

[資 料]

尿中 3-Methylhistidine の測定法とその利用

芳田 哲也*・井川正治**・森田恭光***
宮島俊名****・北 博正*

(昭和 59 年 6 月 1 日受付)

A Analysis and Application of 3-Methylhistidine in Urine

Tetsuya YOSHIDA, Shoji IGAWA, Yasumitsu MORITA,
Toshina MIYAJIMA and Hiromasa KITA

はじめに

3-Methylhistidine (*N*^ε-Methylhistidine, 以下 3-Me と略す) は, 骨格筋蛋白質中に微量に存在し^{1),4)}, 筋蛋白質崩壊後放出された 3-Me は再利用, 再吸収を受けずに尿中に排泄される⁷⁾ ことから, 筋蛋白質崩壊の指標として用いられている⁸⁾。

3-Me の分析は従来アミノ酸分析計で行なわれているが⁵⁾, アンゼリン, 3-Me, ヒスチジンなどの分離が十分でないために分析精度が低く, イオン交換クロマトグラフィーを用いても 200 分程度の分析時間を必要としていた。そこで Wassner⁶⁾ らは検体を蛍光誘導体化し, 高速液体クロマトグラフィーを用いて溶出液の濃度勾配を利用した方法を考案した。さらに飯島³⁾ らは Wasnner らの方法で単一溶出液を用いても 3-Me の分析が可能で, 分析時間も 10 分程度に短縮できることを報告した。

本研究は飯島³⁾ らの方法に若干の改変を加え, 分析精度の高い 3-Me の分析が可能であったので報告する。さらに減量時における尿中 3-Me の変動を追跡し, 体育の場における 3-Me の利用についても検討を加えた。

方 法

1. 試薬

標品の 3-Me, His (ヒスチジン) は Sigma 社製, 標準アミノ酸混合液は和光純薬製の B 型を用いた。蛍光修飾薬は日本ロッシュ社製のフルラムを使用した。

2. 分析機器

分析機器は島津製作所製, 高速液体クロマトグラフィー (LC-3A, CTO-2A, FLD-1, R2AX) を用い, 分離カラムは飯島³⁾ のもの (Zorbax BP-ODS 4φ×25 cm) とは別の Nucreosil C₁₈ (4φ×25 cm, 日本クロマト工業製) を使用した。

また蛍光検出器 (FLD-1) の波長は 360 nm であり, 定量計算は面積比によって行なった。

3. 分析手順

尿を水で 10 倍に希釈して, その 1 ml に 50% スルホサリチル酸溶液 100 μl を加えて除蛋白 (5000 rpm, 30 分間) し, 上清を試料とした。

試料 100 μl を 3 ml 容耐熱試験管に取り, 250 μl の 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 12.2), ついで 250 μl のフルラム溶液 (170 mg/100 ml アセトニトリル) を加えて混和し, 5 分間放置の後 40 μl の 60% 過塩素酸を加えて密封し, オイルバスにて 80°C で 1 時間加熱した。加熱終了後, 室温まで冷却し, 100 μl の 0.5 M-3-(*N*-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (3 M 水酸化ナトリウム溶液) を加え, この 10 μl をマイクロシリンジ (10 μl 用) を用いて高速液体クロマトグラフに注入した。

溶出液は 27.5% アセトニトリル-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を毎分 0.6 ml で流した。

4. 検量線

3-Me の検量線は, あらかじめ作製した濃度が既知の 3-Me/0.1 N HCl 溶液 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5

* 体力学研究室, ** トレーニングセンター, *** 衛生学研究室, **** 健康管理学研究室

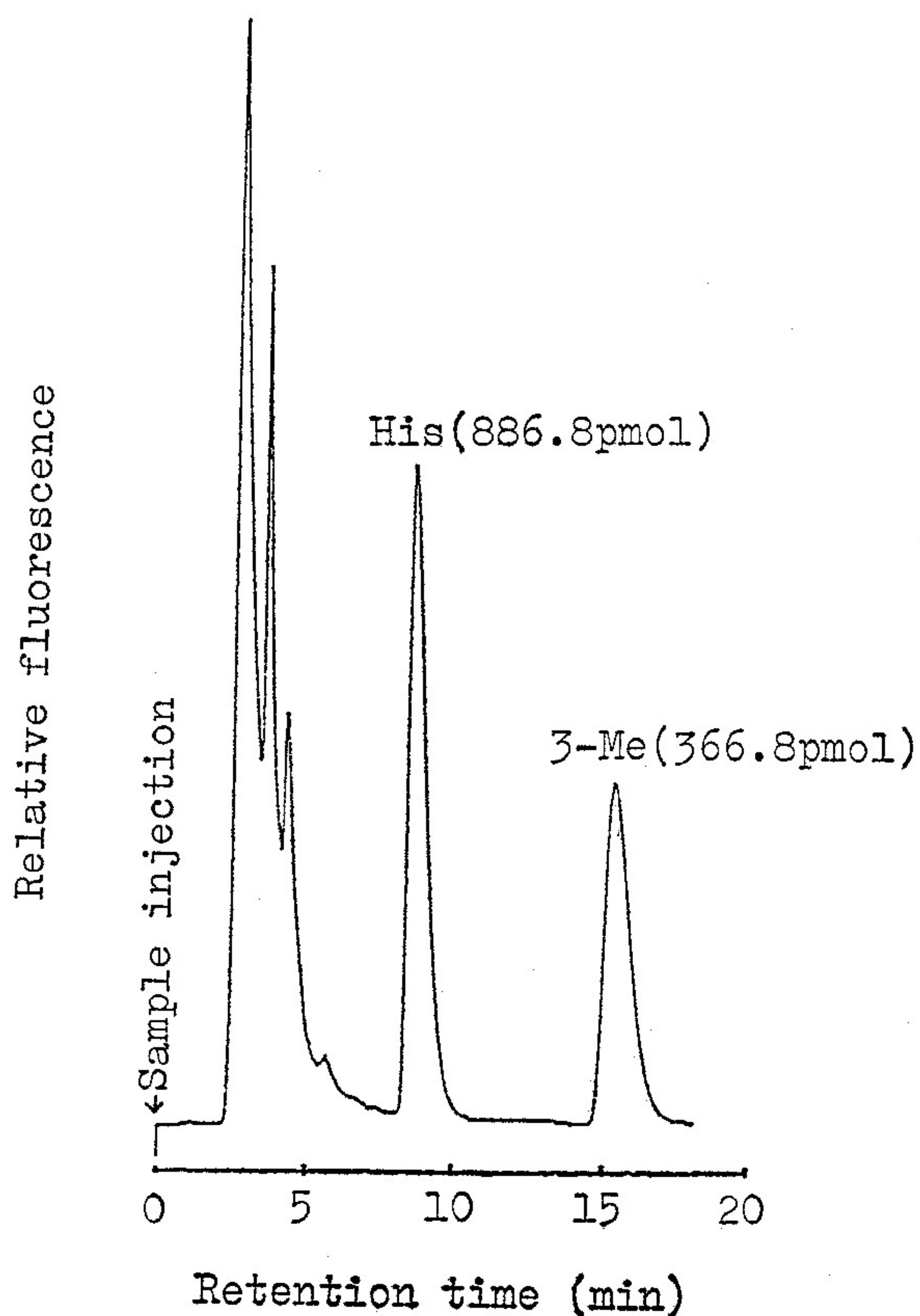


Fig. 1. Chromatographic traces of 3-methylhistidine (3-Me) and histidine (His) derivative from human urine.

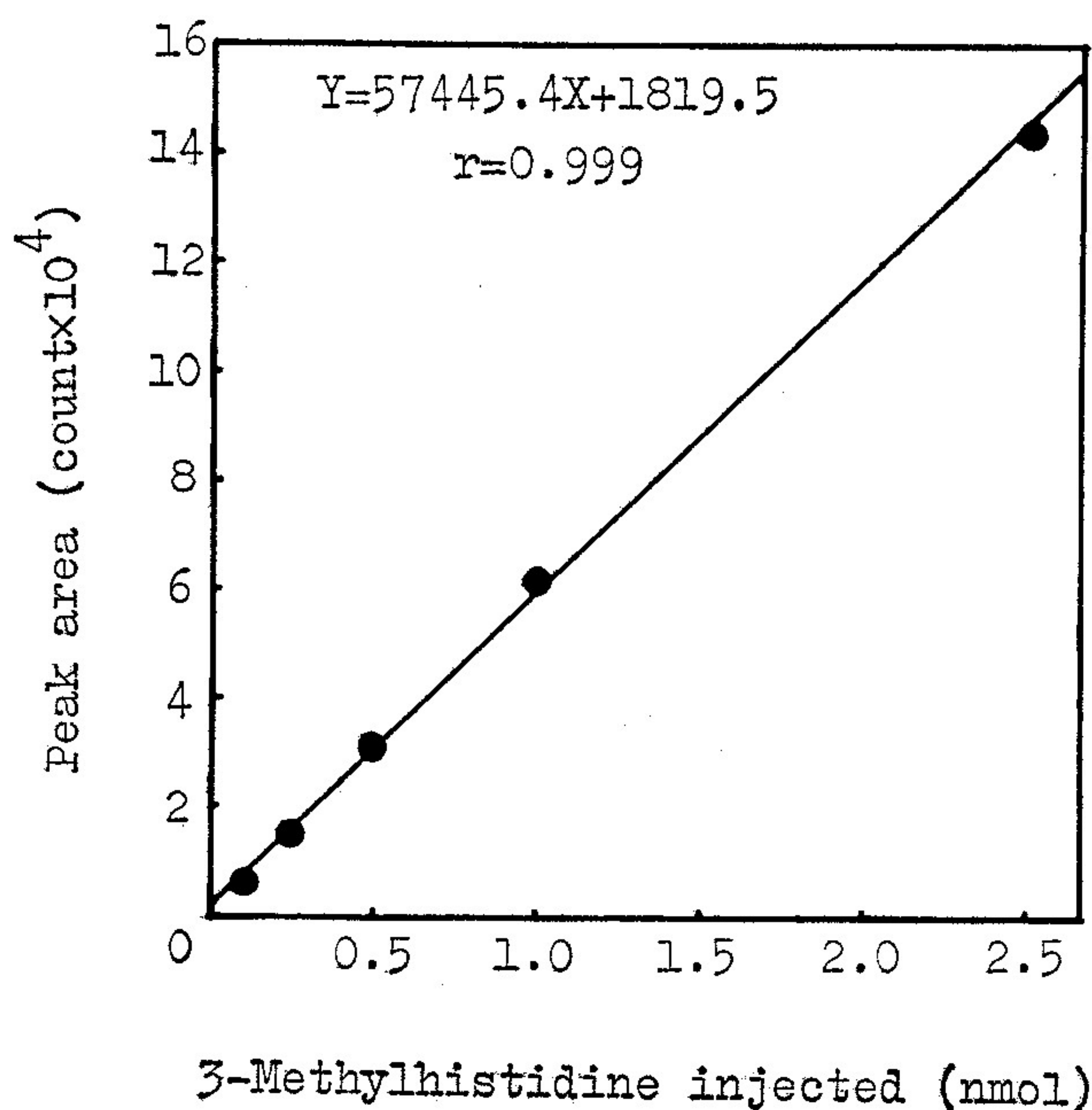


Fig. 2. Standard curve of 3-methylhistidine. Standard curve is linear over the range of 0.1 to 2.5 nmol.

nmol/10 μ l を、上記の分析手順を経て高速液体クロマトグラフに各 10 μ l 注入し、クロマトグラフ上に描かれた各ピークの面積比により求めた。同時に各濃度における変動係数も求めた。

また大学ボクシング選手 2 名の減量時において 1 日尿を採取し、上記の方法による 3-Me の分析を実施した。

Table 1. Changes of 3-Methylhistidine in Urine during Weight Reduction Period.

	Weight reduction period.		
	1	5	10 (day)
Subj. T. A.			
(μ mol/24h)	288.75	320.24	195.37
(μ mol/kg)	4.82	5.70	3.50
Subj. K. M.			
(μ mol/24h)	308.43	387.04	300.36
(μ mol/kg)	4.77	6.24	4.94

結果と考察

Fig. 1 はクロマトグラフに描かれた尿中 3-Me 及び His のピークの状態を示す。3-Me と His のピークは両者の分離が十分に保持時間 (ピーク幅) が比較的短かい鋭いピークが認められた。また 3-Me の検量線は Fig. 2 に示すごとく 0.1~2.5 nmol まで直線性を示し、その分析精度は変動係数 1% 未満であった。

本研究に使用した Nucreosil C₁₈ カラムは飯島ら³⁾のものと同様に逆相カラムとして分類されているが、両者の組成は異なっている。また保持時間、ピークの型及び分離状態は使用したカラムにより異なることが報告されている²⁾。

一般に高速液体クロマトグラフィーによる定量法はピークの高さ、または面積比によって検体を定量計算するものであり、分離状態が良好で保持時間が短かく、かつ鋭いピーク程その分析精度は高いとされている²⁾。

したがって Nucreosil C₁₈ カラムを使用して人尿の 3-Me を分析することは十分可能であり分析精度も高いものと推論した。

減量時における尿中 3-Me の変動は Table 1 に示したごとく、減量 5 日目に上昇し 10 日目に減少する傾向を示した。すなわち被検者の筋蛋白崩壊は減量 5 日目に亢進し、10 日目には抑制される傾向にあったことが推測される。

血液を取り扱う研究は医師の配置及び施設管理が十分でなければ、容易に実施できるものではない。しかし尿の採集は資格を必要とせず誰もがこなえるため、十分な施設を得ることが困難な体育の場においては尿を取り扱う研究を奨励すべきであると思われる。

本実験から得られた結果より、尿中 3-Me を用いて減量時における筋蛋白質の動態を推定することは十分可能であり、今後、体育の場、特に運動選手の蛋白質代謝に関する研究面で尿中 3-Me の利用価値は大なるものにな

と思われる。

文 献

- 1) Asatoor, A. M., and M. D. Armstrong: 3-Methylhistidine, a component of actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **26** (2): 168-174, 1967.
- 2) Huber, J. F. K. (石田泰夫訳): 高速液体クロマトグラフィーの理論と応用, 一現状と将来の展望一, 島津製作所, 京都, 1978.
- 3) 飯島潤一, 田島 真, 福島秀夫: 高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中の N^{ϵ} -メチルヒスチジンの迅速分析法, 日本栄養・食糧学会誌, **36** (4): 229-301, 1983.
- 4) Johnson, P., C. I. Harris, and S. V. Perry: 3-Methylhistidine in actin and other muscle proteins. *Biochem. J.*, **105**: 361-370, 1967.
- 5) Nishizawa, N., M. Simbo, and S. Hareyama: Fractional catabolic rates of myosin and actin estimated by urinary excretion of N^{ϵ} -methyl histidine, the effect of dietary protein level on catabolic rates under conditions of restricted food intake. *Br. J. Nutr.*, **37**: 345-353, 1977.
- 6) Wassner, S. J., J. L. Schlitzer, and J. B. Li: A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **104**: 284-289, 1980.
- 7) Young, V. R., S. D. Alexis, B. S. Baliga, and H. N. Munro: Metabolism of administered 3-methylhistidine, lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N -acetyl derivative. *J. Biol. Chem.*, **247** (11): 3592-3600, 1972
- 8) Young, V. R. and H. N. Munro: N^{ϵ} -methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover, an overview. *Federation Proc.*, **37** (9): 2291-2300, 1978.