九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

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:九州大學農學部學藝雜誌. 17 (3), pp. 241-246, 1959-12. 九州大學農學部

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

ं 1

盃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粉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り ボ核酸及び デオキシリボ核酸とおもわれるので、先ずり 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: 一供試された盃は昭和 29 年 の称,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 アセトンを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 燐酸緩衝液 15 ml 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 5 ml を供しこれに基質として 2.5% Hammarsten カゼイン溶液 1 ml 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 0.1 ml 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 1 ml 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¹⁾ の定量法に従つた、酵素液はアセトン粉末 0.2gを pH 8 の硼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% 落液である。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川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 660 mμ 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 燐の量を mg で表わした。

実験の主な例を示せば歪は遺伝的に純系として育成された P4 の3 全 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続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鉄、営繭、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グに落解させた多角体の 10-5g/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、氷冷したホモヂェナイザーで磨砕し、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砕並びに濾過を 3、4 回線返し之を真空デシケーター中に假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砕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.

	作射蚤	標準器
プロチアーゼ(アミノ窒素 mg)	1.20	0.93
リボヌクレアーゼ (分 解 燐 mg)	0.80	1.07

別に熊本蚕業試験場より護渡された日 122 の蚕卵を 5 月 1 日 に孵化させ第 4 配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^{-4} 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.

	注射蚤	標準從
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 燐 mg)	1.07	1.10

次に養蚕室で純系として飼養された Pa 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日目に多角体バイラス 10⁻⁵g/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。

ŝ	3	表.
7/2		70

プロテアーゼ (アミノ窒素 mg)	注. 射 蚕 1.78	想 準 蚕 1.60
リポヌクレアーゼ (分 解 燐 mg)	0.86	0.54

上表の実験結果を見ると病原パイラス注射後2日目の欠蝕期に於けるプロテアーゼは軽 皮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 $4 \ominus 4$ 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.

	往射盔	標準盃
プロテアーゼ (アミノ窓素 mg)	1.87	1.42
リポヌクレアーゼ (分 解 燐 mg)	1.55	1.13

盃がバイラ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蛋児と区別し難いが、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。この様に節高蛋となれば一見して膿蛋と健蚕との識別が出来る。かかる裸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。此の時期に於ける突験の供試品種は前報⁹ に於て記された P_{21} る。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 濃度のバイラス病毒が 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.

	注射盃	標準盃
プロテアーゼ (アミノ空素 mg)	2.38	1.49
リポスクレアーゼ (分 解 燐 mg)	0.87	0.74

この表に示された如くパイラ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: 一機病の発生が眠る前に落しいこと、起張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パ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パ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} 「の越年界を再び寄期より3代飼育して得た P_{21} 「であつて、この5 令 1 日目に同じ休重の幼虫を 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 2×10^{-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砕し、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、 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.

	距硝酸塩	多角体	水	無
分解燐 (r)	258	258	247	242

更に同じ蚕児は5 ϕ 3 日目に至っ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ってみた。第一区は N/6 過酸化水素を 1 頭に付き 0.03 m/ 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	
分解燐 (1)	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 桑の薬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 燐酸緩衝液及び水を 0.02 mI 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。

		第一卷表。		
	炭酸曹述	燐酸緩衝液	水	無
分解燐 (r)	229	219	220	219

		第 9 表.		
	多角体	'ヒドロキシル アミン	水	無
分解辦 (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 $P_{\rm BI}$ が供試された。これは当教室に於て 14 代 重ねたもので、此盃の 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って注射が進められた。供試盃体は 25 頭の同体面のもので、使用した試薬は N/10 ヒドロキシルアミン溶液で他に $10^{-4}{\rm g}/{\rm ml}$ 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 $0.06\,{\rm ml}$ 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砕し 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 $1\,{\rm ml}$ 使用し之に、上記酵素懸濁液を $5\,{\rm ml}$ 加え、トルオールの数滴で液面を被い $37\,{\rm g}$ に 15 時間 反応せしめた。 盲検としては $100\,{\rm g}$ 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歪体 $10\,{\rm g}$ に対するアミノ窒素 $10\,{\rm g}$ に $10\,{\rm g}$

		第 10 表.		
	レドロキシル アミン	多角体	<u></u>	焦
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_2 . T_4 であつて、 $5 \oplus 1$ 日目に M/15 亜硝酸加里、 N/7 過酸化水素及び 10^{-4} 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って反応せしめ、得られた結果は次表に掲げた通りである。

		第 11 表.	_	
	運硝酸加里	過酸化水素	多角体	水
アミノ栄素 (mg)	6.27	6.39	5.55	4.95

又 $P_{21}T_8$ の盗児に対して M/7 アセトオキシム並びに N/30 炭酸ソーグの注射試験が 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

バイヲ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盃に多角体病毒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。

次にパ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、近硝酸加里、アセトオキシム及び炭酸ソーグ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.