

Arginine の定量

千葉大学医学部医化学(主任 赤松教授)

渡 辺 剛 夫

TAKAO WATANABE

(昭和33年3月20日受付)

緒 言

Arginine がアルカリ性で、Hypochlorite と α -Naphthol とによつて橙赤色を発現し、これにより極めて微量の Arginine が検出されうことは、1925年に坂口博士⁽¹⁾によつて発見されたが、この坂口反応の原理に基づき Arginine 定量が、坂口氏自身或は他の研究者によつて行われ、その実施操作は多種である。

著者はこのたび、従来の諸法に比して、簡便にして安定なる呈色液を得る方法を考案したのでここに報告する。

原 理

この変理は、アルカリ性にてグアニジノ化合物と反応する Hypobromite の過剰を直ちに反応系から除去するために、予め検液にズルフォサリチル酸を加えおくことによつて、ブローム反応生成物の安定化を図り、この生成物に対する発色剤としては、 α -Naphthol の代りに坂口新法⁽²⁾にもとずき Oxine を用いて試薬のみに由来する呈色をさけて、反応液の吸光度がグアニジノ化合物の濃度に比例するものにしたものである。なお、諸種グアニジノ化合物の呈色液の吸光度は相等しき濃度溶液にても、グアニジノ基に結合する化学基の相異によつて変動するから、アルカリ性にて Hypobromite を作用させる反応段階にて、Arginine の酸化的脱アミノ化と酸化的脱 CO_2 とを可及的防ぐために Glycine を添加することにした。従つて Oxine はアルコール性液として供することなく Glycine と共にズルフォサリチル酸液に溶解しておき、この混液を除蛋白操作に使用したのである。

実 験

I. 試 薬

1) ズルフォサリチル酸混液: 5% ズルフォサリ

チル酸 50 ml と $M/100$ グリシン 50 ml とを混和した中に、オキシシン 0.05 g を溶解する。ズルフォサリチル酸濃度は 2.5% となる。以下この混液をズルフォ・オキシシン混液と記す。

2) 2.5% 苛性ソーダ液:

3) ヒポプロミット液: 5% NaOH 100 ml にブローム 1 g を溶解する。褐色ビンに入れ氷室保存すれば少なくとも2カ月は使用に耐える。

4) 塩酸アルギニン: $M/100$ 溶液としてトルエンを重ね氷室保存し、使用にあつて $M/4000$ に稀釈して用いた。この稀釈アルギニン液 1 ml はアルギニン 43.5 μg を含む。検量曲線を求めるときに用いる。

II. 呈色方法

酵素試験液 2.0 ml をとり、ズルフォ・オキシシン混液 2.0 ml を加え濾過または遠沈して除蛋白し、その濾液または上清液 2.0 ml を 10 ml 目盛付試験管にとり、氷冷しつつ、NaOH 液 1 ml を混和し、15分後(それ以上になつてもよい)ヒポプロミット液 1 ml を混和し、そののち10分以内に、室温の水を加えて 10.0 ml とし直ちに Pulfrich 氏光度計 S 50 液層 10 mm にて比色測定する。純アルギニン液の場合は、その 1.0 ml にズルフォ・オキシシン混液 1 ml を混じて以下同様に操作する。

本論文中に於て、アルギニン呈色の至適条件検討の項の呈色法は、上記によらずその都度表の下に記す。

実 験 成 績

I. アルギニン呈色の至適条件

1) ヒポプロミット量及び呈色の時間的経過

$M/4000$ アルギニン液 1.0 ml について、第1表の如き条件で呈色せしめたが(グリシン添加は省略してある)、ヒポプロミット液 1 ml の場合最も高い吸光度を得た。吸光係数は時間と共に低下するが、低下の速度はヒポプロミット液量の多いものでは速い。

第1表 ヒポプロミット量とアルギニン呈色度

ヒポプロミット液	0.5 ml	1 ml	1.5 ml	2 ml
経過時間				
呈色直後	0.34	0.60	0.58	0.53
20 分	0.34	0.59	0.57	0.52
1 時間	0.33	0.59	0.55	0.50
2 時間	0.33	0.58	0.53	0.46
5 時間	0.31	0.56	0.48	0.40

$M/4000$ アルギニン 1.0 mg + 0.05% オキシソ
1 mg + 5% ズルフォサリチル酸 1 ml + 10%
NaOH 1 ml 振盪混和 15 分氷冷後、表記ヒポ
プロミット量添加、約 3 分後水を加えて 10.0
ml とし吸光度測定。オキシソは 0.15 g を $N/100$
HCl 100 ml に溶かし使用の時 3 倍にして 0.05
% とした。

2) アルカリ濃度

添加 NaOH 濃度を第 2 表記載の範囲で変えて検
すると、2.5% の場合が最も高い吸光度を得た。

第2表 アルカリ濃度とアルギニン呈色度

NaOH 濃度	10%	5%	2.5%	1.5%
アルギニン 吸光度	0.63	0.66	0.71	0.67

$M/4000$ アルギニン 1.0 ml + 0.05% オキシソ
1 ml + 2.5% ズルフォサリチル酸 1 ml + $M/200$
グリシン 1 ml + 表記濃度 NaOH 1 ml 混和氷
冷 15 分後前項に決定したヒポプロミット液 1
ml 添加、約 3 分後水を加えて 10.0 ml とし吸
光度測定。

3) グリシン濃度

第 1 表と第 2 表とを見ると、10% NaOH 1 ml と
ヒポプロミット液 1 ml とを用いたときにグリシンの
存在する場合の吸光係数が僅かながら高かつたから、
2.5% NaOH 1 ml とヒポプロミット 1 ml とを
用いる場合に $M/10 \sim M/800$ のグリシン 1 ml 添加に
ついて検討すると、その $M/100$ また $M/200$ の場合が
最も高い呈色度を示した (第 3 表)。

第3表 グリシン濃度とアルギニン呈色度

グリシン濃度	$M/10$	$M/50$	$M/100$	$M/200$	$M/400$	$M/800$
アルギニン 吸光度	0.21	0.65	0.71	0.72	0.69	0.68

$M/4000$ アルギニン 1.0 ml + 0.05% オキシソ
1 ml + 2.5% ズルフォサリチル酸 1 ml + 表記
濃度グリシン 1 ml + 2.5% NaOH 1 ml 以下
前項と同様操作。

以上の成績によつて、アルギニンの定量には前記
実施の項に記載した試薬量を用いることにした。ヒ

ポプロミットを加える前に 15 分間氷冷するのは、
呈色実施の度毎にアルカリ性検液の温度が 0°C にな
るように留意するに他ならぬ。したがつて氷冷時間
15 分を超えても差支えなく、またその間にオキシソ
の沈澱することも無い。

4) 呈色の後吸光度測定までの時間の検討

呈色液は第 1 表に記した様に、時間が経過すると
褪色する傾向があるから、基準呈色法を実施した場
合の、呈色直後より時間を追つて吸光係数の変化を
検した。第 4 表に示すように、測定吸光係数値は 15
分より次第に低下し、30 分後に約 6% の低下を示し
た。したがつて吸光度測定は呈色後 10 分以内に行
う必要がある。即ち室温の水を以つて 10 ml 劃線ま
で充たしたのち、色の濃さが少くとも 10 分間は不
変であるから、多数の試験管列につき定量を実施せ
んとするときには、数本のアルカリ性化検液を 1 組
として、それらにヒポプロミット液を加え、水にて
10 ml として順次に吸光度を測定することが便利で
ある。

第4表 アルギニン吸光度の時間的検討

時間 (分)	5	10	15	20	25	30
吸光度	0.71	0.71	0.70	0.69	0.67	0.66

$M/4000$ アルギニン 1.0 ml に前記決定した至
適量の試薬各 1 ml を加え、前記同様の操作を
なし測定。表記時間はヒポプロミット添加後水
で 10 ml 劃線に稀釈するまでの氷冷時間を示す。

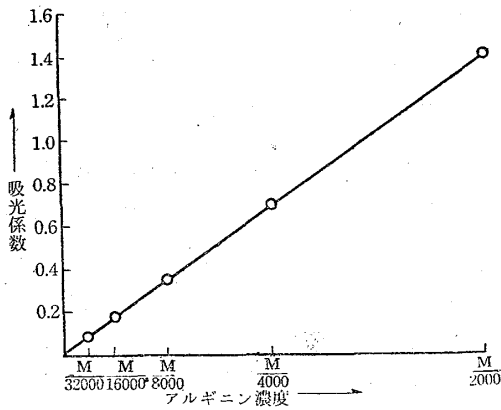
5) アルギニン純溶液の検量曲線

第 1 図に示す如く、アルギニン純溶液について定
量を行つと、アルギニン量と吸光係数は正比例をな
す。盲検の吸光度は 0.000 ~ 0.005 であつた。著者
の実験に於て、上記の実施法通り呈色操作すると、
 $M/4000$ アルギニン液 1.0 ml (= 43.5 γ Arginine) の
吸光係数は 0.71 である。すなわち 10 γ Arginine
は 0.163 の吸光係数を示す。

II. アルギニン呈色に対する諸種化合物の影響

本法を $M/4000$ アルギニン 1.0 ml につき実施法に
記載の様に施行するに際して、予めこれに諸化合物
を添加しておく、グリシン、アラニンは $M/100$ 、尿
素は $M/200$ 、硫酸、チロジン、クレアチンは $M/400$ 、
ロイシン、トリプトファン、クレアチンは $M/800$ 、ヒ
スチジンは Macpherson⁽⁶⁾ と同じ $M/4000$ 以下の濃
度に於てはアルギニン呈色に影響なく、それ以上の
濃度では呈色を阻害する。またチミン、4-メチルウ
ラシルの高濃度添加は Van Pilsun⁽³⁾ 法における

第1図 アルギニン純溶液の検量曲線



アルギニン濃度	吸光係数	摘 要
M/2000	1.410	5 mm キュウベツト使用
M/4000	0.705	10 mm "
M/8000	0.355	10 mm "
M/16000	0.175	10 mm "
M/32000	0.087	20 mm "

図示濃度のアルギニン 1.0 ml + ズルフォオキシシン混液 1 ml + 2.5% NaOH 1 ml 混和水冷 15 分後、ヒプロミット液 1 ml を加え振盪、約 3 分後水を加えて 10.0 ml としプルフリッヒ光度計 S 50 にて測定した。

と反対にアルギニンの呈色を阻害する (第5表)。

III. 回収試験

白鼠の筋ホモゲネートにアルギニンを加えたもの

と、アルギニンの代りに水を加えたものとをズルフォ・オキシシン混液を以つて除蛋白として呈色せしめ、その差をとると純アルギニンと同じ吸光度を得た (第6表)。また M/2000 アルギニン液 2.0 ml に M/10 第二磷酸ソーダ液 1 ml を加え pH を約 8.8 とし、1 ml の肝アルギナーゼ液 (豚肝自家消化透析液) を加え 1 時間と 2 時間 37° に保つた後に、ズルフォ・オキシシン混液を加えて除蛋白した液に走量操作を施すと、吸光度が零であつた。

IV. 諸種グアニジノ化合物の呈色

本法によつて、アルギニン以外のグアニジノ化合物も呈色する。アルギニン酸、モノアセチルアルギニンはアルギニンと同じ吸光度を示し、アグマチン、オキシブチルグアニジン、β-グアニジノ、プロピオン酸はそれより低い吸光度を示し、グリコシアミンはアルギニンに比して稍々黄色味が強く呈色は Weber⁽²⁾ と同じくアルギニンの約 70% であつた。この成績はグリコシアミンの呈色がアルギニンとほぼ等しいという Van Pilsun の所見とは一致しない (第7表)、実施法の相違によるのであろう。

考 按

坂口博士⁽¹⁾によつて発表された Arginine の比色定量法は、グアニジンとアルギニン、グリコシアミンの様なその N-mono 置換体とに特殊である点と呈色鋭敏度が高い点とで世界的に高く評価され

第5表 アルギニン呈色に対する諸種化合物の影響

濃 度	濃 度									
	M/50	M/100	M/200	M/400	M/800	M/1600	M/3200	M/4000	M/8000	
添 加 化 合 物										
尿 素		0.63	0.71	0.70	0.71					
硫 安			0.65	0.71	0.70	0.71				
グ リ シ ン	0.48	0.71	0.71	0.70						
ア ラ ニ ン	0.62	0.71	0.70	0.71						
ロ イ シ ン			0.62	0.63	0.71	0.70				
チ ロ ジ ン			0.63	0.70	0.69	0.71				
トリプトファン				0.64	0.70	0.71	0.71			
ヒ ス チ ジ ン						0.63	0.68	0.71	0.71	
タ レ ア チ ン			0.58	0.61	0.71	0.70				
ク レ ア チ ニ ン			0.65	0.70	0.71	0.70				
4. メチルウラシル		0.54	0.59	0.71	0.71	0.71				
添 加 化 合 物										
濃 度	M/5	M/25	M/125							
チ ミ ン	0.10	0.34	0.47							

M/4000 アルギニン 1.0 ml に表記濃度の各化合物を 1.0 ml 宛添加し、基準呈色法に従つて比色測定した。4. メチルウラシルは M/100 ~ M/1600 液 (1.26 ~ 0.07 mg/ml), チミンは M/5 ~ M/125 液 (25.2 ~ 1.0 mg/ml) を 1.0 ml 宛添加し吸光度測定した。

第6表 回収試験

	白鼠ホモゲネート+アルギニン			*アルギニン
	1回	2回	3回	
	0.77	0.77	0.81	0.71
対照値	0.06	0.07	0.10	
差引	0.71	0.70	0.71	

白鼠の筋(筋2g+水10ml)ホモゲネート1.0mlに $M/2000$ アルギニン1.0mlまたは水1.0ml(対照)とズルフォオキシソ混液2.0mlを加え濾過した濾液2.0mlを用いて呈色せしめた。

* $M/4000$ アルギニン1.0ml+ズルフォオキシソ混液1mlを呈色したときの吸光係数は0.71であつた。

第7表 グアニジン化合物の呈色度

アルギニン	0.71
アルギニン酸	0.71
モノアセチルアルギニン	0.72
アグマチン	0.64
オキシブチルグアニジン	0.54
β -グアニジンプロピオン酸	0.60
グリコシアミン	0.47

$M/4000$ の化合物各1.0mlを用い基準呈色法に従つて呈色測定した。

た。

1930年にWeber⁽²⁾は、坂口法では呈色完了に時間がかかりまたその間に過剰のHypochloriteによるグアニジン化合物の分解も起るといふ点から、Hypochloriteの代わりにHypobromiteを用いてArginineの呈色を速め、また呈色完了液に尿素を加えて過剰のHypobromiteを分解除去し、発現色素の酸化褪色を防いだ。しかしWeber法では、Arginineのアルカリ性液に α -NaphtholとHypobromiteを加えて呈色せしめた液に、尿素を加えるまでの時間が4~6秒ということになつており、またHypobromite量もArginine量が未知なる検液では、極大呈色を示す至適量を予め決定しておかねばならぬ不便があり、なお尿素の添加により色価に於て5~10%の損失を示した。

それに拘わらず、この尿素を用いて褪色を防ぐWeber法は多くの学者によつて採用され、Jorpes and Thorén⁽³⁾、Fisher⁽⁴⁾、Thomas⁽⁵⁾等は試薬の濃度や冷却条件等に関し僅かの変更を試みている

が、いずれもHypobromiteを加えてから尿素添加までの時間を、正確に15秒としており、実際的ではない。その後1942年に発表されたMacpherson⁽⁶⁾法では、水道水冷却の下に α -Naphtholを加えてから、尿素とこれに続きHypobromiteとを添加する操作を二度繰返して行つている。これは成書に最良法と記載されているに拘わらず、呈色度は低く、Beerの法則に従わず、また再現性に乏しい。

1950年に至り、坂口博士⁽⁷⁾はWeber法に準じながら、 α -Naphtholの代りにOxineを用いて、盲験の呈色を極度に抑える改良法を発表されたが、褪色を防ぐための尿素添加時間が、これまたHypobromite添加後正20秒とされ、更に正1分後水を加えるとされており、著者等の経験ではこれも実際的ではないと思われる。

1956年にVan Pilsum⁽⁹⁾、Rosenberg⁽¹⁰⁾は坂口旧法の変法を夫々報告した。そのうち前者は5mgのチミン(5-メチルウラシル)を予め加えておくと呈色が強まるというのが主な点である。その報告に記載された吸光係数測定時の液量3.1mlから計算すると、呈色度は著者の法によるものより低く、またチミンの様な高価の標品を呈色補助剤として供試するのは好ましくない。なお著者の方法では、チミンまたは4-メチルウラシルを加えておいても呈色度は強まらず、添加量の異なるものでは却つて吸光度の低下を認めた(第5表)。

またRosenbergのアルカリ性 α -Naphthol-Diacetyl反応はEggleton et al. (1943)のCreatine定量の変法にて、グアニジンとそのMono置換体のほか、di置換体をも測定するものであるが、極大呈色に達するまでの時間が温度に左右されるから、検液とArginine基準液とに呈色液を加え、正確に相等しい時間後に吸光度を測定せねばならぬ不便がある。

1957年にイタリアのCeriotti and Spandrio⁽¹¹⁾は尿素で褪色を防ぐ代りに、呈色10秒の後形成色素をブタノールで抽出し、色素の安定と鋭敏度の向上をはかつたが、この10秒という点がまた著者等の養成出来ない点である。上記諸氏の定量法を比較すると第8表の通りである。

著者は前記諸法のうち坂口反応に基づくグアニジン化合物の定量を簡易化し、さらにその再現性を確保するために、Arginineの呈色に所要の量を超える剰余のHypobromiteと反応しうる化合物を、予めArginine液に加えて呈色を行うことを考え、

第8表 アルギニン定量法の比較

氏名及発表年	検液	NaOH	α-ナフトール	冷却	ヒポプロミット	添加時間	40% 尿素	摘要
坂口 1925	5 ml	15% 2 ml	0.15% 5 ml	適	ヒポクロリット量	2°~4°C に氷冷		約40分後冷水を加え250 ml とし測定する
Weber 1930	5 ml	10% 1 ml	0.02% 1 ml	2~3分 氷冷	適量	4~6秒 以内	1 ml	5分以内に水を加え10 ml とし測定する
Jorppe 1932	5 ml	10% 1 ml	0.02% 1 ml	1時間 以上氷冷	適量	15秒後	1 ml	6~8分以内に水で10 ml とし測定する
Fisher 1938	5 ml	10% 1 ml	0.04% 1 ml	15分 氷冷	適量	15秒後	1 ml	直後に水を加え10 ml とし測定する
Thomas 1939	5 ml	10% 1 ml	0.05% 1 ml	5分氷冷	1 ml	15秒後	1 ml	5分後水を加え10 ml とし測定する
Macpherson 1942	10 ml	10% KOH 1 ml	0.1% 1 ml	水道水冷却のもとに40% 尿素 1 ml, K-ヒポプロミット 1 ml		2~3分 後	尿素 1 ml K-ヒポプロミット 1 ml	水を加え25 ml としてから10~15分後に測定する
坂口 1950	5 ml	10% 1 ml	0.02% オキシシン 1 ml	2~3分 氷冷	適量	20秒後	1 ml	正1分後水5 ml 加え5分以内に測定する
Van Pilsun 1956	2 ml	10% NaOH 2% チミン 0.04% α-ナフトール 1% NaOCl		混液 0.5 ml 0.2 ml		1分後	2% Na ₂ S ₂ O ₃ 0.2 ml	水にて総量3.1 ml とし測定する。氷冷では数時間安定なりと。
Rosenberg 1956	1 ml	3 N, 1 ml	2.5% α-ナフトールを20 ml に加え	n-プロパノール Diacetyl 2.5 ml を混じ、n-プロパノールにて100 ml とする	混液 2 ml		混液 2 ml	水を加え10 ml とし20~30分以内に測定する
Cerioti 1957	5 ml	アルカリ性 0.02% オキシシン 1 ml			0.5 ml	10秒後	ブタノール 4 ml 添加	色素抽出する

この目的に副うべき諸種の化合物を探したところ、ズルフォサリチル酸が適当であることを発見した。

これは透析したアルギナーゼを用いる酵素試験液の除蛋白剤としても用いられるので極めて都合である。ズルフォサリチル酸を用いることによつて、Hypobromite を添加したのち吸光度測定までの時間的制約が極めて緩やかにされた。なお Glycine をある濃度範囲に予め加えておくと、Arginine の呈色が高まることを知つたが、この吸光度増強に必要な Glycine 最低量添加操作は生化学的材料中にアミノ酸の混入していることが多く、アミノ酸が呈色度を少々高める点から好ましいといつてよい。

また坂口法及びその変法では、個々の場合に於て至適 Hypobromite 量を決定しなければならぬ不便があつたが、著者は毎度一定量の Hypobromite を用い、呈色操作を極めて簡便にした。本法で Arginine 純溶液の定量を行うと、盲験の吸光係数は0または殆んど0にて、Arginine 量と呈色液の吸光係数とは全く直線関係をなす。

この方法により、臓器(アルギナーゼを含まない筋)に加えられた Arginine は100%再証明される。また Arginine 溶液に透析したアルギナーゼを作用させると吸光係数は0となる。アルギナーゼによる Arginine 水解のとき尿素が生ずるが、Arginine に混在する尿素量は第5表の如く、M/4000

Arginine に対しては、尿素濃度が Arginine の20倍になつても吸光度に変化を来たさない。また数種の化合物についても、その阻害を検したが、これらが一般に生化学的材料中に含有される程度の濃度に於ては大きな障害とはならない。

若干のグアニジン化合物は Arginine に類似の呈色を示したが、その化学構造によつて呈色の等しくないことが知られた。この成績は蛋白質溶液でそのまま Arginine 定量を行うと、実際の Arginine よりも低い測定値が与えられるとの坂口、Weber 等の報告の正しいことを理論づけるものである。

総括

(1) ズルフォサリチル酸を添加する、坂口反応に基づく Arginine の定量法について述べた。本法は簡便にして正確であり、また酵素試験に供試出来る。この微量的方法は、従来行われた過剰の Hypobromite を除去するための尿素添加を必要としない。

(2) 本法によれば、アルギニン酸、モノアセチルアルギニンは同濃度の Arginine と等しい呈色を示し、アグマチン、オキシブチルグアニジン、β-グアニジンプロピオン酸は夫々 Arginine の約90%、80%、85%の呈色を示し、グリコシアミンは約70%である。

(3) 尿素, 硫酸, グリシン, アラニン, ロイシン, チロジン, トリプトファン, ヒスチジン, クレアチン及びクレアチニンは高濃度では Arginine の呈色を阻害するが, 生化学的材料中に一般に含まれている程度の濃度では阻害しない。

本研究は文部省より赤松教授に与えられた科学研究費によつて行われ, その間終始御懇篤なる御指導を賜つた赤松教授に対し深甚なる謝意を表します。

文 献

- (1) 坂口昌洋: J. Biochem., **5**, 25, 133, 1925.
- (2) Weber, C. J.: J. Biol. Chem., **86**, 217, 1930.
- (3) Jorpes, E. & Thorén, S.: Biochem. J., **26**, 1504, 1932.
- (4) Fisher, R. B. & Wilhelmi, A. E.: Biochem. J., **32**, 606, 1938.
- (5) Thomas L. E. & Ingalls, J. K.: J. Biol. Chem., **129**, 263, 1939.
- (6) Macpherson, H. T.: Biochem. J., **36**, 59, 1942.
- (7) 坂口昌洋: J. Biochem., **37**, 231, 1950.
- (8) 坂口昌洋: J. Biochem., **38**, 91, 1951.
- (9) Van Pilsum, F.: J. Biol. chem., **222**, 225, 1956.
- (10) Rosenberg, H.: Biochem. J., **63**, 153, 1956.
- (11) Ceriotti, G. & Spandrio, L.: Biochem. J., **66**, 603, 1957.