

Title	ErythroflavinおよびThreoflavinに関する研究
Author(s)	溝口,正
Citation	大阪大学, 1965, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27723
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏 名・(本籍) **溝 ロ 正** だに ただし

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 第 713 号

学位授与の日付 昭和40年3月26日

学位授与の要件 薬学研究科応用薬学専攻

学位規則第5条第1項該当

学位論文題目 Erythroflavin および Threoflavin に関する研究

(主査) (副査)

論文審查委員 教授上原喜八郎 教授 滝浦 潔 教授青沼 繁

論文内容の要旨

ビタミン B_2 (B_2 と略す) は Isoalloxazine 核の糖 アルコール 残基 が Ribitol 基 であることから Riboflavin ともよばれている。

Erythroflavin および Threoflavin の名称は糖アルコール残基がそれぞれ Erythritol 基および, Threitol 基であることから著者らが初めて命名したものである。

Karrer らおよび Kuhn らによって各々独自に B_2 の全合成が完成されたが、その後ひき続いて、たくさんの研究者たちによって B_2 および B_2 類似化合物の研究がなされてきた。

しかし多数の B。類似化合物の研究がなされてきたにもかかわらず、Erythroflavin および Threo-flavin の研究は全くなされていない。

Erythroflavin および Threoflavin はともに四炭糖 アルコール Tetritol 基を結合したフラビンであり、 B_2 の糖アルコール残基より炭素鎖が一個短い。

Erythroflavin および Threoflavin の生物学的活性は全く不明であり、両フラビンの研究を行なう ことは、 B_2 の糖アルコール残基を短縮することによってその作用がどのように変化するかを論ずる上 から興味深いことである。

また、Erythroflavin および Threoflavin は糖アルコール残基が四炭糖アルコール Tetritol 基である点では同一であるが、酵素化学的にそれらの作用を検討してなんらかの作用がある場合、両者の作用が果して同一かどうかも興味ある点である。

単に新しいフラビンを合成して諸性質を明らかにするばかりでなく新しいフラビンの酵素化学的な 検討を加えることを目的として本研究を行なった。

Isoalloxazine 核 9 位に Erythritol 基および Threitol 基を結合したフラビンがそれぞれ Erythro-flavin および Threoflavin でありその構造は 6,7-Dimethyl-9-(n-1'-erythrityl)-isoalloxazine およ

図1 Erythroflavin および Threoflavin の化学構造

D-Erythrose および D-Threose は Perlinおよび Brice の方法に従って D-グルコースおよび, D-ガラクトースからそれぞれ調製した。

3,4-Xylidine と p-Erythrose を無水 メタノール に 溶解し, ちっ素中室温にて振とうする。3,4-Dimethyl-N-p-erythrosylaniline は分離せず,反応液をそのまま Raney nickel 触媒,75 気圧4時間, 約 40°C にて接触還元を行なう。還元終了後,触媒をろ過して除き,溶媒を回収すると3,4-Dimethyl-N-p-erythritylaniline, 針晶 mp. 126°C—127°C が得られる。常法に従って, 3,4-Dimethyl-N-perythritylaniline は アニリンとジアゾカプリング反応を行ない, 4,5-Dimethyl-2-phenyl-azo-N-Derythritylaniline, 橙赤色針晶 mp. 148°C が得られる。n-ブタノール氷酢混合溶媒中, 4,5-Dimethyl-2-phenylazo-N-p-erythritylaniline はバルビツール酸と縮合する。ここに Erythroflavin 橙黄色リ ン片晶 mp.285°C (decomp.) が得られる。

Threoflavin もほぼ同様な経路で合成されたが、高圧接触還元成績体は 結晶しなく 油状 である。 Threoflavin は黄色リン片晶 mp.282°C (decomp) である。

両フラビンの収率はいずれも四炭糖から通算して約 10% であった。

85% のリン酸を直火で加熱し 60°C-70°C に冷却した後これにフラビンを加えて遮光下, ねりあ わせフラビンのリン酸化を行なう。反応液に水を加え処理したのち, エタノール処理, 塩酸加水分解, 炭酸水素ナトリウム処理を経るとフラビンリン酸が単一に得られる。

湿性灰化法に従って合成したフラビンリン酸のリン酸を定量した結果 Erythroflavin リン酸化合物 および Threoflavin リン酸化合物ともに1分子中1分子のリン酸を含み, モノリン酸エステルである ことが明らかになった。

0.05 M 塩酸-塩化カリウム緩衝液 pH 2.0 中, 室温あるいは 38°C で過ヨード酸酸化反応を実施 した結果 Erythroflavinリン酸化合物および Threoflavin リン酸化合物はそれぞれ1分子あたり過ヨ ード酸1分子を消費することが明らかになった。

以上の事実からリン酸化反応で得られたリン酸エステルはそれぞれ, Erythroflavin-4'-monophosphate および Threoflavin-4'-monophosphate であることが明らかになった。

元素分析 の 結果 Erythroflavin-4'-monophosphate は1分子 の 結晶水 を 含 み,Threoflavin-4'-

monophosphate は2分子の結晶水を含むことが明かになった。

Erythroflavin は B_2 より,かなり水によく溶解するが Threoflavin はさらに水によく溶ける。 Erythroflavin および Threoflavin の水溶液は B_2 様螢光を発し紫外部可視部両吸収スペクトルは B_2 のそれと全く一致し,450m μ において分子吸光係数を測定した結果 B_2 のそれとよく一致した。 また赤外部吸収スペクトルも測定し B_2 のそれと比較した。日本薬局方に従って旋光度を測定した結果 Erythroflavin, $[\alpha]$ $D-106^\circ$; Threoflavin, $[\alpha]$ $D+30^\circ$; Erythroflavin-4′-monophosphate, $[\alpha]$ $D-18^\circ$; Threoflavin-4′-monophosphate, $[\alpha]$ $D+64^\circ$ であった。

ペーパークロマトグラフイの結果、Erythroflavin および Threoflavin はアルカリ溶媒、酸性溶媒をとわず B_2 より早く移動する。しかし Erythroflavin および Threoflavin 相互の区別はつかない。 リン酸化されると一層みわけがつかなくなる。ろ紙電気泳動も行なったがフラビンリン酸相互の区別はつかない。

旧黄色酵素はその補酵素 Riboflavin-5'-monophosphate (FMN と略す)が可逆的に容易に脱離することができる。補酵素 FMN を脱離した旧黄色酵素蛋白 (旧黄色アポ酵素と略す)は FMN を補えば酵素活性が回復する。FMN の代りに、Erythroflavin-4'-monophosphate (EMN と略す)あるいは Threoflavin-4'-monophosphate (TMN と略す)を添加して酵素活性の回復状況を検討した。

旧黄色酵素活性は消費される酸素量をもってあらわすことができるのでワールブルグ検圧計を用いて測定した。その結果補酵素としての活性は FMN が一番高く,EMN は FMN の約 70% の活性を示し,TMN は約 20% の活性を示すにとどまった。酵素蛋白とフラビンリン酸との解離恒数を算出した結果,EMN は 2.94×10^{-6} M であり,TMN は 1.85×10^{-5} M であった。リン酸の結合してないフラビンについても検討した結果 B_2 および Erythroflavin が旧黄色アボ酵素の活性を回復することが明らかになった。これは反応経過と共に生成するフラビンリン酸の二次的な作用と考えることもできるが反応生成物,あるいは ATP(Adenosine triphosphate)の添加効果等を検討した結果,フラビンがリン酸化されたという証拠は得られなかった。したがってそれら自身の補酵素作用と考えられる。

ビール酵母の NADPH2(還元型 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)チトクロムc 還元酵素は補酵素がやはり FMN である。補酵素 FMN を脱離した NADPH2 チトクロムc 還元酵素蛋白(アポ還元酵素と略す)は FMN を添加すると活性が回復する。FMN の代りに EMN あるいは TMN を添加して酵素活性の回復状況を検討した。活性測定は DU 型ベックマン分光光度計を用い,還元型チトクロムc に特有の吸収を示す 550 m μ の吸光度を測定した。補酵素 としての 活性 は FMN が一番高く,EMN は FMN の約 70% の活性を示し,TMN は約 10% の活性を示すにと どまった。酵素蛋白とフラビンリン酸との解離恒数を算出した結果,EMN は 2.17×10^{-7} M であり,TMN は 1.03×10^{-6} M であった。リン酸の結合してない B_2 や Erythroflavin もアポ還元酵素の活性を回復することが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

本論文には ribitol の代りに erythritol を結合した新フラビン化合物 erythroflavin および threitol を結合した新フラビン化合物 threoflavin の合成法ならびにこれらの化合物の諸性質さらにこれらの新フラビン化合物の燐酸エステルの酵素化学的活性に関する研究の結果が記載されている。

erythroflavin および threoflavin は Folkers らの方法に従って合成し, またこれらの化合物の燐酸エステル化は Karrer の 方法 に従って行なった。ここに得られた erythroflavin-4′-monophosphate (FMN), threoflavin-4′-phosphate(TMN) の酵素化学的活性に関する研究は酵母の NADPH2 (還元型助酵素 II) チトクロームC 還元酵素を用いて行ない, EMN は flavin-5′-monophosphate(FMN)の約 70%, TMN は FMN の約 20% の活性があることが明らかになった。

新化合物 erythroflavin, threoflavin の合成を行ないその燐酸エステルの酵素化学的活性を検べた本研究はこれから展開されるこの両化合物に関する一連の研究の基盤となるもので、本論文は薬学博士の学位を授与するに十分な価値があるものと認める。