カツオの生化学的研究—Ⅶ. 幽門垂に於けるグアニジン体の分布

柿 本 大 壹

(鹿児島大学水産学部)

Biochemical Studies on Skipjack (*Katsuwonus vagans*)—Ⅶ. Distribution of Guanidine Compounds in Pyloric Coeca Daiichi KAKIMOTO

1. By using the method of paper partition chromatography, the existence of arginine and octopine in fresh pyloric coeca-extract was ascertained.
2. But, in the extract of the pyloric coeca stored for one month at -4°C , the following six guanidine compound were found; methyl guanidine, arcaine, agmatine, arginine, octopine and glycoccyamine.

I. 緒 言

動物体に於けるグアニジン体としては現在まで可成り多数発見されており、その中クレアチン、クレアチニン、アルギニン、オクトピン等については生化学的研究も多く為されているがその他のグアニジン体に関するものは少い。尤も合成化学的研究としては渋谷、大戸氏¹⁾等により可成り広範囲の研究が行われている。渋谷氏は自然界に於けるグアニジン体の直接の生成母体はシアナミド体であるとしているが、之れは天然物について確かめられた観察ではない。又牧角氏²⁾は濾紙クロマト法を用いてグアニジン体の分布を研究し、水産動物では貝類その他に於てアルギニン、オクトピン等を検出し、更にナタメから新しい種類と思われるグアニジン体を分離している。小幡氏³⁾等はある種の酵母の醗酵液中でアルギニンの一部がオクトピンになることを認めている。他方医学方面ではグアニジン体の制菌作用に関する研究も行われ、ストレプトマイシンの如き重要な制菌剤もグアニジン体に属し、此の方面からの研究も進められているので、生化学的領域からも窒素化合物中特殊の一群として研究さるべきであろう。

著者はカツオの生化学的研究の一環として幽門垂の成分を中心に行つた研究の結果を数次に亘り発表した⁴⁾が、そのうち濾紙クロマトグラフ法を応用した実験では専らニンヒドリン呈色物を対照としたため、アルギニン、アグマチンの様な一部のグアニジン体以外の物質は見逃して来た。偶々牧角氏の行つた方法に従い幽門垂エキスについて実験した所、意外に多くのグアニジン体を発見し、此等のグアニジン体が幽門垂内に於て生成せられることを発見したので、幽門垂の生化学的研究の一端として結果の一部を茲に報告する。

II. 実験方法

グアニジン体に関する渋谷⁴⁾氏の研究によるとグリシンはアムモニアと活性炭との存在に於てグアニジン化を起すことを見ているので、活性炭吸着法を応用した著者の実験に於ても操作及び活性炭処理時間等も充分に吟味した。

(1) 濾紙クロマト法 一般法に従い、展開剤としてはブタノール・醋酸・水 (4:1:1) とブタノール・醋酸・ピリジン・水 (4:1:1:2) の二種類を用いた。又呈色は坂口反応とニトロプルシッドナトリウムによる反応を用いた。即ち前者は展開を終り乾燥した濾紙に先ず α -ナフトールの 0.1% アルコール溶液と 20%

尿素溶液の等量混液を噴霧したる後更に5%次亜臭素酸ソーダ液を噴霧するとグアニジン体は赤色のスポットとして顕われる。後者の方法はニトロプルシッドナトリウム、フェリシアン化カリ、カセイソーダ（何れも10%水溶液）の等量混合液を水で3倍に稀釈したものを噴霧すれば、橙黄色のスポットとして顕われる反応である。

(2) 試料 枕崎市に陸揚げされた直後の最も新鮮なカツオから摘出した幽門垂を細目の金網で濾し、適量の水を加えて煮沸後その濾液を減圧濃縮したエキスにつき次の様な処理を施して試料とした。なお試料調製の際特に留意を要するのは、用いた試薬類或は操作によるグアニジン体の新生である。前記渋谷氏等の研究結果を考慮し、本実験に於ては活性炭の活性化は勿論のこと精製した活性炭と試料との接触時間を極力短縮することに留意した。

処理 1: 上記試料エキス 5g に水 100cc を加えて溶解し、不溶物（主としてチロジン）を濾別した後塩酸性に於て減圧濃縮乾固した。これを試料 No. 1 とする。

処理 2: 試料エキス 5g より上と同様に不溶物を除きその溶液を弱塩基性(pH 約 7.8)とし活性炭 1g を加えて沸騰浴上に 10 分間加熱し、20 分間振盪した後吸引濾過し、濾液には再び 1g の活性炭を加えて上と同様に処理する。此の操作を 4 回繰返すとエキス中のグアニジン体は殆んど活性炭に吸着され、濾液は坂口反応もニトロプルシッド反応も呈しなくなる。此の際 2 回の活性炭処理によつて坂口反応のみ陰性となつたがニトロプルシッド反応は陽性であつた。この原因としては吸着によるグアニジン体の漸減、ヒスチジン等坂口反応阻害物質の影響等が考えられるが、このほかに或る種のアミン、尿素等グアニジン体以外にもニトロプルシッド反応陽性の物質が存在することも予想されるので、これも亦ニトロプルシッド反応が濾液に永く残る原因ではないかと思われる。然し何れにしても 4 回の活性炭処理により両反応共に陰性となつた。次にグアニジン体を吸着せしめた活性炭を冷水を以て洗液にニンヒドリン反応、デアゾ反応が認められなくなるまで洗滌する。洗滌を終つた吸着炭に N/10 硫酸 100cc を加えて室温で 10 分間振盪した後遠心分離し此の操作を浸出液が坂口反応陰性となるまで反覆し、約 1500cc の浸出液を得た。これから硫酸をバリタで除き過剰のバリタを炭酸ガスで除いた後、減圧下に濃縮乾固した。なお此の濃縮は炭酸酸性又は塩酸酸性に於て行ふよう留意した。かようにしてえたものを試料 No. 2 とする。

処理 3: 処理 2 に於ては吸着されたグアニジン体を活性炭から溶離するのに硫酸を用いたが、硫酸を用うるとその精密な中和に相当長時間を要し、且つその後の濃縮操作に於て溶液を酸性に保つため塩酸添加の必要が起つて来る。此等の不便を除くため約 4% の塩酸を用いて溶離を試みた所、N/10 硫酸と同じ程度の抽出能があることが解つた。依つて塩酸による溶離液約 500cc を中和することなくそのまま減圧濃縮乾固して試料とした。なお比較的多数のグアニジン体が存在する場合には一次元クロマト法で検出することは不確実を招くので、一旦乾固した試料を無水アセトンで抽出し可溶部（試料 No. 3）と不溶部（試料 No. 4）に分けて見た。

処理 4: 処理 2, 3 に於て溶離に硫酸又は塩酸を用うるとそのために多量の酸類を要するだけでなく長時間を必要とするので、ストレプトマイシン抽出の場合の如く 15% アセトン水(塩酸で pH 2.0 に調節)を用いて溶離を試みた。即ち処理 2 と同様に操作した活性炭に 25cc の 15% アセトンを加え約 5 分間振盪後濾過する。この操作を 4—5 回反覆すればグアニジン体は殆ど完全に溶離された。なお此の場合の溶離液は前の場合と異り可成り濃厚な褐色を呈していた。これを試料 No. 5 とする。

処理 5: 同様な目的で SANDERS⁵⁾ の行つた方法、即ち酸性アルコール (N/10 硫酸のアルコール溶液又は N/10 塩酸のアルコール溶液) で溶離する方法を試みたが、上のアセトンの場合と同様好結果を得た。この処理でえた試料を No. 6 とする。

II. 実験結果

以上の各操作を施した試料について濾紙クロマトグラフィーを行つた結果は Table 1 の通りで、極めて新鮮な幽門垂のエキスを試料とした場合と、同一の幽門垂を約 1 ヶ月間冷蔵庫予備室 -4°C に貯蔵して置い

Table 1-a. Existence of guanidine compounds in the extract prepared from fresh pyloric coeca of skipjack.

Guanidine compounds	Rf value		Sample No.					
	*1	*2	1	2	3	4	5	6
	B. A	B. A. P						
Methyl guanidine	0.60	0.65	—	—	—	—	—	—
Arginine	0.37	0.47	—	—	—	—	—	—
Agmatine	0.27	0.35	—	—	—	—	—	—
Octopine	0.18	0.21	+	+	+	+	+	+
Glycocyamine	0.09	0.10	+	+	+	+	+	+
Unknown	0.29	0.32	—	—	—	—	—	—
	0.00	0.00	—	—	—	—	—	—

Table 1-b. Existence of guanidine compounds in the extract prepared from the one month-stored pyloric coeca of skipjack at -4°C.

Guanidine compounds	Rf value		Sample No.					
	*1	*2	1	2	3	4	5	6
	B. A	B. A. P						
Methyl guanidine	0.60	0.65	—	+	+	—	+	+
Arginine	0.37	0.47	—	+	+	—	+	+
Agmatine	0.27	0.35	+	+	+	+	+	+
Octopine	0.18	0.21	+	+	+	+	+	+
Glycocyamine	0.09	0.10	+	+	+	—	+	+
Unknown	0.07	0.32	—	+	+	—	+	+
	0.00	0.00	+	+	+	—	+	+

* 1. B. A : Butanol : Acetic acid : H₂O (4 : 1 : 1)

* 2. B. A. P : Butanol : Acetic acid : Pyridine : H₂O (4 : 1 : 1 : 2)

Note: For color development on the paper Sakaguchi's reaction and Weyls' reaction were used. Sampling: The sample was prepared by the following method.

Sample 1. After the insoluble matter in the pyloric coeca extract being filtered, the filtrate was condensed under reduced pressure.

Sample 2. The pH of extract was brought to 7.8, and guanidine compounds in the extract were absorbed on animal charcoal; then the absorbed guanidine compounds were eluted with N/10 H₂SO₄ solution.

The eluted substance was condensed after being removed H₂SO₄ by baryta.

Sample 3 and 4. In order to elute the guanidine compounds from animal charcoal N/10 HCl was used in the place of N/10 H₂SO₄; and the separated solution was condensed into the parched conditions. The dried sample was divided into two fractions; acetone soluble one (sample 3) and insoluble one (sample 4).

Sample 5. From the above-mentioned charcoal adsorbate, guanidine compounds were eluted by 15 % HCl acetone solution (pH being ranged to 2.0) and those compounds were condensed under reduced pressure.

Sample 6. As the solvent ethyl alcoholic HCl (N/10) solution was used in the place of acetone solution.

たものでは相異なる結果を得た。

IV. 考 察

Table 1に見られるように新鮮な幽門垂エキスを検出されるグアニジン体はアルギニンとオクトピンの二種に過ぎないが、約1ヶ月冷蔵庫(約-4°C)に貯蔵したものではTable 2に見られるように多くのグアニジン体が検出された。此等が活性炭処理によつて新生したものでないことは極めて新鮮な幽門垂エキスを活性炭で同一処理したものについても何等グアニジン体の種類に変化がなかつたことからほぼ確かであるが、細菌の作用により二次的に生産されたものか幽門垂の機能の中に斯かる酵素が存在するものかは本研究の範囲では解らない。何れにしてもこれまで魚体内に極めて稀にしか検出されていない多数のグアニジン体が動物組織の中で或る化学変化によつて生成されることは一応注目に値するものと思う。更に今一つ興味のあるのは幽門垂の中に甚だ多数のグアニジン体が検出されるという事柄である。自然界に於けるグアニジン体の分布を調べた前記牧角氏の研究に於ても一生物体組織に検出されるグアニジン体は多くの場合1, 2種に限られ、それも殆んどアルギニンとオクトピンであり、そのほかこれ迄の研究結果を見ても例えばメチルグアニジンがフカ、タラ、カツオ、スケソウダラ、その他陸上動物に、アルカインが二枚貝 Arca noae に、アグマチンが魚類の精巢に検出されている程度で、実験方法自体に長足の進歩があつたにしても幽門垂のように多種類のグアニジン体が一組織に検出された例は他に殆んど見当らぬ様である。その生成機構、又事実幽門垂内で上記の様な変化が正常状態で起るものであるか、幽門垂内に於てのみ見られる現象であるか等は

何れも今後の研究問題であるが、本報告は以上の現象の認められた実験結果の発表に止めることとする。

なお実験操作の点で、渋谷氏の行つた活性炭吸着法は天然物からグアニジン体を分離濃縮する方法として良好な結果を与えること、又著者の行つた方法ではそれによつてグアニジン体を新生する等のことは全く認められぬことを附記する。吸着せられたグアニジン体を活性炭から溶離するには有機溶媒（アセトン又はアルコール）と酸との混合液を用うのが能率的にも又操作の簡易という点からも勝れていることが分つた。発色剤についてはあまり問題は起らなかったが、幽門垂エキスを於ては坂口反応は陰性でもニトロプルシットソーダ反応では強い陽性を示す場合があるので確実を期するためには本研究の如く両者を併用する事が望ましい。

V. 摘 要

1. カツオ幽門垂エキス中に存在するグアニジン体を濾紙クロマトグラフ法により試験した結果、新鮮な幽門垂に於てはアルギニン、オクトピンの二種を検出した。

2. 然るに同じ幽門垂を -4°C で約1ヶ月間冷蔵した後調製したエキスを於てはアルギニン、オクトピンの外にアグマチン、アルカイン、メチルグアニジン、グリコチアミンの合計6種のグアニジン体が検出された。

本研究に当り貴重なる文献を貸与せられ且グアニジン体の同定に援助々言せられた九州大学理学部有機化学教室の牧角啓氏、実験の直接指導をせられた本学教授柏田研一氏に対し深甚の謝意を表する次第である。

VI. 文 献

- 1) 大戸敬二郎：日化 **74**, 1 (1953).
- 2) 牧角啓：日化 **73**, 737 (1952).
- 3) 小幡彌太郎, 飯森正秀：日化 **73**, 832 (1952).
- 4) 渋谷真一：J. Biochem., **35**, 379 (1942).
- 5) J. A. SANDERS. Biochem. J., **26**, 801 (1932).