家蚕の Tryptophan 代謝について (其の 2)*

稲 神 馨 (熊本県蚕業試験場)

昭和 30 年 8 月 6 日 受 理

On the Tryptophan Metabolism of the Silkworm. (2)

By Kaoru INAGAMI (Kumamoto Prefectural Sericultural
Experiment Station)前報⁽¹⁾と同様な方法によつて蚕のトリプトファン代謝を追究した。供試材料も前報と同じである。

実験結果及び考察

未知物質 F, I, L について

前報⁽¹⁾の Table 1, 2 の F 及び I 物質は正常系の蛹の尿に相当多量含まれている。即ちこれらの物質への代謝は蚕におけるトリプトファン代謝の主経路の一つをなすものと考えられる。

F, I とともに正常系及び第 2 白卵 (w_2) の尿に存在し、第 1 白卵 (w_1)、赤赤 (rb) の尿にはみられない。 w_1 は kynurenine から 3-hydroxykynurenine (OH-kynu) への代謝が、 rb は OH-kynu から 3-hydroxyanthranil 酸 (OH-anthranil 酸) への代謝が阻害されていることからみて⁽¹⁾、F, I の両物質は OH-anthranil 酸以後の代謝産物と考えられる。

F 物質の性状は次の如くである。

a) Yellow blue の螢光を有し、ニンヒドリン、アルデヒド、ジアゾ反応は全て陰性である。またこの物質は 6N HCl で 10 時間加熱しても全く変化しない。

b) R_F 値は kynuren 酸とよく似ている。

		Buthanol-Acetic acid	5% Na-Acetate
F-substance	R_F	0.55	0.43
Kynurenic acid	"	0.56	0.44

両物質を重ねて 2 次元に展開してもほとんど一致したスポットとして現われてくる。しかし kynuren 酸では濾紙がぬれているときは螢光がみられず、次に弱い紫の螢光を呈し、濾紙が充分に乾燥すると明瞭な yellow blue の螢光に変つてくる。これに対し F ははじめから yellow blue の螢光を呈している。それ故、多量の尿の試料と少量の kynuren 酸を重ねて 2 次元に展開すると、濾紙が乾かない時は F の yellow blue のスポットのみがみられ、やがてそのスポットの中に紫のスポットがみられるようになる。濾紙が乾くと両者を区別することは困難になる。

c) 吸収スペクトルは Fig. 1 の如くで、335 $m\mu$, 347 $m\mu$, に最大吸収がみられ (pH 7.2 磷酸緩衝液),

kynuren 酸と非常によく似ている。また kynurine⁽²⁾ も 320, 330 $m\mu$ の辺りに 2 つの吸収の山があることからみて、F は quinoline 核に似た構造を持つ物質ともみられる。吸収スペクトル測定を試料は前報⁽¹⁾の G 物質の場合と同様な方法によつて作成した。

d) 濾紙電気泳動の結果は Fig. 2 の如くで、kynuren 酸と非常に似た移動を示した。

e) OH-Anthranil 酸以後の物質として Neurospora で知られている quinolin 酸を作り、両者を比較したが一致しなかつた。F は塩酸で分解されないことから quinolin 酸の抱合体とも考えられない。

f) Zn, Fe で沈澱せず、Cu で沈澱する。インドール核の反応、ピリジン核反応 (BrCN 法) は共に陰性である。2 つの OH-anthranil 酸が結合して出

Fig. 1. Absorption Spectra of Substances F (---), I (-.-.-), L (.....), kynurenic acid (—) and kynurenine (----).

* この報告は著者の「家蚕色素の生成に関する遺伝生化学的研究」の第 13 報をなすものである。

F-Substance	+	○
I-Substance	+	○
Kynurenic acid	+	○
	(+)	(-)

Fig. 2. Electrodialysis of F, I-Substance and Kynurenic Acid.

来ると考えられる phenoxazin 核の誘導体については予想される物質を合成して同定すべく、目下研究中である。

F の元素分析及びその他の調査は、何分にも蛹尿が大量に入手出来ないため、未だその目的を達していない。

F は当初 kynuren 酸と考えていたが、 w_1 , rb の尿に含まれないこと、及び螢光の発現状態が異なる点から別の物質とみなした。そして少なくとも OH-anthranil 酸から導かれるトリプトファン代謝産物で、未だ報告されていない新物質と考えた。

I 物質の性状は次の如くである。

a) 前に述べた如く、正常系及び w_2 の尿には含まれるが、 w_1 及び rb の尿には含まれていない。即ち OH-anthranil 酸から導かれた物質と考えられる。

b) Pale blue の螢光を有し、ニンヒドリン、アルデヒド、ジアゾ反応は全く陰性である。

c) 尿をブタノールで抽出し、活性アルミを用いたクロマトグラフィーで、50% メタノールでもつて展開すると、この物質は初期のフラクションに出てくる。これを塩酸酸性にしてデシケータ中に放置しておくで結晶が析出して来る (Fig. 3)。この結晶は潮解しやすい。

d) 吸収スペクトルは Fig. 2 の如くて、min. 318 $m\mu$, max. 355 $m\mu$ で、この曲線は kynurenine (max. 360 $m\mu$) のそれに似ている。

e) 濾紙電気泳動の結果は前報⁽¹⁾の Fig. 3 の如くで、相当陰極側に移動していた。この点では kynurenine とその性質を異にしている。

f) 6N HCl で 95°, 10 時間の加水分解で分解され、 R_F 0.58 (ブタノール・醋酸) の物質を生じた。以下この物質を L とする。

L 物質の性状は次の如くである。

a) Pale blue の螢光を有し、ニンヒドリン、ジアゾ反応は陰性であるが、アルデヒド反応は陽性である。この場合濾紙にアルデヒド試薬を噴霧しても直ぐには発色しないが、1~2 時間たつと青色に呈色してくる。これはインドール- β -カルボン酸の特性である (前報⁽¹⁾ Table 3)。

b) L の吸収スペクトルは Fig. 1 の如くて、min. 318 $m\mu$, max. 350 $m\mu$ で、分解前のものに較べて、最大吸収の位置が多少動いた程度である。この L はいかなる突然変異の尿にも認められなかつた。あるとしたら極微量なのであろう。

以上の成績からみて、I 及び L 物質は OH-anthranil 酸から導かれた物質で indole carbon 酸の誘導体と考えられる。Neurospora で anthranil 酸から indole が生成されることは認められているが⁽³⁾、OH-anthranil 酸から indole 核を有する物質が生成されるということは、未だ如何なる生物に於ても知られていない。F 及び I 物質の究明はトリプトファン代謝の新しい経路を示すものとして興味もたれる。

Kynuren 酸及び Kynurine について

Kynuren 酸は前に述べた如く、蚕蛹の尿中には見出し得なかつた。また他の卵、幼虫の時期にも認められなかつた。

w_1 , rb 及び正常系の蛹の多量の kynurenine を注射しても、kynuren 酸を確認することが出来なかつたので⁽⁴⁾、蚕では kynuren 酸への代謝経路はないものと考えた。

BUTENANDT は蚕蛹 200 kg から 605 mg の kynurine の結晶を得ているので⁽²⁾、蛹の各時期の尿について kynurine の検索を行つた。正常系の尿の 2 次元のペーパークロマトグラムに於て、ブタノール・醋酸の R_F 0.79, 5% 醋酸ソーダ液の R_F 0.45 に yellow blue の螢光を持つ物質がみられる (前報 Fig. 1 の Spot M)。この

Fig. 3. I-Substance

スポットは試料を多量用いた時にのみみられ、試料が少ない時はみられない。純品の kynuren 酸を加熱し、脱炭酸して作った kynurine の R_F と、この Spot M の R_F は大体一致し、螢光も似ている。ともにニンヒドリン、アルデヒド、ジアゾ反応は陰性である。この物質の尿中の含量が非常に少ないため、他の性状調査は出来なかつた。それ故、Spot M が kynurine かどうかは未だ確定すると至っていない。

また最近 BUTENANDT⁽⁶⁾ が報告している 3, 4-dihydroxy-quinoline sulphate も蚕では未だ確認するに至っていない。

ニコチン酸について

蚕ではニコチン酸はトリプトファンから生成されないと、すでに吉川⁽⁶⁾、伊藤⁽⁷⁾等が報告している。念のため著者は正常系と *rb* の蛹のニコチン酸含量を測定し、検討を加えた。

ニコチン酸の測定は BrCN 法によつた。蛹をアルカリで加水分解して試料としたので、ニコチン酸の総量として求めた。その結果は Table 1 の如くで、正常系と *rb* では含量に差はみられなかつた。即ち蚕ではニコチン酸

Table 1. Nicotinic Acid Content in Pupae of Various Types.

Nicotinic acid content per 1g of body weight (μ g).		
Late stage.		
Normarl	35.1	32.3
<i>rb</i>	34.5	34.3
w_1	33.8	33.5

の前駆物質はトリプトファンとは認められない。何故ならば *rb* では OH-kynu から OH-anthranil 酸への代謝が阻害されているので、もしニコチン酸がトリプトファンから作られているとするならば、*rb* の蛹に含まれるニコチン酸量は正常系のそれよりも少ないはずである。

Xanthuren 酸及び 4, 8-dihydroxyquinoline について

さきに報告⁽⁸⁾した如く xanthuren 酸及び 4, 8-dihydroxyquinoline を蛹尿中に確認した。この両物質は昆虫では未だ確認されていなかったが、これの存在を明らかにした。

市原⁽⁹⁾は xanthuren 酸は蚕蛹中には見出されなかつたと報告しているが、若い蛹を使つたために検出出来なかつたものと考えている。両物質とも蛹の前半期にはみられず、後期に現われてくる。

前報⁽¹⁾の Table 1, 2 の E, H がこれらに相当し、ともに正常系、 w_2 , *rb* の尿に含まれており、 w_1 の尿には含まれていない。詳細はさきに報告したのでここでは省略する。

総 括

トリプトファン代謝の研究は哺乳動物に於ては前駆物質を食下或は注射して、その生成物の量の増加度から追究するか、組織のホモジェネートを作用させて生成物を調べる方法、または放射性元素を用いて追跡する方法等がとられている。微生物では主として人工的に突然変異を作り、これを利用して前駆物質と思われるものを培養基に加えて、その代謝路を調べる方法等がとられている。しかし生成物が发育必要物質でないとこの追究も極めて困難である。

著者が蚕でとつた方法はトリプトファン代謝の途中の過程が阻害されている 3 種の突然変異を用い、その各の排泄物の比較検討、及び前駆物質を注射し生成物の検出⁽⁴⁾等である。そのため生成物が发育必要物質である必要はない。

また既に知られていた w_1 , w_2 の突然変異だけでは色素への代謝路の究明には役立つても (Fig. 4), anthranil 酸系への代謝路の究明には充分でない。そこへ anthranil 酸系への代謝が阻害されている突然変異 *rb* を著者が加えたことによつて、蚕のトリプトファン代謝の研究は非常に容易になつてきた。前述した F, I 物質が OH-anthranil 酸から導かれた新しい物質であることがわかつたのも、*rb* が得られたからである。

なおこの代謝路が阻害される突然変異はショウジョウバエでも、Neurospora に於ても未だ見出されていない。(白卵系の突然変異はショウジョウバエにもある)

著者の得た成績^(8, 9, 12) (報も含めて) を要約すると Fig. 4 の如くなる。実線は確認された代謝路、点線は他で確認されたが著者の未確認のもの、----- は存在しないと考えられる代謝路である。

これをみても哺乳動物や微生物の代謝図とかなり異なつていくことがわかる。F, I 等の物質が明らかになつてくると、これらが昆虫のみに見られる物質かどうかは問題になつてくる。

蚕では Fig. 4 に示した代謝が全てどの時期にも行われているわけではない。生育の時期即ち卵、孵化時、幼虫、脱皮期、化蛹期、蛹の前半期、蛹の後半期及び蛾の時期で主代謝路はそれぞれ違つていく。これも哺乳動物

Fig. 4. Pathways of Tryptophan Metabolism in the Silkworm.
 w_1 , white-1; w_2 , white-2; rb , Aka-Aka mutant. (—) Pathways confirmed by author, (---) confirmed by A. BUTENANDT and H. KIKKAWA, (---|---) interrupted.

や微生物の代謝と違う点である。これについては既に報告⁽¹⁰⁾⁽⁸⁾しているが、次にその概要を述べると。

卵期…… Tryptophan—Kynurenine—Hydroxykynurenine—Pigment (卵色素) の代謝以外のルートはみられない。

孵化時…… anthranil 酸系への代謝が生じてくる。

幼虫…… Pigment (糞, 皮膚), anthranil 酸系への代謝がみられる。

脱皮期, 化蛹期…… Hydroxykynurenine が著しく体液中に増加する。脱皮又は化蛹が終ると減少するが, hydroxykynurenine が何に変化するのかわからない。

蛹前半期…… 体液及び排泄物中に kynurenine, Hydroxykynurenine 及びそれらの抱合体以外の物質はみられない。

蛹後半期…… Fig. 4 の全ての代謝がこの時期には行われる。尿色素にも変化している。

蛾…… 雄と雌で異なる。雄では hydroxykynurenine の大部分が尿色素になるが, 雌では hydroxykynurenine のまま卵に移行し, 卵色素の色原体となつている。そのため雄の尿は濃赤褐色をおびているが, 雌の尿は白けた茶色をしている。

摘 要

トリプトファン代謝に関係を持つ蚕の突然変異第1白卵, 第2白卵, 赤赤等を用いて, 蚕のトリプトファン代謝を追究した。その結果, 蚕のトリプトファン代謝の全貌をかなり明らかにすることが出来た。そしてその代謝は哺乳動物や微生物のそれと多少異なつていることを知った。また新しいトリプトファン代謝物質と思われる2つの物質を見出した。

終りに臨み御指導, 御援助頂いた九大佐々木周郁教授, 現慈恵医大牧野堅教授, 佐藤清夫博士並びは高崎恒雄, 高橋幸吉の諸氏の感謝の意を表する。また実験に終始協力された須藤芳三君の援助に感謝する。

(1) 稲神馨: 農化, 29, 918 (1955).

(2) A. BUTENANDT, P. KARLSON, W. ZIL-

LIG: Z. Physiol. Chem., 288, 125 (1951).

(3) H. K. MITCHELL, J. F. NYC: Proc.

- Nat. Acad. Sci.*, 34, 1 (1948).
 (4) 稲神 馨, 須藤芳三 農化, 29, 926 (1955).
 (5) A. BUTENANDT, U. RENNER: *Z. Naturforschg.*, 8b, 454 (1953).
 (6) 吉川秀男, 桑名 馨: 動物雑, 25, 30 (1952).
 (7) 伊藤智夫: 遺伝雑, 27, 75 (1952).
 (8) 稲神 馨 日蚕誌, 24 (5, 6) (1955).
 (9) 市原 硬: 遺伝生化学研究班報告, 3 (1952).
 (10) 稲神 馨: 日蚕誌, 24, 85, 91 (1955).

Summary

The investigation of tryptophan metabolism in the silkworm with mutants related to this metabolism (w_1 , w_2 , rb), has shown that tryptophan metabolism of the silkworm differs a little from that of the mammal or microorganism.

A new tryptophan metabolite induced from 3-hydroxyanthranilic acid has been discovered.

蚕の“赤赤”遺伝子の生化学的意義について*

稲 神 馨, 須 藤 芳 三 (熊本県蚕業試験場)

昭和 30 年 8 月 6 日 受 理

Biochemical Studies on the “Aka-Aka” Gene (rb) in the Silkworm.

By Kaoru INAGAMI and Yoshizo SUTO (Kumamoto Prefectural
Sericultural Experiment Station)

正常系の蚕の体液は空気中に放置しておくくと黒褐色に変つてくるが, 著者の 1 人稲神が見出した突然的変異赤赤の体液は赤紅色を呈してくる⁽¹⁾. この性質は劣性単因子遺伝をなすことを知つたので, この遺伝子に rb (red blood) の記号を与えた⁽¹⁾. そして体液が赤紅色に変つてくる機構を調べたところ, 赤赤の体液には 3-hydroxykynurenine が異常に蓄積しており (正常系の約 20 倍量)⁽²⁾⁽³⁾, そのため赤色のメラニン系色素が生成されるということをさきに明らかにした⁽⁴⁾.

では何故赤赤の体液には 3-hydroxykynurenine が蓄積するのであろうか. この機構を本報では酵素学的に追求し, 赤赤遺伝子は kynureninase の存否は規制する遺伝子であるという結論を得たので, ここに報告する.

供 試 材 料

供試蚕としては第 1 白卵 (w_1), 第 2 白卵 (w_2), 赤赤 (rb) 及び正常系を用いた. w_1 とは kynurenine から 3-hydroxykynurenine への代謝が, w_2 とは 3-hydroxykynurenine から pigment への代謝が阻害されている突然変異である⁽⁵⁾.

実 験 結 果 及 び 考 察

1. Tryptophan 代謝産物の検討

トリプトファン代謝が最も広範囲に行われる化蛾直前の蛹の尿をペーパークロマトグラフ (PC) にかへ, 正常系と赤赤のトリプトファン代謝産物を比較検討した. その結果は前報⁽⁶⁾に報告したが, それを要約すると次の如くである.

Substance	Normal type	Mutant rb	これによつて, 赤赤では kynurenine から anthranilic acid への代謝及び 3-hydroxykynurenine (OH-kynu) から 3-hydroxyanthranilic acid (OH-anthranilic acid) への代謝が阻害されていることが一応うかがわれる.
Kynurenine	+	++	
Anthranilic acid	±	—	
Anthranilylglycine	+++	—	
3-Hydroxykynurenine	+	+++	
3-Hydroxyanthranilic acid	+	—	

2. 注 射 試 験

化蛹 3 日目の雄の蛹に 1.4% *dl*-kynurenine sulphate 及び 1.4% anthranilic acid の Na 塩をガラスキャピラリーで 0.5 cc 注射した. そして化蛾前日の蛹の尿 (直腸内容物) をとり, 80% メタノールで抽出し, 醋酸で微酸性となし減圧濃縮して, トリプトファン代謝生成物を PC で調べた. PC の溶媒は主としてブタノール・醋酸・水 (4:1:5) を用い, 他にブタノール・ベンゾール・メタノール・水 (1:1:2:1), 5% 醋酸ソーダ液も用

* この報告は稲神の「家蚕色素の生成に関する遺伝生化学的研究」の第 14 報をなすものである.