Mitsuo TSUJITA and Bungo SAKAGUCHI: Genetical and biochemical studies of yellow lethal larvae in the silkworm (1). On the nature of pterin obtained from the yellow lethal strain. Jap. Jour. Genet. 30 (1955) : 83-88.

黄色致死蚕の遺伝生化学的研究

(1) 黄色致死蚕系統のプテリンについて*

辻田光雄・坂口文吾**

国立遺伝学研究所

昭和 29 年 7 月 26 日受理

UDC 595. 787 : 575
173. 577. 1

Résumé

In a previous paper, M. Tsujita, one of the authors, has reported on the allelic relation of yellow lethal to lemon in the silkworm, as well as on the maternal inheritance of yellow lethal. Subsequently, we are now carrying on genetical and biochemical studies of the yellow lethal larvae. As the first step, pterins and other fluorescence compounds contained in the yellow lethal larvae were investigated. This paper deals with this experimental results.

Embryos and larvae of the normal (+) strain, larvae of lethal yellow directly after the first moulting (designated as lem^l), embryos of the same strain dead within the egg (designated as $lem^l \cdot e$) and the same lethal embryos developed in the white-1 eggs (designated as $lem^l \cdot e; w_1$) were used as materials. The embryos or the larvae were extracted in solvents, 1/2 N aqueous ammonia, 10-15 % acetic acid or 10-20 % alkali. In order to detect pterins and other fluorescence compounds, paper chromatographical analyses were applied to the solution of pigments extracted by centrifuging or by sucking filtration. These pterins and other coloring compounds were examined under the ultraviolet light. Synthetic leucopterin, xanthopterin, isoxanthopterin and riboflavins were used as controls. The results obtained are as follows:.....

(1) Yellow pigments extracted from the lethal yellow larvae (lem^l and $lem^l \cdot e$) by the solvents, butanol-acetic acid, phenol, sodium citrate and pyridine, have almost the same of Rf value as the yellow pigments obtained by the same solvents from the hypodermis of the lemon larvae. When subjected to photolysis this coloring matter turns blue. From these facts it can be safely concluded that this pigment is xanthopterin-B.

(2) Eggs of +, lem , lem^l · e, and $lem^l \cdot e; w_1$ strains in a later stage of incubation were dried, and 0.3g of the dry matter were extracted in 5 ml of the 1/2 N aqueous ammonia. The extracts, condensed to about 0.5 ml by the depression method, were examined to determine the relative amounts of isoxanthopterin and xanthopterin-B. The relative amounts of isoxanthopterin in these strains have been shown to be $+ > lem > lem^l \cdot e > lem^l \cdot e; w_1$ (Table 2). The relative amount of xanthopterin-B tended to be the reverse, i.e. $lem < lem^l \cdot e < lem^l \cdot e; w_1$, and this pigment could not be detected in the normal strain.

* 国立遺伝学研究所 No.81.

** National Institute of Genetics, Misima, Japan.

(3) In order to detect isoxanthopterin and xanthopterin-B the same experiments were performed by using the first moulting larvae of $+$, lem and lem' strains as materials. The result showed a similar tendency. Namely, the relative amounts of isoxanthopterin in these strains showed to be $+$ $>$ lem' $>$, lem' , and the relative amount of xanthopterin-B tended to be the reverse. Xanthopterin-B could not be detected in the normal larvae (Table 3).

(4) The amount of xanthopterin-B in the lem'/lem' embryos developed in the white-1 eggs (w_1/w_1) is more abundant than that in the wild eggs.

(5) A substance of unknown nature has been recognized in the eggs of lem' and $lem' \cdot e$. This substances extracted by the butanol acetic acid produces a faint bluish fluorescence near Rf 0.67.

(6) In the lem'/lem' larvae developed from the white eggs (genotype w_1/w_1), xanthopterin-B is produced more abundantly than in the lem'/lem' larvae developed from the black eggs ($+$ w^1/w^1). This fact suggests that the formation of xanthopterin-B is somehow related to the tryptophane metabolism.

緒 言

著者の一人辻田は前報において黄色致死遺伝子 (lem') と黄体色遺伝子 (lem) との連関および黄色致死の母親遺伝について述べた。その要点は

- (1) $+$ lem , lem , lem' の 3 遺伝子が複対立関係にあること。
- (2) 3 遺伝子間では $+$ $lem > lem > lem'$ の優劣関係にあること。
- (3) 黄色致死は母親遺伝をなすこと、の 3 点であつた。

上記のうち母親遺伝の大意は次の如くである。

従来この黄色致死は、第 1 眠起において致死するのが特徴とされていた。ところがこれは $+/lem'$ の個体の相互交配において見られる現象であつて、 lem/lem' の個体の相互交配では、この特徴は現われない。この場合 lem' ホモの個体は黄色蟻蚕となり卵内にて死ぬ。そこで $+/lem'$ と lem/lem' との交雑について見ると、この場合母体をいずれにするかにより、致死の時期が異なり、前者を母体とするときは、第 1 眠起黄色致死蚕を生じ、後者を母体とするときは黄色蟻蚕となり卵内にて致死する。すなわち致死の時期が、母体の遺伝子型によりはつきり決まるのである。このことから正逆交雑により卵細胞質中の幼虫皮膚における着色に関係ある物質の基質にちがいを生じ、これが致死時期決定の原因となつていように思われる。これを具体的に究明するため現在生化学的実験を続けている。先ず黄色致死蚕に含まれる黄色素の過剰生産が、この致死の原因および母親遺伝の機構に直接重要な関連をもつことが考えられるので (辻田, 印刷中), この色素についての研究から始めた。

すでに第 1 眠起黄色致死蚕の黄色素については吉川と辻田 (未発表) が調べ、黄体色蚕 (lem) の皮膚における黄色素と同じキサントプテリン-Bであることを確かめた。そこでわれわれは黄体色蚕を母体とした場合すでに孵化直前に黄色となり、卵内にて致死する蟻蚕につき、その皮膚に含まれる黄色素の生化学的性状を調べ、さらに $+$ lem' , lem' 並に上述の孵化直前の黄色致死蚕—以下これを黄色死卵 ($lem' \cdot e$) と仮称する—における数種のプテリンについて比較検討を行い、2~3 の知見をえたので報告する。

本文に入るに先だち実験の便宜を計られた名大理学部江上教授並中西香爾氏及び助言を与えられかつ合成プテリンを供与された本研究所の名和並に名大産研の松浦の両氏に対して感謝の意を表する。

材 料 と 方 法

材料は正常 (日111), 黄体色蚕 (lem), 黄色致死蚕 (lem'), 黄色死卵 ($lem' \cdot e$), 及び ($lem' \cdot e$) と

第1白卵を共存せしめた $lem^l \cdot e$; w_1 などの孵化直前の卵並に孵化より第1眠起までの幼虫などを用いた。

方法は+, lem , $lem^l \cdot e$, $lem \cdot e$; w_1 の孵化直前の卵及び+, lem , lem^l については第1眠起直後の皮膚のみをとり、これを磨碎し、プテリン抽出の方法はエーテルで脱脂し、100%に近いエタノールを加えて除蛋白し、エタノールを除いてN/2アンモニア水で抽出するか、10~20% アルカリを用うるか、又は10~15%醋酸で25°C前後にて約7日間放置して行つた。プテリンの検定には、ペーパークロマトグラフ法を用い、展開剤はブタノール醋酸(ブタノール4:醋酸1:水1)、フェノール(フェノール85:0.1%アンモニア水15)、枸橼酸ソーダ(4%水溶液)及びピリジン(ピリジン4:水1)等を用いたが、これらのうちフェノールとピリジンは展開能は良いが、 lem の黄色々素であるキサントプテリン-Bの斑点が不明瞭になり易いため、特別の場合以外は、ブタノール醋酸及び枸橼酸ソーダを用いた。なお抽出、展開及び乾燥は暗所で行つた。対照としてはロイコプテリン、キサントプテリン、イソキサントプテリン、リボフラビンなどの合成品を用いた。

実験結果

1. 黄色死卵の黄色々素

黄体色蚕(lem)及び第1眠起黄色致死蚕(lem^l)の皮膚における黄色々素は既にのべた如く、キサントプテリン-Bであることが解つている。しかし $lem/lem^l \times +/lem^l$ 又は lem/lem^l の相互交配によつて得られた卵を催青して孵化せしめると1蛾の約1/4は黄色の蟻蚕となり孵化しえないで致死するが、この黄色々素については未知であるので、この究明のため前項で述べた方法に従つて、抽出並に検定を行つた。又対照として lem の5齢期における皮膚から抽出したキサントプテリン-Bを用いた。

第1表 lem 幼虫皮膚と $lem^l \cdot e$ 催青末期の胚子との螢光物質の比較

Table 1 Comparison of fluorescent substance between the larval epidermis of lem and the fully developed embryo of $lem^l \cdot e$

Name of substance	Leucopterin	Isoxanthopterin	Riboflavin	Xanthopter-B
Rf value*	0.10	0.23	0.35	0.38
Color of fluorescence	pale blue	purple	yellow	light yellow
lem	+	+	+	+
$lem^l \cdot e$	+	±	+	+

* by the solvent of butanol 4: Acetic acid 1: H₂O

この結果からブタノール醋酸を展開剤に用いた場合、 lem の皮膚から抽出した黄色々素すなわちキサントプテリン-Bと同じRf値をもつ輝黄色の点が認められた。なおこの他 lem にみられるロイコプテリン、イソキサントプテリン、及びリボフラビンなどの各螢光物質が存在した。又ブタノール醋酸以外の展開剤、即ちフェノール、ピリジン、枸橼酸ソーダを用いた場合にも lem のキサントプテリン-Bと同じ0.70, 0.75, 0.45の各Rf値並に螢光色をもつ点を認め、更にこの物質がキサントプテリン-Bと同様に光分解を受けて、淡青色の螢光に変る物質となることなどから、 $lem^l \cdot e$ における孵化直前の胚子にみられる黄色々素は、 lem 又は lem^l の皮膚に存在するキサントプテリン-Bと同じ物質であることが解つた。

2. +, lem , lem^l 及び $lem^l \cdot e$ などにおけるプテリンその他の螢光物質の比較

+, *lem*, *lem^l* 及び *lem^l·e*; *w₁* の孵化直前の胚子の乾燥量 0.5 g をとり, エーテルにて脱脂し, エタノールにて除蛋白後, 3 ml の N/2 アンモニヤ水にて抽出し, これを遠心沈澱後, その上澄液を約 0.5 ml まで濃縮してペーパークロマトグラフ法による検定を行つた。

この結果+においてはロイコプテリン, イソキサントプテリン及びリボフラビンが検出され, *lem*, *lem^l*, *lem^l·e*; *w₁* には+に見出された前記 3 物質の他キサントプテリン-B が認められ, さらに *lem^l·e*; *w₁* においては前述の 4 物質の他キヌレニンが検出された。なお *lem^l·e* 及び *lem^l·e*; *w₁* には前述の諸物質の他ブタノール醋酸による展開の場合に Rf 0.65~0.70 附近に暗青色の蛍光をもつ物質が認められた。

次に前述の各物質についての相対的な定量を行つた結果は第 2 表の如くである。

第 2 表 +*lem*, *lem*, *lem^l·e* 及び *lem^l·e*; *w₁* の孵化直前の胚子における Pterin 並にその他の蛍光物質の差異

Table 2 Difference of pterins and other fluorescent compounds in the fully developed embryos of +*lem*, *lem*, *lem^l·e* and *lem^l·e*; *w₁*

Name of substance	Leucopterin	Isoxantho- pterin	Riboflavin	Xanthopterin -B	Kynurenine	Unknown substance
Color of fluorescence	pale blue	purple	yellow	light yellow	light blue	dark blue
Rf value*	0.10	0.23	0.35	0.38	0.45	0.67
+ <i>lem</i>	+	≡	+	—	—	—
<i>lem</i>	+	≡	+	+	—	—
<i>lem^l·e</i>	+	+	+	≡	—	±
<i>lem^l·e</i> ; <i>w₁</i>	+	±	+	≡	+	+

* by the solvent of butanol 4 : Acetic acid 1 : H₂O 1

この結果に示されるように各系統間で特に差異を認められたものは, イソキサントプテリンとキサントプテリン-B の量的関係である。即ち前者においては +*lem* > *lem^l·e* > *lem^l·e*; *w₁* の相対的な増減関係があり, キサントプテリン-B においては, ほぼこの反対の増減傾向を示し, +*lem* には存在しない。なお *lem^l·e* に遺伝子を入れるとキサントプテリン-B の量が著しく増加するのは興味多い事実である。また *lem^l* 及び *lem^l·e*; *w₁* において Rf 値 0.67 附近に暗青色の蛍光を認めたが, これが如何なる物質であるかについては現在検討中である。

次に +*lem*, *lem* 及び *lem^l* の 1 眠起蚕について, 前述の催青末期即ち孵化直前の胚子の場合に行つたと同じ方法に従つた実験結果は第 3 表の如くである。

第 3 表 +*lem*, *lem* 及び *lem^l* の 1 眠起蚕における Pterin 並にその他の蛍光物質の差異

Table 3 Difference of pterins and other fluorescent compounds among the +*lem*, *lem* and *lem^l* larvae at the first moulting stage

Name of substance	Leucopterin	Isoxanthopterin	Riboflavin	Xanthopterin-B	Unknown substance
Color of fluorescence	pale blue	purple	yellow	light yellow	dark blue
Rf value*	0.10	0.23	0.35	0.38	0.67
+ <i>lem</i>	+	≡	+	+	—
<i>lem</i>	+	≡	+	+	+
<i>lem^l</i>	+	+	+	≡	+

* by the solvent of butanol 4 : Acetic acid 1 : H₂O 1

この結果に示される如く、各系統間で特に差異を示したものは、イソキサントプテリンとキサントプテリン-Bの量的関係である。即ち前者においては $+^{lem} > lem > lem^l$ の関係に、後者においては $+^{lem}$ の反対の量的増減傾向を示し、 $+^{lem}$ には認められないことは前の実験結果（第2表）とほぼ同様な傾向を示し、なお lem^l には、Rf 値が 0.67 附近に暗青色の蛍光色を有する点が特異的に現われており、これは第2表中に示される lem^l の場合と同一 Rf 値並に蛍光色をもつ物質と同じものであると考えられる。

考 察

従来 lem^l は第1眠起に黄色を呈して死ぬのが特徴とされていた。しかし遺伝子型 lem/lem^l を母体とする場合には、 $+^{lem}/lem^l$ 又は lem/lem^l のいずれを雄として用うるも、第1眠起に黄色致死蚕は現れず、 lem^l のホモの個体はすべて卵内にて死ぬ。この死卵は黄色を呈するが、これは前に述べたように完全に発育せる蟻蚕が淡黄色を呈するためであり、この蟻蚕は丁度第1眠起における黄色致死蚕の大顎が硬化しないため、桑葉を咀嚼しえないで餓死するのと同じ状態が、この蟻蚕の場合に現われ、卵殻を食い破ることが出来ないため、卵内で致死するに至るものと考えられる。

本実験においてこの黄色死卵の黄色々素を検定した結果、 lem 又は lem^l にみられる黄色々素の、キサントプテリン-Bと同じ物質であることを確めた。以上の事実から1眠起の黄色致死蚕も孵化直前の黄色致死蚕も全く同一の原因によつて死ぬことが解る。さらに卵内の着色物質の基質またはこれに関連する物質が母体の遺伝子型に支配され、黄色致死の時期が定まることが推定される。現在、これが如何なる物質であるかについては各種の実験方法をもつて追究中である。

プテリン並にその他の蛍光物質について、 $+$ 、 lem 、 lem^l 及び $lem^l \cdot e$ 間の各突然変異系間における顕著な差異はイソキサントプテリンとキサントプテリン-Bとの間の量的関係である。すなわちこの両物質間には互にその量の増減が逆の関係にあり、一方の増加に伴つて他方は減少する。この2種のプテリンについて、同様な関係は既に有賀ら¹²⁾ (51,52)も指摘しているが、著者の1人坂口（未発表）が分光光度計を用いてモンシロチョウとモンキチョウの翅のプテリンの定量実験を行った結果によると、前者においてはイソキサントプテリンが多量に存在するのに反して、キサントプテリン-Bと酷似する化合物と考えられるキサントプテリンの量が少く、後者では、これと反対の量的関係にある。このことはカイコにおけるイソキサントプテリンとキサントプテリン-Bとの関係に非常に似ており、これらのプテリン間に共通な或る前駆体が存在し、このものからカイコにおいてはイソキサントプテリン又はキサントプテリン-Bの形成を、又モンキチョウ及びモンシロチョウにおいてはイソキサントプテリンおよびキサントプテリンの形成を、各々の遺伝子が質的並に量的に支配しているものと考えられる。カイコの場合のプテリンの生体内形成過程には、次の2通りの場合が考えられる。

上記の2通りの生合成過程のうち、キサントプテリン-Bの構造が現在不明であるから、その可能性が何れにあるかについて明らかな判断はできないが、前述のモンシロチョウとモンキチョウにおけるキサントプテリンとイソキサントプテリンの定量実験結果とこの両プテリンの化学構造式、およびキサントプテリン-Bの光分解物の吸収スペクトルが、キサントプテリンと化学構造が密接な関連

のある葉酸 (folic acid) と類似の物質と推定される点⁴⁾ などから, [2] の場合よりむしろ [1] の過程の可能性が考えられる。

有賀¹⁾²⁾³⁾ ('52, '53) はプテリン代謝と他の代謝系即ちメラニン代謝, 尿酸代謝及びトリプトファン代謝等の間に密接な関連のあることを報告している。著者らのこの実験において, $lem^1 \cdot e$ と w_1 とを共存させた場合, キサントプテリン-B の量に増加がみられる。従つて lem^1 と w_1 との支配する代謝間には密接な関係のあることがうかがわれる。

なお黄色致死蚕系統と他の系統と異なっている重要な点は, プテリン系の代謝特にイソキサントプテリン並にキサントプテリン-B の生合成の関係であり, この系統では lem^1 遺伝子が第 1 次的にプテリン代謝を支配し, これに関連ある代謝系が, 第 2 次的に影響を受けるものと考えられる。

摘 要

黄色致死蚕 (lem^1) 並に黄色死卵 ($lem^1 \cdot e$) を中心に正常 (+ lem) と黄体色蚕 (lem) とを対比しながら, これらの皮膚組織に存在するプテリン系色素を調べた。

1. $lem^1 \cdot e$ の未知の黄色々素について調べた結果, この色素は lem 又は lem^1 の皮膚の真皮細胞に存在するキサントプテリン-B であることがわかつた。

2. 催青末期または孵化直前の+, lem , $lem^1 \cdot e$, $lem^1 \cdot e$; w_1 胚子のイソキサントプテリン並にキサントプテリン-B の各々について, 相対的な量的関係を調べた結果, 前者においては $+ > lem > lem^1 \cdot e > lem^1 \cdot e$; w_1 の関係にあり, 後者においてはほぼその反対の傾向にあり, かつ+には殆んど認められなかつた。なお第 1 眠起脱皮直後の+, lem , lem^1 の各系統におけるイソキサントプテリンとキサントプテリン-B との量的関係においても, 前述の催青末期または孵化直前の胚子における結果と, ほぼ同様な傾向が見られた。

3. $lem^1 \cdot e$ と w_1 とを共存させるとキサントプテリン-B の量が増加する傾向を示す。このことからキサントプテリン-B の代謝とトリプトファン代謝との間に密接な関連性のあることが推察される。

(この研究に要した費用の一部は文部省科学研究費によつた)

文 献

- 1) 有賀久雄, 吉武成美, 石川誠男 (1951) : 日蚕誌, 20 (6).
- 2) ———, ———, 江口正治 (1952) : 同上 21 (5, 6).
- 3) ———, ———, 石原廉 (1953) : 同上 22 (1).
- 4) ———, ——— (1954) : 同上 23 (1).
- 5) Mitsuo Tsujita (1952) : Nat. Inst. Genetics Ann. Rep., 2.
- 6) ——— (1953) : ibid. 3.
- 7) 梅谷与七郎, 辻田光雄 (1951) : 蚕試報告, 13 (7).
- 8) 吉武成美, 有賀久雄 (1952) : 日蚕誌, 21 (1).