

キイロシヨウジヨウバエの正常型及び棒眼突然変異の ninhydrin 反応陽性物質^{註1}について

前 田 米 太 郎

Y. Maeda; The ninhydrin—positive substances in the wild type and the Bar—eyed mutant of *Drosophila melanogaster*.

現代の遺伝学では、遺伝因子が生体内の種々の酵素に関係しているいろいろの形質をつくると考えられているが、遺伝因子の質的量的変化によつて生じた突然変異個体は、生化学的に正常型と異つた発生過程を経てきたと思われる。だから突然変異個体は、成体は勿論、発生過程においても正常型とは生化学的に何らかの相違があると考えられる。こう言う見地からキイロシヨウジヨウバエ (*Drosophila melanogaster*) の複眼の小眼数が減少する突然変異について、螢光物質の違いを Paper Chromatography^(註2) で分析した結果を先に本誌 Vol. 3 No. 3 に報告したが、これと同様の目的から同じ方法により正常型と棒眼突然変異(以下 Bar と書く)の ninhydrin 反応陽性物質について研究した結果を報告したい。

この研究を行うについて御懇切な御指導を戴いた恩師藤井教授・川辺助教授・須田助教授、並びに螢光をしらべるに当つて御援助を戴いた塩野義製薬株式会社研究所に深甚の謝意を表す。

材 料

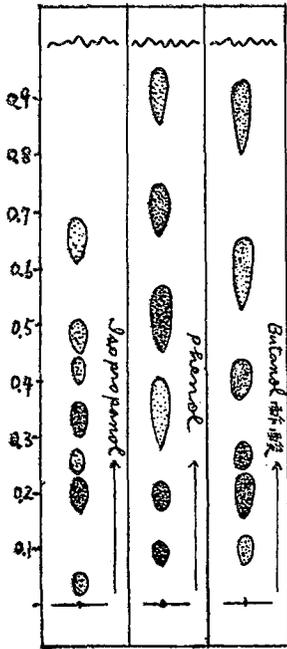
この研究に用いたキイロシヨウジヨウバエは、神戸大学理学部生物学教室の飼育室(25°C ± 1°C)で数年に亘り飼育してきたもので、その正常型(Oregonを使用、複眼の小眼数は雌で780、雄で740である)と Bar(小眼数は雌70、雄90で複眼が棒状に見えるのでこの名がある)を用いた。飼育瓶の餌は、10~12本分として糖蜜 60 cc 又は蔗糖 20 g; 小麦粉 50 g; 寒天 5 g; 水 350 cc~450 cc; 乾燥酵母 0.5 g; KH₂PO₄ 及び KNO₃ 痕跡を煮て滅菌した牛乳瓶に入れ、冷却後純粋培養したパン酵母を水で薄めたものを一滴おとし一昼夜飼育室に放置したものである。この飼育瓶 1 本に約10番の成熟したハエを入れ1週間後に追い出す。同じ瓶内でも始めに生れてくる個体ほど栄養等の関係で大きいので、この差をなくすために最初に出てくるものから30個体だけを使用した。

方法と結果

蛹化間近い三齢末期の幼虫以後の発生段階——即ち三齢末期幼虫、蛹化直後の白い蛹、複眼が黄色に成つ

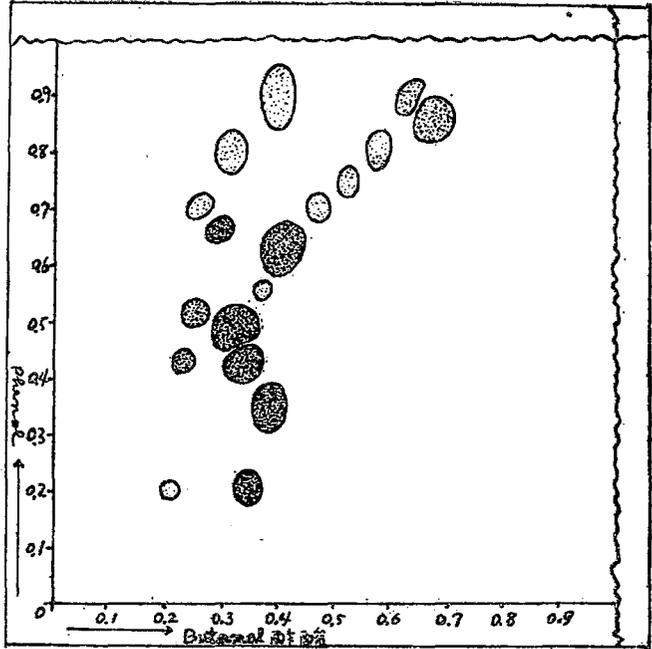
た中期の蛹、羽化間近い成熟蛹、羽化直後の成虫、羽化後数時間及び数日を経た成虫——について正常型と Bar を雌雄別にそれぞれの個体を水洗後熱殺し、2個体づつ濾紙(東洋濾紙 No. 50)の上でガラス棒を用いてすりつぶし、約 10 分間風乾の後、Isopropanol (Isopropanol 2部: 1% アムモニア水 1部)、或は Phenol (Phenol 4部: 0.1% アムモニア水 1部)或は Butanol 酢酸 (Butanol 2部: 氷酢酸 1部: 蒸溜水 4部の上層部使用)で 10~20 時間室温で次元展開^{註3}し、風乾によつて溶媒を蒸発させて後、ninhydrin の 0.2% Butanol 溶液を噴霧し電気乾燥器中で 100°C 5 分間加熱すると、赤・青紫・黄等の斑点があらわれる、これが ninhydrin 反応陽性物質である。すりつぶして展開すると第1図の様な Chromatogram が見られる。これは体内に遊離している ninhydrin 反応陽性物質、例えば血液とか体液等に含まれているものである。この遊離のものでは雌雄の間、正常型と Bar の間、発生過程の各段階の間に定性的な差は認められなかつた。ただ発生過程において正常型・Bar、雌雄ともに量的なうつりかわりが見られた。即ち三齢末期の成熟した幼虫、蛹化したばかりの蛹、成熟した蛹と成虫には Rf の大きい斑点まで濃くはつきりと認められたが、これは ninhydrin 反応陽性物質の総量が他の時期のものに比べて多い為と思われる。この遊離のものの量を Chromatogram の斑点の面積と濃度から推定して、その増減を発生段階を追うてグラフに示すと第1表の様になる。3 齢以前の幼虫や卵については点線で示したが、これは Hadorn・Mitchell の報告中の Chromatogram からその量を推定して示したものである。

第1表から①成熟した幼虫・蛹・成虫には多量の ninhydrin 反応陽性物質があること、餌を摂らない蛹期にこの物質がふえることは、蛹期に体内の全組織に大変化が起ることと関係があるらしい。猶この期に螢光物質も著しくふえる。②蛹化・蛹化・羽化の際に減少すること、羽化後1時間目位が最も少いが、これは羽化直後蛹期に蓄積していた薄緑色の排泄物を出す



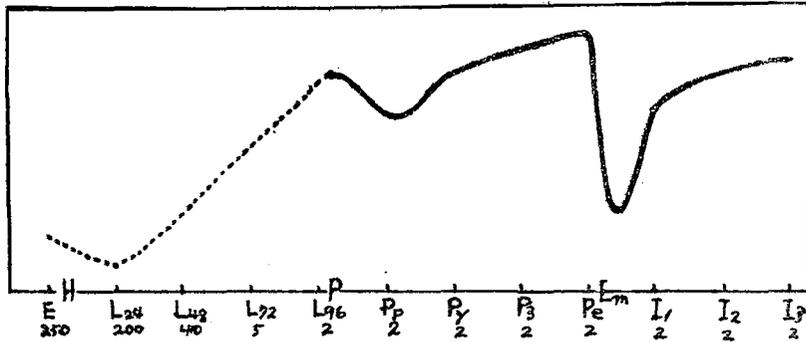
第 1 図

遊離の ninhydrin 反応
陽性物質 (一次元法による)



第 2 図

成虫に見られる ninhydrin 反応
陽性物質 (二次元法による)



第 1 表 発生段階における遊離 ninhydrin 反応陽性物質の増減

E: 卵 H: 孵化 L₂₄: 孵化後24時間の幼虫 L₄₂: 三齢末期幼虫 P: 蛹化
Pp: 前蛹期の若い蛹 Py: 複眼黄色の蛹 P₃: 蛹化後3日目蛹 Pe: 羽化直前
の蛹 Em: 羽化 I₁: 羽化後1日経た成虫 記号の下の数字はすりつぶした個
体数で重量が等しくなるように若いものほど多い。

が、これに相当量の ninhydrin 反応陽性物質が含まれており、これが排泄によるものと思われる。

同じく遊離の ninhydrin 反応陽性物質であるが、成虫について二次元法でしらべてみた。二次元法では濃い試料を必要とするので、成熟した40~50個体の成虫を70%アルコールを加えて乳鉢ですりつぶし、遠心

分離して上澄液を濃縮する。これを40 cm 平方の濾紙の一隅(原点)につけて風乾後 Phenol 及び Butanol 酢酸で二次元展開し、ninhydrin で発色させた結果第2図のような Chromatogram を得た。これらの斑点は Rf 値より考えて、glycine, alanine, threonine, valine, leucine, aspartic acid, glutamic acid, arginine

cystine, phenyl alanine, tyrosine, histidine, proline, serine 及び asparagine, tryptophane と思われるものと全く不明の斑点2つである。この内phenyl alanine は雌に、proline は雄に多い様に思われるが、正常型とBarの間には眼の赤い色素の量以外には差は認められなかつた。猶Hadorn・Mitchell は蛹にみられる pupine と幼虫にみられる larvine—共に加水分解により数種のアミノ酸になる peptid—を報告しているが、これらを見る事が出来なかつた。又中村等はクロシヨウシヨウバエ (*Drosophila virilis*) を用い、200個体を70%アルコールにつけ室温で遊離の ninhydrin 反応陽性物質を抽出し、これを減圧濃縮して phenol 及びButanol 酢酸で二次元展開し、16のアミノ酸と2つの螢光物質について幼虫・蛹・成虫に定性的差のあつたことを報告しているが、筆者はキイロシヨウシヨウバエを70%アルコールで抽出して phenol 或はButanol 酢酸或は Isopropanol で一次元展開し10数種の ninhydrin 反応陽性物質と4乃至5の螢光物質をえたが Isopropanol で展開した場合のみ幼虫や蛹にない Rf 値0.07という ninhydrin 反応陽性物質が成虫に存在することが判つたが、他の2種の溶媒ではこの様な差は認められなかつた。

次に体を構成している ninhydrin 反応陽性物質についてもしらべたので報告したい。先に述べた様に熱殺したハエをすりつぶした場合に見られるものは、体内に遊離しているもので体をつくり上げている種々の蛋白質については、この方法では知る事が出来ない。これを知るためにはハエを加水分解する必要がある。水洗して餌等の附着物を除いた幼虫・蛹・成虫を、内径5mm、長さ10cm位のガラス封管(ガラス管の一端を溶かして閉じたもの)の中に20個体を約1ccの6N HClと共に入れ、その口を焼き切つて閉じこれを湯煎鍋で24時間煮ると、封管中の虫体は薄茶色の残渣だけを残しアミノ酸にまで分解される。この液をマイクロペットにすいあげて濾紙につけ、前記の溶媒を用いて一次元展開し風乾後 ninhydrin で発色させる。この結果、phenol では0.25, 0.31, 0.45, 0.55, 0.8の5つ、Butanol 酢酸では0.08, 0.13, 0.17, 0.23, 0.31, 0.41, 0.47, 0.57, 0.62の9つ、Isopropanol では0.15, 0.26, 0.32, 0.46, 0.57の5つの斑点が見られたが、雌雄の間、正常型とBarの間、発生段階に定性的な差は認められなかつた。一次元法では Rf 値の似たアミノ酸が重つて判別しにくいので、phenolとButanol 酢酸を用いて加水分解した試料を二次元展開したが、この結果も亦雌雄の間、正常型とBarの間、発生段階の間に定性的な差を認める事が出来なかつた。この方法で得た Chromatogram の斑点は Rf 値

から判定して、glycine, alanine, threonine, valine, leucine, aspartic acid, asparagine, arginine, phenyl alanine, tyrosine, histidine, proline, serine, lysine, と glutamic acid, cystine でないかと思われるものと不明の斑点2つである。

猶羽化したあとの蛹の殻を加水分解し二次元法により分析したが、正常型とBarの間に定性的差はなかつたが殻には aspartic acid が多い様に思われた。又螢光物質は6N HCl で加水分解した試料には見られなかつたが、6N NaOH で加水分解した場合には螢光が見られる事やアムモニア水に易溶である事からハエに見られる螢光物質はアルカリに安定な酸性物質である事が判る。以上で正常型とBarに見られる ninhydrin 反応陽性物質についての報告を終るのであるが、最後に筆者が測定した各種の純粋アミノ酸を phenol で展開した Rf 値を掲げる、()の中は佐竹による Rf 値である。leucine 0.89 (0.86)、cystine 0.2 (0.13)、aspartic acid 0.19 (0.12)、arginine 0.51 (0.48)、glutamic acid 0.26 (0.20)、lysine 0.44 (0.43)、histidine glutamic 0.67 (0.7)、valine 0.81 (0.76)、phenyl alanine 0.89 (0.9)、asparagine 0.43 (0.42)、proline 0.9 (0.89)、glycine 0.44 (0.42)、tryptophane 0.80 (0.80)、alanine 0.60 (0.60)。佐竹の Rf 値と幾分の差が見られるのは、Rf 値が濾紙、試料、溶媒のごく僅かな純・不純に左右され、又室温、pH、濾紙の含水量等にも鋭敏に感ずるのでこれらの影響であろうと思う。

要 約

1. キイロシヨウシヨウバエ (*Drosophila melanogaster*) の正常型及び Bar の ninhydrin 反応陽性物質を雌雄別且つ発生段階別に、paper chromatography により分析した。
2. 遊離の該物質については雌雄の間、正常型とBarの間に定性的な差はなく、発生過程において量的な差が見られた、その消長をグラフで示した。
3. 体を構成している該物質も雌雄の間、正常型とBarの間及び発生段階の間に定性的な差を認める事が出来なかつた。

文 献

- 波磨(1949): paper chromatography (1)~(12).
 動物学雑誌 Vol. 58 No 9~Vol. 59 No. 12
 佐竹(1949): ペーパークロマトグラフ。
 化学の領域 Vol. 3 No. 7
 佐竹(1950): クロマトグラフ。
 共立出版社
 中村・北瓜・高浪・今泉(1951): 猩々蠅のアミノ酸について(予報)。遺伝の総合研究I報

(207ページへ)