

氏 名	神 阪 敏 行 こう さか とし ゆき
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 120 号
学位授与の日付	昭 和 46 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専 攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES ON NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF THE SILK WORM (カイコ核多角体病ウイルスの構造と生化学的研究) (主 査)
論文調査委員	教 授 小野寺幸之進 教 授 緒方浩一 教 授 千田 貢

論 文 内 容 の 要 旨

カイコ核多角体病ウイルスはタンパク質から成る多角体内に桿状粒子として封入され、複雑な構造をもっている。このウイルスの核酸化学的な分野はすでに解明されているが、ウイルス形成に関連して重要な問題である内部構造は解明されていなかった。本論文は多角体の希アルカリ処理によって得られるウイルスを分離し、各成分を電子顕微鏡で観察してその構造を示し、さらにウイルスの感染単位との関係を明らかにした研究を論述したものである。

多角体を希炭酸ナトリウム溶液で溶解して単離したウイルス標品には、電子顕微鏡で観察すると2種類の桿状粒子と2種類の膜物質の存在が認められる。これらの各成分の分離法を検討した結果、ショ糖密度勾配遠心法が分離能およびウイルス活性の保存などの点ですぐれていることがわかった。そこで緩衝液の種類、濃度および pH を検討し、最終的に 1/15 モルリン酸緩衝液 (pH8.0) を選定し、さらに、Tween 80 を 0.05% 濃度に加えることによって分離能および回収率が改善されることを見出した。

このような条件の下にウイルスけん濁液を 30—50% ショ糖密度勾配に乗せ、5°C で 25,000rpm, 2 時間遠心することによって4本のバンドとして分離することができた。

これらのバンドのうち第1および第2の成分はさらに40—60% ショ糖密度勾配中で遠心して、幅広い2本のバンドに分離できた。こうして最終的に5個のバンドに分離した。

つぎにこのように分離した各成分をリンタングステン酸によるネガティブ染色法を用いて電子顕微鏡写真を撮影した。第1 (最下層) のバンドには粗い表面構造をもつ約 $80 \times 330 \text{ m}\mu$ の桿状粒子が含まれており、内部構造は見る事ができない。粒子の一端に突起をもつものも数多く存在する。第2のバンドには第1のバンドに存在する粒子から外膜が脱離して生じたと考えられる約 $60 \times 360 \text{ m}\mu$ の桿状粒子の存在が見られた。これらの粒子はその長さにかんがりの変動が見られ、また粒子のわん曲および一部の崩壊が起きている。さらに粒子の表面には 4—5 $\text{m}\mu$ の幅の規則的な縞模様が観察された。

第3のバンドには桿状粒子から脱離した外膜および内膜が含まれており、これは再遠心によって外膜に

富む画分と内膜に富む画分とに分離された。外膜は扁平な球状の膜として観察され、膜そのものには規則的な構造は全く認められない。これに対して内膜には、その表面に幅4—5 μ の規則的な縞模様が明瞭に認められる。これは第2バンドの桿状粒子の表面に見られるのと同じものである。

この内膜に富む画分（第4バンド）には core が一部残存しているものが観察され、それらのうちには core から直径約20 μ の球状粒子が放出されているもの、および数個の球状粒子が空の内膜中に点々と残存しているものが観察された。これはこのウイルスの内部構造に関する有力な手がかりを与えるものである。

最上層（第5）のバンドの成分は直径約20 μ の球状粒子で、これは内膜の中に存在するものと同じものである。比較的均一な形をとり、subunit の存在が明瞭に認められた。この球状粒子を再び10—40%ショ糖密度勾配遠心かけると密度勾配の中心付近に幅広いバンドとなって観察される。このことは、この球状粒子が core の崩壊によって形成されたもので、一定の大きさや形をもつ構造単位ではないことを示している。

以上の結果によってこのウイルスは内部の core とそれを包む二層の膜から成る桿状ウイルスで、core は幅約20 μ の紐状構造をもつと考えられる。

これらの画分について感染試験を行なったところ、第1および第2のバンドがウイルス活性を示し、内部 core は活性を示さなかった。この結果に基づいて、このウイルスの感染単位（ビリオン）は内膜のみをもつ桿状粒子であると結論される。外膜はウイルスの形態と構造を保持する役割をもつものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

カイコ核多角体病ウイルスは、DNA ウィルスに属し、典型的な昆虫ウイルスの一つである。このウイルスは桿状となって直径数ミクロンの多角体の内部に無数に包含されている。このウイルスの核酸化学的研究および多角体形成の様相の電子顕微鏡観察はすでに著者の研究室で完成していたが、ウイルスそのものの内部構造およびビリオンについては解明されていなかった。

著者は生化学的および生物物理学的手法を用いて、多角体から分離したウイルス標品を5個の画分に分けることに成功した。これらの画分をそれぞれリンタングステン酸によるネガティブ染色を行なって電子顕微鏡で撮影し、第1のバンドから順次に、(1) 二重膜をもった桿状粒子、(2) 一重膜（内膜）をもった桿状粒子、(3) 内部 core のない空の外膜、(4) 同じく内膜、(5) 内部 core の崩壊生成物であることを明らかにした。

これらの画分について生物試験を行なって検討した結果、このウイルスの感染単位は内膜のみをもった桿状粒子であることを決定した。またこのウイルスは幅約20 μ の紐状構造の core とそれを包む二重膜から構成されていることを明らかにした。

以上のように本研究はウイルスのうち特異な形態をとる昆虫核多角体病ウイルスの内部構造とビリオンについて新しい知見を加えたもので、ウイルスの生物物理と生化学の分野に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。