

多角体罹病蚕体組織のペプトン分解作用

吉原, 典子
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21396>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 15 (4), pp.473-477, 1956-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

多角体罹病蚕体組織のペプトン分解作用

吉原典子

Decomposition of pepton in polyhedral-diseased silkworms

Fumiko Yoshihara

緒言

バイラス病に罹つた蚕児の蛋白分解酵素が正常蚕に比し著しく強力であり、又蚕体が該病誘発の性能を有するヒドロキシルアミン、過酸化水素、亜硝酸加里、アセトオキシム等の処理を受けた時にそのプロテアーゼが賦活される事は既に屢々報告した。

蚕に病毒を注射すれば、体内に入つたバイラスは小さい粒子に解体されて毒性を失つて了うが、再び増殖し多角体が蚕の体に充満する様になる。家蚕の幼虫に於て、斯様な新生バイラスの構成成分は一部は体内の成分からくるが、他は摂取する桑の養分から来るものと思われる。然し食物を全然摂らない蛹に於ても病毒の接種によつて幼虫と同様な発病経過をとるところから、此の場合のバイラス構成成分は蚕体組成成分の変換に由来することは明かである。バイラス罹病過程中に活性化された蛋白酵素はこのような細胞成分のバイラスへの転換に関与するものと思惟されるが、体蛋白分解物の中如何なる種類の生産物が此の際最もよく利用されるかを探究する一方途として本報に於てはより低分子量のペプトンを基質として研究を進めることとした。

1. 多角体注射蚕のペプトン分解作用

この実験に供した蚕は当学部の養蚕教室で遺伝的純系として多年飼養された P_{21} を3年前に譲り受け、本教室に於て厳重な管理の下に継続飼育したものであつて、すべての化学器具及び飼育用具は乾熱又は火焰殺菌を行い完全なバイラス的無菌条件を保つた。此の蚕の7代目、5令1日に多角体溶液 10^{-6} g/ml 濃度のものを 0.02 ml 宛注射し、該病毒によつて斃れなかつた熟蚕から採卵したものを $P_{21} I_2$ とした。これを引き続き5代重ねて、 $P_{21} I_5$ を得た。この I_1 から I_5 までの生育状態はバイラスの注射を受けない蚕に於ける場合と変らなかつた。斯様に育成した $P_{21} I_5$ の5令蚕児の半数を標準区とし、他方の幼虫には 10^{-4} mg/ml 多角体を1頭当り 0.02 ml 注射した後、此等両区の蚕児は共に同じ条件の下に飼育した。病毒の注射後発病期を過ぎた7日目に尙生存している蚕を集めアセトンで以つて乾燥製剤を作り、標準蚕も注射蚕と同様に酵素剤を調製した。

酵素液はアセトン粉末の 0.2 g 宛を pH9 の硼酸、硼砂緩衝液に懸濁したもので、之れに基質として 10% Witte's pepton 液の 1 ml を加え、全量を 11 ml とした。37°C の恒温器中で 17~18 時間反応せしめ、前報と同様にホルモール法に依つて生成アミノ窒素

量を測定した。このように本報告では従来の磷酸緩衝液に代えるに硼酸塩液を用い、pH を更に高めて反応させたのであるが、此の方法によつて蛋白酵素は一層強く作用し、且つ細菌の増殖を抑制し得たのである。盲検としては、100°C に 10 分浸漬した加熱酵素液を用い、反応測定値から差引き、更に基質の代わりに水を用いて反応せしめたプロテアーゼ分解酵素量を控除し、酵素剤 1 g に対するペプトン分解酵素 mg を算出して第 1 表に掲げた。

第 1 表. 多角体注射残存健全蚕に於ける
ペプトン分解作用.

	注射蚕	標準蚕
アミノ窒素 (mg)	4.23	3.26

上の表にみられる如く多角体注射蚕が発病期に罹病しないで成長した蚕の酵素作用は標準飼育蚕に於けるそれよりも幾分強い様である。

次に同じく純系として育成された P_{11} を昭和 29 年の春蚕室から濃液を受け、同様に感染を避けつつ飼養した 3 代目の蚕体に病毒の 10^{-5} g/ml 溶液を 0.01 ml 宛注射して、4 時間後にアセトン剤を調製した。反応条件並びに測定法は前記の通りである。

第 2 表の実験結果から、注射されたウイルスの缺蝕期に於ても、ペプトンに対する分解力は第 1 表と同様に強いことが観察された。因に多角体病毒を注射した蚕体のアルカリ抽出液を他の健全な蚕児に注射して感染の有無を検し、注射後数

第 2 表. 多角体注射直後の蚕体に於ける
ペプトン分解作用.

	注射蚕	標準蚕
アミノ窒素 (mg)	3.85	3.08

時間内は無毒である事が分り、多角体病に於ても他の動植物及び細菌ウイルスに於けるように缺蝕期が現われることが当室に於ける他の実験で明かにされている (山藤, 吉原, 佐藤: 1954) ので、上記の試験を行つてみたのである。

更に同年の第二飼育期に於て、純系の P_{21} 及び P_{11} の健全な親を選び $P_{21} \times P_{11}$ の交雑種を得た。本報告では前に書いた品種を雌とすることとした。交雑第 1 代目は 7 月から 8 月にかけて飼育され、第 2 代目は 10 月の初旬に孵化させ、これの 5 令起蚕に多角体溶液 10^{-5} g/ml を 0.02 ml 宛注射した。5 日目に発病した蚕を直ちに蒸溜水で洗い、水分を切

つて、糞の混入を避けながら迅速にアセトン乾燥し酵素剤とした。膿病蚕のペプトンに対する分解力は左の表に掲げる如く、標準区に比し 2 倍以上の値を示している。

第 3 表. 多角体病蚕のペプトンに対する
分解作用.

	罹病蚕	標準蚕
アミノ窒素 (mg)	14.63	6.54

2. 核剤注射蚕のペプトン分解作用

当教室に於ては、別に (山藤, 江藤, 青木, 向井: 1955) 蚕体に多角体を注射し、病毒の作用を失つた時期に細胞核を分離して、之をアルカリで抽出しその上澄液を健康な蚕児に注射することによつて、その効果を試験したが、これに関連して次の実験を施行した。

供試核剤は江藤氏により調製されたもので、 P_{21} の5令2日目に多角体 10^{-7} g/ml の溶液を 0.02 ml 注射し、5 時間後に分離した組織を pH 4 枸橼酸で 8 回洗滌して、2 回水洗し強く遠心分離することにより作られた。

この核の塊 20 mg に n/50 炭酸ソーダを 2.6 ml 添加し、乳鉢でよく磨碎して 30°C に 1 時間抽出し、遠心分離を 3 回くりかえし、上澄液を注射液として 1 頭に対し 0.02 ml 使用した。溶出液 0.02 ml は核剤 0.15 mg の抽出液に相当する。注射を受けた蚕は

第4表. 核剤注射液に於けるペプトン分解作用.

	注射蚕	標準蚕
アミノ窒素 (mg)	6.16	4.62

前回に使用した蚕と同時期に飼育された $P_{44} \times P_{21}$ で、その F_2 蚕の5令1日に上記の核剤抽出液を注射し、5 日後に常例に従い酵素剤を調製した。酵素作用は第4表に表示した様に核溶出液の注射によつても賦活された。

4表に表示した様に核溶出液の注射によつても賦活された。

3. ヒドロキシルアミン添食蚕のペプトン分解作用

第1飼育期の春に $P_{21} \times P_{44}$ の交雑種を作り、6月に第1代を、次に7月に飼養した第2代目の幼虫 4令1, 2日の両日に n/10 塩酸ヒドロキシルアミンの添食を施し、3日目に酵素剤とした。その蚕体組織の酵素作用は第5表の通りで、かなり強くなっている。

第5表. ヒドロキシルアミン添食蚕に於けるペプトン分解作用.

	添食蚕	標準蚕
アミノ窒素 (mg)	6.93	5.77

4. 組織酵素剤に対する誘発試薬の影響

本実験に使用した試薬はウイルス病誘発の働きをなす過酸化水素、ヒドロキシルアミン及びチオグルコール酸であつて、その中チオグルコール酸はバスター研究所のルオフ氏によつて溶原株に対し誘発力を有することが見出され (A. Lwoff et L. Siminovitch: 1952), 当研究室に於ても蚕に之を適用して、同様に多角体病を惹き起すことが証明されたものである (山藤, 平山: 1955). 之等3試薬のペプトン分解酵素に対する影響を知るために、酵素剤としては本教室連続飼育し来つた9代目の P_{21} と4代目の P_{22} との交雑種を昭

第6表. ペプトン分解酵素と試薬濃度との関係.

品 種	試薬名	試薬濃度			
		無添加	n/100	n/1000	n/10000
アミノ窒素 (mg)					
$P_{21} \times P_{22}$	過酸化水素	7.80	6.40	7.50	7.45
支115 × 日122	ヒドロキシルアミン	6.65	5.25	8.20	7.20
$P_{21} \times P_{22}$	チオグルコール酸	7.45	7.05	7.05	7.05

和 29 年に飼い、得たる越冬卵を翌春孵化させた 2 代目の健全な $P_{21} \times P_{22}$ から第 4 令 4 日目に調製したアセトン剤、及び熊本県蚕業試験場より恵送された 支 115 × 日 112 の蚕卵を同様な管理の下に飼養した健康な幼虫の 4 令 2 日目にアセトン乾燥した酵素粉末を使用した。試薬は第 6 表に示す濃度になる様に添加し、前記の反応条件下に、ペプトンに対する分解力を比較した。

上記の第 6 表によつて、ヒドロキシルアミンは蚕体プロテナーゼに対する場合と略し、同濃度の 1/1000 規定でペプトン分解度を多少強くすることを知つた。

之れに引きつづき蚕の体蛋白を基質とした場合及びペプトンを添加した時の蛋白分解の両酵素作用を比較し、更に之等に及ぼす試薬の影響を検討したところ第 7 表に示す如く添加基質のペプトンに対する分解力は蚕体プロテナーゼに比してかなり弱い、前にも述べた様に、1/1000 規定ヒドロキシルアミンによつて両酵素力は共に賦活された。しかし過酸化水素及びチオグルコール酸に於てはあまり影響を受けなかつた。

第 7 表. 蚕体プロテナーゼ及びペプトン分解酵素に対する試薬の影響.

品 種	養 令	試 薬 名	蚕体プロテナーゼ		ペプトン分解酵素	
			試薬添加	無添加	試薬添加	無添加
$P_{21} I_5$	5 令 5 日	過 酸 化 水 素	24.50	24.15	6.50	5.95
$P_{21} \times P_{44}$	4 令 4 日	ヒドロキシルアミン	22.40	21.70	6.60	4.85
$P_{21} \times P_{44}$	4 令 4 日	チオグルコール酸	19.90	20.55	4.95	5.80

総 括

蚕体組織のペプトンに対する分解作用は多角体の注射後数時間で既に増強され、又感染後罹病することなくして残存した蚕児の同分解力は正常蚕に比し強大である。更に蚕児のペプトン分解酵素は缺蝕期細胞核の注射によつても賦活せられ、且つ膿蚕の該酵素力は健康蚕のそれに較べ著しく強い。他方ヒドロキシルアミン添食も幼虫のペプトン分解力を活性化する。

家蚕の添加ペプトン分解酵素作用は蚕体蛋白分解力よりも概して弱い。組織製剤の此のペプトン分解能に対しヒドロキシルアミンは低濃度に於てはプロテナーゼに対すると同様稍、賦活的に働くが過酸化水素及びチオグルコール酸ではかかる影響はみられない。

文 献

- A. Lwoff et L. Siminovitch (1952): Ann. Inst. Pasteur, 82, 676.
 山藤一雄, 吉原典子, 佐藤道夫 (1954): Enzymologia, 17, 152.
 山藤一雄, 江藤守総, 青木みか, 向井純一郎 (1955): Enzymologia, 17, 245.
 山藤一雄, 平山勝英 (1955): Enzymologia, 17, 229.

Summary

The decomposition of pepton in silk-worm tissues increased several hours after the injection of polyhedral solution and the decomposing activity was higher in survived larvae than in untreated ones. The pepton-hydrolysing enzyme is activated by the injection of nucleus from silkworms in the eclipse period. The enzymatic activity in virus-diseased individuals is much stronger than that in healthy ones.

An activation of the enzyme is caused by hydroxylamine feeding. The activity of acetone preparations is somewhat elevated by hydroxylamine but is not influenced by hydrogen peroxide and thyoglycolic acid.