[農化 第 41 卷, 第 8 号, p. 393~398, 1967]

カイガラムシの脂質に関する研究 (第 8 報)

モミジワタカイガラムシの脂質

橋本 皓, 山田和彦, 向井克憲

(大阪府立大学農学部農芸化学教室)

昭和 42 年 3 月 25 日 受 理

Studies on the Lipids of Coccids

Part VIII. Chromatographic Separation of the Lipids from *Lecanium horii* (KUWANA)

By Akira HASHIMOTO, Kazuhiko YAMADA and Katsunori MUKAI

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture

The lipid extracts from the adult female of *Lecanium horii* were separated and characterized, using column, thin-layer and gas-liquid chromatographies together with other chemical and physical methods. It was found that the lipids detected were more than twenty components, Triglycerides (TG) were the major components, about 79%, and waxes and phospholipids (PL) accounted for about 8%, respectively. There were also found significant amounts of hydrocarbons, diglycerides (DG) and free alcohols. Specific distribution of fatty acids was found in TG, DG and PL. Lauric acid was contained in high percentages, 95.8 and 87.1%, respectively, in TG and DG, whereas fatty acids of PL were mainly of the 18-carbon varieties, with high proportions of dienes.

The major components of the phospholipids were phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine. Phosphatidyl inositol, lysophosphatidyl choline and cardiolipin-like phospholipid were also present.

(Received March 25, 1967)

1. 緒 言

モミジワタカイガラムシ (*Lecanium horii* KUWANA) は、本邦原産で、カタカイガラムシ科に属している⁽¹⁾。本ムシの寄主植物は、著者らの堺市における調査結果では、主にニレ科 (ニレ, アキニレ, エノキ, ケヤキ), ブナ科 (シノキ, ウバメガシ, クヌギ), クワ科 (イチジク) などであった。

いままでに、本ムシの脂質研究としては、河野⁽²⁾の報告があるだけである。それによると、ロウ状物質は、cerylcerotate が主であることが明らかにされ、また脂肪属炭化水素, cerotene, 未知環状炭化水素 $C_{11}H_{20}$ ~ $C_{11}H_{22}$, 未知環状アルコール $C_{22}H_{36}O$, 未知樹脂酸 $C_{14}H_{28}O_2$ が分離されている。しかし、当時はまだクロマトグラフ分析が適用されていなかったため、本ムシの脂質研究には検討の余地が多い。今回著者らは、包卵雌成虫

の脂質のクロマトグラフ分析を行ない脂質組成を明らかにした。とくに未検討であったグリセリドの脂肪酸組成およびリン脂質組成を明らかにしたので報告する。

2. 実験材料および方法

2-1. 供試モミジワタカイガラムシ

堺市において 5 月上旬, アキニレおよびエノキに寄生している包卵雌成虫を採集し、実験に供した。アキニレの枝幹に寄生している状態を Fig. 1 に示した。体長は約 9 mm, ほぼ円形, 扁平である。外観の特徴は、寄主植物の樹皮に似た灰褐色の背皮が存在することである。そして背皮は亀甲状で、その中央を縦走る隆起線がめだっている。卵のうは、白色で縦に数条の深溝と多数の浅溝がある。ムシは 4 月下旬頃よりいちじくしく肥大しはじめ、淡黄色の卵が産下される。採集時の卵は成熟し、橙黄色であった。

Fig. 1. Adult Female of *Lecanium horii* on a *Ulmus parifolia* Jacq.

2-2. 脂質の抽出

供試全虫を乳鉢にて十分磨砕した。それをクロロホルム-メタノール (2:1) 混液 (以下 CM と略記) 中に浸し、しばらくかきまぜてから吸引濾過した。濾液は窒素ガスを入れ密閉し、 -20° で保存した。残渣は数個の共栓フラスコ (250 ml 容) に分けて入れ、それぞれに新たに CM を試料の約 5 倍量加えた。フラスコ内は窒素ガスと置換した後、それを swirler (約 160 r. p. m.) にとりつけ、室温 (26° 前後) で 24 時間ふりまぜ抽出をした。吸引濾過してから濾液は上記のように保存し、再び残渣に CM を加えて、swirler で 24 時間抽出した。同上処理し、濾液は保存中のそれと合一し、Folch 法⁽³⁾により水洗した。試料液は無水硫酸ナトリウムで脱水して濾過した。濾液はロータリーエバポレーターを使用して 35° 以下で溶媒を留去し、脂質を得た。

2-3. 分析方法

脂質の分離分析は、既報^(4,5)に記載した要領で行なった。リン脂質組成を求める実験は、今回は試料液を薄層クロマトグラフィー (TLC) 用のスポットフィルム (5×20 cm, 東京化成工業株式会社) に塗布し、常法の 1 次元展開を行なった。展開溶媒は、クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (50:25:8:4) を使用した。ヨウ素蒸気で発色させて、各リン脂質の分離帯をフィルムごとにはさみできりとり抽出処理した。70% 過塩素酸で脂質を分解してリンを比色定量^(6,7)し、リン脂質組成を求めた。

3. 実験結果および考察

3-1. 脂質の収量と性状

Table I に脂質の収量と性状を示した。すなわち 160 g (湿重量) のムシから、褐色、低酸価の脂質 31.8 g を得た。収率は約 20% である。ケン化価が大であるのは、後述のラウリン酸含量が大であるためである。また融点の高いのは、脂質がトリラウリンが主成分であるためと考えられる。

3-2. ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画

上に得た脂質の構成成分を分離同定するために、まずカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果は Fig. 2 のとおりである。溶媒組成を適宜かえて展開し、溶出物の収量曲線を求めた。25 ml 単位に溶出液を回収した。溶媒を留去、そして溶出物量の精秤が終った各クロマトチューブは 1 本ずつ後記の TLC を行ない、成分数がチェックされた。このようにして、溶出物の収量曲線上に

TABLE I. YIELD AND PROPERTIES OF THE LIPIDS EXTRACTED FROM *Lecanium horii*

Yield	(g)	31.8
	(%)*	19.9
Acid value		5.9
Saponification value		238.0
Iodine value		12.5
Melting point ($^{\circ}\text{C}$)		43.8~44.2

* Per cent of wet weight.

Fig. 2. Silicic Acid Chromatography of the Lipids Obtained from *Lecanium horii*.

Column: 3 cm diam, containing 60 g of 100~200 mesh silicic acid.

Sample: 1.0679 g.

Eluting solvents: A, *n*-hexane; B, *n*-hexane-benzene (50:50); C, benzene; D, benzene-ether (95:5); E, benzene-ether(85:15); F, benzene-ether(70:30); G, benzene-ether (50:50); H, ether; I, methanol.

Fig. 3. Silicic Acid Thin-Layer Chromatograms of the Fractions Separated by Column Chromatography.

Solvent systems: (a) *n*-hexane;

(b) *n*-hexane-ether-acetic acid (70:30:1)

Detection methods: Sulfuric acid spray followed by charring etc.

Peak numbers correspond to those in Fig. 2.

The spots identified: 1, hydrocarbons; 2, 3 and 4, waxes; 5, free alcohols; 6, triglycerides; 7, free fatty acids; 8 and 9, diglycerides; 10, monoglycerides; 11, unidentified compounds; P, polar lipids, mainly phospholipids.

Intensity of spots: ● strong; ○ medium; ⊙ weak.

得られた各ピーク点を中心に適宜溶出物を合一した。全部で9つのピークが得られ、9分画とした。

3-3. 単純脂質および誘導脂質成分の検討

カラムクロマトで得た分画物質は、つづいて TLC により分離分析された。使用したいくつかの展開溶媒の中で、代表的な溶媒により得た薄層クロマトグラムの一覧は、Fig. 3 に示すとおりである。スポット 1~11 は、単純脂質および誘導脂質成分である。既報^(4,5)に記載と同様にしてそれぞれのスポットが同定された。スポット 1 は炭化水

素である。融点は 25~26° で室温では液状であった。不飽和炭化水素の含まれていることが、先のツノロウムシの虫体の不飽和炭化水素を検出した方法⁽⁸⁾で確認された。スポット 1 はたぶん、河野⁽²⁾が分離している cerotene や未知環状炭化水素の混合物ではないかと思われる。これについては追試したい。

スポット 2 は、白色固体のワックスである。融点は 76.0~77.5° を示した。これは河野が溶媒分別結晶法で得ている cerylcerotate の融点 (76.5~77°) に一致する。またケン化処理後 TLC で、高級アルコールおよび脂肪酸のみが検出された。よってスポット 2 は、true waxes である。そしてたぶん、cerylcerotate が主要ワックスと推定される。

ピーク 3 の分画物質からは, 4 つのスポットが検出された。この分画は, ケイ酸カラムにより再クロマトグラフィーを行ない, 2 つに分画した。すなわちスポット 2 (微量), 3, 4 の混合物と, スポット 5 物質とである。前者の融点は $51.0 \sim 58.0^\circ$ であった。少量のベンゼンに溶解し, その 2~3 滴を濾紙に塗布し, 過マンガン酸カリウム溶液⁽⁹⁾に浸漬して明らかに酸化され着色した。Liebermann-Storch 反応⁽¹⁰⁾は微赤色から黄褐色化し陽性であった。硝酸銀含浸 TLC⁽⁸⁾により不飽和成分が検出された。そしてスポット 2, 3, 4 はケン化すれば消失し, その分解生成物には TLC で高級アルコールおよび脂肪酸が検出された。以上のことからスポット 3, 4 もワックスである。すなわち飽和および不飽和の true waxes が存在し, 環式ワックスなどの存在も推定される。

スポット 5 は, パナジウムオキシソ 錯塩との反応⁽¹¹⁾が陽性であること, 赤外線吸収スペクトルにより水酸基 ($3600 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$, $1060 \sim 1070 \text{ cm}^{-1}$) の存在がみとめられること, TLC によりステアリルアルコールやオレイルアルコールと同じ R_F 値を与えることから, 明らかに遊離アルコールである。その融点は 48° までにとけるものと, 62° 付近でとけるものがあり, はっきりしない。上記の過マンガン酸カリウム溶液で酸化され着色することから不飽和アルコールも存在する。また Liebermann-Storch 反応がやはり微赤色から黄褐色化することから, 河野が記載している環状アルコールの混在がうかがわれる。

以上, ピーク 1, 2, 3 から炭化水素, ワックス, 遊離アルコールをそれぞれ分離したが, その構成成分の精査, 組成決定は, 今後に検討したい。ことに河野が記載している未知環状炭化水素やアルコールは, 興味ある課題と考えている。

スポット 6 はトリグリセリドである。その融点は $45.0 \sim 45.8^\circ$ を示し, トリラウリンの融点⁽¹²⁾ ($45 \sim 46.5^\circ$) に近似した。ケン化してから脂肪酸メチルを調製し, その組成をガスクロマトグラフィーで検した結果は Table II のようである。ラウリン酸が 95.8% の高率を占めた。すなわちトリグリセリドは, ほとんどトリラウリンから構成されているといえる。これは本ムシ脂質の特徴である。トリグリセリドの構成脂肪酸がこのような特異的分布を示す事実は, 他に類例がないように思われ, カイガラムン類の化学分類上非常に興味深い。今回の実験は全

TABLE II. FATTY ACID COMPOSITION OF TRIGLYCERIDES, DIGLYCERIDES AND PHOSPHOLIPIDS SEPARATED FROM *Lecanium horii*

Fatty acid	Triglycerides (%)	Diglycerides (%)	Phospholipids (%)
8 : 0	trace	trace	trace
10 : 0	1.7	1.3	trace
12 : 0	95.8	87.1	2.0
14 : 0	2.2	2.4	0.2
15 : 0	—	—	trace
16 : 0	0.1	1.4	2.2
16 : 1	trace	0.1	0.8
17 : 0	—	—	0.1
18 : 0	0.2	3.1	32.1
18 : 1	trace	2.1	12.4
18 : 2	0.1	1.7	42.9
20 : 0	0.1	trace	7.3
22 : 0	trace	0.8	trace
Saturated	99.9	96.1	43.9
Unsaturated	0.1	3.9	56.1

Conditions : App. Yanagimoto GCG-2; 3 m column packed with Daiaolid S (80~100 mesh) containing polydiethylene glycol succinate; column temp. 220° ; flow rate of helium gas 60 ml/min.; bridge current 150 mA; chart speed 10 mm/min.

虫を磨砕処理した。よって, 卵, 卵のう, 背皮, その他の虫体部分にトリグリセリドが多く分布しているのかは明らかでない。この点はさらに追試する。いちおう著者らが先のツノロウムシの卵の脂質において, ラウリン酸がカプリン酸とともに高率であったことから, おそらく本ムシにおいてもトリグリセリドは, 卵の構成脂質として存在するものと思われる。

スポット 7 は遊離脂肪酸である。総脂質の TLC では, プレートに試料をかなり過剰に塗布しないと検出できず微量である。しかしカラムクロマトにより濃縮され, ピーク 6 の分画から検出された。遊離脂肪酸含量が大であれば, その一部はトリグリセリドのフラクションに同時に溶出してくることもあるので, 再クロマトグラフィーしなければならないが, 本ムシではその必要は全くなかった。遊離脂肪酸が微量であるにかかわらず, Table I のように酸価が 5.9 であった。よって脂肪酸以外の酸性成分も存在することになる。多分, それは樹脂酸類であろう。その物質の一群はスポット 11 に存在し, 河野が記載している未知樹脂酸 $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_2$ も, スポット 11 に含まれると考えている。

スポット 8, 9 はジグリセリドである。TLC でこの分離帯をかきとり, 脂肪酸組成を調べた。結果は Table II

Fig. 4. Tow-Dimensional Thin-Layer Chromatograms of the Polar Lipids Separated by Column Chromatography.

Coating material: silica gel G.

Solvent systems: first direction, chloroform-methanol-7N ammonium hydroxide (60:35:5); second direction, chloroform-methanol-7N ammonium hydroxide (35:60:5).

The detection methods are the same as in Table III.

The spots identified: 13, cardiolipin-like; 14, phosphatidyl ethanolamine; 15, phosphatidyl inositol; 16, phosphatidyl choline; 18, lysophosphatidyl choline; 12 and 17, unidentified compounds.

TABLE III. COLOR REACTIONS OF THE POLAR LIPIDS SEPARATED BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

Reagents	Spot No.*								
	12	13	14	15	16	17	18	19	
Iodine vapor	+++	+	+++	+	+++	+	+	+	
Ninhydrin	—	—	+++	—	—	+	—	—	
Ammonium molybdate perchloric acid	—	++	+++	+	+++	—	+	—	
Ammonical silver nitrate	—	—	—	+	—	—	—	++	
Dragendorff's	++	—	—	—	+++	—	+	—	
Hydroxylamine ferric chloride	+++	+	++	+	++	±	+	+	

* Spot No. corresponds to those in Fig. 4.

のように、ジグリセリドも高率のラウリン酸 (87.1%) から構成される特異的な脂肪酸組成であることを認めた。スポット 10 はモノグリセリドでその存在は微量であった。なおステリンは検出されなかった。

3-4. リン脂質成分の検討

カラムクロマトで得たピーク 8, 9 物質は、リン脂質が主成分であった。TLC の結果、ピーク 8, 9 は質的に

TABLE IV. PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF *Lecanium horii*

Phospholipids	Percentage of each phospholipid*
Cardiolipin-like	13.4
Phosphatidyl ethanolamine	32.0
Phosphatidyl choline plus phosphatidyl inositol**	46.4
Lysophosphatidyl choline	3.6
Total recovery	95.4

* $\frac{\text{Lipid P in fraction}}{\text{Total lipid P chromatographed}} \times 100$

** Small amount.

同じであることが認められたので両者を合一し実験した。Fig. 4 は二次元展開で得たクロマトグラムである。各スポットの呈色反応は Table III のようである。リン脂質は 5 種存在し、Fig. 4 に記載のとおり同定された。Table IV にリン脂質組成を示した。本ムシの主要リン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、およびホスファチジルエタノールアミン (PE) である。ホスファチジリンシット (PI) は少量であった。クロロホルム-メタノール-酢酸-水 (50:25:8:4) で 1 次元展開すると、本ムシでは PC の含量が大であるために、PI の R_F 値と近似し、両者の分離がよくなかった。しかし Fig. 4 に示すように、二次元展開では両者は完全に分離した。ところで PC, PE, PI, スフィンゴミエリン (Sph) などは、多くの昆虫における主要なリン脂質として知られている⁽¹³⁾が、カイガラムシ類のリン脂質についてはほとんどわかっていない現状である。著者らが先に報告したように、ツノロウカイガラムシのリン脂質においては PC, PE が主成分であった⁽⁵⁾。また、イボタロウカイガラムシにおいても PC, PE が主成分であった⁽¹⁴⁾。これらのことから、PC, PE はカイガラムシ類に広く分布するリン脂質成分と思惟される。

PI はモミジワタカイガラムシではじめて検出し得たが、少量であり、他のカイガラムシにおける存在の普遍性が今後の研究にまたれる。Sph は上記のツノロウ、イボタ両カイガラムシおよびモミジワタカイガラムシには検出されなかった。前記のステリンが検出されないこととあわせて、カイガラムシの脂質代謝上興味をもたれる。

リン脂質分画の脂肪酸組成を Table II に示した。C₁₈ 酸が 87.4% を占め、トリグリセリドやジグリセリドにおける脂肪酸分布とは全く対照的であった。とくにオク

TABLE V. THE COMPOSITION OF LIPIDS
SEPARATED FROM *Lecanium horii*

Lipid class	%*
Hydrocarbons	2.5
Waxes	8.2
Free alcohols	0.6
Triglycerides	78.5
Free fatty acids	trace
Diglycerides	0.6
Monoglycerides	trace
Phospholipids	8.1
Unidentified compounds	1.5

* Expressed as percentage of total weight recovered from the column.

Overall recovery was 99.9%.

タデカジェン酸が高率に含まれることから、この酸から構成される不飽和の PC や PE の存在が予想される。

3-5. 脂質組成

以上のように、カラムクロマトおよび TLC による分離分析の結果から、本ムシの脂質組成は Table V のように要約される。約 80% を占めるトリグリセリドが主要成分である。

4. 要 約

モミジワタカイガラムシ（包卵雌成虫）の脂質分析を行なった。

- (1) 20 以上の脂質成分の存在を認めた。
- (2) 主成分はトリグリセリドで、78.5% を占めた。そしてワックス 8.2%, リン脂質 8.1%, 炭化水素 2.5%, 他に遊離アルコール、ジグリセリドなどが少量存在した。
- (3) 遊離脂肪酸は微量であった。
- (4) トリグリセリドの構成脂肪酸は、ラウリン酸が

95.8% の高率を占め、トリグリセリドはトリラウリンから構成されるものと判定された。ジグリセリドも高率のラウリン酸 (87.1%) から構成された。これに対してリン脂質の脂肪酸組成は、 C_{18} 酸の合計が 87.4% を占め、二者とともに特異的であった。

(5) リン脂質成分は 5 種存在し、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンが主であった。

本研究に際し、ご高配を賜りました本学教授岩狭与三郎博士、有益なご助言を賜りました京都府立大学教授野田万次郎博士に深く感謝いたします。

- (1) 石井 梯ら編：日本昆虫図鑑，北隆館，1950，p. 368.
- (2) 河野通男：本誌，10，1228 (1934).
- (3) J. Folch, M. Lees, G. H. Sloanestany : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957).
- (4) 橋本 皓，向井克憲：本誌，39，489 (1965).
- (5) 橋本 皓，向井克憲：本誌，40，277, 336 (1966).
- (6) F. Parker, N. F. Peterson : *J. Lipid Res.*, **6**, 455 (1965).
- (7) C. H. Fiske, Y. Subbarow : *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- (8) 橋本 皓，向井克憲：本誌，41，159 (1967).
- (9) 平山 修，井上吉之：本誌，35，138 (1961).
- (10) 上野誠一，岡村善策：油脂実験法，丸善出版，1950，p. 251.
- (11) F. Figl : "Spot Test's in Organic Analysis", 1960, p. 184.
- (12) 喜多源逸：油脂化学及試験法，至文堂，1965，p. 330.
- (13) A. R. Gilby : *Annual Review of Entomol.*, **10**, 141 (1965).
- (14) 橋本 皓，向井克憲：日本農芸化学会大会講演要旨，1966 年 4 月。