

## レクチンによる狂犬病ウイルスの凝集

武内 恵理子, 牧野 芳大, 三舟 求真人

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

## Agglutination of Rabies Virus with Lectins

Eriko TAKEUCHI, Yoshihiro MAKINO and Kumato MIFUNE (Department of Virology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

**Abstract:** Wheat germ agglutinin (WGA), concanavalin-A (con A) and ricinus communis agglutinin (RCA<sub>60</sub>) were used to study agglutination of purified HEP-Flury strain of rabies virus. The degree of agglutination was estimated by determining the recovery of infectivity, HA activity and CF activity of the resulting virus-lectin aggregates after incubation of the virus with lectins for 60 min. at room temperature. The aggregates were reversed by N-acetyl-glucosamine for WGA aggregates, by  $\alpha$ -methyl-mannoside for Con A aggregates and by galactose for RCA<sub>60</sub> aggregates before assaying biological activities of the virus. The results showed that the maximum virus agglutination occurred when the WGA and Con A were used at a final concentration of 500 $\mu$ g/ml, and the recovery of the infectivity was 99.98% and 93.3%, respectively. However, when RCA<sub>60</sub> was used at a final concentration of 250 $\mu$ g/ml, the recovery of the infectivity was as low as 1.1%.

The solubilization of the virus glycoprotein was attempted with three different detergents (Triton X-100, NP-40 and saponin) using <sup>3</sup>H-glucosamine labelled virus. Treatment of the virus with Triton X-100 at final concentrations of 0.25% and 2% and with NP-40 at a final concentration of 0.25% resulted in the disruption of more than 85% of the virion, as indicated by the release of radioactive virion subunits. Saponin was not effective in solubilizing the glycoprotein, at least in the present test conditions. These results appear to indicate that the rabies virus glycoprotein may be isolated from the virion either with Triton X-100, or with NP-40, and purified by WGA or Con A affinity column chromatography.

Tropical Medicine, 21(4), 171-177, December, 1979

## はじめに

狂犬病ウイルスエンベロープは、脂質層と3種類の蛋白質より構成されている (Sokol *et al.*, 1971). これらの蛋白質のうち、1つは糖蛋白であり、これはウイルスのスパイク部分を構成しており、中和抗体産生を誘導する唯一のウイルス抗原である (Wik-

tor *et al.*, 1973; Cox *et al.*, 1977). 単離された糖蛋白の種々の性状については、これで免疫された動物は、不活化ウイルスワクチンで免疫された場合よりも、狂犬病ウイルスに対する感染防御効果が高いという報告 (Wiktor *et al.*, 1973; Atanasiu *et al.*, 1976; Cox *et al.*, 1977) 等があるが、今後解明されなければならない不明な点が多く残されている.

また、精製された糖蛋白に対する抗体が得られれば、ウイルス感染過程における糖蛋白の生成、感染細胞表面に出現するウイルス抗原の性状の研究等に非常に有用である。これまで、狂犬病ウイルス糖蛋白の精製には、非イオン性界面活性剤で処理した後、等電点電気泳動法を用いる方法 (Dietzschold *et al.*, 1978)、ショ糖平衡密度勾配法を用いる方法 (Györge *et al.*, 1971) など、種々の方法が用いられてきた。

一方、エンベロープを持つウイルスの多くが、エンベロープの多糖体部分とレクチンとが反応することにより凝集されることが知られている。これまで、ミクソ、パラミクソ及び、アルボウイルス等が Concanavalin A により (Oram *et al.*, 1971; Okada *et al.*, 1972; Becht *et al.*, 1972; Calafat *et al.*, 1972; Birdwell *et al.*, 1973; Yoshinaka *et al.*, 1975; Akashi, 1976)、また、シンドビスウイルスが Ricinus communis agglutinin (RCA<sub>60</sub>) により凝集される (Birdwell *et al.*, 1973) こと等が報告されている。

この研究では、狂犬病ウイルスと二・三のレクチンとの相互作用を調べ、狂犬病ウイルス糖蛋白の精製に、レクチンのウイルス凝集能が利用される可能性について検討した。

## 材料と方法

### ウイルスおよび感染価測定

国立予研、近藤博士から分与された狂犬病ウイルスの HEP-Flury 株を用いた。ウイルスを鶏胎児細胞に multiplicity of infection (MOI) 0.01 focus forming unit (FFU)/cell で感染させ、1時間吸着させた後、0.375% 牛血清アルブミン (BSA) を含むイーグル MEM を加え、37°C、3日間培養し、この培養上澄をウイルス液とした。ウイルスの感染価は Smith *et al.* (1977) の方法で測定した。

### ウイルスの精製

培養上澄を3,000rpm 30分低速遠心して細胞成分を除いた後、7%にポリエチレングリコール6,000、および2.3%に塩化ナトリウムを加えて、4°C一夜培養後、4,000 rpm 30分遠心した。沈澱を少量のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム加ナトリウムトリスバッファー (NTE バッファー) pH 7.8に浮遊させ、これを30%グリセロールクッションの上

にのせて、23,000 rpm 60分 (ベックマン SW 50.1 ローター) 遠心し、沈澱を少量の NTE バッファーに浮遊させた後、セファデックス G-75 カラムでゲル濾過を行った。280nmに吸収のあるフラクションを集め、SW 41 ローターで26,000 rpm 60分遠心した後、沈澱を NTE バッファーで浮遊させ、塩化セシウム密度勾配の上に乗せ、26,000 rpm で150分 (SW 50.1) 遠心した後、ウイルスバンドを採集し、NT バッファーで透析した。

### ウイルスのアイソトープ標識

狂犬病ウイルスを<sup>3</sup>H-グルコサミンでラベルするため、まず細胞にウイルスを MOI 0.01 FFU/cell で感染させ、1時間吸着させた後、0.375% BSA を含むイーグル MEM を加え、37°C で30時間培養した。その後、培養液を<sup>3</sup>H-グルコサミン1.7 μCi/ml および0.375% BSA を含むイーグル MEM に変え、37°C で66時間培養し、その培養液をウイルス液とし、上記と同様の方法で精製した。

### レクチン

小麦胚芽レクチン (WGA)、コンカナバリン A (Con A)、およびヒマレクチン (RCA<sub>60</sub>) はファルマシア・ジャパンの製品を用い、各々を0.01Mリン酸バッファー (pH 7.4) で希釈して使用した。

### ウイルスの赤血球凝集 (HA) 価の測定

一部の反応条件を除き、Clark and Casals (1958) の方法に従った。0.33% 鶯鳥赤血球 (GRBC) は VAD, pH 6.2に浮遊、4°C、30分反応後判定した。また、レクチンの GRBC 凝集能の測定は、ウイルスとレクチンとを入れ替えるだけで、ウイルスの HA 価測定と同様の方法で行った。

### レクチンと精製狂犬病ウイルスとの結合の判定法

精製狂犬病ウイルスと各濃度のレクチンを等量混和し、室温で60分振とうした後、2,500 rpm で20分遠心した。沈澱は NT バッファーで一度洗浄した後、Con A については 0.5 M α-メチル D-マンノシド (α-MM) を、WGA については0.5M, N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を、RCA<sub>60</sub> については1.0 M ガラクトースを加え、レクチンとウイルスとの凝集を解離した後、感染価、補体結合抗原 (CF)、および、赤血球凝集 (HA) 価を測定した。また、遠心上澄についても同様の測定を行った。

## 結 果

### レクチンのガチョウ赤血球凝集能とその阻止

動物の赤血球表面には種々の糖蛋白質が存在し、これがレクチンに親和性があるため、レクチン自身で赤血球凝集反応がおこる可能性がある。従って、ウイルスの赤血球凝集反応をみる場合、レクチンが試料中に含まれる場合は、レクチンによる赤血球凝集反応を予め阻止しておく必要がある。このような意味で、レクチンのGRBC凝集能とその阻止方法について予備的実験を行った。

Table 1は各レクチンがGRBCを凝集する最少有効濃度とその阻止物質、およびその濃度を示したものである。Con Aは1,000  $\mu\text{g/ml}$ でもGRBCを凝集しなかったが、WGA, RCA<sub>60</sub>ではそれぞれ0.25, 1.9  $\mu\text{g/ml}$ の濃度でGRBCを凝集した。

次に、このようなWGAあるいはRCA<sub>60</sub>によるGRBCの凝集を阻止する物質の濃度を検討するため、WGAによる凝集阻止にはGlcNAcを、RCA<sub>60</sub>についてはガラクトースを使用し、それぞれ500  $\mu\text{g/ml}$ の濃度のレクチンによるGRBC凝集を阻止するに充分な阻止物質の濃度を調べた。その結果、WGAによる凝集は0.5M GlcNAcを、RCA<sub>60</sub>による凝集は1.0Mガラクトースを、GRBCを加える前に被検液と等量加えることによって完全に阻止されることが判った。従って、以下の実験でレクチンを試料中に含むウイルス液のHA価測定には、試料

に予めこのような処理を行って、ウイルスのGRBC凝集能を測定した。また、Con Aについては、それ自体では1,000  $\mu\text{g/ml}$ でもGRBCを凝集しなかったが、後述するが、1000 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度でも、ウイルスを凝集する能力はあり、このウイルス凝集塊を解離する $\alpha$ -MMの濃度を記載した。WGA, RCA<sub>60</sub>については、GRBC凝集能を阻止する濃度をウイルス凝集塊の解離に使用した。

### レクチンの精製狂犬病ウイルス凝集能

Table 2は、精製狂犬病ウイルスと種々の濃度の各レクチンとを室温で60分反応させ、遠心した後、その上澄と沈澱中の感染価、HAおよびCF活性を調べたものである。回収率(% Recovery)は上澄と沈澱の総感染価を100として求めたもので、これをグラフにしたのがFig.1である。Con A 500, 250, 125  $\mu\text{g/ml}$ ではそれぞれ沈澱に93.3%, 75.7%, 72.9%の感染価が残存しており、またHA活性は16, 16, 8倍、CF活性は4, 2, 2倍であった。WGA 500, 50, 25  $\mu\text{g/ml}$ では沈澱からそれぞれ99.98%, 97.3%, 84.3%の感染価が回収された。またHA活性は32, 16, 16倍、CF活性は16, 4, 4倍であった。この結果から、Con AよりもWGAの方が狂犬病ウイルスとの凝集力がやや強いことがわかった。またRCA<sub>60</sub>では、感染価、HA活性とも上澄に大部分残っており、RCA<sub>60</sub>の狂犬病ウイルスに対する親和性があまり強くないと思われた。

また、Con Aでの総感染価(上澄+沈澱)の各

Table 1. Agglutination of goose red blood cells with lectins and its inhibition

Lectins	Minimum agglutinating concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Chemicals and the concentration to inhibit the agglutination by 500 $\mu\text{g/ml}$ of lectins
Con A	>1000	0.5M $\alpha$ -Methyl mannose*
W G A	0.25	0.5M GlcNAc
R C A <sub>60</sub>	1.9	1.0M galactose

\* Concentration of  $\alpha$ -MM to reverse completely the aggregate of rabies virus with Con A.

Serial 2-fold dilutions of lectins were mixed with equal volume of 0.33% goose red blood cells (GRBC) suspended in VAD (pH 6.2).

Results were read after incubation of 30 min. at 4°C.

To examine the inhibitory effect of chemicals on the agglutination of GRBC caused by lectins, one drop of lectin was mixed with one drop of serially diluted chemicals and then added with 2 drops of 0.33% GRBC and incubated for 30 min. at 4°C.

Table 2. Binding of purified rabies virions with lectins

Lectin	Final concentration of lectin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		Infectivity titer ( $\text{Log}_{10}$ FFU/ml)	%Recovery	HA titer	CF titer
NONE	—	S*	7.7	99.95	64	16
		P**	4.4	0.05	2	2
Con A	500	S	5.7	6.7	2	2
		P	6.8	93.3	16	4
	250	S	6.2	24.3	2	2
		P	6.5	75.7	16	2
	125	S	6.3	27.1	2	2
		P	6.7	72.9	8	2
WGA	500	S	4.0	0.02	2	2
		P	7.9	99.98	32	16
	50	S	5.3	2.7	2	2
		P	7.2	97.3	16	4
	25	S	6.0	15.7	2	2
		P	7.0	84.3	16	4
RCA <sub>60</sub>	250	S	7.1	98.9	16	4
		P	4.9	1.1	2	2
	125	S	6.8	99.3	16	4
		P	4.7	0.7	2	2
	63	S	6.7	99.2	16	4
		P	4.8	0.8	2	2

\* Supernatant

\*\* Precipitate

Purified virus were mixed with various concentrations of lectins and incubated at room temp. for 60 min. with gentle shaking and centrifuged at 2,500 rpm for 20 min. Precipitates were then washed once with PBS by low speed centrifugation and reversed with 0.5M  $\alpha$ -MM for Con A, 0.5M GlcNAc for WGA and with 1.0M galactose for RCA<sub>60</sub> aggregates. Then infectivity and HA and CF activities both in precipitates and supernatants were assayed.

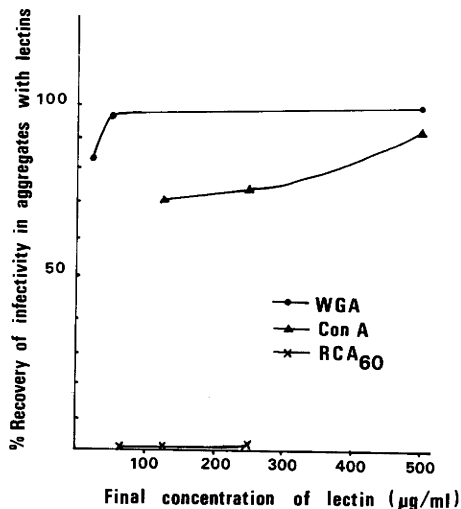


Fig. 1. Agglutination of rabies virus with lectins.

濃度での平均は  $6.3 \times 10^6$ , WGA では  $1.6 \times 10^7$ , RCA<sub>60</sub> では  $8.8 \times 10^6$  FFU/ml であり, Con A および RCA<sub>60</sub> とウイルスとの結合では, ややウイルス感染価の不活化が認められたが, WGA の場合には, ウイルス感染価の不活化は殆んど認められなかった。

#### 狂犬病ウイルスエンベロープ糖蛋白の可溶化

Triton X-100, NP-40, およびサポニン等の界面活性剤を用い, 狂犬病ウイルスエンベロープの糖蛋白の可溶化を試みた. <sup>3</sup>H-グルコサミンで標識した精製狂犬病ウイルスを, Triton X-100, NP-40 の場合は室温で20分間振とう処理を, サポニン処理の場合は, 37°C, 60分間の振とうを行ったあと, SW 50.1ローターで40,000 rpm, 1時間遠心沈澱し, 上澄および少量の NT バッファーに再浮遊し

Table 3. Solubilization of the envelope glycoprotein by treatment of rabies virus with detergents

Detergent	Final conc. (%)	<sup>3</sup> H radioactivity in	
		Sediment	Supernatant
		(% recovery)	
Triton X-100	0.25	12.2	87.8
	2	14.5	85.5
N P-40	0.25	12.6	87.4
Saponin	0.1	81.9	18.1

Purified <sup>3</sup>H-glucosamine labelled rabies virus were treated with NP-40 and Triton X-100 at room temp. for 20 min. With saponin, the virus was treated for 60 min. at 37°C. After centrifugation of treated virus at 40,000 rpm for 1 hr, the radioactivity of supernatant and the sediments resuspended in small amount of NT buffer was measured by liquid scintillation counter.

た沈澱の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

Table 3 は、<sup>3</sup>H 活性で表わした糖蛋白質の量を、沈澱と上澄の合計を100とした時の百分率で示してある。Triton X-100の0.25%および2%では、それぞれ87.8%、85.5%が、また NP-40では、87.4%が上澄の方に溶出してきているのに対して、サポニンでは糖蛋白質はほとんど可溶化されなかった。従って、この実験条件下では、Triton X-100 あるいは NP-40の方がサポニンと比較して、ウイルスのエンベロープ糖蛋白質の可溶化に適していると考えられる。

## 考 察

狂犬病ウイルスは、レクチン特に Con A、および WGA によって非常に良く凝集した。これまで、他のウイルスがレクチンと凝集をおこすと、感染性が低下したという報告 (Yoshinaka *et al.*, 1975) が見られるが、狂犬病ウイルスの場合は凝集阻害剤である、 $\alpha$ -MM および、GlcNAc を加えると、ほぼ完全に感染性は回復し、また HA、CF 活性もやや低下は見られるが、ほぼ回復していた。Con A と WGA とを比較すると、WGA の方が感染価 HA価、CF価とも沈澱から多く回収され、Con A と比較して WGA とウイルスとの結合の方がより強いようである。RCA<sub>60</sub> には、ほとんどウイルスの

凝集能は認められなかった。

Con A の糖蛋白質との結合は、 $\alpha$ -D-グルコース、および $\alpha$ -D-マンノースに、また WGA の結合は、GlcNAc に特異的であると考えられている。Sela *et al.*, (1975) は、マウスリンパ球を用いて、Con A と WGA との結合蛋白質を分離比較し、それぞれの糖蛋白質は全く異なることを示した。しかし、狂犬病ウイルスの場合、予備の実験であるが、Con A で凝集した糖蛋白質も WGA で凝集した糖蛋白質も、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) で、同じ位置にバンドされ、分子量で見るとは全く同一のものであった。現在、狂犬病ウイルスの糖蛋白質は一種類と考えられているが、これら異なるレクチンを結合する糖蛋白質の性状を明らかにすることは興味深いと考える。

界面活性剤によるウイルスエンベロープの可溶化では、Triton X-100 と NP-40 を使用すると、非常に高率に糖蛋白質が分離された。糖蛋白質とレクチンの結合は、非イオン性界面活性剤の存在では影響を受けない (Crumpton *et al.*, 1972) ので、非イオン性界面活性剤でウイルス粒子を可溶化し、糖蛋白質を分離した後、レクチンとの凝集を利用してウイルス糖蛋白質の精製を行うことができると思われる。我々は、ウイルス粒子を Triton X-100 で処理後超遠心し、その上澄に WGA および Con A をそれぞれ 1,000  $\mu$ g/ml に加え、室温で1時間反応させ、生

じた沈澱を低速遠心で回収し、洗浄後、それぞれ 0.5M GlcNAc,  $\alpha$ -MM に浮遊させ、これをPAGE に供した。その結果、糖蛋白は精製ウイルスの糖蛋白と同じ位置にバンドされた。しかし、この方法で回収された糖蛋白にはレクチンが混入しており、このレクチンの混入を防ぐため、現在 WGA をセファロース 4B にカップリングさせ、アフィニティークロマトグラフィーを利用することにより、狂犬病ウイルス糖蛋白を分離精製する方法を検討中である。

### 結 論

狂犬病ウイルスと3種のレクチンの相互作用を調べた結果、狂犬病ウイルスは、小麦胚レクチン(WGA)、およびコンカナバリンA(Con A)によって凝集されるが、凝集能はWGAが最も強く、

次いでCon Aであった。ヒマレクチン(RCA<sub>60</sub>)では、ほとんど凝集されなかった。

ウイルスとレクチンの凝集塊を回収し、WGA、およびCon Aの凝集阻害剤である、GlcNAcと $\alpha$ -MMを加えると、ウイルスの感染性、HA活性、CF活性はほぼ回復した。

<sup>3</sup>H-グルコサミンでラベルされた狂犬病ウイルスを、Triton X-100, NP-40 およびサポニンで処理し、ウイルス糖蛋白の可溶化を試みた。その結果、サポニン処理に比較して、Triton X-100およびNP-40処理により、ウイルス粒子から高率に<sup>3</sup>H活性が遊離されるのが認められ、今後、ウイルスをTriton X-100あるいはNP-40で処理することによって、ウイルス糖蛋白を可溶化し、WGA等レクチンのアフィニティークロマトグラフィーを用いて、ウイルス糖蛋白を分離、精製できる可能性が示された。

### 謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費 No.248169 によって行なわれた。

### 文 献

- 1) Akashi, M. (1976): Study on the basic morphology of Japanese encephalitis virus: The isolation of purified hemagglutinin and the detection of core membrane. *Trop. Med.*, 18(1), 11-28.
- 2) Atanasiu, P.H., Tsiang, P.P. & Favre, S. (1976): Analyse du pouvoir immunogène et protecteur de la glycoprotéine extraite du virus rabique: Comparaison de préparations purifiées par des techniques différentes et résultats. *Microbiol. Inst. Pasteur*, 127B, 257-267.
- 3) Becht, H., Rott, R. & Klenk, H.D. (1972): Effect of concanavalin A on cells infected with enveloped RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 14, 1-8.
- 4) Birdwell, C. R., & Strauss, J. H. (1972): Agglutination of sindbis virus and of cells infected with sindbis virus by plant lectins. *J. Virol.*, 11(4), 502-507.
- 5) Calafat, J., & Hageman, P.C. (1972): Binding of concanavalin A to the envelope of two murine RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 14, 103-106.
- 6) Clarke, D. H. & Casals, J. (1958): Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 7, 561-573.
- 7) Cox, J.H., Dietzschold, B. & Schneider, L.G. (1977): Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infection and Immunity*, 16, 754-759.
- 8) Crumpton, M.J. & Parkhouse, R.M.E. (1972): Comparison of the effects of various detergents on antigen-antibody interaction. *FEBS Lett.*, 22(2), 210.
- 9) Dietzschold, B., Cox, J.H., Schneider, L.G., Wiktor, T.J. & Koprowski, H. (1978): Isolation and purification of a polymeric form of the glycoprotein of rabies virus. *J. Gen. Virol.*, 40, 131-139.

- 10) Györge, E., Mary, C.S. & Sokol, F. (1971): Release of envelope glycoprotein from rabies virions by a nonionic detergent. *J. Virol.*, 8(5), 649–655.
- 11) Okada, Y. & Kim, J. (1972) : Interaction of concanavalin A with enveloped viruses and host cells. *Virol.*, 50, 507–515.
- 12) Oram, J.D., Ellwood, D.C., Appleyard, G. & Stanley, J.L. (1971) : Agglutination of an arbovirus by concanavalin A. *Nature (London) New Biol.*, 233, 50–51.
- 13) Sela, B.A., Wang, J.L. & Edelman, G.M. (1975) : Isolation of lectins of different specificities on a single affinity adsorbent. *J. Biol. Chem.*, 250, 7535–7538.
- 14) Smith, A.L., Tignor, G.H., Mifune, K. & Motohashi, T. (1977) : Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology*, 8, 92–99.
- 15) Sokol, F., Stancek, D. & Koprowski, H. (1971) : Structural proteins of rabies virus. *J. Virol.*, 7, 241–249.
- 16) Wiktor, T.J., Györge, E., Schlamberger, H.D., Sokol, F. (1973) : Antigenic properties of rabies virus components. *J. Immunol.*, 110, 269–276.
- 17) Yoshinaka, Y. & Shiomi, J. (1975) : Agglutination of Japanese encephalitis virus with concanavalin A. *J. Virol.*, 15(3), 671–674.