



Title	リボフラビンを光増感剤とする酵素および核酸の光化学反応に関する研究
Author(s)	細見, 三郎
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30568
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	細見三郎
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 2371 号
学位授与の日付	昭和 46 年 7 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	リボフラビンを光増感剤とする酵素および核酸の 光化学反応に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 上原 喜八郎 (副査) 教授 青沼 繁 教授 梶井 雅一郎 教授 岩田 平太郎

論文内容の要旨

緒 論

太陽光線は、植物の営む光合成をととして生命維持に必要なエネルギーを供給しているが、また光合成とは無関係に光は多くの生物の生長や分化などに大きな影響を及ぼしている。

リボフラビンは、その誘導体である FMN、FAD とともに動植物に広く分布している。リボフラビン、FMN、FAD などのフラビンは可視光線で励起されると、アミノ酸、アスコルビン酸、核酸塩基、酵素、核酸など種々の生体成分を光触媒的に酸化し、生物学的活性を低下させる。もし、この現象が生体内でおこるならば、可視光線がフラビンを介して生体に種々の影響を与えるものと思われる。

興味深いことに、フラビンが光受容体であると推定されている光生物学的現象として、植物の子葉鞘の屈光性、カロチノイドの生合成、ユーグレナの走光性、視覚などの諸現象が知られている。

可視光線がフラビンを介し、どのような機構で生体に影響を及ぼすのかはまだ明らかではないが、可視光線で励起されたフラビンが生体内の酵素や核酸の生物学的機能にどのような影響を及ぼすのかを研究することは、光生物学的現象を分子レベルで解明することに寄与するものと思われる。

以上の見地から著者は、酵母アルコール脱水素酵素および枯草菌の形質転換デオキシリボ核酸(以下 DNA と省略する)を選び、それらに対するリボフラビンの光増感作用の影響を検べた。

リボフラビン存在下の酵素および核酸に可視光線を照射すると、それらは光化学的に失活するが、その際反応液にアデニンを加えておくと、それらの光化学失活が著しく促進されるという興味ある現象を見いだした。

リボフラビンによる光化学反応をアデニンが促進する機構を明らかにする目的で研究を行なった結果、その一端を明らかにすることができるとともに、いくつかの新しい知見を得ることができた。

本 論

第1章 リボフラビン存在下の酵母アルコール脱水素酵素の光化学反応に及ぼすアデニンの影響

〔1〕 Fig. 1 に示すように、リボフラビン存在下の酵母アルコール脱水素酵素に可視光線を照射すると、酵素は光化学的に失活するが、その際反応液にアデニンを加えておくと酵素の光化学失活が著しく促進された。

〔2〕 ルミフラビン、FMN、FAD などのフラビン存在下の酵素の光化学失活をアデニンは促進したが、メチレンブルー、エオシンY、フルオレッセイン存在下の酵素の光化学失活に対してアデニンは何ら影響を与えなかった。

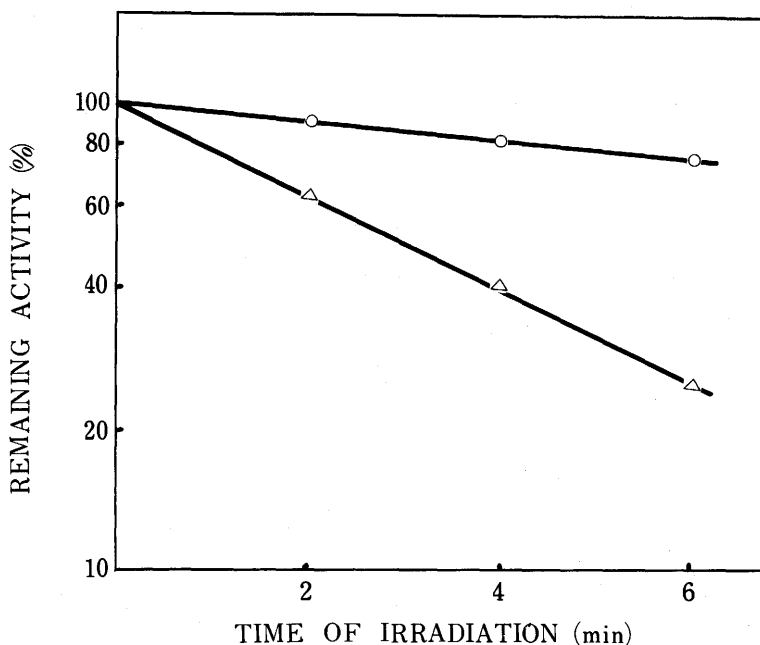


Fig. 1. Effect of adenine on the riboflavin-sensitized photoinactivation of yeast alcohol dehydrogenase.

The reaction mixtures contained; $0.3\mu\text{g}$ of yeast alcohol dehydrogenase, $0.005\mu\text{mole}$ of riboflavin and $0.1\mu\text{mole}$ of adenine in a final volume of 1 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4. Samples in test tubes were placed in a glass walled bath at 30°C and irradiated with a 500 W flood lamp at a distance of 35 cm.

○, Yeast alcohol dehydrogenase + riboflavin;

△, Yeast alcohol dehydrogenase + riboflavin + adenine.

〔3〕 アデニン以外には、グアニン、キサンチンなどリボフラビンにより光化学酸化されやすいプリン誘導体に強い促進作用が認められたが、ピリミジン塩基にはほとんど促進作用は認められなかった。

〔4〕 リボフラビン存在下、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、メチオニンおよびシステインの光化学酸化に対するアデニンの影響を検べたところ、システインの光化学酸化がアデニンの添加

によって著しく促進された。

第2章 リボフラビン存在下の形質転換DNAの光化学反応に及ぼすアデニンの影響

[1] リボフラビン存在下の形質転換DNAの光化学失活に及ぼすアデニンの影響

(I) 枯草菌の形質転換現象を利用してDNAの生物学的活性を測定することができる。

Fig. 2 に示すように、リボフラビン存在下の形質転換DNAに可視光線を照射すると、その形質転換活性が低下するが、その際反応液にアデニンを加えておくと、DNAの光化学失活が著しく促進された。

(II) DNAの光化学失活に対するアデニンの促進作用は、酵母アルコール脱水素酵素の場合と同じく、リボフラビン、ルミフラビン、FMN、FADなどのフラビンを光増感剤として用いた場合にのみ認められた。その他の光増感剤による光化学失活に対して、アデニンは何ら影響を与えなかった。

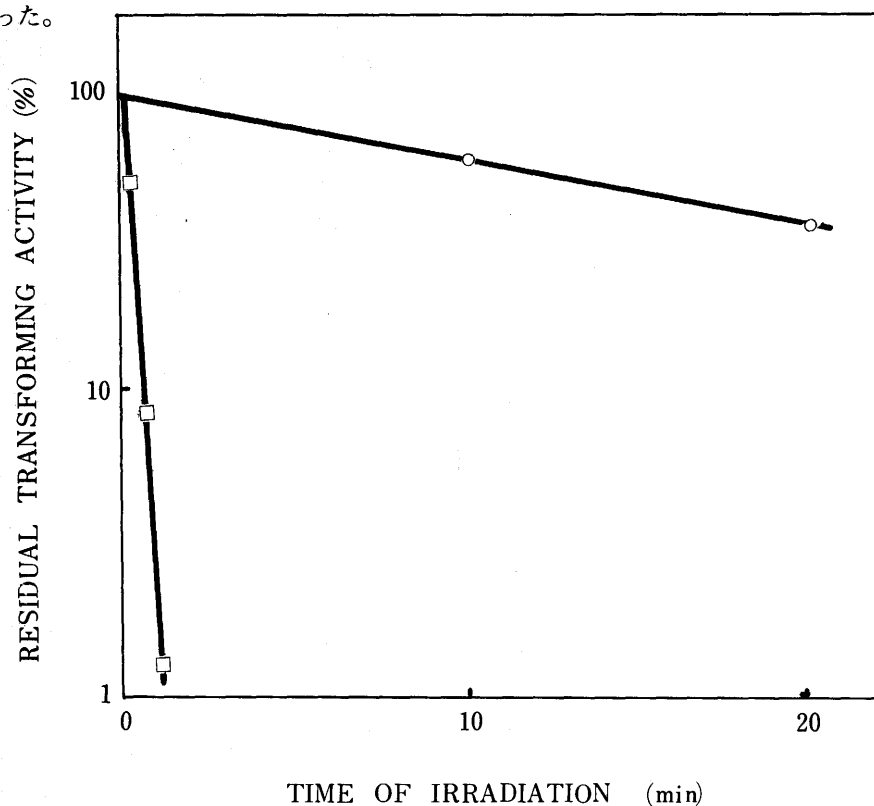


Fig. 2. Effect of adenine on the riboflavin-sensitized photoinactivation of transforming DNA.

The reaction mixtures contained; 9 μ g of DNA, 0.15 μ mole of riboflavin and 1.5 μ mole of adenine in a final volume of 3.0 ml of 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate, pH 6.9. Samples in test tubes were placed in a glass walled bath at 30 $^{\circ}$ C and irradiated with a 500 W flood lamp at a distance of 20 cm.

○, DNA + riboflavin;

□, DNA + riboflavin + adenine.

(Ⅲ) アデニンは検べたプリン、ピリミジン誘導体のうちで最も強い促進作用を示し、グアニンはむしろ保護作用を示した。

〔2〕 光照射されたDNAの塩基分析

リボフラビン存在下のDNAに光照射すると、DNA中の4種の塩基のうちグアニン残基が選択的に光分解された。

また、アデニン共存下でDNAの光化学反応を行なうと、グアニン残基の光分解が著しく促進され、それに伴って失活も著しく促進された。

アデニンがグアニン残基の光分解を促進する現象は、DNAの場合だけでなく、モノヌクレオチドであるデオキシグアニル酸を用いた場合にも認められた。

〔3〕 リボフラビン存在下光化学的に修飾した形質転換DNAによる突然変異の誘起

枯草菌168株(インドール要求性変異株)より抽出したDNAを、リボフラビン存在下光化学的に修飾した後、受容菌S B 25株(インドールおよびヒスチジン要求性変異株)に与えて形質転換を行なわせた。得られたヒスチジン転換型の菌株中に、新しくトリプトファン要求性やチロシン要求性となった突然変異株を見いだした。アデニン共存下でDNAを光化学的に修飾すると、その突然変異の誘起が著しく促進された。グアニンは突然変異の誘起に対してむしろ抑制作用を示した。

第3章 リボフラビンとアデニンの分子化合物

リボフラビンとアデニンが分子化合物を生成することが、アデニンの促進作用発現と密接な関係にあるものと考えた。そこで、リボフラビンとアデニンの分子化合物の存在を証明するため、その分子化合物を単離し性質を検べることが重要となった。幸いにも、リボフラビンとアデニンの分子化合物を結晶状に取り出すことに成功し、所期の目的を果すことができた。

〔1〕 5 mlのジメチルスルホキシサイドに100mgのリボフラビンおよび100mgのアデニンを加え、80℃で溶解した後、4 mlの水を徐々に加え室温で1～2週間暗所で放置すると、リボフラビンとアデニンの分子化合物が赤黄色板状結晶として析出する。

〔2〕 この結晶性分子化合物の性質を分光学的方法、ペーパークロマトグラフィーによる方法、元素分析などで検討したところ、この分子化合物は、リボフラビン、アデニンおよび水を1:1:3の比率に含むことが明らかとなった。また、この結晶性分子化合物は、リボフラビンとアデニンの単なる等量混合物とは異なる分解点および赤外部吸収スペクトルを示した。

結 論

リボフラビン、FMN、FADおよびルミフラビン存在下の酵母アルコール脱水素酵素および形質転換DNAの光化学失活を、アデニンが著しく促進した。

アデニンは、リボフラビン存在下のシステインの光化学酸化、またデオキシグアニル酸およびDNA中のグアニン残基の光分解をいずれも著しく促進した。

リボフラビンは、DNA中のグアニン残基を選択的に光分解した。

また、リボフラビン存在下光化学的に修飾したDNAを用いて枯草菌に突然変異を誘起させることができた。その場合アデニン共存下で光照射したDNAを用いると、突然変異の誘起が著しく促進さ

れた。

リボフラビン存在下の酵素および核酸の光化学反応をアデニンが促進する機構を検討した結果、アデニンの促進作用が、リボフラビンとアデニンの分子化合物生成と密接な関係があるものと推察した。

この知見に基づき研究を進めた結果、リボフラビンとアデニンの分子化合物を結晶状に単離することに成功した。この結晶性分子化合物は、赤黄色板状結晶で、リボフラビン1分子、アデニン1分子および水3分子を含む。

論文の審査結果の要旨

リボフラビン存在下、可視光線の照射によって酵素及び核酸が光化学的に失活することは既に認められていることであるが、この光化学的失活がアデニンの添加によって著しく促進されるという興味深い現象を発見した。

この現象がおこる理由としてリボフラビンとアデニンが分子化合物を生成し、これが能率のよい光化学触媒として作用しているのではないかと考え、この分子化合物の分離を試み、分子比1:1でリボフラビンとアデニンとが結合した分子化合物の結晶を得ることに成功した。