

臭蚕の糞に存在する臭物質について

| | |
|-------|----------------------------|
| 誌名 | 日本蠶絲學雜誌 |
| ISSN | 00372455 |
| 著者 | 吉武, 成美 小林, 正彦 小川, 洋子 |
| 巻/号 | 47巻2号 |
| 掲載ページ | p. 161-165 |
| 発行年月 | 1978年4月 |

臭蚕の糞に存在する臭物質について

吉武成美・小林正彦・小川洋子

文京区弥生・東京大学農学部(〒113)

(1977年9月28日受理)

Narumi YOSHITAKE, Masahiko KOBAYASHI and Yoko OGAWA: On a smell factor existing in faeces from the skunk silkworm, *Bombyx mori*

臭蚕(くさこ)は一種の遺伝的代謝異常蚕で、その排泄糞はへい死蚕がくさったような悪臭がする。遺伝的には第22染色体に座位する劣性の *sku* 遺伝子に支配されているが、ホモの個体は化蛹できないので、遺伝的致死蚕とみなすことができる(吉武ら, 1978; 土井良ら, 1977)。5 齢期における血液と糞の遊離アミノ酸組成を、同一蛾より分離した正常蚕と臭蚕の間で比較したところ、臭蚕はロイシン、イソロイシンおよびバリンなどが血液中に異常に蓄積し、糞中にも比較的多く排泄されていることから、これら脂肪属アミノ酸の代謝系に異常があることが推察された(井口・吉武, 1978)。

そこで臭蚕の糞より臭物質を抽出し、精製後同定を行ったところ、この臭物質の本体はイソ吉草酸であることがわかった。イソ吉草酸の代謝異常としては、すでにヒトでイソ吉草酸血症が知られているが(TANAKA ら, 1966)、昆虫では臭蚕が初めてであり、この突然変異の発見によって昆虫の短鎖脂肪酸代謝の全貌が明らかにされることが期待される。この報告では臭物質の同定の過程についてその大要を述べる。

本研究を行うにさいして種々ご助言を賜った東大農学部害虫学研究室池庄司敏明助教授に感謝する。なお本研究の一部は文部省科学研究費総合研究 A (代表者筑紫春生博士)によって行ったものである。

材料と方法

1. 材料

1 蛾別に掃立て 1 齢末期に悪臭のする蛾区だけ残して飼育した。4 齢盛食期にアイスクリームカップで 1 個体ずつ飼育し、正常蚕と臭蚕とを分別した。

5 齢期間中の正常蚕と臭蚕の糞を別個に集め、実験材料とした。

2. 臭物質の粗抽出

一定量の糞に蒸留水を加えた後、6 N 塩酸で pH 1.0 に調製する。この酸性液をエーテルで数回抽出した後、エーテル層を集めて無水硫酸ソーダで脱水後、窒素ガスを通しながら減圧乾固した。この残渣を粗抽出物として次の段階の実験に供試した。

3. シリシクアシド クロマトグラフィー

Bio-Sil A (100~200メッシュ, Bio-Rad Laboratory 製) を 40 g クロロホルムに懸濁させ、これを 2×40cm のガラスカラムに充填した。前記のエーテル粗抽出物を少量のクロロホルムで溶解し、その約 1 ml をカラム上に添加し展開を行った。展開は室温で行い、溶出液は試験管 1 本当たり 15 ml ずつの分画として採取した(実験結果の項参照)。

4. ガスリキッド クロマトグラフィー (GLC)

GLC の方法は、一般に用いられている低級脂肪酸分析方法に従って行った。試料の検出は水素炎検出器 (Shimadzu-4B FID) により行い、カラムの条件は 0.3×300cm のステンレスカラム、充填剤 OV-101 (島津製) を用い、50~140°C (毎分 3°C) の昇温で測定した。

5. マススペクトロメトリー

マススペクトロメーターはガスクロマトグラフィーと結合した、日立 GC-MS K53 を使用した。質量スペクトルは電子ビームのエネルギー 70 eV で測定した。

実験結果

1. 臭物質の定性

臭物質の溶解性を調べてみると、エーテル、アセトンなどの有機溶媒には溶解性が高いことがわかった。またエーテル溶液から水へアルカリ性では溶出してくるが、酸性では全く溶出されないのので、この臭物質は酸性物質であると考えられた。さらに、2, 3の定性反応を行った結果は次のとおりである。

- 1) p-ニトロブシッドソーダによる含硫イオンの定性は陰性。
- 2) 塩化第2鉄反応陰性、従ってフェノール類ではない。
- 3) アセチル化を行ったが陰性、従ってアルコール類やフェノール類ではないと考えられる。

2. 臭物質のシリシクアシド クロマトグラフィーによる精製

臭物質の分離精製を種々の方法で試みたが、糞中のクロロフィルが障害となって精製が困難であった。しかしシリシクアシド クロマトグラフィーを用いることによって、かなりきれいに精製することができた。

すなわち前記材料と方法の項で述べた、臭物質のエーテル粗抽出物を、シリシクアシドカラムに添加し、次のような溶媒で順次溶出した。

- | | |
|-----------------|------------------|
| 1) クロロホルム | 100ml |
| 2) クロロホルム：メタノール | (99：1) 300ml |
| 3) 同上 | (98：2) 300ml |
| 4) 同上 | (96.5：3.5) 200ml |
| 5) 同上 | (95：5) 200ml |

6) 同上

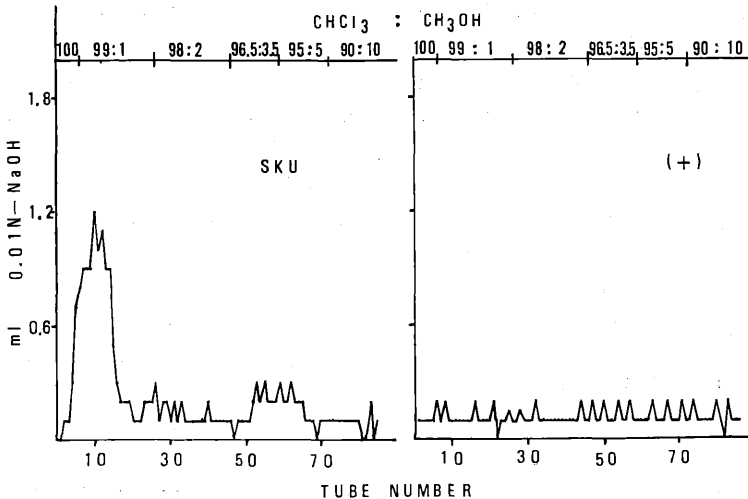
(90：10) 200ml

分画は15mlずつとし、各試験管から1mlずつとり窒素ガスを通じながら、フェノールフタレインを指示薬として0.01N水酸化ナトリウムで滴定すると同時に、各分画溶液の臭を調べた(第1図)。図に示した滴定結果をみると、臭蚕の場合は大小2つのピークがみられ、大きなピークはクロロホルム・メタノール(99：1)の溶出液のところで流出した分画で、臭蚕の糞独特の臭が検出された。一方小さいピークの分画には臭がなかった。正常蚕の場合には特徴あるピークはみられず、またどの分画にも臭はなかった。

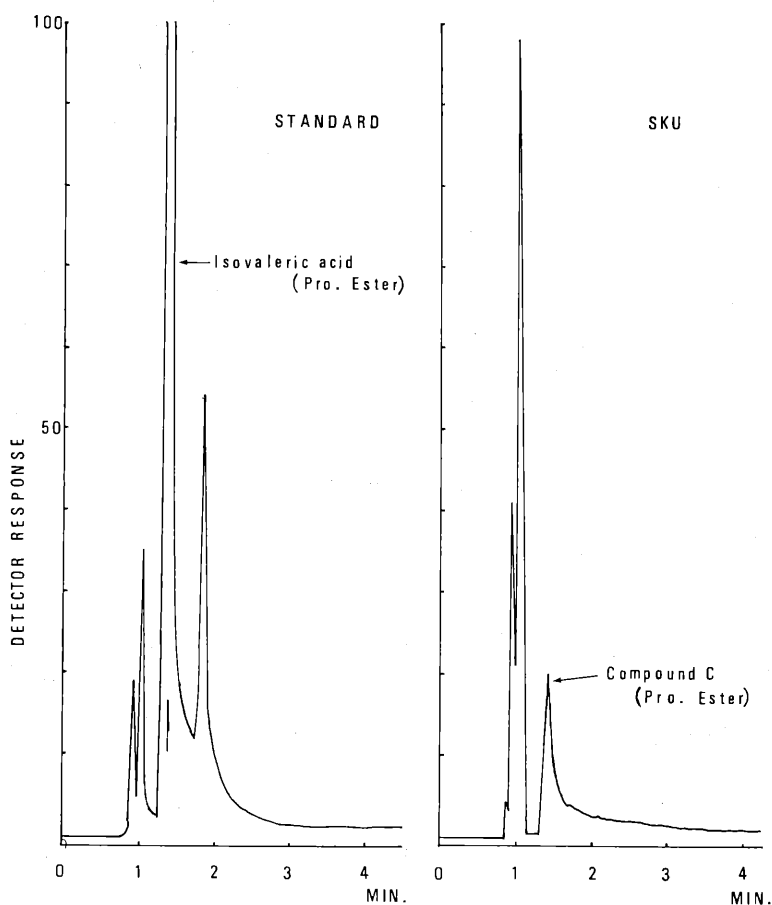
そこで臭蚕の大きなピークの分画を集め、窒素ガスを通じながら減圧乾固し、この残渣にリン酸を加えて酸性とし水蒸気蒸溜を行った。蒸溜物をアルカリ性にして窒素ガスを通じながら減圧乾固し、この残渣に少量の3.5% 蟻酸溶液を加えて溶解し、ガスクロマトグラフィーの試料とした。

3. 臭物質の同定

上記試料について、材料と方法の項で述べた条件でガスクロマトグラフィーを行った結果、臭物質はイソ吉草酸と同一の保持時間を示した(第2図)。さらに精製臭物質とイソ吉草酸をプロピル化して保持時間を調べた結果、主ピークがエステル化していない場合より早い時間にあらわれ、しかも両者の主ピークの保持時間も一致した。



第1図 臭物質のシリシクアシド・クロマトグラフィーによる分離



第2図 臭物質のガスクロマトグラフィー
 カラム：OV-101, 3mmφ, 3mステンレス 温度：60~13°C, 4°C/分

以上の結果から、臭物質はイソ吉草酸であると考えられるが、さらにマスマスペクトロメトリーによって検討した。マスマスペクトルにおいては、カルボン酸の特徴である m/e 60 の強い吸収を示し、またイソ吉草酸の特徴であるイソプロパノール基 $[(CH_3)_2CH-]$ の m/e 43 の強い吸収がみられた(第3図)。これらの結果から、臭物質はイソ吉草酸であることが同定された。

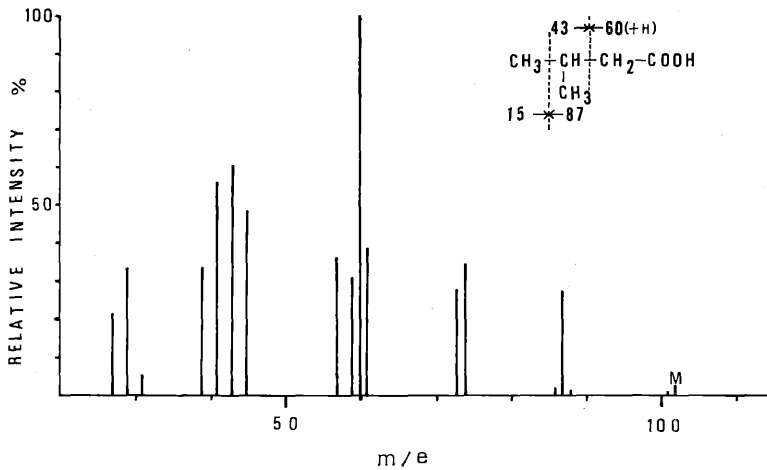
4. イソ吉草酸グリシンの存否

ヒトのイソ吉草酸血症においては、その代謝物としてイソ吉草酸グリシンの存在が知られている(TANAKA ら, 1957)。そこで臭蚕において、この物質が存在するか否かを検討した。イソ吉草酸グリシンはシリニックアシッド クロマトグラフィーで溶媒

クロロホルム・メタノール(98:2)で溶出してくることが TANAKA によって明らかにされている。しかし臭蚕の糞中にはこの位置に溶出する物質は認められなかった。従ってカイコではイソ吉草酸 CoA からイソ吉草酸グリシンへの代謝系が存在しないものと考えられるが、さらに他の方法で検討する必要がある。

考 察

すでに述べたように、ヒトでは先天性短鎖脂肪酸代謝異常としてイソ吉草酸血症が発見されている(TANAKA ら, 1966; BUDD ら, 1967; TANAKA, 1975)。本病の患者は間歇的に嘔吐、ケトアシドーシス、昏睡を繰返すとともに、イソ吉草酸に特有な



第3図 臭物質のマススペクトル

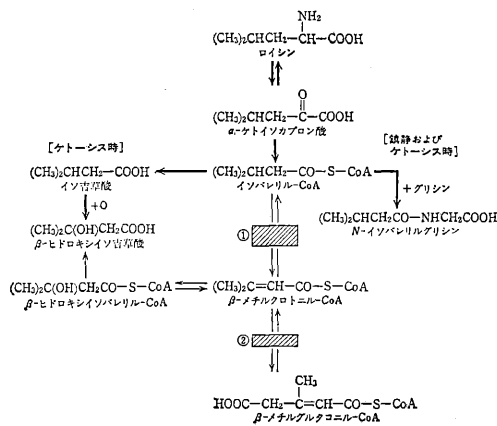
臭気を発するのが特徴であるが、間歇時にはほとんどこのような症状を示さない。生後数週間はことに症状が重く約30%はこの時期に死亡するが、成長するとともに発作が軽くなり、またその回数も減少するが普通知能低下がみられるという。

イソ吉草酸血症は、1950年代より多数記載されたアミノ酸代謝異常症と異なり、代謝阻害が原アミノ酸から少なくとも3段階あるいはそれ以上反応が進んだ段階に酵素欠損が存在するため、原アミノ酸は蓄積されず従ってアミノ酸分析では発見されなかった(第4図:田中, 1975)。その後ガスクロマトグラフィー、核磁気共鳴あるいは質量分析などの機器分

析法の発展によって、それらの分析機器を用いてイソ吉草酸血症その他数種の短鎖脂肪酸代謝異常が発見され、現在では有機酸代謝異常症の一部として、小児科学および人類遺伝学上重要な疾患群として理解されるに到っている。

ヒトのイソ吉草酸血症とカイコの臭蚕において、ともにイソ吉草酸が蓄積され排泄されるという点については、類似の代謝異常と考えられる。しかし臭蚕では前報(井口・吉武, 1978)で述べたようにロイシン、イソロイシン、バリンなど脂肪属アミノ酸の蓄積がみられるのに対し、ヒトのイソ吉草酸血症ではこのような現象はみられないという。このような差異が生ずる原因の1つとして考えられるのは、実験結果の項で述べたように臭蚕ではイソ吉草酸グリシンの存在が認められず、従ってイソ吉草酸 CoA → イソ吉草酸グリシンの代謝系がないためではなかるうか。すなわち、臭蚕ではイソ吉草酸グリシンへの代謝系がなく、しかもイソ吉草酸 CoA 脱水素酵素が欠損しているため、酵素欠損が直接ロイシンなどアミノ酸の蓄積となってあらわれるのではないかと考える。しかしこれらの問題については、さらに詳細な検討を行うことが必要である。

一方ヒトでは体内におけるイソ吉草酸の蓄積が症状の悪化をもたらすので、グリシンを投与してイソ吉草酸グリシンの生成を促進して血中イソ吉草酸の蓄積を防ぐのが、臨床的に有効であることが明らか



第4図 イソ吉草酸血症における異常代謝(田中)

にされている。カイコでは、糞から常時イソ吉草酸を排泄しているため、幼虫期には生理的障害があまり出ていないように見受けられる。しかし熟蚕以降閉鎖系になるに伴ってイソ吉草酸が蓄積し、その結果化蛹が阻害されるのではなかろうか。正常蚕の吐糸期にイソ吉草酸を注射して、臭蚕の場合と同様の未化蛹のフェノコビーをつくることのできる。このようなことから、臭蚕における化蛹阻害は、イソ吉草酸の蓄積にともなう現象と考えてよいと思う。

摘 要

臭蚕は一種の遺伝的代謝異常蚕で、その排泄する糞は悪臭がする。臭蚕の糞を集め、それより臭物質を抽出精製して、ガスクロマトグラフィーなどで同定した結果、この臭物質はイソ吉草酸であることがわかった。イソ吉草酸の代謝異常としては、すでにヒトにおいてイソ吉草酸血症が知られており、臭蚕はこれと類似の短鎖脂肪酸代謝異常であると推定された。

文 献

- BUDD, M. A., K. TANAKA, L. B. HOLMES, M. L. EFRON, J. C. DRAROFORD and K. J. ISSELBACHER (1967): *N. Engl. J. Med.*, **277**, 321-326.
- 土井良宏・筑紫春生・蛭木 理・吉武成美 (1977): 日蚕講要, 31.
- 井口民夫・吉武成美 (1978): 日蚕雑, **47**, 154-160.
- TANAKA, K., M. A. BUDD, M. L. EFRON and K. J. ISSELBACHER (1966): *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **56**, 236-242.
- TANAKA, K. (1975): In "Biology of Brain Dysfunction" (G. GAULL, ed.), Vol. 3, 143-214, pp. Plenum Press, New York.
- 田中 圭・中村栄一・鈴木義之・大木 操・赤松 稔・太田明德・渋谷 勲・野島庄七 (1975): 脂質の代謝 (生化学実験講座9), (日本生化学会編), pp. 501-527, 東京化学同人, 東京.
- 吉武成美・小林正彦・宮下民雄 (1978): 日蚕雑, **47**, 32-34.