バイラス病體のプロテアーゼに関する研究

(第 1 報) 家蠶膿病體のプロテアーゼ作用に及ぼす水素

イオン濃度及び加温の影響

吉 原 典 子 (九州大學農學部農藝化學教室)

昭和 23 年 10 月 9 日受理

Studies on the Proteases in the Virus-diseased Tissues.

Part I. The Influence of Hydrogen-ion Concentration and Temperature
on the Proteolytic Enzymes in the Polyhedral-diseased Silkworms.

By Fumiko YOSHIHARA

(Agr. Chem. Laborat., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan)

緒言 バイラスの繁殖は一般微生物が細胞の分割によつて増殖するに反し正常なる原形質蛋白が變性してバイラス性を帯びるに基くものと惟われる。この見地よりすればバイラスの新生増殖の機構を明確にするには先ずバイラス分子を含む生活細胞の物質代謝について究明する必要がある、變化の中心は蛋白分子にある事は云うまでもない。夫故に著者は茲にバイラス病體に於ける蛋白酵素の作用について實驗を始める事にした。

實驗 1: 家蠶膿病體蛋白酵素に及ぼす水素イオン濃度の影響:- 蠶は發育が早く新陳代謝が旺盛であり、多數飼育が可能なる爲平均値が得られ、且人爲的にも自然的にもバイラス病なる膿病に罹り易く、上記の實驗目的に最適なる昆蟲と思われるのでこれを材料とした。用いた品種は日支交雜種、二化性、日 115 號×支 108 號であり酵素劑は膿病體をアセトン處理によつて調製した乾燥粉末である。酵素作用を測定する爲に上記の如くにして作つた酵素製劑の 2% 水溶液 2 cc, 基質としての 3% アルブミン液 5 cc, McILVAINE 氏による緩衝液の 5 cc を混合し温度 30° に於て 30 分間放置せしめ作用後生成したアミノ酸をフォルモール法に従ひ定量した。實驗は數回行つたがその 1 例を示すと a 表の如くである。

a:	pH	3	4	5	6	7	8
	N/10 NaOH in cc	0.56	0.38	0.40	0.26	0.32	0.18

比較のために膿病家蠶酵素劑と同一製法により製せられた健全なる家蠶よりの酵素劑を使用し之に及ぼす pH の影響を観察した。酵素作用は膿蠶の場合と同様であるが緩衝液を CLARK 及び LUBS 氏法により調製し温度 37° に於て 20 時間作用せしめて測定した。その結果を b 表に掲げる。

b:	pH	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0
	N/10 NaOH in cc	0.74	0.72	0.69	0.73	1.02	0.97	1.16	1.15	0.94	0.91

同一條件の下に飼育し同一の方法により調製せられた酵素製劑を供試し、健病兩組織間の蛋白分解力をより一層精細に比較する爲に更に各種緩衝劑を使用し酵素定量を行つた。使用した緩衝液は WALPOLE 氏の醋酸混液、MICHAELIS 氏の醋酸混液、CLARK 及 LUBS 氏の磷酸加里、苛性ソーダ混液及硼酸、苛性ソーダ混液である。

c:	pH	5.0	6.0	7.0	8.4	8.8	9.0	9.4	9.8				
Time of reactn. in hrs.		22	22	22	22	21½	22	21½	21½				
Temp. of reactn. in °C		36	36	36	36	37	36	37	37				
Enzyme sol.	Heal- thy worm	Virus- dis- eased worm	Virus- dis- eased worm	Virus- dis- eased worm	Virus- dis- eased worm	Heal- thy worm	Virus- dis- eased worm	Heal- thy worm	Virus- dis- eased worm	Heal- thy worm	Virus- dis- eased worm		
Activity N/10 NaOH in cc	0.7	1.5	1.0	1.1	2.0	1.6	2.3	1.5	2.6	1.5	2.7	1.4	2.2

以上の諸實驗に於ては反應液の水素イオン濃度は作用の前後に殆んど變化が觀られなかつたが、得られた成績を綜合するに膿體の蛋白酵素作用は中性附近で最も弱く酸性に於て稍強いがアルカリ性になるに従い再び強大となる様である。又プロテアーゼは同じ pH に於ては常に健蠶より膿體酵素の方が強い事を知つた。

實驗 2: 膿體蛋白酵素に及ぼす加温の影響: バイラスは正常蛋白分子が變性重合して形成された巨大分子であると見做されている。此生成機構を若し試験管内に於て證明しようとするならば、使用酵素劑の分解力を適宜に抑制することが必要であると思惟せられるが、かかる目標に對し著者は上掲の試験に引續いて該酵素作用に及ぼす加熱の影響を検討することとした。酵素作用測定法、酵素劑及基質は前記のものと同じであるが、唯緩衝液は CLARK 及 LUBS 氏法に依る pH 8.4 のものを使用し次表の如き温度に於て 3 時間反應せしめた。結果を d 表に示す。

d: Temperature (°C)		8.5	25	30	37	45
N/10 NaOH in cc	Healthy worm	0.49	0.65	0.70	0.72	0.73
	Virus-diseased worm	0.60	0.70	0.80	0.88	1.28

更に基質として生體內條件に近づくため次の如くして製した家蠶體蛋白を用いた。則ち第 5 齡蠶を一晝夜絶食せしめた後内臓物を除きよく搗り潰し、膿體重量の 3 倍量の水を加え攪拌し N/5 醋酸を添加して pH 4.4~4.6 となし沈澱せしめ脱水し乾燥して作つたものである。測定には此蛋白を 1% 水溶液とし其 5 cc を加えた。見出された數字は e 表の如くである。

e: Temperature (°C)		45	50	60
N/10 NaOH in cc	Healthy worm	0.43	0.50	0.37
	Virus-diseased worm	0.51	0.95	0.76

更に高温度の影響を知るため下表に示す如く豫め 60~70° に加熱せる酵素製劑を使用して其殘存蛋白分解能を検する事とした。本來本報に供試せる酵素劑は其の調製法より明かなる通り充分の體蛋白を含有しているので此度は基質としての蛋白質を別に添加しない事とした。プロテアーゼ作用は酵素

粉末 0.5 g を石英砂と共に水を加えつゝよく攪拌し表の如き加熱處理を施し、後防腐のためトルオールを滴加して一夜放置して測定したがその結果を f 表に揭示する。

f: Time and Temp. of Heatg.	60 min. 60°C		10 min. 70°C		30 min. 65°C	
Time and Temp. of React.	22 hrs. 30°C		22 hrs. 37°C		22 hrs. 37°C	
Enz. soln.	Healthy worm	Virus-diseased worm	Healthy worm	Virus-diseased worm	Healthy worm	Virus-diseased worm
Activity						
N/10 NaOH in cc	0.7	1.1	0.2	0.8	0.4	1.5

d, f 兩表の數値を見るに反應を種々の温度に於て 3 時間進行せしめたる場合には酵素作用は温度の上昇と共に漸次強くなり 50° に於て最高に達し、それ以上に於ては低下する結果を示した。併しより高温にて前處理したる後再び 37° に調整して長時間反應せしめ、加熱による酵素力の減弱度を檢定した成績によれば使用酵素劑は 60° に於て 60 分加熱するとも尙相當量の蛋白分解力を保持するが 70°, 10 分間加熱する事によつてその大部分が失われる事が判明した。又水素イオン濃度の影響に関する試験に於て觀察されたと同様に、加熱に對しても膿體病體酵素が健蠶のそれより著しく強き事も分つた。

總括: 一家蠶膿體病體のプロテアーゼ作用は酸性に於てやや強く、中性附近で弱く、アルカリ性に於て最も強大である。又同酵素の作用は 10° 以下では低く温度の上昇と共に高くなり 50° 前後に於て最強となる。更により以上の高温に對しては抵抗力一層弱く例えば 70°, 10 分間加熱によりその大部分の蛋白分解力を喪失する。但し何れの場合に於てもバイラス病體の蛋白酵素力は健蠶のそれよりも甚だしく高い。

Summary

The multiplication of viruses depends upon the denaturation or polymerization of normal protoplasmic proteins in living tissues. Therefore, in order to clarify the mechanism of vi-

rus formation the metabolism in the cells must be investigated. As it has been generally recognized that the virus molecules are no more than the polymerized nucleoproteins, I have begun to study the changes and properties of proteases in the virus-diseased tissues. At first, the investigation on the nature of proteolytic enzymes in polyhedral-diseased silkworms was performed. The silkworm is the most suitable animal for this purpose, because it grows very rapidly and chemical changes in its body are vigorous. Furthermore, this insect is easily attacked with a virus disease. The polyhedral-diseased silkworms were treated with acetone and an enzyme preparation was prepared. The proteolytic activity of this preparation is somewhat low in acid side, most weak at neutral reaction and strong at higher pH. The action of the protease is very weak below 10°, strongest at 50° and over 70° the activity is lost in few minutes. At all times it was found that the protease activity of diseased body is considerably higher than the activity of healthy one.

バイラス病體のプロテアーゼに関する研究

(第2報) 家蠶に於ける實驗的バイラス發病と蛋白酵素との關係

吉 原 典 子

昭和 24 年 9 月 20 日受理

Studies on the Proteases in the Virus-diseased Tissues Part. II. Relation between Experimental Virus Formation and Proteolytic Activity of Silkworm Body

前報に於て著者は膿病蠶體蛋白酵素の性質の一端を明かにしたが、蠶兒にあつては感染に因る事無くして實驗的手段を用いてその體内にバイラス分子を生成せしめ得る事が漸次確實となつて來たので、かかる人工的バイラス形成經過中生體組織内プロテアーゼの變化を追及する事とした。

1. 加熱處理と蛋白酵素

野外昆蟲に於て所謂多角體病が極めて廣汎なる地域に突發的に發生する事が屢々報ぜられる。廣い面積上多數の別個の樹上にある巨多の個體に一時に病毒の傳染する如き事が考え難い事から、この梢病病原體が存在しなくとも、外界の條件その他に依つて或る特殊な代謝異常が生起して、之が原形質蛋白に變異を生ぜしめ發病に到るものと推定する事が出来る。家蠶に於ても當研究室に於ける多年の飼育經驗に據れば不良環境、別して氣溫高き際には膿病多發することが見られ、實際佐々木⁽¹⁾、北島⁽²⁾、石森⁽³⁾、その他の諸氏によつて蠶兒の高温接觸などによつて多角體病の發顯する事が報ぜられている。

周知の如くバイラス分子は核蛋白を少くとも主成分とするものであり、人爲的にバイラス發病に到らせた場合にも蛋白酵素が極めて重要な役割を演ずる事は容易に想像せられるが、現在の酵素並に蛋白化學の進歩狀態に於ては、その機構を精細に追及する方策が見出せないで、單に體蛋白全體を對象とするプロテアーゼの變化を追跡する事に止めた。

供試品種は二化性、日支交雜、越年性白繭、太平長安の交雜種であつて、福岡蠶種製造所より分譲を受けたものである。掃立は昭和 23 年 4 月 18 日、通常法に従つて實驗室内に特に少量を注意して飼養を續け第 3 齡 2 日目に至りその一部を三角フラスコに入れて緩く栓をなし 48° の溫浴中に浸漬して時々廻轉しつつ各蠶兒が均等に加熱せられる様にし、12 分間經過したる後直ちに取り出して新鮮桑葉中に擴げ、暫時にして體力恢復して食桑を始める様になれば、爾後標準區と同一に飼ひ、兩區間に成長度に差異を生じないよう多少の調節を施した。2 晝夜の後加溫及び標準區より生育度相等しき中庸のものを選ひ、石英砂 0.5 g を加えて乳鉢内で十分に磨り潰