

Flavin-Adenine dinucleotide の酵素的な水解

千葉大学医学部医化学教室 (主任 赤松茂教授)

山 脇 茂

SHIGERU YAMAWAKI

Flavin-Adenine dinucleotide (FAD) の酵素的な水解についてはすでに須田⁽¹⁾, Kornberg⁽²⁾ 等が報告している。須田は FAD に動物組織抽出液が作用すると、FAD を Co 酵素とするアミノ酸酸化酵素系に於いて、D-アラニン酸化の程度が低下することから、FAD が組織抽出液により酵素的に分解されると報告した。その分解生成物の証明は行っていないが、この酵素は磷酸モノエステラーゼ、ピロ磷酸酵素及び Activator ではなく、また抽出液による FAD 分解が無機ピロ磷酸により阻害され、Riboflavin (FR) では阻害されないことから FAD のピロ磷酸結合を水解するものであらうと述べている。Kornberg は Potato から Diphosphopyridine nucleotide (DPN) のピロ磷酸結合を水解する酵素、Nucleotide pyrophosphatase を分離し、この酵素が FAD のピロ磷酸結合をも水解し、Flavine mononucleotide (FMN) と Adenosine 5'-phosphate (AMP) を生ずることを分光光度計で認めた。

著者は前報⁽³⁾で、豚肝から DPP のピロ磷酸結合を水解する酵素、Esterpyrophosphatase を分離し、その性質について報告した。この Esterpyrophosphatase が DPP と近似の構造を持つ FAD のピロ磷酸結合を水解し、FMN と AMP を生ずるものと考えて新たに実験を進めた。その結果、Esterpyrophosphatase は FAD を水解し得ない。而し新たに家兎の筋肉から分離された酵素液は Esterpyrophosphatase を持たないが、FAD のピロ磷酸結合を水解する酵素を持つことを知り、FAD 水解酵素と Esterpyrophosphatase とは異なることを認めたので報告する。

実験の部

I. 実験材料

1) FAD 液 Warburg & Christian⁽⁴⁾の方法に従って分離した FAD, FMN, FR 三者の混液である。その実験法は次の如し。ルモット肝臓を細切し、これに pH 5.0 の酢酸塩緩衝液と生理的食塩水を 1:5 の割合に含む液を少量加えて、80° 5 分間加温後、硝子ホモゲナイザーに入れて磨碎し、再び前記 pH 5.0 生理的食塩水を加えて 80° 15 分間加温する。加温後直ちに遠沈して上澄に食塩を加えて食塩飽和溶液として濾過する。次で濾液を分液ロートに入れ、これに液状フェノール (フェノールに水を飽和させたもの) 5.0 ml を加えて強く振盪し、漸時放置後、別かれた 2 層のうち下層を捨て、黄色を呈する上層の濁濁フェノール部を遠沈すると再び 2 層に別かれるから、この上層黒褐色部分を注意深くピペ

ットで 50 ml メスチリンダーに取り、これに 10.0 ml の水と 40 ml のエーテルを加えてよく振盪した後、再び遠沈すると、白濁した上層と透明黄色の下層に別かれる。上層のエーテル、フェノール混液を注意深く取り去り、下層を濾過する。この濾液を更にエーテルでフェノールがなくなる迄洗滌する。この洗滌濾液が FAD 原液で、殆んど FAD のみであるが、少量の FMN, FR を含んでいる。実験に際しては原液の総 B₂ 量が 5 γ/ml になる程度に稀釈して用いる。以下 FAD 液と記すものは B₂ 3 型の混合液である。

2) FMN Na 塩, Riboflavin (FR), Adenosine-5'-phosphate (AMP) は和光製品である。

3) フェノール磷酸塩, 無機ピロ磷酸塩, Diphenolpyrophosphate は前報⁽³⁾記載の如し。

4) 緩衝液, 前報⁽³⁾に同じ。

II. 実験方法

1) FAD 水解度測定 試験液は第1表に示す如く、第1段反応では褐色試験管に FAD 液、酵素液、緩衝液を混じ、トルオール重畳後、完全に遮光せる 37°C 孵卵器中で一定時間 incubate する。ついで試験液の pH を 5 に修正する。この際第1段反応試験液が酢酸塩で緩衝されていたときは、N-酢酸或は N-NaOH を加え、またペロナル緩衝液であった時は 0.1 N-HCl を加えて、pH 5 とした後、更に pH 5 の酢酸緩衝液 1.0 ml を加えた。pH 修正のために試験液量は増すから、水を追加して全液量を何れの場合にも 9.0 ml とし、これを 80° 15 分間加温して酵素を不活性化する。冷却後、第2段反応では、第1段反応に於いて、FAD 水解で生じた FMN を FR とするために、尿モノエステラーゼを 5 時間作用させ、FMN を完全に FR とした。この FR をベンジルアルコールで 3 回抽出除去し、抽出残液中に水解されずに残っている FAD を藤田⁽⁶⁾、八木⁽⁷⁾法によりルミフラビン化して蛍光計で測定した。FAD 液は B₂ 3 型の混液であるから、これに直ちに尿モノエステラーゼを作用させて、既存の FMN を FR としてベンジルアルコールで抽出除去し、抽出残余液中の FAD 量を求め、この量を初濃度とし、酵素的に減量したる FAD 量から水解 % を算出した。

第1表 FAD 水解度測定の試験液組成

第1段反応	FAD 液	2.0 ml
	酵 素 液	2.0 "
	緩 衝 液	2.0 "
pH 5.0 に修正するとき増加する液量		3.0 "
80° 15 分 加 温		
第2段反応	人尿モノエステラーゼ	2.0 "

2) モノフェノール磷酸、ピロ磷酸、DPP の水解度測定は前報⁽³⁾と同じ。

3) Esterpyrophosphatase 活性度測定 前報⁽³⁾記載の如く、第1段反応では M/200 DPP 1.0 ml, 酵素液 2.0 ml, 緩衝液 2.0 ml を混じ、2 時間後、pH を 5 に修正 (FAD 水解度測定参照) し、100° 5 分間加温、次で第2段反応として、尿モノエステラーゼ 2.0 ml を加える。モノエステラーゼ作用時間は上記の FAD 水解度測定の際も同様であるが、2~5 時間を必要とする。

4) ペーパークロマトグラフィ (PCG) B₂ 3 型

は八木⁽⁶⁾法に従つて試験液を濃縮、展開し、水銀石英灯を光源として東芝製 UV-DI フィルターガラスで濾過した紫外線による螢光像で判定した。

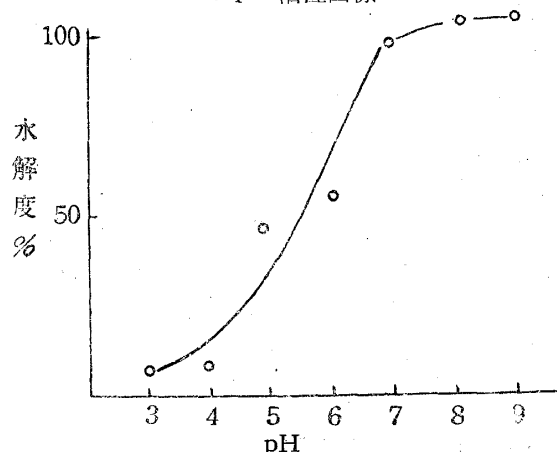
AMP は⁽⁷⁾低圧水銀灯を光源として、Markam, Smith⁽⁸⁾の処方に従つて調製した濾光液 (松崎⁽⁷⁾は塩素ガス、フィルターを必要としないと云っている)のでそれに従つた)で濾光した紫外線による吸収像 (黒色の斑点) で検出した。また関口法⁽⁹⁾に従つて Xray Film を濾紙に完全に密着せしめ、1 m の距離から紫外線を約 3 分間照射し、Film 上に白色の斑点として認められた。(Xray Film 撮影については、東大栄養化学吉川教授の好意により実施し得た。ここに感謝する)

実験成績

1. 粗 Esterpyrophosphatase 液による FAD 水解の至適酸度

図1に示す如く、FAD 水解の至適酸度は pH 8, 9 にあり、酸性側では極大を示す山が見られない。この実験に用いた Esterpyrophosphatase は既に報告⁽³⁾した如く、DPP 水解の至適酸度を pH 4 と 8 に示す 2 種等力性酵素の混合である。ところがこの酵素が FAD に対してはアルカリ側にのみ至適酸度を示している。このことから考えられるのは、FAD のピロ磷酸結合を水解する FAD pyrophosphatase と Esterpyrophosphatase とが異なるものであるのか、或は両酵素は同一つであるが、ただ FAD には酸性側では作用しないのであるかと云う問題である。著者は前報⁽³⁾記載の如く、Esterpyrophosphatase (以下粗 Esterpyrophosphatase とする) からアルカリ性 Esterpyrophosphatase を分離し

第1図 FAD に対する粗 Esterpyrophosphatase の pH 活性曲線



5.5 γ/ml FAD 液使用。

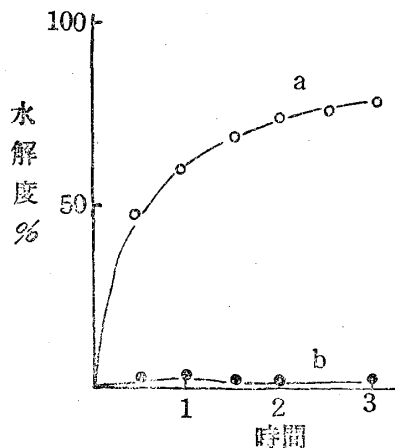
第1段反応、第2段反応共に 2.5 時間。

得たので、粗及びアルカリ性 Esterpyrophosphatase による FAD の水解経過を比較した。

2. 粗及びアルカリ性 Esterpyrophosphatase 液による FAD 水解

pH 8 に於いて、アルカリ性 Esterpyrophosphatase による DPP の水解を、時間的経過を追って実験したのが図 2a である。同じ様に pH 8 でこの酵素による FAD 水解を実験した (図 2b)。即ちアルカリ性 Esterpyrophosphatase は 3 時間後にも FAD を水解しない。一方粗 Esterpyrophosphatase を適当に稀釈して、その活性度をアルカリ性 Esterpyrophosphatase と同じ程度 (図 3a) にして、pH 8 で FAD に作用させたのが図 3b である。粗 Esterpyrophosphatase は 30 分ですでに FAD を 100% 水解する。以上の実験から Esterpyrophosphatase と FAD pyrophosphatase とは互に異なるものであらうと推定される。しかし、水に浮遊させた不溶性のアルカリ性 Esterpyrophosphatase は DPP に対しては活性であるが、FAD の様な高分子のものに対しては活性を示さないとも考えられる。そこで著者はアルカリ性 Esterpyrophosphatase を可溶性の状態にするために次の実験を行つた。前報告⁽³⁾の相互分離の項に記載した如く、水に浮遊させる前の pH 5.8 で生じた沈澱を pH 9, $M/20$ ペロナール緩衝液に浮遊し、37°C の恒温槽中で、時々振盪しながら 3 時間加温する。次で遠沈し、この上澄の Esterpyrophosphatase 活性度を検査すると第 2 表の如く、上澄は酸性、アルカリ性両側で活性なる可溶性の Esterpyrophosphatase

第 2 図 アルカリ性 Esterpyrophosphatase による FAD 水解経過

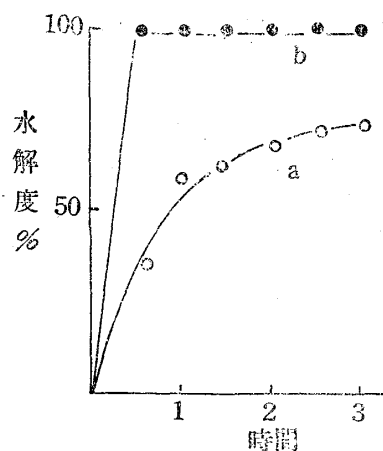


a: DPP 水解経過曲線。

b: FAD 水解経過曲線。

3.4 γ /ml FAD 液使用, 第 2 段反応 3 時間。

第 3 図 粗 Esterpyrophosphatase による FAD 水解経過



第 2 図と同じ。

第 2 表 実験 2 の上澄の Esterpyrophosphatase 活性度

pH	第 1 段 反応	第 2 段 反応
5	0	52%
8	0	46%

第 1 段反応, 第 2 段反応共に
2 時間遊離フェノール定量。

tase を含んでいる。しかしアルカリ側のみで活性なる可溶性の Esterpyrophosphatase を得ることは出来なかつた。この酸性、アルカリ性両型を含む抽出液を pH 8 に於いて、図 2a と同じ様な活性度にした後、FAD に作用させても、24 時間後にも FAD の水解は認められなかつた。即ちアルカリ性 Esterpyrophosphatase は FAD pyrophosphatase を全く含まないことが証明された。次にこれと逆の酵素即ち FAD pyrophosphatase を持つが、Esterpyrophosphatase を含まない酵素の存在を実験し、この様な酵素を筋肉より分離し得た。

3. 筋肉 FAD pyrophosphatase の分離と至適酸度

家兎筋肉粥に 2 倍量の水を加えて、4 日間 37° で自家消化した後、流水透析した液には第 3 表の如くモノエステラーゼ、ピロリン酸酵素は証明されるが Esterpyrophosphatase は全く含まない。即ち DPP に作用させた後、pH 5 として第 2 段に尿モノエステラーゼを作用させても、DPP の水解は認められない。この家兎筋肉自家消化透析液を豚肝から粗 Esterpyrophosphatase を分離する場合と同様に、 $N/10$ -NaOH で pH 9.0 とし、65° 10 分間加温後、冷却、 $M/10$ -HCl で pH 7.0 とした液はモノエス

テラーゼ、ピロリン酸酵素作用も示さない。この筋肉自家消化加温液を種々の pH で 18 時間 FAD に作用させると、図4の如く、pH 8に至適酸度を有し、この pH では FAD を 100% 水解するが酸性側では殆んど水解しない。即ちアルカリ性側で FAD のみを水解する酵素液の分離された。

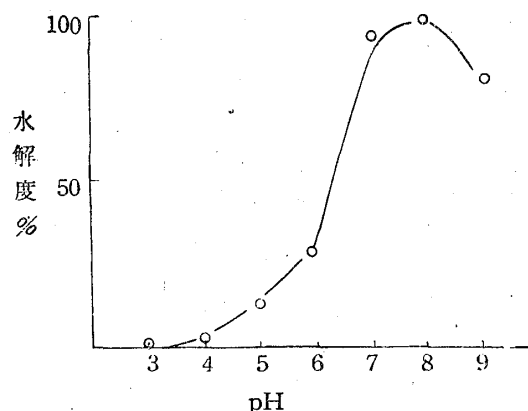
第3表 筋肉自家消化透析液の諸種磷酸酵素作用

基 質	pH	5	9
フェノール 磷酸		51.2%	59.7%
ピロ 磷酸		6.4	25.0
DPP		0	0
DPP に作用後 pH 5*		0	0
モノエステラーゼ加			

24 時間作用後遊離フェノール又は無機磷酸定量

* 第1段反応 24 時間, 第2段反応 2 時間。

第4図 FAD に対する筋肉 FAD pyrophosphatase の pH 活性曲線



4.6 γ/ml FAD 液使用。

第1段反応 18 時間, 第2段反応 5 時間。

4. FAD pyrophosphatase に対する磷酸化合物の阻害

筋肉 FAD pyrophosphatase が FAD に pH 8 で作用するとき、無機磷酸、無機ピロリン酸、フェノール磷酸、及び DPP を添加しておき、12 時間後に pH 5 として、80° 15 分加温、酵素を不活性化し、第2段反応として、これに尿モノエステラーゼを 5 時間作用させた。これと同時に対照実験として第2段の尿モノエステラーゼ作用時に初めてそれら阻害剤を添加した実験とこれら阻害剤を前後とも加えない実験を行つた。その成績は第4表の如く、第2段で始めて阻害剤を添加した対照実験ではモノエステラーゼによる FMN の水解に対して、無機磷酸、無機ピロリン酸、DPP は影響がなく、ただフェノール磷酸のみが阻害するを示す。第1段ですでに阻害剤

を加えてある場合には、無機ピロリン酸が最も強く抑制し、これに無機磷酸、フェノール磷酸がつづくが、フェノール磷酸の阻害は次段のモノエステラーゼ阻害を考慮に入れると無機磷酸より弱いと思われる。注目すべき点は構造上 FAD に近似な DPP の阻害が最も弱いことである。

第4表 FAD pyrophosphatase に対する磷酸化合物の阻害

阻 害 剤	第1段反応	第2段反応	水解度 %
無 機 磷 酸	+		47.5
	—	+	77.1
無機ピロ 磷酸	+		0
	—	+	80.3
フェノール 磷酸	+		47.5
	—	+	66.5
DPP	+		66.2
	—	+	78.5
無	—	—	78.8
終 濃 度	M/120	M/240	

第1段反応 12 時間, 第2段反応 5 時間, 8.1 γ/ml FAD 液使用。

5. FAD pyrophosphatase に対する Mg と Ca 塩の影響

上述のアルカリ性筋肉 FAD pyrophosphatase に対する磷酸化合物の阻害実験と同様に、第1段反応で Mg, Ca を添加した実験と、第2段反応で初めて Mg, Ca を添加した実験を行つた。その成績は第5表の如く、Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ は筋肉 FAD pyrophosphatase を賦活も抑制もしない。

第5表 FAD pyrophosphatase に対する Mg, Ca 塩の影響

金 属 塩	第1段反応	第2段反応	水解度 %
MgCl ₂	+		66.0
	—	+	66.2
CaCl ₂	+		67.1
	—	+	66.8
終 濃 度	M/120	M/240	

第1段反応 10 時間, 第2段反応 5 時間, 7.8 γ/ml FAD 液使用。

6. FAD 水解生成物の証明

今迄述べた、粗 Esterpyrophosphatase 及び FAD pyrophosphatase による FAD 水解実験が

ら推察される如く、FAD 水解により FMN を生ずることは明らかである。然し以上の酵素が FAD のピロリン酸結合のみを水解する酵素であるとは断定しない。そこで粗 Esterpyrophosphatase 及び FAD pyrophosphatase による FAD 水解生成物の証明を PCG により行つた。

(1) FMN の証明。第1段反応終了試験液を pH 5 に修正した後、八木⁽⁶⁾法に従つて、硫酸で飽和し、フェノール抽出を経て、0.1 ml の水に転溶し、試験液を濃縮する。この濃縮液を毛細管で東洋濾紙 No. 50 に塗抹した後、n-Butanol 4, 氷醋酸 1, 水 5 の割合に混合した液の上層を溶媒とし、室温で 16 時間上行性展開した。対照として、基質 FAD 液及び第2段反応終了試験液を同様に濃縮した後展開した。その成績は第6表の如く、粗 Esterpyrophosphatase 或は FAD pyrophosphatase のみが FAD に作用する第1段反応後には FAD のスポットは消失し、FMN のスポットの螢光が増強され、FR のスポットは基質液中のスポットと同様であつた。第2段反応終了後では第1段反応で増強された FMN のスポットも消失し、FR のスポットのみを認め、然も螢光は著しく増強されている。即ち FAD は粗 Esterpyrophosphatase 及び FAD pyrophosphatase により水解され FMN を生ずる。

第6表 FAD 水解生成物中のフラビン分子の証明

スポット	Rf 値	基質液	第1段反応後	第2段反応後
FR	0.30	±	±	卅
FMN	0.09	+	卅	—
FAD	0.02	卅	—	—

記号は螢光の強さを示す 卅 著明, + 軽度, ± 痕跡—認めず, 第1段反応作用時間は Esterpyrophosphatase 液の際は 3 時間, 筋肉 FAD pyrophosphatase は 24 時間。第2段反応作用時間は何れの場合も 3 時間。

(2) AMP の証明。同一の状態を実験した 10 本の第1段反応終了試験液の pH を 5 とし, 80° 15 分加温して酵素を不活性化し, 濾過する。濾液を集めて秤量管に入れ, 80° に調節した完全遮光の乾熱滅菌器中で加温し, 約 1.0 ml に濃縮する。同様の加温操作を 10⁻⁴ M Adenosine-5'-phosphate 液 (AMP), 及び基質 FAD 液につき行つた。各濃縮液を毛細管で数回濾紙に塗抹し, 5% KH₂PO₄-Isoamylalcohol 混液 (A) 或は 5% Na₂HPO₄-

Isoamylalcohol 混液 (B) の二つの溶媒で, 各々室温で 15 時間上行性に展開した。スポットは関口法により Xray Film 上の像によつて検出した。その成績は第7表の如く, 基質液を加温濃縮した液からは紫外線吸収スポットを出発点以外には検出されず, AMP のみを加温した実験からは Rf 0.66 (A), 0.72 (B) の単一つのスポットのみを認めた。即ち加温処理によつて試験液中の FAD 及び AMP は破壊されないことを認めた。両酵素による第1段反応終了後には AMP に相当するスポットと痕跡的な Adenosine のスポットを認めた。Adenosine の生成は酵素液中に含まれる僅かなモノエステラーゼ作用によるためと思われる。

第7表 FAD 水解生成物中のアデニン分子の証明

	溶媒 A			溶媒 B		
	1	2	3	1	2	3
アデニール酸 (AMP)	0.66	—	0.65	0.72	—	0.71
アデノシン	—	—	(0.53)	—	—	(0.51)
アデニン	—	—	—	—	—	—

数値は Rf 値を示す, 溶媒 A は 5% KH₂PO₄-Isoamylalcohol 混液, B は 5% Na₂HPO₄-Isoamylalcohol 混液。

1. 10⁻⁴ M AMP 濃縮液, 2. FAD 液濃縮液, 3. 第1段反応後濃縮液, 反応時間は Esterpyrophosphatase 液 8 時間, FAD pyrophosphatase 液 24 時間, () 内のスポットは痕跡的である。

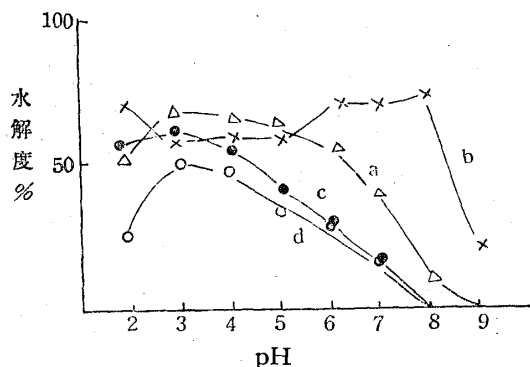
以上の PCG から粗 Esterpyrophosphatase 及び筋肉 FAD pyrophosphatase は FAD のピロリン酸結合のみを水解し, FMN と AMP を生成することを認めた。

7. Kornberg の Nucleotide Pyrophosphatase の各種磷酸酵素作用と FAD 水解の至適酸度

Potato より分離した Nucleotide Pyrophosphatase は磷酸モノエステラーゼ, ピロリン酸酵素を含まず, FAD から FMN を生ずることはすでに Kornberg⁽²⁾が報告した。この酵素が DPP のピロリン酸結合をも水解し得るかどうか不明であるが, 私は純粋な酵素液を得ることが困難なので, Potato 抽出液を 2 回硫酸分割後, 透析した液を使用し, 各種磷酸酵素作用を調べ (第5図), この透析液が至適酸度 pH 3 のモノエステラーゼ及び強力なピロリン酸酵素を持ち, また至適酸度 pH 3 の Esterpyrophosphatase 活性をも示すことを知つた。この透析液

の Esterpyrophosphatase 活性が酸性側にのみありアルカリ側では認められないことから、或は Nucleotide pyrophosphatase による FAD 水解の至適酸度は酸性側にあるのではないかと考えられる。そこでこの透析液に $N/10$ NaOH を加え pH 9.0 とし、 65° 10 分間加温後、透析した液を各種 pH で FAD に作用させ、2 時間後各試験液の pH を総て 5 に修正し、前記八木⁽⁶⁾法に従つて PCG を行い、FAD の水解至適酸度を測定すると、pH 3 で FAD のスポットは最も薄く、アルカリ側では濃厚であつた。即ち FAD 水解の至適酸度が pH 3 にあることを知つた。以上の実験は Potato に酸性で作用する Esterpyrophosphatase と FAD pyrophosphatase とがあると考えられる。

第5図 Potato 酵素の諸種磷酸酵素作用



pH 2: $M/10$ glycine-塩酸緩衝液。

a: フェノール磷酸水解曲線, 時間3時間。

b: ピロ磷酸 " , " "

c: DPP " , " "

d: DPP に作用後, モノエステラーゼを添加せる Esterpyrophosphatase 活性, 第1段反応3時間, 第2段反応2時間。

考 察

当教室の実験により、磷酸酵素はモノエステラーゼ、ピロ磷酸酵素、ヂエステラーゼに分離されているが、著者は豚肝から Esterpyrophosphatase を分離し、磷酸酵素に新たな1型を加えたことは前報⁽³⁾で報告した。

FAD のピロ磷酸結合を水解する酵素については、すでに須田⁽¹⁾, Kornberg⁽²⁾等の報告があるが、彼等はその酵素がモノエステラーゼ、ピロ磷酸酵素を含まず、FAD のピロ磷酸結合を水解すると述べ、その酵素の独自性を証明した。然し新たに Esterpyrophosphatase の存在が立証されたから、これと Nucleotide pyrophosphatase との関連はこゝに検討されねばならない。

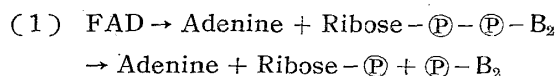
私の実験成績によると、DPP と FAD との水解酵素系が異なるを認めた。即ち DPP 水解の至適酸度を pH 4 と 8 に持つ粗 Esterpyrophosphatase はなおアルカリ側 (至適酸度 pH 8, 9) で FAD を水解するが、酸性側では水解し得ない。この粗 Esterpyrophosphatase から酸性加熱法で酸性 Esterpyrophosphatase を除去したるアルカリ性 Esterpyrophosphatase 液は DPP を至適酸度 pH 8 で水解するが FAD は全く水解し得なくなる。なお、酸性 Esterpyrophosphatase は未だ分離されないが、上述の成績から推して恐らく一般に FAD 水解酵素と Esterpyrophosphatase とは相異なるものと思われるので、実験を進めて、FAD は水解し得るが、DPP を水解し得ない酵素 FAD pyrophosphatase を筋肉から分離し、その至適酸度が pH 8 にあることを認めた。この所見は上述の見解に確証を与えると同時に FAD pyrophosphatase の独自性を立証するものである。Kornberg の Potato Nucleotide pyrophosphatase についての実験は、著者の使用した酵素は Kornberg のもの程純化されていないが、この Potato 酵素液はなお Esterpyrophosphatase 及び FAD pyrophosphatase を含み、何れも至適酸度 pH 3 であつた。Nucleotide pyrophosphatase による FAD 水解の至適酸度は Kornberg の報告に記載していない。然し DPN 水解の至適酸度が pH 8 にあることから、恐らく FAD 水解の至適酸度もアルカリ側にあると考えられる。すると、植物には酸性 Esterpyrophosphatase がアルカリ性酵素を含まぬ状態にあり、Potato には酸性及びアルカリ性で FAD pyrophosphatase があることになる。

各種磷酸化合物の阻害については、すでに須田⁽¹⁰⁾が動物臓器抽出液により pH 8 で FAD を水解する時、無機ピロ磷酸が阻害することを認めている。しかし Kornberg⁽²⁾によると Nucleotide pyrophosphatase による DPN 水解の無機ピロ磷酸阻害は pH 8.5 では著しいが、pH 7.4 では認められず、同様の阻害関係が磷酸塩でも認められていると述べた。著者は筋肉 FAD pyrophosphatase に対する阻害を実験した。阻害の程度は無機ピロ磷酸が最も強く、次で無機磷酸、フェノール磷酸、DPP の順に弱くなる。注目すべき点は DPP が構造上 FAD に最も近似であるに拘らず、その阻害が遙かに弱いことである。従つて無機ピロ磷酸の阻害は相競性であるとは云い得ないし、この阻害成績のみか

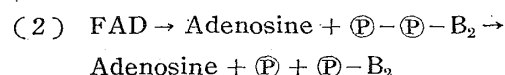
ら FAD pyrophosphatase は FAD のピロリン酸結合を水解するとは断定し得ないことになる。Mc. Illwain⁽¹¹⁾, Handler⁽¹²⁾, Kaplan⁽¹³⁾等は DPN のピロリン酸結合を水解せず, Nicotinic amide を直離する酵素, DPN nucleosidase を分離した。この酵素のうち動物臓器から得られたものは, Nicotinic amide で阻害されるが, Neurospora から得られた酵素は阻害されないと述べている。この様に阻害の機序は簡単には説明し得ないのである。

FAD 水解酵素に対する金属イオンの影響について, 須田は彼の酵素が Mg^{++} , Co^{++} で賦活され, 且つピロリン酸による阻害が Cu 塩の存在で除去されると報告している。著者の筋肉 FAD pyrophosphatase も Kornberg の Nucleotide pyrophosphatase も, ピロリン酸による阻害は認められるが Mg^{++} , Ca^{++} では賦活も抑制もされない。

粗 Esterpyrophosphatase 液及び筋肉 FAD pyrophosphatase 液による FAD 水解生成物の検出は PCG で行い, 螢光性物質としての試験では FAD スポットの消失と FMN スポットの螢光の増強を認め, 紫外線吸収 AMP と僅微な Adenosine の外に原点に止る物質のスポットを検出した。この PCG の結果は, FAD が水解され FMN を生ずることを示すが, FAD の他半たるアデニル酸部分よりの生成物が Adenosine であるか, 或は AMP であるかは不明であり, 前記酵素液により FAD のピロリン酸結合のみが水解されたものとは云い得ない。一体, FMN (B_2-P) を生ずる FAD の水解経過については次の種々の場合が考えられる。

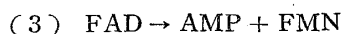


此の式のように反応が起るとすると, 粗 Esterpyrophosphatase 液及び筋肉 FAD pyrophosphatase 液はまず FAD を Adenine と Ribose- $\textcircled{P}-\textcircled{P}-B_2$ に水解する酵素と, 更に生成 Ribose- $\textcircled{P}-\textcircled{P}-B_2$ を Ribose- $\textcircled{P}$ と FMN (B_2-P) とに水解する酵素との混合であることになる。この様な FAD の水解過程は水解終産物中に Adenine を含み, PCG により, 当然紫外線吸収物質として Adenine を認めるわけであるが, 私の実験では Adenine を検出し得ず, この水解過程は否定し得る。



両酵素液が式の如き水解経過を示す酵素混合であ

ると考えると, 水解終産物中には Adenosine と磷酸と FMN (B_2-P) を含み, 水解中間産物として B_2 pyrophosphate ($\textcircled{P}-\textcircled{P}-B_2$ で示されたもの) を生成することになり, PCG に於いては紫外線吸収物質として Adenosine のみが検出されるべきである。著者の PCG の結果は, 紫外線吸収物質として僅微な Adenosine のスポットの外に, 濃厚且つ大きな AMP のスポットを検出し, 螢光性物質として FAD の消失と共に FMN スポットの増強を認めたから (2) 式の如き水解過程は否定し得る。なお Adenosine の生成は粗 Esterpyrophosphatase 液及び筋肉 FAD pyrophosphatase 液中に僅かに混在している磷酸モノエステラーゼにより生成 AMP を更に水解して生じたものと考えるのが妥当である。 B_2 pyrophosphate と思われる物質について, 八木⁽¹⁴⁾, 清水⁽¹⁵⁾が報告している。八木は臓器より B_2 を抽出するとき, 90° 以上で温水抽出すると B_2 3型以外に, 新たに Rf 0.13 の B_2 化合物を生ずることを報告し, この新しい化合物を Fourth-Flavin Compound (FFC) と名付けた。又清水は FR と P_2O_5 との練合反応物から PCG で未反応 FR と反応生成物として Rf 0.10 の FMN の外に Rf 0.12 の未知 B_2 化合物を生ずることを認め, この B_2 化合物が B_2 pyrophosphate でないかと報告している。私の臓器からの B_2 抽出液には B_2 3型以外の螢光性スポットを検出し得なかつたが, チョコラー BB 液(日本衛材より注射液の原液を提供された)には B_2 3型以外に Rf 0.12 の螢光性スポットを多量に含むことを認め, このスポットの Rf は八木の FFC と同様のものであり, 又清水の B_2 -pyrophosphate と同 Rf より見て同じものと想像される。この B_2 pyrophosphate と思われる物質を含むチョコラー BB 液(動物臓器より基質 FAD 液を調整するのと同様の操作で処理した, チョコラー BB 原液)を基質とし粗 Esterpyrophosphatase 液及び筋肉 FAD pyrophosphatase 液を作用後, 水解生成物を PCG で調べると, FAD のスポットは消失し, FMN のスポットは増強されるが, B_2 pyrophosphate (Rf 0.12) のスポットは基質液中のと同じ様に残っており, Rf 0.12 の物質は両酵素液では水解されないことを示している。



著者の FAD 水解生成物を PCG で検したる結果は両酵素はいずれも (3) の如き水解過程を取ること示し, FAD のピロリン酸結合を水解して, AMP と

FMNを生ずるものである。

総 括

1. 粗 Esterpyrophosphatase は FAD を至適酸度 pH 8.9 で水解するが、アルカリ性 Esterpyrophosphatase は FAD を水解し得ない。
2. 筋肉 FAD pyrophosphatase は磷酸モノエステラーゼ、ピロ磷酸酵素, Esterpyrophosphatase を含まず, FAD のみを至適酸度 pH 8 で水解する。
3. 未純化 Nucleotide pyrophosphatase は至適酸度 pH 3 の Esterpyrophosphatase 及び FAD pyrophosphatase を持つ。
4. 筋肉 FAD pyrophosphatase は無機ピロ磷酸 > 無機磷酸 > フェノール磷酸 > DPP の順に阻害され, Mg^{++} , Ca^{++} によつて賦活も抑制もされない。
5. 粗 Esterpyrophosphatase 及び筋肉 FAD pyrophosphatase による FAD 水解生成物を PCG で調べ, AMP と FMN を証明し, 両酵素は FAD のピロ磷酸結合を水解するものである。

本研究は、文部省から赤松教授に与えられた科学研究費により行われた。全実験を指導せられた赤松教授に対しここに深く感謝する。

文 献

- | | |
|---|--|
| 1) 須田正己: 阪大医学誌, 2, 2, 89, 91 (1950). | 9) 関口豊三: 生化学, 26, 4, 476 (1954). |
| 2) Kornberg, A. a. Pricer. W. E., Jr: J. B. C. 182, 763 (1950). | 10) 須田正己: 大阪医会誌, 42, 1654 (1943). |
| 3) 山脇 茂: 千葉医会誌, 30, 4, 403 (1954). | 11) Mc Illwain, H. a. Rodnight, R.: Bioc-hem. J. 44, 470 (1949); 45, 337 (1949). |
| 4) Warburg, O. u. Christian, W.: Biochem. Z. 298, 150 (1938). | 12) Handler, P. a. Klein, J.: J. B. C. 143, 49 (1942). |
| 5) 藤田秋治: ビタミンの化学的定量法(1948). | 13) Kaplan, N. O., Colowick, S. P. a. Nassn. A.: J. B. C. 191, 473 (1951). |
| 6) 八木国夫: フラビン (1951). | 14) 八木国夫: 科学, 23, 10, 532 (1953). |
| 7) 松崎喜久男: ビタミン, 6, 5, 725 (1953). | 15) 清水祥一: ビタミン, 6, 5, 751 (1953). |
| 8) Markam, R. a. Smith, J. B.: Nature, 163, 250 (1949). | |