

卵の色彩について

広腰亜目の卵の色については、表に示したように12通りを区別した。この色の区別はあまり厳密に限定できない。同一種においても、個体によつて、乳白色のときもあり、極めてうすい淡黄色のときもあつたりするが、上記の表は各個体の解剖記録にとどめられてあつた色彩を集めたものである。上記の表から各色彩毎に整理してみると次のような結果になる。最も多い色は乳白色の36種と淡黄色の55種とであつて、色として分布の広いのは乳白色で広腰亜目の8科において認められるが、淡黄色は5科で認められるにすぎない。淡青緑色がそれらに次いで10種2科で見られ、淡緑色が7種2科で、濃黄色が6種3科で、淡黄緑色が4種2科で、淡橙色が4種1科で、青緑色が3種3科で、橙色が3種1科で、黄緑色が2種2科で、濃青緑色が

2種1科でそれぞれ認められる。紫紅色はただ1種で見られた稀な色彩である。それではまず広腰亜目の卵の普通の色は乳白ないし淡黄だということになる。

Résumé

The comparative anatomy of the ovary of the Hymenoptera has been a subject of my study for these ten years. During the course, I observed the mature eggs in ovary of many species, which have been almost undescribed so far as I know. The present paper gives the data on the shape and color of 134 species of the Japanese Symphyta as well as the size of egg in a single example, as shown in the Figure and Table. The comparative discussion on these data will be reported in the separate paper.

On the Color Change of the Triturated Solution of Larvae of the Common House Mosquito, *Culex pipiens* var. *pallens* Coq. Hiromichi MATSUBARA (Laboratory of Agricultural Chemicals, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu) Received Oct. 11, 1956. *Botyukagaku* 22, 19~23, 1957, (with English résumé, 23).

4. アカイエカ幼虫の磨砕液の色変について* 松原弘道(岐阜大学 農学部 農薬化学研究室)
31. 10. 11 受理

謹んで春川忠吉博士の古稀を祝賀し奉る。

アカイエカ幼虫の磨砕液を空気に曝すと、最初紺色に、のち黒色に変ずるのを見出し、その色変機構及び色素について研究した。色変には主として tyrosine-tyrosinase 系が関与している事と、分離した色素が melanin である事から、色変機構について 2, 3 の考察を与えた。

一般に昆虫の体液を空気中に放置すれば、酸化酵素の作用により黒色乃至黒褐色に変ずるものであるが、著者³⁾は殺虫剤に於ける共力作用機構の研究中、アカイエカの幼虫の磨砕液を空気中に放置する時は、最初紺色に、のち黒色に変化するのを観察した。著者はこの色変機構を明らかにし、更に本色素の本体を究明する目的で、色変に及ぼす種々の酵素阻害剤、基質、pH及び馬鈴薯 tyrosinase の影響並びに色素の分離及び理化学的性状に關して実験を行い、2, 3の知見を得たので、ここに報告する。昆虫体液の色変について我が国では、稻神²⁾による赤赤種家蚕体液の赤変についての研究があるが、紺色に変ずるものについての研究は知られていない。

実験材料及び方法

供試昆虫：実験に使用したアカイエカ *Culex pipiens* var. *pallens* Coq. の幼虫は、産卵後12時

* 本報告の概要は昭和31年4月10日日本農学大会応用動物学会・日本応用昆虫学会合同分科会(東京)にて講演。

間以内の卵塊を採集し、水槽中で孵化せしめ、葉用酵母を餌として飼育したものである。

アカイエカ幼虫の磨砕液の調製法：孵化後7~12日目のアカイエカの3齢幼虫を採り、その生体量と等量の蒸溜水と少量の硅砂を加え、乳鉢中でよく磨砕したのち、生体重の2倍量の水を加えガーゼ4重で濾過し、濾液を遠心分離(r. p. m. 4000)し上澄液を試料とした。

実験結果及び考察

A. 色変に及ぼす諸条件の影響

色変に及ぼす各種酵素阻害剤の影響：アカイエカの幼虫の磨砕液(以後磨砕液と称す)を空気中に放置する時は、直ちに空気との接触面から紺色となり、数10分後には黒色に変じ、又磨砕液を加熱すれば全く色変を見ない事から、この色変には酸化酵素が関与している事が想像されるので、先づ色変に及ぼす各種の酵素阻害剤の影響を検した。

磨砕液 5cc に 1cc の KCN (6M/250), Na-

azide(6M/250), thiourea(6×10^{-2} M), salicylaldehyde(6M/500), 8-oxyquinoline(M/200), diethyldithiocarbamate(M/25), CO(飽和), H_2S (飽和)及び monoiodoacetic acid(10^{-2} M)を各々添加し、色変に及ぼすそれら化合物の影響を肉眼で観察し、第1表の如き結果を得た。+は色変に及ぼす阻害度を示す。

察され、又後述の加熱不活性化磨砕液の上澄部は Millon 反応並びに Wurster 反応陽性で、液中に tyrosine の存在が認められ、更に又 tyrosine 添加により呈色度が大となる事から、磨砕液中には tyrosine-tyrosinase 系の存在が予想せられる。

色変に及ぼす馬鈴薯 Tyrosinase の影響: 前実験

Table 1. Effects of enzyme inhibitors on the color change of triturated solution of mosquito larvae.

Inhibitors added	Degrees of inhibition on color change		Color of solutions after 10 min.
	After 30 min.	After 1 hr.	
KCN	+++++	+++++	No change
Na-azide	+++	+++	Light blue-purple
Thiourea	++++	++++	No change
Salicylaldehyde	+++	+++	Light blue
8-Oxyquinoline	+++++	++++	No change
Diethyldithiocarbamate	++++	++++	Very slight blue
CO	+++++	+++++	No change
H_2S	+++++	+++++	No change
Monoiodoacetic acid	±	±	Blue-purple
Control	-	-	Deep dark blue

Table 2. Effects of substrates on the color change of triturated solution of mosquito larvae.

Substrates added	Color of solution			Precipitate after 4 hr.
	After 5 min.	After 15 min.	After 120 min.	
Tyrosine	Purplish dark blue	Deep purple	Black purple	Black-purple
Pyrocatechol	Yellowish brown	Brown	Brown	—
Phenol	Light scarlet purple	—	Scarlet purple	—
Guaiacol	Light scarlet purple	—	Scarlet purple	—
p-Phenylenediamine	Scarlet purple	Brown	Brown	—
Water(control)	Light dark blue	Dark blue	Dark blue	Dark blue-black

上表の実験中、色変が完全に阻害された CO 添加磨砕液は、それを日光直射下に置くも全く変化無く、又銅と安定な complex を作る KCN, Na-azide, thiourea, salicylaldehyde, 8-oxyquinoline, diethyldithiocarbamate 及び H_2S により色変が阻害される事から、この色変には明らかに tyrosinase が関与している事がわかる。

色変に及ぼす各種基質の影響: 磨砕液に phenol-oxidase の基質となり得る各種のフェノール類を添加しその影響を検し、第2表に示す如き結果を得た。この際、磨砕液 1cc に水 4cc を加え、更にそれに tyrosine(30×10^{-3} M), pyrocatechol(30×10^{-3} M), phenol (M/20) 及び p-phenylenediamine(30×10^{-3} M) の各 1cc 或は guaiacol を 0.05g 混合し、26±1° の定温器中に放置して、その色変を観察した。

即ち磨砕液は phenoloxidase がかなり強い事が観

によつて色変には tyrosine-tyrosinase 系が関与している事が明らかとなつたが、更にそれを確かめるために馬鈴薯から tyrosinase を分離し、それが色変に及ぼす影響を研究した。即ち常法により馬鈴薯皮部を破碎し、ガーゼ濾過、遠心分離、硫酸アンモニヤ 0.7 飽和により得られた沈澱を 3 昼夜透析して得た tyrosinase 液或はそれを加熱不活性化したものを磨砕液 8cc に対し夫々 1cc 加えその影響を検したところ、色変を全く促進しない事を認めた。又等量の水を加えた磨砕液を 100° の重湯煎中で 30 分加熱して不活性化し、上澄液と蛋白沈澱部とに分け、前者に馬鈴薯 tyrosinase を添加する時は暗紫色を呈し、又 tyrosinase を添加せず空気を通じても色変を認めず、更に後者を水に懸濁し tyrosinase を作用せしめても変化のない事から、磨砕液の色変には tyrosine-tyrosinase 系が多く関与しているものと考えられる。しかしその色調が

幾分異なる処から、この色変は tyrosine-tyrosinase 系の反応生成物と他の酵素系のそれとの共重合か、或は tyrosine-tyrosinase 系と他の酵素化学的反應との共軛の結果に基づくものではないかと想像せられる。

色変に及ぼす pH の影響: 各種 pH の磷酸塩緩衝液 4 cc を試験管に採り磨砕液 1 cc 宛を加え、添加後 15~35 分間の色変を肉眼で観察し第 3 表の如き結果を得た。高緩衝液の代りに蒸溜水を用いたもの、pH は 6.80 で、前のものと並行に色変を比較した。又分光々電光度計で (波長 381m μ) 各 pH 下の呈色度の測定を試みたが、濁濁のため正確な値を得る事が出来なかつた。

Table 3. Effect of pH value on the color change of triturated solution of mosquito larvae.

pH value	Color intensity	Precipitate after 24 hr.
5.91	+	—
6.24	++	—
6.47	+++	—
6.64	++++	—
6.81	++++	—
6.98	+++++	—
7.15	++++++	Yellowish brown
7.35	++++	—
7.65	+++	—
6.80 (control)	++++++ $\times 2$	Black-brown

上表の結果から色変を伴う酵素化学的反應の最適 pH は 7.0~7.2 で、tyrosinase の最適 pH 範囲内にある事が示されている。なお磷酸塩緩衝液が存在する場合は、色変が阻害せられ、pH 7.15 の最大呈色に於てもその吸光度 (381m μ に於ける) は蒸溜水を用いた control のその 50% に相当する。最近山田ら⁹⁾も紫外線による tyrosine 溶液より melamin の生成研究に於て、磷酸塩緩衝液の存在は tyrosine よりの melamin の沈着を阻害するのを観察している。

呈色磨砕液の吸収曲線: 呈色した磨砕液の可視部の吸収曲線を求めるため、磨砕液 0.5 cc に水 20 cc を加え室温 (28 $^{\circ}$) に 20 分放置後、日立 EPB-A 型分光々電光度計を使用してその吸収曲線を求め第 1 図 (I) の如き結果を得た。

即ちこの磨砕液は可視部に於ては 537 m μ 及び 600 m μ に夫々極大吸収を示す。

呈色の経時変化: 磨砕液に水を加え空气中に放置すれば、徐々に紺色に変わり、のち 20~30 分間略一定の呈色度を示し、のち更に黒化するの認められたので、その呈色を経時的に観察した。試料は前項実験と

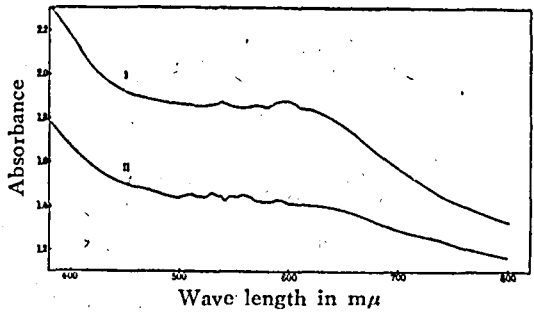


Fig. 1. Absorption spectra of pigment. I-triturated solution of mosquito larvae, II-solution of the separated pigment in 0.025 N NaOH.

同一液を用い、381m μ の波長で、分光々電光度計によつて 28 $^{\circ}$ の室温で観察し、第 2 図の如き結果を得た。即ち磨砕液が空气中に接触し初めてから 16 分までは呈色度がほぼ直線的に増大し、それ以後 40 分までは一定の呈色度を示し、更にその後は階段的に呈色度が増大する。

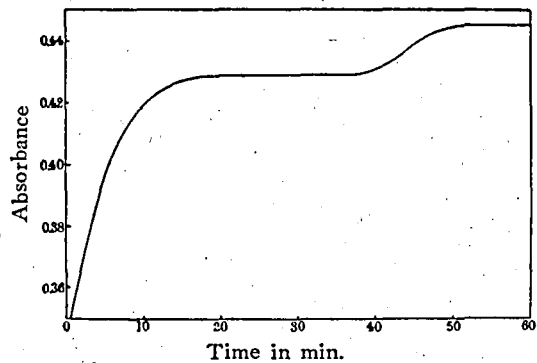


Fig. 2. Color change of triturated solution of mosquito larvae, observed by spectrophotometer (at 381 m μ).

B. 色素の分離及びその分光化学的研究

磨砕液を空气中に放置する時はその色変の速度は小で、これに通気する時はその速度が大となる事が観察されたので、呈色物質の分離には総て 20 分間通気を行い色変せしめたものを用いた。色変せしめた磨砕液を 100 $^{\circ}$ にて 5 分間加熱する時は少しく褪色し、また稀硫酸で酸性とすると淡赤紫色を呈し、1 時間後には橙黄色になることから、この色素は幾分熱及び酸に不安定である事がわかつた。又色素はエーテル、石油エーテル、エチルアルコール、アミルアルコール、アセトン、四塩化炭素及びベンゼンの如き有機溶媒には溶解しないが、分液漏斗中で醋酸エチルと振盪すると色素は絮状となり醋酸エチル層に移る。この醋酸エチル

層を遠心分離すると色素は水層と醋酸エチル層の中間に糊状に分離するので、それを容易に取出す事が出来る。この分離した色素は水には不溶で、0.025N以上の苛性ソーダ溶液には完全に溶解し暗青色を呈するけれども、それ以下の濃度の苛性ソーダ溶液には難溶である。色素の0.025N苛性ソーダ溶液の安定度を分光々電光度計で波長381m μ で観察した結果、溶解後60分間は吸光度は殆んど変化せず安定である事がわかった。分離した色素0.1gを50ccの0.025N苛性ソーダ溶液に溶解し、その可視部の吸収スペクトルを測定したところ第1図(II)の如き結果を得た。即ち磨砕液その儘のスペクトル(I)と相似し、色素は殆んど全部醋酸エチル処理によつて該層に移る事が示されている。

粗色素の分離：磨砕液にその5倍量の水を加え通気装置で20分間処理して呈色せしめ、これに液量の1/2に相当する醋酸エチルを加え分液漏斗中で振盪し、分離した醋酸エチル層を2回水洗し、更に遠心分離(r. p. m. 4000)し、中間層に分離した色素を濾紙に挟み水及び醋酸エチルをよく吸取り、のちデシケーター中で乾燥、粉砕後密栓して貯蔵した。アカイエカの幼虫257.70gから5.08gの粉末が得られ、生体量の1.97%に相当する。本物質は分離直後は紺色であるが、乾燥中黒色に変わり、色を変化せしめず乾燥状態で取出す事は不可能であつた。粗色素0.01gをN苛性ソーダ溶液25ccに溶解し可視部の吸収スペクトルを測定すると第3図(I)の如き結果を得た。

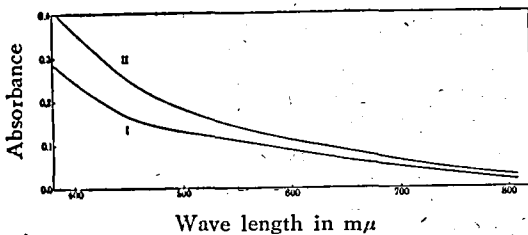


Fig. 3. Absorption spectra of pigment in N NaOH solution. I-crude pigment, II-purified pigment.

即ち前に新しく分離した粗色素が示した(第1図II)500~700m μ に亘る極大吸収は失われ、melaninに類似の吸収スペクトルを示すようになる。これは紺色の色素がかなり不安定な化合物で、分離乾燥後酵素化学的变化を受けなくても重合、或は空気酸化等によりmelanin様色素に変化する事と、紺色を呈するのは500~700m μ に亘る極大吸収のためであるという事を示している。

色素の精製：粗色素3.80gに0.1%苛性ソー

ダ溶液500ccを加え2時間攪拌すると、殆んど完全に溶解する。これを遠心分離し、上澄液を取り0.1N塩酸にて中和し、更に硫酸アンモニヤを0.9飽和せしめると黒色の沈澱が析出する。これを遠心分離し、少量の水を加えセロファン膜で3日間透析し、100ccの水を加えると殆んど溶解する。水に不溶性であつた色素がこの際水に可溶性となる原因は明らかでないが、恐らくコロイド状となつたためと思われる。少量の不溶物(0.03g)を除き、等容の無水アルコールを添加すると、色素は殆んど全部沈澱となつて析出する。これを50%アルコール(2回)、無水アルコール(2回)及びエーテル(1回)で順次洗滌乾燥し黒色粉末0.17gを得た。この物質は粗色素に対して4.43%、アカイエカの幼虫に対しては0.09%に相当する。

精製色素の化学的性状及び分光化学的観察：精製色素は黒色無定形粉末で、水及び各種の有機溶媒に不溶、N苛性ソーダ溶液及びエチレンコールヒドリンには可溶で、その溶液は共に黒褐色を呈する。12N塩酸には可溶であるが、N塩酸には難溶である。その窒素含量を定量(ケルダール氏法)したところ、12.9%を示し、Froence et al.¹⁾によるmelaninのN%に近い。その可視部(0.0001g/cc N NaOH)及び紫外部(0.01g/cc N NaOH)の吸収スペクトルをそれぞれ測定し、第3図(II)及び第4図に示す如き結果を得た。

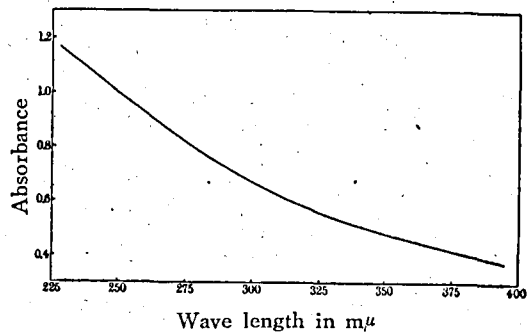


Fig. 4. Ultraviolet spectra of purified pigment in N NaOH solution.

即ち吸収曲線はFroence et al.¹⁾の記載したmelaninの吸収曲線に酷似している事から、この色素はmelaninである事が明らかである。

以上の諸実験から磨砕液を放置或は通気した場合の紺色々素生成には主としてtyrosine-tyrosinase系が関与して居り、その色素は不安定で、そのまま分離する事は不可能であるが、黒化した色素がmelaninである事から、紺色々素はtyrosineからmelaninに至る中間重合体か、或はtyrosine-tyrosinase系反応生

成物と他の酵素化学系のそれとの共重合生成物か、或は又 tyrosine-tyrosinase 系と他の酵素化学反応系との共軛の結果生成したものと推論せられる。

総 括

アカイエカの幼虫の磨砕液を空気中に放置するか、或は通気すると、液は最初紺色に、のち黒色に変ずるのを見出し、その色変機構及び該色素について研究した。色変は KCN, Na-azide, thiourea, salicyl-aldoxime, 8-oxyquinoline, diethyldithiocarbamate, H₂S 及び CO により阻害され、CO 処理液は日光に曝すも変化なく、tyrosine 添加により濃色となり、最適 pH は 7.0~7.2 で、また加熱不活性化磨砕液上澄部に馬鈴薯 tyrosinase を作用せしめると暗紫色を呈する事から、この色変現象には主として tyrosine-tyrosinase 系が関与しているものと想像せられる。

紺色に変つた磨砕液に醋酸エチルを添加分離した色素をアルカリに溶解、塩酸添加にて再沈澱せしめ、透析などの操作によつて精製したものは黒色無定形粉末であつて、紺色色素は不安定で、そのまゝの形態で分離する事は不可能である事を知つた。精製色素は水及び各種の有機溶媒に不溶、苛性アルカリ及びエチレンクロールヒドリンに可溶で、窒素含量は 12.9% を示し、その可視部及び紫外部の吸収曲線からもメラニンである事が明らかとなつた。

結局磨砕液が紺色に変るのは tyrosine が tyrosinase の作用によりメラニンに縮合する際、中間生成物の生成のためか、或は tyrosine-tyrosinase 系反応生成物と他の酵素化学系のそれとの共重合のためか、或は又 tyrosine-tyrosinase 系と他の酵素化学反応系との共軛の結果に基くものと推論せられる。

本研究に当り終始御鞭撻を賜つた高橋梯蔵教授、種々御示唆を賜つた名古屋大学農学部瓜谷郁三助教授、実験に御援助を与えられた岐阜県立農事試験場福富敏雄氏並びに本学浪越昌宏君に夫々厚く感謝する。

文 献

- 1) Florence, G., J. Enselme et M. Pozzi : Bull. soc. chim. biol., 17, 268 (1935).
- 2) 稲神 馨: 日蚕誌 23, 225 (1954).
- 3) 松原弘道: 防虫科学 19, 61 (1954).
- 4) 山田悠記子・桃谷政順・岸 春雄: 日化 76, 1152 (1955).

Résumé

It was found that the color of the triturated solution of larvae of the common house mosquito, *Culex pipiens* var. *pallens* Coq., changed primarily to dark blue, then to black, when exposed to the air. The author studied on the mechanism of this color change and properties of the isolated pigment.

From the experiment on the effect of many enzyme inhibitors and substrates, pH value and potato tyrosinase on this color change, it was observed that tyrosine-tyrosinase system had been associated with mainly in this change. The author concludes that this pigment belongs to melanin, judging from chemical properties and absorption spectra of ultraviolet and visible range of the pigment which was isolated by adding ethyl acetate to triturated solution of mosquito larvae and then purified by reprecipitation and dialysis.

From the results obtained in the present experiment, it was suggested that the color change of triturated solution of mosquito larvae to dark blue had been caused by the formation of the intermediate polymer in melanin polymerisation, by the copolymerisation between reaction product of tyrosine-tyrosinase system and that of other enzyme system, or by the result of conjugation of tyrosine-tyrosinase system reaction with other enzymatic reaction.