



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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Erythroflavin および Threoflavin
に関する研究

溝 口 正

Erythroflavin および Threoflavin
に関する研究

目 次

緒 論	1
第 一 章	<i>Erythroflavin . Threoflavin</i> および それらのリン酸エステル合成と性状 3
第 一 節	<i>Erythroflavin</i> および <i>Threoflavin</i> の合成 3
第 二 節	<i>Erythroflavin</i> および <i>Threoflavin</i> のリン酸化 9
第 三 節	<i>Erythroflavin-4'-monophosphate</i> および <i>Threoflavin-4'-</i> <i>monophosphate</i> の確認 11
第 四 節	<i>Erythroflavin . Threoflavin</i> およびそれらのリン酸エステルの性状 16
第 二 章	<i>Erythroflavin</i> および <i>Threoflavin</i> の 酵素化学的研究 22
第 一 節	旧黄色酵素実験 23
第 二 節	$NADPH_2$ チトクロム <i>c</i> 還元酵素実験 33
第 三 節	考 察 38
結 論	40
実 験 の 部	42
文 献	62

本文中には以下の略号を使用した。

B_2 . ビタミン B_2

NADP, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH₂, 還元型 *NADP*

FMN, Riboflavin-5'-monophosphate

EMN, Erythroflavin-4'-monophosphate

TMN, Threoflavin-4'-monophosphate

ATP, Adenosine triphosphate

ADP, Adenosine diphosphate

ビタミン B_2 (B_2 と略す) は *Isoalloxazine* 核 9 位の糖アルコール残基が *Ribitol* 基であることから *Riboflavin* とよばれている。

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はじめて命名したものである。(1)

Karrer⁽²⁾ および Kuhn⁽³⁾⁽⁴⁾ によつて独立に 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つて 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_2 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 *Threoflavin* の研究は全くなされていない。

これまでの業績によつて明らかにされた B_2 作用発現のための基本構造は大別して 3 つにわけられるが⁽⁵⁾ その 1 つに *Isoalloxazine* 核 9 位の糖アルコール残基は五炭糖アルコール *Pentitol* 基でなくてはならないとされている。

六炭糖アルコール *Hexitol* 基を結合したフラビン、たとえば *Sorboflavin* あるいは、*Galactoflavin* などはビタミンとしての活性がなくむしろ、ラットや細菌の発育抑制作用があり *Antivitamin* として働く⁽⁶⁾。

一方 *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 の糖アルコール鎖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うことは、 B_2 の糖アルコール鎖を短縮することによつてその作用がどのように変化するかを論ずる上からも興味深いことである。

従来ビタミン B_2 およびその類似化合物の作用はほとんど動物試験あるいは細菌試験を用いてしらべられているが、 B_2 はその大部分がフラビン酵素の補酵素として生体内に存在し生体内の酸化還元に必要な役割を果しているのであるから酵素化学的な研究によつてその作用をしらべることは重要なことである。

旧黄色酵素を用いた実験成績によると、*L-Arabo flavin* は、 B_2 におよばないが、かなり活性があり⁽⁷⁾、また酵母の $NADPH_2$ チトクロム c 還元酵素を用いた実験成績によると、*L-Lyxoflavin-5'-monophosphate* は *FMN* の約 75% の活性がある⁽⁸⁾。もとより、*L-Arabo flavin* は B_2 欠乏ラットの成長を促進し⁽⁶⁾⁽⁹⁾、*L-Lyxoflavin* は *Lactobacillus lactis* の増殖をもたらす⁽¹⁰⁾ ことが知られていた。しかし合成された数多くの B_2 類似化合物のうちこのように生物学的活性のあるものはほんのわずかにすぎない。

Erythro flavin および *Threo flavin* 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った。

幸いに、新しい両フラビンの合成に成功しさらにそれらをリン酸化して *Erythro flavin-4'-monophosphate* および *Threo flavin-4'-monophosphate* を合成した。これらを用いて酵素化学的研究を行つた結果興味ある事実が明らかになつた。

第 1 章

Erythroflavin, *Threoflavin* およびそれらのリン酸エステル の合成と性状¹⁾

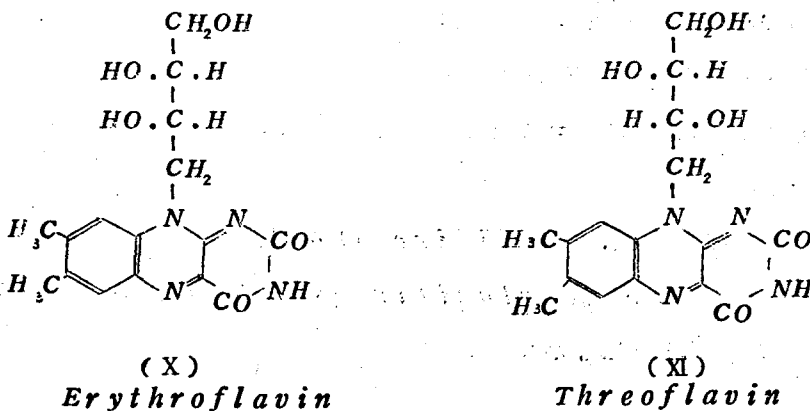
第一節 *Erythroflavin* および *Threoflavin* の合成

B_2 類似化合物は大きくわけて *Isoalloxazine* 核の核置換体と 9 位のち
つ素に結合している糖アルコール残基の異なる誘導体になる。そのうち糖アル
コール残基の異なる誘導体は、五炭糖アルコール *Pentitol*、六炭糖アルコ
ール *Hexitol* 等があるが、四炭糖アルコール *Tetritol* を結合した
フラビン は全く文献記載がない。

Isoalloxazine 核の 9 位に *Erythritol* 基および、*Threitol* 基
を結合したフラビンがそれぞれ、*Erythroflavin* および *Threoflavin*
であり、その構造は 6,7-Dimethyl-9-(D-1'-erythrityl)-
isoalloxazine (X) および 6,7-Dimethyl-9-(D-1'-threityl)-
isoalloxazine (XI) である (図 1)。

図 1

Erythroflavin および *Threoflavin* の化学構造



B_2 の全合成が完成されて以来、 B_2 およびその誘導体の合成法は数多くの改良がなされてきた。今日一般に B_2 および B_2 誘導体の全合成はアニリン誘導体と*Alloxan*あるいは*Barbituric acid*との閉環反応によつてなされている。

*Erythroflavin*および*Threoflavin*の合成もそれにもとずいて行つた。

*D-Erythrose*はRuff⁽¹⁾の方法に従いアラボン酸の過酸化水素、酸化によつて調製したが、副産物が多く精製が困難であり、本合成の原料として用いることはできなかつた。その後イオン交換樹脂クロマト法で精製できることが明らかになつたが、*D-Erythrose*の調製法としては不適當であつた。1956年、PerlinおよびBrice⁽²⁾は、四炭糖を調製する画期的な方法をみいだした。酢酸溶媒中、六炭糖を四酢酸鉛で酸化する方法である。本合成の原料の*D-Erythrose*および*D-Threose*は以後、PerlinおよびBriceの方法に従つて、*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。

糖とアニリン誘導体の縮合は、フラビン合成の際の例によると、メタノール中還流加熱する⁽³⁾あるいはエタノール中室温に放置する⁽⁴⁾のいずれかによつてなされる。しかし本合成には、このいずれの方法も成功しなかつた。それ故、フラビンの合成としては類のない条件すなわち別々に無水メタノールに溶解した 3,4-Xylidine (I) と *D-Erythrose* (II) を、ちつ素気流中混合し、そのまゝ振とうする方法を用いた。その結果反応数時間後に無色結晶 3,4-Dimethyl-N-D-erythroslaniline (III) が析出した。しかし空気中にとりだすと徐々に分解するため再結晶はできなかつた。

D-Threose (III) と 3,4-Xylidine (I) を同様に縮合したが、3,4-Dimethyl-N-D-threoslaniline (V) は結晶しなかつた。ピクラート等の結晶化も成功しなかつた。

D-Erythrose および *D-Threose* の縮合したシッフの塩基, 3,4-*Dimethyl-N-D-erythrosylaniline* (Ⅳ) および 3,4-*Dimethyl-N-D-threosylaniline* (V) はとりださず, そのまゝ, *Raney nickel* 触媒のもと高圧接触還元を行つた。

3,4-*Dimethyl-N-D-erythritylaniline* (Ⅵ) は *mp* 126°C-127°C の無色針晶であり, このものの赤外部吸収スペクトル測定の結果 3460 cm^{-1} および 3310 cm^{-1} にアミノ基および水酸基の吸収を認め, さらに 0.1 *N* 塩酸中, 旋光度を測定した結果 $[\alpha]_D^{19}$, -4.1° であつた。

一方, 3,4-*Dimethyl-N-D-threitylaniline* (Ⅶ) は油状でありピクラート等の調製を試みたが成功しなかつた。

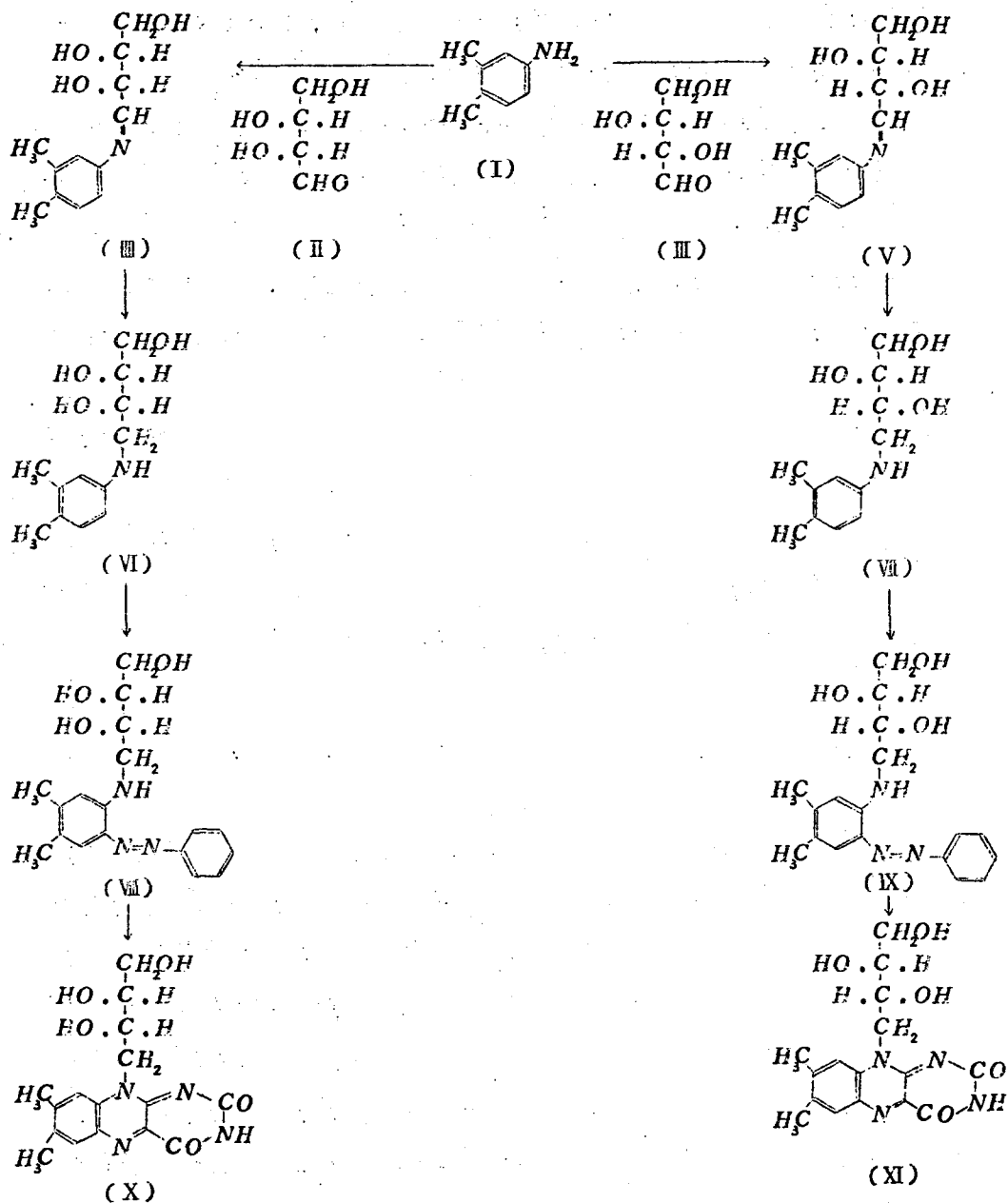
3,4-*Dimethyl-N-D-erythritylaniline* (Ⅵ) および 3,4-*Dimethyl-N-D-threitylaniline* (Ⅶ) は *aniline diazonium* 塩と *Diazo coupling* 反応を行つて 4,5-*Dimethyl-2-phenylazo-N-D-erythritylaniline* (Ⅷ) および 4,5-*Dimethyl-2-phenylazo-N-D-threitylaniline* (Ⅸ) に誘導した。

Diazo coupling 反応はその液性および反応温度によつて大きく左右される。ここでは, *Folkers*⁽⁴⁵⁾ の方法に従い, *pH* 3.0 に調製し, 徐々に *Diazonium* 塩を滴下して反応を行つた。

4,5-*Dimethyl-2-phenylazo-N-D-erythritylaniline* (Ⅷ) の合成において反応温度 -8°C で *Diazonium* 塩を滴下し, その後 5°C にて反応を継続すれば目的の *Azo* 化合物 (Ⅷ) がえられた。4,5-*Dimethyl-2-phenylazo-N-D-threitylaniline* (Ⅸ) の合成において, 同じ反応温度で行えば灰白橙色の結晶が得られ目的の *Azo* 化合物 (Ⅸ) がえられなかつた。反応の終末において, 室温 (15°C) にあたためると, この灰白橙色の結晶は消失し目的の *Azo* 化合物 (Ⅸ) 赤色針晶がえられた。

前者の元素分析値が目的の *Azo* 化合物 (Ⅸ) と一致することからその異

Erythroflavin および *Threoflavin* の合成経路



性体と考えられる。しかしこのものについてそれ以上の詳細な検討を加えなかつた。

Diazo coupling 反応において、目的の *Azo* 化合物は 2 位置換体であるが、異性体の *N* 置換体および 6 位置換体の生成が考えられる。

N 置換体は一般に色調が淡く、また、かりに生成したとしても次の反応の *Barbituric acid* との縮合によつて *Isoalloxazine* 核は形成されない。

6 位置換体については、すでに、*Tishler*⁽¹⁶⁾ らによつて、ここで用いた反応条件では、6 位置換体の生成率が極めて低いこと、および 6 位置換体は次の反応である *Barbituric acid* との縮合が困難であり、反応母液に残ることが示されている。*Tishler* らの研究によれば、4,5-*Dimethyl-2-phenylazo-N-D-ribitylaniline* (mp 174°C-175°C レンガ色針晶) の合成において、副生する 6 位置換体 (mp 196°C-

198°C 橙色針晶) はわずかに 1% 以内にとどまる、しかも、6 位置換体から *Isoalloxazine* 核を合成するためには、*Alloxan* あるいは *Dichlorobarbituric acid* との縮合反応によらなくてはならない。

ここでえられた両 *Azo* 化合物は *Barbituric acid* と縮合できたこと、および *Tishler* らの研究等を考慮して 2 位置換体と思われるが、しかし直接確認はしなかつた。

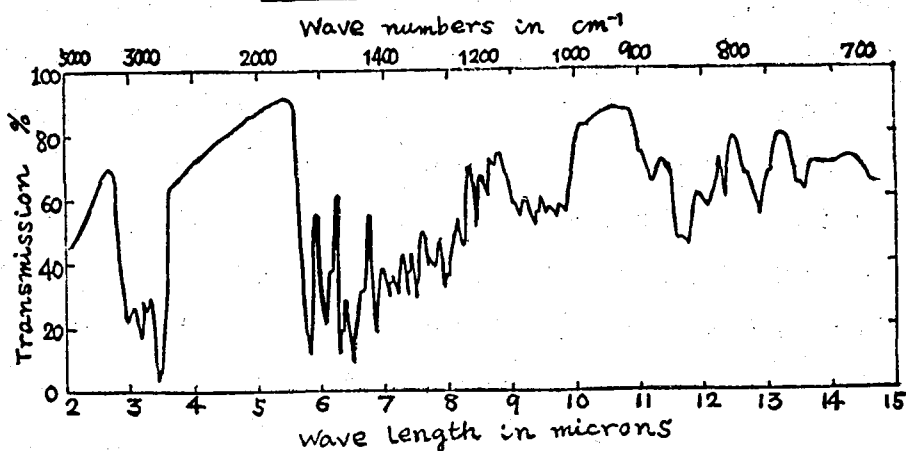
Azo 化合物と *Barbituric acid* との縮合、いわゆる *Isoalloxazine* 核の合成は種々の方法がある。ここでは *Folkers*⁽¹⁷⁾ の方法を利用し、*n*-ブタノール、酢酸混合溶媒中、縮合を行つた。6 *N* 塩酸から再結晶して *Erythroflavin* (X) 橙黄色リン片晶 mp 285°C (decomp) と *Threoflavin* (XI) 黄色リン片晶 mp 282°C (decomp) をえた。なお *D-Erythrose* (II) あるいは *D-Threose* (III) から通算してその収率はそれぞれ約 10% になる。

合成した *Erythroflavin* (X) および *Threoflavin* (XI) は水に溶解して B_2 様螢光を発す。

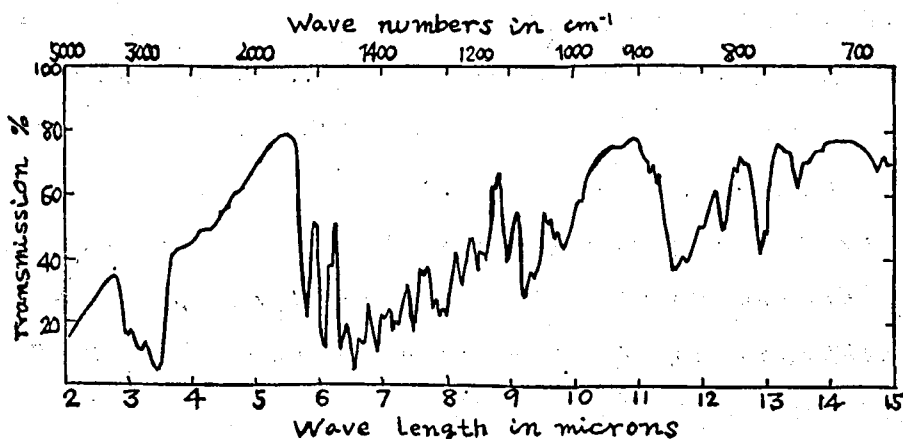
両フラビンの紫外外部吸収スペクトル (図8) および赤外部吸収スペクトル (図3) 測定の結果、いずれも目的のフラビンであることがあきらかになった。

図 3

Erythroflavin および *Threoflavin* の
赤外部吸収スペクトル
Erythroflavin



Threoflavin



第二節 *Erythroflavin* および *Threoflavin* のリン酸化

B_2 を化学的にリン酸化した最初の研究⁽¹⁸⁾ ではオキシ塩化リンを用い、2', 3', 4'-*Triacetyl-riboflavin* がリン酸化された。その後 *Todd* および *Forrest*⁽¹⁹⁾ は B_2 を直接リン酸化した後、生成したフラビンリン酸を活性炭に吸着し精製した。*Flexer*⁽²⁰⁾ はオキシ塩化リンとメタノールから生成する $(MeO)_2POCl$ や $HOPOCl_2$ および $(HO)_2POCl$ を B_2 のリン酸化試薬として用いた。

B_2 のリン酸化に限らず、リン酸化反応は重要であり、種々のリン酸化試薬が検討されてきた。1951年 *Canali*⁽²¹⁾ はオルトリン酸を直火で加熱してえられる一種のメタリン酸が B_2 のリン酸化に最良の試薬であることをみだした。この方法は1952年 *Karrer* ら⁽²²⁾ によつて確立され独得の後処理によつて全く単一の *Riboflavin-5'-monophosphate* (FMN) が得られる。

Erythroflavin および *Threoflavin* のリン酸化はこの *Karrer* らの方法を参考にして行つた。

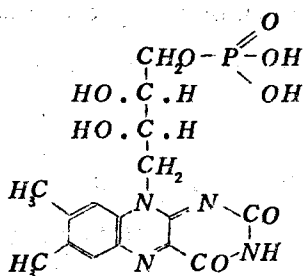
市販85%オルトリン酸を直火で加熱し、白色のメタリン酸の結晶が析出する寸前に放冷しメタリン酸の結晶を含む粘ちような物質をリン酸化試薬として用いる。この場合、オルトリン酸と粉末メタリン酸の混合物、あるいは、粉末メタリン酸のみ、いずれを用いても両フラビンのリン酸化は不可能であつた。

メタリン酸を含む粘ちよう物にフラビンを加えて60℃-70℃に遮光下ねりあわせ、フラビンが一樣に溶解したところで反応を中止し、ただちに水処理を行う。この段階でFMN調製時と同一操作を行えば目的のリン酸化物はほとんどえられなかつた。リン酸濃度が高く目的のリン酸化物が水に溶解しないためだろうと考えられる。したがつてこの段階で水洗を充分行うことが必要であつた。またエタノール処理によつてかなりフラビンリン

酸が失われるので母液からフラビンリン酸を活性炭に吸着しピリジン・メタノール・水の等量混合溶媒⁽¹⁹⁾で溶出回収する方法を適用した。

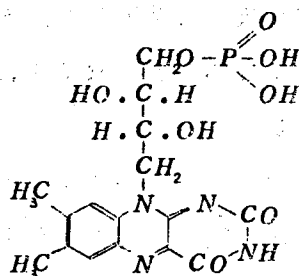
図 4

フラビンリン酸の化学構造



(XII)

Erythroflavin-4'-monophosphate
(EMN)



(XIII)

Threoflavin-4'-monophosphate
(TMN)

B_2 を同様の方法でリン酸化して4つのリン酸化合物が検出されている⁽²¹⁾がそのうち、*Riboflavin-4',5'-cyclicmonophosphate*および*Riboflavin-5'-pyrophosphate*は酸加水分解を受けやすく、*FMN*になる⁽²³⁾ことから、先にえられた粗製フラビンリン酸の塩酸加水分解を行った。塩酸加水分解前のフラビンリン酸は吸湿性であるが、水解後は吸湿性がなくなる。

*Riboflavin-4',5'-diphosphate*は酸加水分解を受けがたく⁽²³⁾*FMN*合成の際、酸加水分解後も不純物として含まれる。しかし、*FMN*より易溶性であるから水処理することが精製に有効だとされている。5%リン酸=ナトリウム水溶液を溶媒とするペーパークロマトグラムにおいてこのものは、*FMN*よりはるかに移動しやすく、その存在が簡単にみわけら

れる⁽²⁴⁾。

水解後のフラビンリン酸を5%リン酸二ナトリウム水溶液を溶媒とするペーパークロマトグラフィーに展開すると、目的のフラビンリン酸よりはるかに移動しやすい未知物質をごく少量ではあるが認められた。このものは水処理を行うと除くことができる。

水処理したフラビンリン酸にはリン酸の結合してない *Erythroflavin* や *Threoflavin* がそれぞれ含まれているから、炭酸水素ナトリウム溶液にフラビンリン酸を溶解しておき、一方フラビンは活性炭に吸着させて除く。

目的のフラビンリン酸は10%あまりの収率でえられ、それぞれ単一であつた。

第三節 *Erythroflavin-4'-monophosphate* および

Threoflavin-4'-monophosphate の確認

リン酸化反応でえられた化合物がモノリン酸エステルであり、リン酸結合位がフラビンの4'位であることを確認しなければならない。

図5に示す化合物は B_2 をリン酸化してえられるリン酸化合物でいままでに明らかになつた化合物⁽²³⁾ から類推して想定したもので、*Erythroflavin* のリン酸化を例にして示したものである。これらの物質はリン酸化反応によつて生成する可能性は充分あるが、*Erythroflavin-4'-monophosphate* (XII) を除いて、いまだに不明の物質である。

湿性灰化法⁽²⁵⁾ に従つて、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、一分子中、一分子のリン酸を含むことが明らかになつた。(表1)。

すなわち生成物はモノリン酸エステルであり、ピロリン酸エステル (XV) やジリン酸エステル (XVI) および (XVII) でない。

Toddら⁽¹⁹⁾ は合成した FMN の確認に過ヨード酸酸化を行つた。また田

Erythroflavin のリン酸化

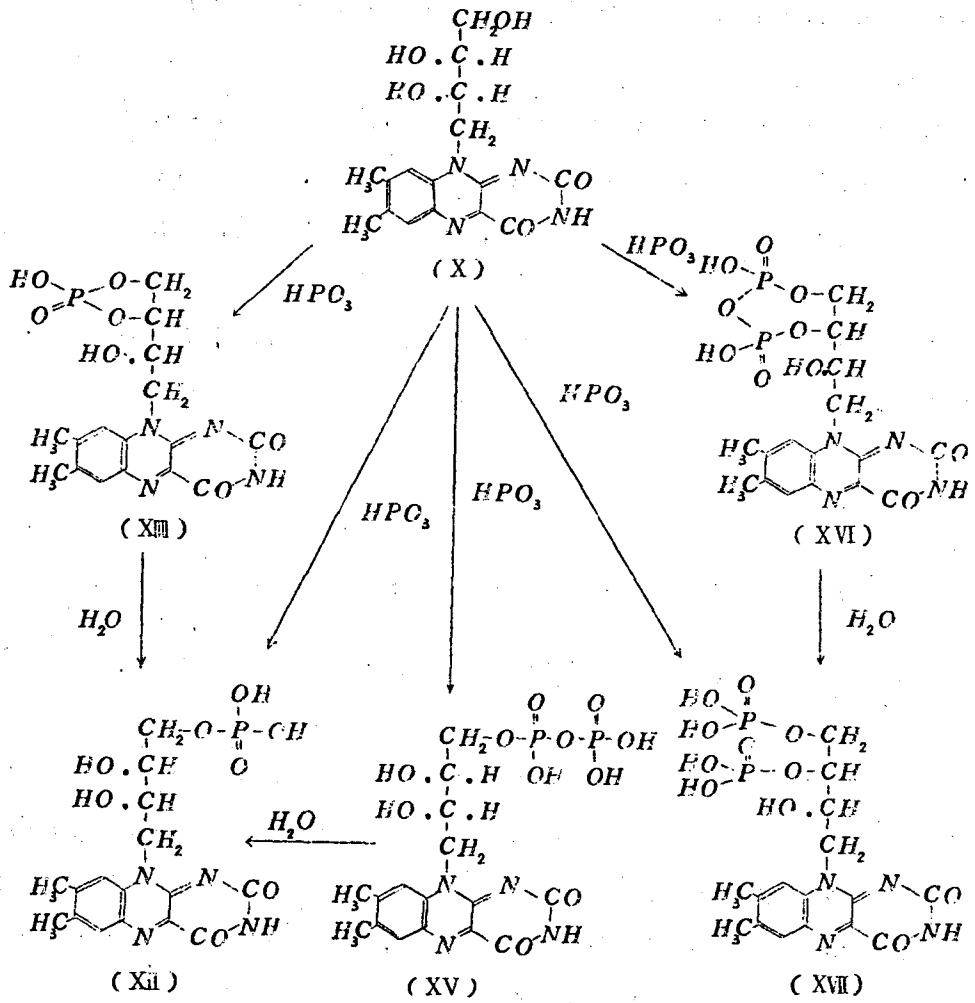


表 1

フラビンリン酸のリン酸の定量

フラビンリン酸	リン酸
FMN	1.08 (moles フラビンリン酸)
EMN	0.96
TMN	1.07

湿性灰化法⁽²⁵⁾によつて定量

中⁽²⁶⁾も *Riboflavin-4',5'-cyclic monophosphate* の確認にやはり過ヨード酸酸化を行つた。

目的のフラビンリン酸は水酸基が2ヶ隣接して存在するからこのもの1 mole は過ヨード酸1 mole を消費する筈である。

1958年Brady⁽²⁷⁾は *Inositol* および *Sorbitol* の定量に過ヨード酸酸化法を応用し、260 $m\mu$ における吸光度から消費された過ヨード酸を定量した。

フラビンリン酸の過ヨード酸酸化反応を260 $m\mu$ において測定しようとするればフラビンの分子吸光係数が過ヨード酸のそれよりはるかに大きく、10数倍に達してこの波長での吸光度測定法は不適當である。

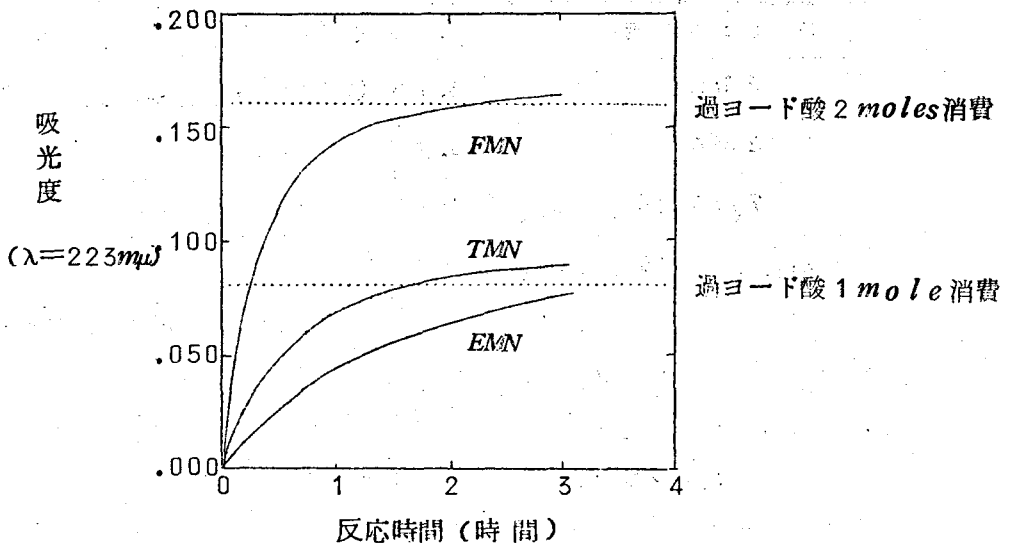
過ヨード酸は223 $m\mu$ に吸収極大を有する⁽²⁸⁾がフラビンも223 $m\mu$ 附近に吸収極大を有する。223 $m\mu$ においてフラビンの分子吸光係数は過ヨード酸のその4倍に相当するが、フラビンが共存する時、分光学的に過ヨード酸を定量するには223 $m\mu$ の吸光度測定法が最も有効である。

分光学的測定法と同時に容量分析⁽²⁹⁾も行い両者が一致した結果を与えることを確めた。

過ヨード酸酸化反応はフラビンリン酸とリン酸の結合してないフラビンとで難易があり *Erythroflavin* および *Threoflavin* はその濃度0.01 mM で酸化を受けるが、フラビンリン酸はその濃度1 mM 以上でようやく酸化を受ける。特に、*Erythroflavin* のリン酸化物は過ヨード

図 6

フラビンリン酸の過ヨード酸酸化



反 応 条 件

フラビンリン酸 $3 \mu moles$, 過ヨード酸 $1.2 \sim 9.0 \mu moles$, $0.05M$ 塩化カリ-塩酸緩衝液 $pH 2.0$ にて全量 $6.0 ml$ とする。
 $15^\circ C - 38^\circ C$, 暗所反応

酸 $4 moles$ 相当量使用してようやく酸化される。

Erythroflavin, *Threoflavin* および *Threoflavin* のリン酸化物は室温 ($15^\circ C$) で充分反応するが, *Erythroflavin* のリン酸化物および *FMN* は $38^\circ C$ に加温しなくてはならない。しかし, $60^\circ C$ で反応すると, フラビンおよびフラビンリン酸が理論値以上の過ヨード酸を消費し分解してしまう。

したがって過ヨード酸酸化反応は, 田中⁽²⁶⁾ の例を参考にし, $0.05 M$ 塩

化カリ―塩酸緩衝液 pH 2.0 , 室温 (15 °C) あるいは 38 °C で実施することにした。

フラビンおよびフラビンリン酸の過ヨード酸酸化を経時的に、過ヨード酸消費量で追つてみると図6のようになる。たて軸に目盛つた吸光度は減少した吸光度を示す。あらかじめ pH 2.0 , 10 °C , 233 $m\mu$ における過ヨード酸の分子吸光係数を求め、それを用いて、フラビンリン酸各々 1 *mole* が消費する過ヨード酸の *mole* 数を吸光度で表わし、過ヨード酸 1 *mole* が消費されて減少する吸光度のところに、1 *mole* 消費の線を、過ヨード酸 2 *mole*s が消費されて減少する吸光度のところに 2 *mole*s 消費の線を附記した。

表 2

フラビンおよびフラビンリン酸の過ヨード酸酸化

フラビンおよび フラビンリン酸	測定* 方法	フラビンおよび フラビンリン酸 のモル数	過ヨード酸 (HIO_4) モル数		比 率**
			加えた HIO_4	消費された HIO_4	
<i>Erythroflavin</i>	A	0.4 $\times 0.1 \mu mole$	1.2 $\times 0.1 \mu mole$	0.806 $\times 0.1 \mu mole$	2.01
	B	2.5	7.5	5.150	2.06
<i>Threoflavin</i>	A	0.4	1.2	0.806	2.01
	B	2.5	7.5	5.400	2.16
<i>FMN</i>	A	1.0	3.0	2.060	2.06
	B	2.5	7.5	5.170	2.07
<i>EMN</i>	A	1.0	4.0	1.000	1.00
	B	2.5	10.0	2.400	0.96
<i>TMN</i>	A	1.0	1.5	1.000	1.00
	B	2.5	3.75	2.650	1.06

* A , 分光学的測定 ; B , 容量分析

** フラビンおよびフラビンリン酸 1 *mole* が消費した過ヨード酸の *mole* 数

表2ではフラビンおよびフラビンリン酸が消費した過ヨード酸の量を測定し、フラビンおよびフラビンリン酸1 *mole* がそれぞれ消費する過ヨード酸の *mole* 比で示した。過ヨード酸がもはやそれ以上消費されなくなった時の測定値である。

表2が示すように *Erythroflavin* および *Threoflavin* のリン酸化合物はそれぞれ1 *mole* 当り過ヨード酸1 *mole* を消費することが明らかになった。比較対照するため行つた実験でも、*FMN*、*Erythroflavin* および *Threoflavin* はそれぞれ過ヨード酸2 *mole*s を消費し理論値に一致した。したがつて合成されたリン酸化合物はそれぞれ目的の物質 *Erythroflavin*-4'-*monophosphate* (XI) および *Threoflavin*-4'-*monophosphate* (XIII) である。

第四節 *Erythroflavin*、*Threoflavin* およびそれらのリン酸エステルの性状

B_2 は水溶性であるが溶解度が低くその難溶性がしばしば問題になる。

Erythroflavin は B_2 よりかなり水によく溶解するが、*Threoflavin* は更に水によく溶ける(表3)。

融点は高く不明瞭であるが、*Erythroflavin* の融点は *Threoflavin* のそれより、わずかに高い。リン酸化されると融点が低下する。

フラビンおよびフラビンリン酸の旋光度は測定溶媒によつて著しくその値が変動する⁽³⁰⁾。旋光度は日本薬局方⁽³¹⁾に従つて測定した(表4)。

それによると *Erythroflavin* は B_2 と同様左旋性であるが、*Threoflavin* は右旋性である。リン酸化されると旋光度が右旋性へと傾くが旋光性はかわらない。ここで用いた *FMN* は B_2 をリン酸化して合成したものである。

表 3

フ ラ ビ ン の 溶 解 度

フ ラ ビ ン	$\frac{\text{moles}}{\text{ml}}$ μmole	$\frac{\text{weight}}{\text{ml}}$ μg
B_2	0.17	65.5
<i>Erythroflavin</i>	0.25	85.5
<i>Threoflavin</i>	0.27	91.5

蒸溜水 8°C

450 $m\mu$ の分子吸光係数より測定

表 4

フ ラ ビ ン お よ び フ ラ ビ ン リ ン 酸 の 旋 光 度

フ ラ ビ ン	$[\alpha]_D^{15}$
B_2	-12.2°
<i>Erythroflavin</i>	-10.6°*
<i>Threoflavin</i>	+3.0°
<i>F M N</i>	-4.0°
<i>E M N</i>	-1.8°
<i>T M N</i>	+6.4°

* $[\alpha]_D^{21}$

日本薬局方に従って測定⁽¹⁾

表 5

フラビンおよびフラビンリン酸の
ペーパークロマトグラフィ
(R_f 値)

フラビン	展 開 溶 媒		
	1	2	3
B_2	—	0.2 8	0.3 9
<i>Erythroflavin</i>	—	0.3 1	0.4 5
<i>Threoflavin</i>	—	0.3 3	0.4 2
<i>FMN</i>	0.5 0	0.1 0	0.0 6
<i>EMN</i>	0.5 3	0.1 0	0.0 6
<i>TMN</i>	0.5 4	0.0 9	0.0 5

東洋ろ紙 No 50

展開溶媒

1. 5%リン酸二ナトリウム水溶液
2. *n*-ブタノール：酢酸：水＝4：1：5の有機層
3. *n*-ブタノール：ピリジン：水＝2：1：1

上昇法 室温（10℃ - 15℃）数時間ないし一夜暗所展開
風乾後紫外線照射下検出

フラビンは特有の蛍光を発するので、紫外線照射すればその検出がきわめて容易である。特にペーパークロマトグラフィに展開した場合極く微量でも検出できる。表5には、各展開溶媒における R_f 値を示した。*n*-ブタノールを含む展開溶媒を用いて展開すると、 B_2 と*Erythroflavin*あるいは*Threoflavin*との区別はつくが、*Erythroflavin*と*Threoflavin*との区別はつかない。リン酸化された場合、*EMN*、*TMN*および*FMN*の区別はつかなくなる。

ろ紙電気泳動⁽²⁾に展開すると図8のように、フラビンリン酸は陽極側へ、

フラビンはずかに陰極側へ移動する。

図 7

フラビンおよびフラビンリン酸のろ紙電気泳動

陰 極	原 点	陽 極
	0.5 5	B_2
	0.7	<i>Erythroflavin</i>
	0.5	<i>Threoflavin</i>
	3.4	<i>TMN</i>
	3.2	<i>EMN</i>
	3.3	<i>FMN</i>
	2.4	<i>FAD</i>

展開条件 (32) 1.67 mA/cm (定電流)
 0.05 M リン酸緩衝液 pH 8.0
 3 時間室温 (15 °C) 暗所にて泳動
 ベックマンスピノ泳動装置使用

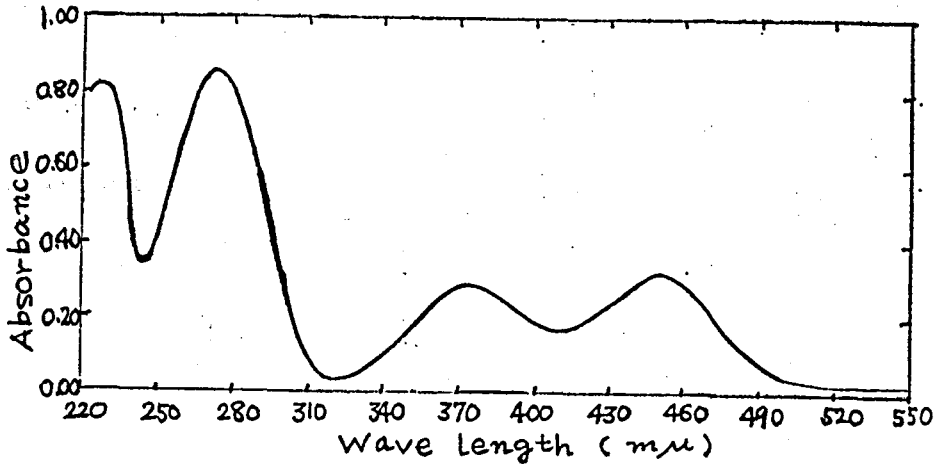
図中の数値は泳動距離を示す。単位 cm

しかし、フラビンリン酸相互の区別はつかない。

フラビンは紫外部および可視部に吸収をもつ。*Erythroflavin*を例に
 その吸収スペクトルを図 9 に示した。*Threoflavin*、*EMN*および*TMN*
 も全く同一のスペクトルを与え、その λ_{max} を表示したものが表 6 である。

図 8

Erythroflavin の吸収スペクトル



濃度 $3.31 \times 10^{-5} M$ 水溶液

日立自記分光光度計 EPS-2型にて測定

表 6

フラビンおよびフラビンリン酸の吸収極大

フラビン	λ_{max} (mμ)			
B_2	223	267	373	445
Erythroflavin	224	267	373	445
Threoflavin	224	266	375	445
FMN	223	267	373	445
EMN	223	267	373	445
TMN	223	267	373	445

濃度 $10^{-4} M \sim 10^{-5} M$ 水溶液

日立自記分光光度計 EPS-2型にて測定

一般にフラビンの吸収極大は $267 m\mu$, $370 m\mu$ および $445 m\mu$ の三個とされているが , $223 \sim 224 m\mu$ 附近に明らかな吸収極大を認めた。

フラビンおよびフラビンリン酸をとわず , 分子吸光係数は等しい筈である。フラビンに特有の吸収のある波長 $450 m\mu$ において分子吸光係数を測定した。その結果 , フラビンおよびフラビンリン酸とも , 等しい分子吸光係数が得られ , さらに *Araboflavin* および *Dichloroflavin* の分子吸光係数 , $11.6 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mole}^{-1} (\lambda = 450 m\mu)$ ⁽³⁾ によく一致した。(表 7)

表 7

フラビンおよびフラビンリン酸の分子吸光係数

フラビン	分子吸光係数 $\lambda = 450 m\mu$
B_2	11.67 $L \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \times 10^3$
<i>Erythroflavin</i>	11.80
<i>Threoflavin</i>	11.88
<i>EMN</i>	11.63
<i>TMN</i>	11.98

フラビン水溶液

日立分光光度計 *EPU-2A* を用いて測定

第二章

Erythroflavin および *Threoflavin*

の 酵 素 化 学 的 研 究⁵⁶⁾

Riboflavin - 5'-*monophosphate* (*FMN*) はある種の酸化酵素の補酵素である。

フラビンが補酵素の観点からその活性が研究された例として *Warburg*, *Christian* の酵素系 (旧黄色酵素系) における B_2 ⁽⁵⁴⁾ および *L-Arabo-flavin*⁽⁵⁾, 酵母の *NADPH*₂ チトクロム *c* 還元酵素系における *L-Lyxoflavin*-5'-*monophosphate*⁽⁸⁾, 豚の *NADPH*₂ チトクロム *c* 還元酵素系における *FMN*⁽⁵⁵⁾ 等がある。

フラビン酵素は補酵素が *FMN* あるいは *FAD* であつてその補酵素を蛋白部分からきり離すことができるが、ある種の酵素では、それが可逆的に容易に実施できる。

補酵素を脱離した酵素蛋白 (アポ酵素) はそれ自身では活性がなく補酵素を添加すれば本来の活性を示す。したがつて補酵素を脱離したアポ酵素に新しく合成したフラビンを添加して酵素活性の回復状況を検討すれば、それらの酵素化学的活性を知ることができる。

新しく合成された *EMN* や *TMN* は *FMN* の同族体であるから *FMN* を補酵素にするフラビン酵素をとりあげた。

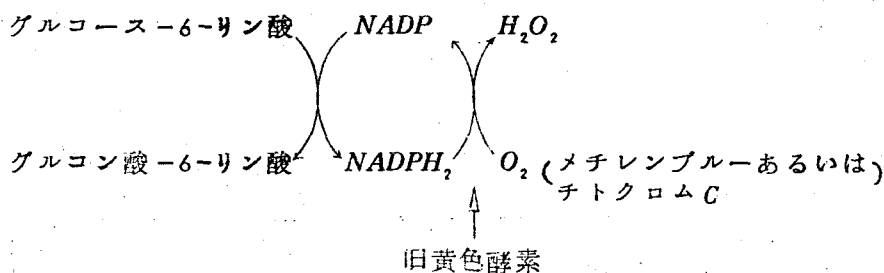
数多いフラビン酵素のうち *FMN* を補酵素とする酵素は比較的少くよく知られているものとして、旧黄色酵素⁽⁵⁶⁾ *L*-アミノ酸酸化酵素⁽⁵⁷⁾ および酵母の *NADPH*₂ チトクロム *c* 還元酵素⁽⁵⁸⁾ があるに過ぎない。

そこでまず酵素標品として入手しやすく比較的安定な旧黄色酵素を用いて検討することにした。

第一節 旧黄色酵素実験

旧黄色酵素は $NADPH_2$ からその水素を直接酸素に伝達することができ、他にチトクロム C あるいはメチレンブルーにも水素を伝達できる (図 9)。

図 9 旧黄色酵素反応



グリコース-6-リン酸脱水素酵素の作用により基質グリコース-6-リン酸が酸化され、グリコン酸-6-リン酸が生成しその際共役して $NADP$ から $NADPH_2$ が生成する ($NADPH_2$ 生成系)。

旧黄色酵素の作用により、 $NADPH_2$ は分子状酸素によつて酸化を受ける。したがつて $NADPH_2$ 生成系および旧黄色酵素からなる反応系を用いて、消費される酸素を測定すれば旧黄色酵素の活性を示すことができる。

この反応に必要なグルコース-6-リン酸は *Horecker* ら⁽³⁹⁾の方法に従つて、グルコースを無水リン酸でリン酸化し合成した。

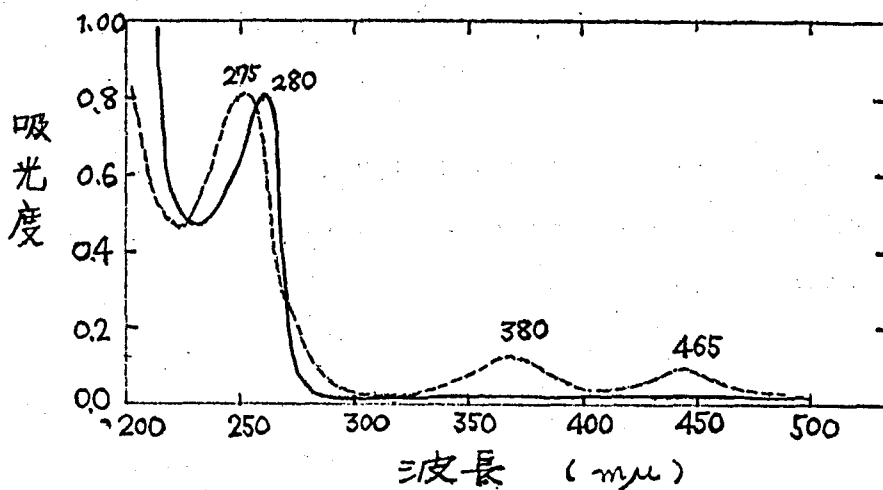
グリコース-6-リン酸脱水素酵素は 1961 年、結晶化に成功した *Noltman* ら⁽⁴⁰⁾の方法に従つてビール酵母より部分的に精製した標品を用いた。

旧黄色酵素は 1956 年、結晶化に成功した *Theorell* ら⁽⁴¹⁾の方法に従つてビール酵母より調製した。乾燥ビール酵母 1 kg から出発しておよそ 100 mg の酵素蛋白が得られたが結晶せず無晶型にとどまつた。

補酵素 *FMN* を脱離した旧黄色酵素蛋白 (旧黄色アポ酵素) は *Warburg, Christian* ⁽⁴²⁾ の方法に従って調製した。

図 10

旧黄色アポ酵素の吸収スペクトル



図中の数値は極大波長を示す

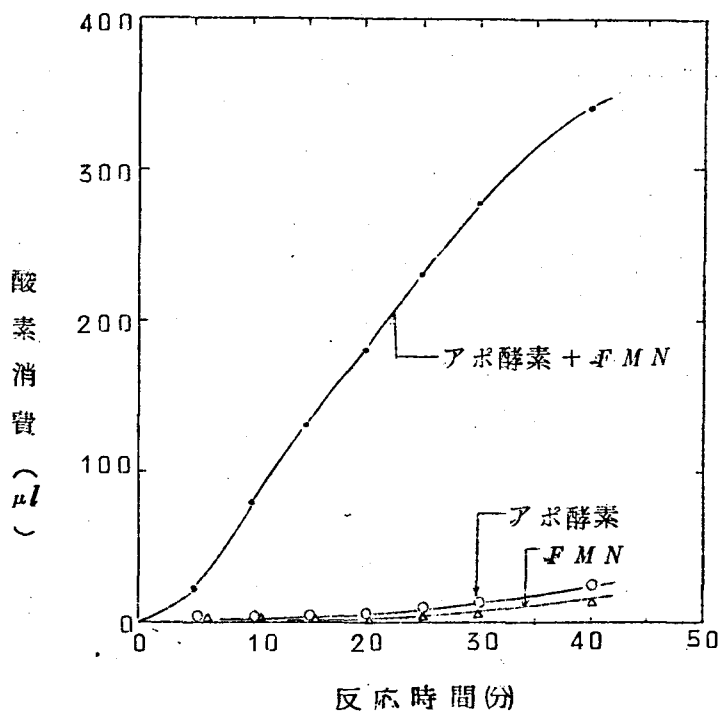
—— 旧黄色アポ酵素 (0.9 mg/ml) pH 7.4 リン酸緩衝液

----- 旧黄色酵素⁽⁴³⁾

活性測定によつて *FMN* の脱離したことは充分確認できる。アポ酵素標品の吸収スペクトルを測定した結果、唯一の吸収極大を有し、その波長は $280\text{ m}\mu$ であつた（図 10）。この吸収極大は蛋白特有のものであり、補酵素 *FMN* が脱離してない旧黄色酵素は *FMN* とほぼ同一の吸収スペクトルを与える (43)。

ワールブルグ検圧計を用い酵素反応の結果消費される酸素を測定した。

図 1 1 旧黄色アポ酵素の再活性化



反応条件

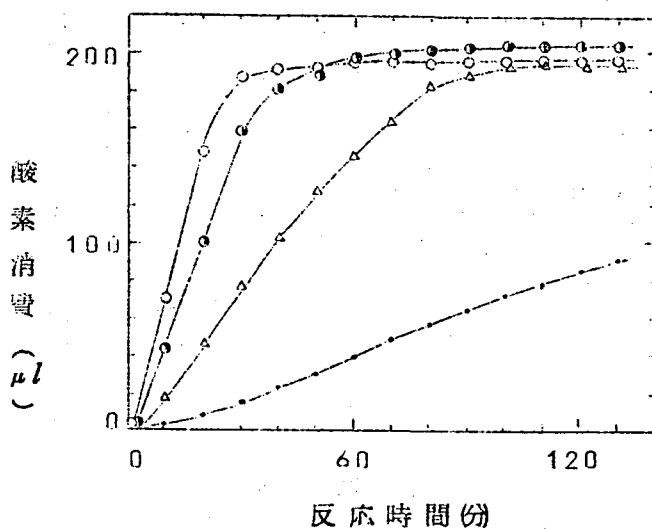
FMN $0.1\text{ }\mu\text{mole}$ を添加

他は実験の部に示した

$NADPH_2$ 生成系および旧黄色アポ酵素を含む反応系に FMN を添加すれば著しい酸素消費が認められるが、 FMN を添加しなければ酸素消費は認められない (図 11)。すなわち FMN を添加すれば旧黄色アポ酵素の活性が回復するが、 FMN を添加しなければ、活性は回復しない。この場合旧黄色アポ酵素を除けば、 FMN を添加しても酸素消費は認められない。このことはこの反応が非酵素的に進まないことを示している。

この旧黄色アポ酵素を含む反応系に、 FMN の代りに新しく合成した EMN あるいは、 TMN を添加した結果、それぞれ酸素吸収が認められた。補酵素としての活性はやはり、 FMN が一番高く、 EMN も FMN にかなり近い活性を示した。一方 TMN はあまり活性がなかつた (図 12)。

図 12 フラビンリン酸共存下の酸素消費



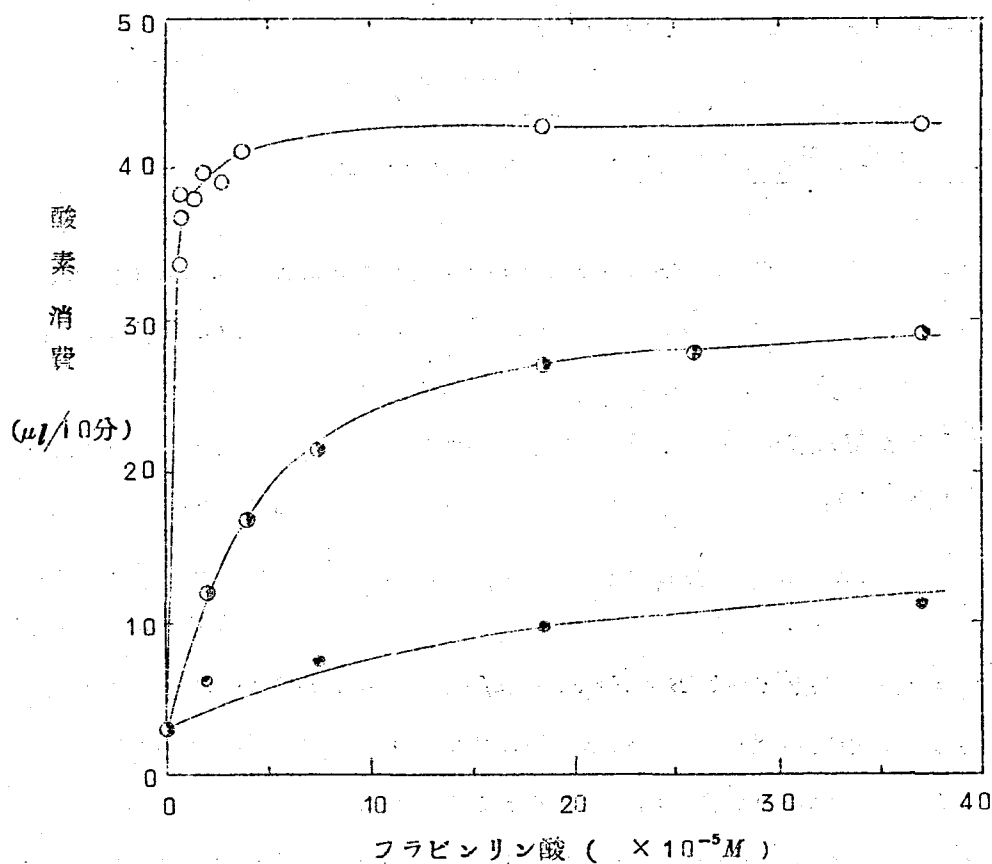
反応条件 フラビンリン酸 $0.1 \mu mole$ 、旧黄色アポ酵素 $4.3 mg$ を使用、他は実験の部に示した。

- 旧黄色アポ酵素 + FMN
- 旧黄色アポ酵素 + EMN
- △— 旧黄色アポ酵素 + TMN
- ◆— 旧黄色アポ酵素

単位時間当りの酸素消費量を算出した結果、*FMN*のそれを100%として、*EMN*は約70%、*TMN*は約20%であつた。

次に一定酵素蛋白量に対しフラビンリン酸の添加量をかえてみた(図13)。

図13 フラビンリン酸量と酵素蛋白量の関係



反応条件 グルコース-6-リン酸脱水素酵素 1.5 mg
旧黄色アポ酵素 6.7 mg を使用。他は実験の部に示した。

—○—○— *FMN*
—◐—◐— *EMN*
—●—●— *TMN*

その結果、補酵素としての活性は、*FMN*の最大活性を100%とすれば
*EMN*の最大活性は約70%であり、*TMN*の最大活性は約20%であるこ
 とが明らかになり、先の実験成績を裏づけることができた。さらに、この成
 績を利用し *Lineweaver-Burk* プロット⁽⁴⁾よりフラビンリン酸と酵素蛋白との
 解離恒数を算出した結果、*FMN*には $1.06 \times 10^{-6} M$ 、*EMN*には $2.94 \times 10^{-6} M$
*TMN*には $1.85 \times 10^{-5} M$ の解離恒数をそれぞれえた。

表 8 フラビン共存下の酸素消費

添 加 物	濃 度	酸素消費量	相対補酵素活性 *
無 添 加		$3 \mu / 10 \text{ min}$	%
<i>FMN</i>	$3.7 \times 10^{-6} M$	41	100
<i>B₇</i>	$3.7 \times 10^{-4} M$	20	45
<i>Erythroflavin</i>	$1.8 \times 10^{-4} M$	23	52
<i>Treoflavin</i>	$1.8 \times 10^{-4} M$	7	10

反応条件 実験の部に示した

* *FMN*の補酵素活性を100として算出した。

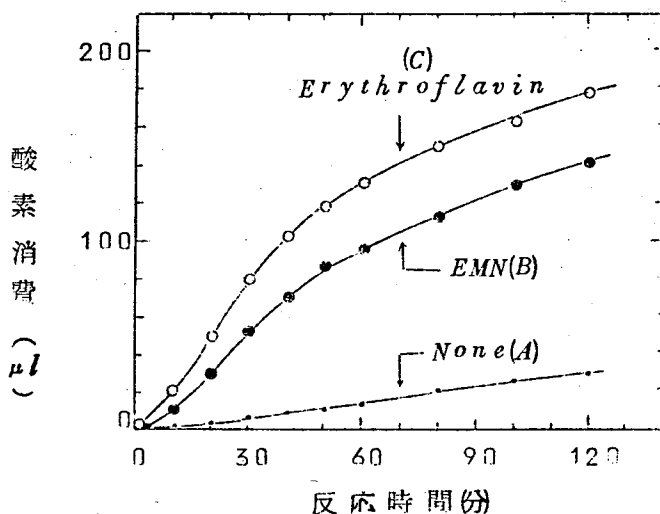
リン酸の結合してない *B₇*や *Erythroflavin*を *FMN*のかわりに添加し
 ても、酸素消費が認められた(表8)。すなわち、*B₇*や *Erythroflavin*
 も旧黄色アポ酵素の活性を回復することが明らかになった。

その理由として、第一に、酵素反応を行っている間に *B₇*や *Erythrofla-*
*vin*がそれぞれ、*FMN*や *EMN*に変化し、それらによる二次的な作用によ
 るもの、第二に、*B₇*や *Erythroflavin*自身の補酵素作用等が想定される。

まず、*Erythroflavin*を添加して反応し、その反応液より *EMN*を検
 出しようとした。すなわち、*Erythroflavin*を $0.1 \mu \text{ mole}$ 添加し
 て120分間酸素消費を測定した後(図14)、反応液を減圧のものと同濃縮

し、残留物のろ紙電気泳動⁽³⁾を行つた。対照実験として、*EMN* を $0.01 \mu mole$ 添加し、酸素消費を測定した後、同様に、ろ紙電気泳動を行つた。
EMN $0.01 \mu mole$ はろ紙電気泳動で充分検出可能な量である。

図 1 4 *Erythroflavin* 共存下の酸素消費



反応条件 *Erythroflavin* $0.1 \mu mole$,
EMN $0.01 \mu mole$, 旧黄色アポ酵素
 $18mg$ を使用した。他は実験の部に示した。

—•—•— 旧黄色アポ酵素 (A)
 —●— 旧黄色アポ酵素 + *EMN* (B)
 —○— 旧黄色アポ酵素 + *Erythroflavin* (C)

EMN の活性が *Erythroflavin* のそれより低いから、かりに、
Erythroflavin の活性がリン酸化の結果生成した *EMN* にもとずくとす
 れば、*Erythroflavin* の反応液から当然 *EMN* が検出される筈である。
 しかし、ろ紙電気泳動の結果、*EMN* は検出できなかつた (図 1 5)。

図 1.5 *EMN* および反応液のろ紙電気泳動

陰極	原点	陽極
	* ⊕ 4.7	<i>FMN</i>
	* ⊕ 4.3	<i>EMN</i>
	⊕ 0.3	<i>Erythroflavin</i>
	* ⊕ 4.2	試料* <i>A</i>
	* ⊕ 4.2	試料* <i>B</i>
	⊕ 0.4	試料* <i>C</i>

図中の数値は泳動距離を示す。単位 *cm*

展開条件 試料 * (図 1.4 の *A, B* および *C* にそれぞれ相応する反応液)

反応液を硫酸デシケーター中真空乾燥し
極く少量の水に溶解したもの

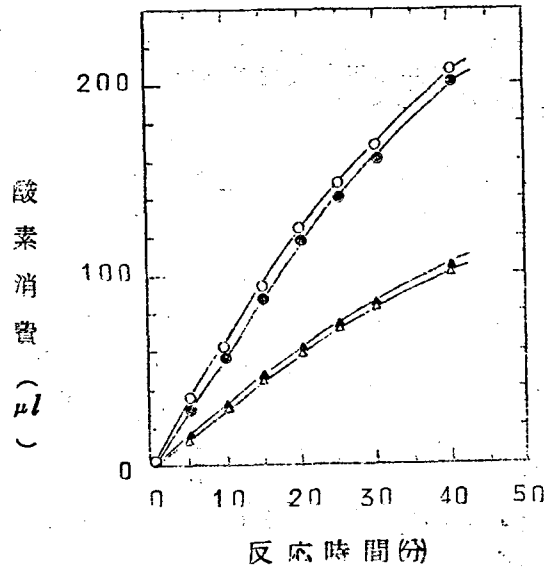
定電流 1.25 *mA/cm*

0.05*M* リン酸緩衝液 *pH* 8.0

3 時間室温 (15 °C) 暗所にて泳動

次に *ATP* の添加効果を検討した。その意図は酵素によつてフラビンがリン酸化されるためには、*ATP* あるいは *ADP* が必要であり、それを添加することによつてフラビンのリン酸化を促進することにある。フラビンの約 5 倍量の *ATP* をフラビンと同時に加え経時的に酸素消費を測定した。

図 16 B_2 およびFMN共存下の酸素消費におよぼすATPの影響



反応条件 グルコース-6-リン酸脱水素酵素 0.6 mg
 旧黄色アポ酵素 4.3 mg, ATP 0.5 μ mole
 およびフラビン 0.1 μ mole を使用した。
 他は実験の部に示した。

- 旧黄色アポ酵素 + FMN
- 旧黄色アポ酵素 + FMN + ATP
- △—△—△— 旧黄色アポ酵素 + B_2
- ▲—▲—▲— 旧黄色アポ酵素 + B_2 + ATP

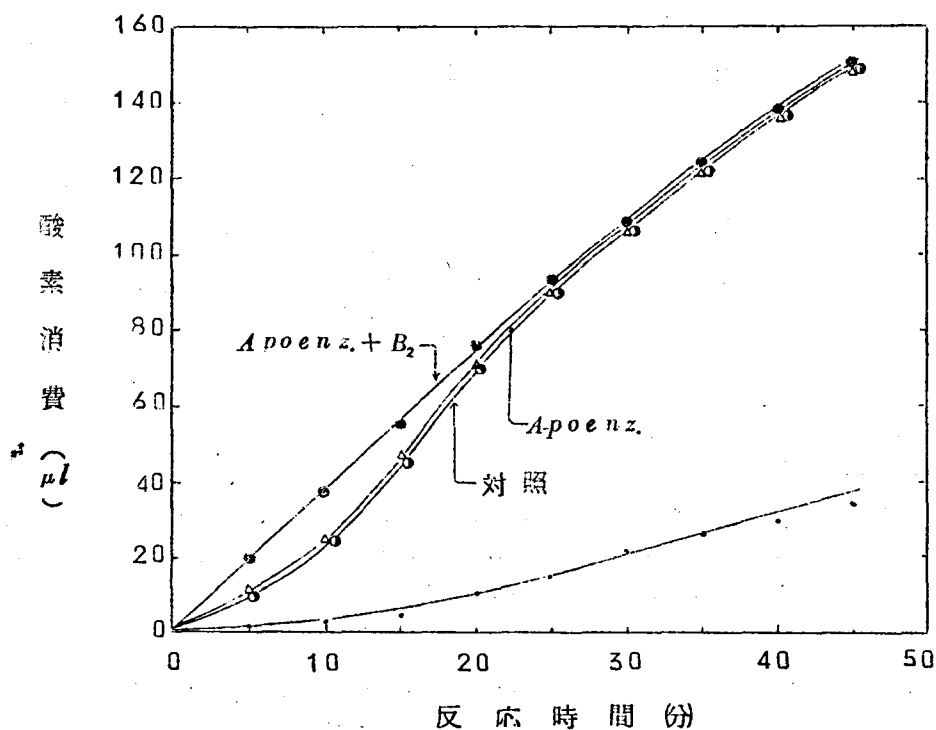
B_2 添加に対しても, FMN添加に対しても, ATPの添加は全く影響しなかった (図 16)。

このことは酵素によるリン酸化反応がおきていないことを示している。したがって, B_2 やErythroflavinがリン酸化を受けその結果生成したFMNやEMNの二次的な作用によるという第一の想定は否定された。

おそらく, B_2 およびErythroflavin自身の補酵素作用にもとづくもの

と考えられるがなお詳細は検討しなければならない。この点に関し、*Kuhn*⁶⁴はすでに、旧黄色アポ酵素実験において多量の B_2 は、*FMN* とほぼ同じ活性を示すことを指摘している。

図 17 B_2 共存下旧黄色アポ酵素の前処理と酵素活性



反応条件 実験の部に示した
前処理の条件

旧黄色アポ酵素 (*Apoenz.*) 12.9 mg, 0.362 m mole B_2 ,
0.1 M リン酸塩緩衝液 pH 7.5 にて全量 3.12 ml とする。

37°C 60 分間暗所に放置

- B_2 共存下, 旧黄色アポ酵素を加温
- △— 旧黄色アポ酵素のみ加温
- 加温しないもの (対照)
- B_2 を加えないで活性測定したもの

ここで、アポ酵素と B_2 を混合し、 37°C にあたため、 B_2 の共存が酵素活性を持続するのに役立つかどうか検討した。この操作をかりに前処理と呼ぶことにする。その結果、 B_2 を加えて前処理した酵素標品は、はじめの遅滞期なしに酸素消費が進行するのに対し、前処理しない酵素標品および、 B_2 を加えないで前処理した酵素標品はともに遅滞期が認められた(図17)。しかし酵素活性は60分ないし、120分間の前処理ぐらいでは、 B_2 の有無にかかわらず、影響されなかつた。

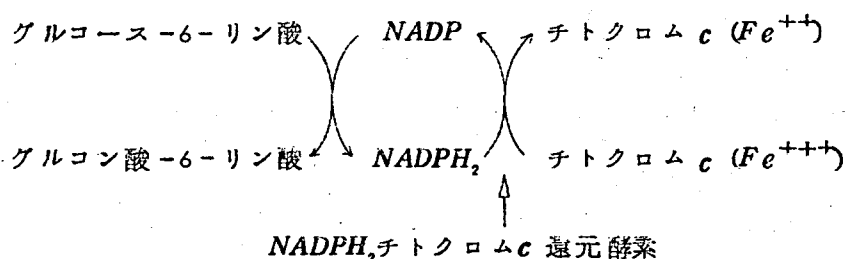
酵素蛋白が補酵素によつて安定化されているかどうか、殊に、 B_2 等の遊離のフラビンによつて酵素蛋白が保護されるという点については今後の研究をまたねばならない。

なお、 B_2 とアポ酵素を前処理することによつて遅滞期がなくなる例はFMNの場合にも観察される。

第二節 NADPH_2 チトクロム c 還元酵素実験

旧黄色酵素は *Turn over number*⁽⁴⁹⁾ が小さく、生化学的にあまり重要でないとされているので、もつと *Turn over number* の大きい酵素、酵母の NADPH_2 チトクロム c 還元酵素を次に選んだ。

図18 NADPH_2 チトクロム c 還元酵素反応



本酵素の *Turn over number*⁽³⁸⁾ は旧黄色酵素のその約 20 倍である。この酵素は図 18 に示すように $NADPH_2$ の水素をチトクロム *c* に伝達する反応を触媒する。

本酵素は酵母⁽³⁸⁾ および動物の肝臓⁽³⁹⁾ 等に存在し、そのうち、ビール酵母の本酵素は、補酵素が *FMN* である。本酵素は *Haas* ら⁽³⁹⁾ の方法に従い乾燥ビール酵母より調製した。また、*FMN* を脱離したビール酵母の $NADPH_2$ チトクロム *c* 還元酵素（アポ還元酵素）は、*Huennekens* ら⁽⁴⁰⁾ の方法に従って調製した。

旧黄色酵素実験（第二章、第一節）の時の $NADPH_2$ 生成系、およびチトクロム *c* 還元酵素系からなる反応系を用いて、還元されるチトクロム *c* を定量すれば、酵素活性を示すことができる。

活性測定は、*DU* 型ベックマン分光光度計を用い、生成する還元型チトクロム *c* に特有の吸収極大を示す波長 $550\text{ m}\mu$ の吸光度を測定した。

反応温度を 25°C に保つため、反応寸前まで酵素および、反応液を 25°C に保温しておいた。反応温度が 15°C 以下に低下するときわめて反応速度が遅くなるからである。

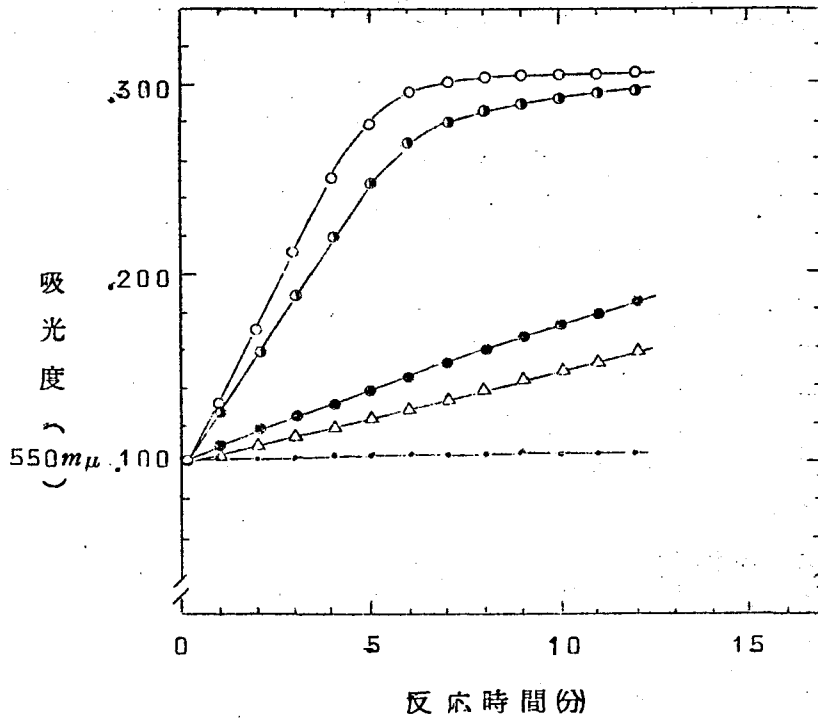
アポ還元酵素を含む反応系に *FMN* を添加すれば著しい吸光度の増大が認められるが、*FMN* を添加しなければ吸光度の増大は認められない（図 19）。すなわち、*FMN* を添加すればアポ還元酵素の活性が回復するが、*FMN* を添加しなければ活性が回復しない。

この場合、アポ還元酵素を除けば、*FMN* を添加しても吸光度の増加は認められない。すなわち、非酵素的にチトクロム *c* が還元されないことを示している。しかしフラビン濃度を 100 倍ないし 1000 倍に高くすれば、 $NADPH_2$ の水素は非酵素的にフラビンを介してチトクロム *c* に伝達される。

このことはすでに *Singer* ら⁽⁴⁷⁾ によつて明らかにされた事実である。

このアポ還元酵素を含む反応系に充分量のフラビンリン酸を添加した結果、

図 19 フラビンリン酸共存下，アポ還元酵素による
チトクロムC の還元



反応条件

フラビンリン酸 $0.001 \mu mole$ を使用した。
他は実験の部に示した。

- アポ還元酵素 + FMN
- アポ還元酵素 + EMN
- アポ還元酵素 + TMN
- △— アポ還元酵素
- FMN

それぞれ経時的な吸光度の増大が認められた。

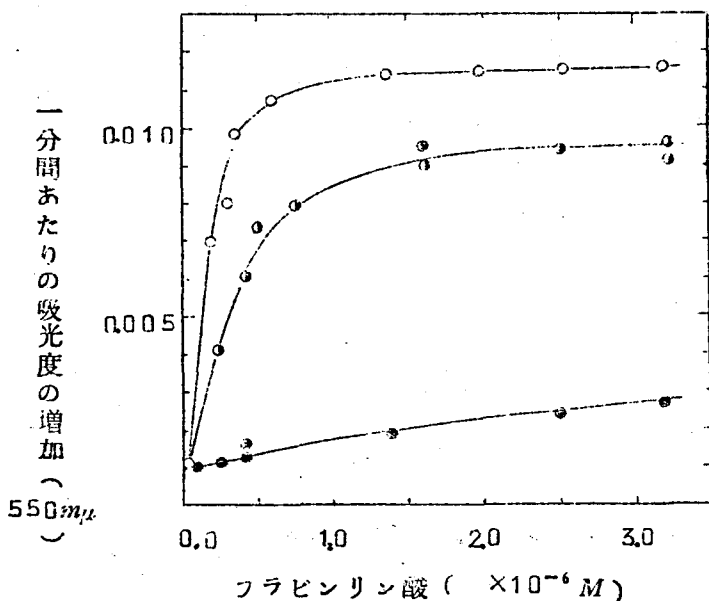
補酵素としての活性はやはり，FMNが一番高くEMNもFMNにかなり
近い活性を示した。一方TMNはあまり活性がなかった。

単位時間当りの吸光度の増加からそれぞれの活性を算出した結果，EMN

は *FMN* の約 70 % の活性があり、一方 *TMN* は *FMN* の約 10 % の活性を示すにとどまつた。

天然に存在する *L-Lyxoflavin* のリン酸エステル、*L-Lyxoflavin-5'-monophosphate* は同一酵素実験において、*FMN* の約 75 % の活性がある(8)。

図 20 フラビンリン酸量と酵素蛋白量の関係



反応条件 グルコース-6-リン酸脱水素酵素 0.12 mg

アポ還元酵素 0.62 mg

他は実験の部に示した。

—○—○— *FMN*

—◐—◐— *EMN*

—●—●— *TMN*

次に一定蛋白量に対しフラビンリン酸の添加量をかえ、アポ還元酵素の活性と添加されたフラビンリン酸の濃度との関係を検討した。その結果、補酵素としての活性は、*FMN* の最大活性を 100 % とすれば、*EMN* の最大活

性は約70%であり、TMNの最大活性は約10%であることが明らかになった(図20)。

Lineweaver-Burkプロット⁽⁴⁴⁾より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、FMNには $1.52 \times 10^{-7} M$ 、EMNには $2.17 \times 10^{-7} M$ 、およびTMNには $1.03 \times 10^{-6} M$ の解離恒数をそれぞれえた。

表9 フラビン共存下、アポ還元酵素による
チトクロムCの還元

添加物	濃度	1分間当りの 吸光度の増加	相対補酵素活性*
無添加		0.005	%
FMN	$3.3 \times 10^{-7} M$	0.034	100
B ₂	$3.3 \times 10^{-7} M$	0.019	48
Erythroflavin	$3.3 \times 10^{-7} M$	0.010	17
Threoflavin	$3.3 \times 10^{-7} M$	0.008	10

反応条件 実験の部に示した

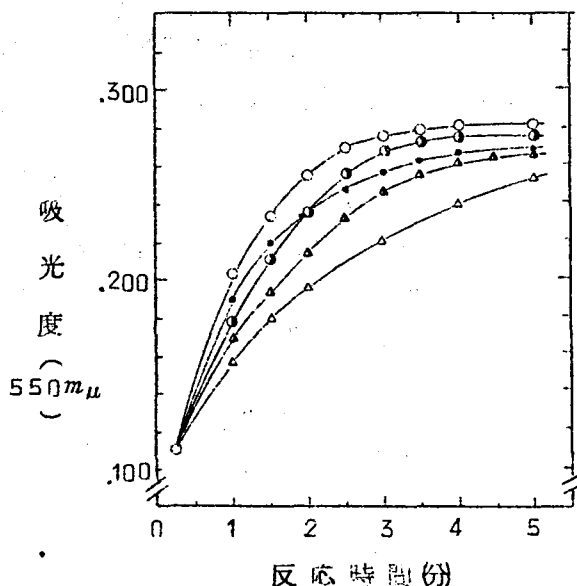
* FMNの補酵素活性を100として算出した

リン酸の結合してないB₂やErythroflavinを、FMNの代りに添加しても、吸光度の増大が認められた。すなわちB₂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。

旧黄色酵素の場合と同じように、多分、B₂およびErythroflavin自身の補酵素作用と考えられる(表9)。

FMNとEMN、あるいはFMNとTMNを同時に添加した場合FMNを単独で添加した時より、わずかに反応速度が小さくなるが(図21)、おそらくEMNやTMNがFMNと競合的に酵素蛋白と作用するためだろうと考えられる。しかし詳細は不明である。

図 2 1 *FMN* 共存下, チトクロム *c* の還元におよぼす
EMN あるいは *TMN* の影響



反応条件 フラビンリン酸 $0.001 \mu mole$ を使用した。
他は実験の部に示した。

- *FMN*
- *FMN* + *EMN*
- *EMN*
- ▲—▲— *TMN* + *FMN*
- △—△— *TMN*

第三節 考 察

合成した *Erythroflavin-4'-monophosphate* (*EMN*) および
Threoflavin-4'-monophosphate (*TMN*) は, *FMN* の同族体であ
るから *FMN* を補酵素とする旧黄色酵素と酵母の $NADPH_2$ チトクロム *c* 還元
酵素をえらび, *EMN* および *TMN* の補酵素活性を検討した。

旧黄色酵素を用いて測定した結果、*EMN*は*FMN*の約70%の活性があつたが、*TMN*は*FMN*の約20%の活性しかなかつた（図12および図13）。

酵母の*NADPH*₂チトクロム*c*還元酵素を用いて測定した結果も、ほぼ同一であつた（図19および図20）

このように*EMN*と*TMN*の補酵素としての活性の相異はいかなる理由によるか明らかでない。しかし両者の構造上の相異は2'位の水酸基の配位にあるから、この2'位の水酸基の配位は他の水酸基の配位より重要な役割をはたすものと考えられる。すなわち、両酵素においては、2'位の水酸基の配位が*Erythroflavin*のそれに等しいフラビン活性が高く、*Threoflavin*のそれに等しいフラビンは活性が低いということになる。

更に、多くのフラビン誘導体のみならず、フラビン酵素についても検討しなければ最終的な結論にはならないが、補酵素活性があるとされている*B₇*、*L-Arabo*flavin、および、*L-Lyx*oflavin はいずれも2'位の水酸基の配位が*Erythroflavin*のそれに等しいことは興味がある。

すでに、酵母の*NADPH*₂チトクロム*c*還元酵素を用いた研究によつて*L-Lyx*oflavin-5'-monophosphate が*FMN*の約75%の補酵素活性のあることが明らかにされているが、この成績と比較して、*Erythroflavin*-4-monophosphate の約70%の補酵素活性に興味がある。

結 論

四炭糖ポリアルコールの *Tetritol* 基を結合した新しいフラビン、*Erythroflavin* および *Threoflavin* を合成し、更に両フラビンをリン酸化し、*Erythroflavin-4^l-monophosphate* および *Threoflavin-4^l-monophosphate* を合成した。

FMN を補酵素とする旧黄色酵素および、酵母の *NADPH₂* チトクロム *c* 還元酵素を用いて *Erythroflavin-4^l-monophosphate* および *Threoflavin-4^l-monophosphate* の補酵素活性を検討した結果 *Erythroflavin-4^l-monophosphate* は、*FMN* の約 70% の活性があり、*Threoflavin-4^l-monophosphate* は、*FMN* の約 20% の活性があることが明らかになった。

終に、本研究に際して終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学教授上原喜八郎先生に篤く御礼申し上げます。また種々有益な御助言、御指導をいただいた菅野浩一博士を始め、実験の一部に御協力下さつ馬場良子女史、赤外部吸収スペクトルの測定および判読に協力を賜りました鈴木美代子技官に謝意を表します。

また、高圧接触還元、元素分析および旋光度の一部の測定を行つていただきました武田薬工研究所白川研蔵博士、3,4-Xylidineの御恵与をいただきました武田薬工研究所、ビール酵母を御恵与下さつたキリンビール株式会社および、アサヒビール株式会社に謝意を表します。

実 験 の 部

第一章 第一節の実験

[1] *Erythroflavin* の 合 成

(1.1) *D-Erythrose*⁽¹²⁾ (II)

D-グルコース 15 g (0.083 mole) を水 30 ml に溶解し氷酢 1500 ml と混合する。これに四酢酸鉛 77 g (0.166 mole) を加えはげしく振とうする。15 分間振とうした後、これに *Oxalic acid* 19 g (0.15 mole) を氷酢 200 ml に溶解して加え、30 分間振とうする。沈殿をろ去しろ液は 45 °C にて減圧濃縮し酢酸を回収する。残留物に酢酸エチル 50 ml あて 5 回加え抽出した後、抽出液は酢酸エチルを回収する。得られた油状物質 9.9 g は 0.05 *N* 塩酸 990 ml に溶解し、50 °C にあたためながら 2 時間加水分解する。放冷後、*Amberlite* IR45 (OH 型) カラム (9.6 cm² × 18 cm 100 mesh) を用いて酸を除く。水溶液は 45 °C にて減圧濃縮する。無色透明なシラップ、収量 6.2 g (50%), 純度 80%
なお純度は *Dische* 法⁽⁴⁸⁾ (比色法) およびヨード滴定⁽⁴⁹⁾ によつて決定した。

(1.2) *N-D-Erythrityl-3,4-*

-dimethylaniline (VI)

メタノール 25 ml に *D-Erythrose* (II) シラップ (純度 80%) 5.0 g (0.033 mole) を、またメタノール 28 ml に 3,4-*Xylidine* (I) 4.4 g (0.033 mole) をそれぞれ溶解し、ちつ素中両者を混合した後 18 °C にて 3 時間振とうする。ついでこの反応液に *Raney nickel* 4 g および 40 ml のメタノールを加え、75 気圧 18 °C - 40 °C にて 4

時間，高圧接触還元する。還元終了後，触媒をろ去し，メタノールを回収すると結晶が析出する。メタノールから再結晶，無色針晶 mp 126°C - 127°C，収量 2.4 g (32%) $[\alpha]_D^{19} - 4.1^\circ$ (C 1.0 0.1 N 塩酸)

$C_{12}H_{19}O_3N$ 計算値 C, 63.97 : H, 8.50 : N, 6.22

実験値 C, 64.19 : H, 8.36 : N, 6.35

IR $\nu_{max}^{Nujol\ cm^{-1}}$: 3460, 3310, 1078, 1046, 1010,
893, 815, 802 (Shoulder)

(1.3) 4,5-Dimethyl-2-phenylazo-N-D-
-erythritylaniline (Ⅷ)

濃塩酸 9.2 ml と酢酸ナトリウム 15.2 g を含む水溶液 56 ml に (VI) 6.2 g (0.0267 mole) をけん濁し，-10°C にてアニリン 3.2 g (0.034 mole) より調製したアニリンジアゾニウム水溶液と酢酸ナトリウム溶液 ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$ 14.2 g を 70 ml の水に溶解) とを交互に加え，pH 3.0 に調整しながらはげしくかくはんする。その後 0°C - 5°C にて 4 時間かくはんを続ける。析出した橙赤色沈殿を吸引ろ過し水洗，乾燥した後，60% エタノールから再結晶，橙赤色針晶 mp 148°C 収量 4.0 g (48%)

$C_{18}H_{23}O_3N_3$ 計算値 C, 65.51 : H, 7.03 : N, 12.75

実験値 C, 65.82 : H, 6.96 : N, 12.77

(1.4) 6,7-Dimethyl-9-(D-1'-erythrityl)-
-isoalloxazine (X)

(Erythroflavin)

n-ブタノール 22 ml 中に Barbituric acid 1.59 g

(12.42 *m moles*) および (Ⅳ) 2.04 *g* (6.21 *m moles*) を混合し、氷酢 3.1 *ml* を加え、130℃の油浴上、5時間還流加熱する。冷却した後、析出物をろ取りメタノールで洗浄した後、乾燥する。固型物は18.6 *ml*の水と30分間80℃に加熱しねりあわす。あついうちに吸引ろ過し水洗、メタノール洗浄乾燥する。このものを6*N*塩酸20 *ml*に溶解し活性炭処理した後沸とう水、50 *ml*に注ぎ氷室に一夜放置する。析出した結晶は6*N*塩酸から再結晶、橙黄色リン片晶 *mp* 285℃ (*decomp.*) 収量0.97 *g* (45%) $[\alpha]_D^{21} - 10.6^\circ$ *

$C_{16}H_{18}O_5N_4$ 計算値 C, 55.48 : H, 5.24 : N, 16.18

実験値 C, 55.51 : H, 5.20 : N, 15.99

$IR \nu_{max}^{Nujol\ cm^{-1}}$: 3350, 1070, 1046-1028 (*Broad*), 1013, 890,

$UV \lambda_{max\ m\mu} (\log \epsilon)$: 224 (4.36), 267 (4.41)

373 (3.92), 445 (3.99)

[2] Threoflavin の合成

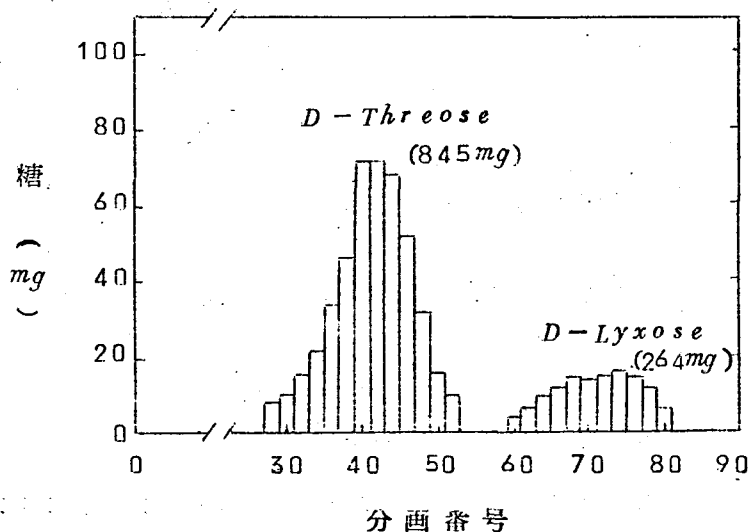
(2.1) D-Threose⁽¹²⁾ (Ⅲ)

D-ガラクトース 15 *g* (0.083 *mole*) を水 30 *ml* に溶解し氷酢 1500 *ml* と混合する。これに四酢酸鉛 75.5 *g* (0.171 *mole*) を加えはげしく振とうする。15分間振とうした後、これに *Oxalic acid* 19 *g* (0.15 *mole*) を氷酢 200 *ml* に溶解して加え、30分間振とうする。沈殿をろ去し、ろ液は45℃にて減圧濃縮し酢酸を回収する。黄色油状の残留物 14.9 *g* は0.05*N*硫酸 1500 *ml* に溶解し45℃にあたためながら18時間加水分解する。放冷後 *Dowex* 1×2 (*HCO₃*型)を用いて酸を除き、水溶液を45℃にて減圧濃縮する。得ら

* 日本薬局方に従つて測定

れた粗製 *D-Threose* 9.7 g はセルローズ粉末カラム ($9.6\text{ cm}^2 \times 43\text{ cm}$, 200 mesh) および展開液に水半飽和 *n*-ブタノールを用いて精製した⁽⁵⁰⁾ (図 2 2)。

図 2 2 カラムクロマトグラフィによる
D-Threose の精製



条 件

セルローズ粉末カラム (200 mesh) : $9.6\text{ cm}^2 \times 43\text{ cm}$

展開液 : 水半飽和 *n*-ブタノール, 15 ml 分画, 流速 20 ml/時間

検体 : *D*-ガラクトースより調製した粗製 *D-Threose* (本文参照)

シラップ 2.0 g を溶解した水溶液 2.0 ml

検出 : *D-Threose* は *Dische* 法⁽⁴⁸⁾ により, *D-Lyxose* は *Bial* 法⁽⁵¹⁾ によりそれぞれ測定

溶離した *D-Threose* 分画は集めて減圧濃縮し残留物を水に溶解し活性炭処理した後再び濃縮する。無色透明なシラップ，収量 6.8 g (48%) 純度 66%，なお純度は *Dische* 法⁽⁴⁰⁾ (比色法) によつて決定した。

D-Erythrose および *D-Threose* のペーパークロマトグラフィは表 10 に示した。いずれも単一であつた。

表 10

D-Erythrose および *D-Threose* の
ペーパークロマトグラフィ (Rf 値)

糖	展 開 溶 媒		
	A	B	C
<i>D-Erythrose</i>	0.32	0.57	0.33
<i>D-Threose</i>	0.39	0.62	0.40

東洋ろ紙 No. 50 下降法 室温にて展開
風乾後硝酸銀試薬⁽⁵²⁾ にて呈色

展開溶媒 A. *n*-ブタノール：エタノール：水 (4：1：5)

B. イソプロパノール：水 (6：1)

C. 水半飽和 *n*-ブタノール

(2.2) *N-D-Threityl-3,4-dimethylaniline* (VII)

D-Threose (III) のシラップ (純度 66%) 5.0 g (0.029 mole) を 50 ml のメタノールに，また 3,4-Xylidine (I) 3.5 g (0.029 mole) を 50 ml のメタノールにそれぞれ溶解しちつ素中混合し 15℃ にて 3 時間振とうする。ついで *Raney nickel* 3.5 g およびメタノール 50 ml を加えて 100 気圧 25℃ - 40℃ で 4 時間高圧接触還元する。還元終了後触媒をろ去しメタノールを回収する。*N-D-Threityl-*

3,4-dimethylaniline (VII) は油状物質で結晶しなくそのまま次の反応に用いる。

(2.3) 4,5-Dimethyl-2-phenylazo-
-N-D-threitylaniline (IX)

油状 (VII) 3.3 g (8.9 mmole) は 2 N 塩酸 16.1 ml と酢酸ナトリウム 4.12 g を混合した水溶液に溶解しこれにアニリン 1.13 g (12.2 mmole) から調製したアニリンジアゾニウム水溶液を加えて 10 °C で 2 時間さらに順に温度をあげ、室温 (15 °C) になるまでの約 8 時間かくはんを続ける。酢酸ナトリウム水溶液 ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5.1g を水 28.5 ml に溶解) を加えて pH 3.0 をたもつ。析出した暗赤色沈殿を水洗乾燥した後 60 % エタノールより再結晶する。赤色針晶 mp 119 °C - 120 °C。収量 0.6 g (D-Threose より算出して 15 % の収率)。

$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{N}_3$ 計算値 C, 65.51 : H, 7.03 : N, 12.75

実験値 C, 65.76 : H, 7.07 : N, 12.56

(2.4) 6,7-Dimethyl-9-(D-1'-threityl)-
-isoalloxazine (XI)
(Threoflavin)

n-ブタノール 17.7 ml 中に, Barbituric acid 1.65 g (12.9 mmole) と (IX) 2.12 g (6.45 mmole) を混合し氷酢酸 3.2 ml を加えて油浴上 115 °C にて 1 時間還流加熱する。析出物をろ取り n-ブタノールで洗浄した後乾燥する。得られた粉末に水 12 ml を加え 80 °C にて 20 分間ねりあわせ、あついうちにろ過し水洗、メタノール洗浄後乾燥する。このものを 6 N 塩酸 9 ml に溶解し活性炭処理しろ液を沸とう水 27 ml に注ぎ氷室に一夜放置する。析出した黄色針晶をろ取り水洗した後乾燥する。6 N 塩酸から再結晶 黄色リン片晶

mp 282°C (decomp) 収量 1.09g (49.5%) $[\alpha]_D^{15} +30^{\circ}$ *

$C_{16}H_{18}O_5N_4$ 計算値 C, 55.49 : H, 5.24 : N, 16.18

実験値 C, 55.23 : H, 5.10 : N, 15.70

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol cm}^{-1}}$: 3350 (Shoulder), 1080, 1046-1028 (Broad),
1014, 890 (Shoulder).

UV $\lambda_{\text{max}} m\mu (\log \epsilon)$: 224 (4.42), 266 (4.43), 375 (3.92), 445 (4.01).

第一章 第二節の実験

[1] リン酸化に用いるメタリン酸⁽²⁴⁾

85%のオルトリン酸 5.0 ml を直火でゆつくり加熱しメタリン酸の結晶があらわれるまで続け白濁が生じたら放冷する。

[2] *Erythroflavin-4'-monophosphate* (XII)

(2.1) *Erythroflavin* のリン酸化

粉末にした *Erythroflavin* 420mg (1.21mmoles) に 5 ml のオルトリン酸から調製したメタリン酸を加え 65°C に加温しながら 30 分間速やかにねりあわせる。得られた橙色粘ちよう物は氷冷しながらこれに 40 ml の水を加える。水溶液を遠心分離して上清を集める。沈殿は黄色がなくなるまで繰返し水洗する。上清および水洗液はあわせて 45°C にて減圧濃縮する。

* 日本薬局方に従つて測定

残った橙色シラツブにエタノール70 mlを加えて冷蔵庫に数日間放置する。析出した沈殿は遠心分離して集め少量のエタノールおよびエーテルで洗浄して乾燥する。上清のエタノール溶液は減圧濃縮し残留物を水70 mlに溶解した後活性炭を加えてフラビンリン酸を吸着する。この活性炭は水洗した後ピリジン水（ピリジン，メタノールおよび水の等量混合物）で45℃にあたためながら抽出し，抽出液は溶媒を回収する。残留物に少量のエタノールを加え，生成した沈殿を遠心分離して集め，エタノールおよびエーテルで洗浄した後乾燥する。えられた黄色粉末はさきのもものと合す。吸湿性黄色粉末295 mg

(2.2) *Erythroflavin-4'-monophosphate* の

精製

粗製の粉末295 mgは1N塩酸25 mlにけん濁し，油浴上100℃にて1時間加熱した後，45℃にて減圧濃縮する。残留物に10倍量のエタノールを加えすりつぶす。生成した黄色沈殿は遠心分離して集め少量のエタノールで洗浄した後乾燥する。えられた黄色粉末160 mgを水3.0 mlにけん濁し，5%炭酸水素ナトリウム溶液で中和する。このけん濁液を遠心分離し，上清を集める。沈殿は水2.0 mlあて3回洗浄し水洗液は上清に合す。この水溶液は澄明になるまで少過剰の活性炭を用いて処理する。ろ液は1N塩酸を滴下しpH 1.0に調整した後減圧濃縮する。析出した黄色微細結晶は遠心分離して集め無水エタノールで洗浄した後乾燥する。黄色粉末mp 227℃ (decomp)。
収量77 mg (13.2%)， $[\alpha]_D^{15} -18^{\circ}$ *

* 日本薬局方に従って測定

$C_{16}H_{17}O_8N_4P \cdot H_2O$ 計算値 C, 43.47 : H, 4.76 : N, 12.63

実験値 C, 42.69 : H, 4.38 : N, 11.28

UV, $\lambda_{max} m\mu$ (log ϵ) : 223 (4.43) , 267 (4.42) , 373 (3.94)

445 (4.01)

[3] Threoflavin-4'-monophosphate (XIII)

(3.1) Threoflavin のリン酸化

粉末にした Threoflavin 460 mg (1.33 mmol) に 5 ml のオルトリン酸から調製したメタリン酸を加え、65 °C に加温しながら速やかに 30 分間ねりあわせる。氷冷しながら、反応液に水 50 ml を加え、遠心分離して上清を集める。沈殿は黄色がなくなるまで繰返し水洗する。上清および水洗液はあわせて、45 °C にて減圧濃縮する。残留物にエタノール 70 ml を加えて冷蔵庫に数日間放置する。生成した沈殿を遠心分離して集め、少量のエタノールおよびエーテルで洗浄後乾燥する。上清のエタノール溶液は減圧濃縮し残留物を水 70 ml に溶解した後、活性炭を加えてフラビンリン酸を吸着する。この活性炭は水洗した後、ピリジン水 (ピリジン、メタノールおよび水の等量混合物) で 45 °C にあたためながら抽出し、抽出液は溶媒を回収する。残留物に少量のエタノールを加え、生成した沈殿を遠心分離して集め、エタノールおよびエーテルで洗浄した後、乾燥する。得られた粉末はさきのもものと合す。吸湿性黄橙色粉末 322 mg

(3.2) Threoflavin-4'-monophosphate の

精製

粗製の黄橙色粉末 322 mg は 1 N 塩酸 20 ml にけん濁し、100 °C にて 1 時間加熱した後、45 °C にて減圧濃縮する。残留物に

10 倍量のエタノールを加え，すりつぶす。生成した黄色沈殿は遠心分離して集め，エタノールで洗浄した後，乾燥する。えられた黄橙色粉末 215 *mg* は水 4.8 *ml* にけん濁し，加熱沸とうさせる。その後，氷冷し遠心分離して沈殿を集め，エタノールで洗浄した後乾燥する。えられた黄橙色粉末 190 *mg* を水 4.0 *ml* にけん濁し，5%炭酸水素ナトリウム溶液で中和する。

このけん濁液を遠心分離し，上清を集める。沈殿は水 2.0 *ml* あて 3 回洗浄し，水洗液は上清に合す。水溶液は澄明になるまで少過剰の活性炭を用いて処理する。

ろ液に 1 *N* 塩酸を滴下し *pH* 1.0 に調整した後，減圧濃縮する。析出した黄橙色微細結晶は遠心分離して集め，無水エタノールで洗浄した後乾燥する。黄橙色粉末 *mp* 202°C (*decomp*) 収量 67 *mg* (10.5%)
 $[\alpha]_D^{15} + 64^\circ *$

$C_{16}H_{19}O_8N_4P \cdot 2H_2O$ 計算値 C, 41.56 : H, 5.01 : N, 12.11

実験値 C, 41.90 : H, 4.65 : N, 11.91

UV $\lambda_{max}, m\mu$ ($\log \epsilon$) : 223 (4.42) , 267 (4.44)

373 (3.95) , 445 (4.03)

* 日本薬局方に従つて測定

第一章 第三節の実験

[1] フラビンリン酸のリン酸の定量

フラビンリン酸を含む水溶液 1.0 ml に 60% 過塩素酸液 1.0 ml を加え、 15 分間砂浴上に加熱する。冷後、 30% 過酸化水素水を数滴加え、数分間加熱し、さらに水 1.0 ml を加えふたたび数分間加熱する。冷後、水 7.5 ml 、 5% モリブデン酸アンモニウム液 1.0 ml および、用時調整した 2.0% 硫酸第一鉄液 0.5 ml を加え混合し、 10 分後、青色を *Coleman* 比色計を用い、 $665\text{ m}\mu$ の吸光度を測定する。対照実験として、リン酸の結合していないフラビンを同様に操作した。なお検量線は、*King*⁽²⁵⁾の方法に従い、別に測定した。結果は表1に示した。

[2] 過ヨード酸酸化

(2.1) 反 応

フラビンおよびフラビンリン酸は、用時、 0.05 M 塩化カリウム塩酸緩衝液 $\text{pH } 2.0$ に溶解し、 0.1 mM および 1 mM の濃度にそれぞれ調整する。過ヨード酸は水に溶解し、亜ヒ酸ナトリウム液で秤定した後、 0.1 M の濃度に調整する。用時、 0.05 M 塩化カリウム塩酸緩衝液 $\text{pH } 2.0$ を用いて任意の濃度に希釈する。

$1\text{ mM Erythroflavin-4'-monophosphate}$ 水溶液 3.0 ml に、 4 mM 過ヨード酸液 3.0 ml を加え 38°C にて、 $1\text{ mM Threoflavin-4'-monophosphate}$ 水溶液 3.0 ml に 1.5 mM 過ヨード酸液 3.0 ml を加え 15°C にて、 1 mM FMN 水溶液 3.0 ml に 3 mM 過ヨード酸液 3.0 ml を加え、 38°C にて、それぞれ酸化反応を行う。対照実験として $0.1\text{ mM Erythroflavin}$ 水溶液 20 ml および $0.1\text{ mM Threoflavin}$ 水溶液 20 ml にそれぞれ 0.3 mM

過ヨード酸液 2.0 ml を加え 15°C にて反応した。

(2.2) 消費された過ヨード酸の定量

分光学的測定

反応液 0.2 ml をとりだし 0.05 M 塩化カリウム-塩酸緩衝液 pH 2.0 を加え、全量 8.0 ml とし、日立 EPU-2A 型光電比色計を用いて波長 223 mμ における吸光度を測定する。

過ヨード酸の分子吸光係数 ($\lambda = 223 \text{ m}\mu$)

$$= 6.8 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

反応開始直前の吸光度はフラビンリン酸溶液および過ヨード酸液についてそれぞれ単独の吸光度を測定し、その和をもつて代用する。対照実験については反応液 3.0 ml をとりだしそのまま吸光度を測定する。

なお過ヨード酸のみあるいは、フラビンリン酸のみを同時に操作し、それらの自然分解にもとづく吸光度の増減を補正した。

結果は図 6 および表 2 に示した。

容量分析

反応液 0.5 ml をとりだし、水 1.0 ml および 5% 炭酸水素ナトリウム液 1.0 ml を加えて弱アルカリ性 pH 7.8 に調整し、これに 20% ヨウ化カリウム液 0.3 ml を加えて室温に 15 分間放置した後、遊離したヨードを 0.001 N 亜ヒ酸ナトリウム液で滴定する。指示薬 2% 澱粉溶液。

なお反応開始直前の価は過ヨード酸液 0.25 ml を同様に操作したものを代用する。

対照実験については、反応液 5.0 ml に水 3.0 ml および 5% 炭酸水素ナトリウム液 2.0 ml を加えて弱アルカリ性 pH 7.8 に調整し、以下上記の方法と同様に行う。

結果は表 2 に示した。

第二章 第一節の実験

[1] 試 薬

(1.1) フラビンおよびフラビンリン酸

Erythroflavin, *Threoflavin* およびそれらのリン酸エステル, *FMN*は合成したものを用いた。(第一章参照) フラビンおよびフラビンリン酸の濃度は450 $m\mu$ における分子吸光係数より秤定した。

(1.2) グルコース-6-リン酸

Horecker, *Seegmiller* ら⁽³⁹⁾の方法に従つて調製し、その水溶液の濃度は*Dreywood*のアンスロン法⁽⁵³⁾およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素⁽³⁹⁾を用いる方法によつて秤定した。

(1.3) B_2 , *NADP* および *ATP*

いずれも市販品を用いた。

[2] 酵 素

(2.1) グルコース-6-リン酸脱水素酵素

Noltman ら⁽⁴⁰⁾の方法に従い次のように調製した。なおビール酵母はキリンビール株式会社より御恵与いただいた。

乾燥ビール酵母150 gを0.2 M硫酸アンモニウム(硫安と略す)溶液 pH 8.9 (硫安溶液にアンモニア水を加え pH 8.9に調整した。)1500 mlに加え、25°C一夜抽出した後、遠心分離する。

上清(分画I)1260 mlに硫安320 gを溶解し2 N硫酸を滴下し pH 5.4に調整した後、*Celite* を用いてろ過する。

ろ液（分画Ⅱ）1470 ml に0.5 M硝酸銀溶液15 mlを混和し、2N硫酸を滴下してpH 4.5に調整した後、数時間かくはんし遠心分離する。沈殿を集め、0.05 Mエチレンジアミン四酢酸（以下EDTA）ナトリウム溶液pH 8.0の150 mlおよび100 mlを用いて2回抽出し遠心分離して上清を集める。

表11 グルコース-6-リン酸脱水素酵素の精製

精製過程	総蛋白量 mg	総活性 unit*	収率 %	比活性 unit/mg protein
I	37.300	22,700	100	0.6
II	32.150	21,500	95	0.7
III	3.690	6,160	27.2	1.7
IV	3.44	3,180	14.0	7.6
V	6.62	3,150	13.9	47.6
VI	3.60	3,050	13.5	82.5

* 340 m μ の吸光度0.100/min.を示す酵素量を1 unitとする。

上清（分画Ⅲ）220 ml に硫酸54.6 gを溶解し、遠心分離して上清を集め、この上清223 mlに、さらに硫酸29.2 gを溶解し遠心分離する。沈殿を集め、0.01 Mシステインの0.05 M EDTA 溶液pH 8.0 30 ml に溶解し0.001 M硫酸マグネシウム溶液中透析する。

透析内液（分画Ⅳ）33 ml に1 M酢酸マグネシウム溶液3.7 ml および2N硫酸0.9 mlを混和した後、冷却した95%エタノール9.2 mlを滴下する。遠心分離して沈殿を集め、0.1 M酢酸マグネシウム溶液60 mlに溶解する。

この溶液（分画Ⅴ）6.3 ml にベントナイト30 mgを加え、遠心分離

して上清を集める。

上清（分画Ⅵ）5.5 ml を本酵素標品として用いた。

（2.2） 旧黄色酵素

Theorell⁽⁴¹⁾の方法に従い次のように精製した。ビール酵母はアサヒビール株式会社より御恵与いただいた。

乾燥ビール酵母700 g を水3600 ml に加え，35℃4時間抽出した後，遠心分離する。

上清（分画Ⅰ）2700 ml に20%塩基性酢酸鉛液520 ml を混和し遠心分離して上清を集め，1Mリン酸二ナトリウム溶液を加えpH 7.0 に調整する。

この溶液（分画Ⅱ）2720 ml に冷アセトン3000 ml を加えた後遠心分離して沈殿を集め水272 ml に溶解し，水に対し透析する。

透析内液（分画Ⅲ）330 ml を2N酢酸を滴下してpH 5.4 に調整した後，遠心分離して上清を集め，1Mリン酸二ナトリウム液を加えてpH 7.0 に調整する。

この溶液（分画Ⅳ）362 ml に硫酸203 g を溶解した後，遠心分離して沈殿を集め，水150 ml に溶解し，水に対し透析する。

透析内液（分画Ⅴ）210 ml にカルシウムフオスフェートゲル430 ml を加え，かくはんした後遠心分離してゲルを集め水洗する。このゲルに0.2M酸性リン酸アンモニウム溶液pH 9.1，60 ml あて加え，4回溶出し，溶出液を集め水に対し透析する。

透析内液（分画Ⅵ）276 ml にカルシウムフオスフェートゲル350 ml を加え，かくはんした後，遠心分離してゲルを集め水洗する。このゲルに0.2M酸性リン酸アンモニウム溶液pH 9.1 50 ml あて加え，3回溶出し，溶出液を集め，水に対し透析する。

透析内液（分画Ⅶ）22.2 ml に 1 M リン酸塩緩衝液 pH 7.0 を加え、pH 7.0 に調整した後硫酸 86.6 g を加え溶解する。遠心分離して上清を集め、さらに硫酸 37.4 g を加え溶解した後、ふたたび遠心分離して沈殿を集め水 15 ml に溶解し、水に対し透析する。

透析内液（分画Ⅷ）33 ml に 1 M リン酸塩緩衝液 pH 7.0 2.5 ml 1 M 塩化ナトリウム溶液、10.0 ml および水を加えて全量 100 ml とし、冷却したエタノールを 66.6 ml 滴下混和した後、遠心分離して沈殿を集め、水に溶解する。

この溶液（分画Ⅸ）20.5 ml に 1 M リン酸塩緩衝液 pH 6.0 0.5 ml 1 M 塩化ナトリウム溶液 2.5 ml および水を加え全量 25 ml とし、5 mM の酢酸亜鉛の 95% エタノール溶液 18.4 ml を冷却して加え、遠心分離して上清を集め、さらに、これに 5 mM 酢酸亜鉛の 96% エタノール溶液 14.1 ml を冷却して加え、遠心分離して沈殿を集め、水 7.5 ml に溶解する。

この溶液（分画Ⅹ）8.5 ml のうち 6.5 ml に水を加え蛋白含量 15 mg/ml 溶液とした後、硫酸飽和溶液を加えて、硫酸 75% 飽和とし、遠心分離して沈殿を集め、水 1.0 ml に溶解する。この溶液に硫酸飽和溶液を加え硫酸 62% 飽和とし遠心分離し、沈殿を集め水 1.2 ml に溶解し水に透析する。

透析内液（分画Ⅺ）6.0 ml を旧黄色酵素とする。

なおこの後結晶化を行つたが無晶型を得たにとどまつた。

（2.3） 旧黄色アポ酵素

Warburg, Christian の方法⁽⁴²⁾に従つて調製した。

旧黄色酵素溶液は水で希釈し蛋白含量 ml 当り 5 mg ないし 10 mg とする。これに飽和硫酸溶液を加えて、50% 飽和硫酸溶液とし氷冷下、冷却した 1 N 塩酸を滴下し、pH 2.8 とする。冷却したまゝ 15 分間かくはん

を続けた後、遠心分離して沈殿を集め、冷却した50%飽和硫酸溶液で洗浄した後、0.1Mリン酸塩緩衝液pH 7.5に溶解する。蛋白含量約10mg/mlに調整する。

本操作は、さらに繰返し行い、FMNが充分脱離するまで続ける。

(2.4) 蛋白の定量

Gornallらのビウレット法⁽⁵⁴⁾に従つて測定した。

検液2.0 mlにビウレット試薬8.0 mlを積層しゴム栓を施し、室温に30分間放置した後、Coleman比色計を用いて波長540 m μ の吸光度を測定した。

なお検量線は卵アルブミンを用いて測定した。

[3] 酵素反応

Haasの方法⁽⁵⁵⁾に従いワールブルグ検圧計を用いて経時的に、酸素消費量を測定した。

反応液組成は別に記載がなければ、全量2.7 mlの水溶液中に次のものを含む。

リン酸塩緩衝液 pH 7.5	0.1 m mole
グルコース-6-リン酸カリウム	20 μ moles
シアン化カリウム	10 μ moles
グルコース-6-リン酸脱水素酵素	0.075 mg
旧黄色アポ酵素	8.6 mg
NADP	0.2 μ mole

ワールブルグフラスコは、NADPを副室に入れ、残る全部を主室に入れて使用する。また中心筒にはろ紙片と20%水酸化カリウム0.3 mlを入れる。

フラビンおよびフラビンリン酸を添加する場合は主室へ、ATPを添

加する場合は副室にそれぞれ入れる。

ガス腔は酸素を充填し、 37°C の温度平衡に達した後、副室の NADP を主室に加えて反応を開始する。酸素消費は5分毎に測定する。

B_2 共存下、旧黄色アポ酵素を前処理する場合は次のように行つた。

旧黄色アポ酵素 12.9 mg を含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 $\text{pH } 7.5$ 1.5 ml に 0.362 mM B_2 水溶液 1.62 ml を混合し、 37°C 60分間前処理した後、その 1.04 ml をとりだし、反応液へ加えて活性測定する。

対照実験として、 B_2 の代りに水を加えて、同様に前処理した後、その 0.5 ml をとりだし、これに 0.362 mM B_2 水溶液 0.54 ml を加えたものを反応液に加えて活性測定する。

反応液組成のうちグルコース-6-リン酸脱水素酵素 0.6 mg 、旧黄色アポ酵素 4.3 mg 、 B_2 $0.2\text{ }\mu\text{ mole}$ をそれぞれ使用した。

[4] ろ紙電気泳動⁽³²⁾

ベックマンスピコロ紙電気泳動装置を用いた。ろ紙はコロンビアスピコロRペーパーNo 300、 0.05 M リン酸塩緩衝液 $\text{pH } 8.0$ 定電流 1.25 mA/cm のもと3時間、室温 (15°C) 暗所で泳動し、風乾後、紫外線照射下、黄色蛍光を発するスポットを検べた。

第二章 第二節の実験

[1] 試薬

チトクロムcは市販品を使用した。他はすべて第二章、第一節の実験で用いたものと同一である。

〔2〕 酵 素

(2.1) 酵母 $NADPH_2$ チトクロム c 還元酵素

Haas ら⁽⁴³⁾の方法に従い次のように調製した。ビール酵母はキリンビール株式会社より御恵与いただいた。

乾燥ビール酵母 400 g を水 1400 ml に加え、25℃にて24時間抽出する。遠心分離して上清を集め、沈殿を一回洗浄し、洗液を上清に合す。

上清(分画Ⅰ) 1470 ml に硫酸 450 g を溶解し、10N酢酸を滴下してpH 4.5に調整する。遠心分離して沈殿を集め、水75 ml に溶解し、これに硫酸31%飽和溶液 321 ml を混合した後遠心分離して上清を集める。

上清(分画Ⅱ) 500 ml に硫酸 60 g を溶解した後、遠心分離して沈殿を集め、水60 ml に溶解し水に対し透析する。

透析内液(分画Ⅲ) 137 ml は氷冷しこれに冷却した40%エタノール 130 ml を加え、遠心分離して沈殿を集め水30 ml に溶解する。

水溶液(分画Ⅳ) 30 ml を酵素標品として用いた。

(2.2) アボ還元酵素

Huennekens⁽⁴⁶⁾の方法に従い次のように調製した。

還元酵素溶液を0.025Mリン酸塩緩衝液pH 7.3に希釈し、蛋白濃度およそ10mg/mlに調整した後硫酸を加えて、硫酸飽和度35%とする。氷冷しながらこれに冷却した2N硫酸を滴下し、pH 3.0に調し45分間かくはんした後生成した沈殿を遠心分離して集め、硫酸35%飽和液で洗浄する。

えられた沈殿は0.025Mリン酸塩緩衝液pH 7.3に溶解し、不溶物を遠心分離して除き、蛋白濃度およそ10mg/mlに調整する。

本操作はさらに、繰返し行いえられた無色透明な溶液をアポ還元酵素とする。

なお、蛋白はビウレット法に従つて定量した。

〔3〕 酵 素 反 応

分光光度計を用い、還元型チトクロム *c* に特有な吸収を示す 550 *mμ* において経時的な吸光度の増加を測定した。

反応液組成は別に記載がなければ、全量 3.0 *ml* の水溶液中に次のものを含む。

リン酸塩緩衝液 <i>pH</i> 7.3	25 μ moles
グルコース-6-リン酸カリウム	3 μ moles
<i>NADP</i>	0.2 μ mole
チトクロム <i>c</i>	0.5 <i>mg</i>
グルコース-6-リン酸脱水素酵素	0.27 <i>mg</i>
アポ還元酵素	1.12 <i>mg</i>

アポ還元酵素およびチトクロム *c* を除いた残り全部は 25°C, 5 分間、反応し *NADP* を完全に還元する。

この反応液に、チトクロム *c* およびアポ還元酵素を加え反応を開始する。

550 *mμ* の吸光度を 15 秒毎に読みとる。

フラビン、あるいはフラビンリン酸を加える時は、あらかじめアポ還元酵素とフラビン、あるいはフラビンリン酸とを混合しておき、その一部をとりだして反応する。

1. Uehara, K., Sugeno, K. and Mizoguchi, T., *J. Biochem.*, 54, 267 (1963)
2. Karrer, P., Becker, B., Benz, F., Frei, P., Salmon, H., and Schöpp, K., *Helv. Chim. Acta.*, 18, 1435 (1935)
3. Kuhn, R., and Weygand, F., *Ber.*, 68, 1001 (1935)
4. Kuhn, R., Reinemund, K., Weygand, F., and Stroble, R., *Ber.*, 68, 1765 (1935)
5. Rudy, H., "Fortschritte der Chemie organischen Naturstoffe" ed L. Zechmeister vol. II. p66. Springer, Vienna 1939.
6. Euler, H. V., and Karrer, P., *Helv. Chim. Acta.*, 18, 522 (1935)
7. Kuhn, R., and Weygand, F., *Ber.*, 68, 166 (1935)
8. Huennekens, F. M., Felton, S. P., and Snell, E. E., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2258 (1957)
9. Kuhn, R., and Weygand, F., *Ber.*, 67, 2084 (1934)
10. Snell, E. E., Klatt, O. A., Bruijs, H. W., and Crauens, W. W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 583 (1953)
11. Ruff, O., *Ber.*, 32, 3672 (1899)
12. Perlín, A. S., and Brice, C., *Can. J. Chem.*, 34, 541 (1956)
13. Karrer, P., and Meerwein, H. F., *Helv. Chim. Acta.*, 18, 1130 (1935)
14. Lambooy, J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 110 (1958)

15. *Folkers, K., U.S. 2,760,865, Aug. 28, 1956.*
16. *Tishler, M., Pfister, K., Babson, R.D., Ladenburg, K., and Fleming, A.J., J. Am. Chem. Soc., 69, 1487 (1947)*
17. *Folkers, K., and Shunk, C.H., U.S. 2,847,413 Aug 12 1958*
18. *Kuhn, R., Rudy, H., and Weygand, F., Ber., 69, 1543 (1936)*
19. *Forrest, H.S., and Todd, A.R., J. Chem. Soc., 1950, 3295*
20. *Flexer, L.A., and Farkes, W.G., U.S., 2,610,178, Sept. 9, 1952*
21. *Canali, V., and Casciotti, G., Boll. soc. ital. biol. sper., 27, 1478 (1951)*
22. *Viscontini, M., Ebnöther, C., and Karrer, P., Helv. Chim. Acta., 35, 457 (1952)*
23. *Kilgour, G.L., and Huennekens, F.M., J. Am. Chem. Soc., 79, 2256 (1957)*
24. *Kilgour, G.L., Felton, S.P., and Huennekens, F.M., J. Am. Chem. Soc., 79, 2254 (1957)*
25. *King, E.J., Biochem. J., 26, 292 (1932)*
26. 田中輝夫 薬. 誌 78, 627 (1958)
27. *Agranoff, B.W., Bradley, R.M., and Brady, R.O., J. Biol. Chem., 223, 1077 (1958)*
28. *Crouthamel, C.E., J. Am. Chem. Soc., 73, 82 (1951)*
29. *Jackson, E.L., "Organic Reactions" ed by Adams, R., John Wiley and Sons, Inc., New York, Vol II, p341, 1944*
30. 渡辺厚, 朝日豊, ビタミン, 4, 146 (1951)
31. 小川俊太郎 日本薬局法注解 第六改正 p439 南江堂

32. *Yagi, K., and Matsuoka, Y., J. Biochem., 42, 757 (1955)*
33. *Kearney, E. B., J. Biol. Chem., 194, 747 (1952)*
34. *Kuhn, R., and Rudy, H., Ber., 69, 2557 (1936)*
35. *Horecker, B. L., J. Biol. Chem., 183, 593 (1950)*
36. *Warburg, O., and Christian, W., Biochem. Z., 266, 377 (1933)*
37. *Blanchard, M., Green, D. E., Nocito, V., and Rotner, S., J. Biol. Chem., 155, 421 (1944)*
38. *Haas, E., Harrer, C. J., and Hogness, T. R., J. Biol. Chem., 143, 341 (1942)*
39. *Seegmiller, J. E., and Horecker, B. L., J. Biol. Chem., 192, 175 (1951)*
40. *Noltman, E. A., Gubler, C. T., and Kuby, S. A., J. Biol. Chem., 236, 1225 (1961)*
41. *Theorell, H., and Åkerson, A., Arch. Biochem. Biophys., 65, 439 (1956)*
42. *Warburg, O., and Christian, W., Biochem. Z., 298, 368 (1938)*
43. *Haas, E., Harrer, C. J., Hogness, T. R., J. Biol. Chem., 136, 747 (1940)*
44. *Lineweaver, H., and Burk, D., J. Am. Chem. Soc., 56, 658 (1934)*
45. *Kuhn, R., and Rudy, H., Ber., 68, 383 (1935)*
46. *Huennekens, F. M., and Felton, S. P., "Methods in Enzymology" ed by S. P. Colowick and N. O. Kaplan Academic Press, Inc., New York, Vol III, p959 (1957)*

47. *Sluger, T.P., and Kearney, E.B., J. Biol. Chem., 183, 409 (1950)*
48. *Dische, Z. and Dische, M.R., Biochem. Biophys. Acta., 27, 184 (1958)*
49. *Willstätter, R., Schudel, G., Ber., 51, 780 (1918)*
50. *Hough, L., Jones, J.K.N., and Wadman, W.H., J. Chem. Soc., 1949, 2511.*
51. *Bial M., Biochem. Z., 3, 323 (1906)*
52. *Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Harrison, J.S., Nature 166, 444 (1950)*
53. *Dreywood, R., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18, 499 (1946)*
54. *Gornall, A.G., Bardewill, C.J., and David, M.M., J. Biol. Chem., 177, 751 (1949)*
55. *Haas, E., "Methods in Enzymology", ed by S.P. Colowick, and N.O. Kaplan., Academic Press, Inc., New York., Vol. II, p713. 1955*
56. *Uehara, K., Sugeno, K., and Mizoguchi, T., J. Biochem., 55, 522 (1964)*