

家蚕卵の Riboflavin に関する研究

第1報 催青中に於けるその含量の消長について

山口定次郎*・清水 猛*・西沢 一俊**

Sadajiro YAMAGUCHI, Takeshi SHIMIZU and Kazutosi NISHIZAWA : Studies on Riboflavin in Silkworm Egg. Part I. Variation of Riboflavin Content during the Incubation Period

(1953年9月15日受理)

家蚕の Vitamin B₂ (リボフラビン) に関する研究の中、卵以外では前田⁽¹⁾三島⁽²⁾鷺見及都築⁽³⁾ DRILHON et BUSNEL⁽⁴⁾丸尾及小池⁽¹⁰⁾小柳⁽¹¹⁾等の業績があり、卵に於ては細川等⁽¹⁵⁾の測定並に吉川⁽⁹⁾の観察があるが之はリボフラビンの存在を確認した実験で、特に生理的意義を探究したものではない。又 DRILHON et BUSNEL は柞蚕 (*Attacus pernyi*) の変態とリボフラビンの関係を観察し、卵内では發育に伴なつて増加することを認め、最近に於て BODINE 等⁽¹²⁾⁽¹³⁾はバツタ卵の發生中のリボフラビン及其他の螢光物質を fluorophotometer により研究した結果、胚子發生の初期のリボフラビン量は変化が少なく、その後期に至り激減すると共に、プテリン様物質が著しく増加するという事を見出し、リボフラビンからプテリン類似物が誘導されるものと考へた。尙之に関連して有賀等⁽²⁰⁾⁽²¹⁾の興味深い研究がある。

近來の研究によればリボフラビンは新及旧黄色酵素の補酵素成分となつてゐることが明かであるので、蚕卵のリボフラビンも何等が重要な生理的意義をもつものではないかと推測し、著者等は先ず催青期間中のリボフラビンの總含量の変化を詳細に観察した。

本研究を行うに當り懇切な御指導を賜つた蒲生教授に対し、又実験に助力された大日方仁氏に対し深謝の意を表する。

尙本研究の一部は昭和26年度文部省科学研究費によるものである。

供試材料及方法

A 試料とその採取法

* 信州大学繊維学部蚕種学研究室

** 信州大学繊維学部化学研究室

a. 供試蚕卵：日115号(新)×支108号、日122号×支122号、両者共越年卵を使用。

b. 試料の採取法：予備実験に於て蚕卵は、新鮮物1g (1gは卵約2000粒) 以上を用い、可也正確に定量出来ることを確認したので、催青着手と同時に、予め一定量を正確に秤量しておき、之を各1区とし毎日又は予定日の試料とし、催青中は午後4時に採取した。催青温湿度はそれぞれ25°C75%とした。尙胚子はそれぞれ第1日目丙B、4日目反転期、6日目氣管發生期、8日目頭部黒色点青期、9日目蟻體完成、10日目は孵化開始であつた。

B リボフラビン定量法

リボフラビン定量法としては「ラクトフラビン螢光法」⁽¹⁴⁾及「ルミフラビン螢光法」⁽¹⁴⁾に従い蚕卵中の總含量を測定した。

a. 「ラクトフラビン法」では (1)蚕卵1及2gの磨砕物を水浸出を行つた後、タカジアスターゼにより1昼夜処理後、水解 (H₂SO₄, 80°15分間) を行い、(2)アソールに吸着させ、(3)アンモニア水をもつて3回以上予浸を行い、(4)ピリジン醋酸液で溶出し、(5)過マンガン酸加里で酸化し、(6)之を添加実験区と共に紫外線の下で、滴定により、標準B₂液とその螢光の強度を比較定量した。

b. 「ルミフラビン法」では供試料各5gを1区とし、(1)前者の方法と同様に水解、浸出を行い、(2)30°Cで200w電球で1時間照射して光分解を起さしめ、(3)水溶液をクロロフォルムにより予浸を行い、(4)更に氷醋酸を含むクロロフォルム液に振盪溶出せしめ、(5)酸化後に、紫外線下で添加実験と共に標準リボフラビン液と比較を行つた。

c. paper chromatography には butanol 醋酸水で1次元法で展開し紫外線下で観察した。

実験結果

(1)蚕卵のリボフラビンを「ラクトフラビン蛍光法」により定量した結果は、Table 1 及 Fig. 1 に示す通りであつて、発生初期には比較的少ないが、胚子の發育に伴つて可也に増加し、孵化直前著しく多く、蠶蚕では絶食時間と共に減少していくことが判つた。

(2)「ルミフラビン蛍光法」により観察した結果も、ラクトフラビン法と略同様に増加を示すが末期の増加割合が前者より少ない。孵化後の蠶蚕では少しく減少する。(Table 2 及 Fig. 1)

(3)ラクトフラビン法によると蛍光色が、リボフラビンの黄色蛍光に加ふるに稍青白色を帯びているが、paper chromatogram にはリボフラビンのみが認められた。もし他の物質が多少とも混在するとすれば、リボフラビンと R_f 値が近い所のプテリンの或種のものではないかと考えられる。

Table 1. Daily Variation of Riboflavin in Silkorm Eggs during Incubation

Days of incubation	Quantity of riboflavin (γ) in 1g.* fresh eggs	
	Before oxidation of pyridine extracts	After oxidation of pyridine extracts
0. At the beginning of incubation	32.7	21.3
1 Day	53.3	36.7
2 Days	53.3	33.3
3 "	61.7	86.7
4 "	71.1	80.0
5 " Inversion stage	53.3	80.0
6 Days	60.0	133.3
7 "	71.1	106.7
8 " (Black head)	83.8	133.3
9 Just before hatching	130.9	186.6
10. 1 day after hatching (starved)	75.5	133.3
11. 2 days after hatching (starved)	60.4	106.7

Method : Lactoflavin fluorescence method
Material : N. 115 (Shin) × C. 108 hibernated

egg

* This 1g. shows the weight of fresh egg at the beginning of incubation.

Table 2. Riboflavin in Silkorm Eggs during Incubation

Stage of embryo in incubation	Quantity of riboflavin (γ) in 1g.* fresh egg	
	Before oxidation of pyridine extracts	After oxidation of pyridine extracts
2 days	59.0	53.0
5 " (Inversion stage)	67.5	69.5
9 (Black head)	73.5	80.5
11 " New hatched larva	69.0	—

Method : Lumiflavin fluorescence method.

Material : N. 122 × C. 122 hibernated egg.

* This 1g. shws the weight of fresh egg at the beginning of incubation.

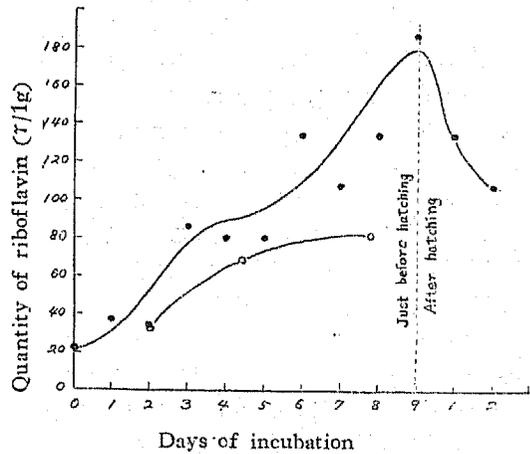


Fig 1. Variation of riboflavin contents in silkorm eggs during incubation.

● — ● By the lactoflavin method.
○ — ○ By the lumiflavin method.

考 察

上記の如くリボフラビンは蚕卵の発生中に可也増加することが判るが、之は明かに催青中に於てリボフラビンが卵内で合成されていることを示すものであつて、卵のカタラーゼ作用、⁽⁹⁾呼吸⁽³⁾⁽¹⁸⁾や胚子成長⁽⁸⁾等の曲線と平行関係にある点から見て、胚子発生中の卵の分解代謝現象に或役割を演じているものと考えられる。

然しながら注意すべきことは、BODINE 等⁽¹²⁾ がバツタでの研究で述べているように、卵内の螢光物質中にはフラビン以外にプテリン様物質が可也多いということでは蚕では吉川⁽¹⁰⁾ 有賀等⁽²⁾ によつて明かにされている。勿論ラクトフラビン螢光法は、リボフラビン以外の螢光物質を絶無にするように工夫されたわけであるが、3回以上の予浸を経ても尚ピリジン抽出液の螢光が、標準リボフラビン液に比し稍青白色を帯びて見える事は数回の吟味によつても否定することは出来なかつた。之に反しルミフラビン法によると、螢光色調は標準液の黄色に酷似し測定は比較的容易であつた。増加の傾向はラクトフラビン法で測定した場合より稍緩慢であるが大略同様と見做された。そこでもしラクトフラビン法でプテリンが多少でも混在して来るとすれば、この方法はプテリン様物質を伴うリボフラビンの定量には不適當であるということになる。著者等がピリジン溶出の螢光物質を paper chromatogram で観た所ではリボフラビン 1 種のみと判定したのであるが、万一他にもありとすればおそらく処理中に分解により他の螢光物質を生じたためか或はリボフラビンと略同範圍の R_f 値を示す或螢光物質が重複して現われたためと考えられ、之は多分 xanthopterin ではないかと思われる。又プテリンはその吸収スペクトルもリボフラビンに似ているし、リボフラビンの benzen 核を失えばプテリン核を生ずる等、プテリンとリボフラビンは極めて類似している為此のような現象がおきるのではないかと考える。尙又前述のようにプテリンは化学的、物理的に類似点が多いのみでなく、白鼠の發育を促進し、動物の營養性貧血ビタミンとして知られていること⁽⁹⁾ やトリプトファンからリボフラビン、リボフラビンからプテリンが導かれたもので、何れも昆虫の色素合成に関係深いものである⁽¹⁰⁾ という点などから、之等の間に濃厚な類縁関係があることは疑いのない事実であつて、蚕卵内のリボフラビンの存在又は合成等の問題と共に新しい生理的意義が加えられると思ふ。

ひるがえつて本研究に於ては結局リボフラビンは卵の發生に伴い増加することが判つたのであるが、もしリボフラビンに類似のプテリンを完全に除きえなかつた為の結果であるとしても、リボフラビン並に之れと類縁の物質が卵内に合成されることを見出しえた点に意義があると考えらる。

尙最近に於て、有賀、吉武及江口⁽²⁰⁾ は生理遺伝研究の立場から、各種の卵についてルミフラビン法により、

リボフラビンの定量を行い、正常卵では胚子の發育と共に稍増加することを認めたが、その後⁽²¹⁾ fluoro-photometer により研究した所では BODINE 等のバツタの研究の場合と同様に、リボフラビンは、發育に伴い変化少なく、プテリン特に leucopterin B が激増すると発表している。之に対して著者等はプテリン等については調査していないが、ラクトフラビン及ルミフラビン法により得た螢光物質を paper chromatography により観察してもリボフラビン以外の位置に螢光は全く現われていなかつたという点から riboflavin のみについては蚕卵内では増加するという此の実験結果は誤りでないものと考えらる。

斯くてリボフラビンは蚕卵内で可也増加するということが知られたが、実験者により差異の生ずるのは、供試品種の相違によるためか、或はフラビンよりプテリンへ又プテリンよりフラビンへの変化の速度に差が生ずることによるものではないかと思われる。尙本研究では卵内のリボフラビンの総含量を測定したのであるが、卵内の存在部位を確めることが重要であつて、之については既に卵黄に於ては漸次減少し胚子内に於て可也増加するという結果を得ており*、甚だ興味が深い。

摘 要

家蚕卵胚子の成長に関連し、蚕卵内リボフラビンの生理的意義を究明する為「ラクトフラビン螢光法」及「ルミフラビン螢光法」をもつて卵の發育に伴うリボフラビンの定量を行つた結果、蚕卵中のリボフラビンは胚子發生の初期には比較的少いが、發育に伴つて、相當量増加することが判つた。従つてリボフラビンは蚕卵内に於て新しく合成されるものであること及び此のものと卵の發育中の分解代謝過程との間に密接の関係があることが考えられる。

引用文献

- (1) 前田 謙 (1924) 大日本蚕糸会報 393.
- (2) 三島忠光 (1936) 蚕業新報 518.
- (3) 福田仁郎 (1936) 応動学誌 8, 3-4.
- (4) 鷲見瑞穂・都築二郎 (1938) 理研彙報 (13年).
- (5) DRILHON, A. et BUSNEL, R. G. (1933) Chim. Physiol. Acad. de Sc. (Séance du 4 Juillet).
- (6) (1941) Extrait des complexes rendus des séances de la société de biologie (Séance du 28

* 未発表

- Jun 1941, Tom cxxxv, année, 1941).
- (7) 山口定次郎・小林敏 (1940) 日蚕誌 11, 3.
- (8) 山口定次郎 (1940) 教育農芸 9, 1.
- (9) 山口定次郎・清水猛 (1951) 第21回蚕糸学会講演要旨.
- (10) 丸尾文治・小池ハルコ (1941) 日農化誌 17, 3.
- (11) 小柳達男 (1941) 植物及動物 9, 9.
- (12) BODINE, J.H. and FITZGERALD, L.R. (1947) *Physiol. Zool.* 20, 2.
- (13) — (1943) *Ibid* 21.
- (14) 藤田秋治 (1948) ビタミンの化学的定量法.
- (15) 細川豊・小田直人・池田忠夫 (1949) 日本化学会第 二年会講演要旨.
- (16) 吉川秀男 (1951) 日蚕誌 20, 1 (要旨).
- (17) 山口定次郎・大日方仁・西沢一俊 (1951) 日蚕中部 支部講演集 Ⅲ.
- (18) 西沢一俊・大日方仁・山口定次郎 (1951) 日蚕中部 支部講演集 Ⅲ.
- (19) 田中義響 (1952) 家蚕遺伝学 p386—392.
- (20) 有賀久雄・吉武成美・江口正治 (1952) 日蚕誌 21, 5~6.
- (21) 有賀久雄・吉武成美・江口正治・石原廉 (1953) 第 23回日蚕学会講演要旨.

Summary

It is a well known fact that riboflavin (vitamin B₂), playing an important role as a growth factor almost in any living thing, is a building stone of the old and new yellow enzymes. Since we have recently found that the riboflavin is

contained in silkworm eggs in a considerably larger quantity per unit weight than at other metamorphic stages of the worm, although no increase of riboflavin is noted by BODINE in the grasshopper egg, we have determined its contents by means of both 'the lactoflavin fluorescence method' and 'the lumiflavin fluorescence method' during the period of incubation of the egg. Then the following results were obtained.

(1) The quantity of riboflavin in the silkworm egg, by the lactoflavin method, is found to be relatively small at the beginning of the incubation, and it increases gradually at the earlier stage, but markedly at the last stage, showing a similar curve with that of the embryonic growth and that of the respiration.

(2) By means of the lumiflavin method, it is found out that the quantity of riboflavin generally increases similarly as by the lactoflavin method.

(3) This increase of riboflavin during incubation can be inferred to be due to the new synthesis of the riboflavin in the egg.

From this point of view we have presumed some intimate physiological relations between this substance and catabolic processes in the silkworm egg.

(Laboratory of Silkworm-egg Science and Chemical Laboratory, Faculty of Textile and Sericulture, Shinshu University)