蜂類の虫体に存在する螢光物質について

石黒伊三雄, 池野武行,^{1a)} 松原 弘^{1b)}

岐阜薬科大学,^{1a)} 中津商業高等学校^{1b)}

Studies on the Fluorescent Substances in the Body of Bees

ISAO ISHIGURO, TAKEYUKI IKENO^{1a)} and HIROMU MATSUBARA^{1b)}

Gifu College of Pharmacy,^{1a)} Nakatsu Commercial High School^{1b)}

(Received July 13, 1973)

The fluorescent substances in the body of four kinds of bees were examined at the three stages of larva, pupa, and imago by paper chromatography. It was confirmed clearly on chromatograms that fluorescent substances of *Apis mellifera* L. and other species were four and five, respectively, excluding riboflavin. Three of these fluorescent substances, BV-substance of *Rf* 0.05, V-substance of *Rf* 0.18, and B-substance of *Rf* 0.45 on the paper, were recognized as major components at three stages of bees, and other substances were negligible on the paper. These three substances were isolated in a crystalline form from defatted powder of the larva of *Vespa lewisi* C. by gel filtration over Sephadex G-10 and absorption chromatography on alumina. These three substances were identified with L-kynurenine, isoxanthopterin, and xanthurate 4,8-diglucoside from chemical and physical properties. The occurrence of xanthurate 4,8-diglucoside as a tryptophan metabolite has been demonstrated for the first time in bees.

前報²⁾で著者らは蜜蜂, 地蜂, 赤蜂, すずめ蜂の幼虫, 蛹, 成虫各期における虫体成分の変動について観察し, 若干の知見を得たが, 今回はこれら蜂類の虫体に数種の螢光物質が特徴的に存在することを認めたので, その単離精製と化学的性状について検討した。

昆虫の螢光物質はプテリン体やトリプトファン (Try) の代謝産物が知られているが, プテリン体は古く Wieland ら³⁾が蝶の翅からロイコプテリンやキサントプテリンを分離し, その後数種のプテリン体が見い出された。一方, Butenandt ら⁴⁾は昆虫の眼色素オンモクローム類が Try 代謝に由来することを明らかにし, その代謝産物として *Calliphora* の蛹から 3-オキシキヌレニンを分離した。⁵⁾ また, 稲神⁶⁾は蚕の変異種に 3-オキシキヌレニン, 梅鉢⁷⁾は蝶の翅にキヌレニンが多量含まれることを認め, その存在意義が注目されるようになった。したがって蜂類の虫体に含まれる主な螢光物質はプテリン体や Try の代謝産物と推定される。

しかし, 蜂類の虫体に含まれる螢光物質についてはこれまで十分に検索されていなかったが, 著者らは蜂類の虫体に見られる 3 つの螢光物質を単離精製し, それぞれキサントプレン酸 (XA)-4,8-ジグルコシッド, イソキサントプテリン (IX) および L-キヌレニン (Ky) であることを確認したのでこれについて述べる。

実験の部

実験材料

蜂類の螢光物質の分布については蜜蜂, 地蜂, 赤蜂, すずめ蜂の幼虫, 蛹, 成虫を用い, 螢光物質の単離は主に地蜂の幼虫を実験材料とした。蜜蜂は本学で飼育したもの, その他の蜂は野生のものを 9 月中旬に岐阜県東濃地方で採取した後, 蜂巣から幼虫, 蛹, 成虫を取り出して直ちに使用した。

- 1) Location: a) 492-36 Mitahora, Gifu; b) Komaba, Nakatsugawa.
- 2) 石黒伊三雄, 池野武行, 松原 弘, 薬誌, 93, 1222 (1973).
- 3) H. Wieland, H. Metzger, C. Schöpf, M. Bülow, *Ann. Chem.*, 507, 226 (1933).
- 4) A. Butenandt, U. Schiedt, E. Bieker, *Ann. Chem.*, 588, 106 (1954).
- 5) A. Butenandt, W. Wiedel, H. Schlossberger, *Z. Naturforsch.*, 4b, 242 (1949).
- 6) 稲神 馨, 日本蚕糸学雑誌, 24, 85 (1955).
- 7) Y. Umebachi, M. Katayama, *Zool. Mag. Tokyo*, 63, 57 (1954).

実験方法

1. 蜂類に含まれる蛍光物質のペーパークロマトグラフィー (PPC) による検出 4 種の蜂の幼虫, 蛹, 成虫を一定量秤取し, これに 4 倍量の 40% エタノールを加えてホモジネートとなし, 遠心上清を濃縮後その一定量を東洋ろ紙 No. 51 に塗抹して PPC を行なった. 展開溶媒は *n*-ブタノール/酢酸/水 (4:1:1) で 14 時間展開後風乾してから紫外線下で蛍光色調および蛍光強度ならびに *Rf* 値を観察した.

2. 蜂類に含まれる蛍光物質の呈色反応 ペーパー上に分離された蛍光スポットは *Rf* 値を確認後 Dalglish の方法⁸⁾ に従って次のような呈色反応を実施した. (1) ジアゾ反応, (2) Bratton-Marshall 反応, (3) ニンヒドリン反応, (4) 過クロール鉄反応, (5) NH_3 性硝酸銀反応, (6) カメレオン反応, (7) エールリッヒのアルデヒド反応. 上記反応をペーパー上で行ない, 各蛍光物質について確認した.

3. 蜂類に含まれる蛍光物質の分離精製法 蜂類の蛍光物質としては 4 種の蜂の幼虫, 蛹, 成虫各期に共通して 3 つの蛍光物質が多く認められたので地蜂の幼虫を材料として単離した. 分離精製法の概略は新鮮な地蜂の幼虫を凍結乾燥して得られたものに 5 倍量のエーテルを加え十分に脱脂した乾燥粉末 150 gr. を 40% メタノール抽出後セフデックス G-10 によるゲルろ過, 活性アルミナによる吸着クロマトおよびろ紙粉末による分配クロマトなどを行って精製した. その詳細は実験結果で述べる.

4. 単離された蛍光物質の紫外部吸収スペクトルの測定 蜂類の虫体から単離された蛍光物質の紫外部吸収スペクトルは島津製 MPS-50L で測定した.

5. BV-物質の酵素水解について 地蜂の幼虫から分離された BV-物質はグルコシッド抱合体と思われたので, これを確認するため Helferich 法⁹⁾ に従って市販の甘扁桃製 β -グルコシダーゼ (300 U/mg) により酵素反応系を調製して酵素水解を実施した. なお, この水解液中に生成したグルコースは *Aspergillus niger* より得たグルコースオキシダーゼ-カタラーゼを用いて Bentley¹⁰⁾ による酵素反応系でグルコースの分解活性を測定した.

実験結果

1. 蜂類の虫体に存在する蛍光物質の呈色反応について

4 種の蜂の幼虫, 蛹, 成虫に含まれる蛍光物質を前述の方法で抽出後 PPC により観察するとペーパー上に分離された蛍光スポットはビタミン B_2 の蛍光スポットを除き蜜蜂で 4 個, 他の蜂で 5 個が認められた. これらの蛍光スポットは各蜂の幼虫, 蛹, 成虫で量的に若干の差異を認めたがいずれにも存在することが確認された. このうちペーパー上 *Rf* 0.05 を示す青紫色蛍光物質 (BV-物質), *Rf* 0.18 の紫色蛍光物質 (V-物質) および *Rf* 0.45 の青色蛍光物質 (B-物質) の 3 つの蛍光スポットは 4 種の蜂にすべて存在し, いずれも量的に多く鮮明なスポットとして認められたが他の蛍光スポットは極めて僅少であった. そこでこの 3 種の蛍光スポットを確認するため, ペーパー上で呈色反応を試み Table I に示すような結果を得た.

TABLE I. Color Reactions of Three Fluorescent Substances in the Body of Bees

Substance	BV-Sub.	V-Sub.	B-Sub.	L-Kynurenine
Fluorescence	blue-violet	violet	blue	blue
<i>Rf</i> value at PPC ¹⁾	0.05	0.18	0.45	0.45
Diazo reaction	—	—	+	+
Bratton-Marshall reaction	—	—	+	+
Ninhydrin reaction	—	—	+	+
FeCl_3 reaction	—	—	—	—
NH_3 - AgNO_3 reaction	—	—	—	—
KMnO_4 reaction	—	—	—	—
Ehrlich's aldehyde reaction	—	—	+	+

1) solvent: *n*-butanol/AcOH/ H_2O (4:1:1)

すなわち, 呈色反応は *Rf* 0.45 を示す B-物質のみジアゾ反応, Bratton-Marshall 反応, ニンヒドリン反応, アルデヒド反応が陽性で, 他の蛍光物質はいずれの反応も陰性であった. この際, B-物質は *Rf* 値, 蛍光色調および呈色反応が標品の Ky とよく一致したので Ky と推定した.

8) C.E. Dalglish, *Biochem. J.*, **52**, 3 (1952).

9) B. Helferich, *Ergebn. Enzymforsch.*, **2**, 74 (1933); **7**, 83 (1938).

10) R. Bentley, "Methods in Enzymology," Vol. I, 1955. p. 340

Fig. 1. Isolation and Purification Procedures of Three Fluorescent Substances in the Larva of *vespa Lewisii* C

2. 蜂類の虫体に含まれる BV-, V-, B- 物質の分離精製

蜂類に存在する BV-, V-, B-物質の分離精製は地蜂の幼虫の凍結乾燥物をエーテルで十分に脱脂した乾燥粉末を実験材料とした。

分離精製法は Fig. 1 のように地蜂幼虫の脱脂乾燥粉末 150 g を 40% メタノール 500 ml で 3 回抽出し、抽出液を集めて減圧下で 1/100 容までに濃縮した。濃縮液は遠心して上清を 4.0×50 cm のセファデックス G-10 によりゲル濾過し、3 種の蛍光物質を分離した。ゲル濾過は H₂O で溶出すると最初に褐色色素が溶出された。この色素が可及的に溶出された後、更に 10 ml 毎に分画すると 3 つの蛍光物質が順次溶出し Tube No. 10—15 に BV-物質、Tube No. 20—25 に V-物質、Tube No. 25—30 に B-物質が溶出された。この分画された蛍光物質にはまだ他の蛍光物質などが混在しているのでつぎのような精製を行なった。

1) BV-物質の単離精製 上述の第 1 に分画された BV-物質は褐色色素や V-物質が一部含まれているので、これらを除去するためこの分画を濃縮し、遠心上清について 3.5×50 cm の活性アルミナカラムで吸着クロマトグラフィーを行なった。溶出は最初に 500 ml のアセトンを流して褐色色素を溶出させた後更に 3% アンモニア水で溶出すると混在する色素は BV-物質画分よりも早く、また、V-物質は可成り遅れて溶出されるので効果的に BV-物質が分離された。しかし、BV-物質画分にはアルミナが一部溶出されているので再び BV-物質画分を集め、減圧下で出来るだけ少量になるまで濃縮して酢酸ブタノールに溶解し、3.5×30 cm のセルロースパウダーカラムにのせ、n-ブタノール/酢酸/水 (4:1:1) の展開溶媒によりクロマトグラフィーを行なった。この際、溶出液を

10 ml 毎に分画すると Tube No. 25—32 の画分に BV-物質は溶出された。この BV-物質画分を集め減圧下に 2 ml まで濃縮し、アンモニア処理したセファデックス G-10 でゲル汜過を行なった。すなわち、2.5×50 cm のカラムにゲルを充填後 2.5 ml の濃アンモニア水を流し、このアンモニアが完全に溶出されるまで水洗した。このように処理したセファデックス G-10 にさきの BV-物質画分の濃縮液をのせてゲル汜過した。この場合、アンモニア処理によって BV-物質はゲルに対する吸着能が著しく高まり、混在する少量の色素や他の蛍光物質は速やかに溶出されて完全に分離することが出来た。単離された BV-物質画分は減圧下に 2—3 ml まで濃縮し、10 倍量の冷アセトンを加えて一夜放置すると無色の針状晶が析出した。更に再結晶して約 18 mg の結晶を得た。

2) V-物質の単離精製 前述の第 2 に得られた V-物質画分は集めて濃縮した後 3.5×50 cm の活性アルミナカラムにのせて吸着クロマトグラフィーを行なった。溶出は BV-物質の精製と同様に最初アセトンで褐色色素を溶出させ、つぎに 3% アンモニア水で溶出すると少量の色素および BV-物質が溶出した後に V-物質は溶出された。この V-物質画分を集めて濃縮し、再びセファデックス G-10 によりゲル汜過を行ない、溶出された V-物質画分を集めて減圧濃縮すると V-物質の無色の粉末約 30 mg が得られた。V-物質は各種の溶媒で再結晶を試みたが結晶にはならず粉末状であった。

3) B-物質の単離精製 前述の第 3 に分離された B-物質画分を集めて減圧下で 1/20 容までに濃縮し、1N H_2SO_4 で pH 4.0 として放置すると絮状の沈でんを生じた。これを遠心して除き上清を再びセファデックス G-10 でゲル汜過した。B-物質はゲルに対して可成り吸着性があるため他の物質の溶出された後に B-物質が溶出された。得られた B-物質画分は減圧下で出来るだけ少量になるまで濃縮し、冷暗所に放置すると黄色鱗片状結晶が析出した。この結晶を少量の 0.5N H_2SO_4 に溶解し、5 倍量のエタノールを加えて放置すると黄色針状結晶が析出した。これを 70% エタノールから再結晶すると 8.5 mg の白色針状結晶が得られた。

3. 地蜂幼虫から単離された蛍光物質の化学的性状

4 種の蜂に多く含まれる 3 つの蛍光物質を地蜂幼虫の脱脂乾燥粉末から精製してそれぞれ単離することが出来たのでこれらの化学的性状について検討した。

1) BV-物質の確認 単離された BV-物質は前述の呈色反応を行なうとすべて陰性であったがこの BV-物質を 1N HCl、30 分煮沸水浴上で加熱すると容易に水解された。この水解物は PPC で観察すると BV-物質の消失にともなう R_f 0.65 に紫色蛍光を有する黄色物質 (Y-物質) が生成された。この水解生成物についてペーパー上で呈色反応を行なうと R_f 0.65 の Y-物質は NH_3 性硝酸銀反応、過クロール鉄反応、ジブゾ反応が陽性を示し、また、 R_f 0.14 に無蛍光の NH_3 性硝酸銀反応陽性スポットが出現した。このように BV-物質の酸水解は還元性とフェノール性水酸基の存在を示す Y-物質と R_f 0.14 の還元性を示す無蛍光スポットに変化することが示唆された。そこで BV-物質の酸水解で生ずる Y-物質の単離を Fig. 2 のように行なった。すなわち、5 mg/ml の BV-物質 5.0 ml に 3N HCl 1.0 ml を加え 45 分水浴上で加熱し、水解後水飽和ブタノール 3.0 ml で 3 回抽出した。ブタノール層は溶媒留去後残渣に少量の水を加えて溶解し、セルローズパウダーカラムにのせ酢酸ブタノールの展開溶媒でクロマトグラフィーを行ない Y-物質画分を分取した。この画分は溶媒留去後残渣を水に溶かして再びセファデックス G-10 でゲル汜過し、溶出された Y-物質画分を集めて濃縮すると黄色粉末が得られた。これを熱水で結晶化させると黄色針状晶が析出した。更に熱水より再結晶して単一の Y-物質 8.5 mg を得た。

この Y-物質の化学的性状は融点 285° 、元素分析値 Anal. Calcd., $C_{10}H_7O_4N$: C, 58.54; H, 3.44; N, 6.83. Found: C, 58.52; H, 3.51; N, 6.92. UV-Spectrum $\lambda_{max}^{H_2O}$ nm: 243, 342, Mass Spectrum m/e : 205 であった。これらの結果から Y-物質は XA と考えられたので標品の XA を用いて PPC の展開溶媒に対する R_f 値および呈色反応を比較すると Table II のように Y-物質はいずれも XA に一致した。

Fig. 2. Purification of Hydrolysed Product (Y-Sub.) of BV-Sub

TABLE II. Color Reactions and Chromatographic Properties of Y-Sub. and Authentic XA.

Substance	Y-Sub.	Authentic XA
<i>R_f</i> Value on PPC		
<i>n</i> -butanol/AcOH/H ₂ O (4 : 1 : 1)	0.65	0.64
<i>n</i> -Propanol/ethanol/H ₂ O (2 : 1 : 1)	0.71	0.70
4% citrate solution	0.40	0.41
Pyridine/ <i>iso</i> -butanol/H ₂ O (4 : 6 : 3)	0.54	0.56
Color reaction		
NH ₃ -AgNO ₃ reaction	+	+
FeCl ₃ reaction	+	+
Diazo Reaction	+	+

TABLE III. Rate of G and XA after Hydrolysis of BV-Sub.

Sample	Hydrolysis product	μmoles
BV-Sub.	Glucose (G)	0.345
	Xanthurenic acid (XA)	0.187

TABLE IV. The *R_f* Values of Paper Chromatograms of V-Sub. and Iso-xanthopterin (IX) with four Developing Solvent

Solvent	V-Sub.	IX
<i>n</i> -Butanol/AcOH/H ₂ O (4 : 1 : 1)	0.18	0.17
<i>n</i> -Propanol/1% NH ₄ OH (2 : 1)	0.16	0.17
4% citric acid	0.28	0.27
3% NH ₄ Cl	0.27	0.27

Fig. 3. UV-Spectra of V-Sub. and IX.

medium	substance	max (nm)
0.1N HCl	V-Sub.	211, 287, 341
	IX	210, 286, 340
0.1N NaOH	V-Sub.	222, 253, 340
	IX	221, 253, 339
H ₂ O	V-Sub.	228, 290, 340

—: V-Sub.
 ---: IX in H₂O

このように BV-物質の酸水解によって生ずる Y-物質が XA と同定されて同時にグルコース (G) に相当する還元性スポットが生成することから BV-物質は XA のグルコシッドと思われたので、5.3 mg/ml の BV-物質 0.2 ml に 900 U/ml β-グルコシダーゼ 0.1 ml, 0.1M acetate buffer, pH 5.2, 1.0 ml を加え全量 2.5 ml で 37°, 24 時間酵素水解を行なった。水解液は BV-物質の完全な消失にともない標品の G と XA に相当するスポットの生成が PPC によって確認された。また、この水解液は著しい還元性を示したがこの液 0.5 ml に Glucose oxidase 0.2 mg を加え作用させると還元性が完全に消失した。

以上のことから BV-物質は XA のグルコシッドと推定されたが XA は 4 位と 8 位に水酸基を有するので XA のジグルコシッドの形成される可能性が考えられる。そこで BV-物質の 3N HCl 水解液を Dowex-50 (H⁺) で G と XA に分別してそれぞれ定量した。その結果は Table III

のように G は Somogyi-Nelson 法¹¹⁾, XA は Satoh と Price の強アルカリ性における蛍光法¹²⁾ で定量する。

11) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952); N. Nelson, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).

12) K. Satoh, M.J. Price, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4609 (1965).

と両者の生成量は XA 1 モルに対して G 2 モルの割合に含まれていた。なお、BV-物質の元素分析値は *Anal.* Calcd., $C_{22}H_{27}O_{14}N$: C, 49.90; H, 5.10; N, 2.64. Found: C, 49.62; H, 5.12; N, 2.90 であることなどから BV-物質が XA-0-ジグルコシッドであることを確認した。BV-物質は融点 360° 以上の黄色物質であった。

2) **V-物質の確認** 単離された V-物質は前述の呈色反応がすべて陰性を示し、結晶性ではなく黄色粉末で融点も 360° 以上であることなどから昆虫体によく見られるプテリン体と思われた。そこで V-物質と既知プテリン体について PPC で *Rf* 値を比較した結果、Table IV のように IX と *Rf* 値がよく一致した。

また、V-物質および標品の IX の紫外吸収スペクトルは Fig. 3 のように酸性およびアルカリ性における λ_{max} が両者とも類似傾向にあつた。V-物質の元素分析値は *Anal.* Calcd., $C_6H_5O_4N_5$: C, 40.23; H, 2.81; N, 39.10. Found: C, 40.21; H, 2.81; N, 39.00 であることから V-物質は IX と同定した。

3) **B-物質の確認** 蜂類の虫体に存在する螢光物質のうちペーパー上 *Rf* 0.45 を示す B-物質は呈色反応の成績から Ky と推定されたが、更に虫体より単離された B-物質についてその化学的性状を検討した。

単離された B-物質は Table V に示すように硫酸塩として得られ、結晶形、融点、紫外吸収 (UV) スペクトル、PPC における各種展開溶媒に対する *Rf* 値がいずれも標品の Ky-Sulfate とよく一致した。

TABLE V. Chromatographic and Physical Properties of B-Sub. and Authentic Ky-sulfate

Properties	B-Sub.	Ky-sulfate
Crystal	colorless needle	colorless needle
Melting point (decomp.)	194°	195°
UV Spectrum (nm) in pH 7.0	230, 257, 360	230, 257, 360
Elementary analysis $C_{10}H_{12}O_3N_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$	C, 36.96; H, 4.96; N, 8.61 (found)	C, 37.08; H, 4.37; N, 8.61 (calcd.)
<i>Rf</i> Value on PPC		
1) <i>n</i> -Butanol/AcOH/ H_2O (4:1:1)	0.45	0.45
2) <i>n</i> -Butanol/ <i>n</i> -propanol/ H_2O (2:1:1)	0.74	0.75
3) Methanol/ <i>n</i> -butanol//Benzene/ H_2O (2:1:1:1)	0.40	0.42
Hydrolysis of B-Sub.		
1) Alkaline decomp. with 0.1N $NaHCO_3$, 100° , 10 min.	0.92 yellow pigment	0.92 ^{a)} yellow pigment
2) enzymatic hydrolysis with kynureninase, 37° , 30 min.	0.96 violet fluor.	0.96 ^{b)} violet fluor.

a), b): *Rf* value on PPC with *n*-butanol/AcOH/ H_2O (4:1:1)

a): *o*-aminobenzoylacrylic acid, b): anthranilic acid

古武¹³⁾は Ky が弱いアルカリで熱分解されると特異な黄色色素「キヌレニン黄」の形成することを認めているが、石黒ら¹⁴⁾はこの色素の本体を *o*-アミノベンゾイルアクリル酸と同定して Ky の特徴的变化とした。著者らも B-物質を 0.1N $NaHCO_3$ 溶液中で熱分解して生成する物質を PPC で観察した結果、標品の Ky と同様にペーパー上 *Rf* 0.92 を示す無螢光の黄色色素が生成することを認めた。また、Ky はキヌレニナーゼで酵素水解されるとアントラニール酸に変化するが B-物質をラット肝から部分精製したキヌレニナーゼで作用させると特異的にアントラニール酸が生成された。

これらの成績から蜂類に存在する B-物質は Try 代謝の重要な中間代謝産物である Ky と同定された。これはさきに述べた BV-物質が XA-4,8-ジグルコシッドであることから Ky は代謝されて BV-物質に変化するものと考えられる。

考 察

すでに昆虫の螢光物質はプテリン体や Try 代謝産物などが知られている。プテリン体は蝶の翅のように鮮や

13) Y. Kotake, M. Kiyokawa, *Z. Physiol. Chem.*, **195**, 147, 152 (1931).

14) 石黒伊三雄, 長村洋一, 生化学, **44**, 22 (1972).

かな色彩を示す部位に含まれて色彩効果の発現に与るものと思われるが、Try 代謝産物はオンモクローム系色素の形成母体になることが Butenandt ら⁴⁾ によって発見され、昆虫における存在意義が明らかにされた。しかし、蜂類に含まれる蛍光物質に関してはまだ十分に検討されていないので著者らはまず PPC で蜂の虫体に存在する蛍光物質を観察し、蜜蜂では 4 個、その他の蜂では 5 個の蛍光スポットが存在することを確認した。このうち、BV-物質、V-物質、B-物質の 3 種の蛍光物質が蜂類に多く含まれていたため、これらを地蜂の幼虫の脱脂乾燥粉末から単離精製し、その化学的性状について検索した。

その結果、BV-物質は XA-4,8-ジグルコシッド、V-物質は IX、B-物質は Ky¹⁵⁾ であることが明らかとなった。このように蜂類の主な蛍光物質が Try 代謝産物の Ky と XA-4,8-ジグルコシッドであることは蜂類の Try 代謝の特異性を示すものとして興味ある事実である。

すでに高等動物や細菌では Try 代謝において Ky が重要な中間代謝産物とされているが、昆虫¹⁶⁾ でも Ky はキヌレン酸、3-オキシキヌレニン、アントラニール酸に代謝されることが知られているので蜂類に存在する Ky も同様に代謝されるものと思われる。しかし、蜂類には他の生物体ではまだ見出されていない XA-4,8-ジグルコシッドが特異的に存在することは本物質が 4 種の蜂に含まれ、XA の抱合体であることから正常な Try 代謝によって Ky を経て生成されたものと推察される。

Greenberg ら¹⁶⁾ は XA-4-C¹⁴ をラットに投与して尿中から XA-4,8-ジグルクロナイドのセリン抱合体を認め、高橋ら¹⁷⁾ は油虫で 3,4-ジオキシ安息香酸が UDPG 関与で酵素的に抱合化されて安息香酸-3,4-ジグルコシッドの生成することを明らかにした。したがって蜂類でも XA の 4-および 8 位の水酸基は容易にグルコシッド抱合を受ける可能性が示唆される。

これについては蜂類に含まれる BV-物質は β -グルコシダーゼで酵素水解されると XA を生成することやその他の性状から BV-物質に対して XA-4,8-ジグルコシッドであることが確認された。また、蜂類では Ky の存在と XA-4,8-ジグルコシッドが蓄積されているので、その生成経路は Ky が 3-オキシキヌレニンに代謝され、更に XA に変化して、これが β -Glucosyltransferase によってグルコシッド抱合されて BV-物質が生成されたものと推察される。この関係は各段階の酵素活性を観察することによって明確になるものと思われる。

一方、蜂類の虫体にプテリン体として IX が含まれることを明らかにした。昆虫のプテリン体は Wieland ら³⁾ が最初蝶の翅から分離し、その後、Saul¹⁸⁾ は *Prasitic wasp* 中に 2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン、キサントプテリン、IX が含まれることを報告した。また、Rembold ら^{19,20)} は蜜蜂の分泌液である王乳にビオプテリン、蛹に IX のほか少量のネオプテリン、ビオラプテリンが含まれることを述べている。

このようなプテリン体の生成経路については Weygand ら²¹⁾ が蝶のプテリン体の前駆物質としてグワノシンを提唱し、Brenner-Halzach ら²²⁾ は *Drosophila melanogaster* のプテリンがプリン塩基から生成するとした。最近、後藤ら²³⁾ はセビアプテリンの生合成を C¹⁴-ラベル化合物を用いて実験した際、セビアプテリンと同時に IX の生成を認めている。

このようにプテリン体はプリン塩基と関連して存在するものと思われ、蜂類では特に IX が最も多く含まれることはプテリン体の主要な代謝産物と思われ、その生理的意義の解明が必要であるがまだ不明である。

結 語

4 種の蜂（蜜蜂、地蜂、赤蜂、すずめ蜂）の幼虫、蛹、成虫に含まれる蛍光物質を PPC により観察するとペーパー上に分離された蛍光スポットはビタミン B₂ の蛍光スポットを除き蜜蜂で 4 個、他の蜂で 5 個が認められた。

15) H. Kikkawa, *Advances in Genet.*, **5**, 107 (1953).

16) M. Rothstein, D.M. Greenberg, *Arch. Biochem. Biophys.*, **68**, 206 (1957).

17) S.Y. Takahashi, E. Ohnishi, *J. Biochem.*, **60**, 473 (1966).

18) G.B. Saul, *Rew. Suisse Zool.*, **67**, 270 (1960).

19) A. Butenandt, H. Rembold, *Z. Physiol. Chem.*, **311**, 79 (1958).

20) H. Rembold, L. Buschmann, *Ber.*, **96**, 1406 (1963).

21) F. Weygand, H. Simon, G. Dahms, M. Waldschmidt, H.J. Schliep, H. Wacker, *Angew. Chem.*, **73**, 402 (1961).

22) O. Brenner-Holzach, F. Leuthardt, *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1480 (1961).

23) T. Okada, M. Goto, *J. Biochem.*, **58**, 458 (1965).

このうちペーパー上 R_f 0.05 を示す BV-物質, R_f 0.18 の V-物質および R_f 0.45 の B-物質の 3 つの蛍光物質が 4 種の蜂にすべて存在し, いずれも量的に多かった.

この 3 種の蛍光物質を地蜂の幼虫の脱脂乾燥粉末を用いて, 溶媒抽出, セファデックス G-10, アルミナカラムクロマトグラフィーなどで単離精製し, BV-物質は酵素水解で XA の生成することやその他の性状などより XA-4,8-ジグルコシッド, V-物質は UV スペクトルおよび展開溶媒に対する R_f 値などから IX, B-物質は呈色反応および化学的性状などから Ky であることを確認した.