

### 第3章 カイコの特異的アミノ酸関連物質の精製

第2章でカイコの組織器官の遊離アミノ酸プールを解析した結果，休眠誘導に関連する特異的アミノ酸関連物質(X-AA)が休眠情報の保持・伝達系に関与することが示唆された。また，カイコ蛹血液中也多量に存在する(6.61  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ )ことから，この物質の大量抽出が可能である。このX-AAの分離精製や構造解析，そして生理活性の検定のためには，まずアミノ酸プールから単離することが不可欠である。したがって，本章では薄層クロマトグラフィー(TLC)と逆相液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)の組み合わせによるX-AAの分離と精製を行った。

#### 材料と方法

X-AAの抽出用試料作製において，カイコ大造の蛹化後24時間以内の蛹から，第2章の材料と方法に述べた通りで採血した。すなわち，蛹血液1mlにスルホサリチル酸5%溶液1mlを加えよく攪拌後，10,000rpmで5分間遠心分離し，上清を $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。薄層で展開す

る直前に、保存上清を解凍してから薄層プレートに塗布した。

1. TLCによる抽出

1) 溶媒：n-ブタノール-酢酸-水(4:1:2)を展開溶媒として使用した。

2) TLCプレート：MERCK社のシリカゲルで、20×20cmプレート、吸着層厚さ0.25mmのものを使用した。

3) 試料の塗布：あらかじめ試料を解凍し、プレートのガラス下端から3cm位のところを原点に定め、ガラス毛細管(100 $\mu$ l, Drummond Scientific Company, U. S. A.)を用い1回100 $\mu$ lで帯状に塗布し、ドライヤーで乾燥してから再び塗布した。このように繰り返し、一つのプレートに5回約0.5mlの試料を添付した。

4) 試料の展開：多重展開法を使用し、同一溶媒で満足すべき分離結果が得られるまで、5回繰り返し展開を行なった。展開したクロマトプレートはその都度一晚風乾し、つぎの展開を行った。

5) 分離層の検出：ニンヒドリン呈色法を利用し、ニンヒドリンを水飽和n-ブタノールに溶かして0.1~0.2%溶液にしたものを用いた。この溶液をクロマトプレ-

トの両側の幅約 2 cm のところに噴霧してからドライヤーで加熱発色させた。両端を発色させた分離層を指標としてそれぞれの中間のシリカゲルを切り取って、エッペンドルフチューブに入れ、1 ml の蒸留水を加え、30 分間抽出した。遠心後、上清はさらに membrane filter (cellulose nitrate, pore size 0.1  $\mu$ m, 東ソー株式会社) でろ過後、アミノ酸アナライザーで各抽出物の溶出時間を調査することによってクロマトプレート上の X-AA の位置を確認した。

6) 凍結乾燥：以上の方法に従って抽出同定した X-AA を含む試料を一晩凍結乾燥した。

## 2. RP-HPLCによる分離

TLCで得られた試料をさらに逆相カラム (TSK gel ODS-80Ts, 7.8  $\times$  300 mm, 東ソー株式会社) を使用した。一連の HPLC システム LC-6A (島津製作所) で分離精製した。X-AA を含むフラクションを分取し同カラムで 3 回流し、2 回目までは 16% から 50% までのアセトニトリル + 0.05% TFA (トリフルオロ酢酸) のグラジエントで、最後には 16% アセトニトリル + 0.05% TFA で溶出した。流速は 1 ml/min で検出は 210 nm で行った。分取した X-AA

のフラクションをさらに金属分子を除去するため 9×13 mm のカラム (Chelex 100 chelating ion exchange resin, Bio-Laboratories, CA) を通し溶出後, 凍結乾燥した。

## 結 果

### 1. 薄層クロマトグラフィーによる分離

Fig. 10 に示したように, TLCプレート上に 13 個のバンドが明らかに認められたが, 一つのバンドの中に 1 個以上のアミノ酸を含んだバンドもあり, アミノ酸アナライザーでそれぞれを調査した結果, 18 個のピークを検出した (Table 8)。カイコの蛹血液で確認されている既知のアミノ酸 (Table 6) のうち, 本実験方法で検出されないものは, アラニン,  $\beta$ -アラニン,  $\beta$ -アミノ酪酸, ヒスチジン, 3-メチルヒスチジン, トリプトファン, オルニチン, アルギニンなどのように塩基性アミノ酸に多い傾向を示した。しかし, 第 2 章で見出した未同定のピークである P8 は 1 番目のバンドに, P5 は 2 番目のバンドに含まれていた。特異的アミノ酸 (X-AA) は 3 番目のバンドで, 両隣のバンドとよく分離して検出さ

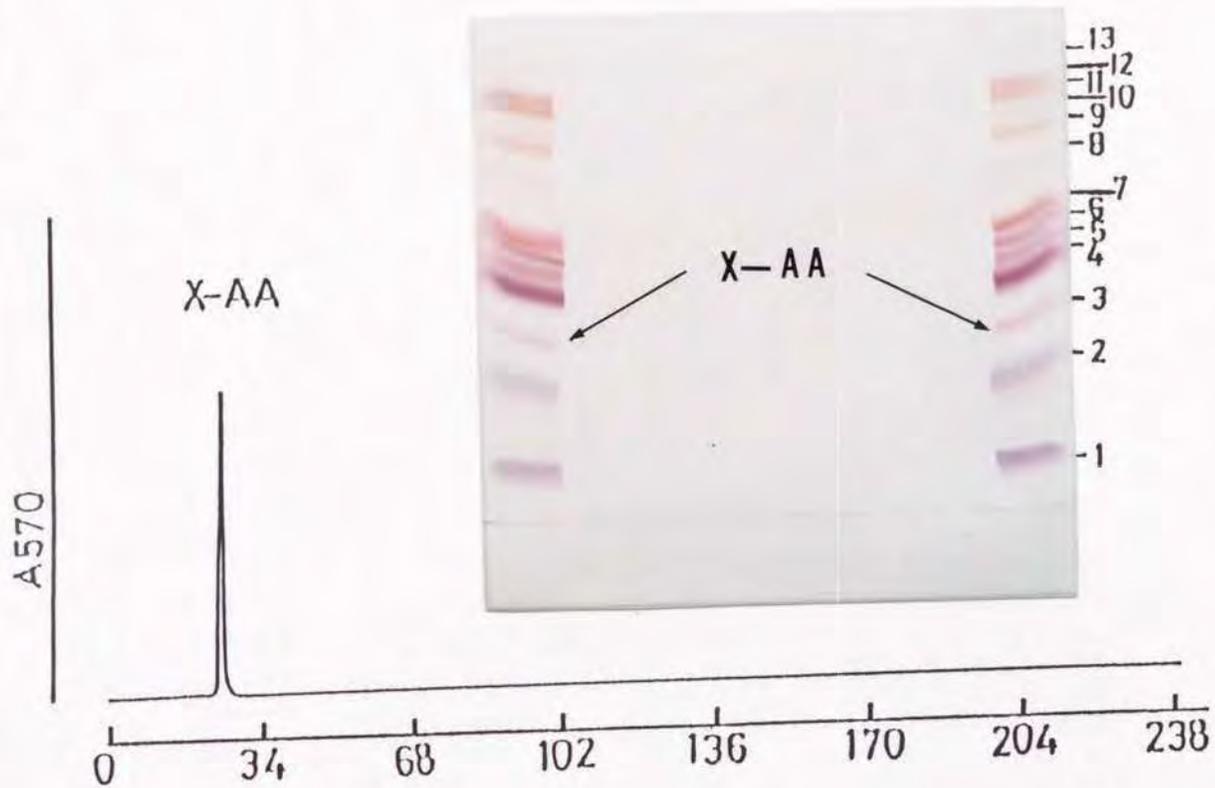


Fig. 10. Specific amino acid derivative (X-AA) demonstrated by the thin-layer chromatography and high speed amino acid analyzer.

The inset photograph is thin-layer chromatogram of the pupal haemolymph extract which was visualized by ninhydrine agent. This fraction was also demonstrated by the amino acid analyzer.

Table 8. Amino acids corresponding to each band of the TLC plate

TLC plate*		Amino acid analyzer	
No. of chromatogram	Rf	Identified	Retention time (min)
1	0.13	P8	218.55
2-a	0.31	P5	85.81
2-b	0.31	Cys	90.77
3	0.40	X-AA	26.80
4-a	0.49	Gln	39.09
4-b	0.49	Asp	21.01
4-c	0.49	Asn	34.29
5	0.53	Ser	31.73
6	0.57	Glu	36.48
7	0.60	Thr	29.65
8-a	0.68	Met	98.72
8-b	0.68	Val	85.90
9	0.75	GABA	144.16
10	0.78	Gly	63.30
11	0.81	Tyr	121.38
12-a	0.84	Ile	109.49
12-b	0.84	Leu	114.18
13	0.87	Phe	131.09

Pupal haemolymph extract (0-day old) were applied on the TLC plate. Developing solvent was composed of n-butyl alcohol, acetic acid and water (4:1:2). After drying, the plates were developed five times in the same solvent. Both edges of TLC plate were visualized according to the method of ninhydrin reaction (ninhydrin-butanol 0.1%), and then the remains being cut off and dissolved with water or LiOH buffer, respectively. Each band on the TLC plate was identified by using the amino acid analyzer.

\*TLC plate showed thirteen bands (Fig. 10, TLC photograph), one (Band 3) of which really corresponded to X-AA. Bands 2, 4, 8, and 12 contained two or more than two amino acids, respectively.

れた。これは多重展開法を使用した成果である。その結果、3番目のバンドをサンプリングしてアミノ酸アナライザーで分析したところ、完全に一つのX-AAピークを得ることができた (Fig.10)。

## 2. 逆相液体クロマトグラフィーによる単離

TLC で分離したサンプルをアミノ酸アナライザーで溶出時間を確認してから、RP-HPLC でさらに精製した。その結果、1回目の RP-HPLC で確認された五つのピークのうち、溶出時間 9.8~10.5 min の溶出液を分取し (Fig.11)、これを2回目の同じ条件下の RP-HPLC で分析したところ、三つのピークが検出された。アミノ酸アナライザーでニンヒドリン反応を示し X-AA と同定できるのは保持時間が同じ最初のピークであった (Fig.12)。さらにこれを分取して、Isocratic の溶離液を用い3回目の RP-HPLC を実行した。その結果、単一のピークが検出され (Fig.13)、しかもアミノ酸アナライザーで同定したところ、X-AA と溶出時間が一致することから、カイコの特異的アミノ酸関連物質はほぼ完全に分離精製された。

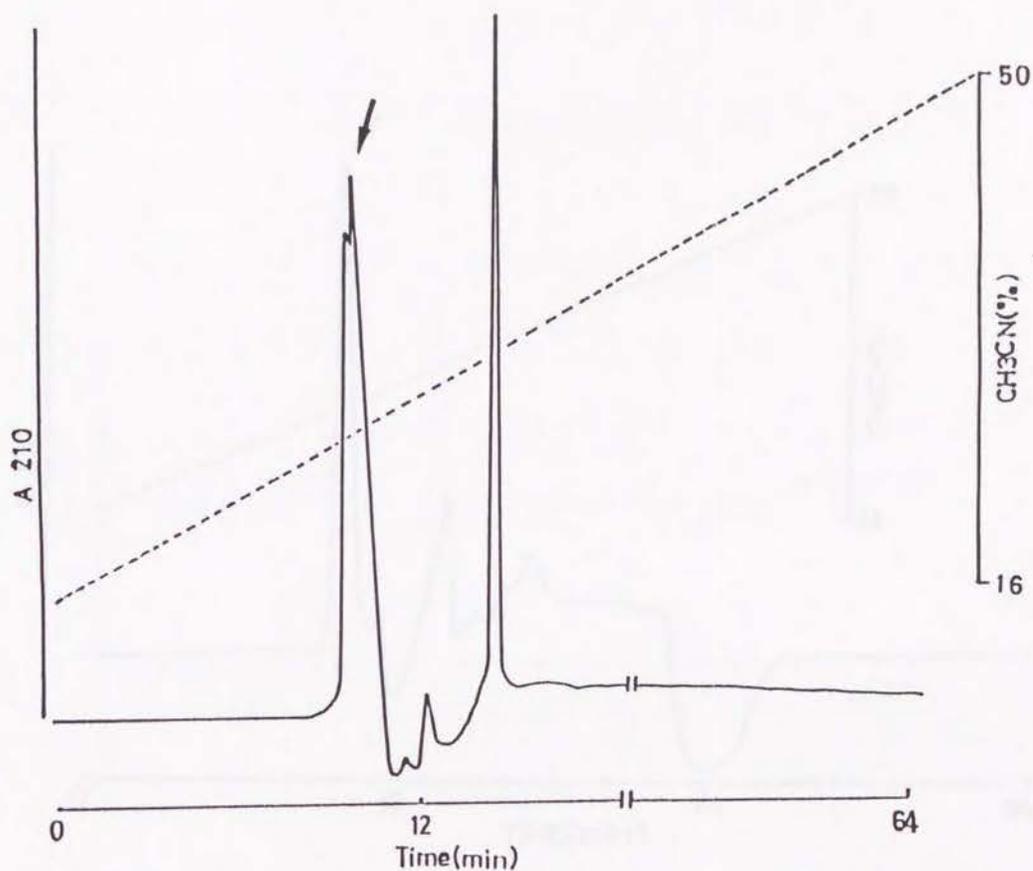


Fig. 11. The first reversed-phase HPLC on TSK gel ODS-80TS of X-AA extracted from TLC.

The extracted X-AA was eluted by a linear gradient of 16 to 50% acetonitrile (in 65 min) in the presence of 0.05% TFA at a flow rate of 1 ml/min.

The peak indicated by an arrow was collected for the second step.

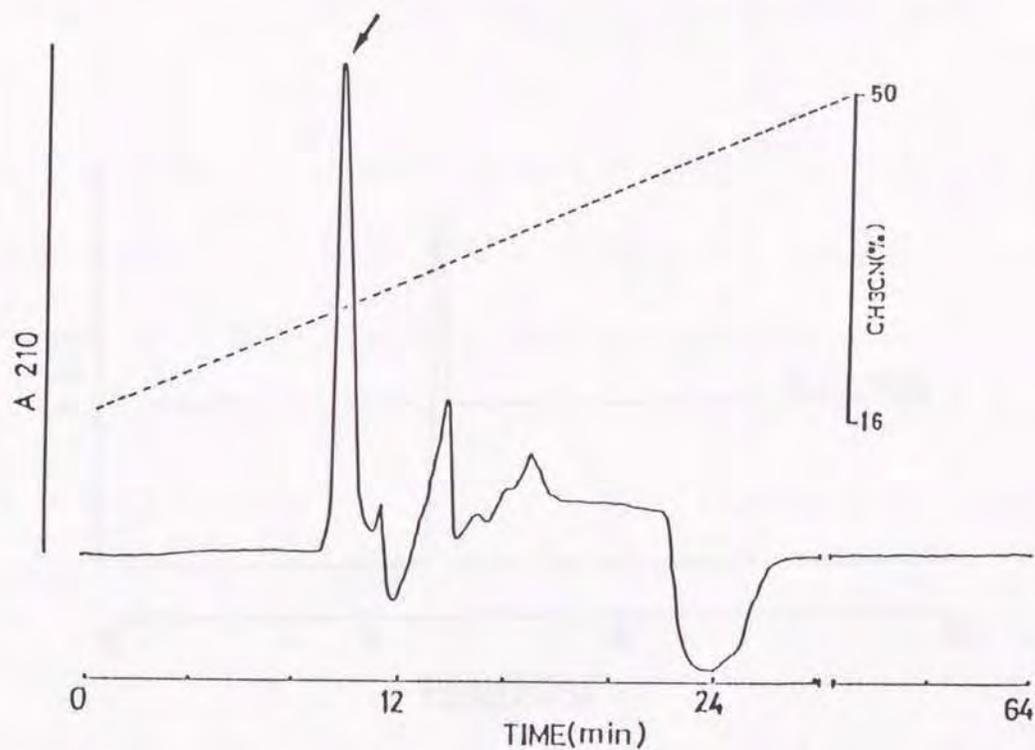


Fig.12. The second reversed-phase HPLC on TSK gel ODS-80TS of X-AA extracted from the first step.

The first fraction was rechromatographed by a linear gradient of 16 to 50% acetonitrile (in 65 min) in the presence of 0.05% TFA at a flow rate of 1 ml/min.

The peak indicated by an arrow was collected for the third step.

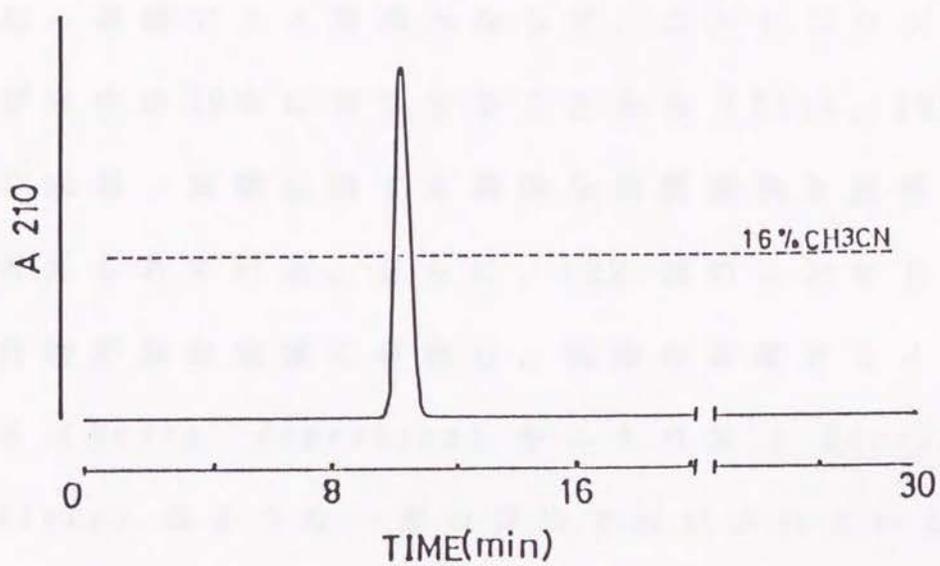


Fig. 13. The third reversed-phase HPLC on TSK gel ODS-80TS of X-AA extracted from the second step.

The second fraction was rechromatographed with 16% acetonitrile in the presence of 0.05% TFA at a flow-rate of 1 ml/min.

## 考 察

前章で述べたように，昆虫の血液は遊離アミノ酸の巨大なプールである。脊椎動物の5 mg/mlに比較して，昆虫では30~240 mg/ml含まれている(Wyatt, 1961)。また，遊離アミノ酸のみならず，ニンヒドリン反応化合物が血中の29%に相当することから(Chen, 1966)，昆虫の成長・変態に関する劇的な代謝変換を反映するものと考えられている。さらに，122個のニンヒドリン反応化合物が昆虫血液に存在し，既知の遊離アミノ酸やイエバエ(*Musca domestica*)やニクバエ(*Sarcophaga bullata*)のような一部の昆虫で同定されているジペプチド，トリペプチドを除けば，多くのニンヒドリン反応化合物の構造については不明である(Bodnaryk, 1978)。

カイコの血液に関しても同様で，最近の人工飼料効果に関する遊離アミノ酸分析においても，既知の33個が測定されているだけである(Ito and Inokuchi, 1992)。しかし，第2章で明らかにしたように，カイコにおける休眠情報の保持・伝達系に関与しているX-AA以外に，8個の未同定のニンヒドリン反応化合物を確認した。

そこで、カイコの未同定のニンヒドリン反応化合物を一つでも分離精製することは、昆虫における巨大なアミノ酸プールを生化学的視点から解析するため極めて重要な課題である。こうして、X-AA は休眠のみならず昆虫生化学的にも意義深いアミノ酸関連化合物と考えられる。

本実験では、予備的にアミノ酸アナライザーで使用しているイオン交換クロマトカラムを HPLC システムに組み込んで抽出分離を試みた。しかし、分離には成功したが、水酸化リチウム緩衝液を含んでいるため、脱塩に困難を来たし精製法として確立することはできなかった。ところが、20-ヒドロキシエクダイソンの抗体作製の際に使用された TLC 系（竹田ら，1986）を使用したところ、プレート上にほぼ完全に分離することによって脱塩操作を排除することができた（Fig. 10, Table 8）。また、この結果は X-AA がニンヒドリン反応化合物の一つであり、しかも低分子のアミノ酸関連化合物であることを明らかにした。TLC システムで分離したアミノ酸関連化合物は、さらに RP-HPLC システムを組み合わせることで、単一のピークとして精製することに成功した（Figs. 11, 12, 13）。従って、本実験で確立した TLC-RP-

HPLC システムは，昆虫における血液中の多くの未知の  
ニンヒドリン反応化合物の分離精製に有益な方法として  
活用できると考えられる。

## 摘 要

1. カイコの蛹血液からスルホサリチル酸で抽出したサンプルをまず薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した。その結果, 13 個のバンドが薄層プレートでニンヒドリン呈色し, それぞれをアミノ酸アナライザーで検討しながら特異的アミノ酸関連物質を含むバンドを特定した。

2. TLC で得られたサンプルをさらに逆相液体クロマトグラフィーで精製した。その結果, 3 回目の RP-HPLC 操作で単一のピークとして分離精製することができた。

3. 本実験で開発した TLC-RP-HPLC システムは, 今後昆虫の血液における未同定のニンヒドリン反応化合物の分離精製に有効であると考えられた。

#### 第4章 カイコの特異的アミノ酸関連物質の構造と機能

前章でカイコの蛹血液から分離精製した特異的アミノ酸関連物質 (X-AA) は、これまで昆虫血液では発見されたことのないニンヒドリン反応化合物であり、しかもカイコの休眠情報の保持・伝達系に深く関与することが示唆されている。

これらの点から、X-AA の構造解析は極めて重要な課題になっている。最近、微量物質のための分析技術が著しく進歩し、本章でも X-AA の構造解析にはタンパクシーケンサーを使用し、部分的な構造を明らかにした。また、X-AA の生理活性の検討も不可欠なことである。本章では、完全な構造解析を達成できなかったので、X-AA の分離精製したものを使用しながら生理活性について検討した。

#### 材料と方法

前章の方法に従って分離精製した場合、1 ml の蛹血液から 1.2 mg の X-AA 粉末が最終的に得られた。そこで、これらのサンプルを以下の方法に従って調製使用し

た。

1. シークエンス分析：サンプル 1 ml 以下をフェニールイソチオシアネート (PITC) で誘導体とした (Chang *et al.*, 1978; Henrikson and Meredith, 1984)。これを 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) とアセトニトリルの混合液 (93:7) に溶かし、カラム Waksil C-18 の逆相 HPLC システムに注入した。特定のピークを数回の HPLC 操作で分取し、島津 PSQ-1 の気相タンパクシーケンサーで構造解析した。

2. 生理活性：サンプル数 mg を超純水で溶解し、2 化性大造の卵期に低温暗催青 (第 1 章) した 5 齢起蚕と非休眠卵産生蛹 (蛹化後 24 時間以内) に注射した。注射針としては、25  $\mu$ l の Drummond 社マイクロキャップをマイクロピペット製作器 (PB-7, ナリシゲ社) で加工し、蟻蚕用として 0.05  $\mu$ l 5 齢起蚕用および蛹用として 0.25  $\mu$ l と 5  $\mu$ l ものを作製した。蟻蚕と 5 齢起蚕の場合は、数分間 CO<sub>2</sub> 麻酔し第 1 腹脚基部から注射した。蛹の場合は、麻酔処理せずに腹部環節間膜から直接注射した。

## 結 果

### 1. シークエンス分析

PITC で誘導体とした X-AA の HPLC パターン (Fig. 14) では, 9.347 分目の主なピーク以外にもわずかの不純物を示すピークが認められた。そこで, この主なピークのみを分取し, シークエンス分析したところ, PITC の分解物である DTT (ジチオトレイトール), DPTU (ジフェニルチオ尿素), DPU (ジフェニル尿素) 以外の第 1 段目の主要なピークはメチオニンであり (Fig. 15), その後 2 ~ 5 段目まで十分に検出できるアミノ酸がないことから (Fig. 16), X-AA はメチオニンを N 末端にもつメチオニン誘導体と考えられる。

### 2. X-AA の生理活性

Table 9 に示したように, 低温暗催青処理した大造の孵化幼虫, 5 齢起蚕そして蛹化 24 時間以内のものにそれぞれの濃度で注射した。その結果, 孵化幼虫に 1  $\mu$ g から 5  $\mu$ g までの X-AA を注射すると, 羽化して生んだ卵は休眠性が変わらず非休眠卵であったが, その 5 齢期が対照区と比較すると 1 日ぐらい延長する傾向にあった。次に 5 齢起蚕に 5  $\mu$ g では効果がなかったが, 100  $\mu$ g 注

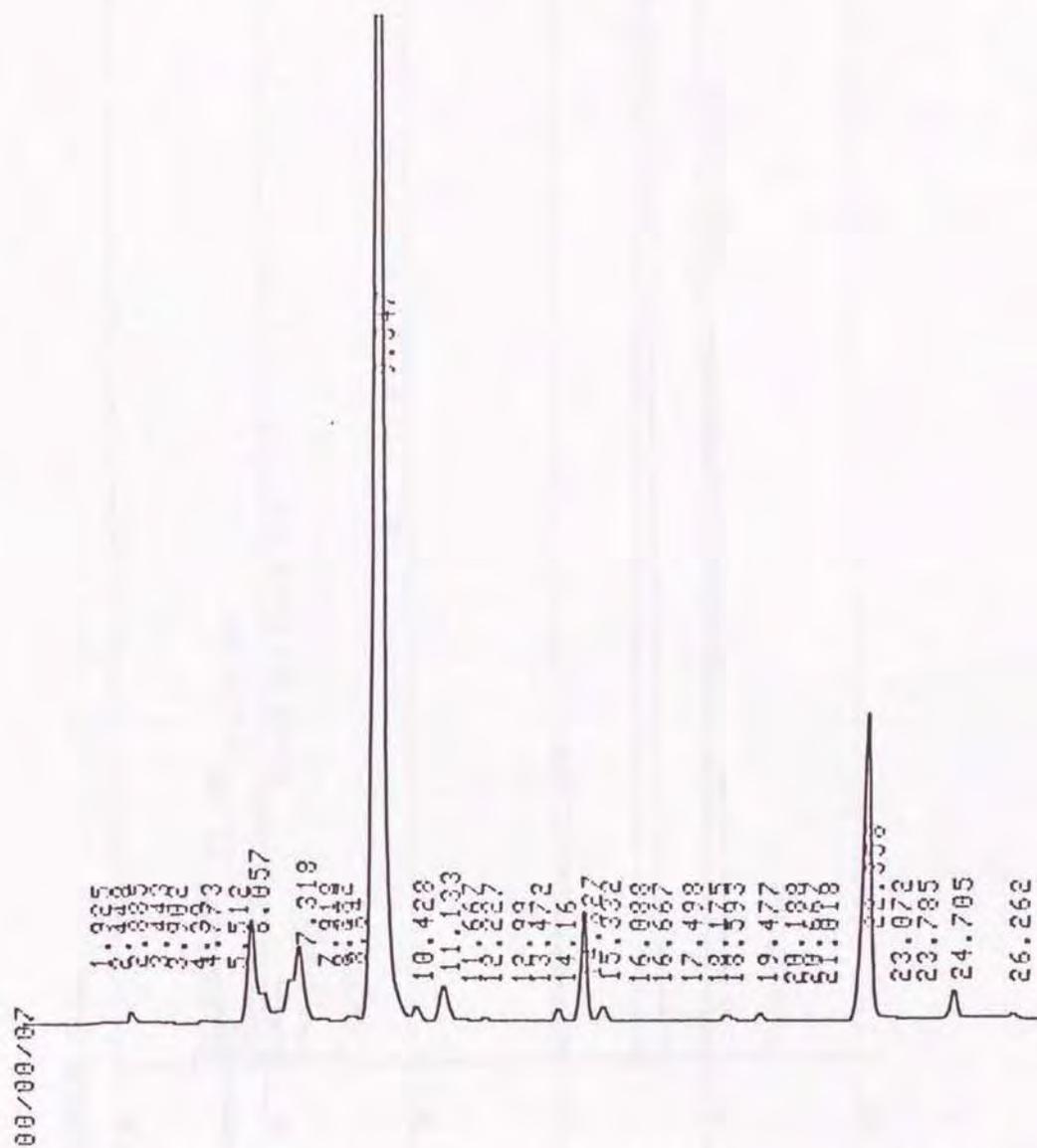


Fig. 14. The reversed-phase HPLC on C18 column of X-AA derived by PITC.

X-AA derived by PITC was dissolved with the mixture (93:7) of 5 mM phosphate buffer (pH 7.5) and acetonitrile. Elutes were monitored by absorption at 220 nm.

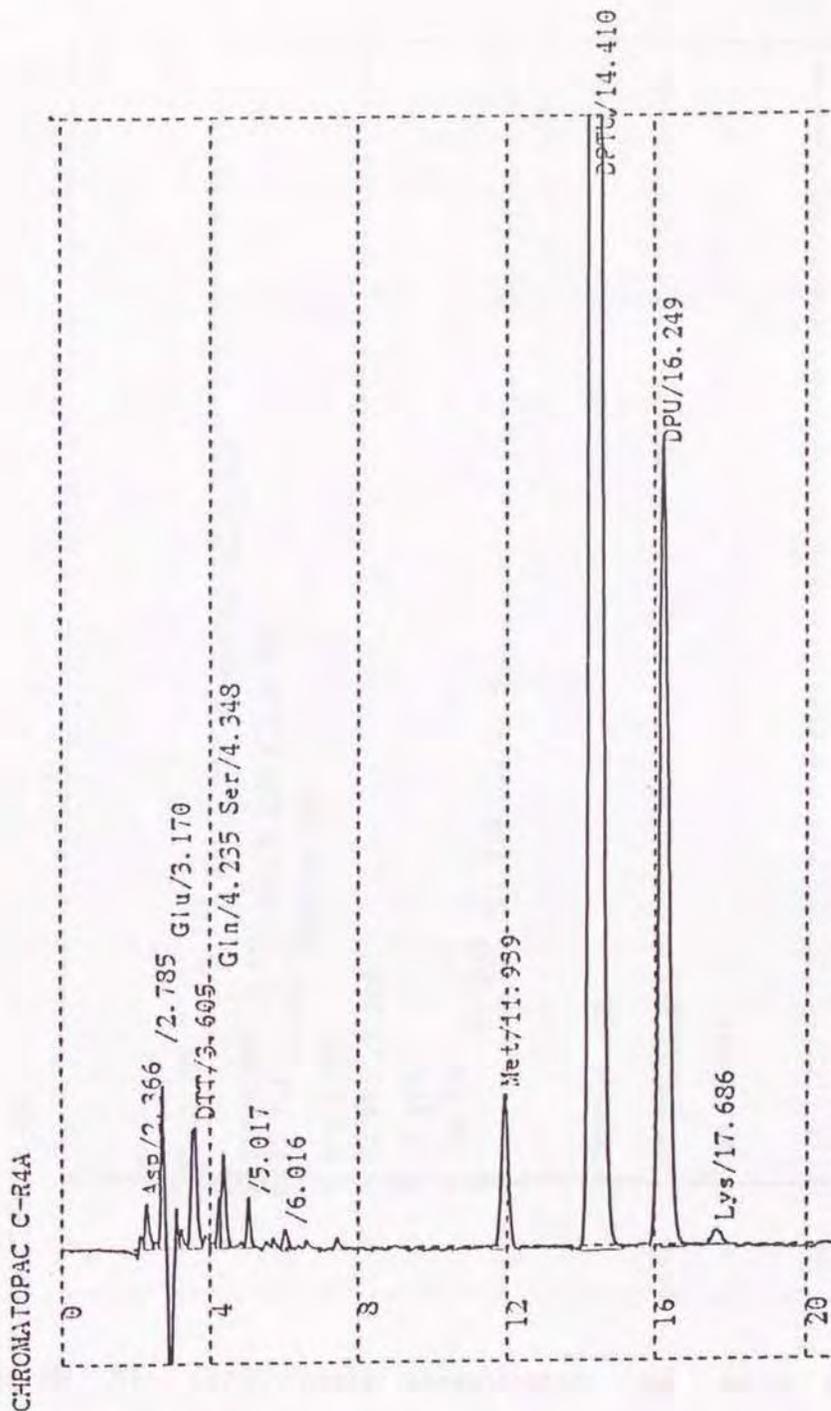


Fig. 15. The first cycle chromatogram on amino acid sequence analysis of X-AA derived by PITC.

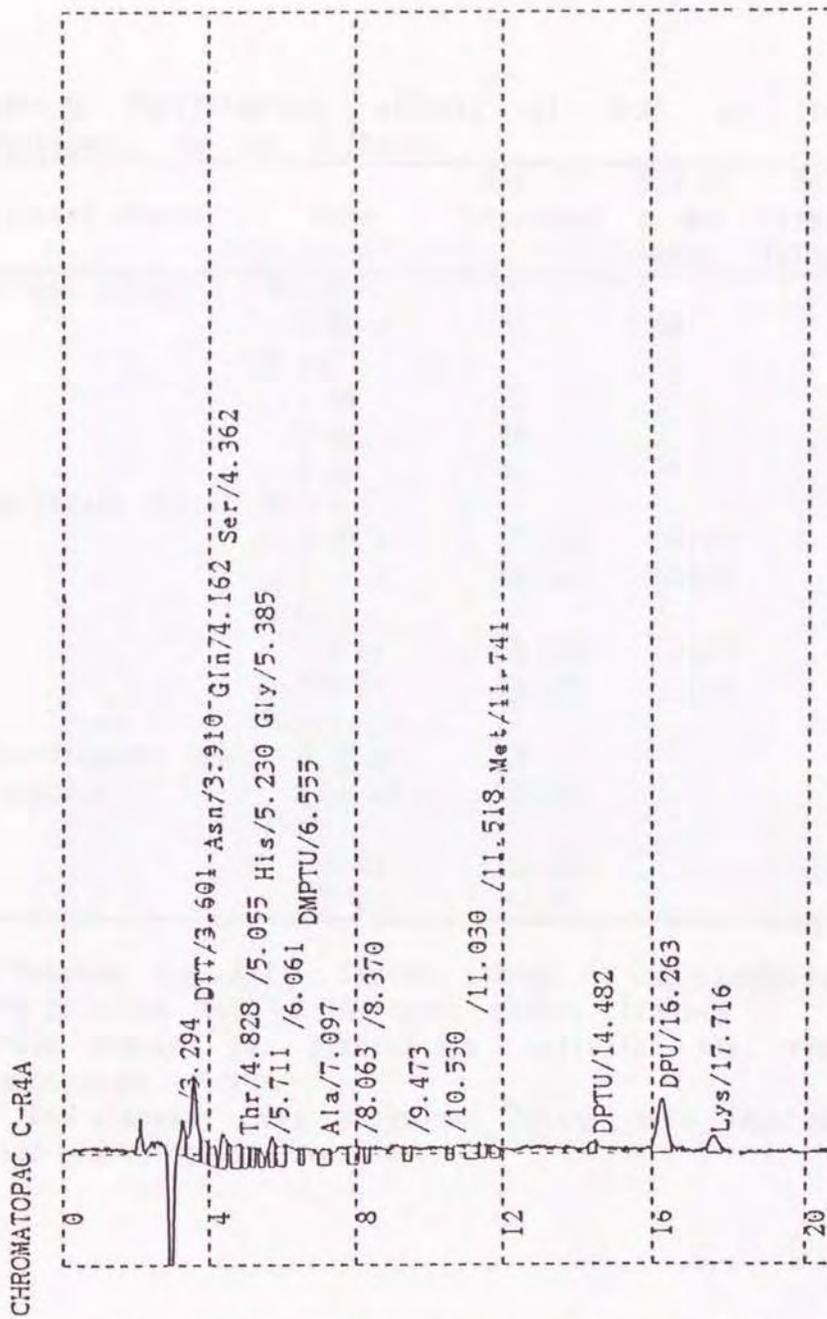


Fig. 16. The fifth cycle chromatogram on amino acid sequence analysis of X-AA derived by PITC.

Table 9. Physiological effects of X-AA on larval and pupal development in the silkworm

Injected stages	Dose	Nos of individual	Nos of normal pupa	Nos of larval-pupal intermediate	Nos of emerged adult
Hatched larva*	Water				
	0.05 $\mu$ l	53	42	0	41
	X-AA				
	1 $\mu$ g	20	16	0	16
	2 $\mu$ g	40	31	0	30
5th instar larva*	5 $\mu$ g	32	24	0	24
	Water				
	0.25 $\mu$ l	10 (10) †	9 (10)	0 (0)	9 (10)
	5 $\mu$ l	10 (10)	10 (10)	0 (0)	9 (9)
	X-AA				
Pupa †† (Non-diapause egg producer)	5 $\mu$ g	15 (15)	13 (14)	0 (0)	13 (14)
	100 $\mu$ g	15 (15)	2 (14)	9 (0)	2 (14)
	Water				
Pupa †† (Non-diapause egg producer)	0.25 $\mu$ l	6			6
	5 $\mu$ l	10 (15)			8 (13)
	X-AA				
	5 $\mu$ g	10 (15)			8 (14)
	100 $\mu$ g	10 (15)			0 (14)

\*Hatched and fifth instar larvae in LD-incubation (Daizo strain) were injected with X-AA agent before feeding.

†The numbers in parentheses indicated the results of N4 in non-diapause strain.

††Non-diapause egg producers (Daizo) were injected within 24hr after larval-pupal ecdysis.



Fig. 17. A photograph of larval-pupal intermediate induced by X-AA.

The pupa injected with 100  $\mu$ g of the X-AA in the newly ecdyzed fifth instar larva, has some larval legs (right).

The left is a control injected with 5  $\mu$ l of water, which has no larval legs.

射した際に、興味深い結果が得られた。すなわち蛹化した蛹の腹部には幼虫の腹脚末端が認められ (Fig.16), そのパターンは幼虫の腹脚と尾脚に相当している。Fig. 16 のようにほぼ完全の幼虫パターンから、腹脚数が3本, 4本, 5本の蛹または尾脚のない蛹もあった。これらの幼虫と蛹の中間体は成虫まで完全に發育したが、羽化が不能になった。その羽化不能のものを解剖した際卵巣は完成卵の状態であったが、休眠性変化の調査は達成できなかった。一方、カイコの多化性品種 N4 の5齡起蚕および蛹化直後の蛹にいずれも 100  $\mu$ g 注射したが、大造のような効果は認められず、いずれも正常に蛹化、羽化、そして非休眠卵を産下した。

## 考 察

シーケンス分析の前に先立って行った HPLC 抽出では、主要なピーク以外にいくつかの不純物が認められた (Fig. 14)。第 3 章で確立した TLC-HPLC 系による X-AA の分離精製は完全なものではないということが pmol レベルの感度で明らかになった。そこで今後の一つの課題として、TLC-HPLC 系の最終段階の HPLC の分離条件の改良が重要と考えられる。特に質量分析による分子量の決定のためには、金属イオンのみならずアミノ酸の混在は避けなければならない。

しかし、本章ではシーケンス分析の結果、X-AA はメチオニン誘導体であることを明らかにすることができた (Figs. 15, 16)。カイコの血液中にはこのメチオニン誘導体が豊富に存在することになるが、昆虫の組織器官には時々非天然型アミノ酸のメチオニンスルホキシドが存在することが報告されている (Gamo and Kuroda, 1978; Haliouvaara and Laurema, 1988; Laurema, 1991; Ito and Inokuchi, 1992)。メチオニンスルホキシドはタンパク質分解中にメチオニンが酸化して生産される非天然型アミノ酸であるが、特殊な例として、バ

カガイ科に内靱帯（弾体とも言う）タンパク質の構成アミノ酸として存在している（Kikuchi and Tamiya, 1981）。この場合のメチオニンスルホキシドの含量（12～15 mol パーセント）は、通常タンパク質のメチオニン含量よりもはるかに高い。従って、従来昆虫の組織器官で同定され報告されてきたメチオニンスルホキシドは、すべて本章で明らかになった X-AA, すなわちメチオニン誘導体と一致すると考えられる。

質量分析による予備的実験でも、標準メチオニンスルホキシドが分子量 166 のピークを示すにもかかわらず、X-AA ではこの付近にピークは認められなかった。本章の構造解析では部分構造を明らかにしたのみであるが、昆虫のメチオニン誘導体は今後新しい生体物質として同定するためにも、完全な構造解析が必要である。

しかし、現時点ではこのメチオニン誘導体が休眠性変換を誘導するところまでは至らなかったが、2 化性大造の低温暗催青した 5 齢起蚕に注射した場合、その蛹は幼虫 - 蛹の中間体と変化した（Table 9, Fig. 17）。この現象を直接休眠関連性から言及することができないが、明らかにメチオニン誘導体がホルモン様の生理活性を有

していることになる。さらに、休眠情報とはまったく関係のないカイコの多化性系統の N4 では、同じ処理でも何ら影響を受けなかった (Table 9)。そこで、メチオニン誘導体による幼虫-蛹の中間体の誘導は、休眠情報の保持・伝達系と何らかの関連性があることが示唆される。今後純品としてのメチオニン誘導体の単離と完全な構造解析、そして合成によって、X-AA, すなわち新メチオニン誘導体の生理機能が明らかにされるであろう。

## 摘 要

1. X-AA のサンプルを PITC で誘導体とした後、数回の HPLC 分析で主要なピークを分取しシーケンス分析した結果、メチオニン誘導体であることが判明した。

2. 2 化性大造の低温暗催青した 5 齢起蚕にこのメチオニン誘導体を注射したところ、蛹腹面に幼虫の腹脚と尾脚が存在する中間体が誘導された。

## 総合考察

本研究は、カイコの休眠情報の保持・伝達系に関する物質を脳の遊離アミノ酸プールに求めてスタートした。すなわち、いくつかのアミノ酸は神経伝達物質として機能することが知られており、必然的に重要と考えられるアミノ酸の同定と量的比較検討を行った。結果的には、アミノ酸アナライザーで特異的アミノ酸関連化合物 (X-AA) が最も有力な物質として注目されるに至った。さらに、この X-AA の部分構造解析が進み、メチオニン誘導体であることが明らかとなった。本研究結果は、以下の二点で昆虫内分泌学的にも生理化学的にも意義ある発見になると考えられる。

一つには、メチオニン誘導体が、昆虫の休眠情報の保持・伝達系を解析する手掛かりとなる最初の物質の可能性があるということである。序論にも述べたように、環境情報の違いがカイコ 2 化性の休眠性を決定する。すなわち、母親の卵期を長日高温下で保護すれば産下卵は休眠卵となり、短日低温下で保護すると非休眠卵になる。このシステムは、(1) 卵休眠の情報の受容 → (2) 幼

虫の休眠情報の保持・伝達→(3) 蝸脳での休眠ホルモン分泌制御→(4) 卵休眠性の決定の一連の系で説明されているが、休眠情報の受容から保持・伝達に至る系〔(1)～(3)〕の物質レベルの解析はまったくなされていない。長谷川によってカイコの休眠ホルモン(Hasegawa, 1957)が発見されて以来、34年後にこのホルモンの構造が明らかになった(Imai *et al.*, 1991)。しかし、休眠情報の受容から保持・伝達の系が、1933年の木暮の先駆的な現象発見(Kogure, 1933)から今日までほとんど解明されていない。この点は、カイコのみならず他の休眠にも当てはまることであり、脳の特定位が重要である(Kono, 1973; Matsutani and Sonobe, 1987)やγ-アミノ酪酸が重要である(Hasegawa and Shimizu, 1990)などの報告はあるが、いずれも休眠誘導の制御系を直接説明するまでには至っていない。本研究では、第1章と第2章でメチオニン誘導体が特に休眠情報の保持・伝達系で最も可能性の高い物質であるということを示した。

しかしながら、現段階では休眠性変換の生理活性を認めていないという点(第4章)から、中間代謝物または

最終産物の可能性もある。ところが、代謝系の最終産物であるにせよ休眠情報の違いによって、カイコの血液、脂肪体、そして脳で大きな濃度差が生じているので（第1, 2章）、この代謝系を糸口にして、休眠情報の保持・伝達系を解析して行くことも可能である。一方、メチオニン誘導体は休眠性変換の生理活性を有する可能性も示唆していた。すなわち、2化性大造の低温暗催青処理した幼虫への注射が幼虫一蛹の中間体を誘導したが、非休眠系統のN4ではまったく影響が認められなかった。こうして、メチオニン誘導体はカイコの休眠性と何らかの様式で密接な関連をもつことを示唆しており、昆虫内分泌学的にも新しい情報をもった低分子物質として十分に期待できる。

さてメチオニン誘導体は昆虫生理化学的にも着目される。昆虫の血液は豊富な遊離アミノ酸プールである（Wyatt, 1961）。血中の29%がニンヒドリン反応化合物であったり、122個のニンヒドリン反応化合物を含有する例が報告されている（Chen, 1966）。またこのプールには、sarcophaine と呼ばれるジペプチド（ $\beta$ -alanine-tyrosine）も存在し、遊離のチロシンよりも200倍も

溶解性がある特異的タイプも含まれる。これらは、脊椎動物にはない劇的な成長・変態と深くかかわりあいがあり、脱皮ホルモンや幼若ホルモンの作用とも関連している。しかしながら、既知の遊離アミノ酸や特定のペプチド以外に同定されたニンヒドリン反応化合物はほとんど知られていない。特に、カイコ (Gamo and Kuroda, 1978; Ito and Inokuchi, 1992), キジラミの一種 (*Trioza apicalis*) (Laurema, 1989), メクラカメムシ *Lygus* の4種 (*L. rugulipennis*, *L. gemellatus*, *L. pratensis*, *L. punctatus*) (Heliovaara and Laurema, 1988; Laurema and Varis, 1991) で報告されているメチオニンスルホキシドの存在は、タンパク質構成アミノ酸としての特異的例以外は極めて疑わしい。この点は、本研究の第1章と第4章で触れ、昆虫で報告されてきたメチオニンスルホキシドは、実は新しいメチオニン誘導体であり昆虫界で普遍的に存在する可能性を指摘した。昆虫のみならず、恒常性のアミノ酸代謝という視点からも、このメチオニン誘導体の構造解析は意義深いものと考えられる。

文 献

- Bodaryk, R. P. (1978): Structure and function of insect peptides. *Adv. Insect Physiol.* pp. 69-70.
- Chang, J. Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B. (1978): Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-*nn*-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93, 205-214.
- Chen, P. S. (1985): Amino acid and protein metabolism. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I. ) pp. 177-217, Pergamon Press, London.
- Chino, H. (1958): Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*-II. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. *J. Insect Physiol.* 2, 1-12.
- Fukuda, S. (1951): The production of the diapause eggs by transplanting the suboesophageal gan-

- g lion in the silkworm. *Proc. Jap. Acad.* 27, 672-677.
- Fukuda, S. (1952a): Function of the pupal brain and suboesophageal ganglion in the production of non-diapause and diapause eggs in the silkworm. *Ann. Zool. Japan* 25, 149-155.
- Fukuda, S. (1952b): Factors determining the production of non-diapause egg in the silkworm. *Proc. Jap. Acad.* 27, 582-586.
- 古沢寿治・清水喜一・矢野竹男 (1987) : 家蚕非休眠におけるポリオール蓄積, 日蚕雑, 56, 150-156.
- 古沢寿治・梁元鎮 (1987) : 家蚕非休眠卵の胚発育にともなう遊離糖類の変動, 日蚕雑, 56, 143-149.
- Gamo, T. and Kuroda, S. (1978): Quantitative changes of asparagine and glutamine in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, during larval and pupal development. *Appl. Ent. Zool.* 13, 223-226.
- Hasegawa, K. (1957): The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature* 179, 1300-1301.
- Hasegawa, K. and Shimizu, I. (1990): GABAergic control of the release of diapause hormone from the

- suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 36, 909-915.
- Heinrikson, R. L. and Meredith, S. C. (1984): Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136, 65-74.
- Heliovaara, K. and Laurema, S. (1988): Interaction of *Aradus cinnamomeus* (Heteroptera, aradidae) with *Pinus sylvestris*: the role of free amino acids. *Scand. J. For. Res.* 3, 515-525.
- Ida, S. and Kuriyama, K. (1983): Simultaneous determination of cystein sulfinic acid and cysteic acid in rat brain by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 130, 95-101.
- Imai, K., Konno, T., Nakazawa, Y., Komiya, T., Isobe, M., Koga, K., Goto, T., Yaginuma, T., Sakakibara, K., Hasegawa, K. and Yamashita, O. (1991): Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Japan Acad.* 67, 98-101.

- Ito, T. and Inokuchi, T. (1992): Nutritive effects of asparagine and glutamine on the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Entomol. Zool.* 27, 575-586.
- Kikuchi, Y. and Tamiya, N. (1981): Methionine sulfoxide in the resilium protein of surf clams. *J. Biochem.* 89, 1975-1976.
- Kogure, M. (1933): The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Dept. Agr. Kyushu Imp. Univ.* 4, 1-93.
- Kono, Y. (1973): Light and electron microscopic studies on the neurosecretory control of diapause incidence in *Pieris rapae crucivora*. *J. Insect Physiol.* 19, 255-272.
- Laurema, S. (1989): Free amino acids in the psyllid, *Trioza apicalis* Forst. *Ann. Agric. Fenn.* 28, 113-120.
- Laurema, S. and Varis, A. L. (1991): Salivary amino acids in *Lygus* species (*Heteroptera: miridae*). *J. Insect Biochem.* 21, 759-765.

- Matsutani, K. and Sonobe, H. (1987): Control of diapause-factor secretion from the suboesophageal ganglion in the silkworm, *Bombyx mori*: the roles of the protocerebrum and triocerebrum. *Insect Physiol.* 33, 279-285.
- Mercer, A. R. (1987): Biogenic amines in the insect brain. In *Arthropod Brain* (ed, Gupter, A. P.) pp. 399-414, John Wile & Sons Inc.
- Mullins, D. E. (1985): Chemistry and physiology of the hemolymph. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (eds, Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I.) pp. 355-400, Pergamon Press, Oxford.
- Narahashi, T. (1963): The properties of insect axons. *Adv. Insect Physiol.* 175-256.
- Osanai, M. and Yonezawa, Y. (1986): Changes in amino acid pools in the silkworm, *Bombyx mori* during embryonic life: Alanine accumulation and its conversion. *Insect Biochem.* 16, 373-379.
- Puiroux, J., Moreau, R. and Gourdoux, L. (1990):

Variations of biogenic amine levels in the brain of *Pieris brassicae* pupae during nondiapauses and diapausing development. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 14, 57-69.

Sonobe, H. and Okada, Y. (1984): Studies on the embryonic diapause of the *pnd* mutant of the silkworm, *Bombyx mori*-III. Accumulation of alanine in the diapause eggs. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 414-417.

Storey, K. B. and Storey, J. M. (1983): Biochemistry of freeze tolerance in terrestrial insects. *TBS.* 8, 242-245.

Suzuki, K., Hosaka, M. and Miya, K. (1984): The amino acid pool of *Bombyx mori* eggs during diapause. *Insect Biochem.* 14, 557-561.

竹田 敏, 木内 信, 上田 悟 (1986): 20-hydroxyecdysoneの抗血清の作製とそれを用いたカイコ血液中のエクジステロイドのラジオイムノアッセイ. 蚕糸験報 30, 361-374.

Tsuchida, K. and Yoshitake, N. (1983): Relationship

between photoperiod and secretion of the diapause hormone during larval stages of the silkworm, *Bombyx mori* L., reared on an artificial diet. *Insect Physiol.* 29, 755-760.

Wagner, R. M., Cook, B. J. and Cooper, J. F. (1991): Action of taurine, 3-aminopropanesulfonic acid, and GABA on the hindgut and heart of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 16, 81-93.

Wegener, G. (1983): Brains burning fat: Different forms of energy metabolism in the CNS of insects. *Naturwiss.* 70, 43-45.

Wyatt, G. R. (1961): The biochemistry of insect hemolymph. *Ann. Rev. Entomol.* 6, 75-102.

Yamashita, O. and Hasegawa, K. (1985): Embryonic diapause. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I. ) pp.407-434, Pergamon Press, London.

