

トリレオウイルスの蛋白質分解酵素処理による感染価上昇

高瀬公三[†]・直原良子^{1)*}・岩瀬夏代^{1)**}・山崎憲一²⁾・小尾岳士¹⁾

(付属越境性動物疾病制御研究センター, ¹⁾病態・予防獣医学講座微生物学分野,

²⁾(財)化学及血清療法研究所)

平成23年10月7日 受理

要 約

蛋白質分解酵素処理がトリレオウイルス (ARV) の感染価上昇に及ぼす影響を検討した。トリプシン, キモトリプシンおよびディスパーゼで処理されたARVの感染価を, 鶏腎培養細胞で測定したところ, 約10~100倍の上昇が認められたが, パパイン, カルボキシラーゼおよびトロンビンでは観察されなかった。トリプシン処理による感染価上昇は用いた4株のARV全てで確認でき, この作用はトリプシンインヒビターによって阻止された。また, フィルター濾過試験の結果から, 感染価上昇は酵素作用によるウイルス粒子凝集の解離によるものではないと考えられた。

キーワード: 蛋白質分解酵素, トリレオウイルス, トリプシン, 感染価

緒 言

トリレオウイルス (Avian reovirus: ARV) は直鎖状の2本鎖RNAを有する, 直径約70nmの正二十面体のウイルスであり, レオウイルス科オルトレオウイルス属に分類される[6]。ARVはエンベロープを欠くが, エーテル, トリプシン, 高温 (50℃) および酸 (pH3.0) に強い抵抗性を示す。このウイルスの血清型は11に分類されるとの記載[10]もあるが, わが国では5血清型の存在が報告[3,9]されている。鶏腎培養細胞 (CK細胞) では明瞭な細胞病原性効果 (CPE) あるいはプラックを形成することから, 野外材料からの分離同定は比較的容易である。

ARVは自然界の鳥類に広く分布し, 鶏, 七面鳥, うずら, ガチョウ, アヒルなどから分離される。その名前が示すように, 健康鶏のほか種々の症状を示す鶏の呼吸器や腸管内容から分離されるが, 鶏の代表的なARV感染症はウイルス性髄膜炎/関節炎である。

ARVをトリプシン処理すると培養細胞での感染価が上昇することが, 初めてKawamura *et al.*[3]によって報告された。その後, 魚介類由来レオウイルスにおいても同様な現象が確認された[4]。しかし, トリプシン処理に感受性[1]あるいは感染価が低下[2]するとの報告もある。このようにARVのトリプシン処理による感染価への影響については十分に検討されていない。著者らはARVのトリプシン等の蛋白質分解酵素処理による感染価上昇を検討し, 新たな知見を得たのでここに報告する。

材料および方法

ウイルス: ARVは, 著者らが野外から分離した58-132株[8]および56-168株[7], ならびにKawamura *et al.*[3]の分離代表株であるTS-142株およびUchida株を用いた。これらARVをCK細胞に接種し, 無血清維持培地 (イーグルMEM培地: 日水製薬) で培養し, CPEが約50~80%程度に認められた時点で

[†] : 連絡責任者: 高瀬公三 (付属越境性動物疾病制御研究センター)

Tel: 099-285-8724, E-mail: ktakase@agri.kagoshima-u.ac.jp

²⁾ 財・化学及血清療法研究所: 〒869-8568 熊本市大窪一丁目6-1

^{*} 現) 岡山市保健所 (岡山県岡山市)

^{**} 現) 佐原動物病院 (千葉県香取市)

培養液を回収，その遠心上清を小分け後 -80°C に保存し供試ウイルスとした。ウイルスの希釈にはリン酸緩衝食塩液 (PBS) あるいは細胞維持用培地 (イーグルMEM培地：日水製薬) を用いた。

培養細胞および培地：培養細胞は定法により作製されたCK細胞を用いた。すなわち，SPF鶏群 (財・化学及血清療法研究所) 由来の1～3週齢鶏雛の腎臓を無菌的に採取，細切後0.25%トリプシン液により消化，洗浄後，増殖用培養液で濃度調整し，6穴あるいは48穴プレートに分注， CO_2 孵卵機内で培養した。細胞の増殖用培地 (イーグルMEM培地：日水製薬) には子牛血清を5%になるよう加えたのち，7% NaHCO_3 液でpH調整したものを使用した。細胞の維持用培地は，増殖用培地の子牛血清量を除くか1%に減じたものを使用した。ブラック形成用の一次寒天重層培地は，維持用培地に寒天 (Bacto agar: Difco) を0.9%になるように，また二次重層寒天培地には同様に寒天0.9%およびニュートラルレッドを0.01%になるように加えて使用した。

蛋白質分解酵素およびトリプシンインヒビター：蛋白質分解酵素として次の6種類を使用した。①トリプシン (豚膵臓由来，ナカライテスク) ②キモトリプシン (牛膵臓由来，Sigma) ③パパイイン (Papaya Latex由来/Crude, Sigma) ④デイスパーゼ (*Bacillus polymyxa*由来，三光純薬) ⑤カルボキシペプチターゼ (豚膵臓由来/カルボキシペプチターゼB, Sigma) ⑥トロンビン (牛血漿由来，Sigma)。これらの酵素は蒸留水 (DW) に溶解後，PBSを用いて0.001～1.0%の範囲に希釈し用いた。

トリプシンインヒビターは，トリプシンインヒビター (Wako) 84mgをDW10mlに溶解し，さらにPBSで10倍に希釈後用いた。

感染価測定：培養3日目の6穴プレート内CK細胞の増殖用培養液を吸引除去し，10倍階段希釈されたウイルス液を接種 (0.2ml/穴)， CO_2 存在下で 37°C 60分吸着，その後ウイルス液を吸引除去後PBSで洗浄したのち，一次重層寒天培地を2ml/穴ずつ重層，再び3日間培養した。その後，二次重層寒天培地を2ml/穴ずつ重層し，翌日ブラック数を観察し，感染価 (PFU/0.2ml) を算出した。

実験1 酵素処理による感染価の変動

1-1 異なる酵素液：各濃度に調整した5種の酵素液をARV58-132株に1：1の割合で加えて混和， 37°C 30分間静置した。その後，それぞれの酵素処理

ウイルス液の感染価をPBSで10倍階段希釈しブラック法で測定した。なお，非処理対象として酵素液の代わりにDWを用いた。

1-2 異なるARV：ARV4株 (58-132株，56-168株，TS-142株およびUchida株) のトリプシン処理の感染価への影響を検討した。ARVに1：1の割合で，0.1%トリプシン液を加えて混和， 37°C 30分間静置した。非処理対象として酵素液の代わりにDWを用いた。その後，トリプシン処理あるいは非処理ウイルスの感染価をPBSで10倍階段希釈しブラック法で測定した。

実験2 トリプシンの作用機序解明

酵素のウイルス感染価上昇の作用機序解明の一助とするために，ウイルスは58-132株をまた酵素は感染価上昇が認められた3酵素の内トリプシンを用いて，以下の実験を行なった。

2-1 トリプシンインヒビター (インヒビター) による阻止：インヒビターでトリプシンの酵素活性を阻止することで感染価の上昇が起きないことを確認するための試験として実施した。まず4群 (A～D) を設定し，第一処理として，(A) 0.1%トリプシン+ウイルス，(B) 0.1%トリプシン+ウイルス，(C) 0.1%トリプシン+インヒビター，(D) PBS+ウイルスのそれぞれを1：1で混和し， 37°C 30分処理した。次に，第二処理として，(A) にはPBSを，(B) にはインヒビターを，(C) にはウイルスを，また (D) にはPBSを2：1になるよう加え，再び 37°C 30分処理した。その後それぞれの感染価をブラック法で測定した。

2-2 CK細胞の酵素処理：感染価測定用のCK細胞をトリプシン処理することで感染価が上昇するかを確認するために実施した。CK細胞の培養液を吸引除去し，トリプシン濃度が0.0%，0.01%，0.001%および0.0001%添加された細胞維持用培地を0.2ml/穴ずつ入れ， 37°C 30分間処理した。このトリプシン処理CK細胞を用いて，トリプシン非処理ウイルスの感染価測定を行なった。

2-3 酵素処理ウイルスのろ過：トリプシン処理によってウイルス凝集塊が解離するために感染価が上昇しているかを確認するために実施した。ウイルスに0.1%トリプシン液又はDWを1：1に加えて 37°C 30分間の酵素処理を行なったのち，ポアサイズ0.22又は $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し，得られたろ液の感染価をブラック法で測定した。

結 果

実験1 酵素処理による感染価への影響：酵素処理および非処理にかかわらず、Photo 1に示すように、ARVはCK細胞において円形で明瞭なブラックを形成し、感染価の算出は容易であった。各濃度に調整された酵素処理後の感染価測定の結果はFigure 1に示した。感染価の上昇は酵素の濃度異存的に、すなわちトリプシンで0.01%、キモトリプシンで0.05%およびディスパーゼで0.1%以上の濃度処理で、いずれも約10倍以上の感染価の上昇を認めた。他の3酵素については、濃度にかかわらず感染価は非処理とほぼ同値であり、上昇あるいは低下は観察され

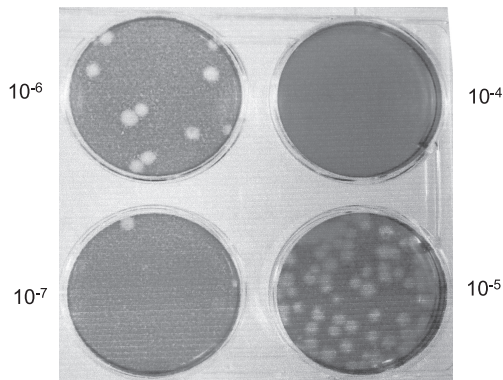


Photo 1. Plaque formation of avian reovirus 58-132 strain treated with 0.1% trypsin on chicken kidney cell cultures
* 5 days post-inoculation; 10^{-4} ~ 10^{-7} : dilution with PBS

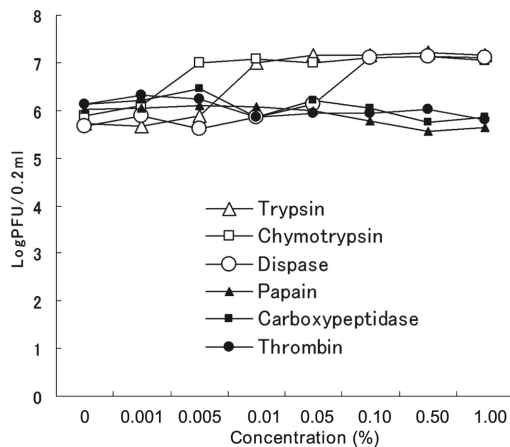


Figure 1. Infectivity titer of avian reovirus 58-132 strain treated with various concentration of 5 proteolytic agents.

なかった。

異なるARV 4株の0.1%トリプシン処理による感染価の影響はTable 1に示すとおりであり、いずれの株においても約10~100倍（指数において1.21~1.92）の感染価の上昇を認めた。

実験2 作用機序解明：インヒビターによるトリプシン作用の阻止の結果はTable 2に示した。ウイルスをトリプシン処理した(A)および処理後にインヒビターを加えた(B)では感染価が上昇したが、トリプシン処理前にインヒビターを加えた(C)においては感染価の上昇は認められなかった。

感染価測定用CK細胞をトリプシンで前処理することの影響を見た結果、非処理CK細胞で測定されたウイルスの感染価は5.89 (logPFU/0.2ml)であったのに対し、0.01%、0.001%および0.0001%トリプシン液で処理されたCK細胞のそれは、測定不能(トリプシンの細胞障害あり)、5.85および5.92であり、ほぼ同値を示した。

トリプシン処理および非処理ウイルスのフィルターろ過後の感染価は、Table 3に示したとおりである。トリプシン処理ウイルスの感染価は非処理ウイルスよりも高くなったが、非処理ウイルスにおいてはフィルターでのろ過によりさらに低値になることはなかった。

考 察

ARVの感染価がトリプシン処理により上昇することは、Kawamura *et al.*[3]によって初めて報告されているが、その後の詳細な検討は行われていない。著者らはキモトリプシンおよびディスパーゼにおいてもトリプシンと同様な感染価上昇の起きることを見出した。ただし、ディスパーゼの効果はその濃度から見ると、トリプシンやキモトリプシンに比べてやや低い傾向であった。各酵素の機能は、トリプシン：アルギニンおよびリジン残基のC末端を加水分解、キモトリプシン：ロイシン残基および芳香

Table 1. Infective titer of four ARV strains treated with 0.1% trypsin

ARV strain	Infective titer (log ₁₀ PFU/0.2ml) after treatment		
	With trypsin	Without trypsin	Difference
58-132	7.12	5.91	1.21
56-168	7.98	6.29	1.69
TS-142	7.51	5.59	1.92
Uchida	7.81	6.06	1.75

Table 2. Inhibition effect by inhibitor on trypsin activity

Group	1 st treatment	2 nd treatment	Infective titer (log ₁₀ PFU/0.2ml)	Difference*
(A)	0.1% trypsin + ARV	PBS	6.61	1.27
(B)	0.1% trypsin + ARV	Inhibiter	6.66	1.32
(C)	0.1% trypsin + inhibitor	ARV	5.11	-0.23
(D)	PBS + ARV	PBS	5.34	

* Difference in infective titer against group (D)

Table 3. Infective titer of ARV 58-132 strain after treatment with trypsin and filtration

Trypsin (0.1%)	Filtration (pore-size: μ m)	Titer (log ₁₀ PFU/0.2ml)
+	0.22	7.74
	0.45	7.46
	—	7.29
—	0.22	6.13
	0.45	5.98
	—	5.89

族アミノ酸のC末端を加水分解，デイスパーゼ：ロイシン-フェニールアラニン結合を特異的に加水分解，パパイン：ロイシン-グリシン結合を加水分解，カルボキシペプチダーゼ：アルギニンおよびリジン残基のC末端を加水分解，トロンビン：アルギニン残基C末端を加水分解，とされているが，本実験で確認された感染価の上昇が必ずしも各酵素の作用部位と関係しているとは思えない。

トリプシンインヒビターを用いた実験では，インヒビターによってトリプシン作用が阻害された場合には感染価上昇は認められなかったことから，蛋白質分解作用に起因した現象であることは確かであろう。

ARVの感染細胞に酵素が作用している場合を想定し，細胞障害を与えない濃度で細胞のトリプシン処理を行ない，その後ARVを接種することで検討してみたが，感染価の上昇は確認できなかったことから，酵素作用はウイルスに直接作用しているものと思われる。

次に，ウイルス粒子が10個以上集って凝集し塊となっている場合に，トリプシンによってそのウイルス粒子が解離するために感染価が上昇すると仮定し，ろ過試験を試みた。すなわち，トリプシン処理ウイルスと未処理ウイルスをフィルターでろ過し，感染価を測定することで，仮に凝集塊が解離されるために感染価が上昇しているのであれば，トリプシン処理していないウイルスは凝集塊のために濾過されず，

感染価は低いはずだと考えた。その結果，0.22あるいは0.45 μ mのフィルターでろ過しても感染価は変化せず，ウイルスの感染価上昇は単に凝集塊の解離によるものではないと考えられた。

トリプシン処理に感受性を示す，あるいは感染価が低下するとの報告[1, 2]もあるが，著者らが検討したARV株は全て感染価が上昇しており，低下するARV株は見つかっていない。トリプシン耐性ARVのほうに難に対する病原性は高いとの報告[2]もある。

トリプシンによって感染価が上昇する機序については解明されていないが，細胞への吸着，侵入に際し，カプシッド表面蛋白質の一部がトリプシン等によって解離されることによって吸着，侵入が促進するのではないかと考えられている[5]。蛋白質分解酵素処理によるARV感染価変動の作用機序をさらに解明するには，今後ウイルスカプシッド表面蛋白質および細胞側レセプターの分子学的機能解析が必要であろう。

引用文献

- [1] Afaleq, A.I. and Jones, R.C.: A trypsin-sensitive avian reovirus: isolation and experimental infection of poults and chicks. *Avian Pathol.*, 20(1), 5-16 (1991)
- [2] Drastini, Y., McKenna, P.K., Kibenge, F.S. and Lopez, A.: Chymotrypsin and trypsin sensitivities of avian reoviruses. *Can. J. Vet. Res.*, 58, 75-78 (1994)
- [3] Kawamura, H., Shimizu, F., Maeda, M. and Tsubahara, H.: Avian reovirus: Its properties and serological classification. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, 5, 115-124 (1965)
- [4] Nason, E. L., Samal, S.K., and Venkataram Prasad, B.V.: Trypsin-induced structural transformation in aquareovirus. *J. Virol.*, 74 (14), 6546-6555 (2000)
- [5] Ni, Y. and Ramig, R.F.: Characterization of avian reovirus-induced cell fusion: the role of viral structural proteins. *Virology*, 194 (2), 705-714 (1993)
- [6] Schiff, L.A. and Nibert, M.L. and Tyler, K.L.: Orthoreoviruses and their replication., pp1853-1915, *Fields Virology*, fifth edition, edited by Knipe D.M. Howley, P.M. et al., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA

-
- (2007)
- [7] 高瀬公三, 西川比呂志, 野中富士男, 山田進二: 脚弱鶏の関節材料からのトリレオウイルスの分離および分離株の性状. 日獣会誌, 37, 374-377 (1984)
- [8] Takase, K., Nishikawa, H., Nonaka, F. and Yamada, S.: Pathogenic characteristics of highly virulent avian reovirus, strain 58-132 isolated from a chicken with tenosynovitis. Jpn. J. Vet. Sci., 47, 567-574 (1985)
- [9] Takase, K., Nonaka, F., Yamamoto, M. and Yamada, S.: Serologic and pathogenetic studies on avian reoviruses isolated in Japan. Avian Dis., 31, 464-469 (1987)
- [10] Wood, G.M., Nicholas, R.A.G., Hebert, C.N. and Thornton, D.H.: Serological comparisons of avian reoviruses. J. Comp. Pathol., 90, 29-38 (1980)

Influence of Trypsin and Other Proteinases on Infectivity of Avian Reovirus

Kozo TAKASE, Ryoko JIKIHARA¹⁾, Natsuyo IWASE¹⁾, Kenichi YAMAZAKI²⁾ and Takesi OBI¹⁾

(*Transboundary Animal Disease Research Center*, ¹⁾*Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Kagoshima University*, ²⁾*The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute*)

Summary

The influence of six proteinases on the infectivity of avian reovirus (ARV) was investigated. Trypsin, chymotrypsin and dispase were effective in increasing the infectivity titer of ARV more than ten times when titrated into cultured chicken kidney cells. However, papain, carboxypeptidase and thrombin were not effective. The increase in the infectivity titer of ARV by trypsin treatment was prevented by adding a trypsin inhibitor. Based on a filtering test, we hypothesized that the increase in the infectivity titer of ARV by enzyme activities did not depend on the aggregation and dissociation of virions. Further investigation is needed to unlock this phenomenon.

Key words: avian reovirus, infectivity, proteinase, trypsin

†: Address correspondence to : Kozo TAKASE (Transboundary Animal Disease Research Center, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

Tel: 099-285-8724, E-mail: ktakase@agri.kagoshima-u.ac.jp

¹⁾ The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute; Okubo 1-6-1, Kumamoto 860-8568, Japan