Ionophoresis による Lysine の分別定量法

前川一之, 櫛部政久 (愛媛大学農学部)

昭和 30 年 6 月 15 日 受理

Separation and Determination of Lysine by Paper Ionophoresis.

By Kazuyuki MAEKAWA and Masahisa KUSHIBE

(Dept. Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Ehime)

Lysine には適当な特殊反応が無く, その定量には臭素等で処理後フェノール試薬で呈色せしめる方法⁽¹⁾⁽²⁾, 2,4-dinitrofluorobenzene を縮合後加水分解して分離, 比色する方法⁽³⁾, Bioassay⁽⁴⁾ 等が行なわれている. 又分別の方法も Ion exchange column⁽⁵⁾, 濾紙クロマトグラフィ等が用いられているが, 特に濾紙クロマトグラフィに依り分別する方法としては buffered *m*-cresol 等を展開剤として用いる方法⁽⁶⁾, PhOH: BuOH: AcOH: H₂O を用いる方法⁽⁷⁾, PhOH: H₂O 又は BuOH: AcOH: H₂O/PhOH: H₂O 又は Cresol: H₂O の二次元を使用する方法等が報告されている⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. 然し前者では分離が必ずしも完全でなく, 二次元法では場所の locate, 其の他予備操作に労多く定量化は共に困難である.

DURRUM⁽¹¹⁾ は濾紙 ionophoresis により蛋白加水分解物からアスパラギン酸, グルタミン酸, 中性アミノ酸, ヒスチジン (His) 及びリジン, アルギニン (Lys, Arg) の 5 群を分離しているが, Lys と Arg の分離は行なっていない. 吾等は此の両アミノ酸の等電点及び pK を考慮して塩基性の領域に於て ionophoresis を行ない, 分離及び定量を企てた. その結果, 通電中に各アミノ酸はそれぞれ一定割合で分解される事が判明したが, 尚その分解量を考慮すれば Lys, Arg, His 及び他の各アミノ酸群を完全に分離し, これら 3 塩基性アミノ酸, 特に Lys を比較的精密 (±3%) に定量し得るに至つたので茲に報告する.

実 験 の 部

I. 濾紙 Ionophoresis により他のアミノ酸群からリジンの分離

Ionophoresis には DURRUM の記載にあるような装置を自製して用いた. 濾紙は東洋濾紙 No. 50 (4×40 cm) を使用した. このほぼ中央に a 及びそれより 1.5 cm 離れて b, 2 線を印す (Fig. 1). 試料は 5~20 micro liter (Lys 0.2~1 μmol) を micro pipette にて a 線上に添加する. 最初 a 線を apex に置く. 濾紙の両端は 0.05 mol Na₂CO₃ 溶液に浸し, これに両炭素電極を浸す.

Fig. 1. Diagram of strip

電気泳動後, 濾紙は 50° の乾燥器にて 10 分間乾燥し, 0.1 N 醋酸溶液を spray 後再び 10 分間乾燥し, 常法の如く 0.02% ニンヒドリン水飽和ブタノール溶液を spray して 50~60° にて微かに呈色する迄加温し, Lys の位置を locate する.

定量には Lys の部分を少し大きく切断し, 試験管に取る. 又 strip 上の他の部分を同一面積使用して blank とした. それぞれに水 0.4 cc を加え TROLL, CANNAN⁽¹²⁾ の方法に従つてニンヒドリン反応を行つた. 比色には Beckmann Model DU Spectrophotometer を使用し, 波長 578 mμ に於て測定した. Filter 570 mμ を用いて光电比色計で測定しても充分である.

分離は Na₂CO₃ 濃度が 1/15~1/30 mol に於て完全である. 結果の 1 例は Figure 2 の如し. アルカリ濃度が 1/30 mol 以下では Lys, Arg の分離が不充分であり 1/15 mol 以上では通電中に於ける分解が多く回収率が著

又濾紙には同一濃度の Na₂CO₃ 溶液を apex 附近凡そ 2 cm を避けて一様に注加する. apex 迄 Na₂CO₃ 溶液が浸透した時に b 線が apex に来るように手早く anode の方に引き下げる. これは通電中に apex 附近に於て Lys が分解される事を防ぐ為である (Arg の分離定量には寧ろ反対に 1 cm 位 cathode の方に引き下げる方が良い. その場合は Fig. 2, c 線の如くなる).

通電の条件は 300 volt, 3.5~5.9 mA/4 cm が適当であつた. 電流密度を大とする時は分離に好都合のようであるが, apex 附近で抵抗の為に発生する熱に依り分解される量が著しく増大するようである. 継続時間に就ては後述する.

Fig. 2. Separation of lysine, arginine and histidine from hydrolysate.

Electrolyte: 5/100 M Na_2CO_3

Duration: 1) 60 min. 2) 140 min. 3) 180 min.

Current: 3.5 mA (initial)/4 cm (width), 300 volts.

Paper: Toyo-roshi No. 50, apex height, 14.5 cm.

Fig. 3. Decomposition of lysine by paper ionophoresis.
(Initial conc. of lys, was $0.44 \mu \text{mol}$)

しく低い。

II. Lys の Ionophoresis 中に於け分解

a) Lys と His との分離は容易であるが, Arg との分離を完全にする為には長時間, 少なくとも3時間以上処理する事が必要である (Fig. 3)。然し他方定量に最も影響する因子は通電の継続時間であると考えられたので Lys の通電に依る分解を精査した。その結果は Fig. 3 の通りであり, 時間と比例してかなり分解が行なわれる事が判る。従つて分解量を少なくする為には可及的短時間の通電が望ましい。

長時間 ionophoresis を行つた場合はニンヒドリンの呈色に於て異なる色調を与える。これは TROLL, CANNAN のニンヒドリン呈色反応に於て, 使用するピリジンと反応して呈色する物質が生成した事によるものと思われる。それは Fig. 4 の如く $388 \text{ m}\mu$ に吸収を有する物質である。然し吸収 max. が離れており, 比色の妨害にはならない。

Fig. 4. Absorption spectrum of colored substance formed from pyridine and a substance which was produced during ionophoresis.

Table 1. Separation and Decomposition of Basic Amino Acids by Paper Ionophoresis.

Duration of ionophoresis	180 min.				260 min.			
	Migrated distance from origin		Recovery (%)		Migrated distance from origin		Recovery (%)	
His	toward anode	4 cm	18		toward anode	7 cm	12.5	
Lys	" anode	1.5 "	50		" anode	2.2 "	34.0	
Arg	" cathode	0	15		" cathode	0.2 "	10.5	

(Initial conc. of each amino acids was $0.29 \mu \text{mol}$).

b) Apex に試料を附加したまま通電する場合と apex を避けて試料を置いた場合とでは, 凡そ 16% の差があつた。

c) Ionophoresis 後, 直に醋酸を spray し strip を酸性として後測定したが, 此の操作に依つて回収率は向上しなかつた。即ち Lys の分解は殆んど通電中に起るもののようである。尚 Arg, His に就ても通電に依る分解を測定したが Table 1 の如くであり, Lys よりも更に大きな分解を蒙っている事が判る。

III. 適当な条件に依る測定結果

広範囲に互つて検討はしなかつたが, I の方法に依り II

の因子を若干検討した結果, 次の各条件が分離, 回収率両面から適当と考えられた: 電圧 300 volt, 電流 3.5 mA/4 cm, 3 時間継続, 5/100 mol Na_2CO_3 溶液 (pH=11.1):

この条件で Lys, Arg, His 及び他のアミノ酸混合物を ionophoresis にて分離し Lys を定量した結果は, Fig. 5 の通りである.

Fig. 5. Calibration curve of lysine by paper ionophoresis.

A.....Direct colorization without separation
B.....Recovery curve after ionophoresis

結果はそれぞれ Table 2 の如き値を示した.

この実験を行なうに当り種々便宜を与えられた本学石川久雄助教授に謝意を表す.

Fig. 5 に於て A は Lys を一旦濾紙に添加したものをそのまま溶出して測定したものであり, B は上の条件により ionophoresis した場合の結果である. 後者に於ては遙かに吸光度が低く, 又 A, B が平行でない事実は ionophoresis に依る分解を示すものである.

この分離定量法の誤差の殆んど総ては通電中に於ける Lys の分解に帰せられるが, これは Fig. 3 の如く時間と密接な関係にあり, 通電時間を注意すれば充分再現性ある結果を与える. 全操作で $\pm 3\%$ 以内の誤差であつた.

Table 2. Lysine Determination of Control Mixture and Protein.

	Amino acids mixture of known composition				Ovalbumin			
Lysine applied	0.350 μ mol				reference ⁽¹³⁾ 6.4%			
Present method	0.347	0.351	0.350	0.353	6.8%	6.7	6.7	6.7

最後に ovalbumin 及び既知組成のアミノ酸混合物をそれぞれ $\text{HCl} \cdot \text{HCOOH}$ 混合溶液にて加熱処理し, 常法に依り酸を除去し, 活性炭にて脱色後, 本法に依り Lys を測定した

- (1) J. A. NELSON, W. D. Mc FARLANE and M. BOULET *Federation Proc.*, 5, 148 (1946).
- (2) M. BOULET, J. A. NELSON and W. D. MCFALANCE: *Can. J. Research*, 25 B, 540 (1947).
- (3) 赤堀四郎, 追田直一, 大野光, 池中徳治, 岡田吉善, 永田明穂: 蛋白質構造討論会 (1952).
- (4) D. DE FONTAINE and S. W. FOX: *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3701 (1954).
- (5) S. MOORE and W. H. STEIN: *J. Biol. Chem.*, 195, 669 (1952); C. H. W. HIRS, S. MOORE and W. H. STEIN; *J. Biol. Chem.*, 195, 669 (1952); 丸田芳樹, 鮫島広平, 田中正雄: 農化, 28, 775 (1954).
- (6) E. F. MC FARREN and J. A. MILLS: *Anal. Chem.*, 24, 650 (1952).

- (7) K. KRISHNAMURTHY and M. SWAMINATHAN: *Science and Culture (India)* 20, 51 (1954). cf. *C. A.*, 49, 4770 (1955).
- (8) R. A. BOISSONNAS *Helv. Chim. Acta*; 33, 1972 (1950).
- (9) W. GEROK: *Z. Physiol. Chem.*, 299, 112 (1955).
- (10) E. KOFRANYI: *Z. Physiol. Chem.*, 299, 129 (1955).
- (11) E. L. DURRUM *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2942 (1950).
- (12) W. TROLL and K. CANNAN: *J. Biol. Chem.*, 200, 803 (1953).
- (13) J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSCHMANN and H. FRAENKEL-CONRAT: *J. Biol. Chem.*, 186, 23 (1950).

Summary

This paper is concerned with the separation and determination of lysine from protein hydrolysates by means of paper ionophoresis.

In regard to the separation and the recovery of lysine, the following conditions were found suitable: current; 3.5 mA/4 cm (width), voltage; 300 volts; duration, 180 minutes; electrolyte; 5/100 M solution.

Under the present experimental condition, the decomposition rate of lysine was estimated during ionophoresis, and data for the determination of lysine is given in Figures 3 and 5.