

## 多角体罹病蚕体組織のプロテアーゼとリボヌクレ アーゼ

吉原, 典子  
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21495>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.241-246, 1959-12. 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プロテアーゼと リボヌクレアーゼ

吉原典子

Ribonuclease and protease in  
virus-diseased silkworms

Fumiko Yoshihara

### 緒言

蚕児の多角体病はヒドロキシルアミン、過酸化水素、亜硝酸加里及びアセトオキシム等の化学薬品によつて誘発されるが、かかるバイラスの形成に伴いプロテアーゼの著しい活性化がみられた。かくの如く蛋白分解酵素の賦活はバイラス発生の第一段階と考えられる。しかし一方に於て本バイラス蛋白の生成に最も密接に関与するものは寄主体細胞に存在し自己増殖性を有するリボ核酸及びデオキシリボ核酸とおもわれるので、先ずリボ核酸分解酵素の行動を蛋白酵素のそれと併せて追及した。

### 実験

実験 1: 一供試された蚕は昭和 29 年の春、初夏及び初秋に亘つて注意深く飼育されたもので、それ等は概ね 4 令又は 5 令にバイラス病原体の接種を行いその後適期にアセトンで以つて乾燥酵素剤とし、同年の冬酵素試験に供した。該酵素剤はアセトン処理により酵素力の低下は逸れないとしても常に冷蔵保存するため貯蔵による影響は少ない様である。

本実験に於けるプロテアーゼの測定は van Slyke の方法に依つた。先ずアセトン製剤の 0.8g を pH 7.7 N/10 磷酸緩衝液 15ml によつて 37 度、1 時間抽出し酵素液とした。反応には該酵素液の 5ml を供しこれに基質として 2.5% Hammarsten カゼイン溶液 1ml を添加した。この混合液は 37 度に 3 時間置かれ反応は氷醋酸 0.1ml を以て停止させ遠心分離によつて透明な上澄液を得た。この除蛋白された溶液の 1ml は van Slyke の装置によつてアミノ窒素が定量された。対照実験には 100 度に 10 分浸漬された加熱酵素液が使用され本試験値から差引かれた。以下表中に掲げる数字は酵素剤 1g に対するアミノ態窒素 mg 量を示す。

リボヌクレアーゼは Allen 法の変法として報ぜられた中村氏<sup>1)</sup>の定量法に従つた。酵素液はアセトン粉末 0.2g を pH 8 の磷酸緩衝液と混合磨砕し同緩衝液を以て 12ml とした。該懸濁液は 37 度に 1 時間放置し次いで遠心分離することにより酵素の抽出液が得られた。基質は酵母核酸を水に懸濁し苛性ソーダで pH 6 に調整した 0.5% 溶液である。反応は上記リボ核酸溶液の 1ml に酵素液 5ml を添加し、37 度に於て 2 時間行つた。盲検としてはこの場合基質核酸の代りに水を使用した。作用後反応液の 2ml をとりウラニウム試薬

2ml を加えて 30 分後遠心分離した。上澄液の 1ml は硬質の試験管に移され砂皿上で蒸発乾固させ之に 60% 過塩素酸を滴下して加熱分解した。更に 30% 分析用過酸化水素を数滴落して分解を続け 1ml の水を注加し 5 分間沸騰せしめ放冷後水を以て 5ml とする。次にアミドール試薬 1.5ml 及びモリブデン試薬 0.5ml が加えられ 20 分後に 660m $\mu$  のフィルターを使用して日立の光電比色計に依り定量し、蚕体製剤 1g 当りのリボ核酸分解磷の量を mg で表わした。

実験の主な例を示せば蚕は遺伝的に純系として育成された P<sub>44</sub> の 3 令 2 日目に当学部の養蚕室から分譲を受け本教室に於て長年の経験に基き バイラス的無菌条件の下に引籠き飼育されたもので、これらの蚕児は成育非常に良好で健全なる個体から上簇、營繭、化蛾を経て採卵された。次いで該卵は 6 月 17 日略 24 度の室温に於て催青、26 日に掃き立て飼養された。5 令に至り、一回の給桑後、半数の蚕児は標準区とし、他方の幼虫は炭酸ソーダに溶解させた多角体の 10<sup>-6</sup>g/ml 溶液を 1 頭当り 0.01 ml 注射した。再び桑を与えて回復せしめたが多くの場合多角体バイラスの注入によつては体力の衰えは見られない様である。かかる 病毒接種の 4 時間後に蚕体は水で洗われ、氷冷したホモジェナイザーで磨碎し、之に冷アセトンを加えて脱水し迅速に吸引濾過した。残渣は再びアセトンの共存下に磨碎並びに濾過を 3, 4 回繰返し之を真空デシケーター中に置くことによりアセトン臭の無い乾燥製剤が得られた。病毒の接種を受けない標準区としての蚕体も同様の操作によつてアセトン粉末が調製された。何れの酵素剤も乳鉢で入念に細かく磨碎し製剤の均等をはかつた。このようにして作製された酵素粉末は上述の定量法に従つて測定され次表に掲げられた如く注射蚕が標準蚕に比しプロテアーゼは強いが、リボヌクレアーゼはむしろ低下する結果を示した。

第 1 表.

	注射蚕	標準蚕
プロテアーゼ (アミノ窒素 mg)	1.20	0.93
リボヌクレアーゼ (分解磷 mg)	0.80	1.07

別に熊本蚕業試験場より譲渡された日 122 の蚕卵を 5 月 1 日に孵化させ第 4 眠期に前回と同様に注射を施行した。この場合病毒の濃度は 10<sup>-6</sup>g/ml とし、アセトン処理は接種の 6 時間後、前法に従つて行われた。これら酵素粉末に於けるプロテアーゼ及びリボヌクレアーゼの作用は第 2 表の通りである。

第 2 表.

	注射蚕	標準蚕
プロテアーゼ (アミノ窒素 mg)	1.60	1.25
リボヌクレアーゼ (分解磷 mg)	1.07	1.10

次に養蚕室で純系として飼養された P<sub>21</sub> は当研究室に於て継続飼育せられ、7 代重ねた

幼虫の4令3日目に多角体ウイルス  $10^{-5}$ g/ml が同様の方法で接種されその後普通の給桑を続け2日目に常法に従いアセトン製剤を調製した。

第3表.

	注射蚕	標準蚕
プロテアーゼ(アミノ窒素 mg)	1.78	1.60
リボスクレアーゼ(分解 磷 mg)	0.86	0.54

上表の実験結果を見ると病原ウイルス注射後2日目の欠蝕期に於けるプロテアーゼは軽度の賦活であるに対し、リボスクレアーゼは相当強められる様である。

多角体の注射後3日目に於けるアセトン製剤の酵素作用は一昨年第一期の春に飼育された  $P_{22} \times P_{21}$  の交雑種に依つた。ここに用いられた病毒は  $10^{-4}$ g/ml 濃度のもので、上記蚕体の4令4日目に接種された。その成績は第4表に見られる如く両酵素は共に幾分活性化されている。

第4表.

	注射蚕	標準蚕
プロテアーゼ(アミノ窒素 mg)	1.87	1.42
リボスクレアーゼ(分解 磷 mg)	1.55	1.13

蚕がウイルス病毒の接種を受けた場合には通常5,6日の潜伏期を経て発病するもので、該病の症状は一般に初期に於ては健康蚕兎と区別し難いが、病勢進むにつれ催眠期に入りても眠らず這い廻つて、皮膚の色は白く光り次第に環節が高くなる。この様に節高蚕となれば一見して膿蚕と健蚕との識別が出来る。かかる罹病蚕の血液は乳白色に濁り、更に進むと皮膚が破れて膿汁を出す様になる。此の時期に於ける実験の供試品種は前報<sup>2)</sup>に於て記された  $P_{21}I_5$  であつて晩秋期に飼育された。幼虫の5令起蚕に対して  $10^{-4}$ g/ml 濃度のウイルス病毒が  $0.02$ ml 宛注射され6日目に上述のような典型的病状をあらわした膿蚕のみのアセトン製剤につき両酵素の作用を健蚕のそれと比較した。

第5表.

	注射蚕	標準蚕
プロテアーゼ(アミノ窒素 mg)	2.38	1.49
リボスクレアーゼ(分解 磷 mg)	0.87	0.74

この表に示された如くウイルス病の罹患によりプロテアーゼは従来しばしば観察された様に著しい活性上昇をあらわすに反し、リボ核酸分解酵素の作用賦活度は概して低い様である。

実験 2: 一膿病の発生が眠る前に著しいこと、起蚕児に誘発試薬の適用が最も有効であること等の経験より多角体バイラスの増殖がおそらく潜伏期の当初に於て旺盛なるものと推察されるのでバイラス誘発処理並びに病毒接種を行つた数時間後に於ける蚕体組織内の両酵素作用を更に追及してみた。

先ずリボヌクレアーゼに対する実験に使用された蚕は上述の  $P_{21}I_3$  の越年卵を再び春期より 3 代飼育して得た  $P_{21}I_3$  であつて、この 5 令 1 日目に同じ体重の幼虫を 10 頭宛 4 区設けた。一区に対しては M/12 亜硝酸加里溶液が 1 頭当り 0.05ml を 2 回に分ち蚕児の体腔内に注入された。他の一区には多角体の  $2 \times 10^{-4}g/ml$  濃度のアルカリ溶液が同様に注射され、残りの二区は対照として一方を無処理のまま置かれ他方は水を前述の注射法に従い処理された。これ等三区の注射は同時に行われ、3 時間後には四区共に手早く解剖せられ消化管を除いた組織が得られ、直ちに乳鉢でよく磨碎し、体重の 10 倍量の水に懸濁された。該酵素液 10ml に 5mg/ml 酵母リボ核酸溶液の 2ml を加え、37 度に 2 時間反応させた。反応液のうち 2ml をとりウラニウム試薬の 2ml が添加され、20 分以上放置し、2,500 r.p.m. で 20 分間遠心法により分離した。この上澄液 0.5ml は既に述べられた測定法に依り燐を定量し、蚕体 1g に対するリボ核酸分解燐として  $\gamma$  数で表わした。盲検としては基質 RNA の代りに水を 2ml 使用して、本試験値より差引き第 6 表に掲げる数値を得た。

第 6 表.

	亜硝酸塩	多角体	水	無
分解燐 ( $\gamma$ )	258	258	247	242

更に同じ蚕児は 5 令 3 日目に至つて次の様な区に分けられ前回実験の条件の下に試験を行つてみた。第一区は N/6 過酸化水素を 1 頭に付き 0.03ml 宛 2 回注射し、第二区としては M/6 アセトオキシムを、第三区には N/2 ヒドロキシルアミンを、第四区に水を夫々同じ様に注射した。各試薬による影響は次の表の通りで過酸化水素及びヒドロキシルアミンが酵素作用への賦活性を持たない事を示した。

第 7 表.

	過酸化水素	アセト オキシム	ヒドロキシル アミン	水
分解燐 ( $\gamma$ )	239	252	245	245

次に純系種  $P_{21}$  が養蚕室から当教室に引継がれ 11 代を経た昭和 30 年の春に、5 令 1 日の幼虫を 5 度に 24 時間冷蔵した後室温に回復せしめてから N/2 亜硝酸加里溶液を桑の葉に湿して添食させた。此添食は蚕が発病に至らぬ程度にとどめ後普通飼育法により採卵、4 代目のものを  $P_{21}T_4$  と符号した。かように育成した蚕児の 5 令 2 日目の成虫に N/50 炭酸ソーダ、pH 8.2 M/15 磷酸緩衝液及び水を 0.02ml 宛 2 回注射した。これ等三区並びに注射を受けない区に於けるリボ核酸の分解酵素力は第 8 表に掲示する通りであつた。

第 8 表.

	炭酸青達	磷酸緩衝液	水	無
分解糖 (r)	229	219	220	219

同じく純系である P<sub>44</sub> に於ても 6 代目に上述の P<sub>21</sub> に於ける如く冷蔵、添食の処理が行われた。これを P<sub>44</sub>T<sub>1</sub> とした。その後順次代を重ねて得られた P<sub>44</sub>T<sub>3</sub> の 5 令 3 日目に多角体の 5 × 10<sup>-4</sup>g/ml 溶液、ヒドロキシルアミンの N/12 溶液並びに水の注射がそれぞれ 0.03 ml 及び 0.02 ml の 2 回に分ちて施行された。この場合 RNA に対する酵素の反応は 1.5 時間に短縮した。実験の結果は次表に示す如くここに於てもヒドロキシルアミンに依つては影響がみられなかつた。

第 9 表.

	多角体	ヒドロキシル アミン	水	無
分解糖 (r)	146	139	140	137

次にプロテアーゼに対する実験には純系種である P<sub>21</sub> が供試された。これは当教室に於て 14 代重ねたもので、此系の 5 令 4 日目に前回のリボヌクレアーゼに於ける実験に従つて注射が進められた。供試胚体は 25 頭の同体重のもので、使用した試薬は N/10 ヒドロキシルアミン溶液で他に 10<sup>-3</sup>g/ml のバイラス病毒液及び水の注射も併せて行われた。各区共に 0.06 ml を 2 回に分けて注射された。4 時間後に消化管を除き組織を集めて磨碎し 10 倍量の水を添加して酵素液とした。基質としては 20% ペプトン溶液を 1 ml 使用し之に上記酵素懸濁液を 5 ml 加え、トルオールの数滴で液面を被い 37 度に 15 時間反応せしめた。盲検としては 100 度で 7 分加熱した酵素液を同様に作用せしめ反応測定値より差引き胚体 1g に対するアミノ窒素 mg としてあらわした。酵素作用は第 10 表に見られる様にヒドロキシルアミン及び病原体の注射によつて賦活される傾向を示した。

第 10 表.

	ヒドロキシル アミン	多角体	水	無
アミノ窒素 (mg)	4.71	4.00	3.50	3.48

次に供試された家蚕は前に使用した品種の P<sub>21</sub>T<sub>4</sub> であつて、5 令 1 日目に M/15 亜硝酸加里、N/7 過酸化水素及び 10<sup>-4</sup>g/ml 多角体溶液の三区の注射がなされた。以降前回の実験に従つて反応せしめ、得られた結果は次表に掲げた通りである。

第 11 表.

	亜硝酸加里	過酸化水素	多角体	水
アミノ窒素 (mg)	6.27	6.39	5.55	4.95

又 P<sub>21</sub>T<sub>3</sub> の蚕児に対して M/7 アセトキシム並びに N/30 炭酸ソーダの注射試験が行われた。第 12 表に於ても誘発試薬の注射で或程度の活性が見られる様である。

第 12 表.

	炭酸曹達	アセト オキシム	水	無
アミノ窒素 (mg)	7.09	7.51	6.70	6.67

### 総 括

バイラスの増殖過程中に於けるリボヌクレアーゼ及びプロテアーゼの変化が家蚕に多角体病を接種せしめてから 4, 6 時間並びに 2, 3, 6 日経過後のアセトン製剤につき比較された。蛋白酵素に於ては上記何れの時期にも或程度の活性化が見られ発病に依つて最大の賦活度が示された。然しリボヌクレアーゼ作用の賦活はプロテアーゼの場合に較べ概して微弱であつた。

次にバイラス誘発の働きをなす過酸化水素、ヒドロキシルアミン、亜硝酸加里、アセトオキシム及び炭酸ソーダ等の試薬並びにバイラス溶液の注射を施行し、数時間後に於ける家蚕生体内の両酵素を測定した。生体蛋白分解酵素もこれらの注射によつて同じく増強されたが、リボ核酸分解酵素に於ては亜硝酸塩、オキシム、曹達及びバイラスの場合にのみ若干の賦活が観察された。

### 文 献

1. 中村道徳, 1950. 農化, 24: 1.
2. 吉原典子, 1956. 九大農学芸誌, 15: 473.

### Summary

Changes of the action of ribonuclease and protease in the course of polyhedrosis development were pursued using acetone preparations prepared 4 and 6 hours as well as 2, 3 and 6 days after viral infection. It was found that the proteolytic activity is elevated in all cases, and that the maximum activation occurs in the period of polyhedron formation. The elevation of ribonuclease action, however, was rather low.

The enzymatic potencies of larvae were also estimated several hours after injecting with virogenic agents, for example, hydrogen peroxide, hydroxylamine, potassium nitrite, acetoxime, sodium carbonate and polyhedral virus. It was observed that the tissue protease is activated by all these treatments. But the increase of ribonuclease activity took place only when caterpillars were injected with nitrite, oxime, carbonate and virus.