家蚕多角体蛋白部のプロテアーゼ

吉原, 典子
九州大学農学部

https://doi.org/10.15017/21528

出版情報：九州大學農學部學藝雑誌. 18 (2), pp.139-146, 1960-12. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

家蚕多角体蛋白部のプロテアーゼ*

吉　原　典　子

On the protease in the polyhedral protein of silkworms

Fumiko Yoshihara

従来バイラスは酵素を含まないものと信ぜられていたが，著者は家蚕組織のプロテアーゼに関する研究結果に基づいて多角体中に本酵素の存在を推定し，その蛋白区劃中にこの作用を確認したので，これに関して報告する．

実　　験

1. 多角体蛋白質の調製

多角体の結晶は糙病蚕から前報[1]に準じて低温において集められた．通常1回の注射が約 1000 頭の蚕児に対して行なわれ発病蚕は冷蔵庫に保存，数回分を併せて病原バイラスの分離に供された．病蚕 1000 頭より得られる多角体結晶は約 1 g であつて，この結晶粉末は水に不溶であるため，本実験に於ては 0.01M 炭酸曹達，0.08M 塩化ナトリウムの混合液を使用した．一例を示せば多角体 1g を乳鉢で磨砕し前記溶媒 140 m*l* を徐々に注加し，室温に1時間放置すれば溶解するが，バイラス粒子との分離を容易にするため一晩冷蔵放置した．僅かに混在する細菌及び細胞片を除くため 5.000 r.p.m. で 15 分間遠心し，その沈澱は再び炭酸ソーダ，塩化ナトリウム混液の 60 m*l* で洗滌され遠心して得られた上澄液は前回の分と併せ，10.000 r.p.m. で 80 分遠心することによりバイラス粒子を沈澱部に集めた．上清の多角体蛋白溶液は 0.7 飽和の硫酸アンモニウムで塩析し，生じた沈澱蛋白は5度の低温室に於て冷流水をもつて透析，次いで凍結乾燥した．かようにして得られた多角体蛋白は 400～500 mg であつた．

2. 測　定　法

先ず酵素液は上記の多角体蛋白粉末の 1～2 mg を N/50 炭酸ソーダ溶液 1 m*l* に懸濁し硝子ホモヂナイザーでよく磨砕溶解して調製した．基質としては2%カゼイン溶液 1 m*l* を使用し，これに緩衝液 1 m*l* 加え，前記酵素液と合わせ全量を 3 m*l* とし，37 度に於て3時間反応せしめた．作用後蛋白沈澱剤として反応液が酸性のものに対しては 0.4 M トリクロール酢酸を，塩基性の場合は 0.125 M トリクロール酢酸，0.25 M 酢酸ソーダ及び 0.375 M 酢酸を含む混液の 2 m*l* を添加，20分後硬質濾紙を用いて濾過しその濾液 1 m*l* につき Folin 試薬で Anson 法により比色定量した．作用力は加熱酵素を以つて同じ条件下に反応させた数値を差引き 10 mg の多角体蛋白中のプロテアーゼにより1時間

* バイラス病体のプロテアーゼに関する研究，第 13 報．

に生じたチロシン量を mg で表わした.

3. 硫 安 分 劃

P_{21} 4 令のバイラス蚕から集めた多角体より上記の如く調製された蛋白粉末の 50 mg は 0.01 M 炭酸ソーダ及び 0.08 M 塩化ナトリウム 20 m*l* に溶解し，硫安により 0.05，0.1，0.3，0.5 及び 0.7 飽和に沈澱する夫々の蛋白区分に分けた．各々の蛋白沈澱は水 2.5m*l* に懸濁し，4.5 度の部屋で氷冷水に対してネスラー氏反応の陰性となるまで透析した．酵素純度は蛋白窒素量当りの活性度を以つて表わし，窒素測定はミクロケルダール法によつたが，蛋白窒素 1 mg に対する pH 10.5 における各区のチロシン生成量は次表に示す通りで収量比と照合すれば 0～0.05 飽和区が最も多く，0.5～0.7 飽和間の蛋白には酵素作用が殆んどみられなかつた.

第　1　表.

飽　和　度	0～0.05	0.05～0.1	0.1～0.3	0.3～0.5	0.5～0.7
チ ロ シ ン mg	1.46	0.35	0.27	0.11	0
収　量　比	72	22	5	1	0

別に健康な家蚕幼虫から消化管を除いた組織だけの凍結乾燥微粉末を作製し，これより酵素の分劃を試みた．例えば組織乾物 8 g を N/10 炭酸ソーダで抽出したが，粘稠なため水 100 m*l* を追加し，20 度に 1 時間放置後，塩酸をもつて pH 7.5 に調整し，5.000 r.p.m. 15 分遠心分離した．上澄後は水で倍量となし，0.7 飽和となる様に微細の硫安粉末を攪拌しながら添加した．蛋白沈澱は前述のように透析，凍結乾燥され約 3 g の組織蛋白を得た.

この乾物 0.5 g に 0.01 M 炭酸ソーダと 0.08 M 食塩の混合液 40 m*l* を加えよく磨砕したが，多角体蛋白に於けるように均一な溶液にならぬため，N/10 炭酸ソーダを追加して溶解せしめ次いで pH 8 に調整するため塩酸を使用した．これを 3.000 r.p.m. で遠心分離し，得られた上澄液 50 m*l* に対し硫安分劃を行なつた．即ち 0～0.2，0.2～0.5 及び 0.5～0.7 飽和の三区に分ち，上法に従つて蛋白窒素当りの酸素力を比較した.

第　2　表.

飽　和　度	0～0.2	0.2～0.5	0.5～0.7
チ ロ シ ン mg	0.19	0.31	0.08
収　量　比	20	78	2

上表にみられるように 0.2～0.5 飽和に最高活性蛋白酵素を有し，酵素収量も最大であつた．なお他に蚕体組織のアセトン製剤からも同様な分劃試験が行なわれたが第 3 表に掲げるように第 2 表と同じく 0.2～0.5 飽和区に活性酵素が得られた.

第　3　表.

飽　和　度	0～0.2	0.2～0.5	0.5～0.7
チ ロ シ ン mg	0.04	0.12	0.02
収　量　比	59	36	5

4. 水素イオン濃度の影響

この実験に供した多角体蛋白は熟蚕の病体から調製したものである．上掲分劃実験に於て活性酵素が低濃度の硫安塩析物中に存在することが明らかになつたが，収量が少ないため以下の実験に対しては調製法の項に記載したように 0.7 飽和沈澱の蛋白を酵素剤とし前記定量法に依り最適 pH を求めた．

既報に於て罹病蚕及び健蚕の蛋白酵素がむしろアルカリ側に活性を有することを見出し，[2] 又多角体が相当高濃度のアルカリ液中でもその感染能を失わないことを認めたが，本試験に於ても予期したように多角体蛋白部のプロテアーゼは pH 10.5 附近に於て最も強く作用することが観察された．得られた成績を第 4，5，6，7 及び 8 表に掲げるが，使用した緩衝液は M/5 酢酸，酢酸ソーダ混液，Sörensen の M/10 燐酸緩衝液，Atkins 及び Pantin の M/5 硼酸，塩化カリ，炭酸ソーダ混合液，M/20 硼砂及び N/10 苛性ソーダの混液，M/4 グリシン，苛性ソーダ混合液である．

第 4 表．　酢酸・酢酸ソーダ緩衝液．

pH	4.5	4.8	5.2	5.7	6.1	6.6	7.0
チロシン mg	0.03	0.04	0.06	0.11	0.15	0.21	0.28

第 5 表．　燐酸カリ・燐酸ソーダ緩衝液．

pH	6.5	6.8	7.2	7.6	7.9	8.0	8.4
チロシン mg	0.16	0.19	0.22	0.30	0.33	0.35	0.39

第 6 表．　硼酸・塩化カリ・炭酸ソーダ緩衝液．

pH	8.5	8.7	9.0	9.3	9.7	10.0	10.3	10.6	10.9	11.0	11.3
チロシン mg	0.47	0.57	0.64	0.69	0.77	0.91	0.98	0.98	0.89	0.86	0.79

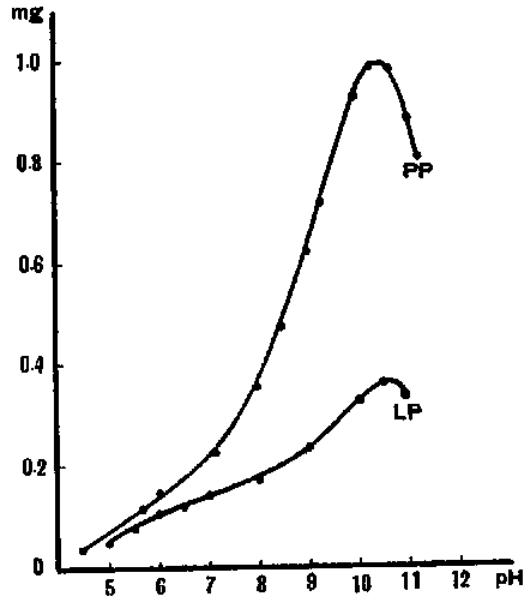
第 7 表．　硼砂・苛性ソーダ緩衝液．

pH	10.3	10.6	11.0	11.7
チロシン mg	0.22	0.26	0.27	0.22

第 8 表．　グリシン・苛性ソーダ緩衝液．

pH	10.7	11.0	11.5	12.6	12.9
チロシン mg	0.33	0.33	0.30	0.22	—

蚕体組織の 0.2～0.7 飽和硫安分劃部についても同時に比較され，第 1 図にみられる様に多角体蛋白と殆んど同じ傾向を示したが，アルカリ側の活性上昇度は多角体蛋白のそれに比し弱い様である．本図に於て LP は健蚕組織のプロテアーゼ作用，PP は多角体蛋白部のそれを示す．



第 1 図.

5. 温 度 の 影 響

次に多角体蛋白のプロテアーゼに対する加熱の影響を検した. P_{21} 病蚕の多角体結晶より酵素液を調製し, 下表の温度に 10 分間保持した後最適 pH 10.5 に於て前述に従い作用を測定した.

第 9 表.

温 度 °C	37	40	50	60	70	80, 90, 100
チロシン mg	0.91	0.81	0.77	0.23	0.03	0

第9表の数値から明かなように本酵素は熱に対し不安定であつて, 70 °C で殆んど失活した.

6. 酵素濃度と加水分解との関係

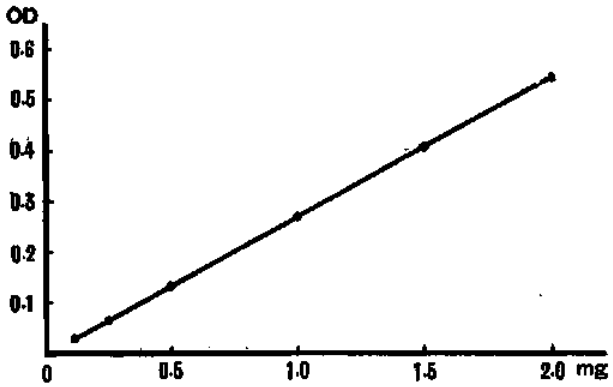
多角体蛋白部分のプロテアーゼは蛋白以外の不純物を殆ど含まないものであるが, 第2図に図示した如くその最適 pH に於て酵素量と基質分解度とは比例する.

7. 反応時間と加水分解との関係

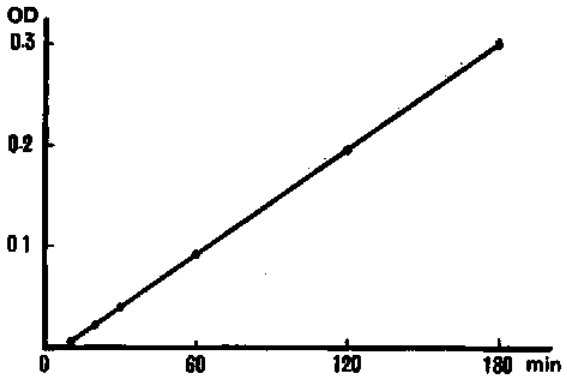
更に又, 第3図から明瞭なようにこの多角体蛋白部のプロテアーゼに於ては反応時間と加水分解度とがきれいな正比例的な直線を与える.

8. 各種賦活, 阻害剤

一般試薬として第10表に掲げるような薬品を使用した. 添加量は終末濃度で表わし, 酵



第 2 図.



第 3 図.

素活性は前記に従い測定したが，試薬は加熱酵素にも同量加えられ夫々盲検を置き反応値から差引いた．多角体蛋白のアルカリ性プロテアーゼに対しては硫酸銅，p-Chloromercuribenzoic arid (PCMB), Flavin adenine dinucleotide (FAD)，クロランフェニコールパルミテート及びクロランフェニコールが阻害的に働き，薄い濃度の硫酸銅，尿素，チオ尿素，塩酸システイン及びアスコルビン酸が相当の賦活性を示した．なお尿酸，テオフィリン，修酸カルシウム，塩化カルシウム，硫酸マグネシウム，ナトリウムアザイド，過酸化水素，Ethylendiamine tetraacetic acid (EDTA)，モノヨード酢酸，シアン化カリ，Adenosine triphosphate (ATP)，8-アザキサンチン等の酵素作用に対する影響は殆んどみられなかつた．又同時に幼虫組織蛋白製剤に対する各種賦活及び阻害剤の影響を試みたが略同じような結果が得られた．

第 10 表.

試薬	濃度	活性及び阻害度 多角体蛋白	家蚕組織蛋白	試薬	濃度	活性及び阻害度 多角体蛋白	家蚕組織蛋白
無添加	—	100	100	テオフィリン	10^{-3}M	98	107
硫酸銅	5×10^{-3}M	4	4	〃	10^{-4}M	91	98
〃	2×10^{-3}M	48	—	燐酸カルシウム	10^{-3}M	89	90
〃	10^{-3}M	116	177	〃	10^{-4}M	92	90
〃	5×10^{-4}M	125	—	塩化カルシウム	5×10^{-3}M	103	95
チオ尿素	10^{-2}M	149	130	〃	10^{-3}M	102	94
〃	10^{-3}M	97	105	硫酸マグネシウム	10^{-2}M	101	102
〃	10^{-4}M	97	100	〃	10^{-3}M	106	94
尿素	10^{-3}M	124	112	ナトリウムアザイド	10^{-2}M	119	106
〃	10^{-4}M	136	91	〃	10^{-3}M	111	89
塩酸システィン	10^{-2}M	164	—	過酸化水素	10^{-2}M	103	96
〃	10^{-3}M	98	—	〃	5×10^{-2}M	106	—
L- アスコルビン酸	10^{-3}M	132	—	〃	10^{-3}M	111	107
〃	10^{-4}M	107	—	EDTA	10^{-2}M	102	105
クロランフェニコール パルミテート	3.3 mg/ml	60	54	〃	10^{-3}M	99	95
クロランフェニコール	3.3 mg/ml	88	80	モノヨード酢酸	10^{-2}M	110	110
FAD	0.017 mg/ml	65	—	〃	10^{-3}M	97	117
〃	0.17 mg/ml	45	52	シアン化カリ	10^{-2}M	118	101
PCMB	2×10^{-3}M	69	—	〃	10^{-3}M	116	100
〃	10^{-3}M	65	—	ATP	0.33 mg/ml	92	100
尿酸	10^{-4}M	100	96	〃	1.33 mg/ml	92	100
〃	10^{-5}M	105	95	8-アザキサンチン	10^{-3}M	104	106

次にこれら蛋白酵素に対する制癌及び抗腫瘍剤或はバイラス性疾患の治療剤として使用されている医薬品の影響を第 11 表にまとめてみた．阻害的に働くものに，8-アザグアニン，ナイトロヂェンマスタード，オーレオマイシンがあり，その他の医薬ではあまり影響がみられなかつた．

第 11 表.

試薬	濃度	活性及び阻害度 多角体蛋白	家蚕組織蛋白	試薬	濃度	活性及び阻害度 多角体蛋白	家蚕組織蛋白
無添加	—	100	100	ナイトロヂェンマスタード	1.1 mg/ml	67	100
8-アザグアニン	4 mg/ml	42	—	〃	2.2 mg/ml	77	77
〃	3.3 mg/ml	54	65	マイトマイシン	0.01 mg/ml	98	103
〃	2 mg/ml	68	80	6-メルカプトフィリン	10^{-2}M	103	81
〃	1.5 mg/ml	94	87	〃	10^{-3}M	105	96
ナイトロミン	10^{-2}M	129	170	オーレオマイシン	0.2%	65	—
〃	7.5×10^{-3}M	114	105	〃	0.1%	87	69
カルチノフィリン	5γ	109	104	〃	0.01%	111	87

麹菌及び枯草菌のプロテアーゼ活性を強く阻害する松島氏の馬鈴薯 inhibitor を調製し，

多角体蛋白酵素への影響を追及してみた．塩酸，食塩で抽出後アセトン粉末とした馬鈴薯 inhibitor[3] は反応全液 3 ml に対し表示の各量を添加した．第 12 表における最後の数値は食塩抽出によるアセトン製剤[4]で酸性抽出製剤よりも強い阻害性を示す様である．

第　12　表．

濃　　度　mg	0	5	10	20	50	4.5
比　酵　素　力	100	65	61	59	55	32

総　　括

多角体結晶中のバイラス粒子を包囲する充塡蛋白のプロテアーゼは硫安により 0.1 程度の低飽和部にその大部分が分劃され，家蚕幼虫組織の蛋白酵素は 0.2～0.5 飽和の区分に最も多く沈澱した．

これらの酵素は共に至適 pH が 10.5 で，その活性は特に多角体蛋白に於て強く，中性側に比し数倍の活度を示したが，高温に対しては不安定であり，60 °C 10 分加熱で約 75% が失活し，70 °C では殆んどその全作用を失つた．

この酵素は高濃度の硫酸銅，クロランフェニコールパルミテート，クロランフエニコール，PCMB 及び FAD 等の試薬によつて阻害され，低濃度の硫酸銅，尿素，チオ尿素，塩酸システイン及びアスコルビン酸によつて賦活せられた．その他尿酸，テオフィリン，蓚酸カルシウム，塩化カルシウム，硫酸マグネシウム，ナトリウムアザイド，過酸化水素，EDTA，モノヨード酢酸，シアン化カリ，ATP，8-アザキサンチン等は酵素作用に殆んど影響しなかつた．制癌又は抗腫瘍剤及びバイラス疾患の治療薬中，8-アザグアニン，ナイトロヂェンマスタード及びオーレオマイシンによる酵素阻害が認められたが，ナイトロミン，マイトマイシン，カルチノフィリン，6-メルカプトフィリンによつてはあまり影響されなかつた．なお馬鈴薯阻害剤によりアルカリプロアアーゼ特有の作用低下が観察された．

文　　献

1) 山藤一雄・平山勝英・吉原典子，1958. Enzymol., 19 : 53.
2) 吉原典子，1950. 農化，23 : 252.
3) 松島欽一，1957. 農化，31 : 38.
4) 松島欽一，1955. 農化，29 : 883.

Summary

Protease in polyhedral protein is precipitated with 0.1 saturation of ammonum sulphate but that in silkworm tissue with 0.2—0.5 saturation.

The both proteolytic enzymes display the highest activity at pH 10.5 ; they are destroyed by heating at 70 °C for 10 minutes.

The protease of polyhedral protein is inhibited by copper sulphate of high

normality, chloramphenicol palmitate, chloramphenicol, p-chloromercuribenzoic acid, flavin adenine dinucleotide, 8-azaguanine, nitrogen mustard, aureomycin or potato inhibitor, and activated by copper sulphate of low concentration, urea, thiourea, cysteine or ascorbic acid. The proteolytic action, however, is not influenced by theophylline, uric acid, calcium oxalate, calcium chloride, magnesium sulphate, sodium azide, hydrogen peroxide, ethylendiamine tetraacetic acid, monoiodoacetic acid, potassium cyanide, adenosine triphosphate, 8-azaxanthine, nitromin, mitomycin, carzinophilin and 6-mercaptophyrin.