

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/227">https://hdl.handle.net/11094/227</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

論 文 題 目

パライソフルエンザウイルス

(H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) 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. H V ジライルス粒子外被

subunits の可溶化

13

II. H V ジライルス粒子外被

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・ウイルスはRNAを含む核蛋白 nucleocapsids とそれを包むスパイクを持つた外被により、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 は中180 Å, コツ450 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)。

このウイ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, 感染性ウイルス粒子

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

外被に結合してゐ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  
て果たす機能、外被と nucleocapsids の結合の機構  
などは現在まだ確立されてゐない。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  
ヒキソウイルスに分類されるインフルエン  
ザウイルスで、血球凝集蛋白質と 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質と  
neuraminidase 蛋白質とか、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、蛋白質の分析がないこと、また neuraminidase は蛋白質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・イマゾール処理 ( 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<sup>ウイルス</sup>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 )。H V J 外被はこの処理によって 6 ~ 10 S の subunits に解離した。ケルソ過によりイ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つてい

た。これらの事實は前記諸問題の解明の二つの系列になると思われる。

## 材料と方法

### 1 ウィルス

ウィルスは Hemagglutinating Virus of Japan (H V J)、5株を用いた。3日鶏卵(10日卵)の漿尿管内にブイヨンで100倍に希釈した感染漿尿管液0.2 mlを接種し、35°C 72時間培養した後、感染漿尿管液を採取した。この感染漿尿管液から分別遠心法(毎分2500回転、20分と毎分20000回転、30分遠心)によりウィルスを精製し、0.15 M 塩化ナトリウム、0.015 M グルコン酸ソーダ(SSC)に浮遊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)により精製したウィルスをを用いた。

### 2 アルカリ・エマゾール処理

SSCに浮遊した精製ウィルスを遠心により集め、0.02 M 炭酸緩衝液(pH、10)に再浮遊し、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・ソルベタン・モノラウレート, KAO-ATLAS K.K



) を加え、 $20^{\circ}\text{C}$ 、1~2時間処理した。ウイルスの破壊は濁度 ( $\text{OD}_{550\text{m}\mu}$ ) 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 $\frac{4}{5}$ を注射器で取り出して可溶性外被とした。

### 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に浮遊) 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抗原も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

4H1/0.1ml の抗 H V J 抗体を 0.1 ml 加え、室温で 20 分間振盪した。後、4HA/0.1 ml の H V J を 0.1 ml 加え再び室温で 20 分間振盪し、最後に 1% 鶏赤血球を 0.25 ml 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 0.1 ml に fetuin (5 mg/ml) を 0.2 ml 加え 37°C 20 分間置いた。後、解離して得た N-acetylneuraminic acid を Warren (1959) の 2-thiobarbituric acid 法で呈色させ、12 N の塩酸を 5% 含む n-butanol で色素抽出した (Aminoff, 1961)。この OD<sub>549</sub> m $\mu$  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 0.2 ml に 1.5% 鶏赤血球を 1.8 ml 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、解離して上澄に作るヘモグロビンを分光光度計で OD<sub>540</sub> m $\mu$  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  $OD_{230\text{ m}\mu}$  を測定した。

## 8 細胞融合能

K B 細胞 (Dr. TAKAHASHI 提供)、又は L L C-MK2 細胞を 10% 仔牛血清を含む Eagles' MEM で分散し、その 2 ml をスライド・カバーガラスを入れたレイトン試験管にまき、 $37^{\circ}\text{C}$  1 日培養して、カバーガ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 0.75 ml と 4% 仔牛血清を含む Eagles' MEM を 0.75 ml 加え、3 時間  $37^{\circ}\text{C}$  で静置培養した。そして PBS で 3 回洗、ブアーン氏液 (飽和  $\text{CaCl}_2$  溶液 15 ml, フォルマリン原液 5 ml, 氷酢酸 1 ml 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 5 ml のカラムを作り、その上に試料 0.5 ml を  
 静かに重層して、SW 39 ローター、または SW  
 W 50 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  
 て一定滴数おつ分注した。沈降係数を測定可  
 る時は、7 S のウサギの  $\gamma$ -グロブリン ( 抗イ  
 ンフルエンザ A<sub>2</sub> 抗体 ) を 0.15 ml とカタラーゼ (  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  ) を 0.05 ml を試料と混合し遠心を行  
 各フラクションのインフルエンザ A<sub>2</sub> 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、<sup>その活性の</sup>  $K_0$  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  
 ド ( SDS )、1% 2-メルカプトエタノール

(ME) で  $100^{\circ}\text{C}$ 、1 分間処理し、0.1% SDS, 0.1% ME, <sup>15% 蔗糖</sup> 0.01 M リン酸緩衝液 (PH 8.3) に一晩透析した。ゲルは  $0.525 \times 6 \text{ cm}$  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, 0.1 M 第二リン酸ソーダを含む。泳動用緩衝液は、0.1% SDS, 0.1 M 第二リン酸ソーダを使った。試料を泳動する前に  $5 \text{ mA}$  / 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  $0.1 \text{ ml}$  をのせ  $5 \text{ mA}$ 、4 ~ 5 時間、<sup>泳動後</sup> 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% コマジーバリリアントブルー R 250 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  $570 \text{ nm}$  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、標準蛋白としてキトクローム 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 ) 。

## II ケルシュ過

i Bio-gel A 15m ( Bio-Rad 社 ) を Pharmacia 社製のケルシュ過用カラムに充填して直径 2.7 cm , 長さ 28 cm のケルシュカラムを作った。緩衝液は 0.05% イ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 ) の二種類を使った。

ii Sephadex G 200 ( Pharmacia 社 ) 5g を 300ml PBS 中で十分に膨潤させ、脱気した後、Pharmacia 社製のケルシュ過用カラムに充填して直径 2.7 cm , 長さ 36 cm のケルシュカラムを作製した。緩衝液は Bio-gel と同様な二種類を用いた。

i ii いずれの場合も間隙容積は HVJ ウイルス粒子とフルーテキストラン、カラム内で、溶媒の占めき容積は、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メッシュにタロジオン膜をほ  
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 H V ジ 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 H V

ジ ウ イ ル ス 粒 子 の 破 壊。

アルカリ・エマゾール 処理によつて H V ジ 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 H V ジ

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<sup>加えると</sup>直ちに急激な濁

度の減少が起つた。5分以後40分までなだら

かな減少が続き、40分以後は極ゆるやかな減少

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<sub>550 mμ</sub> ) 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

( H A 活性 )、赤血球凝集抗原量 ( H I 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。

濁度の減少はエマソール最終濃度0.005%か  
ら始まり0.2%でフラトーに達した(図2)。  
フラトーにおいても処理前の濁度の約 $\frac{1}{3}$ が残  
っていたが、これは主としてアルカリ・エマ  
ソール処理によってほとんど壊れな~~い~~ nucle-  
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ソール濃度の  
処理によっても有意な変化は見られなかつた。  
。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  
ソール濃度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フラトーに達  
する濃度と一致した。このことはアルカリ・  
エマソ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 H V ジ 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% エマールを含む) 沈降遠心し、HA 活性、HI blocking 活性、Nase 活性、蛋白質の分布を測定した。蛋白質の約  $\frac{1}{2}$  は沈澱したが、活性は  $\frac{1}{50}$  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 fr. 5 ~ 9 に来たものは約  $\frac{1}{10}$  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質の約  $\frac{3}{4}$  は fr. 5 ~ 9 に来て、fr. 1 ~ 4 に来たのはわずか  $\frac{1}{4}$  であった (図 3a)。この遠心条件で 7 S の γ グロブリンは fr. 7 に、11 S 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 ~ 11 S になった。外被はアルカリ・エマール処理によって大部分が沈降係数 5 ~ 11 S 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新見と一致する。

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 ~ 20 S あたりに、HI blocking 活性当りの HA 活性が最も高い。アルカリ・エマール処理によって HA 活性が変化しなかつたが、これは 5 ~ 11 S になって低下する活性と、15 ~ 20 S になって上昇する活性とがちょうど見合つたためだと考えられる。アルカリ・エマール処理した試料から 11 S 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 ~ 11 S に分布してゐて（ $\rho$ - $\kappa$  は約 8.7 S）、図 3-a で見られた 20 S あたりの高い HA 活性は

見られなかった。沈澱した蛋白質も少なく、  
 上述の操作によつて nucleocapsids や HA 活性の高  
 … 20 S 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 のウイルスをエマール  
 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 % , そして蛋白質量の 32 % が回収  
 された。(表 2)。

可溶化外被蛋白質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 H  
 V ジウイルス粒子の蛋白質の主なものは 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  
 Dalton であつた。 $P_3$  は nucleocapsids の蛋白質であ  
 り、 $P_1$  は nucleocapsids にかたがひ強く結合して  
 … いる蛋白質で活性は持たないなかつた。 $P_4$  と  $P_5$  は

分離しないこともあるので、ここでは  $P_{4.5}$  として一々に扱った。ウイ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どのような分布しているかを調べた。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イルス蛋白の 32% が回収されたことと (表 1) とウイ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  $P_1$  ;  $\frac{0.24 \times 0.32}{0.26} \times 100 = 30\%$  ,  $P_2$  ;  $\frac{0.41 \times 0.32}{0.23} \times 100 = 57\%$  ,  $P_3$  ;  $\frac{0.13 \times 0.32}{0.28} \times 100 = 15\%$  ,  $P_{4.5}$  ;  $\frac{0.23 \times 0.32}{0.23} \times 100 = 32\%$  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ロー

クの OD<sub>570</sub> で示した ( 図 4-b )。 P<sub>2</sub>, P<sub>4.5</sub> は H I 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<sub>1</sub> 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フタイドは主に P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>4.5</sub> であるが、各ペフタイドの回収率と、活性の回収率、各ペフ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<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> には活性はなく、P<sub>4.5</sub> には H I blocking 活性, Nase 活性が結合してゐると考えられる。P<sub>2</sub> に活性が結合してゐるとすれば、その活性の外被可溶化分画への回収率は 60% 近くなければならぬが、そのような活性はなかった。

#### 4 可溶化外被 subunits の形態

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

可溶化外被可溶化分画には、アルカリ・エマ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 4000  
 回転、45 分間の遠心で nucleocapsids は沈殿した。  
 こゝが確認された。外径 50 ~ 180 Å の円形構造  
 物が多く見られ、またそれに外径 60 Å のリン  
 ガに巾 20 Å、長さ 60 Å の柄の付いた構造物が  
 1 ~ 4 本付着してゐるものも見られた。これ  
 うは外被の基部の膜由来するものと、スパイ  
 クだと思われれる。(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  
 ~ 180 Å の<sup>外被基部膜に由来する</sup>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<sub>2</sub> ヘフタイ  
 ドによつて構成されてゐると考えられる。  
 P<sub>4.5</sub> は、まだ形態学的に同定されてゐないが  
 、HI blocking 活性、Nase 活性と結合してゐるヘ  
 フタイドで、スパイクはこの P<sub>4.5</sub> によつて構  
 成されてゐる可能性が強い。  
 スパイクの基部に結合してゐる構造物の大き  
 さは一定してゐなかったが、このことは、ス  
 パイクを P<sub>4.5</sub>、基部の構造物を P<sub>2</sub> とすれば、  
 可溶化分画を濃度勾配遠心によつて、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（ $T_0$ ）だったこと（図 4- $h$ ）と対応  
する。



## II H V 丁ウイルス外被の再構成

1 可溶化外被 subunits の Bio-gel A 15 m ケル津過。

可溶化外被 subunits がケル津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% のエマールを含んだ Bio-gel A 15 m で、0.25% エマール処理から得られた外被可溶化分画、試料 2 ml を上昇法により津過した。溶出液を 3 ml ずつ分画して、各フラクションの HI blocking 活性、Nase 活性、HA 活性、蛋白質量 ( $OD_{230\text{ m}\mu}$ ) を測定した（図 6）。

HI blocking 活性、Nase 活性はほぼ平行なパターンを示し、fr. 24 から fr. 40 に亘って溶出した。この二つの活性はこのケル津過によって分離しなかった。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。溶血能もエマール存在下では阻害

されて測定できない。OD<sub>230 mμ</sub> は fr. 33 まででは、  
 だいたいい H I blocking, Nase 活性を反映した値で  
 ある。しかし、fr. 38 に活性と比例しない高いコー  
 クがあった。このケ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) であつた。  
 標準試料として用いたγ-グロブリンの溶出  
 容積 (V<sub>elution</sub>) は 114 ml (fr. 38) であつた。ケル  
 濾過の理論はまだ完成してないが実験的に  
 は、溶出容積 V<sub>e</sub> は試料物質の Stokes 半径に依存  
 するところが明らかになつていて水和の大きい  
 ケルでは 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。

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

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

r ; ケル内の通路を円筒と考へ

t ; 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 K<sub>d</sub> は

$$k_d = \frac{38 - 15}{50 - 15} \doteq 0.66$$

この二つの値を(1)式に代入してこのカルの $r$ を求めると  $5.5 \times 10^2 \text{ \AA}$  になる。この数値から活性のピークの見られ方: fr. 31 と fr. 33 に溶出した溶質の Stokes 半径  $a$  を計算すると

$$\text{fr. 31} \quad k_d = \frac{31 - 15}{50 - 15} = 0.46 \quad \frac{a}{r} = 0.17 \quad a = 94 \text{ \AA}$$

$$\text{fr. 33} \quad k_d = \frac{33 - 15}{50 - 15} = 0.51 \quad \frac{a}{r} = 0.15 \quad a = 83 \text{ \AA}$$

Svedberg の式

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

と Stokes の法則から導かれる式

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta rN}$$

から

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

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

$\rho$  ; 溶液の密度

$v$  ; 偏比容

$\eta$  ; 溶媒の粘度

$N$  ; Avogadro 数

$r$  ; 溶質の Stokes 半径

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

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

従つて  $r$  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  $\gamma$ -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

$$M_{fr.33} = \frac{83 \times 6.8}{52 \times 7} \times 160000 = 250,000 \text{ ダルトン}$$

になる。

## 2 外被断片の再構成

i. Bio-gel A 15m ケル柱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 2 ml を柱過した。図 6 と同様に溶出液を 3 ml ずつ分画して、HI blocking 活性, Nase 活性, HA 活性, HL 活性,  $OD_{230m\mu}$  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 1/2 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。このケ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 4 トクローム C, 血清アルブミン, フェトウイン, ヨクロブリン, フルーデキストラン, 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  $V_e$  を比較するとフルーデキストランは一致し

たか、 $\gamma$ -グロブリン、 $\alpha$ トクロームとでは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。もしケルシ過中に外被  
 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。実際はエマソール  
 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、エマソ  
 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  
 コ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ソ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。

間隙容積の直後にコークが存在することはこ  
 の会合はエマソール濃度がある一定値以下に  
 なるとケルシ過中で必ず起ることを意味す  
 る。もしも、それが事実であれば、試料に含

まれるイマヨ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かり溶出パターンは変わるはずである。

イマヨール濃度 0.5%、1% の処理から得られた可溶化外被分画をそれぞれカルシウム処理して、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  $\frac{1}{2}$  が間隙溶積直後にコークを持って溶出したが、0.5% の場合は、約  $\frac{1}{2}$  の活性が fr. 24 のあたりに広いコ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  $\frac{1}{3}$  程度に減少し、0.25%、0.5% で fr. 32 にあった HA 活性のコークは fr. 29 に移った (図 8-b)。このように試料のイマヨ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 はカルシウム処理中に、イマヨ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、ケルシュ過前の可溶性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  $550 \text{ m}\mu$  の長さのものが見られた。(写真 3-b)。

これらの構造は、ウイルス粒子外被の構造と非常に類似していて、形態学的にはウイ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ケルシュ過前には存在せず、ケルシュ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、 $50 \text{ \AA}$  のリング構造が集合して形成している  $50 \text{ \AA} \sim 200 \text{ \AA}$  の構造物が見られた (写真-3a矢印 m) と思われる。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。

エマソ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、スパイクの、4本の集合物などが見られた (写真 3+c)。fr 36 ~ fr 40 では可溶化分画と同様な様相をしていた。

### iii 再構成外被断片のケルシュ過

エマソ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。もしこの構造物がケルシュ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。このフラクシヨンの 1.5 ml を同じカル・カラムで濾過し 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 にピークを持つて溶出し、fr. 32 のあたりは活性は見られなかった (図 9)。<sup>この時</sup>再構成外被断片が、HA 活性のピークのフラクシヨ<sup>fr. 15</sup>ン<sup>に</sup>存在することは電子顕微鏡により確認した。

この結果は、カル濾過前の可溶化分画に、fr. 32 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、再構成がカル濾過中、またはカル濾過後に起ったことを示す。

iv 7 ~ 11 S 外被可溶化分画による再構成可溶化分画をさらに蔗糖濃度勾配沈降遠心 (図 4-a と同じ条件) にかき分画し、7 ~ 11 S のフラクシヨンを集めた。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 ~ 11 S の外被可溶化分画 2 ml をホルシュ過に  
 かけ、溶出液を 3 ml ずつ分注して各フラクシ  
 ョンの Nase 活性、HA 活性、HL 活性、OD<sub>230</sub>  
 m $\mu$  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ール濃度 9 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  
 フラクシオンにもスパイクの面状配列が可  
 なり見られた。fr. 32 では 600 ~ 800 Å 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 ~ 11 S 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か示された。

#### 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、再構成前  
 後の沈降パターンを比較した。

ホルシュ過前の外被可溶化分画と、それをホル  
 シ過して得た HA 活性の 70-7 fr. 29 (図 8-b  
 ) からそれぞれ 0.5 ml を取り、5 ~ 20% の蔗糖  
 濃度勾配沈降遠心にかけた。遠心は毎分 3500

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  $\frac{2}{3}$  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  $\frac{1}{5}$  であった。あとの  $\frac{4}{5}$   
 にはケルソ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 ケルソ過による再構成

ここで行った Bio-gel A15m 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  
 ケルソ過中にも、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  
 によつて fr. 15 ~ fr. 32 に溶出して来る。そのた

め Bio-gel A 15 m 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性 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になるが望ましい。Sephadex G 200 がこの条件を満たしていた。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性試料 2 ml を沖過した。HI blocking, Nase, HA 活性並びに  $OD_{230\text{ m}\mu}$  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、同じ試料を沖過した。この場合も HI blocking, Nase, HA, HL の各活性及び  $OD_{230\text{ m}\mu}$  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点とである (図 12-b)。エマゾールは fr. 32 にピークを持って溶出した。HVJ ウイルスゲル - テキストランは fr. 22 に、カタラーゼ

とケロフリンは 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ケ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% 蔗糖濃度勾配沈降遠心による沈降パターンを見た。沈降前の可溶化外被蛋白に比較して Nase 活性の  $\alpha$ - $\gamma$  は約 3 倍、HA 活性  $\alpha$ - $\gamma$  は約 8 倍、HL 活性  $\alpha$ - $\gamma$  は約 10 倍沈降した(図 11-c)。

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つて Sephadex G 200 のケル沈過でも再構成が起ることを証明された。可溶化外被蛋白は Sephadex G 200 のケル沈過では間隙容積直後に溶出するから、ケル沈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。

### Ⅲ 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ば血球には吸着しないと思われる。ニワトリ赤血球 0.2 ml に再構成外被断片の試料を 0.8 ml 加え、0℃ で 20 分間吸着させた後、毎分 2000 回転 5 分間遠心し、上澄に残り、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、たか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、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...

## ii 細胞融合能

HVJ ウイ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ゐる ( 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、<sup>細胞に対して</sup> 何らか  
 の影響を保持していると思われる。もし再構成  
 外被に細胞融合能があれば、ウイルス核酸の  
 影響は完全になくすることが出来る。

K13 細胞の単層培養をレイトン 4 ユーブに入  
 れたスライドガラスの上で行い、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 0.75 ml と 0.75 ml 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、  
 フォー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 0.75 ml の PBS を加えた。再構成外被試料として Sephadex G 200 によるケル津過から得られた 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。この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。fr. 23 程交率はおくなかった。

LLC<sup>MA2</sup>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。

再構成外被断片の構成へのタイト可溶化外被 - Sephadex G 200 ケル津過 - fr. 22 (図 12-b) の試料を 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール, 100 °C 1 分間処理し、0.1% SDS を含む 7.5% のアクリルアミドケル電気泳動にかけ構成へのタイトを調べた。

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 カル柱過によって得られた。再構成外被断片試料 0.5 ml を 0.02M, PH 10.0 の炭酸緩衝液に一晚透析して、5% エマゾールを 0.05 ml 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°C、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 5-b)。この処理により Nase 活性, HI blocking 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、  
て、エマゾール・エーテル法としてミキソウ  
ウイルスの破壊に用いられた。その後アルカリイ  
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-Thé & O'connor, 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、て、インフルエンザウイルスや  
RNA 腫瘍ウイルスの外被を変性せしめ可溶  
化するこことが報告された ( 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 ~ 10 S の subunits に解離するといふ、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 ~ 10 S の subunits はホリアクリルアミドケル  
電気泳動によれば、主として  $P_2$  (52000 ガルト  
ン) と  $P_{4.5}$  (77000, 81000 ガルトン) の蛋白か  
ら構成されていた。沈降係数とケル泳過パタ  
ーンをより求めた Stokes 半径とから計算した、6.8  
S の沈降係数を持った subunits の分子量は、  
250000 ガルトンであった。(25% - ジ)。

可溶化外被のローグの沈降係数は 8.7 S であ  
り、から、分子量は 360000 ガルトンと算定される  
(分子量の  $\frac{2}{3}$  乗が S に比例する (Martin & Ames  
1961) としても、8.7 S の Stokes の半径を 94 Å (24  
% - ジ) としても一致した値になる)。従  
って 6 ~ 10 S 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  $P_{4.5}$  の比は一定でなかつ  
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、ものや 1 ~ 2 本付いてゐ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 ~ 10 S の subunits には HI blocking, Nase 活性が見られ、それらの活性は、 $P_{4.5}$  に結合してゐることを示され (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を推定された (20 ページ)。スパイクは先端が  $60 \text{ \AA}$  のリング状に見える。しかし、ウイルス粒子または再構成外被のスパイクを観察すると、面状に配列してゐて軸方向から見たと思われれるものでも、リング状になつてゐることから、実体は球状で中心に染色剤が浸透しやすい (中空と思われれる) 構造をしてゐることが考えられる。スパイクの先端を直径  $60 \text{ \AA}$ 、内部が直径  $30 \text{ \AA}$  の中空になつてゐる球と計算し、偏比容を  $0.74$  として分子量を求めると、 $81,000$  カルトンになつた。これは  $P_{4.5}$  ( $77,000 \sim 81,000$  カルトン) とよく一致した。

外被基部の膜を構成する最小単位が  $50 \text{ \AA}$

のリング状であることを示す像が見られたが、この50 Åリング状構造も直径50 Å、内部が20 Åの中空として計算すると49000ガルトンになり $P_2$  (52000ガルトン) とよくあう。

この一致から、 $P_2$  (52000ガルトン) は外被の膜部分を構成し、 $P_{4.5}$  (~~78000~~ 81000ガルトン) 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、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では外被可溶性分画の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 & Valentine は1本のスパイクが、HAで7.5S、Naseで8.5Sとしてゐるか、スパイク1本は7.5Sと8.5Sを示すには小さいかと思われ

れる。また彼等は<sup>HA活性の</sup>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<sub>活性</sub>による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。

H V J の場合、P<sub>4</sub>、P<sub>5</sub>がそれぞれNase、H 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、こゝで取り上げた5つの蛋白には対応しない可能性も強い。

可溶化外被 subunits 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。カルシウム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、カルシウム過後の試料に見られた。

2. エマゾールを含むカルシウムと含まない

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

3. <sup>カルシウムにより</sup>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. カルシウム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令だけ再構成が起った。

2. カルシウム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 & Valentine (1969), Webster & Darlington (1969)

は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か、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らるものではなかつた。

ここで得られた再構成外被は電子顕微鏡で見た形態に関して、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つた。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つてゐる。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 可溶性外被 subunits から得られた再構成外被がかなり均一であつたことである(写真4)。もっと均一な subunits を使えば、大きさのそろつた再構成外被を得ることが出来るかも知れない。

図8-1の fr. 30 に非常に大きな再構成外被が得られ、それを再び処理すると間隙容積直後に容出した(図9)が、このことは fr. 30

の再構成外被はケルシ過後か、または溶出す  
 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、<sup>これは</sup>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、このフラクシヨ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 のケルシ過において大きな面状構  
 造の再構成外被は $\alpha$ - $\gamma$ 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 $\alpha$ - $\gamma$ より少し後のフ  
 ラクシヨ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 のゲル濾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樣ではなく、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、有益な助言並心々に激励の言葉を下  
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. Microscopic. 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
- Tiffany, J. M. and 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 Rueckelshaus, E. 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 ( 0.02 M PH 10 ) に浮游した:HV  
J 0.96 ml (  $OD_{550\text{nm}} 0.530$  ) に 0.04 ml エマゾール ( 5% ) を加え、 $20^{\circ}\text{C}$  に置き各時間の  $OD_{550\text{nm}}$  を測定した。

$0'$  の値は  $0.530 \times 0.96 \doteq 0.509$  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 (  $64000 \text{ HA/ml}$ , Nase.  $11.6 \text{ } OD_{549\text{nm}}/0.1\text{ml}$ ,  $OD_{550\text{nm}} 0.69$  ) 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、 $OD_{550}$  (—□—) 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 ( 0.02 M PH 10 ) を加え毎分 40,000 回転 5 分間遠心し、上澄の HA (—●—), HI blocking (—○—), Nase (—△—) の各活性ならびに蛋白質量 (—○—) を測定した。



図3 アルカリエマール処理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。沈降液は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(△)活性及び蛋白質量(—○—)を示す。7S, 11Sはそのそれぞれがリン, 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 $\frac{HA}{HI\text{ blocking}}$ を計算したものの。

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%エマール濃度で15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  $\frac{4}{5}$  を注射器で取り出  
 し、その 0.5 ml ( 3200 HA/ml, Nase/0.1ml 6.2 OD<sub>579</sub>,  
 320 HI/ml, 950  $\mu$ /ml 蛋白 ) を 5 ~ 20% 蔗  
 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

a) HA (●), HI/ml (○), 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沈

降位置を示す。

r-グロブリン・カタラーゼの

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<sub>570nm</sub> のピーク値をプロットした。

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 8-4 の fr. 29 )

標準試料として 4 トクローム C を入れ

た。

図 6 . . 可溶性外被 subunits の イマゾール を含ん  
 だ Bio-gel A 15 m ケル による 浄過 パター  
 ン。  
 0.25% イマゾール 濃度 の 処理 から 得られ  
 た 外被 可溶性 分画, 2 ml (2800 HA/ml, 360 HI/ml  
 Nase 4.5 OD<sub>230</sub>mpu, OD<sub>230</sub> 2.08) を 0.05% イマゾ  
 ール を含んだ 0.02 M pH 10 炭酸緩衝液 で 平  
 衡化 した Bio-gel A 15 m ケル カラム (2.7 × 28.3 cm)  
 で 浄過 した。 溶出液 は 3 ml ずつ 分注 した。  
 。 各 フラクション の HA, HI ml (-○-),  
 Nase (-△-) 活性, そして OD<sub>230</sub>mpu (-●-) を 測  
 定 した。 標準試料 として 用いた: γ-グル  
 タリン の 溶出位置 を 矢印 で 示す。

図 7

a) 可溶性外被 subunits の イマゾール を含ま  
 ない Bio-gel A 15 m ケル による 浄過 パター  
 ン。

図 6 と 同い 試料 2 ml を 同い ケル カラム  
 を PBS で 平衡化 した もの で 浄過 した。  
 。 溶出液 は 3 ml ずつ 分注 した。 各 フラ

フシヨンの HA (●), HIbl (○), Nase (△),

HL (---○) 活性及び  $OD_{230m\mu}$  (○) を測定した。

b) 同じセルカラムでの 40 mg エマール

8000  $\frac{HA}{ml}$  HVJ ウイルス, 1 mg フルーレ

キストランの溶出パターン及び  $\gamma$ -グロ

ブリン, 牛血清アルブミン (BSA)

, fetuin, 4トクロム C (Cyt. C) の溶

出位置を示す。

### 図 8

a) 0.5% エマール濃度, 外被可溶化分画

の Bio-gel A 15 m (PBS) セル溶出パタ

ーン。

0.5% エマール濃度の処理から得られ

た外被可溶化分画, 2 ml (3200  $\frac{HA}{ml}$ , 320  $\frac{HIbl}{ml}$

Nase/0.1ml 6.2  $OD_{549m\mu}$ ) の図 7 と同じセルで

の溶出パターン。

b) 1% エマール濃度外被可溶化分画, の

Bio-gel A 15 m (PBS) セル溶出パタ

ーン。

1% エマール濃度の処理から得られ

た外被可溶化分画の図7と同じカールで  
の注過バクーション。

図9、再構成外被のBio-gel A 15 m ( P B S ) カ  
ール注過。

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と同じカール  
で再び注過した。HA以外の活性は低  
く可示で測れなかった。

図10、7~11S外被可溶化分画のBio-gel A 15 m  
( P B S ) カール注過。

外被可溶化分画を5~20%蔗糖濃度勾  
配沈降遠心にかける。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と同じカールで注過  
した。HIは測定しなかった。

図11、カール注過前後の沈降バクーションの比較。

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% イマカール濃度の処理から得る

れた外被可溶化分画,

濃度勾配は 0.25 % イマゾールを含む炭酸緩衝液 (0.02 M PH 10) 中に作った。

HA (●), Hill (○), Nase (△)

b) Bio-gel A 15 m にふる再構成外被

(図 8 b, fr 29), HA (●), Nase (△)

HL (---○---)

c) Sephadex G 200 にふる再構成外被

(図 12 - b, fr 22), HA (●), Nase (△)

HL (○---)

図 12, 外被可溶化分画の Sephadex G 200 にふる下ル汗過。

図 6 と同じ試料を  $\phi 2.7 \times 35.6$  の Sephadex G 200 カルカラムで汗過した。

a) 0.05 % イマゾールを含む炭酸緩衝液 (0.02 M PH 10) でカールを平衡化しこの液で溶出させた。

b) PBS でカールを平衡化して PBS で溶出させた。HA (●), Hill (○) Nase (△)

HL (---○---), OD<sub>230 m $\mu$</sub>  (---)

写真の説明

写真 1 . P B S 浮游未知理 H V ジ ウ イ ル ス

X 200,000 スケールはすべて 0.1 μ

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

X 200,000

写真 3 外被可溶化分画, Biogel A 15m (PBS)

フルシフト

a) : fr. 25 X 200,000 矢印 m : 外被基部膜由来構造

b) : fr. 29 X 20,000

c) : fr. 35 X 200,000 (図 8-b)

写真 4 . 7 ~ 11 S 外被可溶化分画, による

再構成外被

( 図 10 . fr. 30 )

X 200,000

写真 5 Sephadex G 200 による再構成外被

( 図 12 b . fr 22 )

X 20,000

写真 6 再構成外被の再アルカリイマゾー

ル処理、図 12-b の fr. 22 を 0.02 M

PH 10 の炭酸緩衝液に一晚透析した

後 1% イマゾールで処理したものの

。

x 200,000



Fig.1

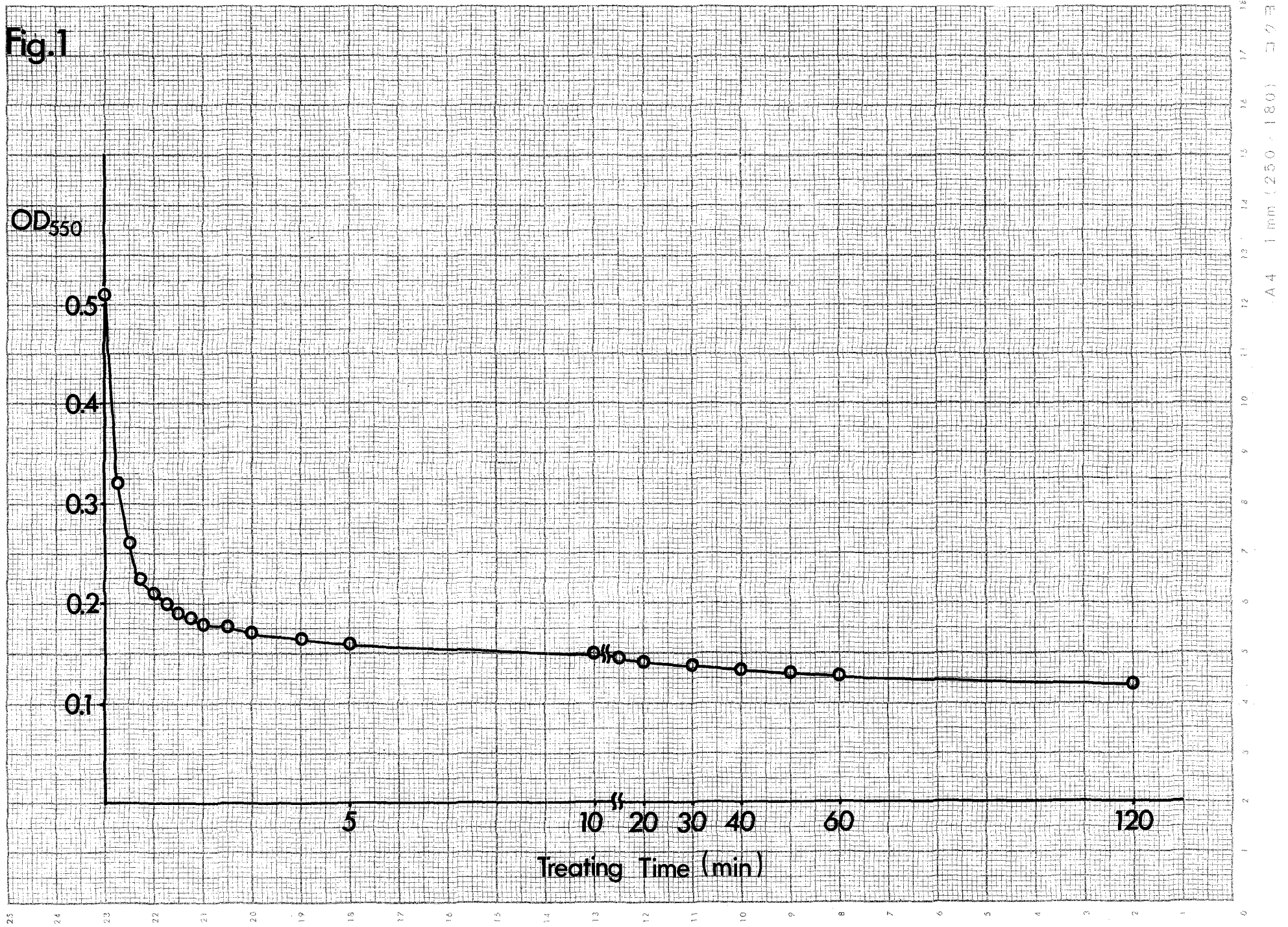
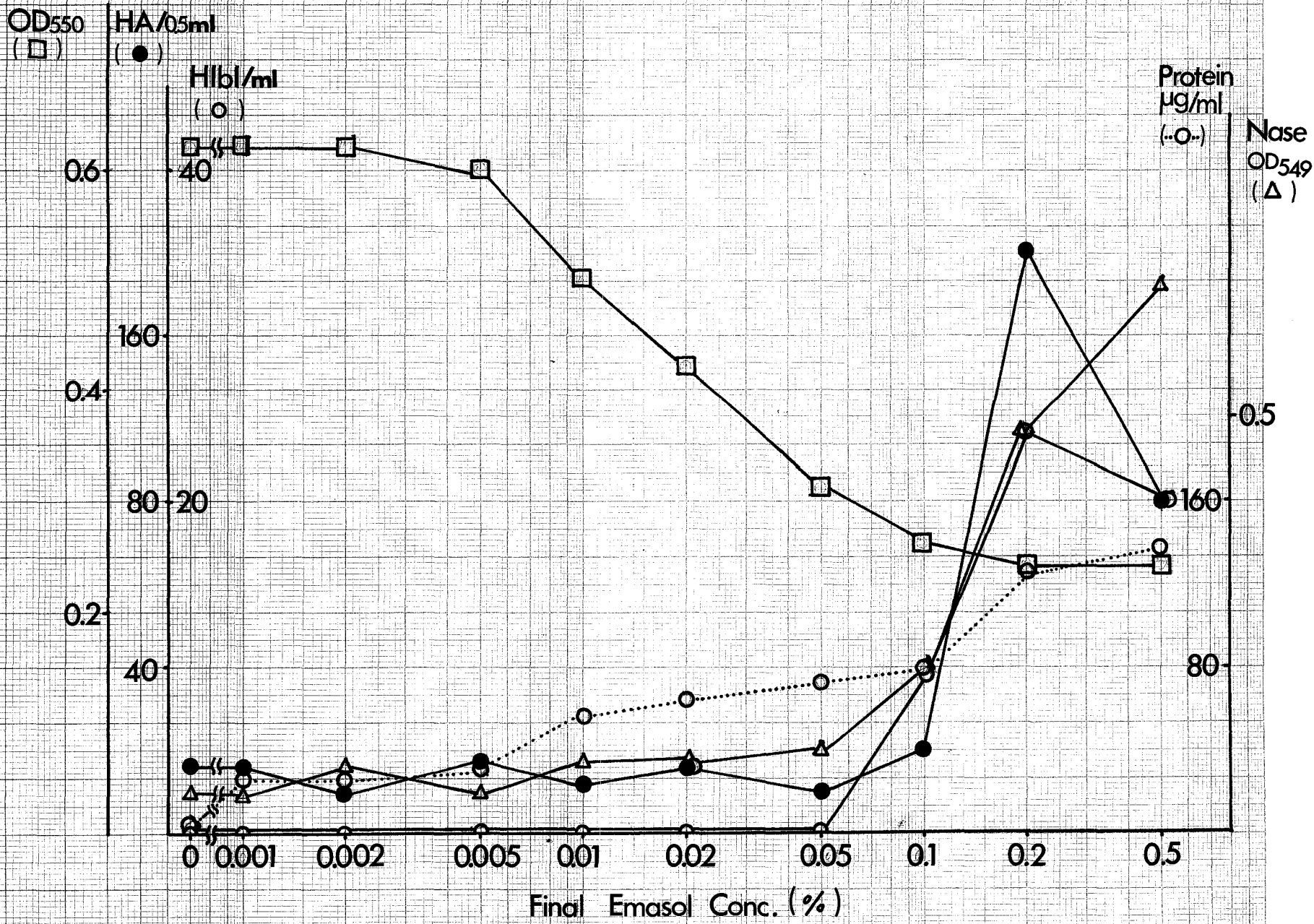
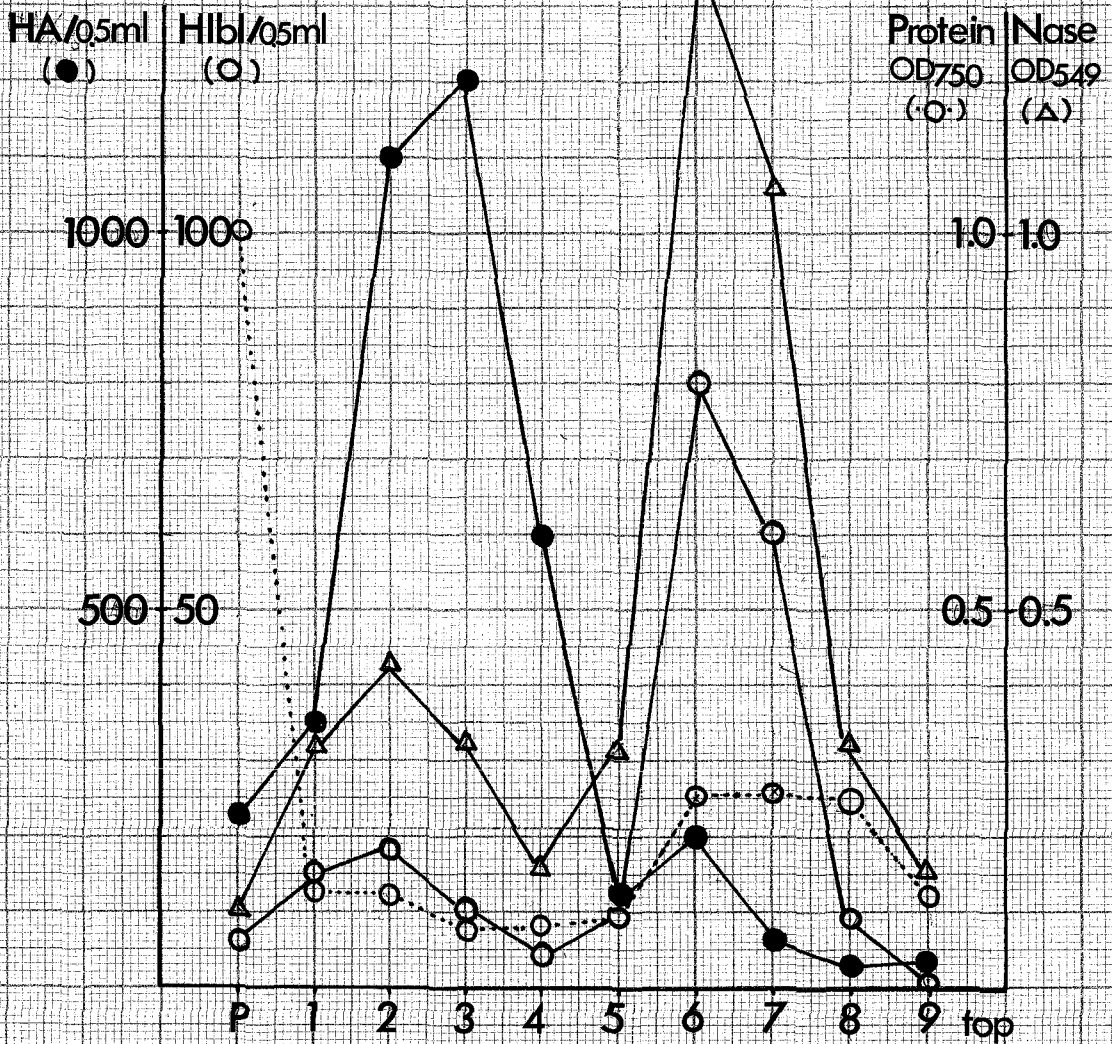


Fig.2



**Fig.3**

**a**



**b**

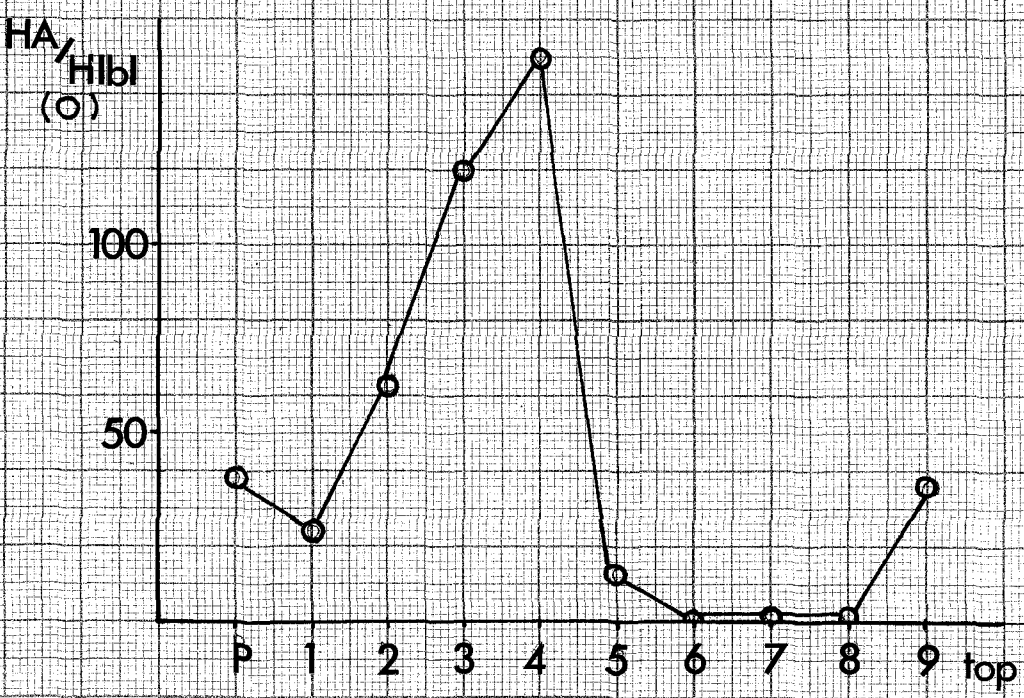


Fig. 4

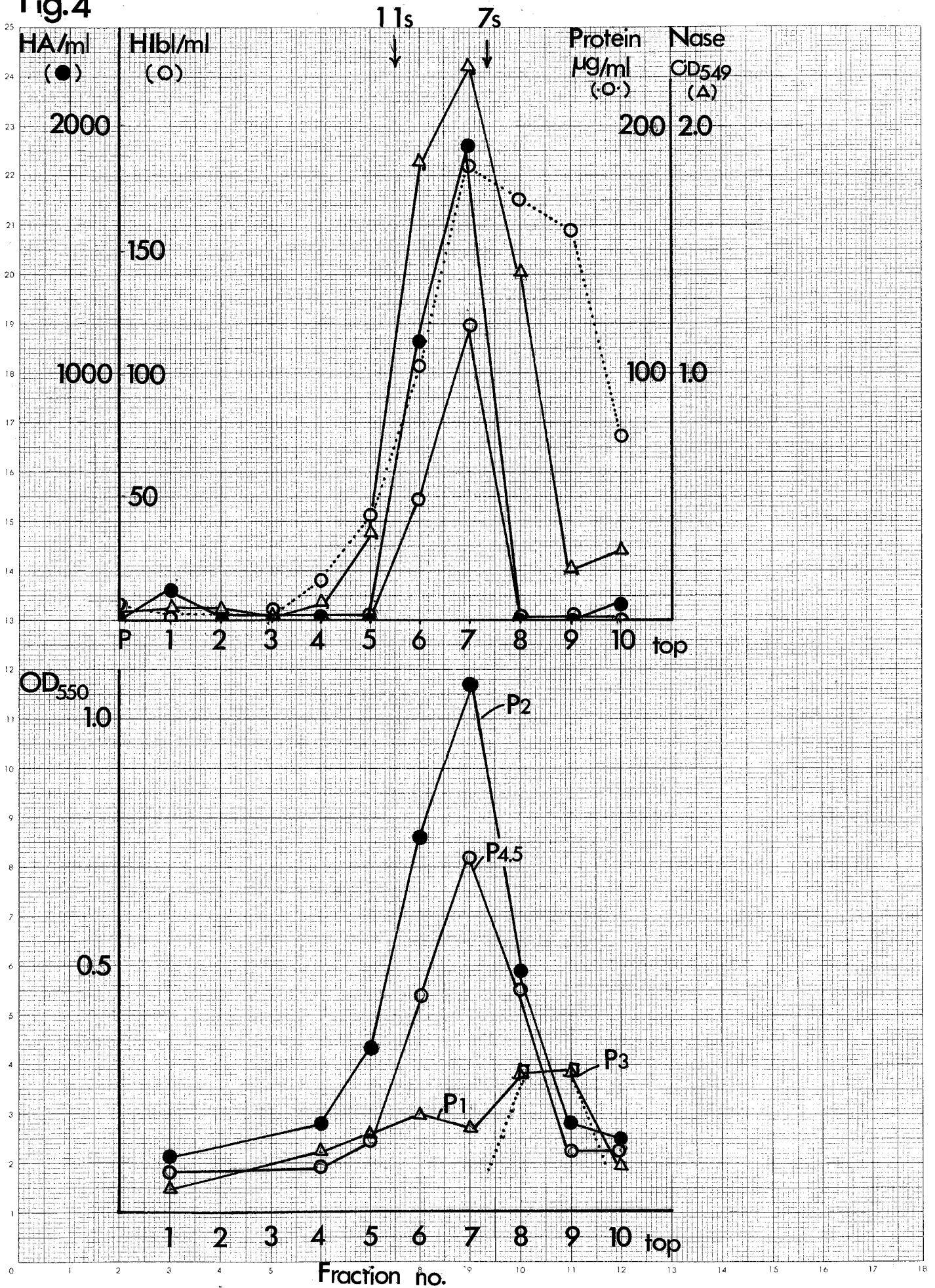


Fig. 5

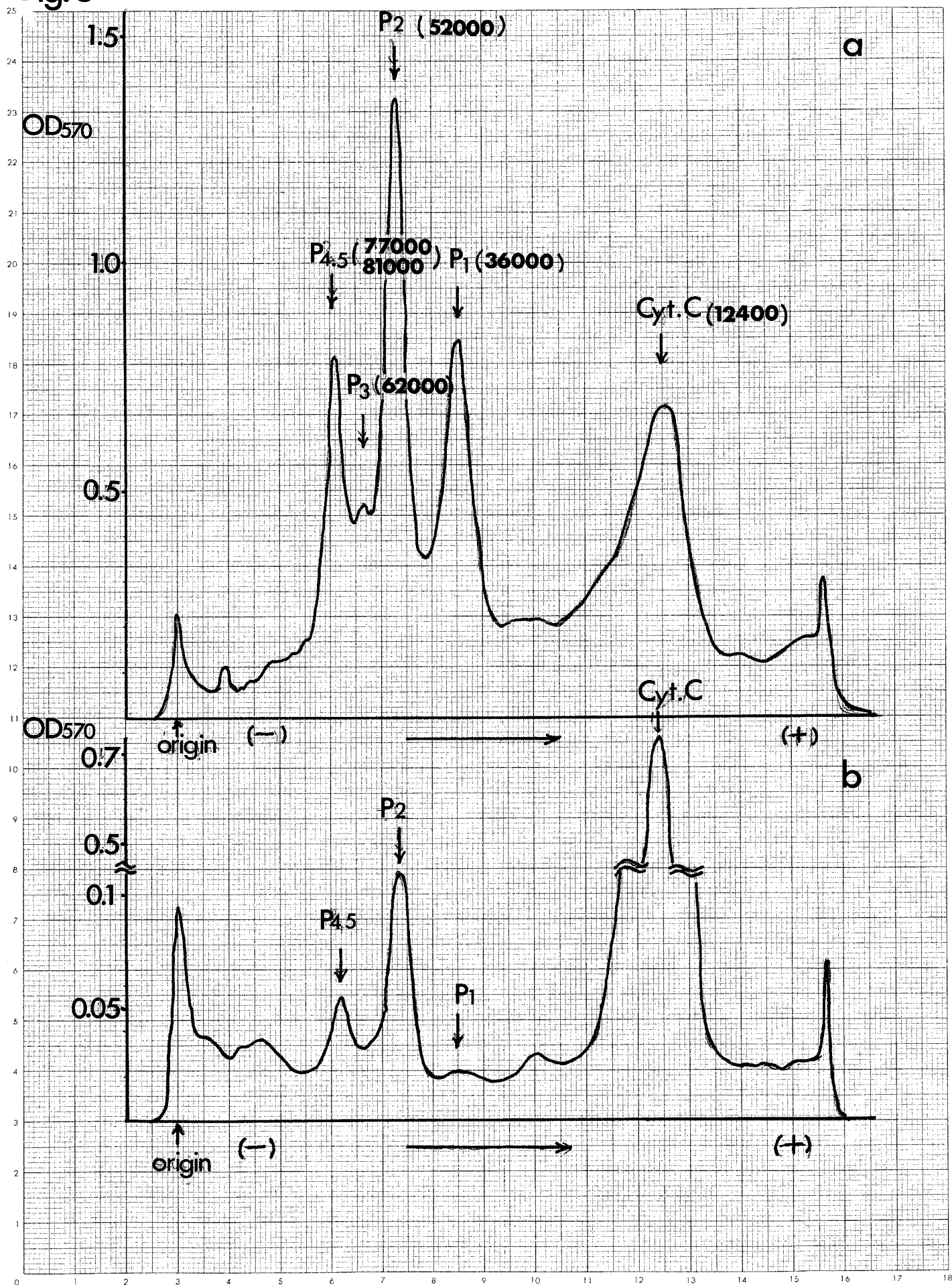


Fig. 6

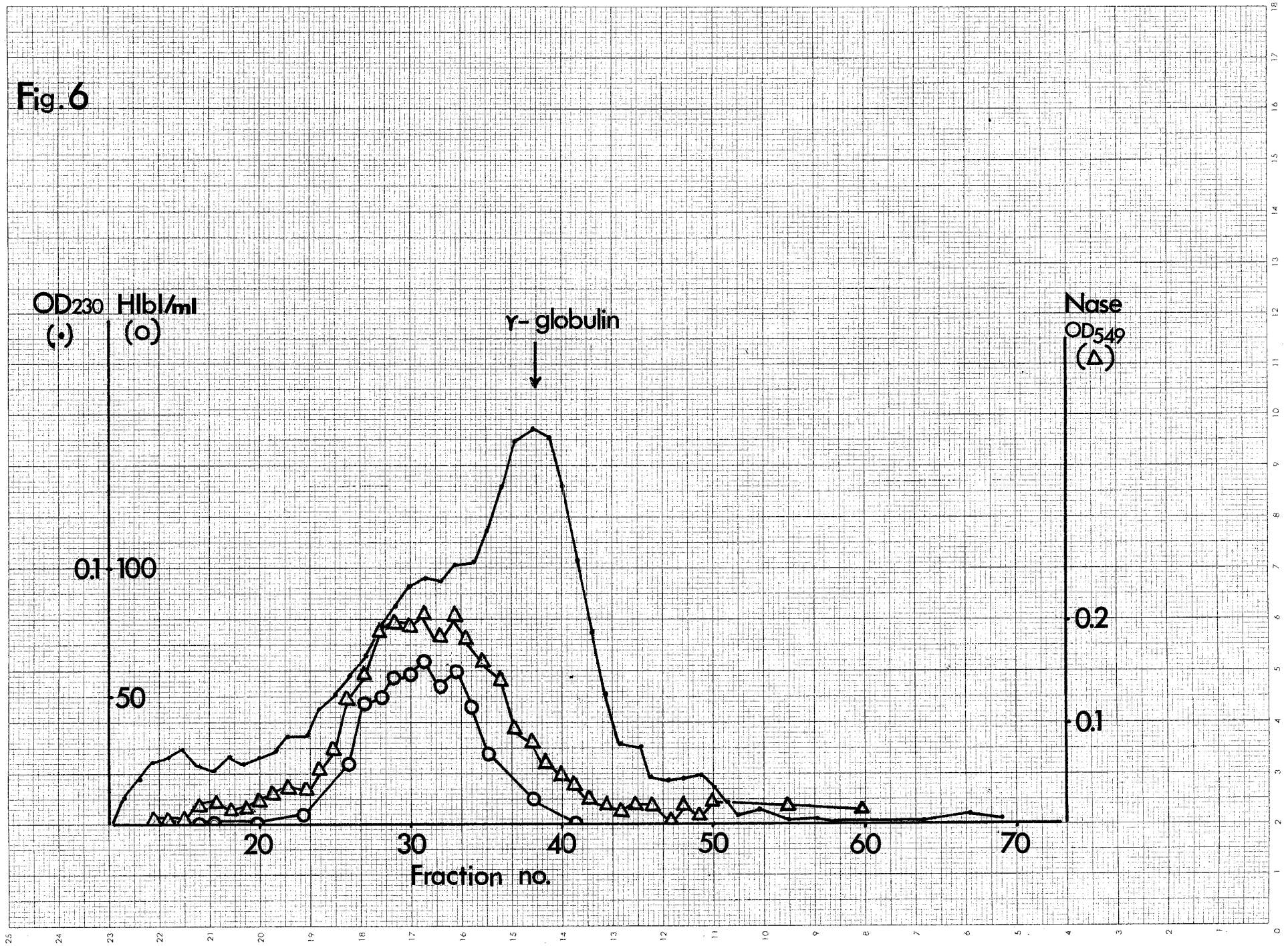
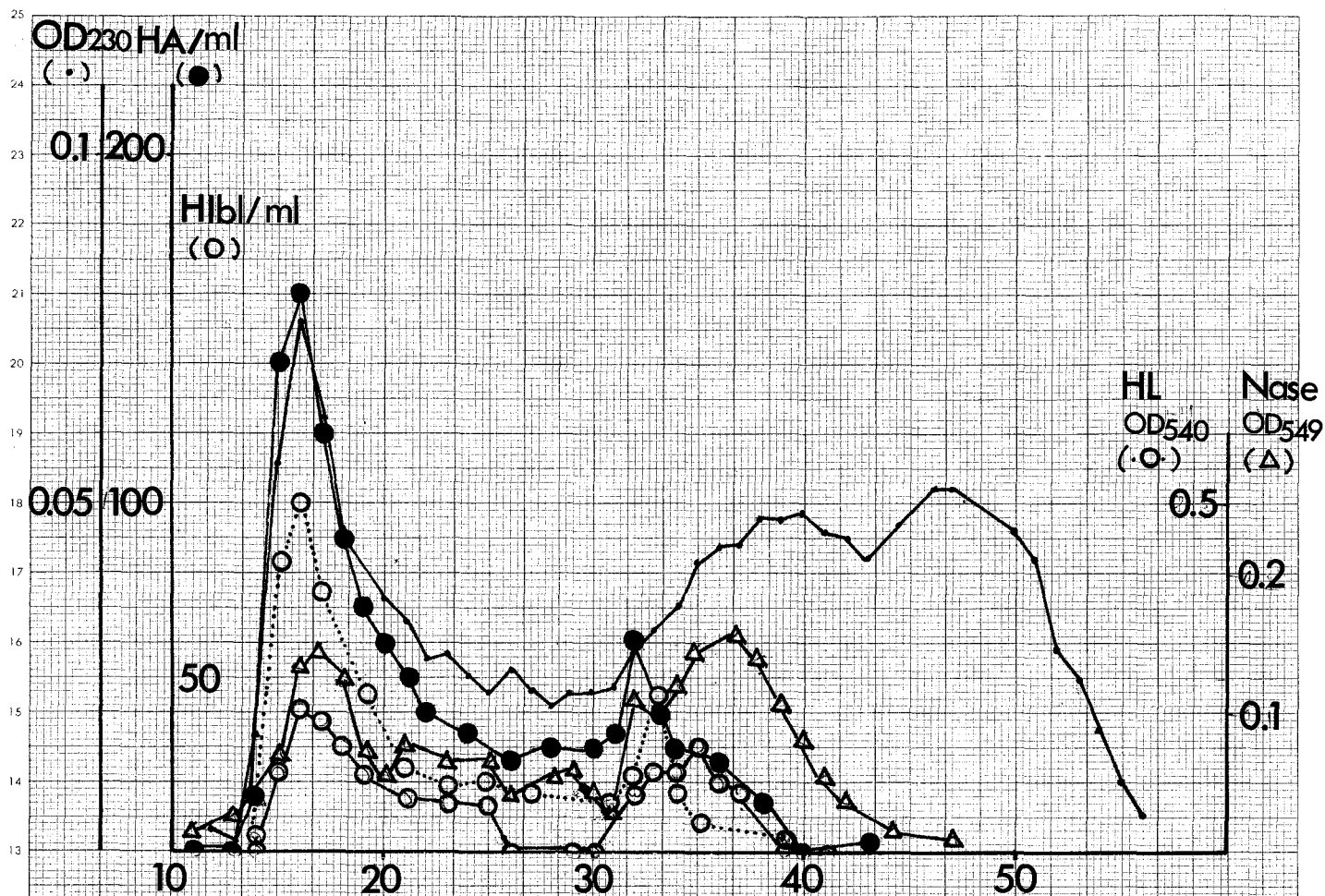


Fig.7

a



b

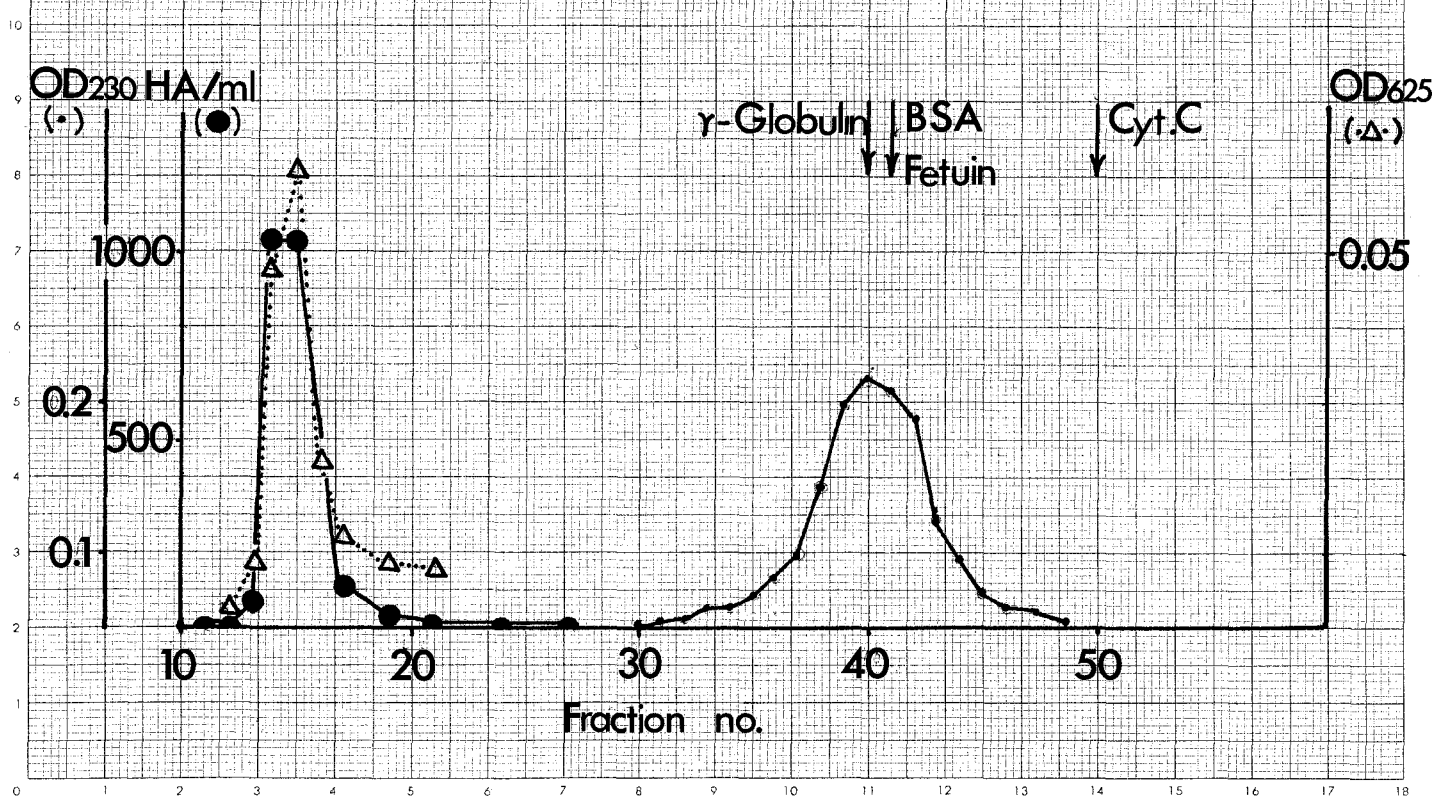
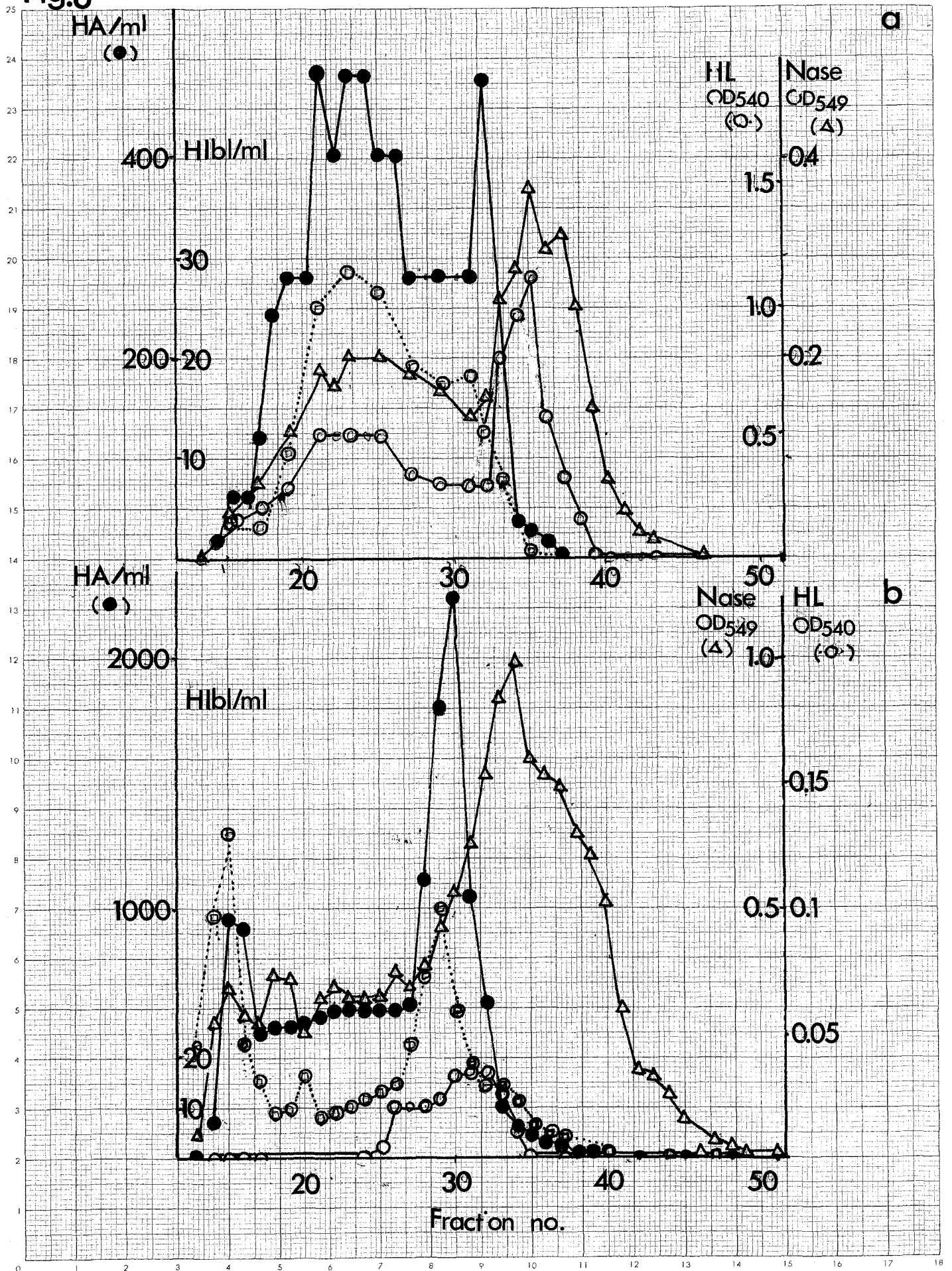


Fig.8





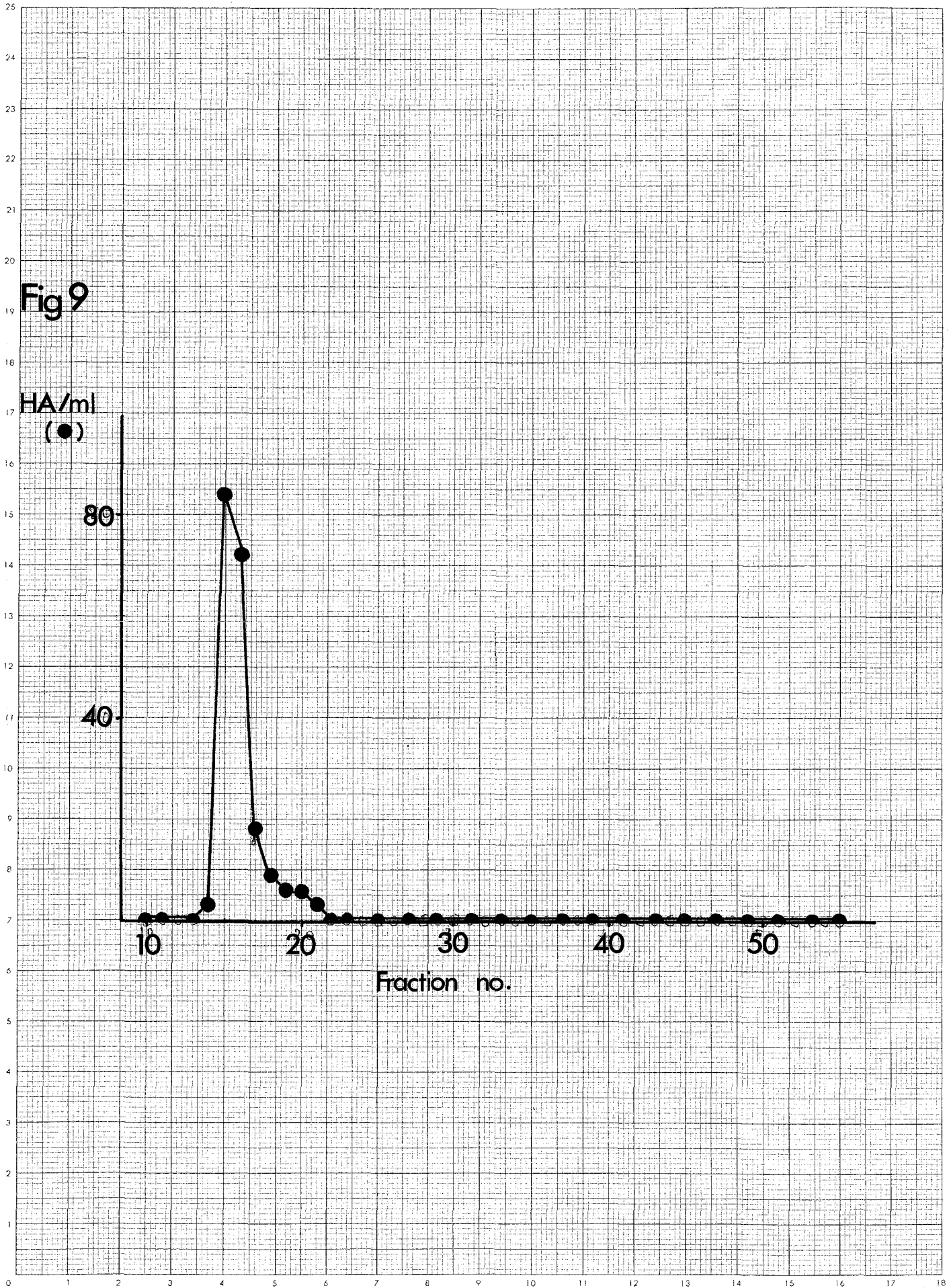


Fig 9

HA/ml  
(●)

80

40

10

20

30

40

50

Fraction no.

Fig. 10

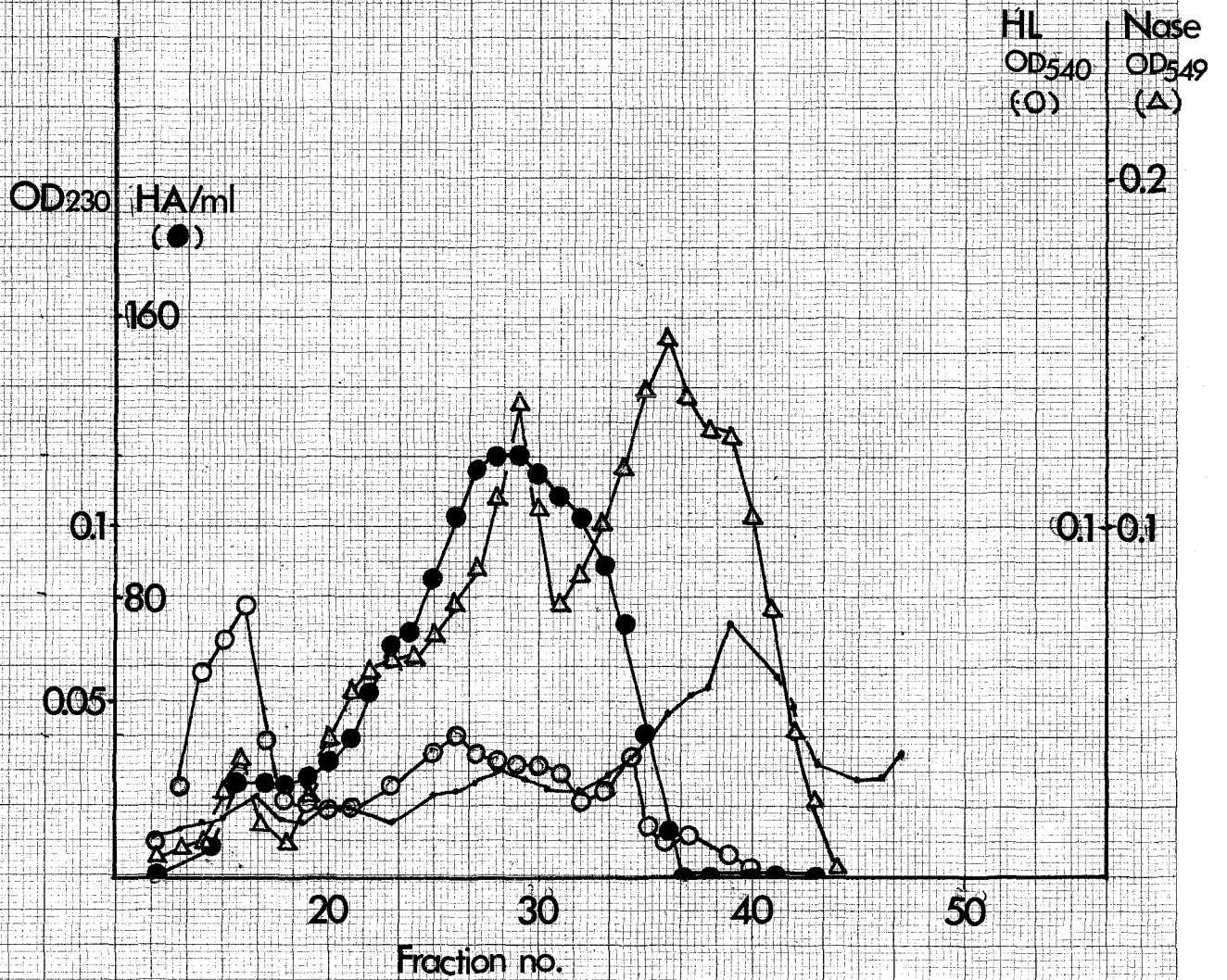


Fig.11

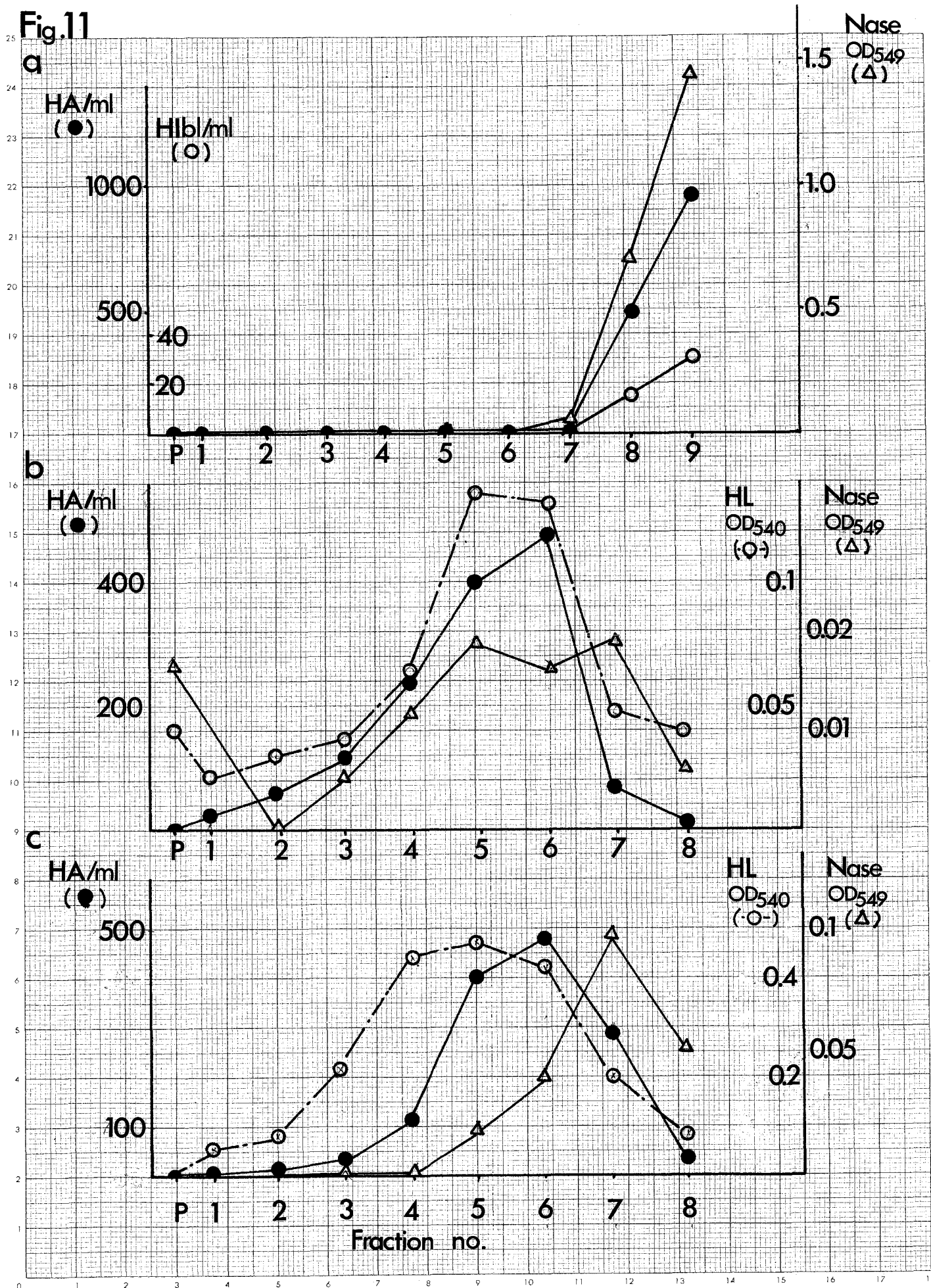
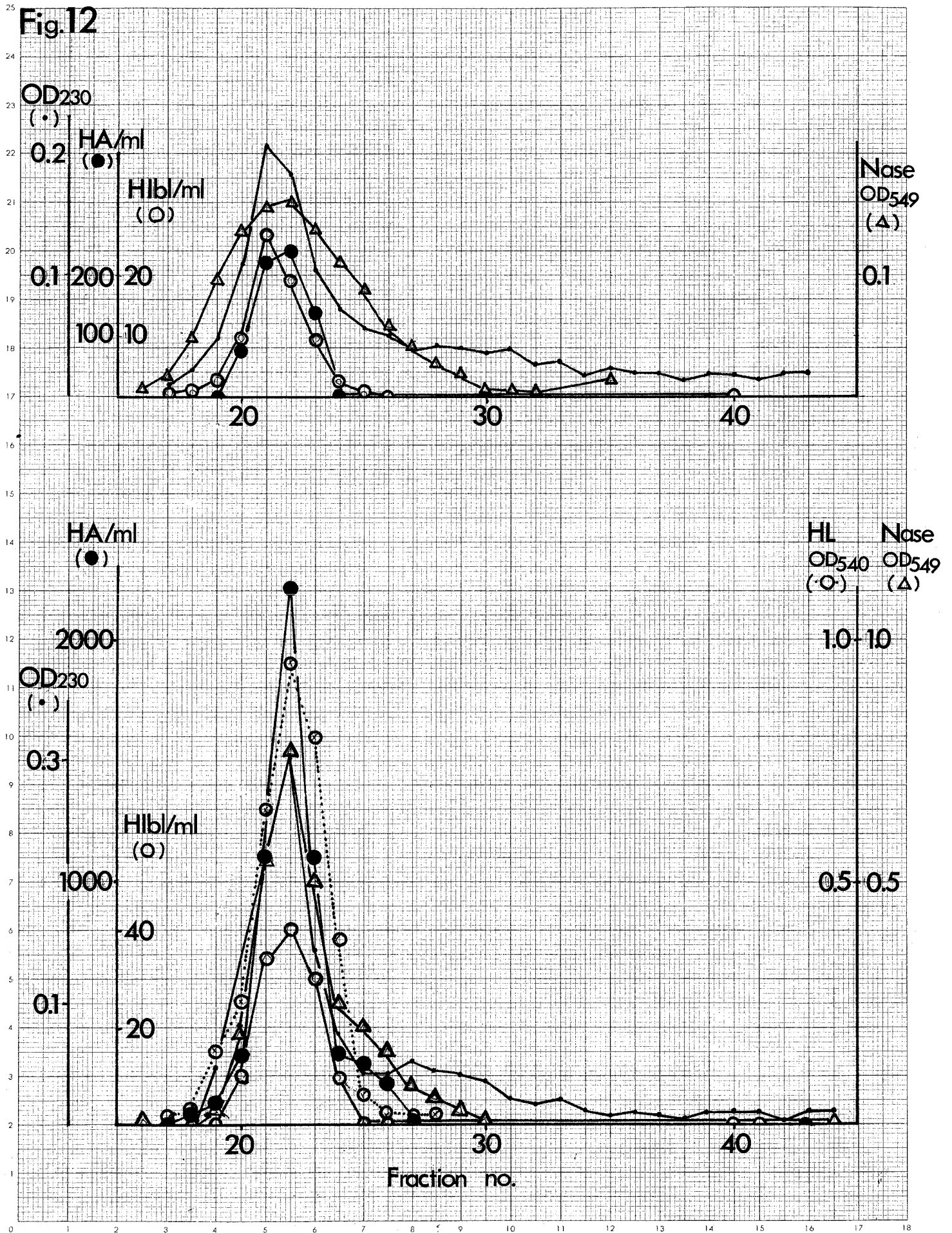
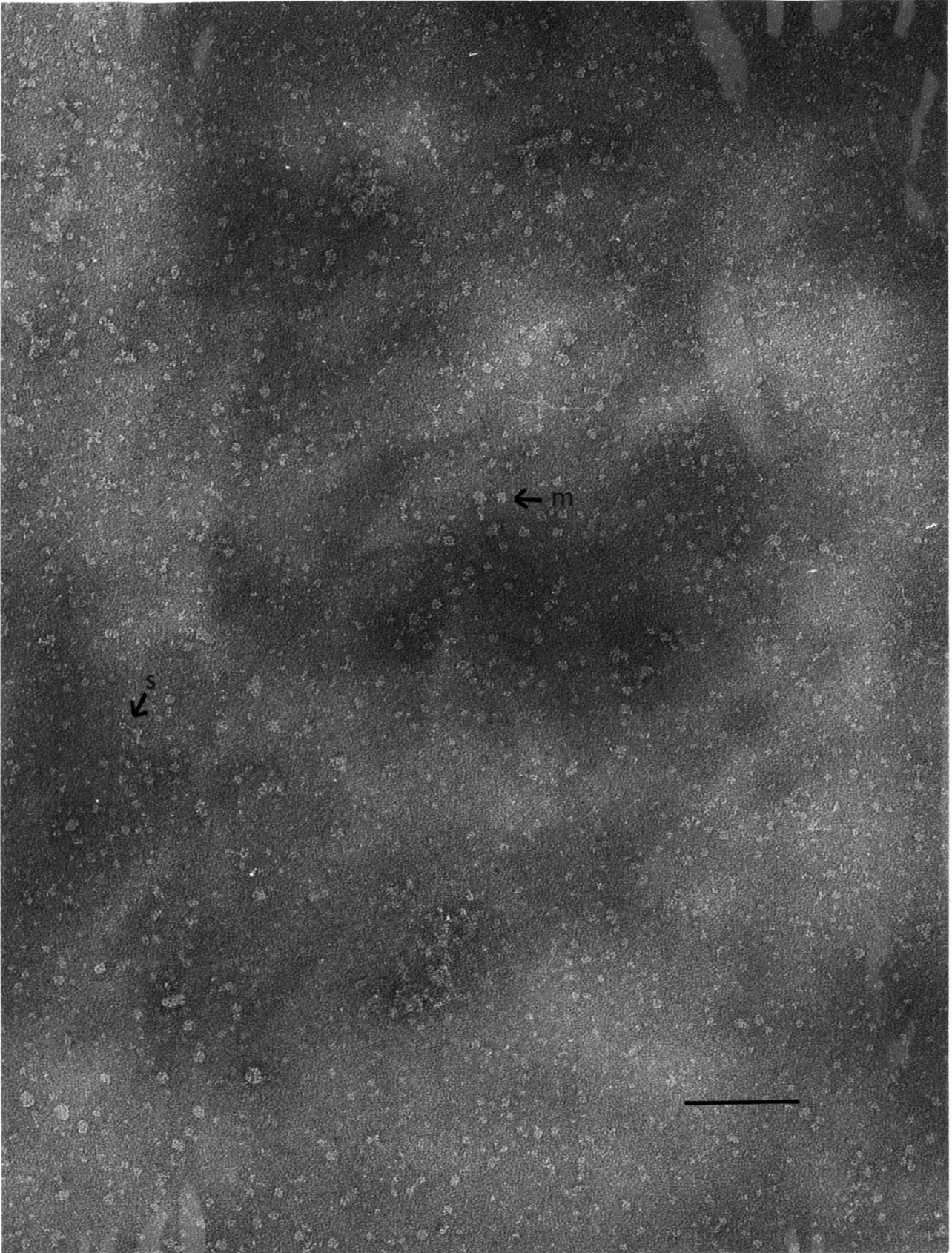


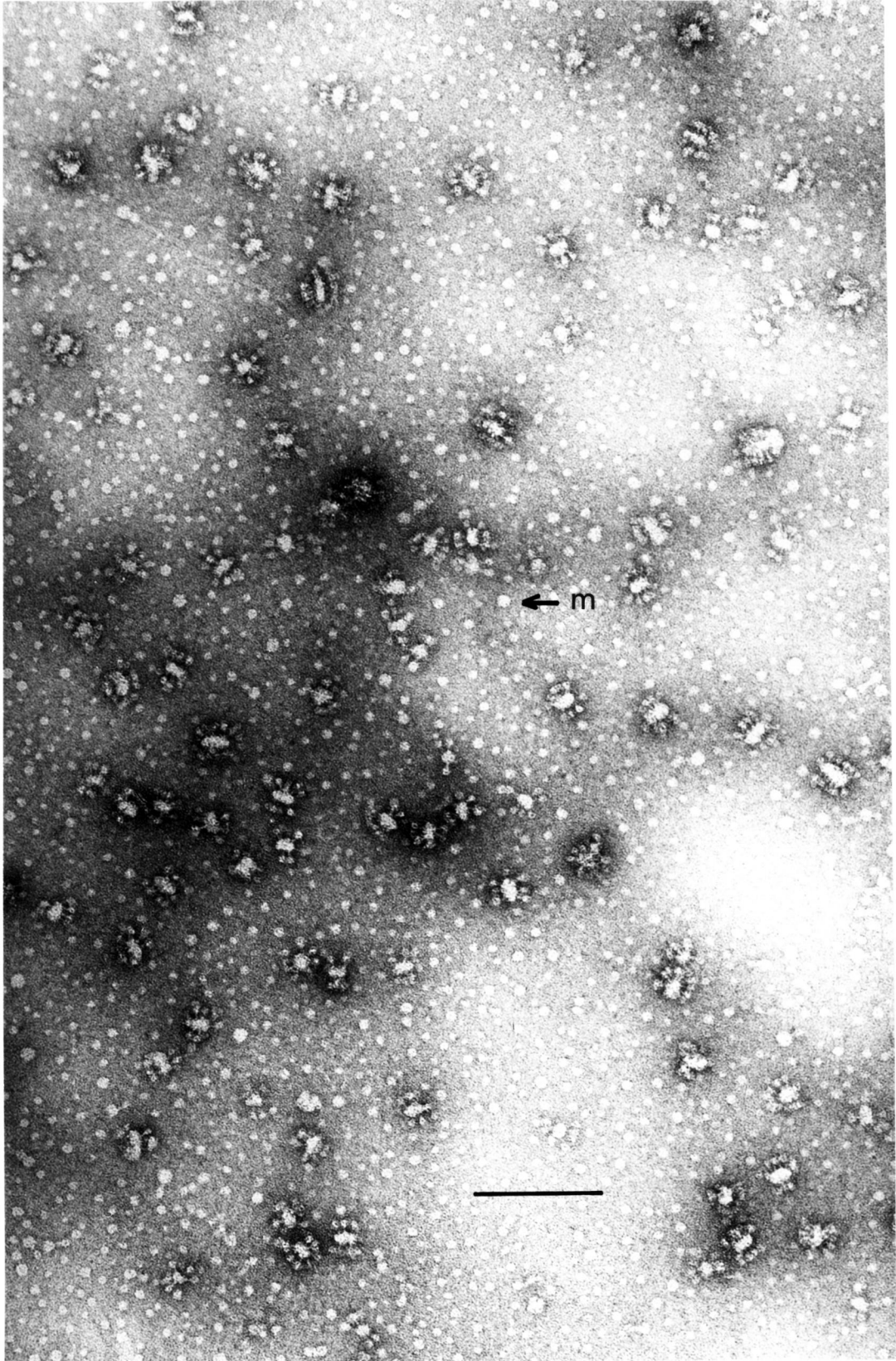
Fig.12



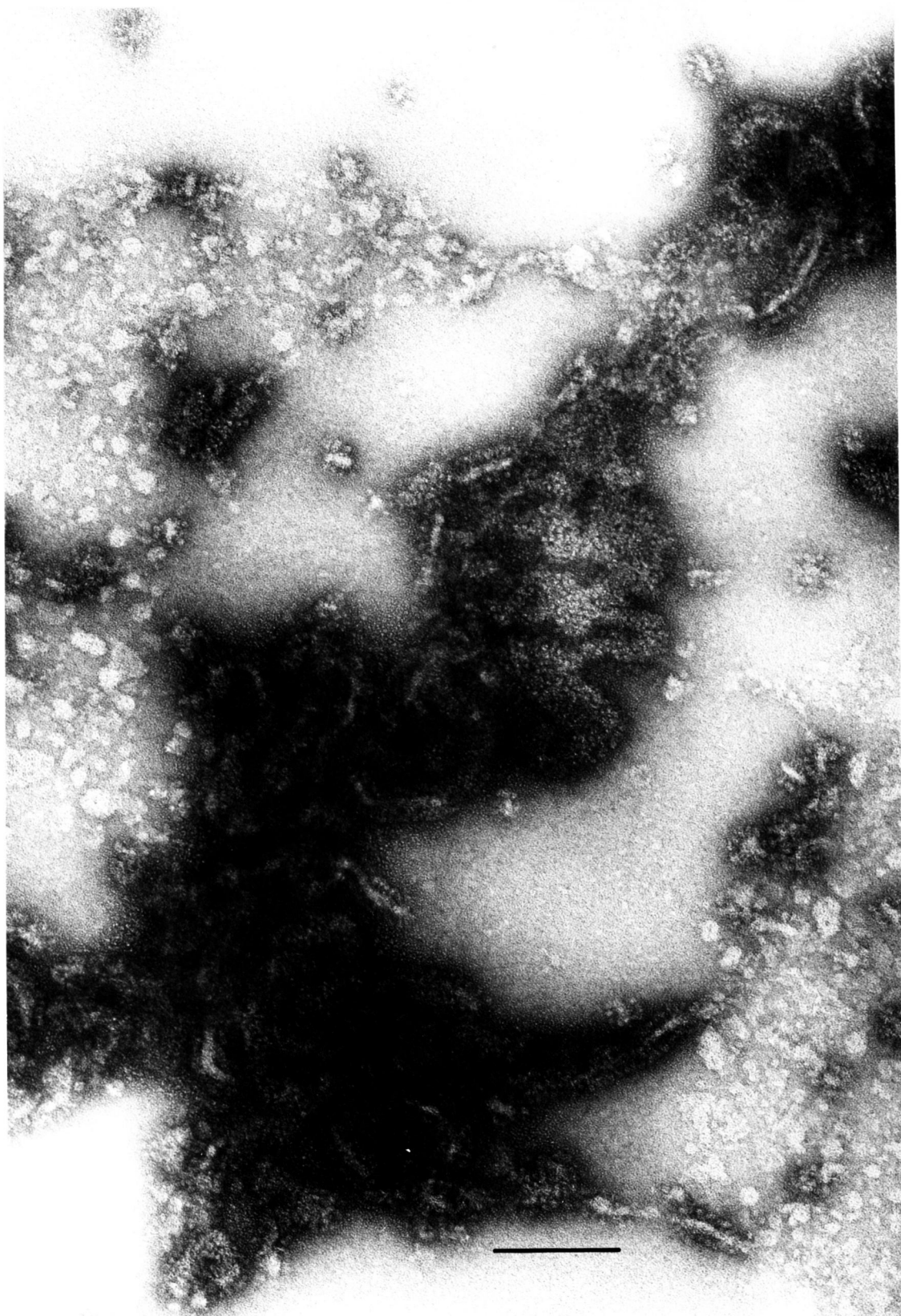




3 a



3 b





3 c

