Osaka University Knowledge Archive

Title	パラインフルエンザウィルス(HVJ)外被の再構成
Author(s)	清水, 一史
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/227
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

（　　）

論文題目

パラインフルエンザウイルス（HVJ）外被の再構成

清水一史

大阪大学大学院　理学研究科
生理学専攻　博士課程

昭和46年　2月20日

目次

緒論 1

材料と方法 5

実験成績

I. HVJウイルス粒子外被 subunitsの可溶化 13

II. HVJウイルス粒子外被の再構成 22

III 再構成外被の諸性質 36

考察 40

要旨 48

謝辞 49

文献 50

図表の説明 53

写真の説明 60

図表

写真

緒論

パラインフルエンザ・ウィルスはRNAを含む核蛋白 nucleocapsids とそれを包むスパイクを持った外被によって構成されている（Horne & Waterson. 1960; Hosaka. et al 1961; Waterson. et al 1961; Rott & Schäffer. 1961; Hermodsson, & Waterson 1962; Choppin & Stockenius, 1964）。

nucleocapsids は巾 180 Å, ピッチ 50 Å, 単位長さ 1 μ の螺旋構造をしている（Choppin & Stockenius, 1964; Hosaka. et al 1966; Compans & Choppin. 1967; Hosaka. 1968; Hosaka & Shimizu. 1968; Kingsbury & Darlington. 1968）。

外被には血球凝集能, neuraminidase 活性, 溶血能, そして細胞融合能が結合している（Okada. 1958; Chanock et al 1961; Hsiung. et al 1962; Choppin. 1964; Holmes & Choppin, 1966）。

このウィルス粒子の増殖の最終段階においては細胞質で形成された nucleocapsids が細胞膜下に移行し, 最後に細胞膜を被って発芽形式により細胞より放出され, 感染性ウィルス粒子

が完成される（Bang. 1953 ; Berkaloff. 1963 ; Compans et. al. 1966 ; Nakai & Imagawa 1969）。発芽に先立ち、細胞膜の蛋白はウイルス特有のものに変換される（Morgan & Howe. 1966 ; Blough et al 1967 ; Klenk & Choppin. 1970）。

外被に結合している各活性の形態学的同定、またそれらの活性のウイルス増殖過程において果す機能、外被とnucleocapsidsの結合の機構などは現在まだ確立されていない。外被をそのsubunitsに解離し、各活性単位を分離できれば、またそれらの単位から外被が再構成できれば、それはこれらの問題解明への有力な手段を提供すると考えられる。

最近、パラインフルエンザウイルスと一緒にミキソウイルスに分類されるインフルエンザウイルスで、血球凝集蛋白とneuraminidase蛋白が分離、同定された（Laver. 1964 ; Laver & Webster. 1968 ; Webster et. al. 1968 ; Laver & Valentine 1969）。しかしこの成績は血球凝集蛋白とneuraminidase蛋白とが、それぞれ別の株

のインフルエンザウイルスから調製されたものについて得られたこと，蛋白の分析がないこと，またneuraminidaseは蛋白量としては微量の構成要素であることが報告されたこと（Drzeniek, et. al 1968 ; Haslam, et. al 1970）などを考えると，この同定はまだ確定したものではないと思われる。

ここに示す研究は，外被のsubunitsへの解離と，解離したsubunitsの外被への再構成に関するものである。アルカリ・エマゾール処理（Hosaka, 1968）はnucleocapsidsの単離精製の方法として非常に有効なものであるが，最近，インフルエンザウイルスにおいて外被の活性単位を失活させずに分離するのにも使えることが見出された（Webster & Darlington, 1969）。HV丁外被はこの処理によって6〜10Sのsubunitsに解離した。ゲル沪過によりエマゾールを除去すると，解離していたsubunitsは外被を再構成した。再構成外被は，血球凝集能，neuraminidase活性，溶血能，そして細胞融合能を持ってい

た。これらの事実は前記諸問題の解明の一つの糸口になると思われる。

材料と方法

1 ウイルス

ウイルスはHemagglutinating Virus of Japan（HVJ）Z株を用いた。ふ化鶏卵（10日卵）の漿尿腔内にブイヨンで100倍に希釈した感染漿尿液0.2 mlを接種し，35°C 72時間培養した後，感染漿尿液を採取した。この感染漿尿液から分別遠心法（毎分2500回転、20分と毎分20000回転、30分遠心）によりウイルスを精製し、0.15M塩化ナトリウム，0.015Mクエン酸ソーダ（SSC）に浮游して低温で保存した。電気泳動による蛋白の分析を行う場合は，更に蔗糖濃度勾配遠心（15～30%W/V 毎分15000回転50分遠心）により精製したウイルスを用いた。

2 アルカリ・エマゾール処理

SSCに浮游した精製ウイルスを遠心により集め、0.02M炭酸緩衝液（pH、10）に再浮游し、室温で1時間放置した後、0.01～0.20 mg/ml エマゾール1130（ポリオキシエチレン・ソルビタン・モノラウレート，KAO-ATLAS K.K

)を加え、20°C、1～2時間処理した。ウイルスの破壊は濁度（$OD_{550m\mu}$）の減少により測定した。これを毎分40,000回転、45分間遠心し、nucleocapsidsや半壊粒子を沈澱させ、上澄の上方約4/5を注射器で取り出して可溶化外被とした。

3 赤血球凝集能の測定

Salk（1944）の方法で行った。SSCで2倍階段希釈した試料0.5mlに、1%の鶏赤血球（0.0025Mリン酸緩衝液、PH 7.0, 0.85%塩化ナトリウム—PBSに浮游）を0.25ml加え室温1時間放置した後、赤血球凝集（HA）を観察した。HA価は赤血球凝集がみられた最終希釈の逆数で示した。

4 HA抗原の定量

HA抗原が単離すると、吸着部位が一価になりHAを示さない。こういうHAを示さないようなHA抗原をHA阻止抗体の消費量によって定量した（Webster AND Darlington, 1969）。SSCで2倍階段希釈した試料0.5mlに

4HI/0.1ml の抗HVJ抗体を0.1ml加え、室温で20分間振盪した後、4HA/0.1ml のHVJを0.1ml加え再び室温で20分間振盪し、最後に1%鶏赤血球を0.25ml加え室温1時間静置した後、HAを観察し、HAを示す最高希釈の逆数をHI blocking価とした。

5 neuraminidase（Nase）活性の測定

試料0.1mlにfetuin（5mg/ml）を0.2ml加え37°C 20分間置いた後、解離してきたN-acethylneuraminic acidをWarren（1959）の2-thiobarbituric acid法で呈色させ、12Nの塩酸を5%含むn-butanolで色素を抽出した（Aminoff, 1961）。これのOD549 mμをNase活性とした。試料が蔗糖を含む場合はPBSに透析した後、測定した。

6 溶血能（HL活性）の測定

試料0.2mlに1.5%鶏赤血球を1.8ml加え、37°C 1時間反応させた後、毎分2000回転、5分間遠心して、解離して上澄にくるヘモグロビンを分光光度計でOD540 mμを測定して定量した。

7 蛋白質の定量

蛋白質の定量はLowry (1951) の方法で測定した。牛血清アルブミンで標準曲線を作った。蛋白質が微量の場合は OD_{230} mμ を測定した。

8 細胞融合能

KB細胞 (Dr. TAKAHASHI 提供)、又はLLC-MK2細胞を10%仔牛血清を含むEagles' MEMで分散し、その2mlをスライド・カバーグラスを入れたレイドン試験管にまき、37℃1日培養して、カバーグラス上に宿主細胞の単層を作り、PBSで一度洗ってから、試料0.75mlと4%仔牛血清を含むEagles' MEMを0.75ml加え、3時間37℃で静置培養した。そしてPBSで3回洗いブアン氏液(飽和ピクリン酸水溶液15ml, フォルマリン原液5ml, 氷酢酸1mlで、室温30分以上固定し、核をヘマトキシリンエオジンで染色し光学顕微鏡で多核細胞の有無を観察した。

9 蔗糖濃度勾配沈降遠心法

試料と同じ溶媒に溶かした5%と20% (W/V

)の蔗糖から density gradient making device (日立)で5%から20%の直線的な蔗糖の濃度勾配を持つ5mlのカラムを作り、その上に試料0.5mlを静かに重層して、SW39ローター、またはSW50ローターで、毎分35000回転1時間、または毎分50,000回転4時間遠心し、底に穴を開けて一定滴数ずつ分注した。沈降係数を測定する時は、7Sのウサギのγ-グロブリン(抗インフルエンザA2抗体)を0.15mlとカタラーゼ(500μg/ml)を0.05mlを試料と混合し遠心を行い各フラクションのインフルエンザA2に対する血球凝集抑制価(HI価)、カタラーゼ活性を測定して、それらの活性のピークを求め沈降係数とフラクションの関係を示すグラフを書き、それにより試料の沈降係数を求めた(Martin & Armes 1961)。

10 ポリアクリルアミド電気泳動

Maizel (1966), Maizel et al (1968) の方法に従って行った。試料は、1%ラウリル酸ソーダ(SDS)、1%2-メルカプトエタノール

(ME)で100℃、1分間処理し、0.1%SDS、0.1%ME、15%蔗糖、0.01Mリン酸緩衝液(PH 8.3)に一晩透析した。ゲルは0.525×6cmのガラス管中に作られ、最終濃度で、7.5%アクリルアミド、0.21%N,N'-メチレンビスアクリルアミド、0.05%(V/V) N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、0.075%過硫酸アンモニウム、0.1%SDS、0.1M第2リン酸ソーダを含む。泳動用緩衝液は、0.1%SDS、0.1M第2リン酸ソーダを使った。試料を泳動する前に5mA 1時間泳動して過剰の過硫酸アンモニウムを除去した。透析した試料0.1mlをのせ5mA、4~5時間、泳動後、泳動した。ガラス管よりゲルを押し出し20%スルホサリチル酸に浸して一晩固定した。0.25%コマジーブリリアントブルーR250中で3時間蛋白を染色し、7%酢酸で洗い過剰の色素は落した。染色パターンはOD 570mμを島津のデンシトメーターにより測定して表わした。分子量の算定には、標準蛋白としてチトクロームC(12400)、トリプシン(23800

)、RNase (13600)、牛血清アルブミン (65000 ~ 70000) を用いた (Shapiro et al 1967)。

11 ゲル沪過

i Bio-gel A 15m (Bio-Rod 社) を Pharmacia 社製のゲル沪過用カラムに充塡して直径 2.7 cm、長さ 28 cm のゲルカラムを作った。緩衝液は 0.05% エマゾールを含む炭酸緩衝液 pH 10.0 と PBS (0.0025M, 0.85% 塩化ナトリウム pH 7.0) の2種類を使った。

ii Sephadex G 200 (pharmacia 社) 5g を 300ml PBS 中で充分に膨潤させ、脱気した後、pharmacia 社製のゲル沪過用カラムに充塡して直径 2.7 cm、長さ 36 cm のゲルカラムを作製した。緩衝液は Bio-gel と同様な2種類を用いた。

iii いずれの場合も間隙容積は HVJ ウイルス粒子とブルーデキストラン、カラム内で溶媒の占める容積は、炭酸緩衝液で測定した。

12 電子顕微鏡

試料を支持膜にのせ、自然乾燥させてから再蒸留水で2回洗い、1% 酢酸ウラニールを

1滴のせ、余分な酢酸ウラニールを口紙で吸い取り、乾燥を待って電子顕微鏡で観察した。支持膜は400メッシュにコロジオン膜をはり、薄くカーボンコートしてglow dischargeしたものを使った。

実験成績

I HVJウイルス粒子外被subunitsの可溶化

1 アルカリ・エマゾール1130処理によるHVJウイルス粒子の破壊。

アルカリ・エマゾール処理によってHVJは破壊されることが知られているが（Hosaka Y.1968）ここでは特に外被に対する影響を調べた。炭酸緩衝液（0.02M, PH10.0）に浮遊したHVJ 0.96 mlに5%エマゾール0.4 mlを加え種々の時間に濁度を測定して、アルカリ・エマゾール処理によるウイルス粒子の破壊の時間的な進行を追跡した。エマゾールを加えると直ちに急激な濁度の減少が起った。5分以後40分までなだらかな減少が続き、40分以後は極わずかな減少が見られた（図1）。エマゾール濃度の影響をみるため、濁度0.69（OD 550 mμ）のウイルス試料0.9 mlに種々な濃度のエマゾール0.1 mlを加え、2時間処理した後、濁度、赤血球凝集能（HA活性）、赤血球凝集抗原量（HI blocking活性）、neuraminidase活性（Nase活性）を測定

した。また2時間処理後の各試料から0.5 mlを取り2.5 mlの炭酸緩衝液を加えて毎分40,000回転45分間遠心し上澄の上方1 mlを取り出し、そのHA活性，HI blocking活性，Nase活性，蛋白量を測定した。

濁度の減少はエマゾール最終濃度0.005%から始まり0.2%でプラトーに達した（図2）。プラトーにおいても処理前の濁度の約1/3が残っていたが、これは主としてアルカリ・エマゾール処理によってはとんど壊れないnucleo-capsidsによると思われる。HA活性，HI blocking活性，Nase活性はいずれのエマゾール濃度の処理によっても有意な変化は見られなかった。40,000回転45分間遠心の上澄に来るHA活性，HI blocking活性，Nase活性，蛋白量はエマゾール濃度0.2%，0.5%で著しく増加した（図2）。この濃度は濁度の減少がプラトーに達する濃度と一致した。このことはアルカリ・エマゾール処理によるウイルス粒子外被の断片化がかなり均一に進行することを示してい

る。

2 HVJウイルス粒子外被の可溶化分画

電子顕微鏡による観察では外被はほぼ完全に破壊されていたが、このことを沈降係数の測定によって確認した。

最終エマゾール濃度0.2%で2時間処理した試料を毎分50,000回転4時間蔗糖濃度勾配(0.05%エマゾールを含む)沈降遠心し、HA活性、HI blocking活性、Nase活性、蛋白量の分布を測定した。蛋白量の約1/2は沈澱したが、活性は1/20以下しか沈澱しなかった。HA活性は大部分がfr.1〜4に来てfr5〜9に来たものは約1/10であった。HA活性とは逆にHI blocking活性、Nase活性、沈澱しなかった蛋白量の約3/4はfr.5〜9に来て、fr.1〜4に来たのはわずか1/4であった(図3a)。この遠心条件で7Sのγグロブリンはfr.7に、11Sのカタラーゼはfr.5に来る。濃度勾配沈降遠心において沈降係数は沈降距離に比例する(R.G.Martin & B.N.Armes 1961)として算定するとHI blocking

活性、Nase活性の高い部分は5～11Sになった。外被はアルカリ・エマゾール処理によって大部分が沈降係数5～11Sのものに解離することが示されたがこれは電子顕微鏡による所見と一致する。

各フラクションのHI blocking活性当りのHA活性を図3-bに示す。15～20Sあたりで、HI blocking活性当りのHA活性が最も高い。アルカリ・エマゾール処理によってHA活性が変化しなかったが、これは5～11Sになって低下する活性と、15～20Sになって上昇する活性とがちょうど見合ったためだと考えられる。アルカリ・エマゾール処理した試料から11S以上の沈降係数を持った構造物を簡単に除くために毎分40,000回転で45分間遠心し、上澄の上方4/5を注射器で取った。この分画を図3-aと同じ条件で濃度勾配沈降遠心にかけた。HI blocking活性、Nase活性、HA活性共に5～11Sに分布していて（ピークは約8.7S）、図3-aで見られた20Sあたりの高いHA活性は

見られなかった。沈澱した蛋白量も少なく、上述の操作によってnucleocapsidsやHA活性の高い20Sあたりの構造物は除かれることが示された(図4a)。この分画を外被の可溶化分画とした。120,000 HA/mlのウィルスをエマゾール濃度0.5%で2時間処理した場合、可溶化分画にはHA活性の5%、HI blocking活性の30%、Nase活性の36%、そして蛋白量の32%が回収された。([illegible])。

3 可溶化外被蛋白のポリアクリルアミド電気泳動。

ポリアクリルアミド電気泳動にかけるとHVJウィルス粒子の蛋白の主なものは5種類に分れた(Shimizu. K & Hosaka. Y 1971)。易動度の大きいものから、P_1, P_2, P_3, P_4, P_5としたが泳動距離から算定した分子量はP_1: 36000, P_2; 52000, P_3; 62000, P_4; 77000, P_5; 81000ダルトンであった。P_3はnucleocapsidsの蛋白であり、P_1はnucleocapsidsにかなり強く結合している蛋白で活性は持っていなかった。P_4とP_5は

分離しないこともあるので、ここでは$P_{4.5}$として一つに扱った。ウィルス粒子中における各蛋白の含有率はP_1；26％，P_2；23％，P_3；28％，$P_{4.5}$；23％であった。これらの蛋白が外被可溶化分画においてはどのように分布しているか調べた。可溶化分画にはP_1，P_2，P_3，$P_{4.5}$が全部見られたが、P_2が最も多くて、$P_1+P_2+P_3+P_{4.5}$の41％，$P_{4.5}$は23％，P_1は24％，P_3は13％であった（図5-a）。可溶化分画には処理ウィルス蛋白の32％が回収されたことと[illegible]とウィルス粒子の蛋白の割合からP_1，P_2，P_3，$P_{4.5}$の外被可溶化分画への回収率はP_1；$0.24\times0.32/0.26\times100=30$％，$P_2$：$0.41\times0.32/0.23\times100=57$％，$P_3$；$0.13\times0.32/0.28\times100=15$％，$P_{4.5}$；$0.23\times0.32/0.23\times100=32$％となる。各蛋白と活性の関係を知るために、可溶化分画を更に蔗糖濃度勾配遠心により分画した各フラクション（図4-aの各フラクション）の蛋白構成を調べた。各フラクションに含まれるP_1，P_2，P_3，$P_{4.5}$の量をそれぞれに相当するバンドのピー

クのOD_{570}で示した（図4−b）。P_2，$P_{4.5}$はHI blocking活性，Nase活性（図3−c）とほぼパラレルなパターンを示した。P_1と活性には相関はみられなかった。可溶化分画に存在するペプタイドは主にP_1，P_2，$P_{4.5}$であったが，各ペプタイドの回収率と，活性の回収率，各ペプタイドの沈降パターンと活性の沈降パターンの比較から，P_1，P_2には活性はなく，$P_{4.5}$にHI blocking活性，Nase活性が結合していると考えられる。P_2に活性が結合しているとすれば，その活性の外被可溶化分画への回収率は60％近くなければならないが，そのような活性はなかった。

4 可溶化外被subunitsの形態

未処理ウイルス粒子を写真1に示すが，一面にスパイクでおおわれた外被がnucleocapsidsを包んでいるのがみられる。アルカリ・エマゾール処理によりこの外被が可溶化された。

外被可溶化分画には，アルカリ・エマゾール処理したそのままの試料に見られる

ような nucleocapsids はほとんど無く、毎分40,000回転、45分間の遠心で nucleocapsids は沈澱したことが確認された。外径50～180Åの円形構造物が多く見られ、またそれに外径60Åのリングに巾20Å、長さ60Åの柄の付いた構造物が1～4本付着しているものも見られた。これらは外被の基部の膜に由来するものと、スパイクだと思われる（写真2、矢印S）。外被基部膜に由来する構造物とスパイクでは、50～180Åの外被基部膜に由来する構造物がはるかに多く、この構造物は可溶化分画に最も多く含まれるP_2ペプタイドによって構成されていると考えられる。

$P_{4.5}$は、まだ形態学的に同定されていないが、HI blocking 活性、Nase 活性を結合しているペプタイドで、スパイクはこの$P_{4.5}$によって構成されている可能性が強い。

スパイクの基部に結合している構造物の大きさは一定していなかったが、このことは、スパイクを$P_{4.5}$、基部の構造物をP_2とすれば、可溶化分画を濃度勾配遠心によって、更に分

画した時、各フラクションに見られるP_2と$P_{4.5}$の比が一定しなかったこと（図4-b）と対応する。

II HVJウィルス外被の再構成

1 可溶化外被subunitsのBio-gel A 15mゲル沪過。

可溶化外被subunitsがゲル沪過により各活性要素に分離できるかどうか、またそのStokesの半径（溶質が球状でない場合、流体力学的に等価な球状分子を考えたときの半径）を知るために、0.05%のエマゾールを含んだBio-gel A 15mで、0.25%エマゾール処理から得られた外被可溶化分画、試料2mlを上昇法により沪過した。溶出液を3mlずつ分画して、各フラクションの、HI blocking活性、Nase活性、HA活性、蛋白量（$OD_{230\,m\mu}$）を測定した（図6）。

HI blocking活性、Nase活性はほぼパラレルなパターンを示し、fr.24からfr40に広がって溶出した。この二つの活性はこのゲル沪過によっては分離しなかった。HA活性はいずれのフラクションにも検出できなかった。これはHA活性が低い場合はそのHA活性はエマゾールによって阻害されるが、そのためと考えられる。溶血能もエマゾール存在下では阻害

されて測定できない。OD230mμ は fr.33 までは、だいたい HI blocking, Nase 活性を反映した値であったが、fr.38 に活性と比例しない高いピークがあった。このゲルカラムの間隙容積(V-void)は 45 ml (fr.15) でカラム内で溶媒の占める容積(V-buffer)は 150 ml (fr.50) であった。標準試料として用いたγ-グロブリンの溶出容積(Velution)は 114 ml (fr.38) であった。ゲル沪過の理論はまだ完成していないが実験的には、溶出容積 Ve は試料物質の Stokes 半径に依存することが明らかになっていて水和の大きいゲルでは Ackers (1964) の次式が実験結果と最もよく合うことが知られている。

$$Kd = \frac{V_{elution} - V_{void}}{V_{buffer} - V_{void}}$$

$$= \left(1-\frac{a}{r}\right)^2\left[1-2.104\frac{a}{r}+2.09\left(\frac{a}{r}\right)^3-0.95\left(\frac{a}{r}\right)^5\right] \quad \cdots\cdots (1)$$

r ; ゲル内の通路を円筒と考えた時の有効半径

a ; 溶質の Stokes 半径

γ-グロブリンの Stokes 半径は Ackers (1964) によれば 52 Å である。γ-グロブリンの Kd は

$Kd = \frac{38-15}{50-15} \fallingdotseq 0.66$

この二つの値を(1)式に代入してこのゲルの r を求めると 5.5×10^2 Å になる。この数値から活性のピークの見られた fr. 31 と fr. 33 に溶出した溶質の Stockes 半径 a を計算すると

fr. 31　$Kd = \frac{31-15}{50-15} = 0.46$　$\frac{a}{r} = 0.17$　$a = 94$ Å

fr 33　$Kd = \frac{33-15}{50-15} = 0.51$　$\frac{a}{r} = 0.15$　$a = 83$ Å

Svedberg の式

$$M = \frac{RTS}{D(1-\bar{v}\rho)}$$

と Stokes の法則から導かれる式

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r N}$$

から

$$M = \frac{6\pi\eta N r S}{(1-\bar{v}\rho)}$$

が得られる。

M ; 溶質の分子量

R ; 気体定数

T ; 絶対温度

S ; 沈降係数

D ; 拡散係数

ρ ; 溶液の密度

$\bar{v}$; 偏比容

η ; 溶媒の粘度

N : Avogadoro 数

r : 溶質の Stokes 半径

蛋白では $(1-\bar{v}\rho)$ はだいたい一定しているから、M は r, S に比例することになる。従って標準物質の M, r, S を M_{st}, r_{st}, S_{rt} とすれば試料の M, r, S との間に次の関係式が成立する。

$$M = \frac{r \cdot S}{r_{st} \cdot S_{st}} \cdot M_{st} \quad \cdots\cdots\cdots (2)$$

従って r と S の値が得られれば分子量が求まる。

fr 33 の試料を蔗糖濃度勾配沈降遠心して沈降係数を算定したが、6.8 S であった。標準蛋白として γ-グロブリン（分子量 16 万ダルトン）を用い、(2) 式により fr. 33 に溶出した溶質の分子量を求めると

$$M_{f33} = \frac{83 \times 6.8}{52 \times 7} \times 160000 = 250{,}000 \text{ ダルトン}$$

になる。

2 外被断片の再構成

i. Bio-gel A 15m ゲル沪過によるエマゾールの除去。

外被可溶化分画からエマゾールを除去するため、PBSで平衡化したBio-gel A 15mで図6と同じ外被可溶化分画の試料2mlを沪過した。図6と同様に溶出液を3mlずつ分画して、HI blocking活性、Nase活性、HA活性、HL活性、OD230mμを測定した(図7-a)。エマゾールを含んだ場合に比較して著るしいパターンの変化があった。HI blocking活性、Nase活性の約½は間隙容積の直後にピークを持って溶出した。そしてこのピークには高いHA活性、HL活性が存在していた。このゲルカラムではエマゾールはfr.35〜40に溶出してきた(図7-b)。図7-bにはチトクロームC、血清アルブミン、フェトウィン、γ-グロブリン、ブルーデキストラン、ウイルス粒子の溶出位置も示した。エマゾールを含んだカラムの時とVeを比較するとブルーデキストランは一致し

たが、γ-グロブリン，チトクローム c では2フラクションだけPBSを使った時の方が遅くなった。従って図6のfr 27～36は図7-aのfr 29～38に相当する。もしゲル沪過中に外被可溶化試料に構造上の変化が起らないと仮定すると、fr. 29～38にHI blocking活性，Nase活性は溶出してくるはずである。実際はエマゾールが一緒に存在するfr. 35～38では図12のfr. 32～fr. 36の活性がほぼ保たれているが、エマゾールと分離したfr. 29～34では図12のfr. 27～31の活性の約1/3しか存在せず、あとの2/3は溶出容積が著るしく小さくなり間隙容積の直後にピークを持って溶出した。このパターンは可溶化外被蛋白はエマゾールと分離したところでは会合を起し、より大きな構造物を形成することを示している。

間隙容積の直後にピークが存在することはこの会合はエマゾール濃度がある一定値以下になるとゲル沪過中ですでに起ることを意味する。もしも、それが事実であれば、試料に含

まれるエマゾール濃度が高くなれば、なるほどその濃度まで低下するのに時間がかゝり溶出パターンは変るはずである。

エマゾール濃度0.5%，1%の処理から得られた可溶化外被分画をそれぞれゲル沪過して、図7の0.25%の場合と比較した。

0.25%の場合、HI blocking活性，Nase活性の約1/2が間隙溶積直後にピークを持って溶出したが、0.5%の場合は、約1/2の活性がfr.24のあたりに広いピークを持って溶出した（図8-a）。1%では、fr.30以前に溶出したHI blocking活性，Nase活性は1/3程度に減少し、0.25%，0.5%でfr.32にあったHA活性のピークはfr.29に移った（図8-b）。このように試料のエマゾール濃度が高くなるほど、fr.30以前に溶出してくる活性の溶出容積は大きくなり、またその活性の量が少なくなった。この結果は予想された通り可溶化外被subunitsはゲル沪過中に、エマゾール濃度がある値以下になると直ちに会合を起すことを示す。

ii 電子顕微鏡による再構成の確認

図8-bの各フラクションに存在する構造物を電子顕微鏡で観察した。

fr.15～fr.32には、ゲル沪過前の可溶化外被分画には見られなかった数本から数十本のスパイクが集合した構造物が見られた(写真3-a,b,c)。スパイクの配列は、放射状配列、列状配列、面状配列の3種類に分けることができる。各配列とも、大きさは一定していなかった。最も多いのは、列状配列で放射状配列、面状配列は少なかった。HA活性のピークになっているfr.30では他のフラクションと違って、大きな面状配列が多く見られた。また、このフラクションでは列状配列の長いものも多く550mμの長さのものが見られた(写真3-b)。

これらの構造は、ウィルス粒子外被の構造と非常に類似していて、形態学的にはウィルス外被断片の再構成が起ったと言える。

fr.15～32ではいずれのフラクションにも種々

の大きさの再構成断片が含まれていて溶出容積と大きさの間に相関がないが、このことはこれらの構造物がゲル沪過前には存在せず、ゲル沪過を始めてから色々な時間に生じたものであることを示す。各フラクションには再構成外被断片以外に、50Åのリング構造が集合して形成している(と思われる)50Å～200Åの構造物がみられた(写真-3-a矢印m)。この構造物には数本のスパイクの付着したものもあり、外被基部膜に由来するものと考えられる。

エマゾールが混在し始めるfr.35では大きな構造物はなく、単離したスパイク、スパイク3、4本の集合物などが見られた(写真3-c)。fr36～fr40では可溶化分画と同様な様相をしていた。

iii 再構成外被断片のゲル沪過

エマゾールが溶出して来る直前にHAのピークがあるが(図7-a)、このフラクションには大きな再構成外被が見られた。もしこの構造物がゲル沪過前の試料にあったとすると

、もっと早く溶出すると思われる。このフラクションの1.5mlを同じゲル・カラムで沪過しHA活性の溶出パターンを調べた。HA活性は全部、間隙容積直後のfr.15にピークを持って溶出し、fr.32のあたりは活性は見られなかった(図9)。この時再構成外被断片が、HA活性のピークのフラクションfr.15に存在することは電子顕微鏡により確認した。

この結果は、ゲル沪過前の可溶化分画に、fr32に来た外被断片様構造物が存在していた可能性を否定し、再構成がゲル沪過中、または沪過後に起ったことを示す。

iv 7～11S外被可溶化分画による再構成

可溶化分画をさらに庶糖濃度勾配沈降遠心(図4-aと同じ条件)にかけ分画し、7～11Sのフラクションを集めた。ここには半壊外被が混入する可能性は少なく、この分画から外被が再構成されれば可溶化外被subunitsから外被が再構成されるということが確立すると考えられる。

7～11Sの外被可溶化分画，2mlをゲル沪過にかけ，溶出液を3mlずつ分注して各フラクションのNase活性，HA活性，HL活性，OD_{230} mμを測定し，電子顕微鏡で観察した。活性の溶出パターンは試料のエマゾール濃度の等しい図8-aとよく似たパターンを示した（図10）。電顕によるとfr.19～fr.32にわたって，再構成外被断片が見られた。この場合fr.32以外のフラクションにも，スパイクの面状配列がかなり見られた。fr.32では600～800Åのかなり長さのそろった列状配列構造物が多かった（写真4）。7～11S可溶化外被によっても大きな再構成外被が形成されることが示された。

vi 再構成前後の沈降パターンの比較

再構成を定量的に証明するために再構成前後の沈降パターンを比較した。

ゲル沪過前の外被可溶化分画と，それをゲル沪過して得たHA活性のピークfr.29（図8-b）からそれぞれ0.5mlを取り，5～20%の庶糖濃度勾配沈降遠心にかけた。遠心は毎分35000

回転、1時間、SW 39 ローターで行った。可溶化外被はこの遠心条件ではほとんど沈降せずHI blocking、Nase、HA活性の2/3はトップのフラクションに残った(図11-a)。再構成外被では、底より8フラクションに分注したが、fr. 6にHA、HL活性のピークがあった。Nase活性は低かったがfr. 5、6、7にピークがあった(図11-b)。HI blocking活性は5倍に希釈したもので全部マイナスであった。fr. 7、8に残ったNase活性は約1/5であった。あとの4/5にはゲル沪過により著しい沈降係数の増大(約10倍)が見られ、再構成の起ったことが確認された。

3 Sephadex G200ゲル沪過による再構成

ここで用いたBio-gel A 15mでは可溶化外被蛋白とエマゾールの分離が悪く約半分だけが再構成に関与した(図7-a、図8)。再構成はゲル沪過中にも、可溶化外被subunitsとエマゾールの分離に従い漸次起り、その起った時間によってfr. 15〜fr. 32に溶出して来る。そのた

め Bio-gel A 15m は濃度の高い再構成断片の調製には適さない。この目的のためには可溶化subunitsは間隙容積で溶出するが、エマゾールはそれより遅れて溶出するようなゲルが望ましい。Sephadex G 200がこの条件を満していた。エマゾールを含んだSephadex G 200ゲルで0.25%エマゾール濃度の処理から得られた外被可溶化試料2mlを沪過した。HI blocking, Nase, HA活性並びにOD230mμはすべて間隙容積にピークを持って溶出した(図12-a)。

同じゲルカラムをPBSで平衡化して、同じ試料を沪過した。この場合もHI blocking, Nase, HA, HLの各活性及びOD230mμは間隙容積にピークを持って溶出した。エマゾールを含んだカラムに比較して異なる点はHA活性が約10倍に増大したこと、わずかにずれていたNaseとHI blocking活性のピークが完全に一致したことである(図12-b)。エマゾールはfr.32にピークを持って溶出した。HVJウイルス、ブルー示キストランはfr.22に、カタラーゼ

γ-グロブリンはfr.31に、血清アルブミンはfr.40に溶出した。

fr.22の試料を電子顕微鏡で観察した。種々の大きさの再構成外被断片が見られ、面状配列も多く見られた(写真5)。エマゾールを含んだゲルの場合は外被可溶化分画とよく似ていて、再構成外被は見られなかった。fr.22の5～20%庶糖濃度勾配沈降遠心による沈降パターンをみた。沪過前の可溶化外被蛋白に比較してNase活性のピークは約3倍、HA活性ピークは約8倍、HL活性ピークは約10倍沈降した(図11-と)。

HA活性の増大が見られたこと、電子顕微鏡による外被断片様構造物が観察されたこと、沈降係数が増大したことによってSephadex G200のゲル沪過でも再構成が起ることが証明された。可溶化外被蛋白はSephadex G 200のゲル沪過では間隙容積直後に溶出するから、ゲル沪過中に再構成するものがあったとしても、再構成していないものと分離することはなく、

間隙容積直後に共に溶出する。そのためBio-gel A 15mを用いた場合の14倍のHA活性を持ったフラクションを得ることができた。

II 再構成外被断片の諸性質

i 血球吸着

再構成外被にHA, Nase活性が共に結合しているのか、あるいはHA, Nase活性それぞれよく似ているが、別々の構造物を構成しているのかどうかは、まだどちらとも言えない。インフルエンザウイルスではNase活性は赤血球に吸着されない(Webster & Darlington 1969)。HVJにおいても、もしNase活性がHA活性と別々に存在するなら血球には吸着しないと思われる。ニワトリ赤血球0.2mlに再構成外被断片の試料を0.8ml加え、0°Cで20分間吸着させた後、毎分2000回転5分間遠心し、上澄に残ったHA, HI blocking、Naseの各活性を測定した。対照として赤血球を加えないものについても同様の操作を行った。対照実験ではHA/ml : 240, HI blocking/ml : 16, Nase/0.1ml : 0.298

あったが血球吸着した試料ではHA/ml；5以下，HI blocking/ml；2以下，Nase/0.1ml：0.058であった。Nase活性が吸着したことから再構成外被断にはHA，Nase活性が共に結合している可能性が強い。

ii 細胞融合能

HVJウィルス粒子の細胞融合能は異種細胞のハイブリッド細胞を得る手段として細胞学の分野で使われている（Harris & Watkins, 1965；Okada & Murayama, 1965）。この場合HVJ核酸は紫外線等で不活化して使われるが、細胞に対して何らかの影響を持っていると思われる。もし再構成外被に細胞融合能があれば、ウィルス核酸の影響は完全になくすることができる。

K13細胞の単層培養をレイトンチューブに入れたスライドグラスの上で行い、細胞が単層になった時期に、培養液をすて、再構成外被試料0.75mlと0.75mlのEagle's MEM（4%仔牛血清を含む）を加え、37°Cで3時間置いた後、ブアン氏液で固定しヘマトキシリンエオジン

で核を染色した。対照には試料のかわりに0.75mlのPBSを加えた。再構成外被試料としてSephadex G 200によるゲル沪過から得られたfr.21, 22, 23, 24（図12-b）を用いた。fr.23を加えたものでは、対照に比べ多核細胞の頻度が明らかに高く、また対照には見られない多数の核を持った細胞が見られた。3時間の間に核だけが異常分裂をしたということは考えられないから、これは細胞融合によるものである。fr.21, 22, 24でも融合は起っていたがfr.23程効率はよくなかった。

LLC-MK2細胞を使って同様な実験を行った。この場合もfr.23で細胞融合がみられた。

iii 再構成外被断片の構成ペプタイド

可溶化外被－Sephadex G200ゲル沪過－fr22（図12-b）の試料を1%SDS, 1%2メルカプトエタノール, 100℃1分間処理し、0.1%SDSを含む7.5%のアクリルアミドゲル電気泳動にかけ構成ペプタイドを調べた。

fr.22には、ウイルスのP_2，$P_{4.5}$に相当するバンドが見られた（図5b）。再構成外被は基部を構成するP_2蛋白と、スパイクを構成する$P_{4.5}$蛋白によってできていると考えられる。

iv 再構成外被断片のアルカリエマゾール処理。

再構成の可逆性を見るため再構成外被をアルカリエマゾール処理した。Sephadex G 200カラム沖過によって得られた再構成外被断片試料0.5mlを0.02M，PH 10.0の炭酸緩衝液に一晩透析して、5%エマゾールを0.05ml加えた。炭酸緩衝液に透析した段階では、外被断片様構造は保たれていた。エマゾールを加えて20℃、1時間処理すると、外被断片様構造は全く見られなくなり、再び外被蛋白は可溶化した（写真6-b）。この処理によりNase活性，HIblocking活性には減少はみられなかったが、HAは著しく減少した。

考察

エマゾールは、最初Hosaka等(1959)によって、エマゾール・エーテル法としてミキソウイルスの破壊に用いられ、その後アルボウイルス、RNA腫瘍ウイルスなど外被を持った各種ウイルスの破壊に用いられてきた(Nobby 1966; Waterson. et al; 1963; Mussgay & Rott. 1962; de-The & O'conner. 1966)。しかし、この方法では外被は断片化するだけで可溶化はされなかった。

その後、アルカリ中でエマゾールを作用させる方法が、ミキソウイルスのnucleocapsidsの単離精製の方法として開発された(Hosaka. 1968)。この時、外被は可溶化すると考えられた。

最近、アルカリエマゾール法と呼ばれるこの方法によって、インフルエンザウイルスやRNA腫瘍ウイルスの外被も変性せずに可溶化することが報告された(Webster. & Darlington. 1969; Tozawa. et al 1970; Duesberg. et al 1970)。

HVJのアルカリエマゾール処理により外

被が6～10Sのsubunitsに解離するという，ここに示した結果は，これらの報告と基本的には一致する。

6～10Sのsubunitsはポリアクリルアミドゲル電気泳動によれば，主としてP_2（52000ダルトン）と$P_{4.5}$（77000，81000ダルトン）の蛋白から構成されていた。沈降係数とゲル沪過パターンより求めたStockes半径とから計算した，6.8Sの沈降係数を持ったsubunitsの分子量は，250000ダルトンであった（25ページ）。

可溶化外被のピークの沈降係数は8.7Sであったから，分子量は360000ダルトンと算定される（分子量の2/3乗がSに比例する（Martin & Ames 1961）としても，8.7SのStockesの半径を94Å（24ページ）としても一致した値になる）。従って6～10S subunitsはP_2，$P_{4.5}$のモノマーではなく，それらが数個結合して構成されていることになる。P_2と$P_{4.5}$の比は一定でなかったから種々の組合せが存在すると思われる。このことは電子顕微鏡でスパイクの付いてい

ないものや1～2本付いているものなど色々な構造が外被可溶化分画に観察され裏付けられた。

6～10Sのsubunitsには HI blocking, Nase 活性が見られ、それらの活性は、$P_{4.5}$に結合していることが示され（19ページ）、更に$P_{4.5}$がスパイクを構成し、P_2は外被基部の膜を構成することが推定された（20ページ）。スパイクは先端が60Åのリング状に見える。しかし、ウィルス粒子または再構成外被のスパイクを観察すると、面状に配列していて軸方向から見たと思われるものでも、リング状になっていることから、実体は球状で中心に染色剤が浸透しやすい（中空と思われる）構造をしていることが考えられる。スパイクの先端を直径60Å、内部が直径30Åの中空になっている球と計算し、偏比容を0.74として分子量を求めると、81,000ダルトンになった。これは$P_{4.5}$（77,000～81,000ダルトン）とよく一致した。

外被基部の膜を構成する最小単位が50Å

のリング状であることを示す像が見られたが
この50Åリング状構造も直径50Å、内部が20
Åの中空として計算すると49000ダルトンになりP_2(52000ダルトン)とよくあう。
この一致からも、P_2(52000ダルトン)は外被の膜部分を構成し、$P_{4.5}$(79000〜81000ダルトン)がスパイクを構成し、HA活性、Nase活性を持つという結論は正しいと思われる。
インフルエンザにおいては、HI blocking とNaseが異なる沈降係数を持つこと、スパイクにも2種類の形態があることが報告された(Laver & Valentine. 1969; Webster & Darlington 1969)。
HVJでは外被可溶化分画のHI blocking とNaseは等しい沈降係数を示し、電子顕微鏡によっても2種類のスパイクを観察することはできなかった。
LaverとValentineは1本のスパイクが、HAで7.5S、Naseで8.5Sとしているが、スパイク1本は7.5Sや8.5Sを示すには小さすぎると思わ

れる。また彼等はHA活性の測定を界面活性剤を除いて行っているが、図3に示したように、HA活性は粒子の大きさによって著しく比活性が異なり、粒子の大きさが均一でない場合は、HA活性によりHA蛋白の定量を行うことはできない。このようなことから彼等の成績はそのまゝ受取ることはできないと思われる。

HVJの場合、P_4、P_5がそれぞれNase、HI blockingに対応するのかどうかは今後の課題である。Naseは蛋白量としては微少で、ここで取り上げた5つの蛋白には対応しない可能性も強い。

可溶化外被submitsは、エマゾールを除去すると会合を起し外被断片を再構成した。ゲル沪過により再構成が起ったことは以下の知見から確認された。

1. 電子顕微鏡下で、外被可溶化分画には見られないような外被断片様構造が、ゲル沪過後の試料に見られた。

2. エマゾールを含むゲルカラムと含まない

ゲルカラムでの溶出パターンの変化は溶質の会合が起ったことを示すものであった。

3. ゲル沪過によりHA活性に10倍以上の増大がみられた。

4. 7〜11S可溶化外被subunitsによっても、外被断片様構造物が形成された。

5. ゲル沪過により沈降係数の増大がみられた。

この再構成の原因がエマゾールの除去によるものであることが次の実験によって示された。

1. Bio-gelにおいてエマゾールと分離した部分だけ再構成が起った。

2. ゲル沪過試料のエマゾール濃度を高くすると再構成の開始は遅れ、また再構成される量も少なくなった。

3. 再構成外被を再びアルカリエマゾール処理すると、またsubunitsに解離した。

Laver と Valentine (1969)、Webster と Darlington (1969) も界面活性剤の除去により、HAスパイク、

Naseスパイクが会合することを示したが、彼等の場合は数本のスパイクが放射状に結合したもので、外被の再構成と言えるものではなかった。

ここで得られた再構成外被は電子顕微鏡でみた形態に関しても、濃度勾配沈降遠心の沈降パターンに関しても一様なものではなかった。このことは各活性要素と構造や構成蛋白を分析する上で障害になっている。均一な再構成外被を得ることが今後の重要な課題の一つであるが、その可能性を示すものは、7〜11S可溶化外被subunitsから得られた再構成外被がかなり均一であったことである(写真4)。もっと均一なsubunitsを使えば、大きさのそろった再構成外被を得ることが出来るかも知れない。

図8-bのfr.30に非常に大きな再構成外被が得られ、それを再びゲル沪過すると間隙容積直後に溶出した(図9)が、このことはfr.30

の再構成外被はゲル沪過後か、または溶出する直前に再構成されたものであることを意味する。そしてまた、これらはかなり均一な大きさのsubunitsから再構成したと思われる。これらのことは、このフラクションに大きな面状配列の再構成外被が多かったことの原因と考えられる。

Sephadex G 200のゲル沪過において大きな面状構造の再構成外被はピークより少し後のフラクションに多かった。

細胞融合能がやはりピークよりすこし後のフラクションで最も高かったが、この活性には大きな再構成外被が必要なのかも知れない。

再構成外被と細胞の相互作用、また再構成外被の脂質や糖に関しては今後実験を進めて行きたいと考えている。

要旨

HVJウイルス粒子をアルカリ・エマゾール処理すると、外被は可溶化し6～10Sのsubunitsに解離した。

Bio-gel A 15mまたはSephadex G 200のゲル沪過によりエマゾールを除去すると、解離していた外被subunitsは会合し外被断片を形成した。この再構成外被は赤血球凝集能、溶血能、細胞融合能やneuraminidase活性を持っていた。再構成外被の形態は一様ではなく、種々な数のスパイクが放射状、列状または面状に配列していた。再構成外被の蛋白はSDSを含んだポリアクリルアミドゲルでの電気泳動で2種類に分れた。再構成外被をアルカリ・エマゾール処理すると再びsubunitsに解離した。

謝辞

筆を置くに当り，直接御指導下さった保坂康弘博士，有益な助言並びに激励の言葉を下さった深井孝之助教授，厳密な検討を加えて下さった富沢純一教授，いろいろ御助力いただいた微生物病研究所深井研究室，中央研究室の諸氏に深く感謝の意を表します。

文献

Ackers. G. K. 1964. Biochemistry. 3. 723 - 730.

Aminoff. D. 1961 Biochem. J. 81. 384 - 392

Bang. F. B. 1953 Bull. Johns. Hopkins. Hosp. 92. 309 - 329

Berkaloff. A 1963 J. Microscopie. 2. 633 - 638

Blough. H. A., Weinstein. D. B., Lawson. D. E. M., and Kodicek. E. 1967 Virology. 33. 459 - 466

Chanock. R. M., Johnson, K. M., Cook. M. K., Wong. D. C and Vargosho. A. 1961. Am. Rev. Respiral. Diseases. 83 (2) 125 - 129.

Choppin, P. W 1964 Virology 23. 224 - 233

Choppin. P. W; and Stoeckenius. W 1964 Virology 23. 195 - 202

Compans. R. W; Holmes, K. V., Dales, S. and Choppin. P. W 1966 Virology 30. 411 - 426

Compans. R. W., Choppin. P. W 1967a Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57. 949-956

Compans. R. W., Choppin. P. W. 1967b Virology 33 344 - 346

De-Thé. G and O' Connor. T. E 1966 Virology 28 713 - 728

Drzeniek. R., Frank. H and Rott. R 1968 Virology

Harris. H. and Watkins. J. F 1965 Nature. 205. 640 - 646

Haslam. E. A., Hampson. A. W., Radiskevics and White. D. O 1970 Virology 42

Hermodsson. S and Westman. J 1962. J. Ultrastruct. Res. 6. 499-510

Holmes. K.V and Choppin. P.W 1966. J. Exptl. Med. 124. 501-520

Horne. R.W. and. Waterson. A.P 1960. J. Mol. Biol 2 75-77.

Hosaka. Y., Nishi, Y., and. Fukai. K. 1961. Biken's J. 4 243-254

Hosaka. Y., Kitano. H., and. Ikeguchi. S. 1966 Virology 29 205-221.

Hosaka. Y. and Koshi. Y. 1968 Virology 34 419-434

Hosaka. Y 1968. Virology 35 445-457

Hosaka. Y., and Shimizu. K. 1968 J. Mol. Biol. 35 369-373

Hsiung. G. D., Isacson. P. and McCollum. R. W 1962 J. Immunol. 88 284-290

Kingsbury. D. W and. Darlington. R. W 1968. J. Virol. 2. 248-255

Klenk H. D and Choppin. P. W 1970 Virology. 40. 939-947

Laver. W. G. 1964. J. Mol. Biol. 9. 109-124.

Laver. W. G. and Webster. R. G. 1968 Virology 34 193-202

Laver. W. G and Valentine. R. C 1969. Virology 38 105-119

Maizel. J. V. Jr. 1966. Science 151 988-990

Maizel. J. V. Jr., White. D. O and Scharff. M. D. 1968 Virology 36. 115-125

Martin. R. G and Ames. B. N 1961 J. B. C. 1372-1379

Morgan. C. and Howe. C. 1966. Sixth. International Congress For Electron Microscopy Kyoto.

Nakai M and Imagawa. D. T 1969 J. Virol. 3 187

Mussgay. M and Rott. R. 1964 Virology 23 573-581

Norrby. E. 1962 Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 111 814-818

Okada. Y. 1958 Biken's J. 1 103-110

Okada. Y. and Murayama. F 1965 Biken. J. 8 7-21

Salk. J. E 1944 J. Immunol. 49 87-98.

Shapiro. A. L., Viñuela. E and Maizel. J. V. JR. 1967
Biochem. Biophys. Res. Commun 28. 815-820.

Shimizu. K. and Hosaka. Y. (1971) in preparation for press

Rott. R. and Schäffer. W 1961 Virology 14 294-299

Tiffang. J. M. ana Blough. H. A 1968 Science 163 573-574

Tozawa. H., Bauer. H., Graf. T., and Gelderblom. H 1970
Virology 40 530-539

Warren. L 1959 J. Biol. Chem. 234 1971-1975

Waterson. A. P. Jensen. K. E. Tyrrell. D. A. J and Horne. R. W 1961
Virology 14 374-378

Waterson. A. P. Rott. R and Ruekele.-Enders. G. 1963
Z. Naturforsch 18b 377-384

Webster. R. G., Laver. W. G., and Kilbourne. E. D 1968
J. Gen. Virol. 3 315-326

図の説明

図1. アルカリエマゾール処理によるウイルス粒子破壊の時間的な進行。

炭酸緩衝液(0.02M PH10)に浮游したHVJ 0.96 ml (OD550mμ 0.530)に0.04 mlエマゾール(5%)を加え、20°Cに置き各時間のOD550mμを測定した。

0'の値は0.530×0.96≒0.509とした。

図2. アルカリエマゾール処理におけるエマゾール濃度の影響。

HVJアルカリ浮游液(64000 HA/ml, Nase 11.6 OD549mμ/0.1ml, OD550mμ 0.69)を0.9 mlずつ10本の試験管に分注して、それぞれに0～5%エマゾール0.1 mlを加え2時間室温に放置の後、OD550(-□-)を測定した。そしてそれぞれから0.5 mlを取り出し2.5 mlの炭酸緩衝液(0.02M PH10)を加え毎分40,000回転45分間遠心し、上澄のHA(-●-), HI blocking(-○-), Nase(-△-)の各活性ならびに蛋白量(…○…)を測定した。

図3. アルカリエマゾール処理HVJの沈降パターン。

HVJアルカリ浮游液を0.2%エマゾール濃度で2時間処理し0.5mlを5～20%蔗糖濃度勾配(0.2%エマゾールを含む0.02M pH 10の炭酸緩衝液中)を持った5mlのカラムにのせベックマンSW50ローターで毎分50,000回転4時間遠心し底に穴をあけて30滴ずつ分注した。沈渣は0.6ml炭酸緩衝液に浮游した。

a) 各フラクションのHA(●), HI blocking(○), Nase(△)活性及び蛋白量(…○…)を示す。7S, 11Sはそれぞれγ-グロブリン, カタラーゼが同じ遠心条件で沈降した位置を示す。

b) aの各フラクションのHA/HI blockingを計算したもの。

図4. 外被可溶化分画の沈降パターン。

HVJアルカリ浮游液を0.5%エマゾール濃度で1.5時間処理してベックマン

#40ローターで毎分40,000回転45分間遠心し、上澄の上方4/5を注射器で取り出し、その0.5ml(3200HA/ml, Nase/0.1ml 6.2 OD_{549}, 320 HIbl/ml, 950 μg/ml 蛋白)を5～20%庶糖濃度勾配(0.5%エマゾールを含む0.02M PH10の炭酸緩衝液中)沈降遠心、毎分50,000回転4時間にかけ

a) HA(●), HIbl.(○), Nase(△)活性そして蛋白(…○…)の沈降パターンを測定した。7S, 11Sは同じ遠心条件でのγ-グロブリン・カタラーゼの沈降位置を示す。

b) 各フラクションの構成蛋白をポリアクリルアミド電気泳動により、分析した。各フラクションについて各バンドの$OD_{570mμ}$のピークの値をプロットした。

図5 ポリアクリルアミド電気泳動パターン

a) 外被可溶化分画

b) 再構成外被(図8-b の fr. 29)

標準試料としてチトクロームCを入れた。

図6. 可溶化外被subunitsのエマゾールを含んだBio-gel A 15mゲルによる沪過パターン。

0.25%エマゾール濃度の処理から得られた外被可溶化分画2ml(2800 HA/ml, 360 HIU/ml Nase 4.5 $OD_{549mμ}$, OD_{230} 2.08)を0.05%エマゾールを含んだ0.02M pH10炭酸緩衝液で平衡化したBiogel A 15mゲルカラム(2.7×28.3cm)で沪過した。溶出液は3mlずつ分注した。各フラクションのHA, HIU(-○-), Nase(-△-)活性、そして$OD_{230mμ}$(-•-)を測定した。標準試料として用いたγ-グロブリンの溶出位置を矢印で示す。

図7

a) 可溶化外被subunitsのエマゾールを含まないBio-gel A 15mゲルによる沪過パターン。

図6と同じ試料2mlを同じゲルカラムをPBSで平衡化したもので沪過した。溶出液は3mlずつ分注した。各フラ

クションのHA(●)、HIbl(○)、Nase(△)、HL(---○)活性及びOD230mμ(・)を測定した。

b) 同じゲルカラムでの40mgエマゾール8000 HA/ml HVJウィルス、1mgブルーデキストランの溶出パターン及びγ-グロブリン、牛血清アルブミン(BSA)、fetuin、チトクローム C(Cyt. C)の溶出位置を示す。

図8

a) 0.5%エマゾール濃度、外被可溶化分画、のBio-gel A 15m(PBS)ゲル沪過パターン。

0.5%エマゾール濃度の処理から得られた外被可溶化分画、2ml(3200 HA/ml、320 HIbl/ml Nase/0.1ml 6.2 OD549mμ)の図7と同じゲルでの沪過パターン。

b) 1%エマゾール濃度外被可溶化分画、のBio-gel A 15m(PBS)ゲル沪過パターン。

1%エマゾール濃度の処理から得られ

た外被可溶化分画の図7と同じゲルでの沪過パターン。

図9、再構成外被のBio-gel A 15 m (PBS) ゲル沪過。

再構成外被フラクション(図8-a, fr. 32) 2 ml (480 HA/ml) を図8-aと同じゲルで再び沪過した。HA以外の活性は低くすぎて測れなかった。

図10、7〜11S外被可溶化分画のBio-gel A 15 m (PBS) ゲル沪過。

外被可溶化分画を5−20%蔗糖濃度勾配沈降遠心にかけ、7〜11Sに相当するフラクション(図4のfr. 6, fr 7)を集め2 mlを図7aと同じゲルで沪過した。HIblは測定しなかった。

図11 ゲル沪過前後の沈降パターンの比較。

試料0.5 mlを5〜20%蔗糖濃度勾配沈降遠心、毎分35000回転1時間にかけた。

a) 0.25%エマゾール濃度の処理から得ら

れた外被可溶化分画、

濃度勾配は0.25%エマゾールを含む炭酸緩衝液(0.02M PH10)中に作った。

HA(●), HIhl(○), Nase(△)

b) Bio-gel A 15mによる再構成外被

(図8b, fr29), HA(●), Nase(△)

HL(…○…)

c) Sephadex G 200による再構成外被

(図12-b, fr22), HA(●), Nase(△)

HL(‥○‥)

図12. 外被可溶化分画のSephadex G 200によるゲル沪過。

図6と同じ試料をφ2.7×35.6のSephadex G200ゲルカラムで沪過した。

a) 0.05%エマゾールを含む炭酸緩衝液(0.02M PH10)でゲルを平衡化しこの液で溶出させた。

b) PBSでゲルを平衡化してPBSで溶出させた。HA(●), HIhl.(○) Nase(△)

HL(…○…), OD230mμ(-・-)。

写真の説明

写真1. PBS浮游未処理HVJウィルス

×200,000　スケールはすべて0.1μ

写真2. 外被可溶化分画

矢印m：外被基部膜由来構造

矢印S：スパイク

×200,000

写真3 外被可溶化分画, Biogel A 15m (PBS)

ゲル沪過

a)：fr. 25　×200,000　矢印m：外被基部膜由来構造

b)：fr. 29　×20,000

c)：fr. 35　×200,000　(図8-b)

写真4. 7～11S外被可溶化分画による

再構成外被

(図10. fr. 30)

×200,000

写真5 Sephadex G 200による再構成外被

(図12b. fr 22)

×20,000

写真6　再構成外被の再アルカリエマゾール処理。図12-bのfr.22を0.02M pH10の炭酸緩衝液に一晩透析した後1%エマゾールで処理したもの。

×200,000

Fig.1

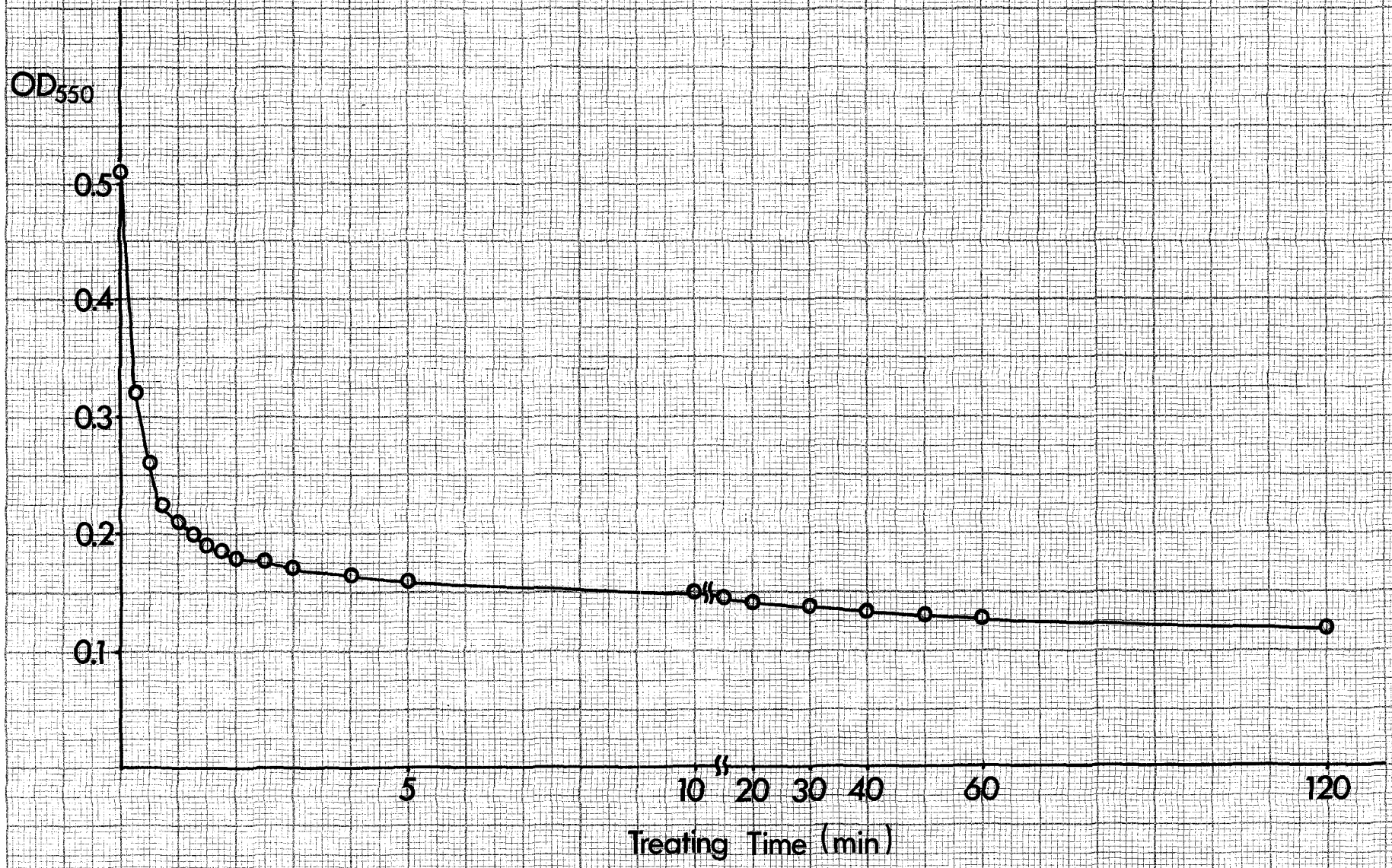
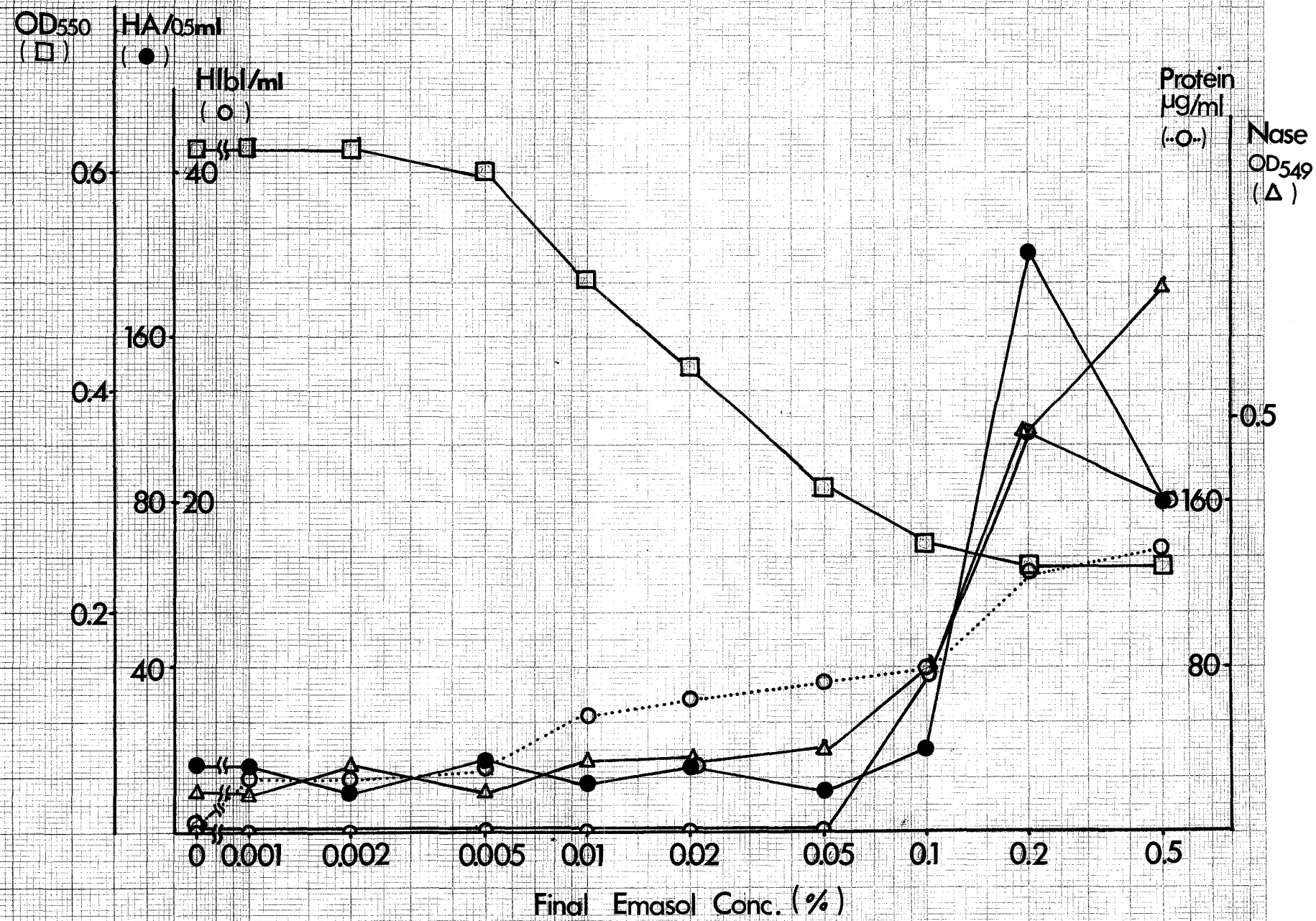
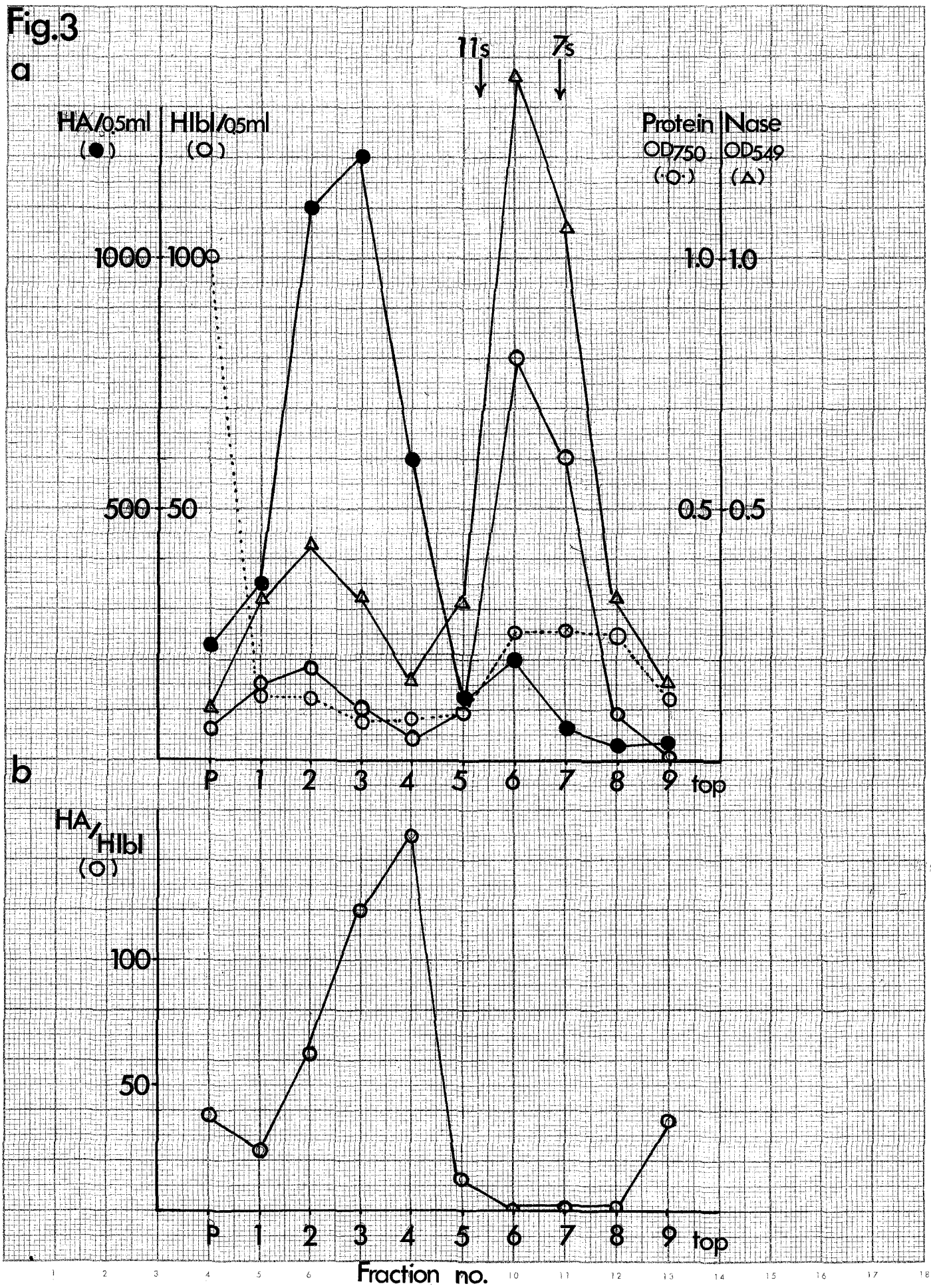


Fig.2

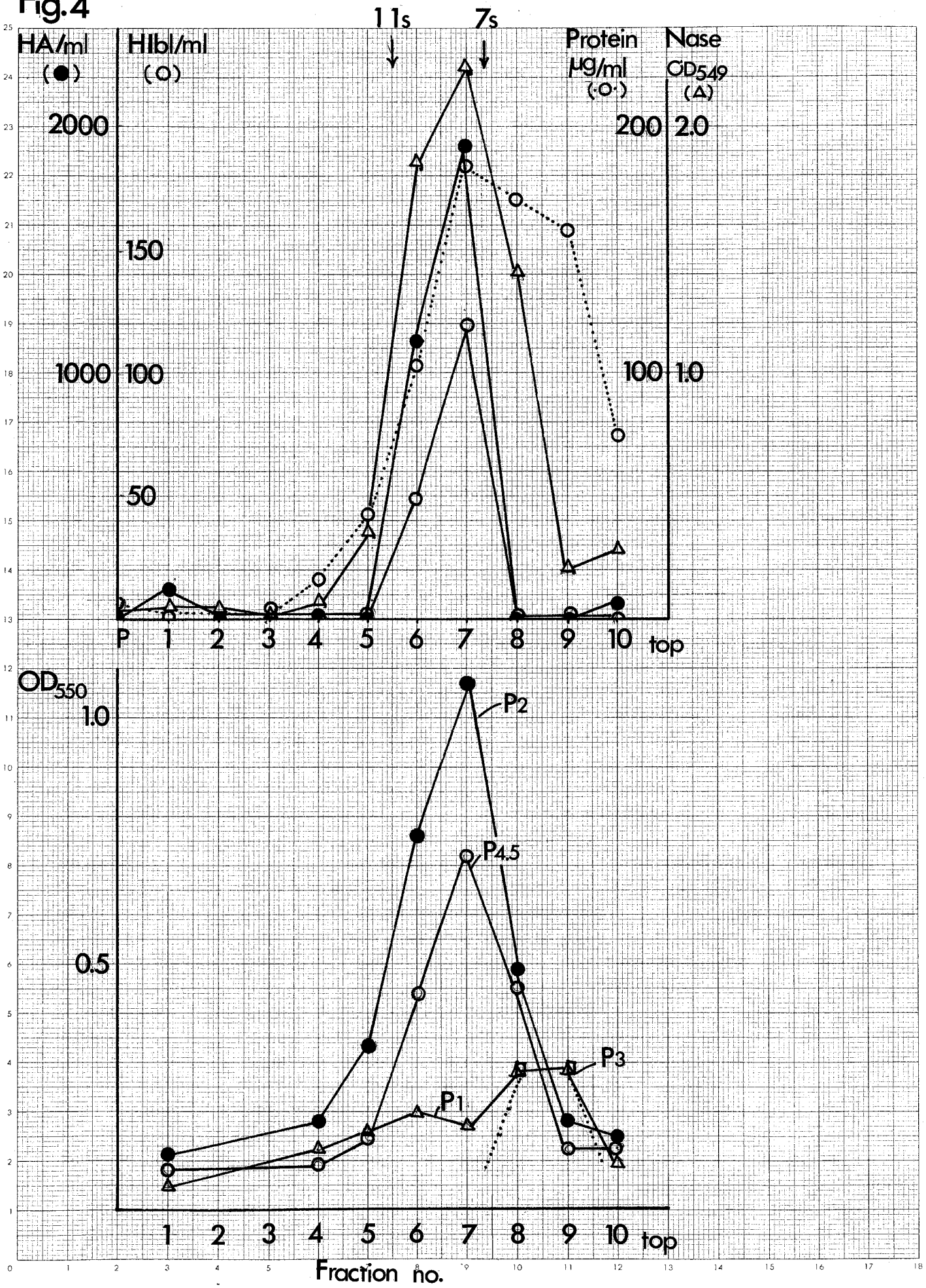


JIS-A4 片対数方眼紙 コクヨ



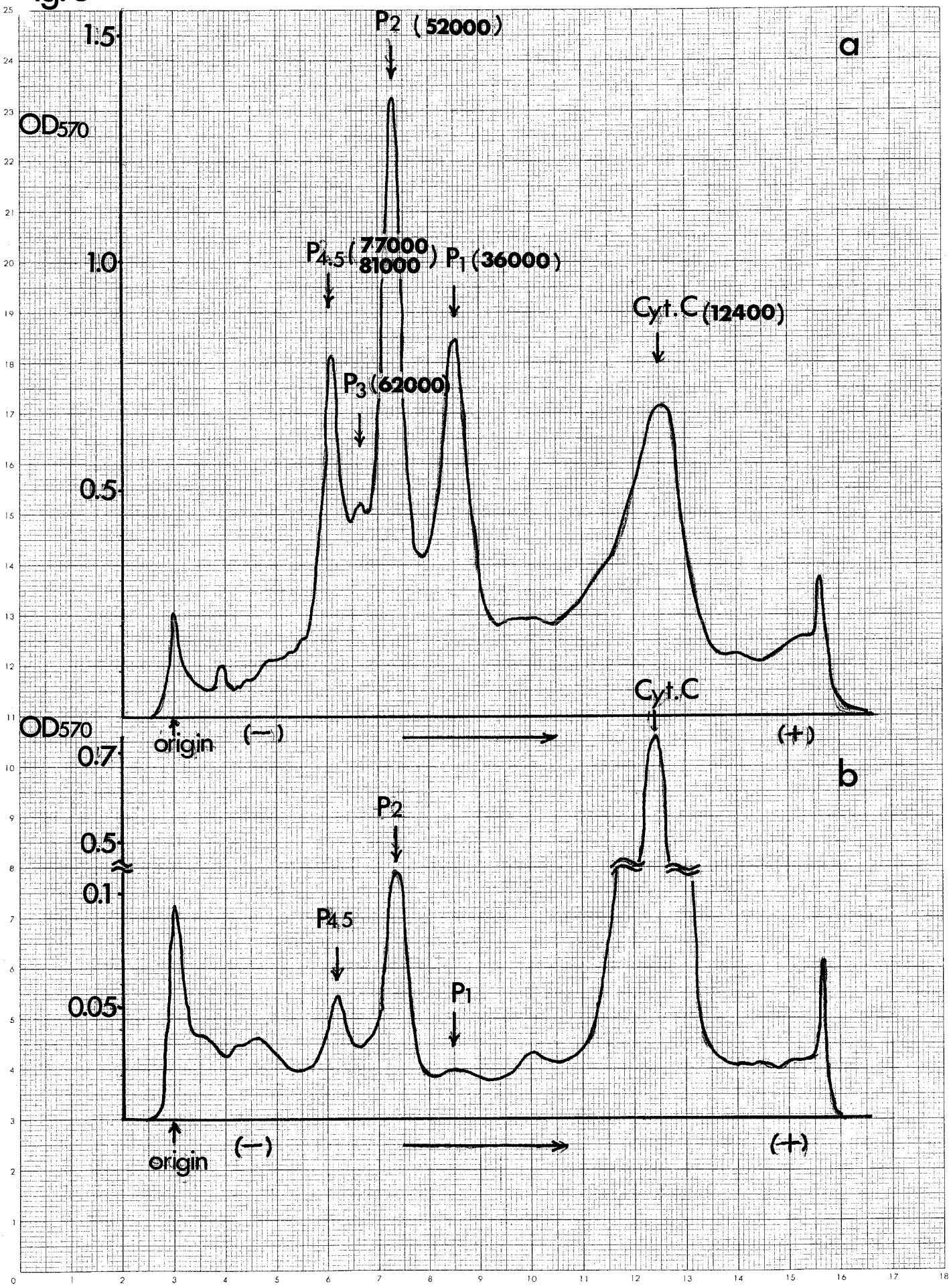
A4 1mm (250×180) コクヨ

Fig.4



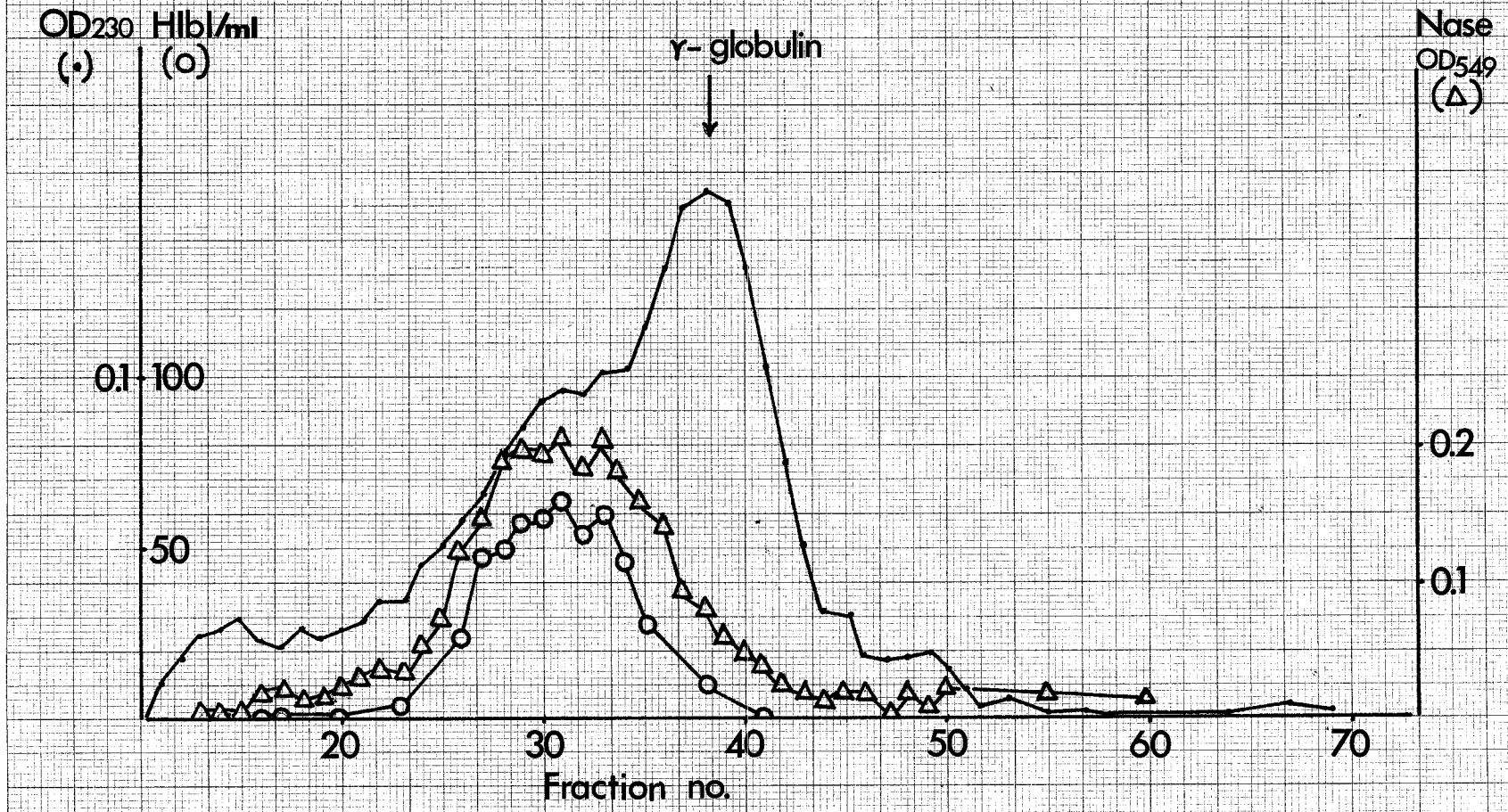
A4 1mm (250×180) コクヨ

Fig. 5



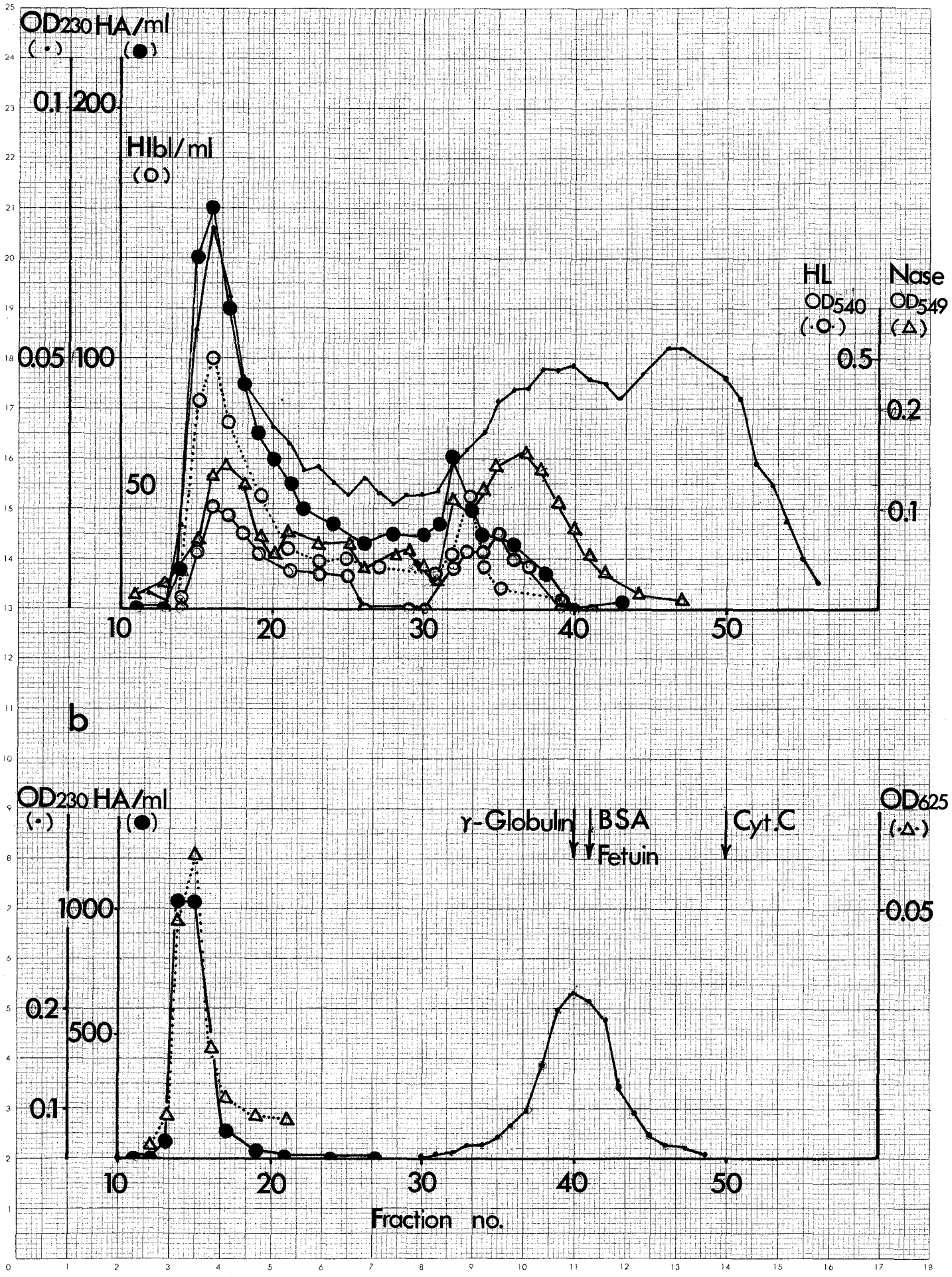
A4 1mm (250×180) コクヨ

Fig.6



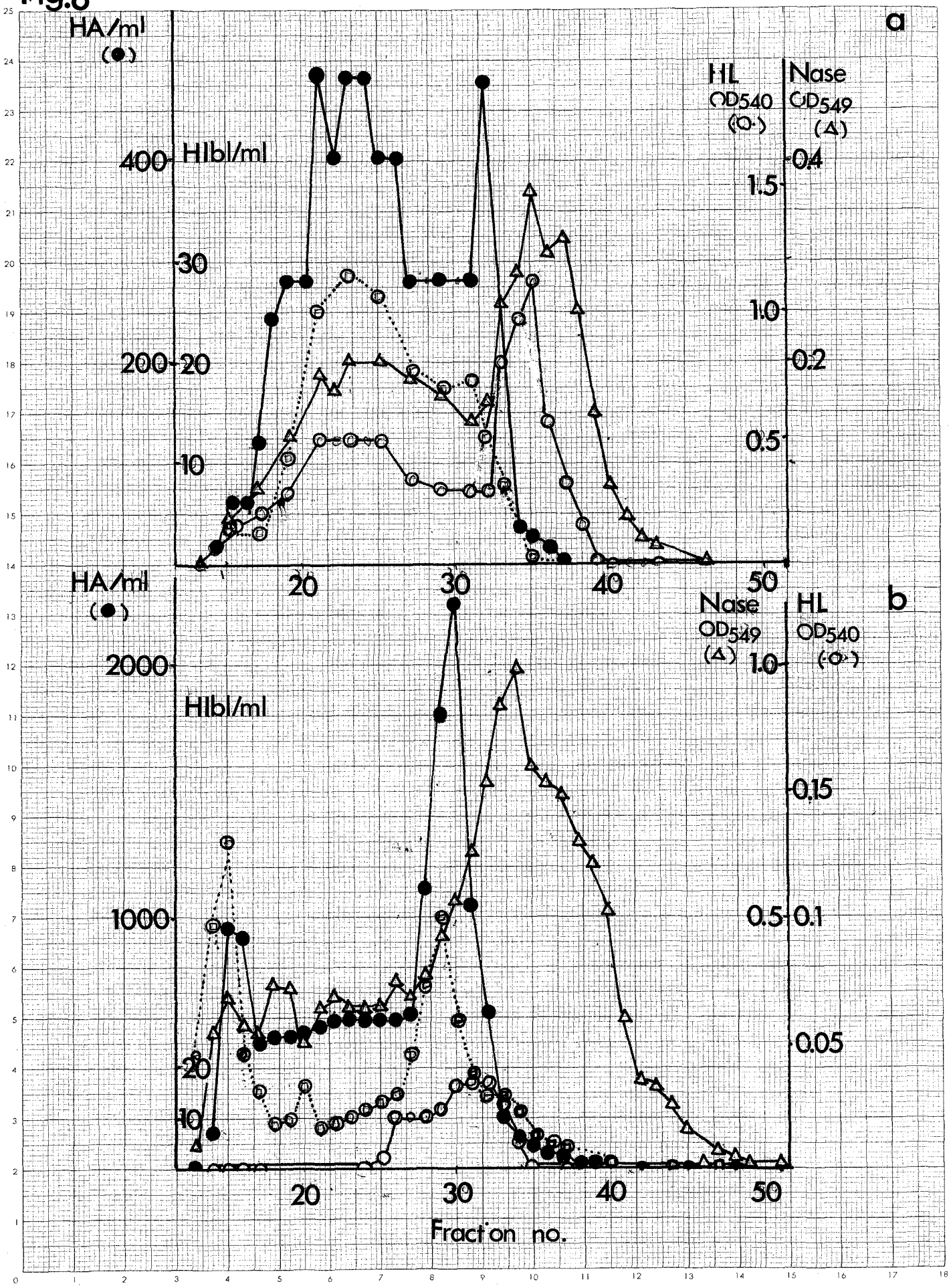
A4 1mm(250×180) コクヨ

Fig.7

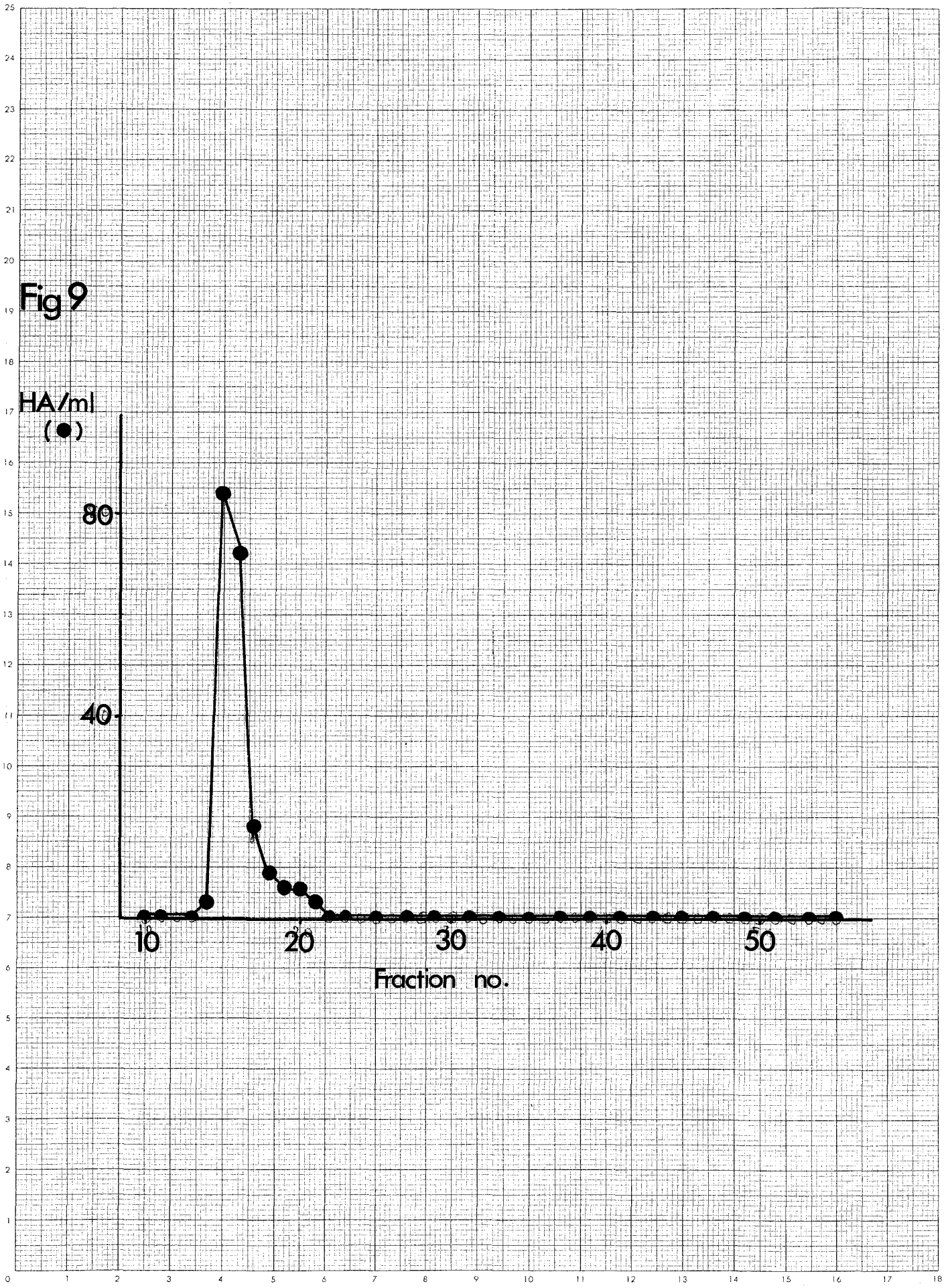


A4 1mm (250×180) コクヨ

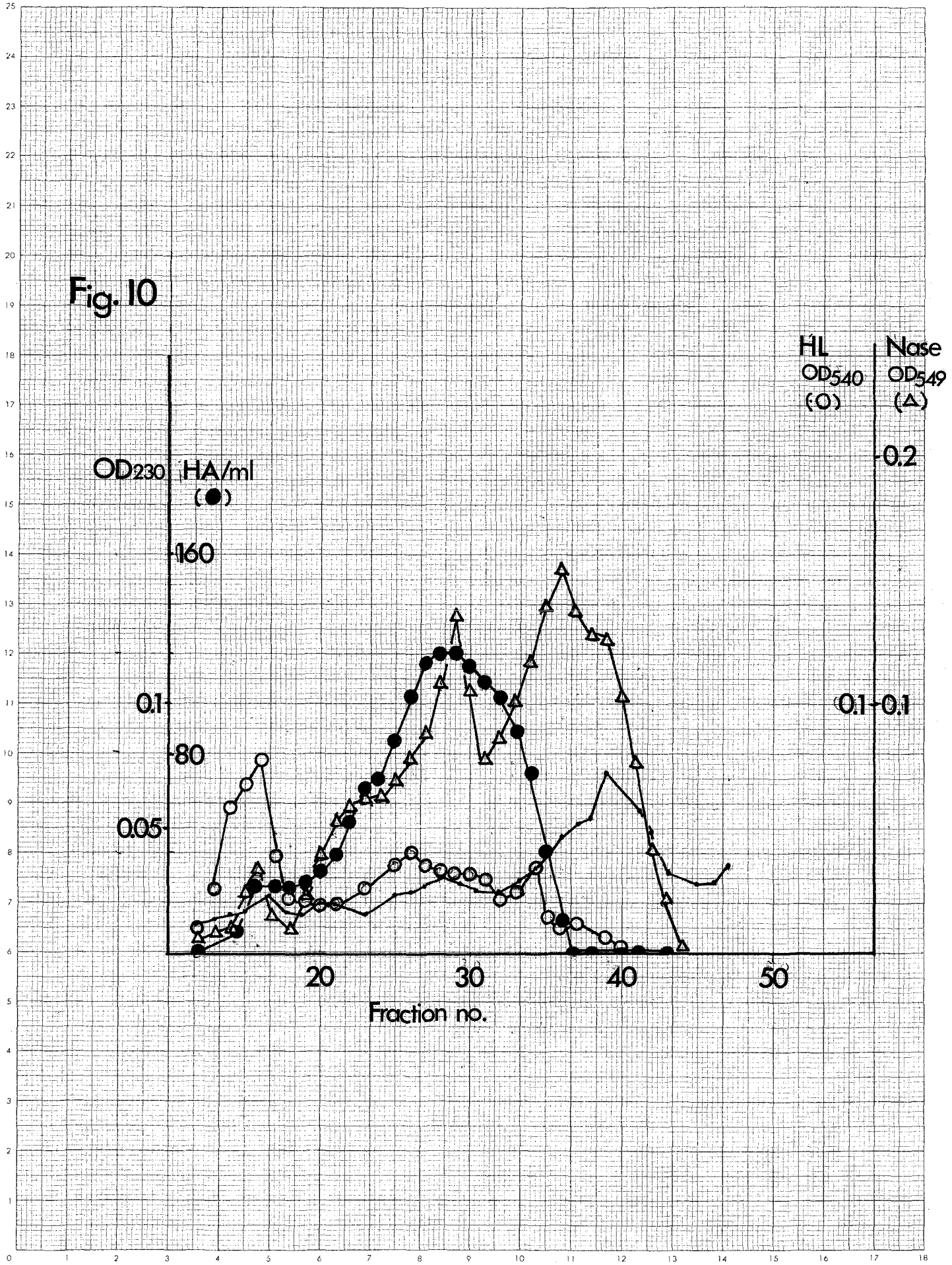
Fig.8



A4 1mm (250×180) コクヨ

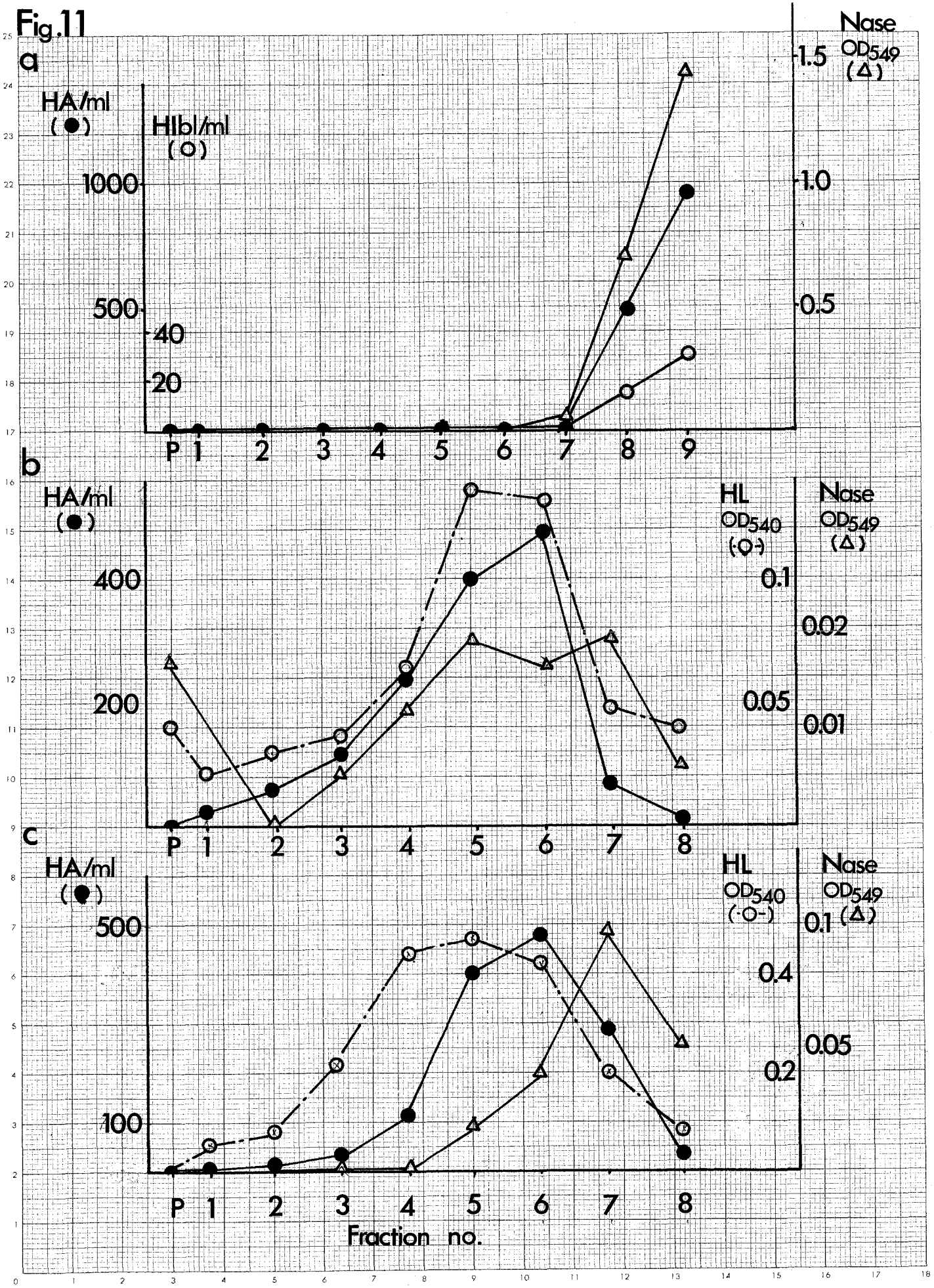


A4 1mm (250×180) コクヨ



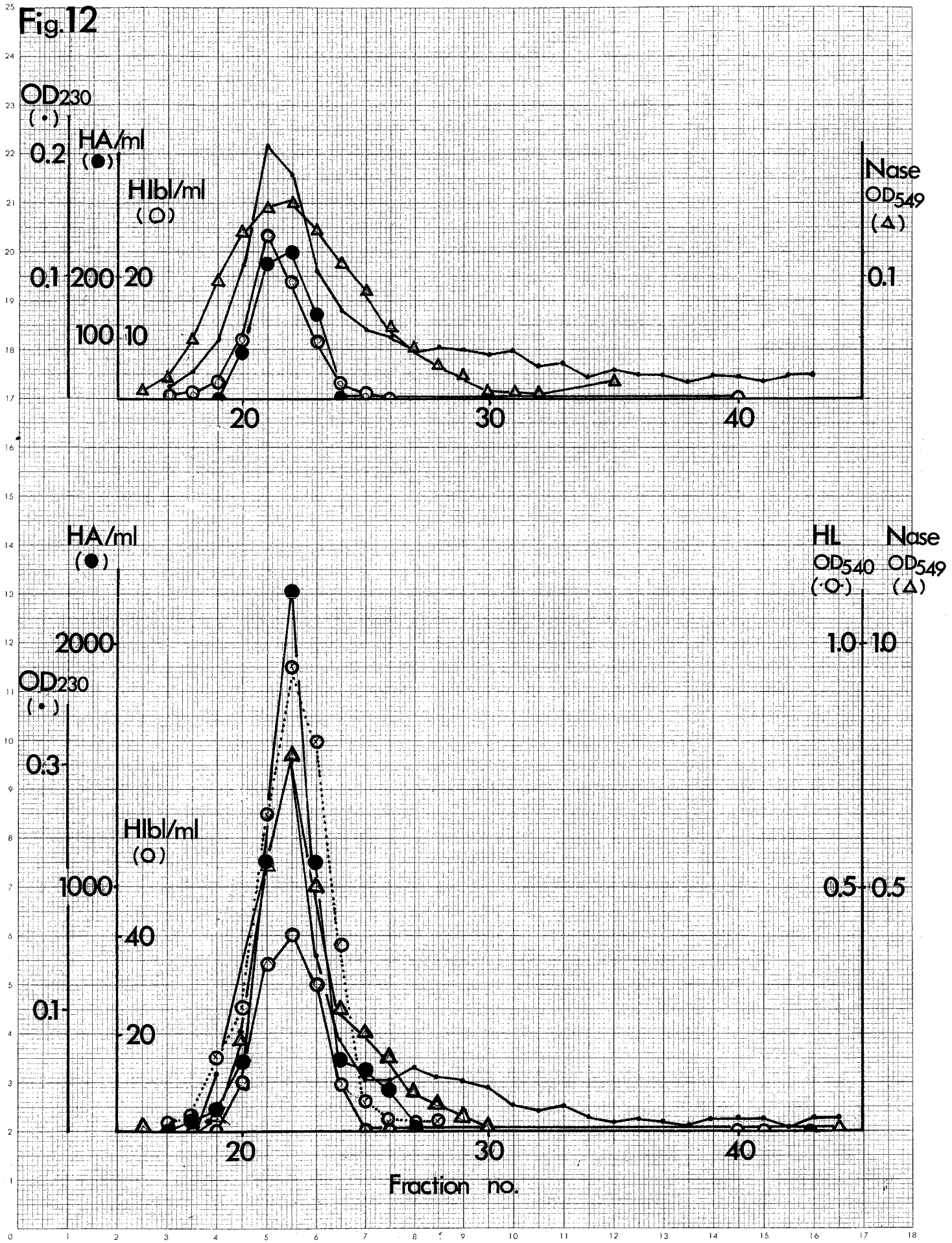
A4 1mm (250×180) コクヨ

Fig.11



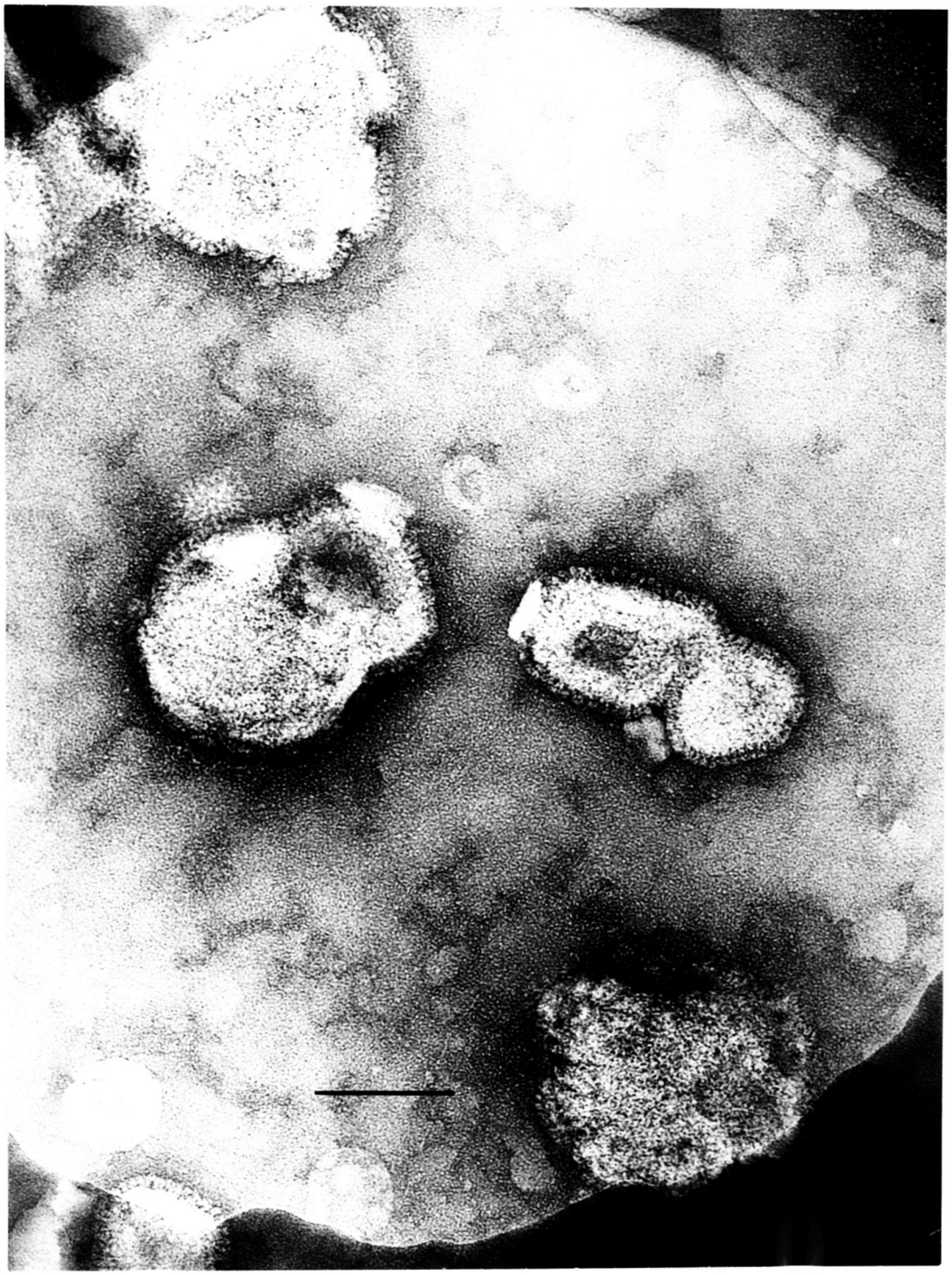
A4 1mm (250×180) コクヨ

Fig.12

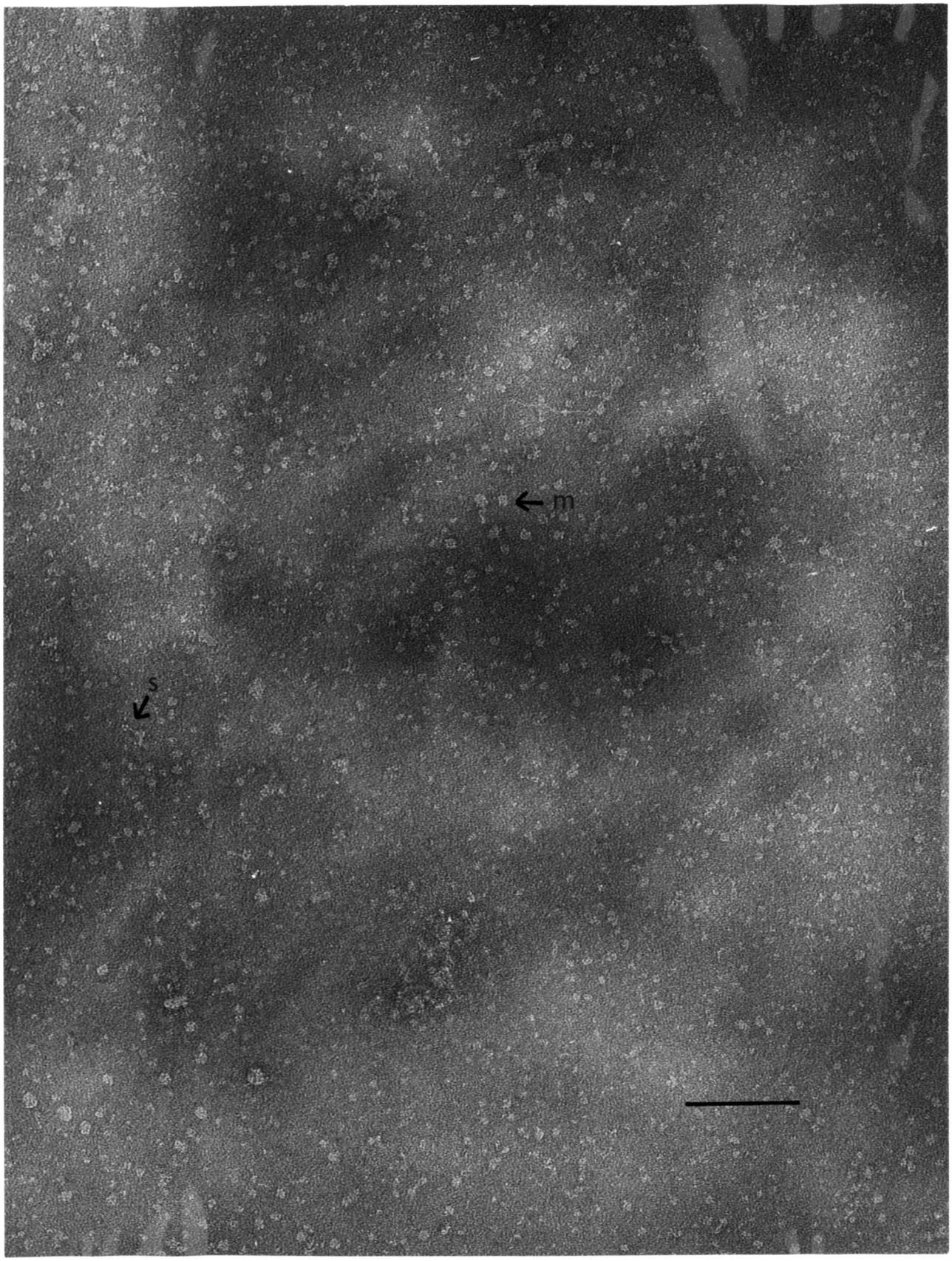


A4 1mm (250×180) コクヨ

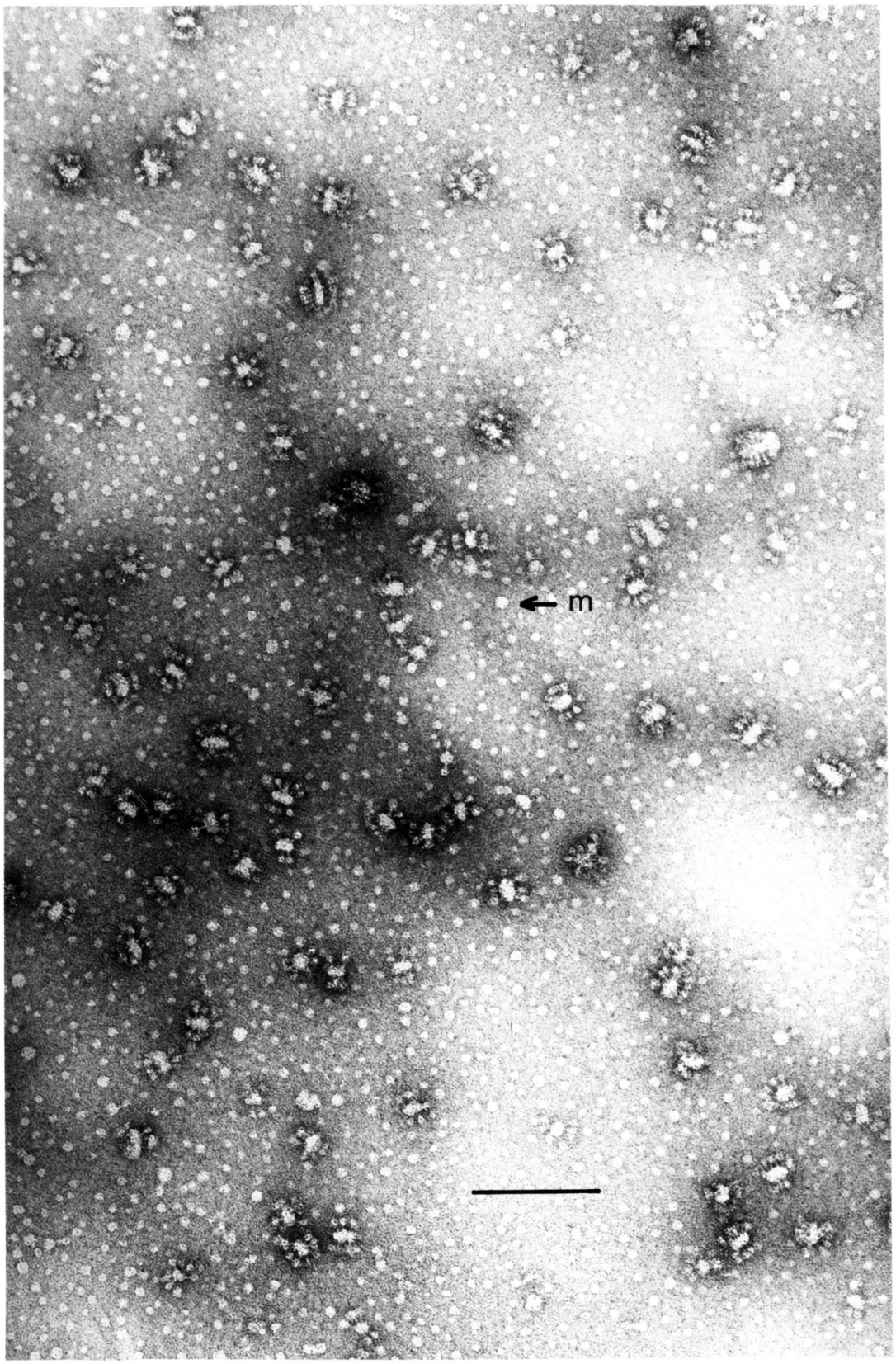
1



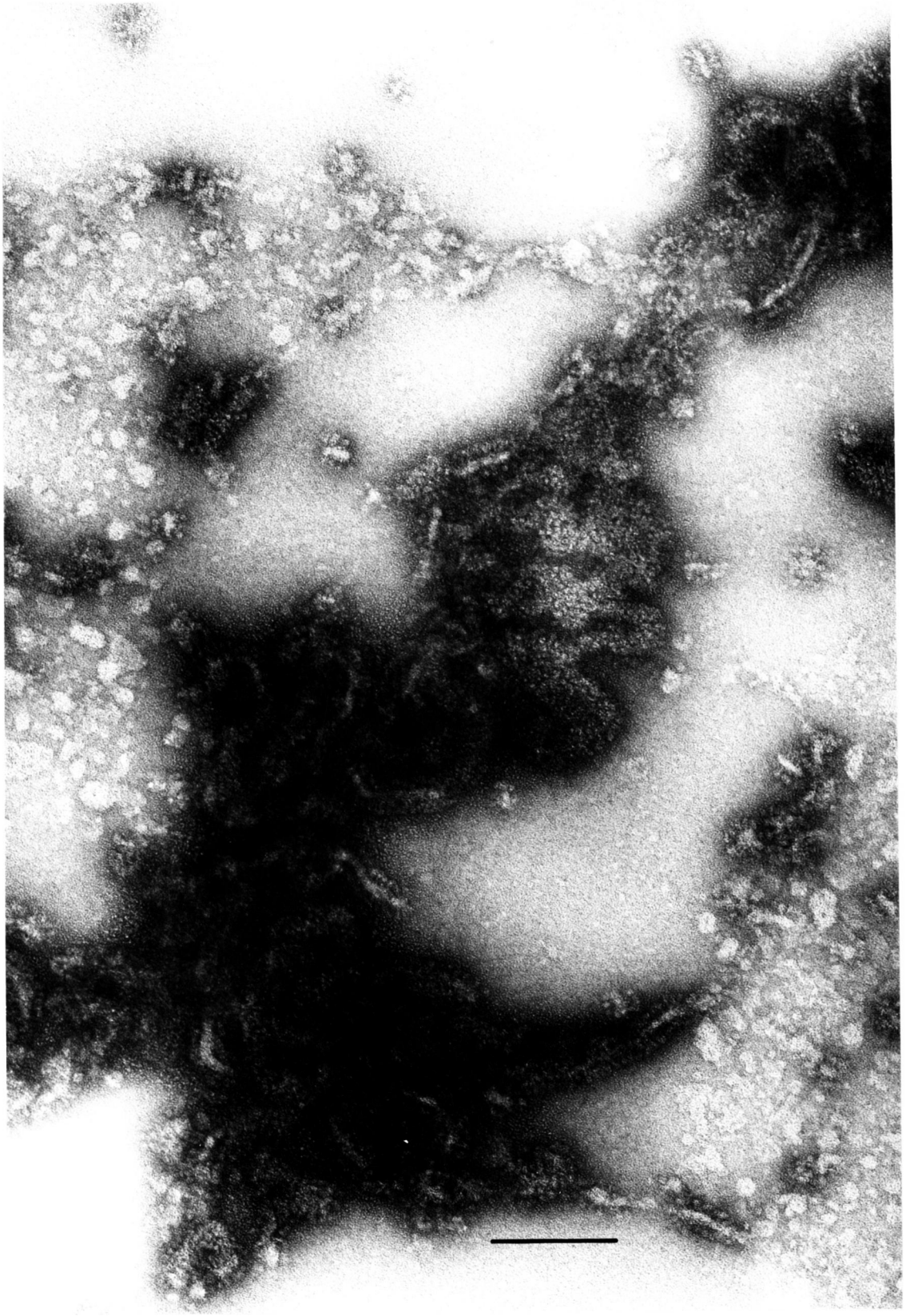
2



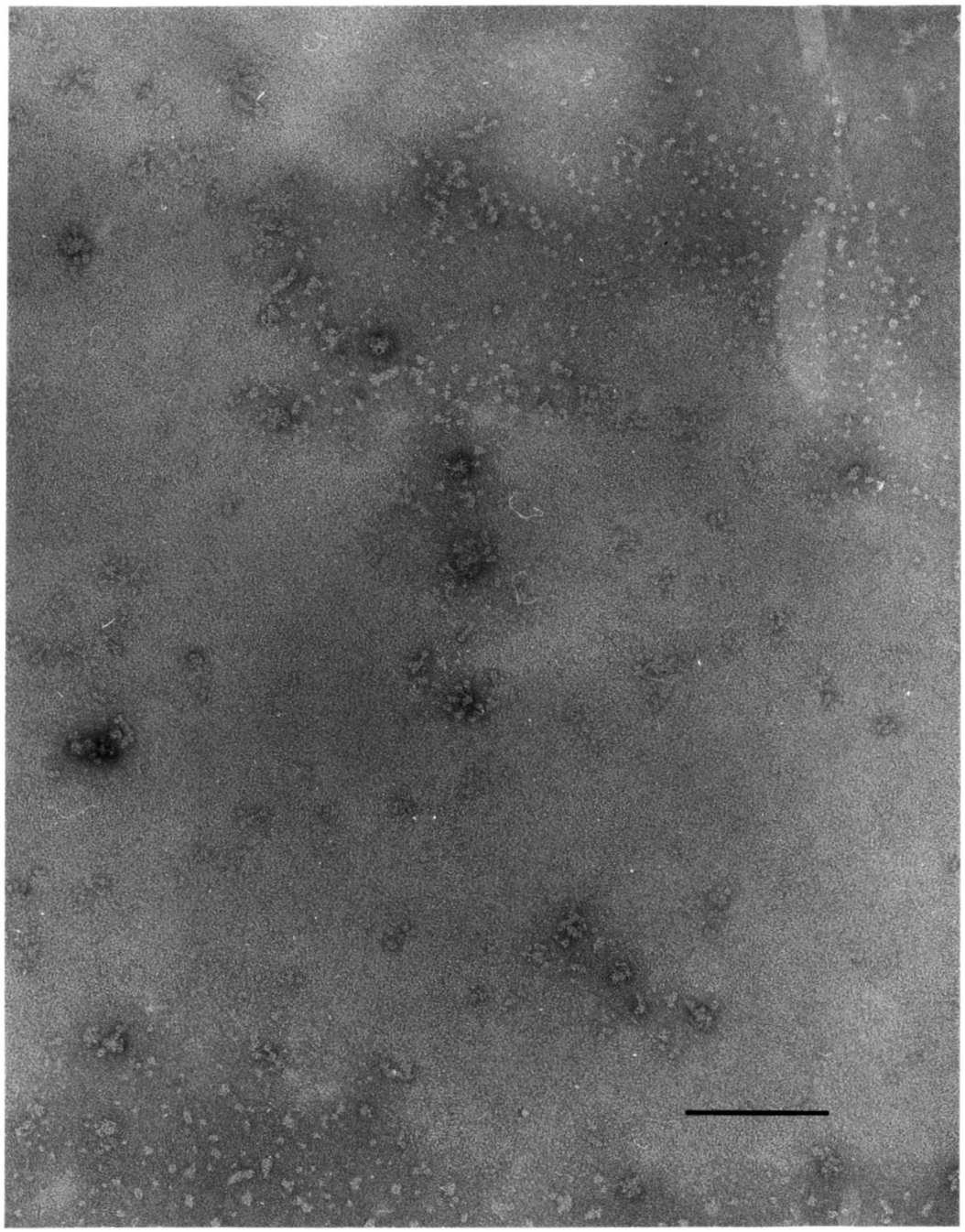
3 a



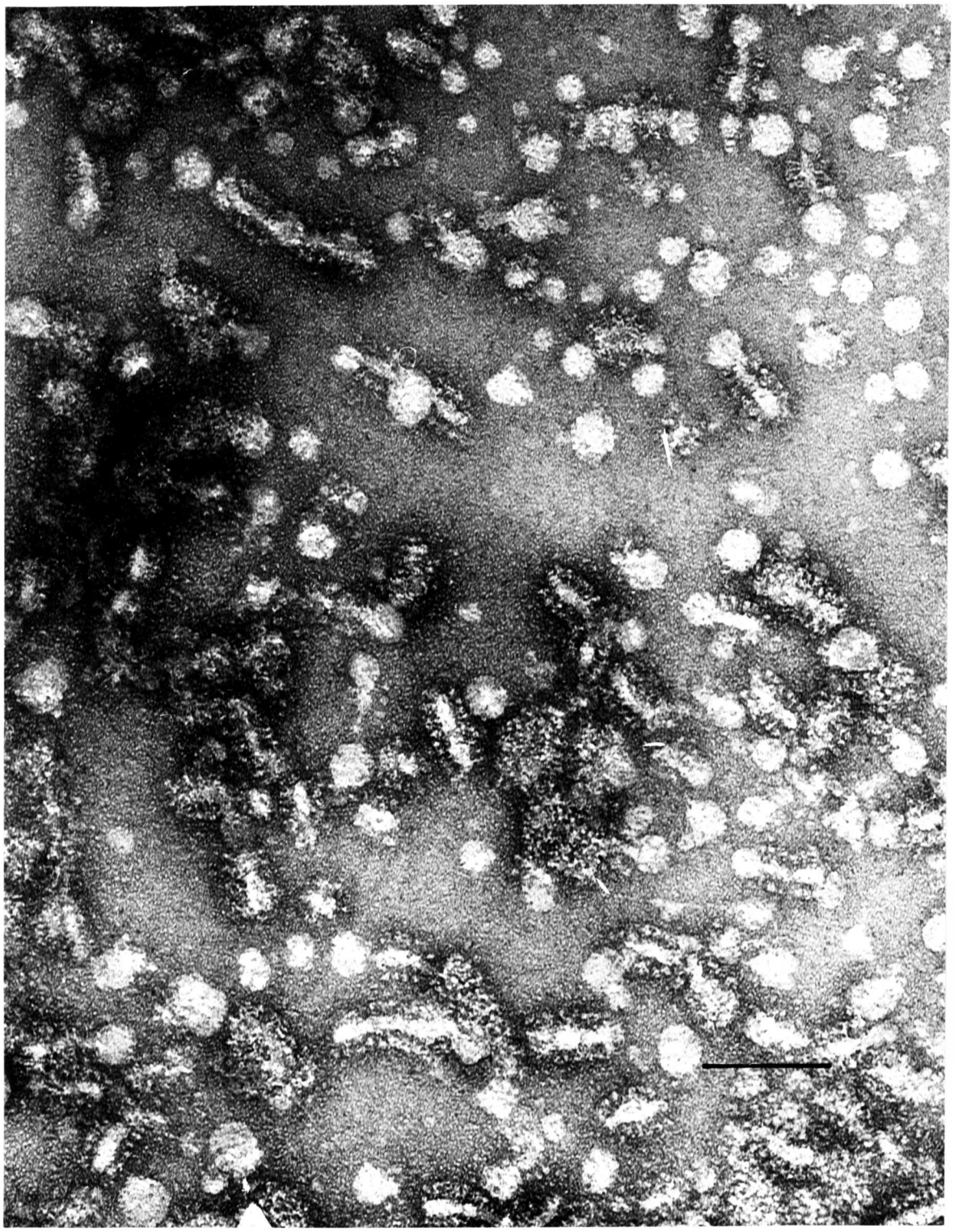
3 b



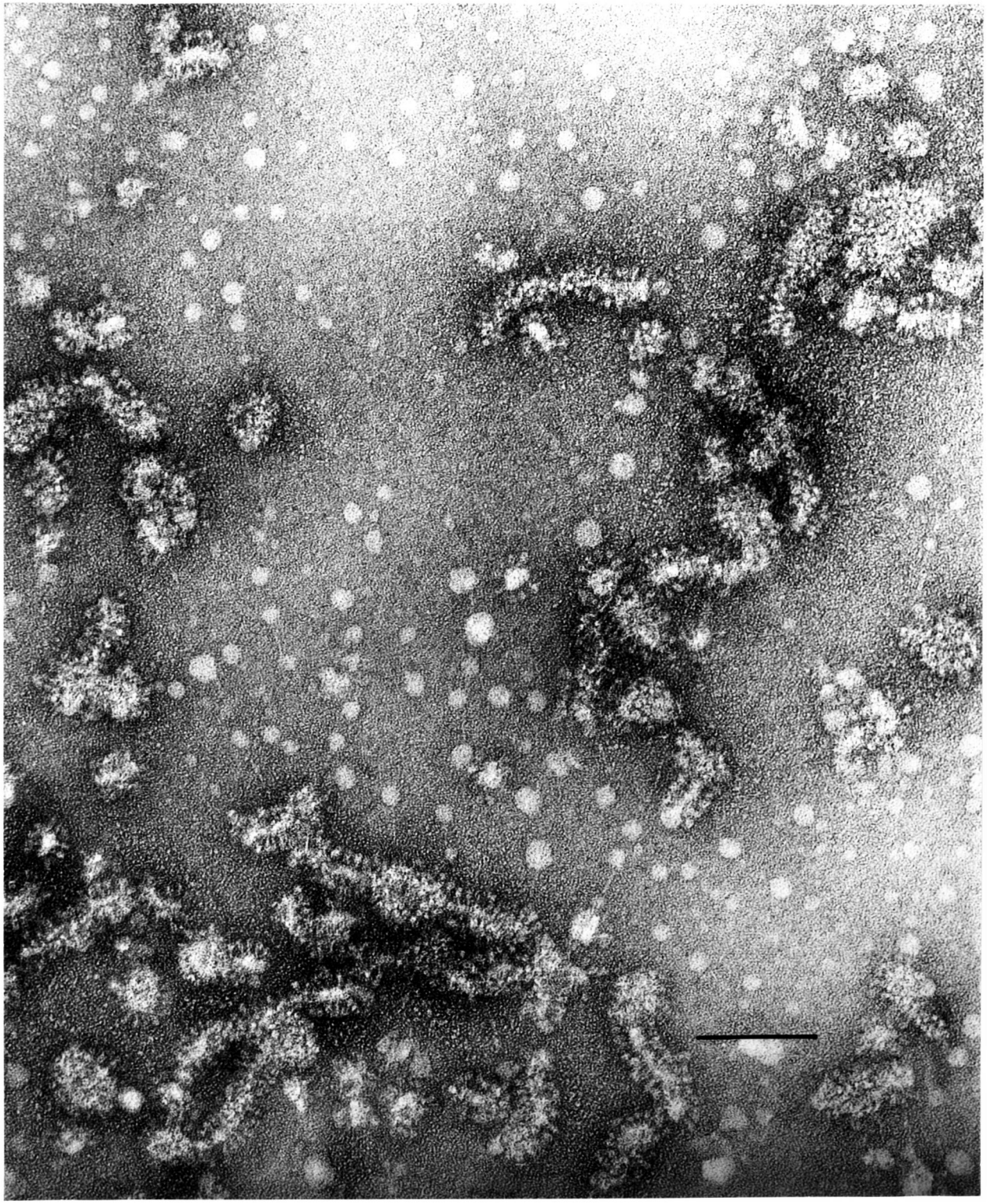
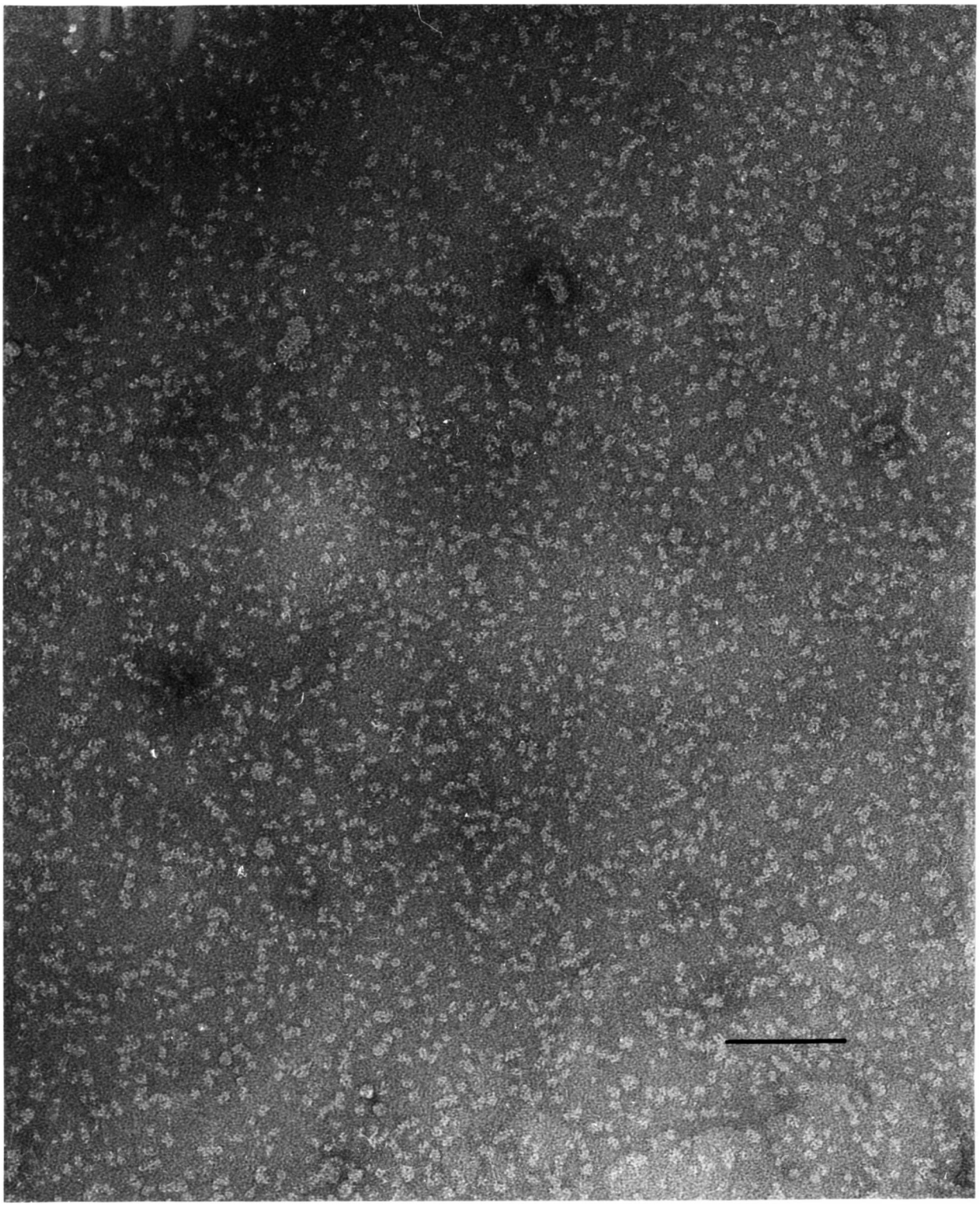
3 c



4



5



6