

In shorter wavelength than 548 m μ , the sensitivity of dark-adapted eye was greater than that of light-adapted eye, while in longer wavelength regions, the sensitivity of light-adapted eye was

same as or greater, compared with that of dark-adapted eye. But a shift of wavelength at which compound eye produced maximum responses was not observed.

On the Non-Protein Folin (Lowry) Positive Components in the Larval Haemolymph of the Armyworm, *Leucania separata* in Relation to Melanin Synthesis. Hajime IKEMOTO (Tokyo Prefectural Isotope Research Station, Setagaya, Tokyo) Received March 5, 1971. *Botyu-Kagaku* 36, 59, 1971. (with English Summary 65).

11. アワヨトウ幼虫の体液にみられる非蛋白性フォリン (Lowry) 陽性物質とくにメラニン生成との関係 池本 始 (東京都立アイソトープ総合研究所) 46. 3. 5. 受理.

アワヨトウの体液にみられる非蛋白性フォリン (Lowry) 陽性物質 non-protein Folin (Lowry) positive components とメラニン生成との関係について若干の研究をおこなった。体液中に9個の陽性物質を確認することができた。そのうち4個はトリプトファン、チロシン、ドーパおよび尿酸と推定された。体液のメラニン生成にともない、チロシン量が減少しドーパ量が一時的に増加した。そして体液にフェノールオキシダーゼの存在を確認することができたので、メラニン生成の過程で、チロシンはフェノールオキシダーゼによってドーパになるものと考えられる。メラニン生成にともない尿酸量もいちじるしく減少したが、メラニン生成と関係があるのかどうかあきらかでない。

緒 言

アワヨトウ *Leucania separata* の幼虫は黄緑色あるいは褐色をしめすが、高密度で飼育すると黒色になる。最近、この黒色素はインドールメラニンであることがわかった (池本 1971)¹⁾。

インドールメラニンはチロシンの酵素酸化によって形成される高分子の色素でチロシンがフェノールオキシダーゼで酸化されてドーパさらにドーパキノンとなり、つづいてインドール核が形成され、重合してメラニンになると考えられている。昆虫のインドールメラニンもこの経路にしたがって形成されるものとおもわれるが、まだ実証はされていない。この仮定が実証されるためには、これらメラニン生成の中間物の幾つかが単離されねばならない。

チロシンやドーパをふくむフェノール性化合物はフォリン (Lowry) 反応²⁾に陽性であることが知られている。アワヨトウの相変異にともなうメラニン生成の過程をあきらかにするため、体液にふくまれる非蛋白性フォリン (Lowry) 陽性物質の同定をおこない、体液が空気にふれたときみられるメラニン生成にともなう、これら非蛋白性フォリン (Lowry) 陽性物質の含有量がどのように変化するかをしらべ、体液のフェノールオキシダーゼの natural substrate が、はたしてチロシンであるかどうか、その他メラニン生成を中心として2, 3の問題を検討したので報告したい。

実験材料および方法

〔実験材料〕

実験には25~26°Cの採光恒温器内でトウモロコシの葉をあたえ全幼虫期間を1シャーレあたり10匹から15匹の密度で飼育した黒色型幼虫 (6令摂食期) の体液を用いた。体液は脚を切断して氷冷したフラスコにあつめた。実験によっては1シャーレあたり1匹で飼育した淡色型幼虫の体液も用いた。

〔メラニン生成の測定〕

黒色型幼虫の体液20 mlを三角フラスコにとり、フラスコをアルミニウム箔でかるく蓋をし、振盪恒温水槽を用いて8時間にわたり28°Cでインキュベーションした。そして一定時に体液0.2 mlを採取し、25倍量の1%食塩水 (メラニン化を防ぐため KCN を5 N ふくむ) を加え、濾紙で濾過し、その濾液について Beckman の spectrophotometer を用いて400 m μ で測定された吸光度でメラニン生成の程度をしめすことにした³⁾。実験は3回ほどくり返し、その平均値をとった。なお、同時に一定量の体液を採取しフォリン反応の測定、チロシン、ドーパ、トリプトファンおよび尿酸の定量をおこなった。

〔フォリン (Lowry) 反応によるフェノール類などの定量〕

体液1 mlに等量の10% トリクロル酢酸を添加し、濾紙で濾過し、濾液の0.1 mlを用いて、フォリン試

薬、アルカリ性銅液を使用する Lowry らの変法³⁾ (フォリン反応) によってフェノール類など (非蛋白性フォリン-Lowry 陽性物質) を測定した。660 m μ で測定された吸光度で含有量をしめすことにした。

〔フォリン (Acetate) 反応によるジフェノール類の定量〕

前述の方法によるとモノフェノールの他ジフェノールも反応する。反応系の pH を低くするとジフェノール類のみが呈色するにすぎない。ジフェノールはアルカリ性銅液の代りに 1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を添加して 1 時間インキュベーションし、660 m μ で測定された吸光度で含有量をしめすことにした。

〔チロシンの定量〕

体液 3 ml に 12 ml の 9% トリクロル酢酸を添加して、しばらく放置した後、遠心分離し、その上清を用いてチロシンを 1-ニトロソ-2-ナフトールを使用する Udenfriend, Copper (1952)⁴⁾ の方法によって定量した。

〔ドーバの定量〕

体液 0.6 ml を用いて 亜硝酸-モリブデン試薬を使用する Arnow (1938)⁵⁾ の方法によってドーバを定量した。

〔トリプトファンの定量〕

体液 1 ml に 4 倍量の 5% トリクロル酢酸を加えて、しばらく放置した後、遠心分離し、その上清を用いてトリプトファンを *p*-ジメチルベンズアルデヒドを使用する Horn, Jones (1945)⁶⁾ の方法によって定量した。

〔尿酸の定量〕

体液 1~2 ml を用いて Caraway (1955)⁷⁾ の方法で尿酸を定量した。

上述の測定はいずれも 2, 3 回くりかえしておこなった。

〔フォリン (Lowry) 陽性物質のペーパークロマトグラフィー〕

黒色型幼虫の体液 50 ml に 4 倍量のメタノール (M/10 KCN 数滴添加) を加え、数時間放置し、メタノール抽出液を用いて濃縮し、遠心分離でコロイド状物質を除いてペーパークロマトグラフィーの試料とした。抽出液は実験に用いる迄 deep freezer (-20°C) に保存した。フォリン (Lowry) 陽性物質の分離固定には東洋紺紙 No. 50 を用いて 25°C で、(1) *n*-ブタノール、酢酸、水 (4:1:2)、(2) *n*-ブタノール、酢酸、水 (1:1:10)、(3) *n*-ブタノール、*n*-プロパノール、水 (9:2:1)、(4) 酢酸エチル、酢酸、水 (9:2:2) を展開液 (いずれも v/v) とする一次元ペーパークロマトグラフィー法によった。

フォリン (Lowry) 陽性物質の検出には次のような試薬を用いた。

a) フォリン試薬

フォリン試薬のみあるいはフォリン試薬噴霧後、前述のアルカリ性銅液³⁾ を噴霧した。

b) アンモニア性硝酸銀 (吉川 1955)⁸⁾

c) 亜硝酸-モリブデン試薬

亜硝酸ナトリウム 1 g, モリブデン酸ナトリウム 10 g, 水 100 ml 1 容
0.5 N 塩酸水 1 容

2 種の試薬を別々に調製しておき、使用直前に混合して噴霧する。モノフェノールは呈色しないが、ジフェノールは黄色または黄褐色をしめす。さらに 1 N 苛性ソーダを噴霧するとオルソジフェノールは赤色をしめす。

d) 塩化鉄 (吉川 1955)⁸⁾

e) 赤血塩試薬 (Devi ら 1963)⁹⁾

f) Pauly 試薬 (ジアゾ化スルファニル酸) (Smith 1958)¹⁰⁾

g) 1-ニトロソ-2-ナフトール試薬 (Asher, Crocker 1952)¹¹⁾

h) エーリッヒ試薬 (*p*-ジメチルベンズアルデヒド) (Smith 1958)¹⁰⁾

i) *p*-ニトロアニリン試薬 (ジアゾ化-*p*-ニトロアニリン) (Block, Durrum, Zweig 1958)¹²⁾

j) Gibbs 試薬 (2,6-ジクロロキノ-4-クロリイミド) (インドフェノール反応) (Block ら 1958)¹²⁾

k) ニンヒドリン (0.2% 水飽和ブタノール溶液)

なお、若干の成分について紫外線吸収曲線を測定するためにマスハーバークロマトグラフ法によって試料をあつめた。

実験結果および考察

〔体液のメラニン生成〕

第 1 図に示したようにメラニンはインキュベーション後急速に生成された。そしてインキュベーション後 5~8 時間にかけてほぼ平衡にたった。

〔脱蛋白体液のフォリン反応〕

第 2 図に示すようにインキュベーション後、3~4 時間で、脱蛋白体液 deproteinized haemolymph のフォリン (Lowry) 反応はいちぢるしく減少し、以後ほぼおなじ値をしめした。一方、酢酸緩衝液で酸性にするとフォリン反応にたいする response はインキュベーション 1 時間後でインキュベーション前の 1.5 倍にたし、しばらくすると最初の 50% になり、以後おなじ値をしめした。フォリン (Acetate) 反応はジフェノールのみ呈色するといわれている。フォリン (Lowry) 反応はチロシンやドーバなどフェノール性化合物の他、トリプトファンや尿酸なども呈色させるので、フォリン (Lowry) 反応で呈色度が減少しても、い

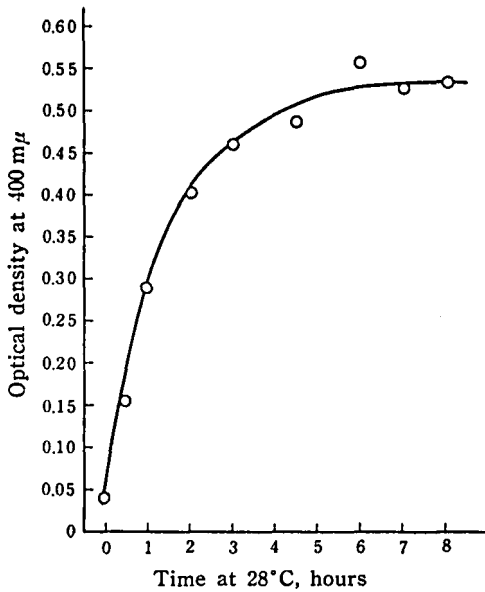


Fig. 1. Formation of melanin in the larval haemolymph at 28°C.

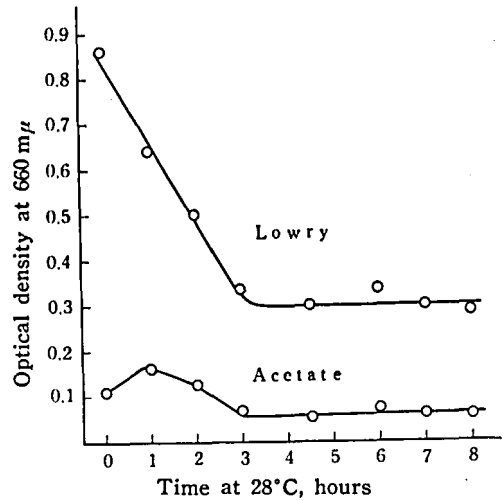


Fig. 2. Changes in the non-protein Folin (Lowry) and Folin (Acetate) responses of the larval haemolymph at 28°C during the melanization and after.

Table 1. Paper chromatography of non-protein Folin (Lowry) positive components in the larval haemolymph.

Compounds	Rf values in different solvent mixtures				Compounds to be expected	Folin (without alkali)	Folin (after alkali)	Silver nitrate	Nitrate-Molybdate (without alkali)	Nitrate-Molybdate (after alkali)	Ferric chloride	Potassium ferricyanide	Pauly's diazotized sulphaniic acid	1-Nitroso-2-naphthol	p-Dimethylaminobenzaldehyde	Diazotized p-Nitraniline	2,6-Dichloroquinone 4-chlorimide	Ninhydrin
	1	2	3	4														
A	0.70	0.54	0.48	0.74		—	+	+	—	—	—	—	o	—	—	rp	b	—
B	0.48	0.29	0.35	0.42	Tryptophan	—	+	—	—	—	—	—	—	gybn	p	—	—	+
C	0.44	0.25	0.32	0.31	Tyrosine	—	+	—	—	—	—	—	o	r	—	r	—	+
D	0.40	0.26	0.44	0.26		—	+	—	—	—	—	—	y	—	—	rp	b	—
E	0.31	0.14	0.18	0.21		—	+	—	—	—	—	—	—	r	—	rp	—	
F	0.27	0.09	0.22	0.11	Dopa	+	+	+	y	r	dkr	yo	r	—	—	rp	p	+
G	0.25	0.15	0.10	0.15	Uric acid	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	y	—
H	0.12	0.09	0.11	0.17		—	+	+	—	—	—	—	—	r	l	rp		
I	0.03	0.03	0.04	0.05		—	+	+	—	—	—	—	r	—	l	rp		
Tryptophan	0.48	0.29	0.35	0.42		—	+	—	—	—	—	—	—	gybn	p	—	—	+
Tyrosine	0.44	0.25	0.32	0.31		—	+	—	—	—	—	—	o	r	—	r	—	+
Dopa	0.27	0.09	0.22	0.11		—	+	+	y	r	dkr	yo	r	—	—	rp	p	—
Uric acid	0.25	0.15	0.11	0.15		—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	y	—

Solvent systems used were : 1) *n*-Butanol/Acetic acid/Water (4:1:2), 2) *n*-Butanol/Acetic acid/Water (9:1:10), 3) *n*-Butanol/*n*-Propanol/Water (1:2:1), 4) Ethylacetate/Acetic acid/Water (9:2:2).

Abbreviations for colours (small letters). b: blue, bn: brown, dk: dark, gy: grey, l: lemon, o: orange, p: purple, r: red, y: yellow.

がいにフェノール類の量が減少したとはいえないが、それにともないジフェノール量が増加しているの、第2図はメラニン生成にともないとくにモノフェノール量が減少しジフェノール量が増加し、モノフェノールから生成されたジフェノールは更に他の化合物に変ったことをしめすものとおもわれる。

〔脱蛋白体液におけるフォリン (Lowry) 陽性物質の同定〕

第1表および第3図にしめすように黒色型幼虫の体液から9個の非蛋白性フォリン (Lowry) 陽性物質を確認することができた。溶媒 1) において Rf の高いものから順にそれぞれ Compound A, B, C, D, E, F, G, H, I と名づけることにした。B, C, F, G の紫外線吸収極大は第2表にしめた。

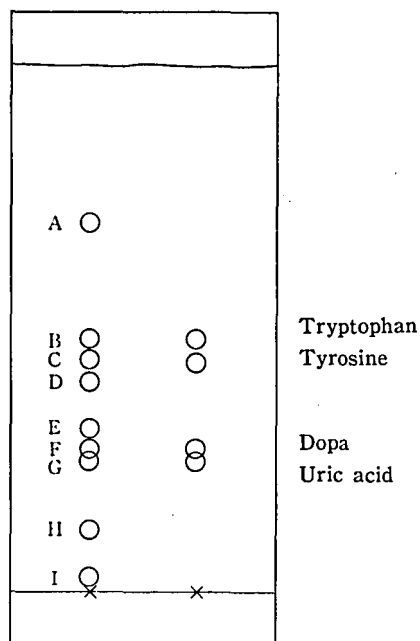


Fig. 3. Paper chromatography of non-protein Folin (Lowry) positive components in the larval haemolymph. Solvent was a mixture of *n*-butanol, acetic acid, and water (4:1:2). At the right-hand of the paper, the authentic compounds were applied.

B は Rf 値, エーリッヒ反応で赤紫, 1-ニトロソ-2-ナフトールで灰褐色に呈色すること, 紫外線吸収曲線からおそらくトリプトファンとおもわれる。C は Rf 値, 紫外線吸収曲線および種々の定性反応とくに 1-ニトロソ-2-ナフトールで赤色をしめすことからチロシンとおもわれる。F はドーパとおもわれる。F はインドフェノール反応, 赤血塩試薬, 亜硝酸-モリブデ

ン試薬 (アルカリ) でそれぞれ紫, 黄橙, 赤色をしめすが, これらはいずれもジフェノールに特有な反応である。なお, ドーパ以外にジフェノールはみとめられなかった。G は Rf 値, 紫外線吸収曲線およびインドフェノール反応で黄色をしめすので尿酸とおもわれる。

A および D はいずれもインドフェノール反応で青色を呈した。昆虫でインドフェノール反応で青色を呈す物質として 3-ヒドロキシヌレニン, ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の ca 物質 (N-アセチルドーパミンのグルコシド), 3, 4-ジヒドロキシフ

Table 2. Absorption spectra maxima of several components in the larval haemolymph

Compounds	Maxima in acid (mμ)	Maxima in alkali (mμ)	Compounds to be expected
B	278	281	Tryptophan
C	277	295	Tyrosine
F	280	475, 305	Dopa
G	284, 230	295, 218	Uric acid

ェニル酢酸のグルコシド, 3-ヒドロキシアントラニル酸などが知られているが^{13,14)}, ペーパークロマトグラフィー所見はこれらのいずれとも異なることがわかった。インドフェノール反応はフェノール性水酸基にたいし *p*-位に置換基のないフェノール類のみに適用され, 逆にこの性質を利用すれば *p*-位に置換基があるかどうかをたしかめることができるといわれてきた。しかし *p*-位の置換基の種類によっては反応が陽性を呈する場合もあることがわかってきた。 *p*-ヒドロキシ安息香酸, *p*-クマル酸, サリチル酸, *p*-ヒドロキシフェニル酢酸, *p*-ヒドロキシフェニル焦性ブドウ酸, キサンツレン酸のいずれもペーパークロマトグラフィックな挙動は A と異なった。A および D を封管して 1N 塩酸で 100°C, 12時間煮沸したが, 変化をうけなかったので配糖体とおもわれない。A および D の構造決定は将来の機会にまきたい。

なお, 淡色型幼虫の体液からも前述した9個のフォリン (Lowry) 陽性物質を確認することができた。ペーパークロマトグラフィーから黒色型幼虫の体液は淡色型幼虫の体液に比較してチロシン量が少なくドーパ量が多いようにおもわれた。

カイコなどの体液には 3-ヒドロキシヌレニンの存在が確認されているが^{15,16)}, アヲヨトウの体液 (少なくとも黒色型幼虫) からはみとめられなかった。

〔トリプトファン, チロシン, ドーパおよび尿酸量のメラニン生成にともなう変動〕

メラニン生成にともないとくにモノフェノール量が

Table 3. Quantitative variations of several components in the larval haemolymph during the melanization

Compounds	Incubation time (hrs)				
	$\mu\text{g/ml}$ haemolymph				
	0	1	2	3	6
Tryptophan	76.3	68.4	71.5	71.8	69.4
Tyrosine	832.0	213.3	116.0	72.0	42.0
Dopa	113.4	176.7	151.3	76.7	66.7
Uric acid	67.0	47.0	37.5	15.3	9.0

減少しジフェノール量が増加するものと推定されたが、アヲトウ幼虫の体液にみられる非蛋白性フェリン (Lowry) 陽性物質のうち化学構造の確認されたトリプトファン、チロシン、ドーパおよび尿酸について、メラニン生成にともない、黒色型幼虫の体液でこれら化合物の含有量がどのような変動をしめすか検討をこころみた。

第3表にしめすようにトリプトファン量はほとんど変動がみられなかった。チロシン量は急速に減少し、6時間後にはインキュベーション前の約半になった。チロシン以外にも1-ニトロソ-2-ナフトールで呈色する化合物がみつめられるので、厳密には1-ニトロソ-2-ナフトール反応陽性物質というべきであるが、これらの物質はチロシン量に比較してはるかに少ないとおもわれるので、いちおうチロシンとして考察をすすめた。一方、ドーパ量は1時間後には1.6倍となり、3時間後から6時間後には70%から60%になった。ドーパ量の変動は第1図のフェリン (Acetate) 反応の消長によく一致している。

興味深いことにはメラニン生成にともない尿酸量がいちじるしく減少したことである。しかし両者の代謝的相互関係の結果かどうかあきらかでない。吉武、有賀 (1952)¹⁷⁾ はカイコ幼虫の皮膚を用いてメラニンと尿酸の相互関係をしらべ、外皮のメラニン量が増加すると尿酸量が減少することを報じた。一方、正常カイコの皮膚細胞では尿酸量がいちじるしく多く、油蚕では少なく、かつ皮膚の透明度がつよくなるにしたがって、その量が次第に少なくなることが知られている。最近の研究^{18,19,20)} によると色素顆粒に多量の尿酸がみつめられ、皮膚細胞内の色素顆粒の性状とその量の多寡とくに後者によって油蚕性の強弱の程度が決定されると考えられている。おなじような関係はメラニン量が増加すると尿酸量が減少する場合 (吉武、有賀1952)¹⁷⁾ にもあてはまるのか、あるいは代謝的な相互関係 (直接的あるいは間接的な) の結果、メラニン生成にともない尿酸量がいちじるしく減少するのかどうかあきらかにされていないようである。

なお、ペーパークロマトグラフィー所見では他の非

蛋白性フェリン (Lowry) 陽性物質量はあまり変動していないようにおもわれた。

〔体液中のフェノールオキシダーゼの確認〕

アヲトウの体液にフェノールオキシダーゼが存在するということは次の方法によって確認された。

黒色型幼虫の体液5 ml を用いてアセトン粉末を製し、アセトン粉末をアスコルビン酸を0.4%ふくむM/15リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。このようにしてえられた抽出液3 ml (体液1 ml に相当する) を28°Cで6時間1 mg のチロシン存在下でインキュベーションした。抽出液に少量のフェニルチオ尿素の結晶を入れてあらかじめ30分間インキュベーションしたものを対照区とした。インキュベーション後、10%トリクロル酢酸1 ml を添加して酵素反応を停止させた。そして遠心分離後、その上清をエーテルで洗い、オルソジフェノールをアルミナに吸着させた (Anton, Sayre 1962 による)²¹⁾。アルミナを0.05 N 塩酸で洗い、溶液を減圧蒸留し、その残渣をメタノール1 ml に溶解した。そして反応生成物ドーパをペーパークロマトグラフ法によって同定した。ジフェノールの呈色に赤血塩試薬を用いた。

第4図にしめされるように反応生成物としてドーパをみつめることができた。体液蛋白質によってチロシンはドーパに代謝されたのである。すなわち体液にフェノールオキシダーゼの存在を確認することができたわけである。フェニルチオ尿素でインキュベーションした対照区にはドーパは生成されなかった。フェニルチオ尿素はフェノールオキシダーゼの阻害剤として知られている。

前述したようにメラニン生成にともない、体液のチロシン量が減少しドーパ量が一時増加するので、フェノールオキシダーゼの natural substrate としてチロシンをあげることができる。また、メラニンはチロシンからドーパをへて生成されるものとおもわれる。

黒色型幼虫は淡色型幼虫に比べてつよいフェノールオキシダーゼ活性をしめす (池本1967)²²⁾。相変異による皮膚の黒化現象はフェノールオキシダーゼの活性増大にともない体液のチロシンがドーパになり、生成さ

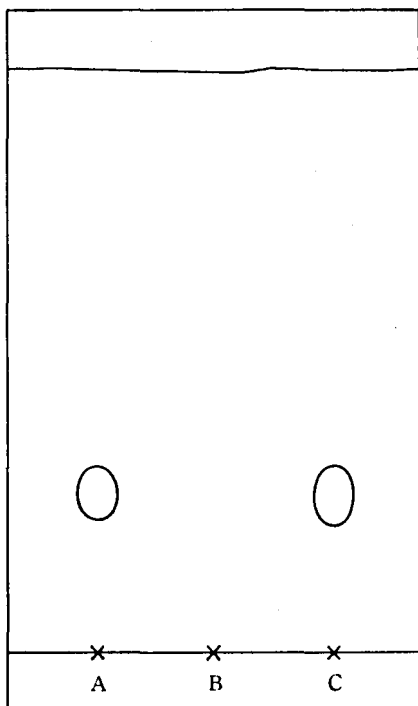


Fig. 4. Paper chromatographic identification of dopa formed in tyrosine-ascorbic acid-haemolymph incubation. Solvent was a mixture of *n*-butanol, acetic acid, and water (4:1:2). The paper was sprayed with the potassium ferricyanide reagent. A, reference dopa B, phenylthiourea control; C, phenoloxidase product.

れたドーパは皮膚にうつり、外皮でドーパはメラニンになるためとおもわれる。

〔黒色型幼虫と淡色型幼虫の体液にみられるチロシンおよびドーパ量の違い〕

黒色型幼虫と淡色型幼虫の体液にみられるチロシンとドーパの含有量を比較したところ、第4表に示めされるように黒色型幼虫は淡色型幼虫よりもチロシンおよびドーパともに多量ふくまれていることがわかった。

Table 4. Comparison of tyrosine and dopa contents in the haemolymph between pale larvae and black larvae

Compounds	$\mu\text{g/ml}$ haemolymph	
	Tyrosine	Dopa
Larval type		
Pale larvae	540.0	<50.0
Black larvae	840.0	113.4

このことはチロシンは体液フェノールオキシダーゼの natural substrate とおもわれるという考えを支持するものである。なお、淡色型幼虫の体液を用いてワールブルグ検圧計でチロシンを基質としてフェノールオキシダーゼの活性を測定すると、酸素吸収はいわゆる誘導期 (lag period) をしめすが、黒色型幼虫の体液を用いた場合は誘導期がみられず、チロシンを酵素液に接触させるやいなや酸素吸収をしめす (池本 1967)²²⁾ が、これは一因として黒色型幼虫の方が淡色型幼虫に比較して多量のドーパをふくんでいるためとおもわれる。

要 約

高密度で飼育されたアワヨトウ *Leucania separata* 幼虫 (黒色型) の体液を用いて体液にふくまれる非蛋白質性フォリン (Lowry) 陽性物質とメラニン生成との関係について2, 3の実験をおこなった。

ペーパークロマトグラフ法により体液のなかに9個の非蛋白質性フォリン (Lowry) 陽性物質を確認することができた。そのうち4個はトリプトファン、チロシン、ドーパおよび尿酸と推察された。

体液をフラスコ内でインキュベーションするとメラニンが生成されるが、メラニン生成にともない高濃度ふくまれていたチロシンはいちじるしく減少し、ドーパ量はメラニン生成がおこる前に一時的に増加した。時間がたつとドーパ量の減少がみられたが、これはドーパがさらに化学的変化をうけてメラニンになるためとおもわれる。

体液のなかにフェノールオキシダーゼの存在を確認することができた。したがって前述の実験から体液フェノールオキシダーゼの natural substrate はチロシンで、メラニンはチロシンからドーパをへて生成されるものとおもわれる。

メラニン生成にともない尿酸量もいちじるしく減少したが、はたしてメラニン生成と関係があるのかどうか、関係があるとしても、どのようなしくみによっておこなわれるのかあきらかでない。

黒色型 (高密度飼育) 幼虫の体液は淡色型 (単独飼育) 幼虫の体液に比較して多量のチロシンおよびドーパがふくまれていた。その生理的意義については2, 3論議をした。

(本報告の概要は昭和44年8月17日、日本応用動物昆虫学会東海支部第15回講演会で発表した)

文 献

- 1) 池本 始: 印刷中 (1971).
- 2) Evans, J. J. T.: *J. Insect Physiol.*, 14, 277 (1968).

- 3) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 4) Udenfriend, S. and J. R. Copper : *J. Biol. Chem.*, 196, 227 (1952).
- 5) Arnow, L. E. : *J. Biol. Chem.*, 118, 531 (1938).
- 6) Horn, M. J. and D. B. Jones : *J. Biol. Chem.*, 157, 153 (1945).
- 7) Caraway, W. T. : *Am. J. Clin. Path.*, 25, 840 (1955).
- 8) 吉川秀男 : 遺伝生化学実験法, 生物学実験法講座 12 C, 中山書店, 東京 (1955).
- 9) Devi, A., M. A. Mukundan, F. V. Patil and N. K. Sarkar : *Experientia* 19, 404 (1963).
- 10) Smith, I. : *Chromatographic techniques*, William Heinemann Medical Books Ltd. (London) (1958).
- 11) Ascher, R. and C. Crocker : *Biochim. Biophys. Acta* 9, 704 (1952).
- 12) Block, R. J., E. L. Durrum and G. Zweig : *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, Academic Press INC. (New York) (1958).
- 13) Okubo, S. : *Med. J. Osaka Univ.*, 9, 327 (1952).
- 14) Tomino, S. : *Experientia* 19, 231 (1963).
- 15) Tomino, S. : *Jap. J. Zool.*, 16, 61 (1963).
- 16) Tomino, S. : *J. Insect Physiol.*, 11, 581 (1965).
- 17) 吉武成美, 有賀久雄 : 日蚕雑 21, 7 (1952).
- 18) 辻田光雄, 桜井 進 : 日蚕雑 33, 289 (1964).
- 19) 辻田光雄, 桜井 進 : 日蚕雑 33, 247 (1964).
- 20) 辻田光雄, 桜井 進 : 蚕糸学会東海支部大会講演要旨 12, 23 (1964).
- 21) Anton, A. H. and D. F. Sayre : *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 138, 360 (1962).
- 22) 池本 始 : 日本応用動物昆虫学会東海支部 第

11回講演会 (1967).

Summary

It has been known that larvae of the armyworm, *Leucania separata* show greenish yellow or reddish brown colour when reared in isolation. But those reared in high density show the fine velvety black in their appearance.

The relationship between non-protein Folin (Lowry) positive components and melanin synthesis was studied at biochemical point of view by using haemolymph of the black larvae of the armyworm.

By means of paper chromatography, nine non-protein Folin (Lowry) positive components were found in the larval haemolymph. They were tyrosine, dopa, tryptophan, uric acid and five unknown substances. The haemolymph began to melanize when it was exposed to air. And it formed melanin for 1 to 6 hrs or more when gently shaken at 28°C. With advancing melanization, tyrosine was markedly decreased in its concentration and a considerable amount of uric acid was disappeared. On the contrary, the dopa increased to prior to the melanization temporarily, and phenoloxidase that converts tyrosine to dopa was found in the haemolymph. From these experiments, it is inferred that tyrosine is a natural substrate for phenoloxidase and a major precursor of melanin in the haemolymph. Still there are some questions whether uric acid takes a part in the melanin synthesis or not.

Further, it was found that contents of both tyrosine and dopa in the black larval haemolymph were higher than those in the pale larval haemolymph.