

D-リボースによるタバコモザイクウイルスおよびバクテリオファージ ϕ X174 の *in vitro* 不活化反応について*

柏村 直樹・佐藤 郁夫・熊澤善三郎・小山 司朗・酒井 昭弘

On *in vitro* Inactivation of Tobacco Mosaic Virus and Bacteriophage ϕ X174 by D-Ribose

Naoki KASHIMURA, Ikuo SATO, Zenzaburo KUMAZAWA,
Shiro KOYAMA and Akihiro SAKAI

緒 言

近年、レダクトン、抗生物質、放射線あるいは酵素(オキシターゼ類)などによるウイルスの *in vitro* 不活化反応および核酸鎖切断反応の研究が盛んに行われている¹⁾。これらの反応では、薬剤の自動酸化で生成する活性酸素ラジカルが重要な役割を演ずると推察されており、薬剤の生物活性の特質を明らかにするためには、ラジカル生成機構の検討、構造-生物活性相関、構造-反応性相関の研究、および各種の酸素ラジカル生成系の比較が重要で興味ある課題となっている。

我々は、これまでにレダクトンより温和な還元力を有する糖質誘導体即ちピラノシドウロース、還元性糖リン酸エステルおよびアルドペントースが緩衝液中、室温でスーパーオキシド(O_2^-)を生成し、 Cu^{2+} の存在により、ウイルスを不活化することを見出した²⁻⁹⁾。これらの糖類誘導体は細胞毒性がなく、また *in vitro* のウイルス不活化反応や核酸鎖切断反応については研究例はほとんどない。糖類は、レダクトン類とくらべて、種々の立体構造、官能基を有する誘導体の調製が比較的容易である。そこで新しいウイルス不活化系としてその性質を明らかにし、また、これまでの還元剤による生体成分損傷反応特にレダクトンによる核酸鎖切断反応と比較検討することは意義のあることと考え、本研究を行った。

本研究では、アルドペントースのなかでタバコモザイクウイルスおよびバクテリオファージ ϕ X174 に対して

最も不活化能が高いことがわかっている⁶⁾ D-リボースについて、スーパーオキシド検出系であるニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元反応の性質と上記両ウイルス不活化反応における金属イオンやラジカル阻害剤の影響を調べることを目的とした。なお、D-リボースなど各種の還元糖によるDNA鎖切断反応が最近森田ら⁷⁾によって報告された。

実験材料および方法

1. 試 薬 類

D-リボースは KOHJIN Co., Ltd. (東京) 製標品(Product 1900)をそのまま用いた。タバコモザイクウイルス(TMV)は文献法に従い⁸⁾、TMVを全身感染させた *N. tabacum* L. var. Bright Yellow から分離精製した標品(TMV-OM, $A_{260}/A_{280}=1.16$)を用いた。 ϕ X174は森田らの方法⁹⁾により調製した。他の試薬類は特に記載のない限り、Sigma Chemical Co.の標品を用いた。

2. TMV の不活化反応と生存率の算出

TMV (70 μ g/ml)、金属イオン、阻害剤の 0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 8.1, 5 ml)に、D-リボースを溶解し、パラフィルムで覆った後直ちに、37°C で0~3時間の反応を恒温水槽中に静置して行った。対照としては同濃度の TMV のみを含む緩衝液を用いた。反応終了後、あらかじめカーボランダムをふりかけたタバコ検定葉 *N. tabacum* c. v. Xanthi n. c. の右半葉(検定区)に反応液を、左半葉(対照区)に対照溶液を綿球を用いて塗布し、水道水で水洗した後、バットに並べサランラップで覆い、蛍光灯照射下 25°C で、2~3日静置培養を行った。TMVの不活化反応の指標には、反応液中の TMV の生

昭和58年6月30日 受理

* 農芸化学科農薬化学研究室、糖質誘導体による植物ウイルスの不活化に関する研究第2報。

存率を用い、これは、検定区、対照区で生成した TMV 局部病斑数を計数し、対照区との比を%で表わした。

3. ϕ X174 の不活化反応と生存率の算出

ϕ X174, 金属イオン, 阻害剤の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.1) を調製し, D-リボースを秤量後直ちに溶解し, アルミキャップで蓋をして, 37°C, 3 時間恒温水槽中に静置して反応を行った。反応液の一定量を取り, 希釈後, *E. coli* C_N 株を指示菌とした寒天重層法¹⁰⁾ により, プラークを計算し, 反応 0 時間のプラーク数に対する 3 時間反応液のプラーク数の比 (%) を生存率とした。また, 阻害剤の阻害率の計算は, 次の式によった。

阻害率 (%)

$$= \frac{\text{阻害剤存在下の生存率} - \text{阻害剤無添加の生存率}}{100 - \text{阻害剤無添加時の生存率}} \times 100$$

4. ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元反応

測定開始 10 分前に, D-リボースを 0.015 M または 0.01 M 炭酸緩衝液 (25°C, pH 10.4) に溶解し, 測定開始直前に同じ緩衝液で調製したニトロブルーテトラゾリウム (NBT) (最終濃度 50 μ M) 溶液, 金属イオン溶液, および阻害剤溶液を加え, 560 nm における吸光度の増加を測定した。還元力は, 25°C の吸光度の増加率 $\Delta A_{560}/\text{min}$ で表わした。反応はすべて開放系で行い, 吸光度は, 最初の 20 分間は直線的に増加した。阻害剤を用いた実験における阻害率の計算は次の式を用いた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{阻害剤存在下の } \Delta A_{560}/\text{min}}{\text{阻害剤無添加時の } \Delta A_{560}/\text{min}} \times 100$$

結 果

Fig. 1 は, D-リボース (10 mg/ml), および Cu^{2+} (10^{-4} M) それぞれ単独の存在下での TMV の不活化反応と両者の共存下での反応の結果を示したものである。生存率の平均値は, 92% (Cu^{2+}), 106% (D-リボース), および 8.5% (D-リボース + Cu^{2+}) であり, 明かに, D-リボースまたは Cu^{2+} 単独では, 対照に対して有意の不活化はみられないが, 両者が共存すると著しく不活化反応が進行することがわかった。第 2 図は, TMV の不活化に及ぼす D-リボースおよび Cu^{2+} の濃度の影響についての実験結果を示したものである。 10^{-4} M の Cu^{2+} の存在下で, 生存率が 10% 以下になるには D-リボース 5 mg/ml (0.033 M) が必要であり, 1 mg/ml 以下では不活化の効率は著しく低下した。一方, Cu^{2+} の濃度は 10^{-6} M

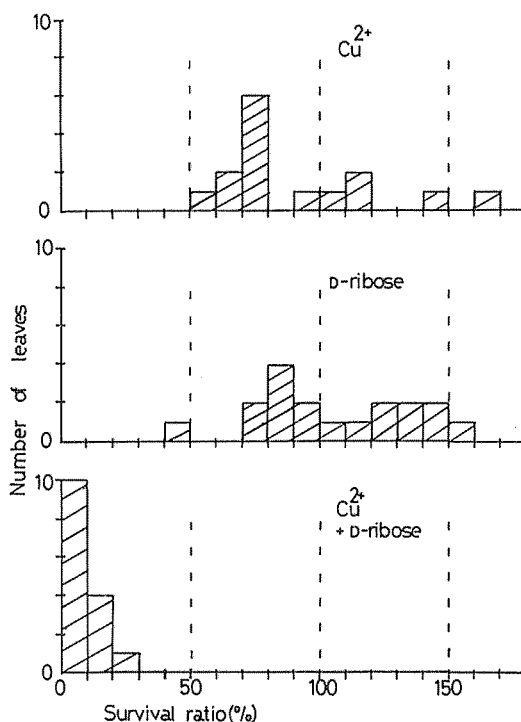


Fig. 1. Inactivation of TMV by D-Ribose and/or Cu^{2+} , Determined by Local Lesion Assay on Half-leaves of *N. tabacum*.

TMV was treated with D-ribose (10 mg/ml) and/or Cu^{2+} (10^{-4} M) at 37° for 3 hr. For other reaction conditions see text.

以下ではほとんど TMV 不活化の促進効果はみられず, 10^{-4} ~ 10^{-5} M で 10% 以下の生存率が観察された。この濃度は, D-リボースに対して 3×10^{-2} ~ 3×10^{-3} モル当量にあたる。以上の結果とこれまでに得られたフラクトース 6-リン酸エステルによる TMV の不活化¹¹⁾, およびピラノシドウロースによる TMV の不活化⁵⁾ の結果をくらべると, D-リボースの不活化能は上記二種の還元糖より小さいことがわかった。

D-リボース (5 mg/ml) と Cu^{2+} (10^{-4} M) 存在下で, バクテリオファージ ϕ X174 は, 著しく不活化されること (生存率 0.1% 以下) はすでに報告したが⁶⁾, 今回, Cu^{2+} の非存在下で D-リボース濃度の影響をしらべたところ, 対照実験 91% 生存率の反応条件下で, 生存率 78.2% (5 mg/ml), 50.8% (20 mg/ml), 44.5% (25 mg/ml), および 42.0% (40 mg/ml) (かっこ内は糖濃度) の生存率が得られた。一方, 糖が存在しない時の Cu^{2+} の

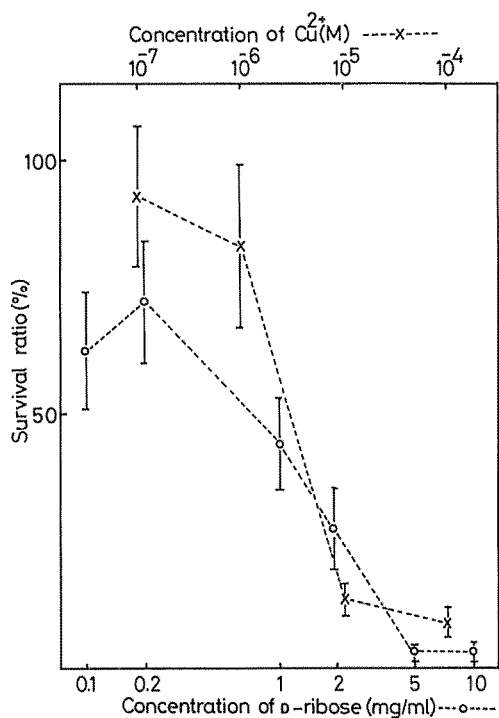


Fig. 2. Concentration Dependence of TMV Inactivation by D-Ribose and Cu^{2+} .

TMV was treated with Cu^{2+} (10^{-4} M) and indicated amount of D-ribose (---○---), or with D-ribose (5 mg/ml) and indicated amount of Cu^{2+} (---×---), at 37° for 3 hr. For other reaction conditions see text.

濃度の影響については、対照実験91.1%生存率の反応条件下で、生存率 73.2% (10^{-4} M), 80.6% (10^{-5} M), 85.7% (10^{-6} M) (かっこ内 Cu^{2+} 濃度) の結果が得られた。

次に TMV および ϕ X174 の不活化が金属イオンの種類によってどのように変わるかを調べた。第3図は、 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} の TMV 不活化促進作用を調べた実験結果を示している。各実験における生存率の平均はそれぞれ、1.9, 94.0, 71.4, 63.6, 74.6%であった。明らかに、 Cu^{2+} のみに D-リボースの不活化を促進する効果が認められた。今回行った実験回数では、 Cu^{2+} 以外のイオン間での有意差は、95% 信頼限界では認められなかった。同じ目的の実験を ϕ X174 について試みたところ、金属イオン 1×10^{-6} M, D-リボース 5 mg/ml における生存率は、 Cu^{2+} , 0.04%; Fe^{3+} , 26.4%; Ni^{2+} , 18.0%; Zn^{2+} , 15.4%; Co^{2+} , 13.8%であっ

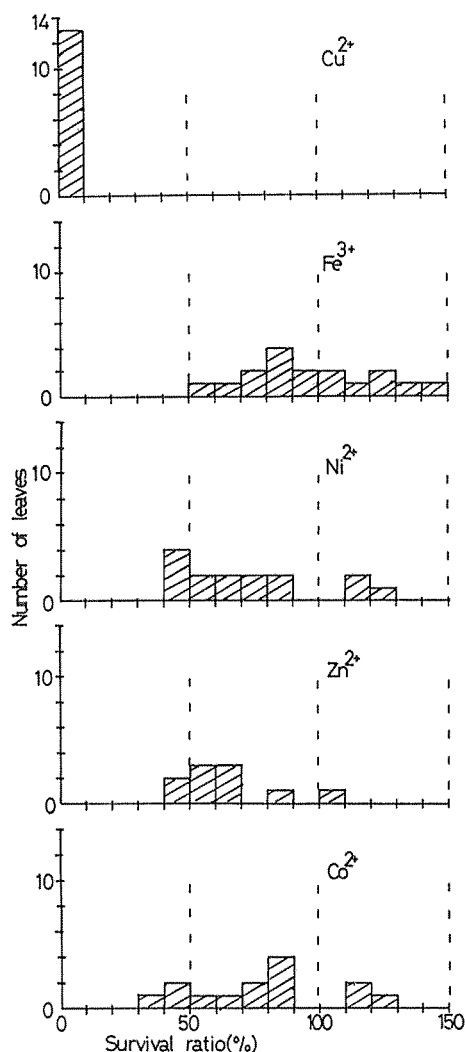


Fig. 3. Effect of Metal Ions on Inactivation of TMV by D-Ribose.

TMV was treated with D-ribose (10 mg/ml) and metal ions (10^{-4} M). Following metal chlorides were used: CuCl_2 , FeCl_3 , MnCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 . For other reaction conditions see text.

た。以上の結果にみられるように、金属イオンの影響は、TMV, ϕ X174 とほぼ平行しており、これまで得られているフラクトース 6-リン酸エステルによる ϕ X174 の不活化の場合³⁾と同じ傾向がみられた。

以上に示した結果とこれまで得られた還元性糖誘導体によるウイルスの不活化反応の性質から、D-リボース- Cu^{2+} 系によるウイルスの不活化は、ウイルスの核

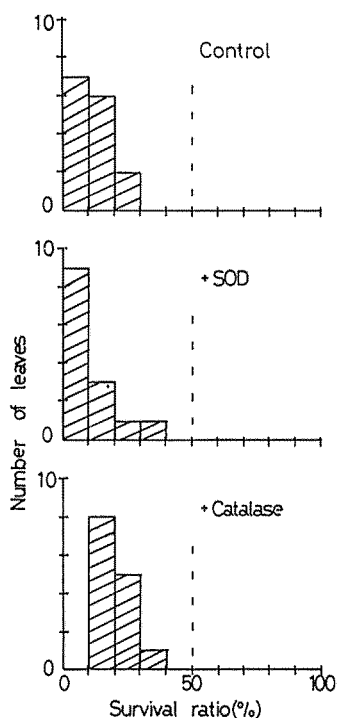


Fig. 4. Effect of Superoxide Dismutase and Catalase on Inactivation of TMV by D-Ribose and Cu^{2+} .

TMV (6.7×10^{-3} mg/ml) was treated with D-ribose (10 mg/ml) and Cu^{2+} (10^{-4} M) in the absence (control) or presence of SOD (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 148 units/ml) or catalase (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 11.6 units/ml). For other reaction conditions see text.

酸が、D-リボースの自動酸化反応で生成した種々の酸素還元種 ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} など) によって損傷をうけるためにおこったことが強く示唆された。そこで、次に、各種のラジカル阻害剤の影響をしらべた。Fig. 4 は、TMV の不活化に対するカタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の影響を調べた結果である。両酵素はそれぞれ、 H_2O_2 および $\text{O}_2^{\cdot-}$ の特異的阻害剤と考えられ、対照区、SOD 添加区、およびカタラーゼ添加における平均生存率は、それぞれ、12, 9, 18%であった。対照区 SOD 添加区間では、有意の差はみられなかったが、対照区カタラーゼ添加区間では有意差は小さいが認められた (95%信頼限界)。Table は、D-リボース- Cu^{2+} による ϕX174 の不活化に対して、各種酸素ラジカル阻害剤の影響を調べた結果を示したものであ

る。チロンは、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の¹²⁾、DABCO は一重項酸素の¹³⁾、D-マニトールおよび sodium formate は水酸ラジカルの¹⁴⁾、特異的阻害剤と考えられているものである。また、thymidine および thymidine 5'-monophosphate は、核酸構成成分として添加した。実験は特定濃度の阻害剤について行ったが、DABCO およびカタラーゼの添加効果より不活化反応において、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 が関与していることを示している。カタラーゼおよびチロンの効果は、フラクトース 6-リン酸エステルによる不活化 (Cu^{2+} 非存在下)²⁾ においても認められた。水酸ラジカル阻害剤によっては全く阻害されなかったが、この結果もこれまでの糖リン酸エステル、ピラノシドウロースについての結果^{2,3)} と同じである。

ウイルス不活性化能や酸素ラジカルによる高分子損傷反応と糖の構造との相関性について調べるには、酸素ラジカル種の分布や発生速度を知る必要があり、我々のこれまでの一連の研究では、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成反応をひとつの指標としてきた。糖リン酸エステルのウイルス不活性化能は、pH 10.4 で測定した NBT 還元速度とよく相関したので、本実験においても NBT 還元反応について検討し

Table. Effect of Catalase, Superoxide Dismutase, Radical Scavengers, and Some Organic Compounds on ϕX174 Inactivation by D-Ribose and Cu^{2+} .

enzymes or compounds	concentration	survival ratio (%)
catalase*	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40.0
SOD**	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.02
tiron***	10^{-2} M	82.9
DABCO****	10^{-1} M	0.0
D-mannitol	10^{-1} M	0.0
sodium formate	10^{-1} M	0.0
thymidine	10^{-3} M	0.0
thymidine 5'-phosphate	10^{-3} M	0.0

ϕX174 (3×10^7 p. f. u./ml) was treated with Cu^{2+} (10^{-4} M) and D-ribose (5 mg) in the absence or presence of radical scavengers. Survival ratio for control was $5.1 \times 10^{-4}\%$. For other reaction conditions see text.

* EC 1. 11. 1. 6, bovine liver, ** superoxide dismutase, EC 1. 15. 1. 1, bovine blood, *** 4, 5-dihydroxy-1, 3-benzenedisulfonic acid disodium salt, **** 1, 4-diazabicyclo [2. 2. 2] octane.

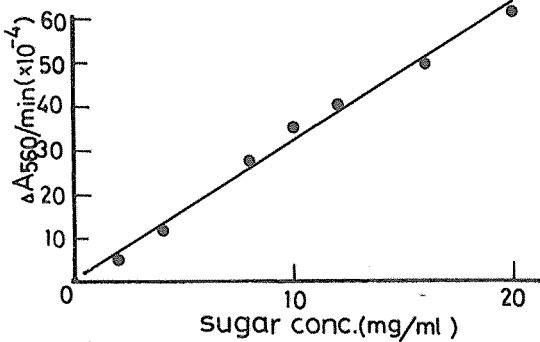


Fig. 5. Rate of Reduction of NBT in Sodium Carbonate Buffer (0.01 M, pH 10.4) at 25°, as a Function of the Concentration of D-Ribose.

Reaction mixtures contained the indicated concentrations of D-ribose and 50 μ M NBT, and were equilibrated with air. For other reaction conditions see text.

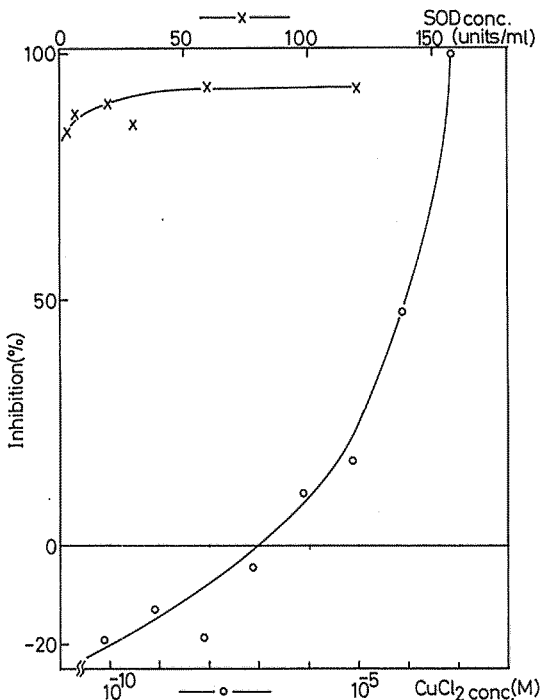


Fig. 6. Inhibition by SOD or Cu^{2+} of Reduction of NBT by D-Ribose in Sodium Carbonate Buffer (0.01 M, pH 10.4) at 25°.

た。アルドペントース 4 種の pH 8.1 および pH 10.4 の NBT 還元力 ($\Delta A_{560}/\text{min}$) がウイルス不活化能と相関することはすでに報告した⁹⁾ ので、今回はさらに、糖濃

度依存性と SOD および Cu^{2+} による阻害をしらべた。Fig. 5 は、 Cu^{2+} 非存在下の NBT 還元反応、Fig. 6 は、SOD および Cu^{2+} による阻害をしらべた結果を示している。D-リボースの還元力は、20 mg/ml (0.13 M) まで、直線的に増大し、D-リボース 5-リン酸エステル²⁾ やピラノシドウロース⁵⁾ にくらべると極めて小さかった。Fig. 6 に示されているように、NBT 還元反応は SOD によって約 90% 阻害され、 O_2^- による還元反応であることが確認された。 O_2^- と非特異的に反応すると思われる Cu^{2+} ¹⁴⁾ では阻害が認められたが、低濃度の Cu^{2+} では若干の反応促進が観測された。

考 察

通常の還元性アルドースは、ウイルスやファージに対して、また、その宿主細胞に対して *in vitro*, *in vivo* とも不活化作用や毒性を有しないが、*in vitro* においては、分子内にリン酸エステルやケトンを導入した場合^{2,5)}、緩衝液にリン酸イオンが含まれている場合³⁾ 又は、 Cu^{2+} が共存する場合に、宿主内増殖能が低下し、その原因がウイルス核酸の切断にあること³⁾ が、これまで示されてきた。アルドペントースはアルドヘキソースより一般に還元力が大きく、また D-リボースは 4 種のアルドペントース中最も還元力が大きい。D-リボースが TMV の RNA や外被たん白または宿主細胞に対して特異的な相互作用をすることはこれまでに報告されていないので、以上の事実と本実験の結果から、D-リボースによって Cu^{2+} の存在下、ウイルス核酸鎖の切断がおこることが強く示唆される。今後、不活化した TMV の RNA の分析を行って確認したい。TMV と ϕ X174 の D-リボースに対する感受性の違いについては、ウイルス粒子の形態とウイルス核酸の種類の違いが原因と考えられるが、生物活性測定法も異なるので現時点でははっきり結論できない。フラクトース 6-リン酸エステルによる各種ファージの不活化実験では、ファージの種類によって不活化能がかなり異なることが報告されている¹⁵⁾。

本実験の不活化反応が Cu^{2+} によって促進されることは、酸素ラジカルによる核酸の損傷反応がおこっている 1 つの証拠と考えられる。その機構として Haber-Weiss 型の反応が考えられるが¹⁶⁾、 Fe^{3+} の効果があまり認められなかったことから、我々はむしろ、 Cu^{2+} が D-リボースの自動酸化反応に関与しているのではないかと考

えている。例えば、直鎖型 D-リボースから生成するエンジオールが Cu^{2+} と complex を形成して、 O_2 の一電子または二電子還元を容易にしている機構である。今後、D-リボースの各種置換体を用いて検討する予定である。本不活化反応に対するカタラーゼおよび SOD の効果は、還元糖- Cu^{2+} 系によるウイルス不活化に共通の特徴と考えられる。不活化能が NBT 還元力即ち O_2^- の生成能と相関するが、SOD による不活化の阻害が少ないので、 Cu^{2+} が存在する場合は、 H_2O_2 の生成反応が主体とも考えられるが、前述の糖- Cu^{2+} - O_2 の complex による O_2^- の生成系で SOD が有効に作用するかどうかかわからず、今後さらに検討する必要がある。 ϕX174 の不活化実験で、DABCO の効果が認められなかったが、この結果は、フラクトース 6-リン酸エステルを用いた実験結果と対照的であり、原因は明らかでない。

今回の実験によって Cu^{2+} の非存在下、D-リボースが微弱ながら O_2^- を生成することが確認された。この反応における中間体として、前述のエンジオールが考えられる。アルドースが無触媒塩基性の条件¹⁷⁾ で酸素の一電子還元をおこすのは興味深い結果であり、NBT 還元反応が低濃度の Cu^{2+} によって若干促進されたことはひとつの傍証となるが¹⁷⁾、今後、さらに ESR を用いて確認する必要がある。

要 約

還元性糖類のウイルス不活化作用の機構を解明するため、D-リボースによる、タバコモザイクウイルス (TMV) とバクテリオファージ ϕX174 の *in vitro* 不活化およびニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の還元が研究された。TMV と ϕX174 は、 10^{-4} M の Cu^{2+} の存在下、D-リボースによって効率よく不活化された。しかし、他の金属イオン、例えば Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} は不活化を促進しなかった。

不活化反応は、カタラーゼまたはチロンで阻害されたが、このことは、不活化が、D-リボースの自動酸化で生成した酸素ラジカルによってウイルス核酸の生物活性が失われたためであることを強く示唆した。NBT 還元反応がスーパーオキシドジスムターゼによって阻害されることわかるように、D-リボースは、スーパーオキシドを生成することが見出された。また、D-リボースの NBT 還元速度は D-リボース 5-リン酸エステルやピラノシドウロースの速度よりもかなり遅いことがわかった。

本実験で得られたデータとこれまでの研究で得られた結果から、本ウイルス不活化作用の可能なメカニズム (複数) が推察されたが、そのなかで、D-リボースの自動酸化における Cu^{2+} の関与および酸素の一電子還元においてエンジオールの中間体としての寄与が考察された。

引用文献

- 1) a) BRAWN, K. and I. FRIDOVICH: Arch. Biochem. Biophys., 206, 414, 1981; b) BRAWN, K. and I. FRIDOVICH: Autoxidation in Food and Biological Systems (Ed. by M. G. SIMIC and M. KAREL), Plenum Press, New York, p. 429, 1980.
- 2) KASHIMURA, N., J. MORITA, and T. KOMANO: Carbohydr. Res., 70, C3, 1979.
- 3) MORITA, J., N. KASHIMURA, and T. KOMANO: Agric. Biol. Chem., 44, 883, 1980.
- 4) 柏村直樹, 熊澤善三郎, 小山司朗, 北川 優, 佐藤郁夫, 森田潤司, 駒野 徹: 第 5 回糖質シンポジウム講演要旨, p. 70, 1982.
- 5) KASHIMURA, N., M. KITAGAWA, Z. KUMAZAWA, S. KOYAMA, I. SATO, and K. NOBA: Carbohydr. Res., 105, C5, 1982.
- 6) KASHIMURA, N., I. SATO, Z. KUMAZAWA, H. KUNO, S. KOYAMA, and M. KITAGAWA: Agric. Biol. Chem., 46, 2407, 1982.
- 7) MORITA, J., and T. KOMANO: Agric. Biol. Chem., 47, 11, 1983.
- 8) 岡田吉美: 生化学実験講座 2, 核酸の化学 III (日本生化学会編, 東京化学同人) p. 516, 1977.
- 9) MORITA, J., T. NISHIDA, and T. KOMANO: Agric. Biol. Chem., 41, 567, 1977.
- 10) ADAMS, M. H., Bacteriophages, Interscience, New York, p. 450, 1959.
- 11) 柏村直樹, 久野宏和, 熊澤善三郎, 小山司朗, 野場和徳: 昭和 56 年度日本農芸化学大会講演要旨, p. 166, 1981.
- 12) MILLER, R. W. and U. RAPP: J. Biol. Chem., 248, 6084, 1973.
- 13) OUANNÈS, C., and T. WILSON: J. Am. Chem. Soc., 90, 6527, 1968.
- 14) 浅田浩二: 生化学, 48, 226, 1976.
- 15) MORITA, J., T. OKUGAWA, and T. KOMANO: Agric. Biol. Chem., 46, 279, 1982.
- 16) FRIDOVICH, I.: Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biochemistry (Ed. by M. A. J. Rodgers and E. L. Powers), Academic Press, New York, p. 201, 1981.
- 17) 松浦輝男, 酸素酸化反応, 丸善株式会社, p. 329, 1977.

Summary

In vitro inactivation of tobacco mosaic virus (TMV) and bacteriophage ϕ X174, and reduction of Nitro Blue tetrazolium chloride (NBT), by D-ribose were studied for the elucidation of the reaction mechanism of virus inactivation by reducing sugars. TMV and ϕ X174 were effectively inactivated by D-ribose in the presence of Cu^{2+} (10^{-4} M), but other metal ions such as Fe^{3+} , Mn^{2+} , and Zn^{2+} did not stimulate the inactivation.

The inactivation reactions were inhibited by catalase or tiron. This fact strongly suggested that the inactivation is due to the loss of biological activity of the virus nucleic acids caused by oxygen radicals generated by the autoxidation of D-ribose. It was found that D-ribose generates superoxide as revealed by inhibition by superoxide dismutase of NBT reduction, and that the rate of NBT reduction is much slower than those of D-ribose 5-phosphate and pyranosiduloses.

From the present data, together with previously obtained results, possible mechanisms for the virus inactivations were proposed in which contribution of cupric ion to the autoxidation of D-ribose and the intermediacy of endiolate anion in univalent reduction of oxygen by D-ribose were discussed.