353. 村岡三郎, 高木康史: カナバニン及びアルギニンの分別定性及び定量について

Saburo Muraoka and Yasushi Takagi: Detection and Determination of Canavanine and Arginine from Biological Materials.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto)

著者らはアミノ酸拮抗物質の研究に際して, 種々の代謝物質を含む微生物の培養液からカナバニンとアルギニンを分別定性及び定量する必要にせまられたので, 従来のカナバニン, アルギニンについての分析法を検討するとともに新たにバッファード濾紙クロマトグラフィー, 濾紙電気泳動法, イオン交換樹脂及び微生物定量法などを応用してほぼ目的を達した。

一次元ペーパークロマトグラフィーによるカナバニンとアルギニンの分離検出はすでに牧角¹⁾ によつて報告されているが, この方法では両者の Rf 値が近似して判定が困難であるので, 著者らは次のバッファード濾紙クロマトグラフィー及び濾紙電気泳動法を応用した。

バッファード濾紙クロマトグラフィー アルギニン (等電点 pH 10.8) とカナバニン (等電点 pH 8.2) の等電点の差を利用して, Levy²⁾ らの方法を参照してバッファード濾紙クロマトグラフィーを行つた結果 Rf 値はアルギニン 0.83, カナバニン 0.69 となり容易に分離検出することができた (Table I). なお表中には牧角法を一次元上昇法ペーパークロマトグラフィーで著者らが追試した結果をも附記する。ニトロプルシット・フェリシアンカリ混液で両物質とも紫色に発色するので呈色には, この反応を主に用いたが, アルギニン単独の場合は坂口反応によつた。

Table I

Solvent	Rf value		
	Canavanine	Arginine	
Phenol+borate buffer	0.69	0.83	Author
Butanol+pyridine+HAc	0.19	0.21	Makizumi
Butanol+HCl	0.15	0.18	Makizumi

Fig. 1

濾紙電気泳動法 pH 8.6 のペロナル・バッファを用いる濾紙電気泳動法で, アルギニンとカナバニンは Fig. 1 に示すように簡単に分離できる。

微生物の培養液の中には後にのべるように坂口反応やニトロプルシット反応を不鋭敏にする物質が存在し, アルギニン, カナバニンを検出するのに培養液そのままについて上記反応を行えない。濾紙電気泳動法かバッファードクロマトグラフィーによつてこの二つの物質を分離して後呈色せしめれば好結果をおさめえる。実際には濾紙電気泳動法が単時間で操作できて便利であるが, 正確に物質を固定したい場合はペーパークロマトグラフィーによるのがのぞましい。

カナバニンとアルギニンの分別定量 カナバニンの定量については Archbald³⁾ のニトロプルシットを用いる比色法がある。しかしこの際の呈色は中性アミノ酸の共存によつて妨げられ, 微生物の培養液中からの定量には応用できなかった。従つて以下にのべるのは主としてカナバニン共存下におけるアルギニンの定量である。

i) 坂口反応によるアルギニンの定量に及ぼす他物質の影響: 北川は α-ナフトールと次亜塩素酸ナトリウムを

1) 牧角: 日化, **73**, 737 (195).

2) A. L. Levy, David Chung: Anal. Chem. **25**, 396 (1953).

3) R. M. Archbald: J. Biol. Chem. **165**, 168 (1946).

用いる坂口反応ではカナバニンもアルギニンと同様に呈色することを認めたが⁴⁾、著者らは次亜臭素酸ナトリウムを用いればカナバニンは呈色せず、またカナバニンの共存はアルギニンの呈色を妨げないことを知った (Fig. 2 曲線 1 及び 2)。なお8-オキシキノリンを用いる坂口氏改良法⁵⁾に準じた場合も上と同様の結果をえた。次にブドウ糖添加の影響を検したが、アルギニンの呈色はブドウ糖の共存で妨げられた (Fig. 2 曲線 3)。また、坂口反応はブドウ糖以外の還元性物質によつても、また2価金属イオンによつても呈色が妨げられるのを経験したので生物学的試料そのままについて坂口反応を適用することは多くの場合適当でない。

Fig. 2. Effect of Glucose and Canavanine on the Colorimetric Determination of Arginine

1. L-Arginine·HCl
2. L-Arginine+canavanine (100 γ /cc.)
3. L-Arginine+glucose (1%)

Fig. 3. Effect of Canavanine on the Microbiological Assay of Arginine *St. faecalis* R (24 hrs. 30°)

1. L-Arginine HCl
2. L-Arginine HCl+20 γ /cc. Canavanine
3. L-Arginine HCl+100 γ /cc. Canavanine

ii) *Streptococcus faecalis* を用いる微生物定量法: *St. faecalis* を用いるアルギニンの微生物定量は Snell⁶⁾ 並びに著者の1人村岡⁷⁾ による報告を合せ考えると、オルニチン、チトルリン、アグマチン、アルカリン、オクトピンの共存によつて影響されない。また、*St. faecalis* はカナバニンによつて増殖抑制されない⁸⁾ので、カナバニン共存下のアルギニンの定量を試みた。その結果は Fig. 3 に示すが、カナバニンの共存によつて増殖の stimulation が見られ、アルギニンの正確な定量値をえにくい。しかしこの微生物定量法では他の代謝物質で妨げられないので同量のカナバニンが混在しているようないくつかの試料どうしについて、それぞれの中アルギニンの量を相対的に概略的に比較するときには応用できる。このような要求には拮抗物質の研究の際しばしば遭遇する。

iii) アルギニン脱炭酸酵素: アルギニンは *Escherichia coli* 7020 または No. 1 によつて定量的に脱炭酸されるので、この方法は Gale⁹⁾ らによつてアルギニンの定量に応用されている。著者らは *E. coli* No. 1 のアセトン乾燥菌を作成し、Gale の条件にしたがつてアルギニン及びカナバニンにそれぞれ作用させた結果、アルギニンは殆んど 100%、カナバニンは 76% 分解された。すなわち本法ではアルギニンとカナバニンの総量についての概略値をえるのみで両者の分別定量はできない。増殖実験ではアルギニンに対して拮抗的に作用するカナバニンが脱炭酸酵素によつてアルギニンと同様に作用をうけることは興味あることでこの分解の機構については別に発表する。

iv) イオン交換樹脂による分離: Amberlite IRC-50, IRA-400 を用いて両物質の分離を試みた。カチオン交換樹脂 IRC-50 では pH 8.0 でアルギニンは樹脂に吸着されカナバニンはそのまま流出してくるので両物合を分離することができた。アニオン交換樹脂 IRA-400 ではその逆にカナバニンのみ吸着させることができた。

以上カナバニン共存下におけるアルギニンの定量について要約すると、微生物の培養濾液などについては坂口

4) 北川, 高荷: 農化, **11**, 1077 (1935).

5) Syoyo Sakaguchi: J. Biochem. (Japan). **38**, 91 (1951).

6) Volcani, Snell: J. Biol. Chem. **174**, 893 (1948).

7) 鈴木, 村岡: 本誌, **72**, 1405 (1952).

8) 鈴木, 村岡: 本誌, **75**, 534 (1951).

9) E. F. Gale: Biochem. J. **41**, vii-ix (1947).

反応の呈色は妨げられやすい。また *St. faecalis* を用いる微生物定量法ではカナバニンによつて stimulation され相対的な値しかえられないが、目的如何によつては適用できる。著者らは *Staphylococcus aureus* によるアルギニンの up-take の状態をしらべる際に、カナバニンの共存する培地からアルギニンの減少する量を *St. faecalis* を用いる微生物定量法で相対的ではあるが測定することができた¹⁰⁾。

なお、更に正確な定量値をえるためにはイオン交換樹脂による分離操作と上記の種々の方法との併用が考えられるが、将来適当な生物学的試料について種々の検討を加えたい。

終りに本研究に当り終始御懇切な御指導を賜つた鈴木教授に深謝する。

実 験 の 部

バッフアード・クロマトグラフィー 2 cm 巾の沓紙を硼酸緩衝液 (pH 9.3) で湿らし、乾燥後一次元上昇法で行つた。溶媒は 50 g のフェノールに 7 cc の硼酸緩衝液を加えたもの 8 cc を硼酸緩衝液 250 cc に加えたものである。

なお、沓紙上における呈色は坂口反応¹¹⁾、ニトロプルシット-フェリシアンカリ¹²⁾法を用いた。

沓紙電気泳動法 鈴木, 前川¹¹⁾の装置を用い、ペロナール緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.1$) で 90 分泳動させた。なお、電流は沓紙巾 1 cm あたり 1 mA ながれるように調節した。

微生物定量法によるアルギニンの定量 *Streptococcus faecalis* R を使用し、基礎培地、接種菌、培養条件などは全く鈴木, 村岡⁷⁾の報告と同一にした。

坂口反応 Jorpes-Thoren¹³⁾による α -ナフトールと次亜臭素酸ナトリウムを用いる方法で呈色させた後、光電比色計で 500 m μ で比色した。

アルギニン脱炭酸酵素の調製 Gale⁹⁾の方法により *Escherichia coli* No. 1 のアセトン乾燥菌を作成し、アルギニン又はカナバニンの分解によつて発生する CO₂ を Warburg 検圧計を用いて測定した。

イオン交換樹脂によるアルギニン、カナバニンの分離 Amberlite IRC-50 の場合は Kunin¹⁴⁾の方法により pH 8.0 の磷酸緩衝液で緩衝化した後、また Amberlite. IRA-400 は 4% 水酸化ナトリウムで処理した後アルギニンカナバニンの標品の等量混液を通過させた。定量はカナバニンの場合はニトロプルシッド法により、アルギニンの場合は坂口反応によつた。

京都大学医学部薬学科

Summary

Canavanine is used in biological experiments as an antimetabolite of arginine but suitable method has not been found for separatory detection of these two substances in a sample. It has been found that good results can be obtained in this direction by coloration after separation of the two substances by paper electrophoresis in Veronal buffer (pH 8.6) or by buffered chromatography with phenol and borate buffer (pH 9.3). The colorimetric determination of canavanine in the presence of arginine³⁾ was found to be impossible in a biological system because of an obstruction by metabolites but a few knowledge were gained on the determination of arginine in the presence of canavanine. For example, the determination of arginine by the Sakaguchi reaction can be freed from the influence of canavanine if hypobromite is used but coloration is interfered by the presence of a reductive substances such as glucose. Microbiological assay using *Streptococcus faecalis* R is not affected by the growth inhibition of canavanine nor by other arginine homologs but stimulation of growth by canavanine appears and the determination values obtained are only relative. Separation of canavanine and arginine was effected by the use of an ion exchanger, Amberlite IRC-50 or IRA-400.

(Received August 16, 1954)

10) 村岡, 高木: 本誌, **74**, 1338 (1954).

11) 鈴木, 前川: 本誌, **71**, 1298 (1951).

12) 北川, 山田: 農化, **8**, 1135 (1932).

13) E. Jorpes, S. Thoren: Biochem. J. **26**, 1504 (1932).

14) J. C. Winters, R. Kunin: Ind. Eng. Chem. **41**, 461 (1949).