

超遠心機によるタバコ・モザイク・バイラスの精製の研究

渡辺 格, 川出 由己, 中村 正好

(1954 年 5 月 11 日 受理)

Study on the Ultracentrifugal Purification of Tobacco Mosaic Virus

Itaru WATANABE, Yoshimi KAWADE and Masayoshi NAKAMURA

(Received May 11, 1954)

ABSTRACT: Procedures for the purification of tobacco moasic virus (TMV) from tobacco leaves by several cycles of alternate high and low speed centrifugations using an air-driven ultracentrifuge first constructed in Japan recently are described in detail. Colored impurities were easily removed when White Burley tobacco plants were used as the starting material. The solvents used for dissolving pellets of TMV were mainly 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0, followed by 0.01 M buffer. The properties of the purified products were examined by various means including biological assay (preliminary), chemical analyses, electrophoresis, diffusion, sedimentation velocity, viscosity and electron micrography. It was shown that chemical purity was satisfactory, but the homogeneity with respect to the length of the TMV particle was not always good, as judged by electron micrographs and sedimentation patterns. Especially, rod particles shorter than "monomer" (300 m μ in length) were always observed in electron micrographs, sometimes existing in large proportions, and the possible causes of their occurrence were discussed. It is presumed that some of them are produced during preparation of the specimen for the electron microscopic observation. Some have probably existed in the original juice. Although a preparation showed a very sharp peak in sedimentation pattern, another preparation, which was purified carefully, revealed two components in sedimentation measurements performed immediately after the purification. Thus, further investigations seem necessary to establish a reliable method to obtain highly homogeneous preparations.

超遠心機という言葉は「遠心力場における沈降の状態を定量的に測定する装置」に対して Svedberg によつて与えられた名前である¹⁾が, 1930 年代にアメリカで発達した空気駆動の超遠心機は Svedberg の油タービン超遠心機と同様の沈降測定を行う²⁾ほかに, 別の型のロータを用いて相当多量の液体を遠心処理する能力ももっており, バイラスその他のものを遠心力によつて溶液から分離し, これを濃縮精製する新しい方法がここに誕

生することとなつた³⁾. 各種の型の超遠心機は 1940 年ごろに一応完成の域に達し¹⁾, 現在ではバイラス, 蛋白質, その他一般の高分子物質の研究にとつてもつとも基礎的な装置の一つとして広汎に使われているが, わが国でもようやく近年各方面の研究者の協力の下に特別委員会*が組織され, 1948 年からはじめて分離用超遠心機が完成し, 以来各

* 文部省科学研究費による「超遠心器の製作とそれによる蛋白質およびウイルスの研究」特別委員会.

種のバイラスの濃縮精製などに利用されている。⁴⁾ この報告にはそれらのうち、タバコ・モザイク・バイラスの精製に関して今までに行つた研究を総括して記す⁵⁾。なお、超遠心機の本来の使命である巨大分子の沈降の測定に関しても、1950年同委員会によつて一応の成功がもたらされている⁶⁾。

バイラス(濾過性病原体)は、いうまでもなく特定の宿主に寄生してその細胞内で増殖し、特定の病変を起すという生物作用の面で古くから注目されて来たのであるが、1935年 Stanley⁷⁾ がタバコ・モザイク病のバイラスを結晶状に分離して以来、バイラスそれ自体の物理的・化学的性質に関する研究が著しい進歩を遂げることとなつた。各種のバイラスは化学的には核酸と蛋白質とが結合したもの、またはこれに二三の成分の加わつたもので、細菌などの微生物に比べてかなり単純なものであり、物理的・化学的研究によつて次第にその性状を明かにしつつある⁸⁾。精製バイラスはコロイド科学的研究の対象として興味深く、また多くの物理化学的測定方法の進歩に対して精製バイラスの寄与が大であつたともいえるのである。一方バイラスは物質的に簡単なものでありながら、「増殖」というような生物としての基本的な活性をもつので、生命現象を解明する手がかりを与えることが予想されるが、この方面の研究も近年とくに細菌に対するバイラス(バクテリオファージ)について多く行われている。バイラスに関するこれらの物理的・化学的、あるいは生物学的・医学的研究にとつて、精製されたバイラスのもつ意義は測り知れないものがある。

バイラスの精製法⁹⁾としては、はじめは硫酸アンモンなど蛋白質化学における試剤を用いた化学的方法がとられたが、現在では一般には超遠心分離による方が有利であると考えられている。その利点は、バイラスを含む材料から極めて温和な方法で、常に低温に保ちつつ、比較的簡単にしかもよい収量で精製することができる点にある。

今までにかなり多くの植物バイラス、動物バイラス、細菌バイラスが研究の対象となつてゐるが、その中でタバコ・モザイク・バイラス(以下 TMV と略す)がもつともよく研究されており、我々もまずこれを取上げたわけである。その理由は、罹病植物中にかなり高濃度に存在し、バイラス活性

が安定であり、活性の定量法が比較的正確に行われ、人体に対して安全であるなどのことによつてとり扱いが比較的容易であること、ならびにこのバイラス粒子が細長い棒状という特殊な形態を持ち、それに由来する溶液の種々の物理化学的性質の特殊性がコロイド科学の対象として大きな興味を惹くこと、などが挙げられる。研究の第一歩は TMV を材料として我々の超遠心機の性能を調べることであつた⁴⁾が、さらに進んで精製試料の諸性質を化学分析、電気泳動、拡散、沈降速度その他の測定によつて調べ、同時にこれらの重要な研究手段の基礎を検討することができた。TMV の精製はかなり容易で、その方法はすでに確立されていると一般には思われているようであるが、実際に精製を試みた結果、十分に精製された試料を得るには多くの点に注意する必要があると、とくに棒状である TMV 粒子の長さに関して均一な試料を得ること(あるいは均一であると証明すること)はむしろ容易でないといつた方が良いことがわかつた。以下に精製法に関して今までにえた知見に重点を置いて述べる。

1. 超遠心分離機

特別委員会によつて製作された超遠心機は、空気を駆動真空型と呼ばれるものである。機械その他に関する詳細は別の報告^{4) 10)}に譲り、ここには実際に分離に使用するに当つて必要なデータを記しておく。

分離用ロータとしては超ジュラルミン製の一体のロータに一定の傾きをもつた孔をいくつかあけ、これに正確に適合する試験管を挿入するという型が採られている。ロータ No. 1, 2 は容量 3.5 cc のメタクリル酸樹脂製の試験管 8 本を容れ、一回の処理量は約 28 cc である。No. 3 はこれと同形であるが試験管 10 本を容れる。回転数の最高の限界は駆動方式によつてでなく、用いられるロータおよび分離用試験管がどのような遠心力まで破壊せずに耐えうるかということできるが、上記のものは最高 42,000 r.p.m. (700 r.p.s.) まで常用できる。分離用としてはこれ以上の回転数が用いられることはあまりない。加速に要する時間は最高回転まで 10~15 分程度である。ロータ No. 4 はこれらとちがつて試験管ごとに蓋をする形が

とられ、容量約 6.5 cc の試験管 12 本を容れ、一度に約 80 cc を処理できるが、安全に使用される回転数の上限は 25,000 r.p.m. とされている。

分離用試験管の材料としては国産品ではメタクリル酸樹脂がもつともよく高速遠心に耐えるようであるが、これでも 40,000 r.p.m. 附近ではかなり亀裂を生じることが多く、まれには破壊して内容が流出することがある。試験管を入れるまえにロータの試験管孔に 1, 2 滴の水を入れておき、試験管孔と試験管との間の僅かな隙間が水で満たされるようにしておくと、亀裂を生じる割合は著しく少くなる。このようにして一応は支障なく用いられるが、強度上肉を厚くする必要があり、容量を犠牲にするので不利である。その後 Lusteroid* の試験管が手に入つたが、これは肉が薄いので容量がかなり増し、ロータ No. 1, 2 でも一回の処理量は 40 cc あまりとなる。管径がロータの孔の径と合わないので回転数が高すぎると試験管の上部がつぶれるが、温度が高くなければ 30,000 r.p.m. までは使える。またこの試験管に合わせたロータも最近作られた (No. 5) が、これは 1 本に 7 cc, 12 の孔をもち、最高回転数は 24,000 r.p.m. である。** 実際上はしかし No. 1, 2, 3 がもつとも使いよく、ここに述べる実験には主として No. 1 を使用した。

ロータを使用するとき各試験管の重量を釣合わせる必要があるが、これはさほど厳密でなくてよく、目分量で充分である。それは回転軸が撓み軸で、ロータの回転に際して「自動調心」が行われるからである。

回転中にロータの温度が低く保たれることが望ましい。温度上昇が甚しいときにはバイラスの不活性化を来すおそれがあり、また温度勾配が試料液中に生じると熱対流で溶液粒子の沈降が満足に行われな可能性があるのである。温度上昇の原因には、ロータ室の真空度不足によるロータ周辺と残留空気との摩擦と、シャフトの平軸受部分の摩擦とがあり、前者の方が大きいと思われる。通常 30,000 r.p.m. で 1 時間回転させたときに 2~3°C, 40,000 r.p.m. ではこれよりやや大きい

温度上昇があるのみで、分離用として使うかぎり特別の場合を除いては問題にならないといえることができる。

現在の超遠心機によつて一応研究を進めることができるが、これは試作機であつて、改良すべき問題がいくつか残されている。時として回転中にロータが横振動 (歳差運動) を起すこと、一回の処理量が小さいこと、ロータのとり付けとり外しその他操作に少くとも 2 人の人手を要すること (および分析用の場合はロータの強度上最高回転数が低くおさえられていること) などがこの超遠心機の性能上改良を要する最大の問題であると思われる。

2. 精製の材料

モザイク病にかかつたタバコの葉を精製の出発材料としたが、これはすべて専売公社秦野たばこ試験場の日高醇博士より頂いたものである。TMV には多数の変株のあることが知られているが、日高氏によればここで扱つたものは病兆などから判断して通常株と考えられる。

バイラス精製の成功・不成功によつて、出発材料の選択が適当であるか否かが一つの重要な因子となる。TMV (あるいは一般に植物バイラス) の場合、着色物質が容易に除かれるためには罹病植物があまり成長しすぎていない若い植物であること、バイラスを接種してからあまり長くたたないことが望ましい。普通播種後 1~2 月程度のタバコにバイラスを接種し、2~3 週後に葉を切取つて集めた。この場合接種後の時間が短いとバイラスの収量が低いおそれがあるが、植物中の TMV の量は、電気泳動的研究によると接種後 2 週間程度で最大に達するといわれる¹¹⁾。ただしタバコの葉から後述するような通常の方法で汁液をしぼるならば、「容易に抽出される」状態にある TMV の量が問題になるわけであるが、このものの量が最大になるのはもつと遅いという報告もある¹²⁾。またタバコの種類のいかにによつても着色物質が超遠心精製だけではどうしても除かれないことがある。後述のようにキサンチ種を用いたことが 3 回、ホワイトバーレー種が 7 回、ブライトイエロー種が 1 回であるが、このうちホワイトバーレー種が明かに着色物質がもつとも少く、精製が容易であ

* Lusteroid Container Co., Maplewood, N.J., U. S.A.

** これらのロータは現在東大伝研構内におかれている特別委員会試作第 1 号機と共用されている。

る。植物体内にある TMV 粒子の大きさの分布がタバコの種類によつてちがう可能性については後に述べる。

3. 精製操作

今までに 11 回の精製を行い、えられた試料を順に TMV-1 から -11 と名づけた。このうち TMV-8 と -9 とについては簡単に精製とその性質とを報告した¹³⁾が、ここにはその後の研究も含め全体を総括してやや詳細に述べる。

A. 前処理

採取した病葉をただちに冷凍機またはドライアイスで凍結し、肉挽で磨碎してパルプとする。これを数枚の木綿布で包み、融解するのを待つて万力にかけて圧搾すると、濃い緑褐色の濁った汁液がえられる。葉を凍結-融解させるのは細胞を破壊してバイラスを遊離しやすくするためであり、またバイラス以外の蛋白質の一部を変性させて除き易くする効果もあるといわれるが、収量を問題にしないときには凍結せずにそのまま磨碎してもよい。凍結-融解という操作では TMV の不活性化は起らぬとされている。

この圧搾汁は濾紙で濾過しても充分に濁りはとれないが、アングル遠心機で 8,000~10,000 r.p.m. (大体 5,000~10,000 g の範囲) で 30 分程度遠心すると、破壊されなかつた組織片や細胞、白色の澱粉粒、緑色の葉緑体などが沈澱し、上清は非常に濃い茶褐色の、しかし濁りは感じられない汁液となる (clarification)。これを超遠心精製の原料とする。

葉を磨碎するとき適当にアルカリを加えて汁液の pH を中性附近に保つことが、バイラスの会合や不活性化を防ぐのに良いとされる。アルカリを加えない圧搾汁の pH は 5.5~6.0 附近であるが、TMV-8, 9, 10, 11 の場合に葉の重量の 2~3% の第二磷酸カリ (K_2HPO_4) を固体のまま加えつつ磨碎するようにした結果、圧搾汁の pH は 7 に近くなつた。固体のまま加えるのは、滲透圧作用で細胞の破壊を助けるといふ目的もある。このようにアルカリを加えて汁液の pH を中性にすると、汁液中の蛋白質と思われるものの一部が凝固して懸濁しているのが認められ、これは上記の低速遠心で容易に除かれる。このようにして透明化された

汁液の窒素含量は、アルカリを加えなかつた場合に比べてかなり低くなるようである。バイラスの収量には影響はない。精製試料の諸性質を、汁液にアルカリを加えたときと加えないときとで特別に比較はしていないが、アルカリを加えない汁液の pH はもちろん TMV の安定 pH 域¹⁴⁾内にあるから、上のような処理は TMV に関するかぎり省いても差支えないように思われる。pH が中性より酸側に移つて等電点 (pH 約 3.5)¹⁵⁾ に近くと TMV の会合が起ることが知られている¹⁶⁾ので、TMV 粒子の長さの分布にはいくらか影響があるかも知れないが、不可逆的な会合はこの程度の酸性ではあまり起らないであろう。また、透明化された汁液中の窒素は後述のように最初の高速遠心で大部分上清に残されるので、汁液中のバイラス以外の窒素の量を少くしておく必要はあまりない。さらにまた、圧搾汁の緑色の不純物は、いままでの経験ではアルカリを加えない時の方が遠心で除去しやすいように思われる。ただしこのことは原料タバコの種類によつてちがうらしく、我々の乏しい経験では明かにはいえないが、アルカリを加えると加えないとで圧搾汁の状態がかなりちがうことは明かであり、場合により目的によつては加えない方が有利なことがあるように思われる。

圧搾汁を透明にするための遠心として通常の懸垂型の 4,000 r.p.m. (平均約 2,000 g) の遠心器を用いると緑色の濁りが充分にとれず、その上清をそのまま超遠心機で高速遠心すると後述のようなやつかいな状況を生ずるので、前記のようにより高速のアングル遠心機を用いるか、試料が多量ならば連続的に流して処理できる Sharples 高速遠心機を用いる必要がある¹⁷⁾。TMV-11 の場合、圧搾汁を予備的に低速遠心してえた上清 800 cc に pH 7.0, 0.1 M の磷酸塩緩衝液を同量加えて 1.6 l とし、これを Sharples 高速遠心機* で 40,000 r.p.m. (ボウル周辺で 40,000 g) において 10 l/hr の流速で流して濁りを除いた。緩衝液を加えたのは、処理量が少いと損失の割合が多いからである。Sharples で処理すると流出してくる液は著しく泡立つので、厳密にいえば TMV 粒子の長さに影

* 国立豫防衛生研究所に設置のもので、内田久雄氏の御協力に感謝する。

響するおそれがあり、適当な消泡剤を考慮すべきであつた。場合によつてはまた圧搾汁を超遠心機で 9,000~12,000 r.p.m. で 10~15 分遠心する方法をとつたこともある。この場合はロータの容量が小さいので所要時間が著しく長くなる。

なお、圧搾汁を低温に1夜ないし数日放置すると不純物が会合を起すのか 4,000 r.p.m. でもよく濁りがとれたことがあつたが、このことは常には起らないで逆に保存によつて不純物が除きにくくなることもあり、さらには TMV 粒子は圧搾汁中にあるとだんだん会合してゆく傾向があることが報告されている¹⁸⁾ので、精製は葉の採取後なるべく速に行うことが望ましい。また、一度濁りが認められない程度まで透明化された汁液でも、一夜放置するとふたたび濁り(緑ではなく褐色の)を生じることが多いから、最初的高速遠心は濁りを除いた後続いて行うのが有利である。

B. 超遠心精製

以上のようにして濁りを除いた汁液から前記の超遠心機を用いて分割遠心によつてバイラスを精製することになる。まず 30,000 r.p.m. (65,000 g)* で 45~60 分、あるいは 36,000 r.p.m. (95,000 g)* で 30 分程度遠心すると、TMV は試験管の底部に沈着する。このときバイラスより沈降しにくい低分子のものは上清にとり残されるから、これを傾瀉して除くことができる。沈澱は TMV のほかに不純物をかなり含んで茶色あるいは緑色を呈するが、適当な溶媒に再溶解し(このとき原容の何分の1かに濃縮する)、今度は 9,000~12,000 r.p.m. (6,000~10,000 g) で 15 分程度遠心すると、バイラスは上清に残るが、混在する重い粒子や分散しにくいコロイド状物質は沈澱させられる。この上清をビベットで吸取り、ふたたび高速遠心かけると、バイラスはかなり純粋な状態で pellet** になる。このような高速遠心-溶解-低速遠心というサイクルをくり返して不純物を除いてゆくのである。

TMV 粒子の沈降定数はすでによく研究されている¹⁹⁾²⁰⁾ので、上記の回転数が適当であることは

* 超遠心機の場合遠心力は便宜上回転中心から 65mm (分析用ロータのときのセルの中心の位置)における値で示す。

** pellet とは試験管の底に生じるゲル状の沈澱物を指すが、適当な訳語がないのでそのまま用いる。

まず疑いないのではあるが、我々の予備実験⁴⁾においても、いつたん精製した TMV 溶液を用い、上記の高速遠心で充分沈降して上清にはほとんど残らないこと、上記の低速遠心ではあまり沈降しないことを、窒素量の分析(および簡単な活性度試験)でたしかめることができた。バイラスを沈降させて pellet にするための高速遠心は、生じた pellet が容易に溶けるためにはなるべく低い回転数を用いることが望ましく、場合によつては回転数が高すぎるとバイラス粒子が破壊するおそれさえあるといわれる²¹⁾が、なるべく時間を短縮し、取扱いを容易にするために上記の回転数をとつた。TMV は、遠心される溶液の濃度が著しく高くないかぎりこの高速遠心ですべて器底に沈降して安定な pellet を作り、上清を傾瀉しても損失はほとんどない。またこの pellet は純水や中性附近の緩衝液に比較的よく溶け、pellet の再溶解という点で困難のあつたことはない。ただし精製試料中の TMV 粒子の長さの分布という問題には高速遠心の強弱ということがいづらか関係するかも知れない。つぎに低速遠心についていうと、能率よく不純物を除くには比較的強い遠心力が必要であるが、かなり強く遠心しても一般にこれで沈降する不純物は安定な pellet にならず、上清と明瞭な境界のないことも多いので、上清をとるにはビベットを用いなければならない。TMV 粒子(いわゆる monomer)自身 10,000 g (12,000 r.p.m.) 10 分で約 1 mm 沈降する計算となるから、低速回転をあまり強くすることは収量を問題にするかぎり許されない。事実超遠心分離における TMV の損失は、大部分が低速遠心における損失で占められるように思われる。

高速遠心でできた pellet を溶かす溶媒として適当なものを用いる必要がある。TMV 粒子は pH が 8~9 以上のアルカリ性や 2 以下の酸性では分裂して活性を失い、等電点附近では会合することが知られているから、中性附近の溶媒であることが第一条件であるが、中性附近でも含まれる電解質の種類により、あるいは一般に電解質の濃度が高いと容易に長軸の方向に会合するといわれる²²⁾。また電解質を含まない蒸留水を溶媒とすると、保存した場合 TMV の性質が変化するといわれる²³⁾。我々ははじめ蒸留水または pH 7.7、イオ

ン強度 0.2 の磷酸塩緩衝液を用いたが、まもなく超遠心精製のときおよび精製試料を保存するときには粒子の会合を最小に保つために用いるべき溶媒系を研究した Schachman, Kauzmann の報告²³⁾が現れ、以後は大体その報告の記載に従うこととした。すなわちはじめは pH 7.0, 0.1 M の磷酸塩緩衝液を溶媒とし、精製が進むと主に 0.01 M のものを用い、保存にも多く後者を採用した、

高速遠心-溶解-低速遠心というサイクルを普通 3~5 回行つて精製完了とした。褐色の不純物は最初的高速遠心で大部分が上清に残つて除かれ、3 回目ごろには高速遠心の上清はほとんど色の感じられない透明な液体となる。TMV の pellet がある程度固ければ、静に溶媒を入れて管の内壁および pellet の表面を洗うことができ、これで高速遠心上清に残る不純物の混入を著減させることができる。低速遠心を行つたときにバイラスと同様上清に残つた不純物の一部は、続く高速遠心でバイラスと共に pellet に入るが、これを再溶解してふたたび低速遠心にかけると、今度はかなりのものが沈降し去るようになる。このように、高速遠心という操作はバイラスを沈降させて低分子の不純物を上清に残すという目的のほか、不純物の一部を会合させて低速遠心で除去しやすくするという作用をもつようである。しかしながら、原料植物としてキサンチ種 (TMV-1~3) やブライトイエロー種 (TMV-11) を用いた場合には、分割遠心のサイクルを重ねると TMV の pellet は半透明ゲル状できれいにはなるが淡褐色または淡緑色を呈し、着色は低速遠心でも除かれず、少くも一部は TMV 粒子に結合しているらしくて超遠心だけでは分離することができなかつた。この問題は原料としてホワイトバーレー種を用いることによつて避けられ、最後には無色の pellet がえられ、これを溶かすと特有の青白い強い乳光を呈する液体となる。

着色物質の除去の難易には、タバコの品種のほかに、原料植物が若い成長しすぎているかということも関係するといわれる²⁴⁾²⁵⁾。ブライトイエロー種から TMV を精製した経験は 1 回 (TMV-11) だけで、そのときの pellet に常に着色が伴っていたことは、原料が成長しすぎていたことに帰せられるかも知れないが、同じブライトイエロー

種から矮化病バイラスを分離する試み (未発表) においてもしばしば着色物質が除きにくかつた。これに対してホワイトバーレー種からの TMV の精製試料には常に着色物質がほとんど認められないので、この問題にはタバコの品種の選択ということがもつとも重要であると考えられるように思われる。ただしホワイトバーレーを用いたときでも無色の不純物が TMV と結合して存在する可能性も全く否定するわけにはゆかぬが、着色を完全には除けなかつた場合も含めて電気泳動その他の試験で不純物が明かに検出されたことはあまりないので、我々の精製試料中の不純物は、あるとしても量的には少いと考えることが許されるであろう。

分割遠心によつて精製の進行してゆくもようを各部に含まれる窒素の量で調べてみると第 1 表のようである (TMV-8 の場合)。表のうち最初と最後の行以外の分割はすべて捨て去られるわけである。表からただちに判るように、汁液に含まれる

第 1 表 超遠心精製における各分割の窒素量 (TMV-8 の場合)

分 割	液 量 (cc)	窒素濃度 (mg/cc)	窒 素 の 全 量 (mg)
原料汁液	約 150	1.86	約 280
第 1 回高速遠心上清	約 150	1.68	約 250
第 1 回低速遠心沈澱の浮遊液	5	1.08	5.4
第 2 回高速遠心上清	30	0.25	7.5
第 2 回低速遠心沈澱の浮遊液	2	0.49	1.0
第 3 回高速遠心上清	28	0.031	0.9
第 3 回低速遠心沈澱の浮遊液	1.5	0.35	0.5
精製試料 (TMV-8)	10.3	2.88	29.7

窒素の大部分は最初的高速遠心で上清に残り、バイラスと分離される。以後高速遠心のときに上清に、低速遠心では沈澱に残つて除去される窒素の量は急激に少くなり、3, 4 回の遠心サイクルで超遠心精製の限界に達するようになると思われる。一方バイラス活性の方は、定性的な試験ではあるがあまり失われないと見られる結果がえられているので、単位窒素量あたりの活性度が汁液に比べて著しく上昇することになり、バイラスの精製の進んだことが明かである。

圧搾汁の濁りを充分除かないと精製の能率が悪くなると前に述べたが、その実例がTMV-9の場合である。このときには短時間にTMVを濃縮するつもりで、4,000 r.p.m. で遠心しただけでかなり濁りの残っている汁液を高速遠心にかけた。えられた沈澱は極めて多量の緑色物質を含み、これを再浮遊して低速遠心したときに不純物の沈降のしかたが甚だ不満足で、その上清は著しい緑色を呈した。同一の圧搾汁の一部を数日後試みに超遠心機で充分濁りを除いてから高速遠心したところ緑色物質の少ないpelletがえられ、これを溶かして低速遠心したときの上清は緑色がほとんど感じられず、TMV特有の乳光がすでに明瞭であつた。これからわかるように、最初の圧搾汁の中の緑色不純物は、これをはじめに5,000 g程度の遠心力で遠心すると容易に沈降し去るが、いつたん高速で遠心沈澱させ、再浮遊するとかなりの部分がより沈降しにくい状態に変化して分散するらしい。^{*} さて上記のTMV-9精製の主径路にもどると、著しい緑色を呈した低速遠心上清を高速で遠心したとき、底部にほとんどつばらTMVから成ると考えられる大きな白色のpelletがあり、その平たい面の上に緑色の不純物が層を作つて沈著し、そのほかに上清の大部分(うすい褐色を呈する)と明かに区別される、密度・粘度の高い安定な液層が出来ていてそこにも緑色の不純物が集まつていた。以後の遠心で、pelletの面に緑色の層を作るものは低速遠心で大体除かれることがわかつた。また底部の高密度の液体部分だけを集めてまず低速遠心し(かなりの緑色物が落ちる)、ついで高速にかけると多量の白色pelletを生じるので、この部分にもTMVが高濃度に存在し、緑色の不純物もここに濃縮されることが明かとなつた。TMVのかかなりの部分がpelletに入りきらないのは、単に遠心される溶液中のTMV濃度が高すぎたためと思われる。3回目の高速遠心のときに、底部の重い液体部分を別にとり出して主径路とは別に遠

^{*} これは前に述べた場合、すなわち低速遠心で上清に残った不純物の一部が高速遠心でバイラスとともにpelletに入ると、再浮遊されたときに今度は低速遠心で沈澱にかなり行くようになるということと、一見矛盾するように思われるかも知れない。しかしここに述べたのは低速遠心で容易に落ちるべき不純物粒子に関することであり、また両者の場合とも不純物粒子の全部についていつているのではない。

心精製を行うこととし、またpellet表面を溶媒で静に洗つて附着した緑色物を除くことができ、これによつてようやく収量をあまり落さずに精製の能率を高めることができた。このように圧搾汁の濁りを充分除かなかつた場合にも超遠心分離のみで不純物を除きえたのは、TMVの濃度が高くて大きなpelletを生じ、不純物がこれとはつきり分れた層を形成したためであつて、収量の低い他のバイラスの場合には、ただでさえ正常成分の混在が問題になる²⁶⁾のに高速遠心のpelletのほとんどが不純物となつて、精製を著しく困難にすると考えなければならない。

一般に着色不純物は、これを含むバイラス溶液を放置した場合、徐々に会合して沈降しやすいものに変化するらしく、ときには緑色や褐色のものが容器の底に沈んでいることがある。このようなことは、超遠心精製が2日以上にわたるときに、精製の途中の溶液を一夜放置した場合にも見られる。これをただちに高速遠心にかけると、上記のTMV-9の場合と同じように不純物がふたたび沈降しにくくなるので、その日はじめに低速遠心をして落ちるものを除いておくことが能率上望ましい。また超遠心による精製が一応限界に達し、精製完了とした試料でも、数日あるいは数週間後に不純物の沈澱を生じ、これを低速遠心で除去して純度を向上せしめうる場合がある。ただし溶液中のTMV粒子の状態は保存によつて変化するおそれがあり、一般には精製試料についての各種の測定は精製後なるべく早く行う方が疑義が少いと考えられるので、上のようにして不純物を除きうるということを必ずしも期待することはできないであろう。

なお、高速遠心のpelletを処理するとき、非常に均一性の高い試料を作る目的で、その全体でなく中心部だけを溶媒に浮遊し、試験管壁に附いた部分はすてるという操作をした人もある²⁷⁾。我々はこのような操作はTMVに関するかぎり第一義的に重要なことではないと考えて行わなかつたが、場合によつては考慮すべきであろう。

TMV-11の場合には最初的高速遠心は時間を短縮するためにSharples高速遠心機を用い、50,000 r.p.m. (ボウル周速で62,000g) で1 l/hrの速度で流した。ボウルの壁に附いた沈澱を pH 7.0,

第2表 TMV-1~11の精製に関する二三の要項ならびに収量

試料番号 (TMV-)	材料タバコの 品 種	超遠心 精製サイ クルの 数	pelletの溶解に 用いた溶媒*	処理した原料の量		えられた 精製TMV の量 (g)	収 量		葉の採取後 処理までの 期間 (日)	精製時期
				植 物 (g)	汁 液 (cc)		原料植物 1gに対し (mg)	汁液 1cc に対し (mg)		
1	キサンチ	3	pH 7.7, μ 0.2	20	13	0.030	1.5	2.3	—	1948年12月
2	"	3	蒸溜水	90	60	0.18	2.0	3.0	—	1949年 1月
3	"	3	"	50	32	0.065	1.3	2.0	17	" 3月
4	ホワイト パーラー	3	"	35	20	0.045	1.3	2.3	—	" "
5	"	4	0.01 M	160	110	0.15	0.9	1.4	33	" 6月
6	"	(故障のため中止)		—	90	—	—	—	5	" "
7	"	3	0.1M-0.1M-0.01M	120	90	0.075	0.6	0.8	2	" 10月
8	"	3	" " "	180	150	0.18	1.0	1.2	20	1950年 6月
9	"	5	0.1M-0.1M-0.01M -0.01M-0.01M	750	600	1.0 ₇ (1.5)**	1.4 (2.0)**	1.8 (2.5)**	2	" 10月
10	"	3	0.1M-水-0.01M	80	40	0.025	0.31	0.63	38	1951年10月
11	ブライ トイエロー	5	0.1M-水-水- {0.01M-0.01M - μ 0.2- μ 0.2	1240	800	0.145	0.12	0.18	1	1952年 6月

* 蒸溜水以外はすべて燐酸塩緩衝液であり、 μ はイオン強度、M はモル濃度を示す。0.1M, 0.01M はともに pH 7.0 である。

** 主分割よりわずかに純度のおちる分割まで含めた値。

0.1M の燐酸塩緩衝液 200 cc に浮遊し、以後は Spinco E 型超遠心機* の分離用ロータ B (約 30 cc の容量のラステロイド管 8 本) で 3 回、空気駆動の委員会機で 1 回の遠心サイクルを行つた。

TMV-1~11 の精製に関する二三の要点を第 2 表にまとめて記した。

4. 収 量

超遠心による精製法は、硫酸アンモンなどの化学試剤を用いる精製法に比べて収量の点でも優れているといわれるが、我々の場合も、精製試料に含まれる窒素量を分析し、TMV の窒素含量を 16.7%¹³⁾として TMV の量を求めたところ、多くの場合他の研究者²³⁾²⁸⁾と同様の満足すべき高い収量であることがわかつた**。原料植物および汁液に対する収量を第 2 表に示す。この場合精製試料中に窒素を含む不純物がないと仮定することが必

要であるが、これは次節に記すように一応許されたと見られる。

TMV-11 は他より収量が著しく低い。その可能な原因として、原料のブライトイエロー種の病葉に TMV の濃度が低かつたため (健全な葉の混入したおそれは少い) とか、Sharples 高速遠心機の操作に未熟なために損失が多かつたとかが考えられるが、確かなことはわからない。

なお、バイラス活性試験も収量の一つの目安になりうるが、これは次節で触れることにする。

5. 精製試料の純度と諸性質

次にこのようにしてえた試料の純度を決定することが必要となる。一般にあるバイラス試料の純度を厳密な意味で決定することは困難であり^{8a)}、今までに何人も「完全に純粋なバイラス」をうるのに成功した、あるいはある試料が完全に純粋であることを証明しえたとはいえないと思われるが、各種の生物学的、化学的、物理的な方法を用いて、その試料に不純物が認められない、ないしは僅少であるという証拠を独立に多数集めることは可能であり、このような消極的な証拠でも極めて重要

* 東京工業大学精密工学研究所にあるもの。

** これは葉から「容易に抽出される」TMV の量であつて、圧搾したパルプの残渣からも適当な方法で TMV をとり出すことができる (たとえば Takahashi ら²⁹⁾ 参照) から、植物中のバイラスの全量を問題にするならば充分とはいえない。

な意味をもつものである。これらの「精製」試料がバイラスと本質的な関聯をもつものであることは疑う余地がなく、バイラス研究のあらゆる分野に大きな貢献をするからである。このような考えから以下に記すような純度に関するいくつかの試験を行つた。これらのうち物理化学的測定は同時にバイラス粒子についての「分子」定数を与えることになる。これらについてはそれぞれ別に詳細が発表されるはずであり、ここには必要なことだけを簡単に総括する。以下に述べる数種の試験の結論をはじめに記すと、我々のえた試料は、いわば化学的な意味では純度は極めて高いと考えられるが、TMV 粒子の著しい分裂・会合の傾向のゆえに、その長さに関する均一性は必ずしも常に良好とはいえないということである。

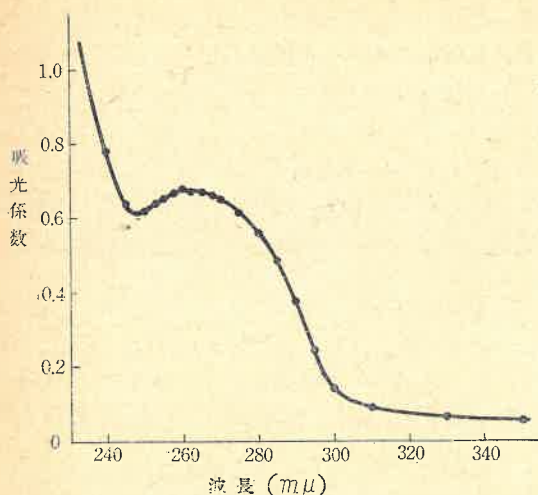
A. 生物活性試験 バイラス粒子は、現在の物理的、化学的技術ではとうてい検出できないような微細な変化によつてその活性を失う場合がしばしばあるので、あらゆる意味での純度を調べるためには生物活性の定量が不可欠となる。病原性という性質は物理的・化学的研究に普通用いられるよりはるかに低い濃度あるいは量で明かに現われるので、その意味では極めて鋭敏なものといふことができるが、その定量の精度は残念ながら一般に極めて低い。したがつて、精製試料に含まれる粒子全部が活性をもつか否か、すなわち生物活性について均一であるか否かを決定することは極めて困難である。しかし、少くともある物質あたり、たとえば窒素量あたりの「比」活性度が、精製の進むにつれて上昇してゆくことは比較的容易に調べることができるであろう。

実験は TMV の定量にもつとも正確とされている半葉法³⁰⁾によつた。*Nicotiana glutinosa* の葉にバイラスを接種すると全身病とならず、感染は local lesion と呼ばれる黒褐色の小斑点に局限され、その数の多少でバイラス濃度が推定される。斑点の数はバイラス濃度のほか、葉の面積や生理的狀態、接種条件などにも関係するので、一枚の葉を左右に分け、一方にはある標準試料を、他方には被検液を接種してたがい比較するようにする。実際に接種するには、日高氏にならつてます葉の面にカーボランダムを少量撒き、小さい綿球に試料を浸みてこめたもので葉の表面を軽くこす

る。精度の高い結果をうるためには生育程度その他の条件のよく揃つた多数の葉を必要とし、また接種方法を常に一樣にするのに熟練を要するのであるが、我々の場合これらの点を十分にできない状況にあつたので、定性的な結果で満足することにした。我々の接種方法では、精製試料の場合窒素濃度が $10^{-5} \sim 10^{-6}$ g/cc の稀釈液を接種したときに発斑数が読取りにもつとも適当であつたが、それらの数は、窒素濃度がそれぞれ 10^{-4} および 10^{-5} g/cc の原汁液の発斑数とほぼ同程度であることが、TMV-7, 8, 9 の場合に見出された。すなわち窒素量を基準にした比活性度が原汁液に比べて1桁程度上昇しているようである。原汁液中の TMV 核蛋白の量が 2 mg/cc であるとする、窒素量としては約 0.3 mg/cc となり、一方原汁液の全窒素濃度は大体 2~4 mg/cc であつたから、汁液から TMV 以外の窒素化合物を除去したならば窒素量あたりの比活性度は1桁程度上昇する（この場合 TMV の損失があつてもかまわない）はずであり、上の実験結果は一応満足するように思われる。また原汁液と、精製試料を原容に稀釈したものとの活性度を比較すれば、精製によるバイラスの損失あるいは不活性化の有無を見ることが出来る。TMV-5, 7, 8, 9 の場合にこれを調べ、大体において大きな損失や不活性化は起つていないことが認められた。これらの実験は前述のように不十分ではあるが、我々の精製操作によつて除去された窒素化合物はバイラス活性とは無関係のものであつたこと、その際バイラス活性の著しい損失は起らなかつたことを推論しても大きな誤りはないであろう。

B. 化学組成 窒素、燐、ペントース核酸、デソキシペントース核酸の含量を TMV-9 について分析した結果は、すでに報告したとおり、それぞれ 16.7%, 0.51%, 6.0%, 0% であつて¹³⁾、我々の試料が化学的に純粋であることの一つの根拠となる。

Beckman DU 型分光光度計で紫外線吸収を測定した結果を第1図に示した。「吸収」の値には TMV 粒子による散乱の寄与もかなりあるが、核酸および蛋白質の吸収極大が明かに認められ、その値は Dannenberg ら³¹⁾の値とよく一致している。



第1図 TMV 溶液の紫外線吸収 (TMV-11, 0.021%, 溶媒は pH 7.0, 0.01M 磷酸塩緩衝液)

C. 電気泳動 Tiselius 型の装置を用い、主に pH 7.7, イオン強度 0.2 の磷酸塩緩衝液を溶媒として測定した³²⁾。調べられた試料 (TMV-2, 3, 5, 7, 8, 9) はいずれも全く、あるいは僅かしか不純物を示さなかった。

D. 拡散 Neurath 型の拡散セルを用い、シュリーレン光学系で拡散定数を測定した。TMV-1, 2, 8, 9, 10, 11 につき測定し、それぞれかなり妥当な値がえられている。拡散曲線に顕著な不均一性の現れたことはあまりない。

E. 沈降速度 TMV-8, 9 について超遠心機委員会製作の分析用超遠心機で、また TMV-11 について Spinco E 型超遠心機で測定した。前者の結果はすでに報告した⁶⁾が、TMV-9 は極めて鋭い単一の界面を示し、この試料の均一性が優れていることの有力な証拠となつた。これに対し TMV-8 は著しく不均一な沈降図形を示した。この結果と電気泳動測定などの結果との関係については前報⁶⁾を参照されたい。

TMV-11 についての測定結果の詳細は別の機会にゆずるが、当時までの知見にもとずいて精製に注意を払い、測定も精製直後に行つたにかかわらず、沈降図形にはつきり 2 つの成分が現れ、一方はいわゆる monomer に、他はそれが 2 つ縦につながつた dimer に相当すると考えられる沈降定数を示した。これを説明するのに、この試料の精製の原料であるブライトイエロー種のタバコの

中では、TMV 粒子のかなり多くのものが会合して存在するという考えは魅力があるが、まだ一回だけの経験であるから何ともいえない。もしこの考えが事実であるならば、バイラスの精製試料の性質とその原料との関係、あるいは植物体内での TMV 生成の機序について興味ある問題を提起することになるであろう。

F. 粘度 TMV-8, 9, 11 について測定した。純度ないし均一性についての知見は粘度からは全くえられないが、TMV 粒子の会合の程度がこの測定から推定される。測定された固有粘度は試料によつて異り、粒子の長さの平均値がちがうことがわかつた。TMV-9 についての実験結果は次の報告に詳述する³³⁾。

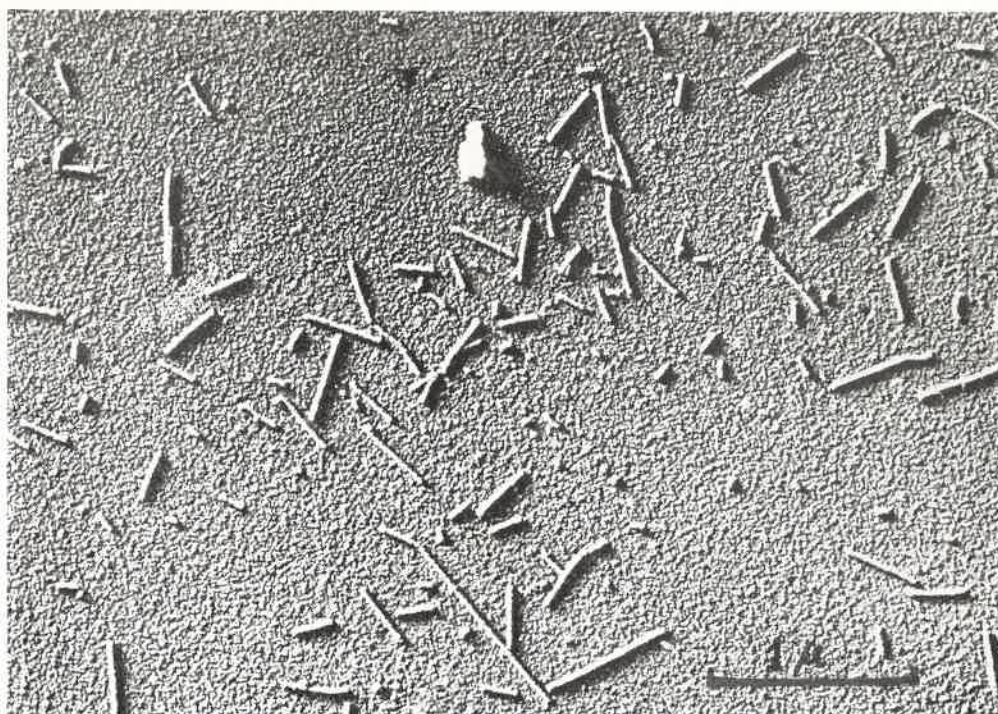
G. 電子顕微鏡による観察 TMV-1, 4, 7, 9 について電子顕微鏡写真を撮影した。電子顕微鏡所見から純度や均一性を問題にすることはしばしば危険ではあるが、どの場合にも視野には幅約 15 mμ の棒状粒子のみが見られ、TMV に無関係な不純物が認められたことはなかつた。粒子の長さについては約 300 mμ 附近のものがもつとも多く見受けられ、これは Stanley らのいう monomer と同じものと考えられる。しかしこれより長いものおよび短いものが常に認められ、試料あるいは写真によつては短い粒子がかなり高い割合で存在することがとくに注目される。第2図にその顕著な例を示した (TMV-7)。TMV-9 は沈降測定、電気泳動で不均一性が見出されず、電子顕微鏡写真においても今までえられた試料のうちで最良と思われるものであるが、それでも約 300 mμ の長さの主成分以外の粒子が明かに見られた¹³⁾。

この他 TMV-7 の精製に用いた汁液をそのまま撮影した (第3図)。TMV が特有の形をもち、その濃度が高いために、精製しなくても図のように明かに見られるのであるが、ここにも短い粒子が多数認められることに注意したい。

TMV 粒子の長さの分布についてはいろいろ議論があり、Pirie³⁴⁾などは長さの一定した試料をうることにについて全く悲観的な見解を述べたが、Stanley 一派の研究者は注意深く扱えば均一性の高い試料を作りうるとしており、また種々の長さの粒子のうちで約 280 mμ のものが病原性をもつ最小の単位であつて、それ以下の長さのものは活



第2図 TMV-7 の電子顕微鏡写真，短い粒子の多いことが注目される。
(日立製作所中央研究所撮影)



第3図 TMV-7 の精製に用いた汁液の電子顕微鏡写真
(日立製作所中央研究所撮影)

性のない分裂断片であると考えている³⁵⁾³⁹⁾。とにかく精製の際に溶媒の pH, 電解質の種類や濃度などを適当にしたときでも電子顕微鏡写真に種々の長さの粒子が常に見られることは事実であつてその原因としてつぎのようなことを先づ考えるべきであろう。* (1) 電子顕微鏡で観察するための試料を作るときに、その支持膜上で乾燥に際して粒子が分裂(場合によつては会合)する。(2) 超遠心精製操作によつて分裂(あるいは会合)が起る。(3) 植物体内ですでに種々の長さのものが存在している。以下にこれらの可能性について考察を加えてみたい。

(1) の問題は、電子顕微鏡像が溶液中での粒子の状態をそのまま表すか否かという重要なそして一般には未解決な問題が、TMV の場合に長軸の長さの変化の有無として現れるものである。電子顕微鏡観察試料を作るときに、充分稀薄な溶液を膜に載せても乾燥とともに局部的に濃度が高くなり、粒子が非常に大きな集団を作つて縦横に会合した像を現すことがしばしばあり、また逆に大きな表面張力を受けたり粒子自体のもつていた水が失われるために分裂を起すことも考えられる。試料溶液が電解質を含むときには乾燥とともにイオン強度が高くなつて長軸方向の会合が起ることもあるであろう。また電子顕微鏡写真から長さの分布を求めるときには視野の選択が行われざるをえないから、えられた分布を溶液中の粒子の状態に結びつける際には充分注意が必要である。TMV の写真に短い粒子がいくつか縦の方向に小間隔を置いて連なっているのがしばしば見られるが、これは Oster³³⁾ が考えたようにある種の遠距離力によつてそのような配列が生じるといふよりは、単にはじめ一つの粒子であつたものが乾燥に際して分裂したものと考える方が妥当と思われる。Schramm ら³⁷⁾ は TMV の液滴を支持膜上で充分注意を払わずに乾燥するとそのような像が多く見られると述べている。また Williams ら³⁸⁾ は mi-

cro spray の方法による観察の結果、注意深く作つた TMV 試料は溶液中で極めて高い均一性をもち、電子顕微鏡で見られる若干の小粒子は観察用試料を作るときに生じた人工的な分裂断片であろうと推論している。これらのことを考えて、我々の場合もおそらく小粒子はその相当多数のものが支持膜上でできた人工産物ではないかと想像される。TMV-9 の沈降図形が極めて鋭い単一の界面を示したことは、沈降測定が TMV の分裂粒子の存在を検出するのに極めて鋭敏である³⁹⁾ことを考えると、この予想を支持するに思われる。

(2) については、実際に超遠心精製操作によつて分裂するという報告¹³⁾⁴⁰⁾があり、高速攪拌などの機械的な作用でも分裂するといわれるから充分の注意を要する。これを避けるために、TMV の pellet をとくすのに手を加えず、溶媒を入れて一夜放置するなどという方法をとっている人もあるが³⁹⁾、我々はこのように点に特別の考慮は払わなかつたので、我々の試料の写真にある小粒子は一部精製中に機械的にこわれてできたものかも知れない。しかし第3図のように超遠心機にかけない汁液でも明かに短い粒子が認められることは、(1) あるいは次に述べる (3) の可能性をまず考慮する必要のあることを示すものと見てよい。

(3) については、植物体内でいわゆる monomer にまで成長する途中の段階のものがあるとか、一たん生成したバイラス粒子が分裂や会合を起すことがあるとすれば考えられる。Oster ら⁴¹⁾ は TMV に感染したタバコの hair cell をおしつぶしてえられる液をそのまま電子顕微鏡で調べ、native のままと見られるこの試料の中にも短い粒子が若干観察されることを報じ、それらが完全なバイラス粒子にまで成長する途中の段階のものではないかと想像している。一般にバイラスの生成される機序についてはほとんど明かにされてはいないが、種々の段階から成る life cycle があると想像されているバイラスもあり、TMV においても上のような考えは一がいに否定はできない。したがつて植物の成長の程度、とくにバイラス接種後の時間のいかによつて TMV 粒子の長さの分布が拡がるということもありえないことではない。また TMV を精製するのに普通用いられるのは植物をしぼつてえられる汁液であるが、その残渣からも

* TMV 粒子の長軸方向の会合性の強いことはあまりにも有名であるが、短い粒子の問題が考えられることは比較的少いようであり、ここでは後者にとくに注意を向けるわけである。会合を防ぐということは留意されることが多く、またその傾向を防ぐ方法はかなり明かになつてはいるが、分裂を防ぐことには最近までそれほど注意されていなかったように思われる。

適当な方法でさらに TMV を抽出することができ
る。Takahashi ら²⁹⁾によるとこの再抽出液から
の TMV 試料は、電子顕微鏡で調べると通常の試
料と粒子の長さの分布が異り、短い粒子をより多
く含むという。そしてこれらは細胞の構造と結び
ついていてより抽出されにくいのであらうと考え
た。これが事実だとすると、葉からの抽出の程度
の強弱によつてえられる TMV 試料の長さの分布
が変化することになる。一方「成熟した」TMV
粒子が、植物体内で分裂や会合を起すことも大い
にありうると思われる。native の TMV を分解
する酵素の存在は今まで明かにされておらず^{42) 43)}
また一たん生成した TMV 核蛋白は高速遠心で沈
降しないものにまで分解されることはないという
報告⁴⁴⁾もあるが、植物体内でどんな場合にも（た
えば切りとつた葉を長く冷凍室に保存するとい
うような場合）巨大な TMV 核蛋白の粒子状態が
そのままに保たれるとはむしろ考えにくい。我々
が精製に用いた汁液のあるものは、はじめから短
い粒子をいくらか含んでいたと考えるのが妥当で
あると思われる。まゝに¹³⁾ TMV-8 と 9 の沈降図
形の比較から推論したように、均一な試料をつく
るには刈取つた葉をなるべく早く処理することが
重要であらう。

以上の考察から、我々の精製した TMV 試料の
電子顕微鏡写真中に $300\text{m}\mu$ より短い粒子が常に、
時には甚だ多く見出されるということの原因とし
ては、場合によつてちがうであらうが、第一には
電子顕微鏡観察の試料を作るときに人工的に分裂
するものが少なくないと考えてよいであらう。また
(3) の点、すなわち汁液の中にはじめから存在す
ることがある（とくに葉を採取後長く保存した場
合）という可能性を考えることも重要であると思
われる。いずれにしても長軸の長さが均一な試料
を得ること、あるいは均一であることを証明する
ことは必ずしも容易ではなく、今後の研究に待つ
べき点が多いというべきである。

H. TMV 粒子の大きさと形状 TMV-9 につ
いて沈降速度、拡散、粘度、電子顕微鏡の実験から
粒子量および長軸・短軸の長さを求めた結果はす
でに報告した¹³⁾が、粒子量は $4\sim 5\times 10^7$ で妥当な
値であり、また測定値のいくつかの組合わせから
求めた値はたがいに一応満足な一致を示した。

6. 結 び

TMV については古くから各方面の研究が数多
く行われて来たが、高分子の分子量・形状の決定
のための最近著しく発達して来た各種の物理化学
的方法による統一的な研究は案外少い。バイラス
粒子に関するこのような物理化学的研究は、バイ
ラスの生物活性の本質という生物学の根本的な問
題にとつても無縁でありえないことはいうまでも
ないが、より直接的には、沈降、拡散、粘度、電
気泳動、光の散乱、流動複屈折その他溶液中の高
分子物質の研究に広い応用範囲をもつ測定法の進
歩と、それらの測定値を溶質粒子の性質に関係す
ける理論の検討とにとつて極めて重要なものでは
ある。また電子顕微鏡像と溶液中での状態との関
連という問題にとつても極めて興味深い。このよ
うな研究に TMV はしばしば登場し、大きな役割を
果たして来たが、TMV の場合、その長さに関する
均一性にまだ問題があるので、検討の余地がかなり
あるといわねばならない。

まゝに述べたように、植物体内で自然の状態
ですでに TMV 粒子が一定の長さでなく種々の長さ
のものが存在していることがあるという可能性を
否定することはかなり難しいが、植物から存在す
る TMV の全部を定量的に取出すことは容易でな
いので、植物体内の TMV の粒子状態は十分に知
られていないと見るべきである。これに対し物理
化学的な立場からは大きさ、形の均一な精製試料
が、理論的な取扱いが容易であるという意味で望
ましい。精製に際して人為的な因子に充分の注意
を払つたとしても、必ず均一性の高い試料がえら
れるとは保証されていないが、なるべく均一性の
高い純粋な試料をうるための注意として今までに
えられた知見をまとめると次のようになる。

1. 原料の選択 タバコの種類を選択すること
がもつとも重要なように思われる。今までの経験
ではホワイトバーレー種がもつとも適当である。
そのほか、若い植物を用いること、接種してから
あまり長く経たないことが望ましい。

2. 精製操作 刈取つた葉を遅滞なく処理す
る。圧搾汁の濁りをはじめに充分除く。超遠心機
で TMV を沈降させるときになるべく低目の回転
数を用い、pellet の溶解はおだやかに、収量

を問題にしないでよければ pellet の中央部のみをとる。分割遠心のサイクルの数は最小限度に止める。TMV の濃度をあまり高くしないようにする。もつとも重要なのは pellet の溶媒の選定であり、TMV 粒子の会合や分裂を来すおそれのないものを用うべきである*。全操作を低温で行い、できるだけ短時間内に完了させることが望ましい。

3. 測定 精製試料の純度、均一性、物理化学的性質を調べるための測定は、精製後できるだけ速かに、しかもできるだけ多くの方法を並用して行うことが必要である。

我々の超遠心機ならびにそれによる TMV の精製は、なお多くの改良の余地があるが、ほぼすべての場合を通じて精製試料中には TMV に無関係な物質は検出できず、ほとんどもつばら直径約 15 μ の棒状粒子のみから成ると考えられ、その長さは他の研究者と同じく約 300 μ のものもつとも多いので、ここに報告した研究によつて一応所期の目的を達したと見ることができよう。

最後に、多量のタバコモザイク病葉を御恵与下さり、終始変らず懇篤な御指導をおしまれなかつた専売公社秦野たばこ試験場日高醇博士、超遠心機による実験に多大の御便宜をお計り下さつた東京工業大学精密工学研究所佐々木重雄所長、谷口修教授および同研究室の方々、電子顕微鏡の撮影をして戴いた日立製作所中央研究所只野文哉、土倉秀次両氏、ならびに種々御援助頂いた当研究所水島三一郎教授その他の方々に厚く感謝の意を表したい。研究費は文部省科学研究費によつた。

文 献

- 1) T. Svedberg, K.O. Pedersen: "The Ultracentrifuge," Oxford, 1940.
- 2) J. Biscoe, E.G. Pickels, R. W. G. Wyckoff: *J. Exp. Med.* 64 (1936) 39.
- 3) J. H. Bauer, E. G. Pickels: *J. Exp. Med.* 64 (1936) 503; R.W.G. Wyckoff, R.R. Corey: *Science* 84 (1936) 513.
- 4) 超遠心機委員会研究報告: 近く出版の豫定。

* Schramm ら³⁷⁾は Stanley 一派や我々たちがつて pH 8.6 の 0.1M 重曹溶液が TMV の均一性のために良いとしており、場合により変株によつて最適な溶媒がちがうという可能性も考えられる。ただし pH 8 以上では数日おくと分裂を起すことがある⁴⁵⁾から一般には避けた方がよいと思われる。

- 5) ごく初期の研究の一端は、渡辺格、大塚由己、水島三一郎、東大輻射線化学研究所報告, No. 5, (1950) 10 に報告した。
- 6) 渡辺格, 川出由己, 水島三一郎: 日化 73 (1952) 828.
- 7) W.M. Stanley: *Science* 81 (1935) 644.
- 8) たとえば (a) 渡辺格, 薬学 3 (1949) 350; (b) 岡小天 (江上不二夫編) "核酸および核蛋白質," 共立出版, 1951, 第 6 章参照。
- 9) 各種の精製法については、渡辺格, 鈴木曄之 (江上不二夫編) "核酸および核蛋白質," 共立出版, 1951, 第 5 章参照。
- 10) 佐々木重雄, 谷口修: 日本機械学会誌 54 (1951) 255; 渡辺格, 川出由己: 化学と工業 5 (1952) 585.
- 11) S. G. Wildman, C. C. Cheo, J. Bonner: *J. Biol. Chem.* 180 (1949) 985.
- 12) W.M. Stanley: *J. Biol. Chem.* 121 (1937) 205.
- 13) I. Watanabe, Y. Kawade: *Bull. Chem. Soc. Japan* 26 (1953) 294.
- 14) W. M. Stanley, H. S. Loring: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 6 (1938) 341.
- 15) I.-B. Eriksson-Quensel, T. Svedberg: *J. Am. Chem. Soc.* 58 (1936) 1863; G. Oster, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 55.
- 16) M. A. Lauffer: *J. Biol. Chem.* 126 (1938) 443.
- 17) W. M. Stanley: *J. Am. Chem. Soc.* 64 (1942) 1804.
- 18) T. Sigurgeirsson, W. M. Stanley: *Phytopathology* 37 (1947) 26.
- 19) M. A. Lauffer: *J. Am. Chem. Soc.* 66 (1944) 1195.
- 20) G. Schramm, G. Bergold: *Z. Naturforsch.* 2b (1947) 108.
- 21) J. W. Beard: *J. Immunol.* 58 (1948) 49.
- 22) たとえば H. K. Schachman: *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1841.
- 23) H. K. Schachman, W. J. Kauzmann: *J. Phys. & Colloid Chem.* 53 (1949) 150.
- 24) W. M. Stanley: *J. Biol. Chem.* 115 (1936) 673.
- 25) F. C. Bawden, N. W. Pirie: *Brit. J. Exptl. Path.* 19 (1938) 251.
- 26) N. W. Pirie: *Biochem. J.* 47 (1950) 614.
- 27) R. C. Williams, R. C. Backus, R. L. Steere: *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 2062.
- 28) F. C. Bawden: "Plant Viruses and Virus Diseases," Waltham, 1950.

- 29) W. N. Takahashi, T. E. Rawlins: *Phytopathology* 39 (1949) 672.
- 30) F. O. Holmes: *Bot. Gaz.* 87 (1929) 39; G. Samuel, J. G. Bald: *Ann. Applied Biol.* 20 (1933) 70; H.S. Loring, *J. Biol. Chem.* 121 (1937) 637.
- 31) H. Dannenberg, G. Schramm, H. Flammersfeld, *Z. Naturforsch.* 3b (1948) 241.
- 32) N. Ui, I. Watanabe: in preparation.
- 33) 川出由己: 理工研報告, 8 (1954) 115.
- 34) N. W. Pirie: *Advances in Enzymol.* 5 (1945) 1.
- 35) M. A. Lauffer: *J. Biol. Chem.* 151 (1943) 627.
- 36) G. Oster: *J. Gen. Physiol.* 31 (1947) 89.
- 37) G. Schramm, M. Wiedeman: *Z. Naturforsch.* 6b (1951) 379.
- 38) R. C. Williams, R. L. Steere: *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 2057.
- 39) H. K. Schachman: *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 4808.
- 40) G. Oster, W. M. Stanley: *Brit. J. Exptl. Path.* 27 (1946) 261.
- 41) G. Oster, C.A. Knight, W.M. Stanley: *Arch. Biochem.* 15 (1947) 279.
- 42) S. S. Cohen, W. M. Stanley: *J. Biol. Chem.* 142 (1942) 863.
- 43) A. Kleczkowski: *Biochem. J.* 38 (1944) 160.
- 44) M. Meneghini, C. C. Delwiche: *J. Biol. Chem.* 189 (1951) 177.
- 45) G. Schramm: *Z. Naturforsch.* 2b (1947) 112.