

兩棲類の發生初期の代謝終産物について

II. モリアオガエル初期胚の圍卵腔の化學成分について

有 馬 四 郎 (奈良女子大學) (1951 年 12 月 7 日受領)

兩棲類發生初期の代謝終産物の研究は、MC CLENDON (1914) が *Amblystoma* 及び *Cryptobranchus* の圍卵腔に鹽類の一部と不明の有機酸があることを報告しているだけである。普通の兩棲類は水中に産卵するから、發生の進むにつれ、體外に出される代謝産物は卵膜を通つて周圍の水に失われることが考えられる。しかし、樹上に産卵されるモリアオガエル *Rhacophorus schlegelii* var. *arborea* ではその恐れがない。發生が進むに従つて卵膜内の液は黄色を帯び、孵化前には褐色になる。この液は色々な代謝終産物を含んでいると思われる。本報告は二年間にわたつて、この液の化學成分を成體尿の成分と比較しつつ定性的に調査したものである。

1. 材料及び方法 奈良市の春日神社裏及び京都北郊の鞍馬で卵を採集し、4°-10°C の冷蔵庫に入れて發生の進むのを抑制した。發生時期を囊胚期、神經胚期及び孵化前の三段階に分けて液を採集した。囊胚期、神經胚期の卵膜内の液量は極めて微量で、毛細管では採集が困難なために、一定量の蒸溜水に卵を入れ滲透作用で卵膜内の液を増し、所謂稀釋したものの膜を除去して毛細管で集めた。この操作で卵膜内の物質が蒸溜水内に滲出することも考えられるから、別にこの蒸溜水も集めた。孵化前になると卵膜内の液は多いので、現液を毛細管で採取した。採取した液は小さい試験管に入れ、尿の場合と同様に数滴の toluol を加え、冷蔵庫に保存して腐敗を防いだ。採集に用いた卵の数は 1950 年には囊胚期 1322 箇から約 2cc, 神經胚 512 箇から約 3cc, 孵化前のもの 921 箇から約 3cc, 1951 年には、囊胚期 1117 箇から約 4cc, 神經胚 592 箇から約 4cc, 孵化前のもの 768 箇から約 3cc を集めることが出来た。

三時期の何れの液にも蛋白質を含有しているから、Cl, urea, uric acid の分析には醋酸ウラニールで除蛋白し、SO₄, PO₄ の分析にはトリクロール醋酸で除蛋白し、炭水化物の分析には ZnSO₄ で除蛋白した液を用いた。即ち、醋酸ウラニールの場合には、検液 1, 蒸溜水 2, 1.55% 醋酸ウラニール 1 の割合に混ぜた濾液を用い、トリクロール醋酸の場合には、検液 4 に對し 10g/dl トリクロール醋酸 9 の割合に混ぜた濾液を使い、ZnSO₄ の場合には、RICHARD が蛙の plasma を分析した際に用いた除蛋白の方法になつた。囊胚期と神經胚期に採集した液は既に稀釋されているので、そのまま用い、孵化前の胚から採集したものは、蒸溜水で 2 倍にうすめて用いた。従つて絶えず蒸溜水の成分も對照として分析した。

2. 結果 分析した結果は表の通りである。－の符號は反應が陰性、＋は陽性、±は微弱で確定困難の場合を示している。

第1表 *Rhacophorus schlegelii* var. *arborea* の圍卵腔内溶液の定性分析結果 (次頁に續く)

		無 機 成 分								
		Na	K	Cl	SO ₄	PO ₄	NO ₃	NO ₂	Ca	NH ₄
1951 年	囊 胚	+	－	+	+	－	－	－	－	－
	神 經 胚	+	－	+	+	－	－	－	－	－
	孵化前の胚	+	－	+	+	－	－	－	－	－
				醋酸 ウラニール で除蛋白	トリクロール 醋酸で除蛋白	トリクロール 醋酸で除蛋白				
1950 年	囊 胚	+	－	+	±	+	－	－		－
	神 經 胚	+	－	+	±	+	－	－		－
	孵化前の胚	+	－	+	±	+	－	－		－

昭和 27 年 (1952) 10 月

兩棲類の發生初期の代謝終産物について

301

		有機成分									pH
		蛋白質			炭水化物			クレアチニン	尿素	尿酸	
		MILLON test	HELLER test	Sulfosalicylic acid	BENEDICT reaction	MOLISCH reaction	LUGOL reaction				
1951 年	囊 胚	+	+	+	-	-	-		+	+	7.2-7.4
	神 經 胚	+	+	+	-	-	-		+	+	7.6-7.8
	孵化前の胚	+	+	+	-	±	-		+	+	7.4
					ZnSO ₄ で除蛋白	ZnSO ₄ で除蛋白	ZnSO ₄ で除蛋白		醋酸 ウラニール で除蛋白	醋酸 ウラニール で除蛋白	
1950 年	囊 胚	+	+			+	-	-	+		7.2-7.6
	神 經 胚	+	+			+	-	-	+		7.8-8.0
	孵化前の胚	+	+			+	-	-	+		7.4

註 1950 年のは除蛋白しない分析であるが参考のため記す。

無機成分について見ると、反應の表われたのは、Na, Cl, SO₄ で、このうち Cl は使用した蒸留水の分析では表われていない。分析して陰性の結果を示したものは、K, NO₃, NO₂, Ca, NH₄, PO₄ であつた。1950 年には PO₄ が陽性を示したのは、除蛋白不完全の結果であろう。つぎに有機成分では三時期ともに蛋白質を含有している。即ち、MILLON 試薬を加えると沈澱を生じ、加熱により沈澱物は紅色に變ずる。また、濃硝酸を用いた HELLER の試験でも、sulphosalicylic acid を加えた場合でも、何れも陽性の結果を示している。

炭水化物の分析は ZnSO₄ を加えて除蛋白した濾液を用いたが、BENEDICT 試薬では陰性であり、glycogen 定性のために、LUGOL 液を加えて検べても陰性の結果であつた。ただ MOLISCH 反應では孵化前の胚の液でかすかな反應を示すが、確定するまでに至らなかつた。1950 年の除蛋白しない分析の結果では、MOLISCH 反應は陽性であつた。従つて蛋白質のなかに糖基のあることが推測される。

creatinine の分析は sodium tungstate による除蛋白に失敗したので調査することは出来なかつた。

urea は黒大豆に含まれている urease を利用して試験を行つたが、約 18 時間後に反應が現われた。従つて、極めて微量が含まれていると考えざるを得ない。しかしこの反應は發生が進むに従つて強い。uric acid は BENEDICT の直接微量定量法によつて分析した。この場合囊胚期の液は約 0.88mg/dl、神経胚期の液では約 1mg/dl、孵化前の胚の液では約 1.6mg/dl の程度を示した。1950 年には除蛋白しないで creatinine を分析したが、その結果は陰性であつた。また除蛋白しない採集液に黒大豆の urease を加えて urea を分析したが、この場合も約一晝夜後に反應が陽性に現われた程度であつた。

pH は液が微量であるから、東洋濾紙によつて測定したが、神経胚の溶液で最も高い値を示した。

3. 考察 NEEDHAM (1937) の蛙卵の化學成分の分析の表によると、*Rana temporaria* の卵細胞の無機成分として、K, Na, PO₄, Cl, Ca があり、SO₄ は表われていない。また、池田 (1937) がメダカの卵を検べた結果では、K が卵外に出る量は極めて少く、殆ど結合状態にあると述べている。また McCLENDON (1914) は *Amblystoma* では發生が進むに従い、水と NaCl が卵外に出ると述べている。本分析で Na, Cl が陽性に表われた點は McCLENDON の結果と一致する。しかも、NEEDHAM の表から蛙卵内に含まれる Na, K 量が略々等しいにも拘らず、K の存在が證明されなかつたのは K が結合状態にあるためと推測される。PO₄ は殆ど蛋白質として結合の状態で存在すると考えられるが SO₄ が微かな反應ながらも無機状態で現われたのは、蛋白質分解の結果と考えられる。これに對し PO₄ が現われない點に對する説明は今の所不明である。モリアオガエル成體尿に於いては NO₃, NH₄, PO₄, K が何れも證明されているが、これらが圍卵腔液に現われないのは肝臓、腎臓の機能のまだ働かない發生初期には、無機の形にまで分解遊離さ

れることは非常に少いことを示しているように思われる。

有機成分のうち三時期ともに蛋白質を含有していることは明らかである。この蛋白質の性状については今後の研究を必要とするが、加熱により凝固しないし、發生の進むに従い濃厚になる褐色の色素も、除蛋白劑によつて、濾過した濾液にはなくなる。MCCLENDON (1914) は MILLON 試薬でかすかな沈澱が生ずることを見ているが、加熱の結果は報告していない。本實驗の結果からモノオキシベンゾールをもっているものであることが推測される。また MCCLENDON は非常に表面張力を減ずる有機酸の存在を豫告しているし、更に囊胚期前後には少量の glycogen の存在を報告している。囊胚形成に際し背唇部に glycogen 量の増加することから豫期されることではあるが、本分析ではその存在を證明することは出来なかつた。しかし液の中には少くとも糖基をもつた化合物が存在するだろうとは MOLISCH 反應が陽性であることから推測出来る。

uric acid の含量は發生の進むに従つて増加し、且つ成體尿よりもその量が多くなる。これに反し urea の量は極めて微量である。従つて少くとも胚内の蛋白質や核酸の一部は尿酸にまで分解されて胚外に出され、成體の蛋白質分解産物の大部分が一旦 NH_4 迄分解され更に肝臓で尿素にまで合成されて排泄されるのとはよい對照をなしている。

以上本實驗は成體尿の成分と比較しながら分析したものであつて、これ以外に種々な化合物の存在も豫想され、液の黄色乃至褐色が如何なる物質であるかなどについては、今後の研究をまつて報告し度い。

4. 總括 1. モリアオガエル發生初期の圍卵腔内液の化學成分の定性分析を行つた。
2. 無機成分では Na, Cl, SO_4 の存在が證明出來た。
3. 有機成分としては、囊胚期、神經胚期、孵化前の胚の何れの時期にも蛋白質が含まれている。
4. uric acid は成體尿よりも含量が多く、しかも發生が進むにつれてその量を増加するに反し urea の含量は各時期とも極めて微量である。
5. glycogen の存在を明らかにすることは出来なかつた。

筆をおくに當りこの研究の課題を與えられ且つ御懇篤な御指導を戴いている京都大學市川教授に厚く深謝する。

文 献 1) BALDWIN, E. '49. Dynamic Aspects of Biochemistry. 2) BENEDICT, S. R. '22-'26 J. Biol. Chem. 51; 52; 54; 64; 68. 3) 池田雄一郎 '37 東京大學紀要 4. 4) MC CLENDON J. F. '14 Science 40. 5) NEEDHAM, J. '37 Chemical Embryology.

Résumé

Studies on the End-products of Metabolism in the Early Developmental Stages of Amphibia

II. Qualitative Analysis of the Composition of the Peri-vitelline Fluid of *Rhacophorus schlegelii* var. *arborea*

SHIRO ARIMA (Institute of Biology, Nara Women's University)

MCCLENDON (1914) reported that peri-vitelline fluid in the early developmental stages of *Ambystoma* and *Cryptobranchus* contains sodium chloride and the organic acid which shows a slight MILLON reaction, but no trace of protein. The present study reveals the existence of sodium-ion, chlorine-ion and sulphate-ion, but fails to show any trace of potassium-ion, phosphate-ion, ammonium-ion, nitrate-ion and calcium-ion. Moreover, protein, uric acid and urea are found, but no trace of carbohydrates, especially glycogen, are detected. Protein is determined by positive MILLON reaction, sulphosalicylic acid-reaction, HELLER test and MOLISCH reaction. Urea is present in only low concentration, since it shows a slight positive reaction even after 18-hour treatment with urease. As the development goes on, uric acid increases gradually, and eventually its concentration becomes rather higher than that of uric acid in the bladder urine of adult animals.