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デオキシリボヌクレアーゼ

吉原，典子
九州大学農学部

https://doi.org/10.15017/21496

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 17 (3), pp.247-252, 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デオキシリボヌクレアーゼ

吉　原　典　子

Deoxyribonuclease and protease in virus-diseased silkworms

Fumiko Yoshihara

緒　　言

多角体バイラス蛋白の合成は蚕の幼虫体内に於ける核酸の仲介によつて進行するものと想定せられるが，前報[1] 記載の如くリボヌクレアーゼの作用力はバイラスの成長に伴い比較的低度の賦活を示したに過ぎなかつた．

しかし蚕の組織に於ては多角体結晶が多くの場合細胞核内に形成されることから，バイラス病の発生は先ず染色体乃至病毒粒子の外側をなす蛋白質が活性化された蛋白酵素によつて水解され，次に内部のデオキシリボ核酸がヌクレアーゼにより或程度分解せられた後に増殖することによつて開始されるものと推測せられる．

従つて本報では蚕体内のデオキシリボヌクレアーゼに対し病毒の接種或は誘発試薬の処理が及ぼす影響をプロテアーゼの作用と併行して観察してみた．

実　　験

実験 1：—病原体の接種は当研究室に於て操返し行われた感染実験に基き高度の発病率を示す濃度，即ち 10^{-4}g/ml の多角体バイラス溶液が使用された．白色の多角体結晶は水に不溶であるが，炭酸曹達によつてその外殻の蛋白物質が溶解され更に内部に充塡されていたバイラス粒子の個々が離れてくるため透明な溶液となる．通常 2mg の多角体粉末を N/10 炭酸ソーダ液 0.4ml と共に小型乳鉢中で磨砕し，室温に 10～20 分間放置すれば顕微鏡下にその結晶は全く見えなくなる．次に殺菌水の添加により上記の濃度になる様稀釈し遠心分離を 4，5 回反覆して混在細菌を除去したる液を 1 頭当り 0.02ml 宛注射した．

ここに用いられた蚕は長年純系として飼育された品種であつて，前の報告[1] に於て述べられた $P_{44}T_5$ の幼虫から更に 11 代を重ね $P_{44}T_{16}$ と符号されたものである．当教室に於ては普通前代の親より採卵された蚕種は一部直ちに催青するが，その大部分は冷蔵保存して其の後 7～10 日毎に室温に取出し孵化させ，1 蚕期に 4～5 回の飼育を行い，順次 a, b, c と記号している．

昨年の初秋に飼育された $P_{44}T_{16}$ の第 2 回孵化蚕即ち b は第 4 令の初日に標準区と注射区の二区に分けられ，後者には上述の方法に従い病毒の接種が施された．注射後 2 日目には各区の 20 頭が解剖され消化管を摘出して組織のみが集められた．この組織は蚕体重の約

30％に相当する．注射によつて体力の低下はみられず，然も対照蚕と同一飼養条件に置かれたので成長差は殆ど無く両区共に健全なる発育をなし，酵素実験に好適なる同一体重蚕を集めることが出来た．組織は乳鉢で磨砕，室温に30分間 pH 11 の Atkins 及び Pantin 氏緩衝液に懸濁し，プロテアーゼ測定にはこの懸濁液を使用，デオキシリボヌクレアーゼの定量には之の遠心分離並びに濾過して得られた透明な抽出液を5倍稀釈して用いた．

酵素作用の測定に対してはデオキシリボヌクレアーゼは粘度測定法を採用し，プロテアーゼは前報と同様にパンスライク法によつたが，唯反応時間を37度に於て2時間とした．

粘度測定は内容 3 ml のオストワールドのミクロ粘度計を使用し，これに基質として牛胸腺より調製された糸状デオキシリボ核酸 1.5 mg/ml 水溶液 1 ml を入れ，硫酸マグネシウムを最終濃度 10^{-3}M となる様添加して32度の恒温槽中に固定した．酵素液は別に試験管で同じ浴槽内に浸漬し，5～10分して同温度となつた後，該酵素液の 1 ml を粘度計に移し迅速に混合，直ちに流下速度を測り0分時の相対粘度を得た．続いて10分毎に反応液の流下時間を測定し，夫々の比粘度を算出，一分子反応式としての恒数 $K \times 10^5$ によつて表示した．

次で病原体注射後5日目の蚕体に就いても同様に両酵素の作用力が定量された．この日の蚕は病徴が顕著であり，体内の脂肪組織及び血液は多角体で満されていた為，これらの流出なき様に注意して解剖された．このような病蚕でも飼育室の温度及び湿度が適当に調節され，その上良好な成長度の且つ新鮮な桑葉が与えられたので発育度は対照蚕とかわることなく同頭数に於ける体重は全く同じであつて，健病蚕の比較に対する実験には好都合であつた．

第1表は病毒の接種後2日及び5日目の蚕体組織に於けるプロテアーゼ及びデオキシリボヌクレアーゼの作用を併せ掲げたものである．

第 1 表.

注射後日数：	2 日 目		5 日 目	
酵素作用：	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）
注射蚕	5.78	0.657	6.56	1.965
標準蚕	5.65	0.581	6.51	0.882

上表の実験結果を見ると酵素抽出剤として Atkins-Pantin 緩衝液を使用した場合バイラス病毒の注射後2日目に於ける蛋白酵素は対照蚕のそれに比し僅かながら賦活され，5日目の発病組織に於いて著しい活性が示された．核酸分解酵素に就ては何れの時期もあまり影響がみられない様である．

引き続き $P_{44}T_{16}$-C の家蚕についても同様の実験が繰返されたが，今回は酵素液調製に pH 8 の燐酸緩衝液を使用した．病原体注射後 2，3 及び 5 日目の病蚕に於ける両酵素作用が健蚕のそれと共に測定され得られた結果は次に示す通りである．

第 2 表.

注射後日数：	2 日 目		3 日 目		5 日 目	
酵素作用：	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）
注射蚕	1.35	0.584	1.05	0.401	2.60	1.403
標準蚕	1.76	0.543	1.37	0.390	2.20	0.601

第2表に於ても病毒接種後のプロテアーゼ作用は発病時に最大の活性を示し，又デオキシリボヌクレアーゼ作用も幾分賦活される様であるが酵素の抽出を燐酸緩衝液によつた為表中の数値は概して低い.

更に 10 日 遅れて第4回目卵化蚕の幼虫も同じく 4 令第1日目に処理された. 4～5日の潜伏期を経て体内に形成される多角体の結晶は前述の如く炭酸曹達によつてその塡充蛋白質は除かれるが，他方ベルゴルド氏等がバイラス粒子の分離に使用した食塩，炭酸ソーダの稀薄混合液によつても溶解される.[2] この事から酵素の抽出には 0.08M 食塩と 0.01M の炭酸曹達の混液を使用し，反応は pH 10.5 の硼砂，苛性ソーダ混合緩衝液中で行わしめた.

特にこの実験は膿病の典型的な症状である節高があらわれる前即ち注射後 4 日目に施行されたので，バイラス多角体が脂肪並びに血球細胞内にも増殖し，しかもそれらが体液に流出しない時の罹病組織が得られた.

一般に該病状の発現が急速であるために，上記の如き病蚕を得ることは困難である. 多くの場合症状が進行し過ぎて皮膚が破れ，血液は流出し体長が萎縮して，健康蚕との酵素比較には不適当になり勝ちである.

第 3 表.

注射後日数：	2 日 目		4 日 目		5 日 目	
酵素作用：	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）	ヌクレアーゼ（反応恒数）	プロテアーゼ（アミノ窒素 mg）
注射蚕	6.87	0.487	9.46	1.097	7.49	1.326
標準蚕	7.16	0.487	5.62	0.416	6.19	0.546

前掲の第 1, 2 表に見られる様に本実験に於いてもバイラスの注射後 2 日目の欠蝕期に於ける組織プロテアーゼ及びデソキシリボヌクレアーゼは共に対照蚕体のそれと大差ないが発病前日の 4 日目に於ける両酵素の作用力は相当に増強される様である.

実験 2：一蚕の多角体病はヒドロキシルアミン，亜硝酸塩及び過酸化水素等によつて誘発される. 病原バイラスの増殖には両種の核酸が基本的役割を演じていると思われるので前報[1] に於ては先ず上記試薬注射後のリボヌクレアーゼの変化を追及したがプロテアーゼに於ける如き高度の賦活性はみられなかつた. 本実験に於ては同様にこれら誘起薬物処理後に起る細胞内のデオキシリボ核酸酵素の変動を観測してみた.

初めの実験に供されたのは純系種 P_{44} の7代目，5令1日目の蚕で，早朝時の給桑後約1時間を経て，各試薬が注射された．即ちヒドロキシルアミン並びに過酸化水素の夫々発病効果の高い濃度である M/20 及び M/5 を適用し，更に多角体結晶の溶剤であり同時にバイラス誘発剤である炭酸ソーダの M/100, M/50, M/30 溶液を各区に分ち注射した．他に比較のため常法に従い M/100 炭酸ソーダに溶解せしめた 10^{-4}g/ml 及び 10^{-3}g/ml のバイラス溶液の注射も同時に行われた．対照区としては水を注射したるものと注射しない無処理のものを併置した．これらすべての溶液は 0.04ml を2回に分けて硝子毛細管針により夫々の蚕区に注射され，その後は桑を与えず通常2時間半静置して体力の恢復をはかつたのちに解剖した．消化管を除いた組織は冷水で良く洗滌され過剰の水分は濾紙で吸収られた．かくして得られた組織は各区殆ど同じ重さであつて，是等は直ちに乳鉢で海砂を以つて細かく磨砕され，組織重に対し5倍量の pH 7.5 M/30 燐酸緩衝液が加えられた．31°C に 40 分放置後 3,000 r.p.m. で 15 分遠心分離し上澄液を酵素液とした．酵素作用の測定は前実験に於ける通りであるが，オストワールドの粘度計は容量が 5ml のマクロ型を使用し，酵素液を 2ml に増量した．緩衝液は酵素液調製時と同じものを 2ml 用い，マグネシウムを添加して，基質の脾臓核酸 3mg/ml に反応せしめた．酵素の作用力は次表の如く比粘度恒数 $K\times10^3$ で表わされた．

第 4 表.

注　射　液	$K\times10^3$
M/20 NH_2OH	1,739
M/5 H_2O_2	1,860
M/100 Na_2CO_3	1,928
M/50 〃	1,829
M/30 〃	1,809
10^{-3}g/ml Virus	1,428
10^{-4}g/ml 〃	1,427
H_2O	1,356
無	1,536

第 5 表.

注　射　液	$K\times10^3$
M/20 NH_2OH	1,963
M/3 H_2O_2	2,083
H_2O	1,785
無	1,750

その成績は左表に掲げられる様に蚕体組織のデオキシリボヌクレアーゼはヒドロキシルアミン及び過酸化水素の注射によつて賦活され，又炭酸曹達によつても強められるが，その濃度は M/30 並びに M/50 に於けるよりはより低い濃度の M/100 溶液によつて高い数値が得られた．多角体バイラス注射の影響は病毒の各濃度に於て差が見られないが，水注射区に比し幾度の賦活を示した．

次に同じ時期に飼育された純系品種の P_{21} 12代の5令起蚕に対し上述と同様な実験が繰返された．注射に使用された薬品は過酸化水素，ヒドロキシルアミンであり，前法によつて各試薬の注射を行い続いて蚕体の解剖並びに酵素の抽出が実施されたが，ヒドロキシルアミンの濃度は前回同様 M/20 を，過酸化水素に於ては濃度を少し高くして M/3 を使用した．之と併行して上記同様の対照区が設置された．得られた結果は上表の通りで第4表に見られる如くこの両試薬によつても或程度の活性化が見られた．

同種の蚕を使用し M10/, M/15, M/30 及び M/200 の各濃度の炭酸曹達が注射され，別に亜硝酸加里の M/20 液並びにアセトオキシムの M/10 溶液の注射処理も行われた．

この場合組織内の核酸分解酵素は各試薬によつて活性化される様であるが M/10 並びに M/15 の濃度の高い炭酸ソーダ溶液によつては阻害された．事実かような高濃度の炭酸曹達を注射すれば蚕体は衰弱して約一昼夜後斃死する．

多角体病毒は P_{21} の家蚕に対しても注射されたが，接種後 2，3 時間後に於ける組織の核酸酵素作用は P_{44} 蚕児の場合と同様軽度の賦活性がみられる様である．

試薬並びに病毒の注射後に於ける蚕体組織のプロテアーゼ作用に就ては前報のリボヌクレアーゼ測定の際に併せて観察されたので，その傾向は推察し得られるが，更に上述のデオキシリボヌクレアーゼの実験に供試された同時期の同種幼虫についても測定せられたので其一例を挙げることとする．

蛋白分解酵素の測定は P_{44} 家蚕の第 5 令 2 日乃至 3 日目に行われ各区 20 頭宛に対する各試薬の注射後 4 時間経過してから解剖され組織が集められた．各々の組織は磨砕と同時に 5 倍量の pH 9 硼砂—硼酸緩衝液で浸出され酵素抽出液の 5 ml を 2.5% カゼイン溶液 1 ml に添加し次にトルオールを覆うて 37°C，15 時間反応せしめた．次いで作用液は遠心分離されその上澄 2 ml に対し氷醋酸 0.1 ml を加え反応停止と共に蛋白質は除かれ透明な液が得られた．この液の 1 ml のアミノ窒素はバンスライク装置により測定された．盲検としては同酵素液を 100°C に 7 分加熱して作用させ，反応測定値より差引き組織 1 g 当りの生成アミノ窒素量を算出して第 8 表に掲げた．ここに示された試薬は M/20 ヒドロキシルアミン，M/5 過酸化水素，M/10 アセトオキシム，N/20 亜硝酸加里並びに N/20 炭酸曹達及び 5×10^{-4} g/ml 多角体溶液である．

第 6 表.

注射液	$K \times 10^3$
M/10 Na_2CO_3	1,420
M/15 〃	1,468
M/30 〃	1,860
M/200 〃	2,195
M/20 KNO_2	2,459
M/10$(CH_3)_2C=NOH$	2,366
H_2O	1,878
無	1,903

第 7 表.

注射液	$K \times 10^3$
5×10^{-4}g/ml Virus	2.24
H_2O	1.75
無	1.82

第 8 表.

注射液	アミノ窒素 mg
M/20 NH_2OH	2.38
M/5 H_2O_2	1.29
M/10$(CH_3)_2C=NOH$	1.66
N/20 KNO_2	1.92
N/20 Na_2CO_3	1.67
5×10^{-4}g/ml Virus	2.42
10^{-4}g/ml 〃	2.18
H_2O	1.26
無	1.40

各種誘起試薬並びにバイラス病毒の注射は蚕児の組織内プロテアーゼを上表の如く対照区の水注射に比して何れの場合も賦活する様である．

総　　括

家蚕幼虫に多角体バイラスを接種し病勢の進行に伴うプロテアーゼ及びデオキシリボヌクレアーゼ作用を追及した．蛋白酵素は接種後 2～3 日目に於て軽度の活性が見られ，4

～5日目には高度の賦活を示したが，核酸分解酵素に於ては発病の後半期に幾分強くなる様である．

更にバイラス誘発処理及び病毒接種を行い数時間後に於ける両酵素を測定した．デオキシリボ核酸酵素はヒドロキシルアミン，過酸化水素，亜硝酸加里，アセトオキシム及び炭酸ソーダの各誘発薬剤並びに多角体バイラス溶液の注射によつて或程度活性化され，又プロテアーゼもかかる処理によつて同様に増強された．

文　　献

1. 吉原典子，1959．九大農学芸誌，17 (3)：241.
2. Bergold, G. H. and Wellington, E. F., 1954. J. Bact., 67: 210.

Summary

Variations of deoxyribonuclease and protease activities were investigated at varying intervals after infecting virus. It was demonstrated that the activation of protease is relatively small within 2 or 3 days after infection and becomes much higher in 4 or 5 days. Deoxyribonuclease, however, is activated only in the latter half of virosis development.

The action of these enzymes in worms was further measured a few hours after treating with inducers and virus. It was established that the activity of protease as well as deoxyribonuclease is augmented by the injection of hydroxylamine, hydrogen peroxide, potassium nitrite, acetoxime, sodium carbonate and polyhedra.