[農化 第 37 卷, 第 7 号, p. 375~378, 1963]

家蚕におけるグルクロン酸の生理的機能について*

河 北 俊 彦 (岐阜蚕業試験場)

林 金 雄 (岐阜大学農学部農芸化学科)

昭和 37 年 12 月 7 日 受 理

蚕児の飼育に際して、桑葉あるいは人工飼料にグルクロン酸（以下 GA と略す）を添加したところ、生育状態がきわめて良好で、実用上からもまた生化学的見地からもきわめて興味ある事実を見出したので、蚕児の生育と GA との関係について実験を進めた。また蚕糞中に GA が排泄されていることを明らかにし、その生理的作用についても追究し、さらに蚕の餌食膜成分として GA を構成成分とするムコ多糖類の存在を確認したので、これらの結果について報告する。

I 桑葉に GA を添加した飼育試験

蚕品種：支 122 号(太)×日 124 号。

蚕児の飼育時期：昭和 35 年春蚕期。

飼育方法：催青末期（青み卵）の蚕種を 0° に 24 時間保護し、孵化した蛾蚕を 24 時間絶食させ、強い生理的障害を负荷させて掃立し、これに毎日 1 回一定時刻に GA の 0.01%, 0.02%, 0.1% 水溶液を塗抹して陰乾させた桑葉を給与して飼育し、普通桑葉で飼育したものを対照とした。結果は第 1 表のようで、対掃立蚕上繭収量・対 4 令起蚕 1 万頭上繭収量のいずれも GA 添加区は優れている。なお、対照区においては 5 令期に軟化病蚕を多発したが、GA 添加区においては 0.01%, 0.02%, 0.1% の順に軟化病蚕の発生が少なかった。

第 1 表 桑葉にグルクロン酸を添加した飼育試験

試 験 区	掃立 蚕数 (頭)	4 令 起蚕 数 (頭)	減 蚕								上繭 収量 (g)	対 4 令 起蚕 1 万頭上 繭収量 (kg)	対 結 繭 蚕				
			1~3令		4~5令		簇 中		繭 中				計		上繭 歩 合 (%)	中下繭 蚕 歩 合 (%)	玉繭蚕 歩 合 (%)
			実数	歩合	実数	歩合	実数	歩合	実数	歩合			実数	歩合			
グルクロン酸*	497	487	10	2.0	333	68.4	18	3.7	46	9.4	407	81.9	169	3,426	61	36	3
0.01%	497	481	16	3.2	288	59.9	18	3.7	46	9.6	368	74.0	241	5,007	69	31	0
0.02%	497	487	10	2.0	210	43.1	16	3.3	42	8.6	278	55.9	424	8,709	81	17	2
0.1%	497	478	19	3.8	359	72.2	19	4.0	40	8.4	437	87.0	122	2,548	60	40	0
対 照																	

* 純グルクロン酸末 純度 99.8% (中外製薬株式会社製品) 以下同様

II. 人工飼料に GA を添加した飼育試験

蚕児の飼育時期：昭和 36 年 1 月 16 日～2 月 25 日。人工飼料は福田ら⁽¹⁾の方法にもとづいて第 2 表の配合とし、これに GA を添加した飼料と、参考のためにペクチンを添加した飼料を調製し、無添加飼料を対照とした。

飼育方法：蚕品種は支 122 号(太)×日 124 号。1~2 令は内径 9.0cm, 3~4 令は内径 14.5cm, 5 令以降は内径 23.5cm のシャーレ内で飼育した。飼料の給与は

	第 2 表 飼 料 の 配 合		
	グルクロン酸 添加飼料	ペクチン 添加飼料	無添加飼料 (対照)
桑 葉 粉 末*	5g	5g	5g
澱 粉	1.5	1.5	1.5
キ ナ 粉	1.0	1.0	1.0
蔗 糖	1.0	1.0	1.0
グルクロン酸	10mg	—	—
ペ ク チ ン	—	10mg	—
水	15ml	15ml	15ml

* 桑品種：改良鳳返 採集時期：昭和 35 年 9 月

1 日 2 回で 12 時間ごとに与えた。飼育温度は稚蚕期は 25°, 壮蚕期は 23° に保った。発蛾から結繭までの日数は 35~40 日で、飼育中に 5 眠蚕出現個体も認められた。得られた結果は第 1 図および第 3 表のようで、虫質の強健性におよぼす影響は各試験区間で差があり、無添加・ペクチン添加・GA 添加の順に減蚕が少なく、また蚕児发育の斉一性は GA 添加区が最も優れており、結繭歩合も 40% であった。無添加区では蚕

* Studies on the Physiological Function of Glucuronic Acid in Silkworm, *Bombyx mori* L.
By Toshihiko KAWAKITA and Kaneo HAYASHI* (Sericultural Experiment Station of Gifu;
+ Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Gifu)

第1図 人工飼料にグルクロン酸およびペクチンを添加した蚕児の發育状態 (掃立後33日目)

試 験 区	経過日数(日時)			掃立 頭数 (頭)	減 蚕 歩 合(%)			結 繭 蚕数 (頭)	結 繭 歩合 (%)
	1~3令	4令~結繭	全令		1~3令	4令~結繭	全令		
グルクロン酸添加区	17.01	19.02	36.21	100	47	13	60	40	40
ペクチン添加区	17.01	21.08	39.09	100	52	14	66	34	34
無添加区(対照)	17.01	22.02	39.03	100	55	25	80	20	20

児の發育が不齊であり、結繭歩合は20%であった。ペクチン添加区では1~3令頃までは無添加区に劣っていたが、4令期以降蚕児の發育が齊一になった。しかし1~3令の減蚕歩合が高かったため、結繭歩合は34%にとどまった。

以上の結果からGAは、虫質の強健性付与に有効であり、蚕体生理機能の維持あるいは促進の上に重要な役割をはたすと推定される。

III. 蚕糞中のGA GAの生理的意義を究明するために、健康蚕の糞についてGAの存在を明らかにし、さらに薬品添加桑葉で飼育した場合の蚕糞中のGAについても追求した。

第2図 蚕糞抽出液およびその加水分解液のペーパークロマトグラム

東洋濾紙 No. 51, 2cm×40cm
展開剤: 酢酸エチル, ビリジン, 水, 酢酸(5:5:3:1)
発色剤: アニリン, フタル酸
(1) 1% グルクロン酸
(2) 1% ガラクトロン酸
(3) フェノールフタレイン添食蚕糞抽出液
(4) サリチル酸添食蚕糞抽出液
(5) 無添食蚕糞抽出液
A: 蚕糞抽出液 10ml を 40° において減圧濃縮後乾固させたものに、蒸留水 1ml を加えたもの。
B: 蚕糞抽出液 10ml に N/10 硫酸 5ml を加え、沸騰水浴中で 30 分間加熱した後、水酸化バリウムで中和後遠心分離して上澄液をとり、これを 40° で減圧濃縮して乾固させ、蒸留水 1ml を加えたもの。

昭和 35 年晩秋蚕期 5 令 6 日目蚕 (日 124 号×支 124 号) を用い、実験開始前 4~5 時間絶食させた。そしてこの間に排泄したものはすべて除去した。添加薬品としては 1% フェノールフタレイン水懸濁液およびサリチル酸可溶性澱粉混合粉末 (1:1) を使用し、1日4回給桑時に桑葉添加によって経口投与し、薬品を添加しないものを対照とし、それぞれの排泄糞を採取して実験に供した。

蚕糞 1g に 50 ml の蒸留水を加え、50° の湯浴中で 20 分間浸出し、浸出液を吸引濾過し、濾液 5 ml を Sevag 法で除蛋白したものを蚕糞抽出液とした。

まずこれに稀硫酸 2 滴と亜鉛末 0.1 g を加えて弱い焔で、約 1 分間加熱還元して冷却後濾過した液について、カルバゾール反応⁽²⁾およびナフトレゾルシノール反応⁽³⁾を試み、両呈色反応について光電光度計 (Bausch and Lomb Spectromic 20 型) で測定したところ、いずれの試験区においてもカルバゾール反応の場合には 410 mμ, 530 mμ, 540~550 mμ に吸収のピークを示し、またナフトレゾルシノール反応の場合には 560 mμ に顕著なピークを認めることができ、ウロン酸の排泄されていることを推定した。

次に、蚕糞抽出液およびその加水分解液についてペーパークロマトグラフィーを試みたところ、第2図のように蚕糞抽出液については、サリチル酸添食蚕糞の場合 R_F 0.04 と

第 4 表 カルバゾール反応による抱合グルクロン酸の定性

	水 溶 液	NaOH(1N) 処 理 液
フェノールフタレイン添食蚕 蚕糞抽出液	+(ピンク色)	+(ピンク色)
サリチル酸添食蚕蚕糞抽出液	+(ピンク色)	+(ピンク色)
無添食蚕蚕糞抽出液	+(ピンク色)	+(ピンク色)
グルクロン酸 (40 r)	+(ピンク色)	—

第 5 表 蚕糞中のグルクロン酸の定量

		グルクロン酸量 (蚕糞 1 g 当りの mg)		
試 験 区		総グル クロン 酸	遊離およびエ ステル型グル クロン酸	グルコシッ ド型グルク ロン酸
A	フェノールフタ レイン添加区	4.6	1.3	3.3
	サリチル酸添加区	5.3	1.7	3.6
	無添加区 (対照)	2.4	0.3	2.1
B	グルクロン酸添加区	2.2	0.2	2.0
	無添加区 (対照)	1.8	0.1	1.7

A: 桑葉飼育 B: 人工飼料飼育

とし、アルカル処理後も陽性である場合を抱合型としたところ、第 4 表に示すように抱合型を含んでいることが明らかである。

さらに蚕糞抽出液について能勢⁽⁴⁾のカルバゾール法で、総 GA・遊離およびエステル型 GA・グルコシド型 GA を分離定量したところ、第 5 表の結果を得た。

以上の実験から健康児排泄糞中には、常成分の 1 つとして各型 GA が排泄されていること、GA と抱合可能な構造を有する化合物を桑葉に添加することにより、排泄糞中の各型 GA 量は顕著に増加すること、および排泄された GA は抱合体、すなわちグリコシド型結合として排泄されるものが大部分を占めることを明らかにした。

なお、前記人工飼料による飼育試験における GA 添加区、および無添加区の 5 令期蚕児が排泄した糞 1 g をとり、蒸溜水 50 ml を加え、50° で 30 分間抽出を行い、上記の方法で定量した結果も第 5 表のようであった。この場合も無添加区においても各型 GA が排泄されているが、GA 添加区は無添加区に比べて、蚕糞中の各型 GA 量はいずれも増加しているし、排泄 GA は大部分グルコシド型である。

このように健康蚕蚕糞中に GA が存在することが証明され、また GA と抱合体形成の可能性のある化合物を桑葉に添加して蚕児を飼育すると、その糞中に GA の量が増加することを認めたのはきわめて興味のある事実で、後述のように餌食膜にヒアルロン酸の存在が証明されたことも考え合せて、GA 抱合解毒が餌食膜系内において生起されるという推論もできよう。

IV. 家蚕餌食膜のムコ多糖類 家蚕の生育と GA との関係を追求する意味から、蚕体器官における GA の検索を試み、著者の一人河北⁽⁵⁾は、餌食膜の成分として GA を構成成分とする酸性多糖類の存在を組織化学的に証明し、さらにその分離法ならびに理化学的性質について研究したが、再検討したところ次のように酸性のムコ多糖類であることが証明された。

(1) **ムコ多糖類の分離**：昭和 35 年春蚕期に、家蚕 (日 124 号×支 122 号) の 5 令盛食蚕約 6,000 頭から餌食膜をとり出し水中で桑葉片等を充分除去して、クロロホルム飽和の 0.1 N 食塩水 2 l 中に入れて保存し試料とした。試料を木綿布で濾過して沈澱物 (1) と濾液 (1) とに分け、沈澱物 (1) はホモゲナイザーで磨砕しながら、さらにクロロホルム飽和 0.1 N 食塩水 2 l を加えて抽出し、木綿布で濾過し沈澱物 (2) と濾液 (2) とに分け、濾液 (1), (2) を合して約半量に減圧濃縮し、5 N 塩酸で pH 2.5 とし、遠心分離を行なって上澄液と沈澱物 (3) とに分けた。そして沈澱物 (2) と沈澱物 (3) を合して (約 31 g)、これに蒸溜水 31 ml を加え、これに 2 N 塩酸を加えて pH 2 とし、ペプシン (キシダ化学製品 1:10,000) を 1% の割に加えて 37° で 24 時間消化を行ない、消化後さらに 10 N 苛性ソーダ液を加えて pH 7.4 とし、トリプシン (メルク製品) を 1% の割に加えて 37° で 24 時間消化を行ない、これを遠心分離して上澄液を上記の上澄液と合した。この液約 2 l に Jeanloz 等⁽⁶⁾の方法の 1 部にならない硫酸 563 g を加えて振盪攪拌し、5° で 2 時間放置した後遠心分離して沈澱を集め、こ

0.14, フェノールフタレイン添食蚕糞の場合 R_F 0.05 と 0.15, 無添食蚕糞の場合 R_F 0.01 と 0.13 に、それぞれアニリンフタル酸によって鮮明な褐色を呈し、ナフトレゾルシノール・トリクロール酢酸によって鮮明な青色に発色する 2 つのスポットを示したが、その加水分解によってはいずれも R_F 0.16 にただ 1 つのスポットを示し、これは対照とした GA にはほぼ一致した。

そこで GA の存在様式として遊離型かあるいは抱合型かを明らかにするために、能勢⁽⁴⁾の方法によって蚕糞抽出液 0.5 ml に 1 N NaOH 液 0.1 ml および蒸溜水 0.4 ml を加えて 2 分間沸騰水浴上で加熱し、カルバゾール硫酸法によって発色させ、アルカリ処理で反応が陰性となった場合を遊離型

第 6 表 胃食膜ムコ多糖類の定性

	家蚕胃食膜多糖類	臍帯多糖類	コンドロイチン硫酸
ウロン酸 { ナフトレゾルシンノール反応 (赤紫色)	+	+	+
カルバゾール硫酸反応 (桃色)	+	+	+
アミノ糖 Elson-Morgan 反応 (赤色)	+	+	+
N	+	+	+
S	—	—	+

れを蒸留水 100 ml にとかし 2 倍量の 95% アルコールを加えて, 3 時間氷室内に放置して遠心分離を行ない, 得た沈澱をさらに蒸留水 84 ml に懸濁して硫酸 40 g とピリジン 4 ml を加えて, 振盪攪拌氷室内に 24 時間放置した。

酸性多糖類は面間層に集まるので, 下面をサイフォンで除いて得た面間層物質を再び水に懸濁して前回と同様に硫酸とピリジンを加え振盪攪拌氷室内に 24 時間放置後再び面間層物質を採取した。これを水にとかし 2 倍量の 95% アルコールを加えて 3 時間氷室内に放置遠心分離して沈澱物を集め, 水にとかし Sevag 法で 2 回除蛋白後, その上澄液を流水および蒸留水中でそれぞれ 24 時間透析し, 2 倍量の 95% アルコールを加えて得た沈澱物を常法によって乾燥約 100 mg の白色粉末を得た。

(2) ムコ多糖類の化学的性状: 水に易溶。ウロン酸・アミノ糖の定性試験を試み, また窒素と硫黄の有無をしらべたところ第 6 表の結果を得た。なお対照として臍帯を用いて上記方法に従って分離した多糖類およびコンドロイチン硫酸 (和光純薬工業会社製品) を用いた。この結果から, 家蚕胃食膜多糖類は臍帯多糖類, すなわちヒアルロン酸と類似していることが推定できる。

(5) 加水分解生成物の検索: 多糖類 5 mg を 0.15 M 食塩水を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し, ヒアルロニダーゼ 5,000 V.U.M. (持田製薬の製剤, スプレーゼ) 1 mg を加えて 48 時間消化を行ない, 加水分解液についてペーパークロマトグラフィーを試みた結果は第 3 図のようで, GA と N-アセチル・グルコサミンが証明された。

第 3 図 構成糖のペーパークロマトグラム

東洋濾紙 No. 51

展開剤: ブタノール, 酢酸, 水 (38:12:50)

発色剤: 5% ベンチジンアルコールおよびエリッヒ試薬

a: 家蚕胃食膜多糖類加水分解物

b: 臍帯多糖類加水分解物

c: 1% グルクロン酸

d: 1% N-アセチルグルコサミン

	R_F	色
スポット 1	0.14	褐色
スポット 2	0.34	紫紅色
グルクロン酸	0.14	褐色
N-アセチルグルコサミン	0.34	紫紅色

以上の結果から, ここに得た多糖類はヒアルロン酸類似のものであることを確認した。

要 約

家蚕における GA の生理的機能を追求し, 次の結果を得た。

(1) 生理的障害を負荷した蚕児に対し, 桑葉に GA を添加して飼育したところ, 蚕児の成長・発育および生存に良好な結果を得, 収繭量において増加を認めた。

(2) 人工飼料に GA を添加して飼育したところ, 同様に蚕児の成長・発育および生存によい結果を示し, 結繭も良好であった。

(3) 蚕児の糞の常成分の一つとして GA が排泄されること, 桑葉に GA と抱合型をとり得る薬物を添加して飼育すると GA の排泄量が增大すること, 排泄された GA の形態は抱合型のものが多いこと等を明らかにした。

(4) 蚕消化管内胃食膜から, ヒアルロン酸様物質であるムコ多糖類を分離した。

本研究に有益な助言を賜った岐阜薬科大学小瀬洋喜博士, 東京教育大学西沢一俊博士, ご援助いただいた岐阜蚕業試験場長竹本信夫氏, 同場渡辺卓也, 太田義男の両氏, 臍帯を分与いただいた岐阜県立病院石原恒二博士, 薬剤を提供された中外製薬会社の各位にお礼申上げる。

(1) 福田紀文他: 日本蚕糸学雑誌, **29**, 1(1960)。

(2) Z. Dische: *J. Biol. Chem.*, **167**, 189(1946)。

(3) 町田誠之: 蛋白質・核酸・酵素, **5**, 47(1960)。

(4) 能勢勇一: 日本薬理学雑誌, **49**, 186(1953)。

(5) 河北俊彦: 医学と生物学, **55**, 150 (1960);

57, 77 (1960); 科学, **31**, 262 (1961); 日本蚕糸学雑誌, **30**, 191, 325 (1961)。

(6) R. W. Jeanloz, E. Forchielli: *J. Biol. Chem.*, **186**, 495 (1950)。