核多角体病および細胞質多角体病ウイルスに 感染したカイコ幼虫の体液蛋白質合成¹

渡 部 仁・小 原 隆 三

東京大学農学部・鳥取大学農学部

(1970 年 12 月 19 日受領)

Synthesis of Hemolymph Proteins in the Silkworm, *Bombyx mori* L., Infected with a Nuclear- and a Cytoplasmic-Polyhedrosis Virus. Hitoshi WATANABE (Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo, 113) and Ryuzo KOBARA (Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori, 680) *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **15**: 198—202 (1971)

Effects of virus infections on the synthesis activity of hemolymph proteins in the silkworm, *Bombyx mori* L., were studied by means of agarose-gel electrophoresis and autoradiography of the electrophoretic pattern with ¹⁴C-amino acids. In the nuclear-polyhedrosis larva, hypoproteinemia was detected by electrophoresis after the mid-stage of infection and incorporation of ¹⁴C-amino acids into hemolymph proteins was markedly on the decrease, indicating that an inhibited synthesis of hemolymph proteins was induced by the virus infection. On the other hand, the electrophoretic pattern and the concentration of the hemolymph proteins from the cytoplasmicpolyhedrosis larva, even in the late stages of infection, were similar to those from the uninfected larva. Autoradiographs of the electrophoretic pattern with radioactive amino acids also indicated that the synthesis activity of hemolymph proteins of the diseased was comparable to that of the uninfected larva.

昆虫の病態生理学に関する研究、すなわち昆虫の罹病に伴う種々の異常生理に関する研究は数多く行なわれている (MARTIGNONI, 1964)。これらのうちウイルスの感染に伴う昆虫の病態生理に関しては、ウイルスが核酸と蛋白質より成り、それが宿主細胞を利用して合成されるということもあって、主に感染に伴う宿主昆虫の核酸あるいは蛋白質の変化に焦点がおかれてきた (BERGOLD and FRIEDRICH-FREXSA, 1947; 稲神, 1954; 鮎沢, 1955; 重松・竹下, 1958; MARTIGNONI and MILSTEAD, 1964, 1966; KAWASE and HAYASHI, 1965)。

さきに著者ら (小原・渡部, 1969) は正常なカイコ幼虫の体液蛋白質合成について明らかにしたが、核多角体病および細胞質多角体病ウイルスに感染した場合、宿主の体液蛋白質の合成能力は少なからず影響を受けると予想されたので、この点に関する 2 種ウイルス病の病態生理の差異を比較した。脂肪組織は体液蛋白質の合成機能を営むが (SHIGEMATSU, 1958)、核多角体病ウイルスの主要感染組織の一つであり、一方中腸は養分の消化吸収

という生理機能をもつが、細胞質多角体病ウイルスの唯一の標的組織である。したがってこの研究では、2 種ウイルスがそれぞれの標的組織に感染して組織本来の生理を侵す場合に、宿主昆虫における体液蛋白質の合成が二次的にどのような影響を受けるかということに焦点を置いて行なわれた。本報はこれらの結果の概要を記述したものである。

材料および方法

供試したカイコの系統は鐘和×錦秋および神白で、5 令起蚕期に雌雄に分け、それぞれ核多角体病ウイルス (以下 NPV と略記) 浮遊液を 1 個体当たり 0.5 μ l 注射し、あるいは細胞質多角体病ウイルス (以下 CPV と略記) 浮遊液を桑葉に添加して経口的に投与し、両種ウイルスに感染させた。これらのウイルス量は 100% の感染を起こさせるのに充分な量であった。NPV 浮遊液は感染蚕体液の遠沈上清 (3,000 rpm, 10 分) として得られたものであり、CPV 浮遊液は精製した細胞質多角体

1 本研究の一部は昭和 44 年度文部省科学研究費によった。

の浮遊液（濃度： 10^8 多角体数/ml）である。

感染の中期以後適時感染蚕および対照の正常蚕に放射性アミノ酸として ^{14}C チロシン（比放射能 475 Ci/mM , 2% アルコール溶液, 放射能濃度 0.05 mCi/ml), ^{14}C グリシン（比放射能 108 Ci/mM , 水溶液, 放射能濃度 0.06 mCi/ml), ^{14}C ロイシン（比放射能 311 Ci/mM , 2% アルコール溶液, 放射能濃度 0.06 mCi/ml), あるいは ^{14}C メチオニン（比放射能 56.8 Ci/mM , 0.01 N HCl 溶液, 放射能濃度 0.1 mCi/ml ）をそれぞれ 1 個体当たり $10 \mu\text{l}$ 注射し, 4~24 時間後に採血して常法（渡部ら, 1968）によりアガロースを支持体とする電気泳動を行なった。

泳動板はアミドブラック 10B で蛋白質染色を行なって乾燥した後, X線フィルム（富士ノンスクリーン型, No. 200）と暗室中で密着させ, 2 週間の露出の後所定の現像を行なってオートラジオグラムを作成した。

実験結果

NPV に感染した幼蚕の体液蛋白質合成

第1図 ^{14}C チロシンをとり込んだ正常蚕および核多角体病蚕体液蛋白質の電気泳動像 (A, B) とオートラジオグラム (A', B')。 (5 令 4 日)。A, A': 5 時間ラベル; B, B': 20 時間ラベル; 1: 正常蚕雌; 2: 正常蚕雄; 3: 病蚕雌; 4: 病蚕雄。

正常蚕および核多角体病蚕（感染中期：5 令 4 日）に各種の ^{14}C アミノ酸を注射し, 5 時間および 20 時間経過したのち, 個体別に採血してアガロース電気泳動を行なった。蛋白質染色を行なったのち, その泳動板をもとにしてオートラジオグラムを作成した。それらの結果を第 1~4 図に示す。

第2図 ^{14}C グリシンをとり込んだ正常蚕および核多角体病蚕体液蛋白質の電気泳動像 (A, B) とオートラジオグラム (A', B')。 (5 令 4 日)。A, A': 5 時間ラベル; B, B': 20 時間ラベル; 1: 正常蚕雌; 2: 正常蚕雄; 3: 病蚕雌; 4: 病蚕雄。

一般に感染中期は感染組織でウイルスが増殖し多角体が形成され始める時期に当る。正常蚕の体液蛋白質の泳動像においては, 主泳動帯として三つの分画が分離された。すでに明らかにしたように（渡部ら, 1968）, 感染中期の体液蛋白質の泳動像も正常体液蛋白質の場合とほぼ同じであるが, 中期より末期へと感染が経過するに従って各主泳動帯は量的に減少し, 特に泳動性の低い分画から高い分画へと順次減少消失した。第 1~4 図の泳動像によると, 感染中期の体液蛋白質の泳動像は, 泳動性の低い分画がすでに消失している個体もあるが, 一般的に見ると, 正常体液蛋白質の場合と顕著な差は認められなかった。しかし, 体液蛋白質の量的な点では, 感染蚕雌における体液蛋白質の減少は感染蚕雄におけるよりも

第3図 ^{14}C ロイシンをとり込んだ正常蚕および核多角体病蚕体液蛋白質の電気泳動像 (A, B) とオートラジオグラム (A', B')。 (5令4日)。A, A': 5時間ラベル; B, B': 20 時間ラベル; 1: 正常蚕雌; 2: 正常蚕雄; 3: 病蚕雌; 4: 病蚕雄。

顕著であった。

つぎに各 ^{14}C アミノ酸の体液蛋白質へのとり込みを第1～4図に示すオートラジオグラムによって調べると、いずれの ^{14}C アミノ酸についてもいえることであるが、正常蚕の体液蛋白質については、どの分画にも既存の蛋白質量に比例したとり込みがみられた。このことは各蛋白質分画の量的差異が、それぞれの蛋白質の合成力の差に依存していることを示している。雌雄の個体で比較すると、一般に雌の蛋白質合成力は雄のそれよりも大きかった。また5時間および20時間 ^{14}C アミノ酸で蛋白質をラベルしたオートラジオグラムの間で、放射性物質のとり込み量に顕著な差異が現われていないことは、5令盛食期における正常体液蛋白質の代謝では合成～turn over のサイクルが少なくとも5時間以内で行なわれていることを示すものであろう。

一方、感染蚕における体液蛋白質への ^{14}C アミノ酸のとり込みは、雌雄いずれにおいてもきわめて少なかっ

第4図 ^{14}C メチオニンをとり込んだ正常蚕および核多角体病蚕体液蛋白質の電気泳動像 (A, B) とオートラジオグラム (A', B')。 (5令4日)。A, A': 5時間ラベル; B, B': 20 時間ラベル; 1: 正常蚕雌; 2: 正常蚕雄; 3: 病蚕雌; 4: 病蚕雄。

た。このことは、感染中期のように体液蛋白質の泳動像が正常の場合とさほど変わらない時期において、すでに感染個体の体液蛋白質の合成力が顕著に低下していることを示している。また感染蚕の体液蛋白質の電気泳動像において、原点に多量の放射能が認められたが、これは主に、試料体液に混在する血球および多角体が泳動されずに原点に残っていて、血球中に形成されたり、体液中に浮遊していた多角体の蛋白質にとり込まれた ^{14}C アミノ酸による放射能であろう。

CPV に感染した幼虫の体液蛋白質の合成

CPV に感染した個体の体液蛋白質を電気泳動にかけると、感染初期から末期にかけて、その泳動像は正常体液蛋白質の場合とパターンおよび量的な点でほとんど差異が認められなかった。ただ感染の末期で外部病徴 (体色の变化, 不活動, 食桑中止, 白色糞排泄など) が明瞭になった時期では、体液蛋白質の泳動像のパターンは正常の場合と同じであるが、各分画とも量的に一樣に減少する現象が認められた。そこで、正常蚕および細胞質多角体病蚕 (感染末期: 5令6日) に各種の ^{14}C アミノ酸

を注射し、4時間（感染6日）および24時間（感染7日）経過したのち、個体別に採血してアガロース電気泳動を行なった。蛋白質染色を行なったのち、その泳動像をもとにしてオートラジオグラムを作成した。 ^{14}C チロ

シンおよび ^{14}C メチオニンを用いた結果をそれぞれ第5および第6図に示す。

正常体液蛋白質における電気泳動像のオートラジオグラムが示すように、蚕品種によって若干異なるが、5令末期では ^{14}C チロシンがまず泳動性の低いものと中間の分画にとり込まれ、時間の経過とともに量的に増加しながら泳動性の高い分画へもとり込まれた。 ^{14}C ロイシンおよび ^{14}C グリシンのとり込みもほぼこれと同様の経過をたどった。これに対して ^{14}C メチオニンの場合は中間の泳動性を示す泳動帯に、特に雌に顕著にとり込まれる傾向があった（小原・渡部、1969）。

一方感染末期における病蚕の体液蛋白質の泳動像は正常の場合と若干量的に異なる場合もあったが、一般にオートラジオグラムの ^{14}C アミノ酸のとり込みは正常の場合と大差が見られなかった。これらの結果は、CPVに感染した場合は、NPVに感染した場合と異なって、感染末期におよんでも宿主の体液蛋白質合成能は阻害されないことを示している。

考 察

昆虫がNPVに感染した場合に、その感染の経過に伴う体液蛋白質の質的变化を追う研究が最近アガロースおよびアクリルアミドを支持体とする電気泳動法を用いて行なわれている（WATANABE, 1967; 渡部ら, 1968; VAN DER GEEST and WASSINK, 1969; YOUNG, 1970）。それらの結果から共通していることは、感染が進むに従い宿主の体液蛋白質は量的に徐々に減少して、hypoproteinemia（体液蛋白欠乏症）を示すが、電気泳動的に見ると、高分子の蛋白質と考えられる泳動性の低い分画から低分子の蛋白質と考えられる泳動性の高い分画へと順次減少して行くことである。

昆虫体液の蛋白質は脂肪組織で合成され、すみやかに体液に移行したものである（SHIGEMATSU, 1958）。一方NPVの主要感染組織の一つは脂肪組織であるから、NPVに感染した昆虫の示すhypoproteinemiaは、ウイルスの感染によって脂肪組織細胞の体液蛋白質合成の機能が阻害された結果生ずる症状に他ならないといえる。

CPVに感染した昆虫でもhypoproteinemiaが起こるか否かについては、これまで異論があった。KAWASE and HAYASHI (1965) は細胞質多角体病蚕の体液蛋白質含量は感染中期以後著しく減少すると報告している。一方、小森 (1965) は細胞質多角体病蚕の体液屈折率を測定したが、その値は病気の末期に至るも正常蚕と差異が

第5図 ^{14}C チロシンをとり込んだ正常蚕および細胞質多角体病蚕体液蛋白質の電気泳動像 (A) とオートラジオグラム (B)。(5令6日)。1~3: 正常蚕雄; 4: 病蚕雄; 5, 6: 病蚕雌, 以上 いずれも 4 時間ラベル。7~9: 正常蚕雌; 10~12: 病蚕雌; 以上 いずれも 24 時間ラベル。

第6図 ^{14}C メチオニンをとり込んだ正常蚕および細胞質多角体病蚕体液蛋白質の電気泳動像 (A) とオートラジオグラム (B)。(5令6日)。1: 正常蚕雌; 2, 3: 正常蚕雄; 4, 6: 病蚕雄; 5: 病蚕雌, 以上 いずれも 4 時間ラベル。7, 8: 正常蚕雌; 9: 正常蚕雄; 10, 12: 病蚕雌; 11: 病蚕雄, 以上 いずれも 24 時間ラベル。

なかった。また著者らの電気泳動による結果でも、細胞質多角体病蚕の体液蛋白質は、感染末期において若干量的に減少する場合もあったが、量的、質的にみて正常蚕と大差が認められなかった。

このような細胞質多角体病蚕の hypoproteinemia に関する研究結果の差異がどのような要因により生じたのか明らかでないが、一つには供試材料蚕の細胞質多角体病に対する耐性の違い、したがって病気の進行に伴い、中腸本来の消化吸收生理をどの程度全うし得るかという能力に左右されるものと考えられる。しばしば付随して見られる腸内細菌の異常増殖があったか否かによっても、養分の消化吸收生理の異常に関連して宿主の体液蛋白質量が変わってくる可能性も十分考えられる。

いずれにしても、体液蛋白質の合成に関与する脂肪組織は CPV に非感染性と考えられており、本研究のオートラジオグラムの結果からも、脂肪組織の体液蛋白質の合成機能そのものは、宿主が CPV に感染しても何ら影響されずに維持されていることが認められた。

摘 要

カイコに核多角体病ウイルス (NPV) あるいは細胞質多角体病ウイルス (CPV) を接種し、感染中期から末期における体液蛋白質の変化をアガロースを支持体とする電気泳動法によって調べ、また各種 ^{14}C アミノ酸の体液蛋白質へのとり込み量から、その合成機能の変化を調査した。

その結果、核多角体病蚕については、感染中期以降体液蛋白質の電気泳動像に変化が現われ、泳動性の低い蛋白質分画から高い蛋白質分画の順に減少消失して行った。各種 ^{14}C アミノ酸の各蛋白質分画へのとり込みは、感染中期において、すでに抑圧されていたので、脂肪組織本来の体液蛋白質合成機能は NPV の感染により顕著に阻害されていると考えられた。

また、細胞質多角体病蚕については、CPV の感染末期になって体液蛋白質の電気泳動像に若干の変化が現われ、各蛋白質分画は量的に減少した。しかしながら、各種 ^{14}C アミノ酸の各蛋白質分画へのとり込みは、正常蚕のそれと大差なく、脂肪組織の体液蛋白質合成機能そのものは、CPV 感染末期においても正常に維持されていると考えられた。

引 用 文 献

- 鮎沢啓夫 (1955) カイコ血液蛋白の 滲紙電気泳動. 日蚕雑 24 : 393~397.
- BERGOLD, G. and H. FRIEDRICH-FREKSA (1947) Zur Grösse und Serologie des *Bombyx-mori*-Polyedervirus. Z. Naturforsch. 2 b : 410~414.
- 稲神 馨 (1954) 家蚕体液の蛋白質に関する研究 (III) 蛋白質の電気泳動像について. 日蚕雑 23 : 304~307.
- KAWASE, S. and Y. HAYASHI (1965) Nucleic-acid and protein changes in blood and midgut of the silkworm, *Bombyx mori* (LINNAEUS), during the course of cytoplasmic polyhedrosis. J. Invertebr. Pathol. 7 : 49~54.
- 小原隆三・渡部 仁 (1969) カイコ体液蛋白質のアガロース電気泳動. 日蚕雑 38 : 386~394.
- 小森三郎 (1965) ウイルス性軟化病または細胞質多角体病に感染した蚕児の体液屈折率. 日蚕雑 34 : 366~368.
- MARTIGNONI, M. E. (1964) Pathophysiology in the insect. Ann. Rev. Entomol. 9 : 179~206.
- MARTIGNONI, M. E. and J. E. MILSTEAD (1964) Hypoproteinemia in a Noctuid larva during the course of nucleopolyhedrosis. J. Insect Pathol. 6 : 517~531.
- MARTIGNONI, M. E. and J. E. MILSTEAD (1966) Hypoproteinemia in a Noctuid larva during the course of granulosis. J. Invertebr. Pathol. 8 : 261~263.
- 重松 孟・竹下弘夫 (1958) 膿病罹病経過に伴う家蚕脂肪組織の核酸及び蛋白質の量的変化. 日蚕雑 27 : 66~70.
- SHIGEMATSU, H. (1958) Synthesis of blood protein by the fat body in the silkworm, *Bombyx mori* L. Nature 182 : 880~882.
- VAN DER GEEST, L. P. S. and H. J. M. WASSINK (1969) Hemolymph proteins of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, after infection with a nucleopolyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 14 : 419~420.
- WATANABE, H. (1967) Electrophoretic separation of the hemolymph proteins in the fall webworm, *Hyphantria cunea*, infected with a nuclear-polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 9 : 570~571.
- 渡部 仁・小原隆三・保坂政子 (1968) 核多角体病ウイルスに感染した家蚕体液蛋白の電気泳動. 日蚕雑 37 : 319~322.
- YOUNG, S. Y., III and H. A. SCOTT (1970) Immuno-electrophoresis of hemolymph of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. J. Invertebr. Pathol. 16 : 57~62.