蚊の窒素代謝に関する研究

(1) *Culex pipiens* の發育に伴う組織内の
遊離アミノ酸及び蛋白について

Studies on the nitrogen-metabolism of mosquitoes
(1) The relation of free amino acids and protein in
the tissues of *Culex pipiens*-during the development

吉 田 幸 雄*
Yukio Yoshida

緒 言

昆虫の組織及び haemolymph の化学的組成、或は發育に伴う成分の変化に関する先人の業績はかなり多い。桑名 (1937)^{11,33)} は家蚕の haemolymph の成分に就て、Agrell (1949)¹⁾ は *Calliphora* の蛹の遊離アミノ酸に就て、Buck (1953)¹⁶⁾ は窒素とグリコーゲンや脂肪との關係に就て、福田 (1951)^{27,29)} は家蚕のアミノ窒素に就て、Butenandt et al. (1954)⁵⁾ は蛹化ホルモンに就て、又 Pratt (1950)¹⁵⁾, Drilhon et al. (1946)¹⁹⁾, 尾崎 (1936)³⁶⁾, 等は種々の昆虫の haemolymph 中のアミノ窒素に就て各々研究を行つた。

これらの成績によると昆虫の發育に伴い変化する成分として蛋白及び遊離アミノ酸の変動を重視するものと然らざるものとがある、然し乍ら遊離アミノ酸が幼虫に多

く、蛹や成虫に少ないと云う点は諸家の一致した成績である。昆虫の変態に際しその体内では組織の大きな組換えが行われているものと想像されるがその本態は未だ明らかでない。又幼虫期に遊離アミノ酸が非常に多く、蛹や成虫には減少する理由についても殆んど不明である。著者はこれら諸問題の内極く一部を知る目的で *Culex pipiens* を用い、その發育に沿つて細かく時期を分け組織内の蛋白と遊離アミノ酸との相關關係を追究した。

本研究に際し終始御指導を賜り、御校閲の労をとられた小林晴治郎先生に深く感謝致します。又実験に際し種々御援助を頂いた京都府立医科大学生化学教室に対し深謝致します。本論文の要旨は日本衛生動物学会、第9回西日本大会 (昭和29年9月) に於て発表した。

材料並びに方法

Culex pipiens の卵塊を採集し之を実験室内で一定容量の水槽内で一定食飼 (エビオス) を与え飼育し、3齡幼虫、4齡末期幼虫、蛹化直後の蛹 (蛹化後2時間以内の白色を呈せるもの)、蛹初期 (蛹化後2乃至12時間経過せるもの)、蛹末期 (蛹化後約48時間以上を経過し黒褐

* 京都府立医科大学医動物学教室 (主任 小林晴治郎 講師)

Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural University of Medicine (Director: Harujiro Kobayashi)

色を帯びたもの), 成虫初期(羽化後 12 時間以内のもの)等の各期に分けて測定を行つた。更に 4 齢幼虫は摂食中のものと 24 時間蒸留水中に移し空腹にしたものとに分け, 成虫は雌雄に分けて測定した。飼育温度は夏期は室温, 比較的寒期には 20~21°C 孵卵器内にて飼育した。

先ず各期の材料は 70 % エチルアルコール中に保存し, 各々充分な量が貯蔵されると一連の測定を同時に行つた。即ち各期材料を乾燥磨砕し, 乾燥重量 50 mg を 1 実験量とするを原則とし, 之に 70 % エチルアルコールを加え静かに混和, 遠心沈澱して除蛋白を行い, 沈澱する分割は組織蛋白の消長を知る為に Kjeldahl-N の定量に供し上清は遊離アミノ酸の消長を知る為に amino-N の定量に用いた。アミノ酸の抽出は 70 % エチルアルコールにより 3 回繰返し上清の総量を集め減圧乾固してアルコールを飛ばし, 之を 2 cc の蒸留水に溶解して amino-N 定量の材料とした。amino-N の定量は Van Slyke' McFadyen, & P. Hamilton (1941)¹⁸⁾ の発表した micro method を用いた。測定は 1952 年から 1954 年迄の間に 3 回反復して平均を求めた。

次に 4 齢幼虫, 蛹初期, 蛹末期, 成虫初期の 4 期について個々のアミノ酸増減の大約を知る為, paper chromatography を用いて検出を行つた。材料の抽出方法は amino-N 定量に於けると同じであり, 各々一定量を原点に吸着せしめ, 二次元展開法を用いた。展開剤は phenol (0.1 % アムモニア水を 10 % の割合に添加) 及び lutidine (lutidine 11 容に対し蒸留水を 7 容の割合に添加) で 45 cm 平方の東洋濾紙 No. 50 を用い, 20~21°C で展開を行つた。発色は 0.2 % ニンヒドリン含水ブタノール溶液を噴霧し 90°C, 5~10 分加熱発色後直ちに判定した。実験に先立ちアミノ酸純粋溶液による厳密な基礎実験を行つた事は云うまでもない。

成 績

A) *Culex pipiens* の各發育期に於ける体組織中の蛋白並びに遊離アミノ酸の關係

前述の如き *Culex pipiens* の各發育期の経過に沿い, その体組織中に於ける組織蛋白及び遊離アミノ酸の消長並びに相互關係の測定成績は第 1 図に示した如くである。先ず遊離アミノ酸について述べると (amino-N 量として記述) 3 齢幼虫には最も多く 1,364 mg %, 4 齢末期幼虫はやゝ低下するが平均 1,010 mg % (摂食中のもの 856 mg %, 24 時間空腹にせるもの 1,164 mg %) と多量である, 次で蛹化が行われると急に減少し蛹化直後 (蛹化後 2 時間以内) では 160 mg % となる。次で蛹化後 2~12 時間のものでは 550 mg %, 蛹末期 (蛹化後 48 時間以上) には 370 mg % と動揺を示し, 次で羽化後初

期成虫 (羽化後 12 時間以内, 雌雄の平均) では 377 mg % と蛹末期と大差はない。

一方 Kjeldahl-N は amino-N と対蹠的な経過をたどり 3 齢幼虫は最も低く 4,842 mg %, 4 齢末期には平均 7,136 mg % (摂食中のもの 6,800 mg %, 24 時間空腹のもの 7,472 mg %), 蛹化直後には 9,700 mg % と急激に増加してゆき, その後蛹期間中は 9,396 mg %, 9,872 mg % と軽い変動を示し成虫は蛹末期と大差なく 9,828 mg % である。又成虫に於ては amino-N は雄 438 mg %, 雌 315 mg % と雄に多く, Kjeldahl-N は雄 9,626 mg %, 雌 10,030 mg % と雌に多い。

以上の成績から最も顕著な事は幼虫期には組織中の遊離アミノ酸量が多く, 蛋白が少ないが蛹化現象を通じて反対の増減を示し, 遊離アミノ酸は急減し, 蛋白は急増する事である。そして蛹期間中は両者共多少の変動はするがほぼ constant である。Agrell (1949)¹¹⁾ も *Calliphora*

Fig. 1. Progress and relation of protein and free amino acids in the tissues of *Culex pipiens* during their metamorphosis.

の蛹期間中、遊離アミノ酸はほぼ constant を示すと述べた。蛹期間中の変動よりも蛹化と云う現象の前後に於ける変動が注意を引くと思われる。上述の結果は蚊体内に於ける histolysis と histogenesis との関係の一端を示しているのではなからうか。幼虫末期に於ける遊離アミノ酸の非常に多い事は摂食による貯蔵と幼虫組織の histolysis によると考えられ、蛹化による急激な遊離アミノ酸の減少と組織蛋白の増加はこの時期に盛んな histogenesis が行われている事を想わしめる。次で蛹期間中は成虫体への組織の組換え即ち histolysis と histogenesis が比較的静的に平衡して行われている様に考えられる。

勿論この間に於て新しい体組織に合成されるのはアミノ酸のみでなくグリコーゲン、脂質等からの利用も看過する事は出来ない。又 Pratt の述べた如く幼虫期に遊離アミノ酸の非常に多いのを摂食を中止した蛹期間中のエネルギー源として考えるならば（勿論、エネルギー源としても一部は消費されるであろうが）遊離アミノ酸量は蛹化と云う現象に於て激減せず蛹期間を通じて漸減の傾向を示すはずであろう。

B) 發育の経過に伴う各アミノ酸の検出成績

A) に於て發育にともなう遊離アミノ酸の消長をその総和として amino-N を定量する事によつて求めたが、次に paper chromatography を用いて個々のアミノ酸について検討した。周知の如く paper chromatography を定量化する種々の試みが為されてきたが厳密に各アミノ酸の定量を望むならば fraction collector を用いる液体クロマトグラフ、或いは microbiological assay 等に依らねばならず私もこゝでは發育の経過に伴う大約の消長を述べるに止め、個々のアミノ酸の定量については今後実験を行う予定である。

昆虫の haemolymph 或は whole body extract に就て paper chromatography を用いて遊離アミノ酸を検出した成績は相当多い (Clark, et al.(1952, 1953)⁷⁾; Micks, et al.(1951)¹³⁾; Raper, et al. (1948); Hilchey, et al. (1954)¹⁰⁾; Pratt, (1950)¹⁵⁾; Agrell(1949)¹⁾; Finlayson, et al. (1949)⁸⁾; 福田他 (1950)²⁸⁾; 吉武他 (1950, 1951)^{43, 44)}。その中で蚊に関するものは Clark and Ball (1952)⁷⁾ と Micks and Ellis(1951)¹³⁾とである。

私の実験は *Culex pipiens* の 4 齢末期幼虫、蛹初期（蛹化後 12 時間以内）、蛹末期（蛹化後 48 時間以上）、成虫初期（羽化後 12 時間以内）の 4 過程に就いて行つた。その成績は第 1 表の如きである。即ち同一量、同一装作による濾紙上の spot の大きさ及び濃さより判断すると 4 齢幼虫は質に於ても又量に於ても蛹、成虫より著明に多い事が判る。表示の如く 4 齢幼虫にては 18 種、蛹初期

は 11 種、蛹末期は 8 種、成虫初期は 10 種の遊離アミノ酸が検出された。4 齢幼虫で検出され、蛹や成虫で検出されなかつたものについては一応合成への利用も考えられるが主として減量によつて検出されなかつたものと思われるその存在を否定する事は出来ない、併し非常に減量している事は確かである。A) の amino-N 定量の成績を裏付けるものと考えられる。

Table I, Free amino acids in the tissues of *Culex pipiens* during their metamorphosis.

	4-instar larvae (end stadium)	pupae (initial stadium)	pupae (end stadium)	adults (initial stadium)
α-alanine	+++	+++	++	++
glutamic acid	+++	+++	++	++
leucine & isoleucine	+++	++	+	+
proline	++			+
histidine	++	+		+
serine	+			
valine	+++	++	+	+
methionine	+			
lysine	++	+		+
arginine	++	+	+	+
aspartic acid	++	+		
glycine	+++	+	+	+
tyrosine	+++	+	+	
phenylalanine	+			
cystine	+			
hydroxyglutamic acid	+			
methionine sulfoxide	+			

考 察

本観察に関係ある若干の先人の業績をあげると、Agrell(1949)¹⁾ は *Calliphora* の蛹期間中の測定を行い遊離アミノ酸はほぼ constant であると述べ、福田(1951)^{27, 29)} は家蚕の蛹化前後に於て haemolymph 中の amino-N はほぼ constant を示すがアミノ酸は絶えず絹糸腺へ移行している事を述べ、尾崎(1936)³⁶⁾ は家蚕につき amino-N は蛹期間中はほぼ constant であるが化蛹、化蛾に際し減少する事を認めている。Drilhon, et al.(1946)¹⁹⁾ も *Attacus* に就て同様の事を認めている。Pratt(1950)¹⁵⁾, Wigglesworth(1954)²⁰⁾ 等も種々の昆虫に就て amino-N は幼虫に多く成虫に少ない事を記述している。一方桑名(1937)^{11, 33)} は家蚕の脱皮直前に haemolymph 中の reducing power が著明に増加する事を認めたがこの物質

は不明であると述べ、又 Buck (1953)¹⁶⁾ は体組織の組換えはグリコーゲンや脂肪に関係が深い事を述べた。

私は *Culex pipiens* の發育に伴い遊離アミノ酸は先人の成績に一致し幼虫に多く、蛹、成虫には少ないが之は蛹化に於てはげしく減少する事を認め、又組織蛋白は蛹化に於て急増する等の点より Pratt (1950)¹⁵⁾ は遊離アミノ酸はエネルギー源として消費されると云つたが、之のみでなく histolysis と histogenesis との相関関係に於て大きく変化するものではないかと考える。併しこれら新しい組織の合成にはグリコーゲン、脂肪等の利用もあり複雑な経過をたどるものと考えられ上述の成績はその一端を示すにすぎない。

次に蚊組織内に於ける個々の遊離アミノ酸について paper chromatography を用いて定性乃至半定量を試みたのは Micks, et al. (1951) と Clark, et al. (1952) とである。此等はマラリア原虫に対する蚊の属或いは種の間に於ける感受性を支配している要因を説明しようとする試みの一部を為すもので Micks, et al.¹³⁾ は *C. quinquefastiatus*, *C. pipiens*, *A. aegypti*, *A. quadrimaculatus*, *C. salinarius*, *A. sollicitans*, *Culiseta inornata* 等の雌成虫について行い、18種のアミノ酸を見出した。又 Clark, et al.⁷⁾ は *C. tarsalis*, *C. stigmator*, *A. varipalpus*, *Culiseta incidens* 等の成虫につき同様 paper chromatography を行い、一貫して見出される遊離アミノ酸は15種、種により見出されるもの5種を記述している。これら2論文に依ると蚊の属或は種の間に遊離アミノ酸の多少の差があると述べている。

私の実験に於ては4齢幼虫、蛹（初期及び末期）、成虫に於て、前述の如く各々、18種、11種、8種、10種の遊離アミノ酸を検出した。4齢幼虫に於ては大体殆んどすべてのアミノ酸が見出されたが蛹、成虫に於ては減量した為種類も少なかったものと考えられる。

結 語

Culex pipiens を用い、その変態を通じて体内組織に於ける蛋白と遊離アミノ酸の消長及びその相互関係を観察した。遊離アミノ酸は3齢幼虫に最も多く、4齢幼虫で少しく減るが蛹化すると急に激減し、その後蛹期間中はやや増加するもほぼ constant であり羽化後も大体同程度である。一方組織蛋白は反対に3齢幼虫が最も少なく、4齢、蛹化と経過する間に急に増量する。その後、蛹期間中はほぼ constant で羽化後も著変はない。この様な蛹化前後に於ける遊離アミノ酸の急減と、組織蛋白の急増はこの時期に新しい組織の合成 (histogenesis) が盛んに起つている事を示し、蛹期間中両者ほど constant を示すのは、この間に於て比較的 histogenesis と

histolysis とが平衡して行われている事を示すものと考えられる。或は蛹化前後に於ては遊離アミノ酸が大いに利用され、蛹期間中はアミノ酸以外の物質、例えばグリコーゲン、脂質等の利用が盛んとなるのかも知れない。

次に paper chromatography を用い、4齢幼虫、蛹初期、蛹末期、成虫初期の各期に於ける個々の遊離アミノ酸の状態を観察した所、各々18種、11種、8種、10種の遊離アミノ酸を検出した。こゝに於ても4齢幼虫は、蛹、成虫に比し量並びに質的にも多い事を示している。

参 考 文 献

- 1) Agrell, I. (1949): Occurrence and metabolism of free amino acids during insect metamorphosis, Acta physiol. Scand., 18: 247-258. —2) Agrell, I. (1949): Localization of some hydrogen-activating enzymes in insects during metamorphosis, Nature, 164: 1039-1040. —3) Barton-Wright, E. C. (1952): The Microbiological Assay of the Vitamin B-Complex and Amino Acids —4) Buxton, P. A. (1935): Composition during hibernation, *Culex* (Diptera), Parasit. 27: 263-265. —5) Vortrag von Prof. Dr. Butenandt in Japan, 1955, (XIV. Japanischen Medizinischen Kongress in Kyoto) —6) Crumpler, H.R. & Dent, C.E. (1949): Distinctive test for α -amino-acid in paper chromatography, Nature, 164: 441. 7) Clark, Edgar, W. & Ball, Gordon, H. (1952): The free amino acids in the whole bodies of culicid mosquitoes, Exp. Parasit. 1 (4): 339-346. —8) Finlayson, L. H. and Hamer, D. (1949): Free amino-acids in the haemolymph of *Calliphora erythrocephala* Meigen, Nature, 163: 843-844. —9) Golberg, L. and Meillon, B. (1949): Further observations on the nutritional requirements of the larva of *Aedes aegypti*, Nature, 160: 182-183. —10) Hilchey John, D. and Block Richard, J. (1954): Quantitative amino acids composition of the german cockroach, *Blattella germanica* (L.), Cont. Boyce. Thompson Inst., 17 (6): 380-382. (Sum., Biol. abst., 28(10), 1954). —11) Kuwana, Z. (1937): Reducing power of the body fluid of silkworm, Jap. Jour. Zool., 7: 273-303. —12) Ludwig Daniel, and Rothstein Fred (1949): Changes in the carbohydrate and fat content of the Japanese Beetle (*Popillia japonica* Newman) during metamorphosis, Physiol. Zool., 22: 308-317. —13) Micks, Don, W and Ellis James, P. (1951): Free amino acids in adult mosquitoes, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78: 69-72. —14) Moore Stanford, and Stein William H. (1951): Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins, Jour. Biol. Chem., 192: 663-681. —15) Pratt, J. J. (1950): A qualitative analysis of the free amino acids in

insect blood, Ann. Ent. Soc. Amer., 43 (4) : 573-580. —15) Roeder K.D. (1953) : Insect Physiology. —17) Trager William (1937) : A growth factor required by mosquito larvae, Jour. Exp. Biol., 14 : 240-251. —18) Van Slyke, Donald D., MacFadyen, Douglas A. and Hamilton Paul (1941) : Determination of free amino acids by titration of the carbon dioxide formed in the reaction with ninhydrin, Jour. Biol. Chem. 141 : 671-680. —19) Wigglesworth, V. B. (1950) : The Principles of Insect Physiology, Fourth Edition. —20) Wigglesworth, V. B. (1954) : The Physiology of Insect Metamorphosis. —21) Woiwon, A. J. (1948) : Microestimation of amino-nitrogen and its application to paper partition chromatography. Nature, 161. —22) 赤尾晃 (1931) : 蚕蛹変態時血液の尿酸量, 遊離アミノ酸量並に血液水素イオン濃度及び其の相互関係について, 朝鮮医学会誌, 6. —23) 赤尾晃 (1931) : 核酸代謝の研究, 蚕体内窒素化合物の消長より観たる尿酸の生成について, 朝鮮医学会誌, 6. —24) 赤尾晃 (1931) : 化蛹期に於ける家蚕の蛋白質, 脂肪並に糖質各養素相互の態度に就て, 朝鮮医学会誌, 7. —25) 伊藤智夫 (1954) : 昆虫の変態と呼吸代謝, 科学, 24 : 595-600. —26) 伊藤智夫 (1954) : 家蚕における変態の生理, 蚕試報, 14 (5) : 263-278. —27) 福田紀文 (1951) : 家蚕の蛹化と絹質物形成との関係に就て, 蚕試報, 13 (9) : 423-480. —28) 福田紀文 (1951) : Paper chromatography に依る桑葉, 蚕及び繭繊維中のアミノ酸の識別, 蚕試報, 13 (9) : 481-503. —29) 福田紀文 (1951) : 家蚕の蛹化に伴う糖及び脂肪の変化に就て, 蚕試報, 13 (10) : 536-556. —30) 石森直人, 武藤聰雄 (1951) : Paper chromatography による家蚕の健全及び膿病の血液の遊離アミノ酸に関する研究, 日蚕誌, 20 (2) : 123-131. —31) 川瀬惣次郎, 岩岡末彦, 斎藤良三郎 (1912) : 家蚕の發育に伴う体成分の変化について, 農学会報, 136 号. —32) 川瀬惣次郎, 須田圭二, 斎藤格次 (1921) : 家蚕の血液に関する研究, 農学会誌, 222 号. —33) 桑名寿一 (1937) : 家蚕体液の還元力, 蚕試報, 9 (2) : 35-62. —34) 桑田智 (1954) : クロマトグラフィー, 広川書店. —35) 宮本高明, 佐竹一夫, 林誠 (1950) : 私たちのペーパークロマトグラフ, 日新医学, 37 (7) : 256. —36) 尾崎準一 (1936) : 家蚕の変態に伴う体成分の変化に就て, 東京高蚕報, 1 (2). —37) 佐竹一夫 (1952) : クロマトグラフ, 共立全書. —38) 佐竹一夫 (1950) : 生物化学に於けるペーパークロマトグラフの応用, 化学の領域, 4 (8) : 32-38. —39) 佐竹一夫 (1949) : ペーパークロマトグラフ, 化学の領域, 3 : 264-276. —40) 武田スミ, 柴田篤弘 (1951) : ペーパークロマトグラフ法を定量化する試み, 科学, 21 (3) : 136. —41) 梅村清彦 (1951) : ペーパークロマトグラフによるアミノ酸の簡易定量法, 組織遊離アミノ酸への適用についての試み, 医学と生物学, 19 : 250-252. —42) 山川一郎 (1919) : 家蚕の変態期に於ける脂肪と含水炭素との関係, 東京医学会誌, 32. —43) 吉武成美, 有賀久雄, 鈴木嘉純 (1950) : 家蚕のアミノ酸に関する研究 (I-V), 日蚕誌, 19 (6) : 530-

537. —44) 吉武成美, 有賀久雄 (1951) : 家蚕のアミノ酸に関する研究 (VI-VII), 日蚕誌, 20 (4) : 264-267. —45) Uvarov, B. P. (江崎悌三訳) (1913) : 昆虫の栄養と新陳代謝, 国際書院.

Résumé

Many studies on the substances that control the insect metamorphosis have done recently and Butenandt has succeeded to obtain the "verpuppungshormon" in the crystall form from silkworm pupa in 1954. However, the progress of the body constituents in insect tissue during metamorphosis is not yet enough explained.

In this paper the investigations about the relation between tissue protein and free amino-acid during metamorphosis of *Culex pipiens* were carried out to explain certain parts of above question. The result is shown on the Fig. I.

The results can be summarized as follows: Free amino-acids in tissues are much abundant in 3 and 4-instar larvae and they decrease rapidly just after pupation. Although the free amino-acids content increases slightly in pupal stage, it is relatively constant during this stage and similarly it does not show any notable changes after emergence.

On the other hand the tissue protein is most scant in 3-instar larvae and it increases rapidly in accordance with their development to the 4-instar larvae and pupation. During pupal stage the tissue protein content is constant generally and it is also similar after emergence. Such rapid decrease of free amino acids and the rapid increase of protein in tissues during pupation suggest the vigorous histogenesis for producing the new tissues in this stage. And during the pupal stage contents of free amino-acids and protein are both constant in general. This constancy seems to show the histolysis and histogenesis progress in this stage relatively constant or may utilize chiefly the free amino acids during pupation and glycogen and fat substances during pupal stage.

Quality of free amino acids in each stages of 4-instar larvae, pupae (initial stadium), pupae (end stadium), adults (initial stadium) are shown on Table I, estimated by paper chromatography. It shows the presence of: in 4 instar larvae 18 free amino-acids (α -alanine, glutamic acid, leucine & isoleucine, proline, histidine, serine, valine, methionine, lysine, arginine, aspartic acid, glycine, tyrosine, phenylalanine, cystine, hydroxyglutamic acid, methionine sulfoxide), in pupae of initial stadium 11 (α -alanine, glutamic acid, leucine & isoleucine, histidine, valine, elysin,

(146)

衛生動物 1955 年 Vol. 6 Nos. 3・4

arginine, aspartic acid, glycine, tyrosine), in pupae of end stadium 8 (α -alanine, glutamic acid, leucine & isoleucine, valine, arginine, glycine, tyrosine), and in adults 10 (α -alanine, glutamic acid, leucine & isoleucine, proline, histidine,

valine, lysine, arginine, glycine) respectively. These results seem to indicate also that the free amino acids content in 4-instar larvae is much predominant as compared with them in the pupal or adult stages.