[農化 第 46 卷, 第 3 号, p. 103~110, 1972]

ピリドキサル・りん酸の生産に関する研究 (第 1 報)

フラビン存在下におけるピリドキシン-5'-りん酸およびピリドキシン-4',5'-環状りん酸エステルの光酸化について

峯 浦 和 幸, 田 中 正 生
(協和醸酵工業株式会社富士工場研究室)

昭 和 46 年 7 月 23 日 受 理

Studies on the Production of Pyridoxal Phosphate Part I. Photooxidation of Pyridoxine-5'-phosphate and Pyridoxine-4',5'-cyclicphosphate in the Presence of Flavin Compounds

By Kazuyuki MINEURA and Masao TANAKA
Fuji Research Laboratory of Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

It was found that both pyridoxine-5'-phosphate (PIN-P) and pyridoxine-4',5'-cyclic-phosphate (cyclicPIN-P) were decomposed by the irradiation with visible light in the presence of flavin compounds, such as riboflavin, FAD and FMN (coenzyme of PIN-P oxidase).

The some conditions and the mechanism of photochemical decomposition of PIN-P were studied. The results were as follows:

(1) PIN-P and cyclicPIN-P were decomposed by the irradiation with visible light in the presence of catalytic amount of flavin compounds under the aerobic condition.

(2) The photosensitizing activities of flavin compounds were in the order of FMN $\approx$ FR > FAD.

(3) The optimal pH of this reaction was 7~8.

(4) This reaction was inhibited with metal ions such as Cu²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Al³⁺ and Ni²⁺.

(5) The stability of FMN during irradiation was increased with PIN-P.

(6) In the optimal condition, both PIN-P and cyclicPIN-P were oxidized to 4'-pyridoxic acid-5'-phosphate through PAL-P. 4'-Pyridoxic acid-5'-phosphate was thought to be futher decomposed.

(Received July 23, 1971)

緒 言

ビタミン B₆ が光に対して不安定であることは古くから知られ, 多くの報告があるが⁽¹⁻⁵⁾, いずれの報告も, 太陽光線, 紫外線および可視光などの光単独の作用下においてなされたものであり, 光増感剤存在下におけるビタミン B₆ の光分解反応に関する研究は見あたらない。

著者らは, たまたまピリドキシン-5'-りん酸が FMN

の存在下に容易に光酸化される事実を認めた。この反応は FMN が光化学反応の分野において, 光増感剤としての作用が知られる⁽⁷⁻¹⁰⁾。一方, 生体内のビタミン B₆ 活性化に関連する pyridoxine phosphate oxidase の補酵素⁽⁶⁾として要求される点で, この低エネルギーの温和な反応が, 酵素モデル反応として考える場合, 基礎的にも興味をもたれると同時に, ピリドキサル-5'-りん酸の製造という実用面からも興味ある反応である。以上の点

から著者らは、ピリドキシン・りん酸およびピリドキシン・りん酸と物理化学的性質が近似し、ピリドキシンの化学的りん酸化により容易に得られる新規化合物であるピリドキシン-4',5'-環状りん酸エステル⁽¹¹⁾を用い、フラビンによる光増感酸化反応について検討し、興味ある知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試料 実験に使用したピリドキシン-5'-りん酸 (PIN-P) は Peterson らの方法⁽¹²⁾に従って合成した。ピリドキシン-4',5'-環状りん酸エステル (cyclicPIN-P) は、Fig. 1 に示す構造式を有し、ピリドキシン塩酸塩 (PIN-HCl) をポリソク酸により直接りん酸化する方法により⁽¹¹⁾合成した。その他実験に使用した試薬は、市販のものである。

Fig. 1. Structure of PIN-P and CyclicPIN-P.

2. 反応方法 PIN-P または cyclicPIN-P, フラビン, その他の添加物および緩衝液を含む水溶液を, 好氣的条件下の反応では L 型試験管中, 一方嫌氣的条件下の反応では, 充分抜気したツンベルグ管中で恒温振盪下に光照射した。光源としては, 室内散光型フラッドランプ (100 V, 300 W) を使用し, 光強度は反応液を含む試験管と光源間の距離を調節することにより任意に定め, 反応液を含む試験管面の照度を照度計により測定した。

3. PIN-P の定量 東洋濾紙 No. 51 A を固定層とし, 展開溶媒として *n*-ブタノール: アンモニア水: 水 (6:4:1) を用いるペーパークロマトグラフィー (PPC) によった。定量は 1/15 M りん酸緩衝液 (pH 7.0) にて, PIN-P スポットを室温 2 時間抽出し, 324 mμ の吸光度より算出した。

4. CyclicPIN-P の定量 上記 PPC 法および Gibbs 試薬改良法によった。従来の Gibbs 試薬法⁽¹⁴⁾では, PIN, ピリドキサミン (PAM) およびピリドキサル (PAL) は呈色するが, それらの磷酸エステルは呈色しないことを利用し, りん酸エステルの内 cyclicPIN-P のみ呈色せしめる方法を検討して, cyclicPIN-P の定量法を確立した。すなわち, 0~50 γ/ml の cyclicPIN-P

を含む試料液 2 ml に 1/10 M 磷酸緩衝液 (pH 8.5) 2 ml を加え, 硫安を飽和量添加した後, 水飽和 *n*-ブタノールにて調製した Gibbs 試薬 5 ml を添加し, 充分振盪し 30 分室温に放置後, 青色に発色したブタノール層の 660 mμ の吸光度を測定する。この方法によって, 他の B₆ 化合物およびそのりん酸エステルは発色しない。なお blank としては, 硫安無添加の発色液を使用した。

5. PAL-P の定量 フェニルヒドラジン法⁽¹³⁾の変法およびアボトリプトファナーゼ法⁽¹⁴⁾によった。フェニルヒドラジン法変法は, 従来の方法における夾雑 PAL と着色による影響を防ぐために, われわれにより改変したもので, 0~20 γ/ml の PAL-P を含む 3.8 ml の試料液に氷冷下 18 N 硫酸 0.5 ml と, フェニルヒドラジン水溶液 0.2 ml を添加し, 30 分低温下で発色せしめた後, 18 N NaOH 0.5 ml で中和し, 直ちに 2 M 重亜硫酸ソーダ 0.5 ml と水飽和ブタノール 5 ml を加えて抽出し, *n*-ブタノール層の呈色度を 410 mμ で測定した。

6. Dowex 1 × 2 (Cl 型) カラムクロマトグラフィー PIN-P または cyclicPIN-P の光分解生成物の確認の目的で, Dowex 1 × 2 (Cl 型, 100~200 メッシュ, 1.0 × 15.0 cm カラム) を用いた。溶出液の吸光度は HITACHI UV-VIS Effluent Monitor によった。

実験結果および考察

1. PIN-P および cyclicPIN-P の分解におよぼす光, FMN および酸素の影響

i) 好気条件下における光および FMN の影響: 好気条件下の PIN-P および cyclicPIN-P の可視光照射による分解におよぼす FMN の影響について検討した結果は, Table I に示したように, 明らかに PIN-P または cyclicPIN-P の光分解に FMN が関与していることが示されている。また, FMN 濃度の影響は Fig. 2 に示したように, 光を遮断した暗反応においては FMN の存在の

Table I. Effect of FMN on Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P

		B ₆ -P remained (%)	
		PIN-P	CyclicPIN-P
-FMN	irradiation	100	100
	none irradiation	100	100
+FMN	irradiation	39	30
	none irradiation	100	100

Reaction: B₆-P 10 μmoles, FMN 0.2 μmole and phosphate buffer (pH 6.0) 0.1 mmole in a reaction mixture of 5 ml, 35°C, 10,000 lux, 2 hrs.

Fig. 2. Effects of FMN Concentration on Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P.

Reaction: PIN-P (○) or cyclicPIN-P (●) 10 μ moles, FMN 0~1.0 μ mole and Tris buffer (pH 8.0) 0.2mmole in a reaction mixture of 5ml, 40°C, 10,000 lux, 2 hrs.

— none irradiation, ---- irradiation.

有無にかかわらず, 全く PIN-P または cyclicPIN-P の分解は認められなかった。一方, 光照射下においては FMN 濃度に比例して, PIN-P または cyclicPIN-P の分解が進行した。しかも PIN-P または cyclicPIN-P の光分解を促進させるための FMN 有効量は, PIN-P または cyclicPIN-P 量に比較して, 触媒量の存在でよいことが認められた。

ii) 通気の影響: FMN 存在下における可視光による PIN-P および cyclicPIN-P の分解におよぼす通気の影響は, Fig. 3 に示したように, 嫌氣的条件下においては FMN 濃度に無関係に, PIN-P または cyclicPIN-P の減少は全く認められなかったが, 好氣的条件下においては, FMN 濃度に比例して減少した。

以上のように, 好氣的条件下, FMN の触媒量の存在により, PIN-P または cyclicPIN-P が, 可視光により分解するということから, 本反応が FMN による光増感反応であり, かつ酸化分解反応であると推察された。

2. pH の影響

PIN-P または cyclicPIN-P の FMN による光増感分解反応におよぼす pH の影響は, Fig. 4 に示したように, PIN-P および cyclicPIN-P の分解速度は, pH 7~8 において最大値を示した。

CyclicPIN-P の光増感分解は, 硼酸緩衝液の影響を全く受けなかった。一方, PIN-P の分解においては, 硼酸

Fig. 3. Effect of Aeration on Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P.

Reaction: PIN-P (○) or cyclicPIN-P (●) 10 μ moles, FMN 0.2 μ mole and phosphate buffer (pH 6.0) 0.1mmole in a reaction mixture of 5ml, 35°C, 10,000 lux.

— anaerobic, ---- aerobic.

Fig. 4. Effect of pH on Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P.

Reaction: PIN-P (○) or cyclicPIN-P (●) 10 μ moles, FMN 0.2 μ mole and buffer 0.2mmole in a reaction mixture of 5ml, 35°C, 10,000 lux, 1.5 hrs.

1: citrate buffer, 2: phosphate buffer, 3: borate buffer.

緩衝液の影響が著しかった。この現象は, 硼素が PIN-P と酯体を形成し, 反応を阻害しているものと推察された。

Fig. 5. Effect of Illumination on Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P.

Reaction: PIN-P (○) or cyclicPIN-P (●) 10 μ moles, FMN 0.2 μ mole and phosphate buffer (pH 6.0) 0.2mmole in a reaction mixture of 5ml, 35°C, 1hr.

3. 光照度の影響

室内散光型フラッドランプを使用した場合の PIN-P の光増感反応におよぼす照度の影響を調べた、その結果は Fig. 5 に示したように、0~10,000 ルックスの光照度範囲において、PIN-P の分解度は光強度と比例した。

上記光源以外に蛍光灯、高圧および低圧水銀灯などを用いた結果においても、光源のエネルギーおよび強度による影響の差は生じるが、いずれの光源を用いても反応することを認めた。このように、室内散光型フラッドランプまたは蛍光灯で反応すること、および FMN の可視部吸光スペクトラムから、4000~5000 Å の波長の光線が本反応に有効であろうと推察された。

4. フラビン種の影響

フラビン種による PIN-P、または cyclicPIN-P の光増感分解におよぼす影響については、Table II に示したように、FR、FMN および FAD により、PIN-P または cyclicPIN-P の分解に対する増感活性が異なり、FR および FMN に比較して、FAD に著しくその活性が低いという現象を認めた。このことは FAD が、分子内でイソアロキサジン核とプリン核との間で分子内複合体を形成し、安定化しているという Weber らの報告⁽¹⁵⁾を考慮すれば、FAD と PIN-P または cyclicPIN-P との間に、電子授受系が形成されていないためであろうと推定される。

Table II. Effect of Flavins on Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P

Flavin	Concentration of flavin	B ₆ -P remained (%)	
		PIN-P	CyclicPIN-P
None	—	100	100
FR	2 $\times 10^{-5}$ (M/L)	74	64
	4 "	52	32
FMN	2 "	69	73
	4 "	50	52
FAD	2 "	97	97
	4 "	94	94

Reaction: PIN-P or cyclicPIN-P 10 μ moles, flavin 0.1 or 0.2 μ mole and Tris buffer (pH 8.0) 0.2mmole in a reaction mixture of 5ml, 40°C, 10,000 lux, 1hr.

Table III. Effect of Metal Ions on Photochemical Decomposition of PIN-P in the Presence of FMN

Metal ion	PIN-P remained	Metal ion	PIN-P remained
Ag ⁺	52(%)	Zn ²⁺	65(%)
Ca ²⁺	50	Cd ²⁺	55
Cu ²⁺	86	Mn ²⁺	91
Hg ²⁺	71	Sn ²⁺	50
Co ²⁺	89	Ba ²⁺	50
Fe ²⁺	79	Pb ²⁺	81
Mg ²⁺	51	Ni ²⁺	69
Al ³⁺	76	none	52

Reaction: PIN-P 10 μ moles, FMN 0.2 μ mole, metal ion 2.5 μ moles and Tris buffer (pH 7.5) 0.2mmole in a reaction mixture of 5ml, 35°C, 10,000 lux, 1.5 hrs.

5. 金属イオンの影響

FMN による PIN-P の光増感分解におよぼす金属イオンの影響について調べた結果は、Table III に示したように、反応を促進する金属イオンは認められず、多くの金属イオン、特に Cu²⁺、Hg²⁺、Co²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Mn²⁺、Pb²⁺、Ni²⁺、Al³⁺ などは、強く反応を阻害した。これらの作用は、励起した FMN と金属イオンが反応し、FMN を基底状態のエネルギーレベルに下げることによる反応阻害であろうと推察される。

6. PIN-P による光に対する FMN の安定化

FMN は光に対して不安定であることは、すでに知られている。しかるに PIN-P が共存する水溶液中における FMN の安定性について調べた結果は、Fig. 6 に示したように、PIN-P が存在しない FMN 単独溶液の光照射においては、1 時間で 375 m μ および 450 m μ における極大吸収が、光照射により減少し、FMN が分解してい

Fig. 6. Change in Absorption Spectrum of FMN during Irradiation.

Reaction : FMN 0.25 μ mole, PIN-P 25 μ moles and phosphate buffer (pH 7.0) 0.2 mmole in a reaction mixture of 5 ml, 10,000 lux, 1 hr.

1 : none irradiation, FMN PIN-P, 2 : irradiation, FMN PIN-P, 3 : irradiation, FMN only.

ることを示している。一方 PIN-P の共存下においては、吸収スペクトルの変化が著しく抑えられており、このことは PIN-P が FMN の安定化作用を有していることを示している。また、種々濃度の PIN-P 存在下で FMN の吸収スペクトルの測定を行なったが、室温下においては吸収極大値の波長シフトは認められなかった。しかし凍結することにより、肉眼的観察でその色調に PIN-P の存

在の有無では明確な差異を生じた。このことは、György らの FMN とトリプトファンの電子移動に関する報告とよく一致した⁽⁹⁾。cyclicPIN-P についても、全く同様の現象が認められた。この PIN-P または cyclicPIN-P による FMN の安定化作用、および色調変化、および先に記した FAD が弱い光増感活性を示した事実から、PIN-P または cyclicPIN-P は、FMN と電子移動複合体を形成しているものと推定された。

7. 反応様式

FMN による PIN-P または cyclicPIN-P の光増感分解の反応様式を調べた結果は、Fig. 7 および Fig. 8 に示した。この結果から、PIN-P および cyclicPIN-P いずれの場合においても、1 次反応であり、PIN-P または cyclicPIN-P の FMN に対する解離定数は、この条件下においては、それぞれ 2.7×10^{-3} M および 1.9×10^{-3} M であり、反応速度定数は、それぞれ $1.08 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ および $1.34 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ と算出された。これらの結果から、PIN-P に比較して cyclicPIN-P は、FMN による光増感分解をやや受けやすいことを認めた。

Fig. 7. Effect of B_6 -P Concentration on the Photochemical Reaction.

Reaction : PIN-P (○) or cyclicPIN-P (●) 10~20 μ moles, FMN 0.2 μ mole and phosphate buffer (pH 7.5) 0.2 mmole in a reaction mixture of 5 ml, 10,000 lux, 1 hr.

Fig. 8. Time Course of the Photochemical Reaction.

Reaction : PIN-P (○) or cyclicPIN-P (●) 10 μ moles, FMN 0.2 μ mole and phosphate buffer (pH 7.5) 0.2 mmole in total volume 5 ml, 35°C, 10,000 lux.

Table IV. Detection of PAL-P in the Reaction Mixture with PIN-P

Time of reaction	PAL-P produced ($\mu\text{g/ml}$)	
	(1)	(2)
0(hr)	0	0
1	2.0	1.0
2	3.0	2.5
3	2.6	2.3
4	1.7	1.8
5	0.7	0.9
6	0	0.3

(1): photometric determination with phenylhydrazine, (2): enzymatic determination with apotryptophanase.

Reaction: PIN-P 20 μmoles , FMN 0.4 μmole and phosphate buffer (pH 7.5) 0.2 mmole in a reaction mixture of 5 ml, 35°C, 10,000 lux.

8. 分解生成物の検索

i) PIN-P の光分解について: 本反応は好氣的条件下においてのみ進行し, 嫌氣的条件下においては全く反応しないことから, PIN-P が開環を受けるまえに, 4位のヒドロキシメチル基の酸化をうけることが推察される. 従って, まず反応液中の PAL-P 量の定量を試みた. その結果は Table IV に示したように, 微量ではあるが PAL-P の生成を確認した. また, 反応液の PPC を行なった結果は, Fig. 9 に示した. 図中に PIN-P および FMN 関連化合物の標準品の R_f 値を示した. FMN を用いた反応であるため, その分解産物の混在が避けられず, 多数のスポットを与えるが, FMN 由来の生成物と思われるスポットは, FMN 単独溶液の光反応液の PPC により認知し, PIN-P 分解物と識別した. その結果, 一定の反応時間内において PIN-P の減少にともない, R_f 値および蛍光の色調が 4'-pyridoxic acid-5'-phosphate (4'-PIC-5'-P) と同一のスポットの増大を認め, このスポットはさらに長時間の光反応にともない減少した.

PPC 法により検出された分解生成物を分離する目的で, Dowex 1 $\times$ 2 (Cl 型) によるカラムクロマトグラフィーを行なった. 好氣的条件下で 15 時間光照射した反応液 10 ml をカラムに負荷した後, 水および塩酸で溶出した. その結果, Fig. 10 に示した溶出曲線が得られた. 溶出画分 (I,

Fig. 9. Paper Chromatography of Reaction Mixture with PIN-P.

y: yellow fluorescence, b: blue fluorescence, yb: yellowish blue fluorescence.

Paper: Toyo Roshi No. 51 A, solvent: n-propanol: ammonia water: water (6:4:1), reaction: as same as Table IV.

II, III) を濃縮し, PPC を行なった結果, I は FR およびその分解物を含み, II は未分解の PIN-P であった. III は R_f 0.45 の 4'-PIC-5'-P と思われる化合物と, FMN (R_f 0.65) の 2 成分を含むことを認め, III の画分の R_f 0.45 の青色蛍光物質を 0.1 N NaOH, 0.1 N HCl および 0.1 M リン酸緩衝液にて抽出し, 紫外吸収スペクトルの測定を行なった結果, Fig. 11 に示したように, 標準の 4'-PIC-5'-P と全く一致し, R_f 0.45 物質は 4'-PIC-5'-P と同定した.

ii) CyclicPIN-P の分解物について: アルカリ水

Fig. 10. Elution Pattern of Photolysis Products with Dowex 1 $\times$ 2 (Cl form).

Reaction: PIN-P 0.2 g, FMN 4 mg and phosphate buffer (pH 7.0) 0.8 mmole in a reaction mixture of 10 ml, 35°C, 10,000 lux, 15 hrs.

Column: Dowex 1 $\times$ 2 (Cl form, 100~200 mesh, 1.0 $\times$ 15 cm).

— 260 m μ , ---- 320 m μ .

Fig. 11. Ultraviolet Spectra of R_f 0.45 Substance.

Solvent : 1 ; 0.1 N NaOH, 2 ; phosphate buffer (pH 7.0), 3 ; 0.1 N HCl.

溶液中において, cyclicPIN-P の環状りん酸エステルは加水分解し, PIN-P を生成することを確認している⁽¹⁵⁾. 従って, cyclicPIN-P の光分解も PIN-P と同様に, 酸化分解することが推測された. 一方, 環状構造が直接酸化される可能性も考えられた. 従って cyclicPIN-P の光分解では, 4' 位および 5' 位のヒドロキシメチルの酸化が考えられた. PIN-P の場合と同様に, 光反応液中の PAL-P を酵素法および化学定量法により測定した結果は, Table V に示した. PIN-P の場合と同様に微量ではあるが, 反応液中に PAL-P の生成を認めた. なお酵素法による定量値と, 化学定量法による定量値がよく一致することから, isoPAL-P の生成はないものと判断された.

また, 光反応液の PPC を行なった結果は, Fig. 12 に示した. PIN-P の場合と全く同様に, cyclicPIN-P の減少にともない, R_f 0.45 の蛍光スポットの増大を認める以外に, cyclicPIN-P 由来と思われる分解産物は蛍光, 紫外吸収および Gibbs 試薬による呈色反応にては, 検出されなかった. また PIN-P と同様に, 光反応液を Dowex 1×2 (Cl 型) によるカラムクロマトグラフィーを行ない, 0.1 N HCl で溶出する画分を同様に処理し,

Table V. Detection of PAL-P in the Reaction Mixture with CyclicPIN-P

Method of analysis	PAL-P produced (g/ml)
Phenylhydrazine method	30.0
Apotryptophanase method	31.4

Reaction : cyclicPIN-P 50mg, FMN 1mg and phosphate buffer (pH 7.0) 0.1mmole in a reaction mixture of 5ml, 35°C, 10,000 lux, 15hrs.

Fig. 12. Paper Chromatography of Photolysis Products with CyclicPIN-P.

Condition of paper chromatography : as same as Fig.

Reaction : cyclicPIN-P 20 μ moles, FMN 0.4 μ mole, phosphate buffer (pH 7.5) 0.2 mmole, total volume 5 ml, 35°C, 10,000 lux.

Fig. 13. The Pathway of Photochemical Decomposition of PIN-P and CyclicPIN-P.

紫外外部吸収スペクトラムを取った結果は, Fig. 11 に示した 4'-PIC-5'-P と全く一致した. 以上のように, cyclicPIN-P の光反応液中に PAL-P および 4'-PIC-5'-P のみの生成を認め, 5' 位のヒドロキシメチルの酸化に由来する生成物は認められなかったこと, 光反応液中に PIN-P の生成も認められなかったこと, および先に記したように cyclicPIN-P の光増感分解には酸素は全く影響しないが, PIN-P の場合には阻害的に作用し, 同一条件下における cyclicPIN-P の光増感分解速度は, PIN-P のそれに比較して大であったことなどの結果から, cyclicPIN-P は環状りん酸エステル構造のまま, 直接 4'

位が特異的に酸化分解するものと考えられた。

以上の結果から, PIN-P および cyclicPIN-P のフラビンによる光増感分解は, Fig. 13 に示した経路を経るものと推論した。

要 約

PIN-P および cyclicPIN-P のフラビン存在下における光分解反応について検討した。その結果,

(1) 好氣的条件下, フラビンの触媒量の存在により容易に分解した。

(2) フラビンとしては FR および FMN が有効であり, 一方 FAD の触媒活性は著しく弱い。

(3) 分解反応の至適 pH 域は 7~8 であった。

(4) この反応は多くの金属イオン, 特に Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} などにより強く阻害された。

(5) PIN-P は水溶液中において, FMN の光に対する安定性を著しく増大させた。

(6) この反応は 1 次反応であり, cyclicPIN-P が PIN-P に比較して, やや反応性に富んでいた。

(7) PIN-P および cyclicPIN-P いずれの場合においても, 反応生成物として PAL-P および 4'-PIC-5'-P を確認した。従って, 本反応はフラビンによる光増感酸化分解であり, PIN-P は 4' 位の hydroxymethyl の酸化であること, 一方 cyclicPIN-P は, 環状りん酸エステル構造のまま, 4' 位のみが特異的に酸化されることを明らかにした。

終りに, この研究に当り終始ご指導ご鞭撻を賜りました当社東京研究所長木下祝郎博士に対し, 厚くお礼申し上げます。

- (1) M. Hochberg, D. Melnick and B. L. Oser : *J. Biol. Chem.*, **155**, 129 (1944).
- (2) E. Cunningham and E. E. Snell : *ibid.*, **158**, 491 (1945).
- (3) M. Adler and G. Schwartzman : *Arch. Biochem.*, **28**, 405 (1950).
- (4) A. L. Morrison and R. F. Long : *J. Chem. Soc.*, **1958**, 211.
- (5) 池田精一郎, 岡 達, 大石誠子, 福井三郎 : ビタミン, **38**, 109 (1968).
- (6) S. Yamamoto, T. Tochikura and K. Ogata : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 315 (1965).
- (7) J. S. Sussenbach : *Biochem. et Biophys.*, **105**, 197 (1964).
- (8) K. Uehara, T. Mizoguchi, Y. Okada and J. Kuwashima : *J. Biochem.*, **59**, 433 (1966).
- (9) S. György : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 1229 (1959).
- (10) S. F. Yang, H. S. Ku and H. K. Pratt : *J. Biol. Chem.*, **242**, 5274 (1967).
- (11) 貴志光雄, 峯浦和幸, 田中正生 : 日本農芸化学会大会, p.163 (1968).
- (12) E. A. Peterson and H. A. Sober : *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 169 (1954).
- (13) H. Wada and E. E. Snell : *J. Biol. Chem.*, **236**, 2089 (1961).
- (14) H. Wada : *J. Vitaminol.*, **3**, 183 (1957).
- (15) G. Weber : *Biochem. J.*, **47**, 114 (1950).