

## エルゴチオネインの新定量法について

藤井 實・増田 篤子・加茂 靖子

(生物化学研究室)

昭和52年4月30日 受理

### A New Method for Determination of Ergothioneine

Minoru FUJII, Atsuko MASUDA and Yasuko KAMO

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received April 30, 1977

#### Summary

Ergothioneine reacted with alloxan on heating for 6 minutes at 30°C at pH 7.4. The reaction product exhibited its absorption maximum at 265 nm. When the ratio of ergothioneine to alloxan in cocentration was less than 0.01, the optical density at 265 nm was proportional to the concentration of ergothioneine.

In order to determine ergothioneine in the extract from tissues, it is necessary to remove nucleic acids (DNA and RNA) and L-ascorbic acid, which interfere with the measurement of the optical density at 265 nm. Nucleic acids (DNA and RNA) and L-ascorbic acid were completely adsorbed on Dowex 1×2. The adsorption coefficient of ergothioneine on Dowex 1×2 was constant. Therefore, this treatment with Dowex 1×2 is possibly used for the determination of ergothioneine in the extract from tissues.

#### 緒 言

エルゴチオネイン (ESH)<sup>1)</sup> は 258nm の波長に極大吸収<sup>2)</sup> を示す物質である。著者等は ESH にアロキサンを添加したところ、その反応生成物の極大吸収は 265nm に移動し、その吸光度は ESH の濃度に比例する事実を知った<sup>3)</sup>。そこでアロキサンを使用して ESH の新しい定量法を案出しようとして企てたが、265nm に極大吸収を示す物質としては核酸 (DNA, RNA)、その関連物質であるヌクレオチド類およびアスコルビン酸等があり、特にこれらの物質は生体組織中に常に存在するものであるため、これらを除去する必要がある。その除去方法について攻究した結果、満足すべき測定結果を得ることができた。

#### 実 験 方 法

##### 1. 試料の調製

###### 1-1 試 薬

エルゴチオネイン (ESH)

Sigma 社製ならびに Fluka A. G. 社製を使用し、その 10<sup>-2</sup>M 溶液を作り、適当に希釈して使

用した。

DNA

ニシンから得られたもので Sigma 社製品を使用した。

RNA

酵母トルラから得られたもので、片山化学工業社製品を使用した。

DNA, RNA 共に pH 6.5 の Kolthoff 緩衝溶液に溶かして使用した。

1-2 樹脂 Dowex 1×2 の調整

樹脂を水洗した後、1N 苛性ソーダ溶液 1l で15分間洗った後、充分に水洗し、つぎに 2N 塩酸溶液 1l で20分間洗った。さらに水洗し、pH が5 前後になってから、ふたたび 1N 苛性ソーダ溶液 1l で15分間洗い、つぎに水洗して pH が7 前後になってから pH 6.5 の Kolthoff 緩衝溶液で緩衝化した。そして Dowex 1×2 分散液 15~20ml が樹脂を乾燥物として約 2.2g 含むように調整した。

## 2. エルゴチオネインの標準曲線の作成

ESH がアロキサンと反応する場合、アロキサンの 100 に対し ESH が1 以下のモル比の場合に ESH-アロキサン複合体の示す吸光度を 265nm の波長で測定すると、ESH の濃度に比例するという事実<sup>3)</sup> から、46, 92, 138 および 184 $\mu$ g の ESH を含む溶液 1ml にそれぞれ pH 7.4 の Kolthoff 緩衝溶液 9ml, 蒸溜水 1ml, さらに 0.1M アロキサン溶液 1ml を添加し、全溶液量を 12ml とし、30°C に6分間加熱し、その後常温に10分間放置し、それぞれ 265nm における吸光度を測定した。ブランクとして試料の代りに上記と全く同一に処理して吸光度を測定した。

図1は標品の標準曲線で、この図で示される通り、反応混合物中の ESH 量が 184 $\mu$ g までは ESH とアロキサンとの反応生成物による O. D.<sub>265</sub> と ESH 量との間に比例的關係がみられた。

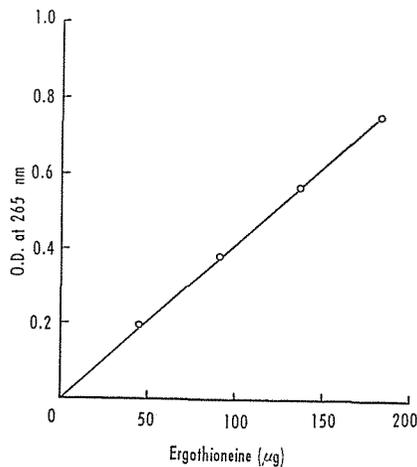


Fig. 1 Standard Curve of Ergothioneine

## 実験結果

1. DNA, RNA, ヌクレオチド類, L-アスコルビン酸 (AsA) および ESH の Dowex 1×2 への吸着

1-1 DNA, RNA および ESH の Dowex 1×2 への吸着におよぼす pH の影響

Table 1 Effect of pH on Adsorption of Nucleic Acids (DNA and RNA) and Ergothioneine on Dowex 1×2

a) DNA: 500 $\mu$ g				
pH	6.0	6.5	7.0	8.0
Adsorption (%)	93.2	94.4	91.6	93.8
b) RNA: 500 $\mu$ g				
pH	6.0	6.5	7.0	8.0
Adsorption (%)	97.8	99.3	93.7	91.2
c) ESH: 2293 $\mu$ g				
pH	6.0	6.5	7.0	8.0
Adsorption (%)	28.3	24.5	25.2	36.6

Table 2 Adsorption of Nucleic Acids and Ergothioneine on Dowex 1×2 at pH 6.5, 25°C and 70°C

Sample	DNA (500 $\mu$ g)	RNA (500 $\mu$ g)	ESH (2293 $\mu$ g)	
Adsorption (%)	25°C	97.5	98.0	23.1
	70°C	100	100	9.7

すでに活性化された樹脂の一定量をそれぞれ6, 6.5, 7および8の pH に調整し, 500 $\mu$ g の DNA, 500 $\mu$ g の RNA および 2293 $\mu$ g の ESH を加えて数分間攪拌し吸着処理を行なった。それらの混合物を濾過し 25ml に定容した。そして濾液について, DNA, RNA は 260nm で, ESH を 265nm でアロキサン法によってそれらの吸光度を求めた。

それらの実験結果は表 1 a) b) c) にまとめられている。これらの結果から, DNA および RNA は pH 6.5 で最もよく吸着され, その吸着率は90%以上を示した。これに反して ESH はいづれの pH においても吸着率が小さく, 特に pH 6.5 では最も吸着されにくかった。

#### 1-2 DNA, RNA および ESH の Dowex 1×2 への吸着におよぼす温度の影響

DNA, RNA および ESH の Dowex 1×2 への吸着実験を pH 6.5 で, 25°C と 70°C で行なった。

その結果を表 2 に示す。

表 2 で示されるように吸着処理時の温度を 70°C にして10分間攪拌すれば, DNA, RNA は共に100%の吸着率を示した。これに対し ESH の吸着率は DNA, RNA の場合とは逆に高温では減少して約10%となった。これらの結果は DNA, RNA の除去を行なって ESH の測定を行なう場合, 70°C に加温することが好結果をもたらすことを示している。

#### 1-3 ヌクレオチド類の Dowex 1×2 への吸着におよぼす温度の影響

DNA, RNA の関連物質としてヌクレオチド類が生体抽出物中に混在することは当然考えられる。ヌクレオチド類のなかで 265nm に強い吸収を示すものとして, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP および 5'-UMP が挙げられる。そこで 500 $\mu$ g の各種ヌクレオチドを含む試料溶液について前記

と同じ条件でそれらの Dowex 1×2 への吸着率を測定した。それらの結果を述べると、5'-AMP は Dowex 1×2 に100%吸着された。また 5'-CMP, 5'-GMP および 5'-UMP もそれぞれ96%以上吸着された。

#### 1-4 L-アスコルビン酸 (AsA) の Dowex 1×2 への吸着

AsA は 265nm に極大吸収を示す物質の1つであり、多くの試料中には常に存在する物質であるので、これを予め除去する必要がある。この場合、DNA, RNA の除去と全く同一条件下で AsA が Dowex 1×2 に完全に吸着されるか否かを調べた。種々の濃度の AsA 溶液 (100, 500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 1ml を用いて Dowex 1×2 への吸着を調べた。

その結果は表 3 に示されている。

Table 3 Adsorption of Various Amounts of Ascorbic Acid on a Given Amount of Dowex 1×2 at pH 6.5 and 70°C

AsA ( $\mu\text{g}$ )	100	500	1000
Adsorption (%)	100	100	97.0

この表の結果で明らかのように、一定量の Dowex 1×2 は AsA が 500 $\mu\text{g}$  までは100%の吸着率を示したが、1000 $\mu\text{g}$  になると97%に低下した。そこでさらに1000, 1500 および 2000 $\mu\text{g}$  の場合を検討したところ、1500 $\mu\text{g}$  までは97%, 2000 $\mu\text{g}$  になると吸着率はさらに低下して93%であった。

#### 1-5 一定量の Dowex 1×2 の DNA, RNA および ESH に対する吸着限界

測定時に使用する Dowex 1×2 が DNA, RNA および ESH を吸着する限界量を予め調べておくことは試料の処理上および ESH の定量の正確を期する上に重要である。そこで100, 200, 300 および 400 $\mu\text{g}$  の DNA と RNA, また 286, 573, 1146 および 2293 $\mu\text{g}$  の ESH を別々に一定量の Dowex 1×2 に加えて、pH 6.5 で 70°C という条件下で、DNA, RNA および ESH の Dowex 1×2 への吸着を調べた。

表 4 の a~c はその結果を示す。

Table 4 Adsorption of Various Amounts of Nucleic Acids (DNA and RNA) and Ergothioneine on a Given Amount of Dowex 1×2 at pH 6.5 and 70°C

##### a) DNA

DNA ( $\mu\text{g}$ )	100	200	300	400
Adsorption (%)	100	100	100	100

##### b) RNA

RNA ( $\mu\text{g}$ )	100	200	300	400
Adsorption (%)	100	100	100	100

##### c) ESH

ESH ( $\mu\text{g}$ )	286	573	1146	2293
Adsorption (%)	22.0	20.0	22.2	22.5

これらの結果から一定量の Dowex 1×2 は 400 $\mu$ g の DNA, あるいは RNA を100%吸着した。また ESH の場合には, 286~2293 $\mu$ g までの範囲でほぼ一定量の ESH が吸着された。

2. アロキサン法による ESH の定量法

分析試料溶液 10.0ml に粉末重炭酸ナトリウムを使用してその溶液の pH を 6.5 に調整する。

その溶液に Kolthoff 緩衝溶液 (pH 6.5) を加えて全容を 25.0ml とする。その中から 5.0ml を分取し, さらに pH 6.5 に平衡化しておいた Dowex 1×2 の分散液 15ml (乾燥樹脂量として 2.2g を含む) を加える。この混合分散液を 70°C で10分間ガラス棒を用いて攪拌する。その後, この混合分散液を濾過し, その濾液を集め, さらに Kolthoff 緩衝溶液 (pH 6.5) を加えて全容を 25.0 ml とする。その濾液を 1.0~5.0ml 分取し, 方法 2 に記した操作によってアロキサンと反応させ, ESH の定量を行なう。別に一定濃度の ESH 溶液について Dowex 1×2 への ESH の吸着量を求めることによって ESH の定量の補正を行なう。

いま試料として ESH (2293 $\mu$ g/ml) 1.0ml, DNA (100 $\mu$ g/ml) 2.0ml, RNA (100 $\mu$ g/ml) 2.0ml および AsA (500 $\mu$ g/ml) 1.0ml を含む混合溶液を用いて上記の ESH の新定量法の試験を行なった。その混合溶液 6.0ml に Dowex 1×2 分散液 15ml を添加して pH を 6.5 に調整し, 70°C に加熱してから10分間攪拌する。濾液を常温にしてから 25.0ml に定容する。その 1.0ml を使用しアロキサン法により吸光度を測定する (No. 1)。つぎに上記 ESH のみを試料として他は全く上記の同一条件で処理して吸光度を求める (No. 2)。さらに ESH のみの試料を Dowex 1×2 に対する吸着処理を行なうことなく直接にアロキサン法によってその吸光度を求める (No. 2')。ブランクとして, 試料の代りに緩衝溶液を試料と同量使用し, 他は全く同一条件で処理してその吸光度を求

Table 5 Determination of ESH in the Mixture of ESH, DNA, RNA and AsA

Sample No.	OD <sub>265</sub> Treatment of Dowex 1×2	OD <sub>265</sub> Nonc Treatment
1. Mixture*	0.347	—
2. ESH	0.317	0.381

\* The mixture contained 2293  $\mu$ g ESH, 200  $\mu$ g DNA, 200  $\mu$ g RNA and 500  $\mu$ g AsA

Calculation

Adsorption Coefficient (%) of Ergothineine

$$\frac{0.381 - 0.317}{0.381} = 16.80 (\%)$$

$$OD_{265} \ 0.347 \longrightarrow 84.63 \ \mu\text{g ESH}$$

(by Standard Curve)

True Value of ESH

$$84.63 \times \frac{100}{100 - 16.80} = 101.72 \ \mu\text{g ESH}$$

Theoretical Value

$$OD_{265} \ 0.381 \longrightarrow 92.93 \ \mu\text{g ESH}$$

(by Standard Curve)

Recovery of ESH

$$\frac{101.72}{92.93} \times 100 = 109.45 (\%)$$

める。

その結果を表5で示す。

No. 1 は DNA, RNA および AsA が混在するにも拘らず、樹脂処理後の吸光度は ESH のみの No. 2 に比べてやや高目を示したにすぎない。これは不純物質 (DNA, RNA, AsA) が樹脂によってほぼ完全に近く除去されていることを示している。また No. 2 および No. 2' の吸光度から樹脂による ESH の吸着率が算出されるが、この実験では16.8%であった。

No. 1=0.347 に対する ESH の値は標準曲線から求めて  $84.63\mu\text{g}$  となるので、上記吸着率から換算すると  $101.72\mu\text{g}$  が求める数値となる。標品 ESH を直接に測定して得た吸光度は0.381であり、これに対する ESH の値は  $92.93\mu\text{g}$  となるので、この理論値に対する実験値の回収率は  $101.72/92.93 \times 100 = 109.45(\%)$  であった。

## 考 察

エルゴチオネインの定量については種々の方法が発表されている。古くは HUNTER<sup>4)</sup> がジアゾ化したスルファニール酸を発色剤としてエルゴチオネインを定量したが、同じく赤色に呈色するグルタチオンやシステイン等により妨害を受け、またフェノール、ヒスチジン、尿素等も同発色剤と反応して発色するので妨害を受ける。LAWSON<sup>5)</sup> 等はエルゴチオネインをアルカリ分解して生じるチオールウロカニック酸がジアゾスルファニール酸で赤色を呈することに着目して定量法を発表しているが、チオールイミダゾール基をもつ化合物はすべて同様に赤色を呈するのでやはり使用上問題である。また JOCELYN<sup>6)</sup> はエルゴチオネインのアルカリ分解を行なって生じるトリメチルアミンをベンゼン・ピクリン酸塩として捕捉し、その色を比色定量する方法を案出した。この方法は装置の操作がかなり煩雑である上に、かなり多量のエルゴチオネインを必要とし1mg以下の測定はできない。

著者等の案出したアロキサン法はエルゴチオネインが  $184\mu\text{g}$  の場合、約0.75の吸光度、 $25\mu\text{g}$  の場合でもその吸光度は0.11を示すので、JOCELYN 法の約40分の1程度の微量エルゴチオネインの測定が可能である。

チオール化合物のうち、アロキサンとグルタチオンの反応生成物は305nmに極大吸収を示すし、システインのそれは全く極大吸収を示さないので両者とも何ら妨害とならない。またチオウレアは HEATH<sup>7)</sup> によれば、240nmに極大吸収を示すし、エルゴチオネインのアルカリ分解産物であるチオールウロカニック酸<sup>8)</sup> は314nm付近に極大吸収を示すので、いずれもエルゴチオネイン・アロキサン複合体が265nmで示す極大吸収値には何らの影響も与えない。

## 総 括

著者等はエルゴチオネインが pH7.4, 30°C で6分間加温するとアロキサンと反応して265nmの波長に極大吸収を示し、アロキサンに対するエルゴチオネインの濃度が100分の1以下の条件下、エルゴチオネインの吸光度はその濃度に比例するという事実を知った。

この事実を利用して試料中に混在する核酸やその関連物質、アスコルビン酸を樹脂 Dowex 1×2 によって完全に除去した後、アロキサン法を用いてエルゴチオネインを測定する方法を案出した。

## 文 献

- 1) JOCELYN, P. C. *Biochemistry of the SHI Group* (1972) p. 8 ACADEMIC PRESS LONDON, NEW YORK.
- 2) THE MERCK INDEX (1960) p. 411 Seventh Edition Published by MERCK A. CO., INC. U. S. A.
- 3) 藤井 實・平野成孝・泉外嘉雄・古屋友喜：佐賀大学農学叢報, **36**, 95-102, 1974.
- 4) HUNTER, G.: *Biochem. J.* **22**, 4, 1928.
- 5) LAWSON, A., MORLEY, H. D. and WOOLF, L. I.: *Nature* **167**, 82, 1951.
- 6) JOCELYN, P. C.: *Biochem. J.* **70**, 656, 1958.
- 7) HEATH, H. and TOOENNS, G.: *Biochem. J.* **68**, 204, 1957.
- 8) KELLY, B. and APPLEMAN, M. D.: *J. Bact.* **81**, 715, 1969.