抗菌性物質の作用機作に関する研究 (第 1 報) デハイドロ酢酸
ナトリウムと Flavin との Interaction について

久恒和仁

徳島大学医学部栄養学科¹⁾

Studies on Mode of Action of Antibacterial Substances. I.
Interaction between Sodium Dehydroacetate and Flavins

KAZUHITO HISATSUNE

Department of Food Microbiology, School of Medicine, Tokushima University¹⁾

(Received March 23, 1970)

An evidence was provided that a kind of a complex is formed by interaction between sodium dehydroacetate with flavin in aqueous solution from the result of physicochemical examination proving the following four points. In the presence of sodium dehydroacetate, (1) quenching of fluorescence characteristic to flavin occurs, (2) a change occurs in the ultraviolet absorption spectrum of flavin, the absorption maximum at 445—450 m μ shifting to a longer wavelength region, with decrease in its intensity, (3) photodecomposition of flavin is markedly inhibited, and (4) solubility of sparingly soluble riboflavin increases markedly. Dissociation constant of flavin-sodium dehydroacetate complex was measured by the fluorescence method, absorption spectroscopy, and by the solubilization method and the value was found to be approximately 2 to 6×10^{-2} M/L (pH 5.8—8.6, 20°). The site of the dehydroacetic acid molecule interacting with flavin seems to be the enolic hydroxyl in 4-position of its pyrone ring.

デハイドロ酢酸 dehydroacetic acid (DHA) は細菌, カビ, 酵母にわたる広範囲な抗菌スペクトルをもち, しかもその化学構造が比較的簡単な抗微生物剤である. DHA の化学構造上の特徴は図に示すように pyrone 核 3

位の C 原子を中心に 3 個の $-C=O$ 基が共軛し, しかもその 1 個が容易に enol 化しうる構造, いわゆる tricarbonyl methane 原子団²⁾ をもっていることである. この原子団をもっている化合物の抗菌性と化学構造との関係については浮田ら³⁾ により明確な法則性が見出されている.

DHA はその化学構造において, この tricarbonyl methane 原子団化合物の最小のヒナ型と見なしうる抗菌性化合物である. また, テトラサイクリン系抗生物質の化学構造のうち, その強力な抗菌性の発現に必須かつ本質的な役割を果す部分はテトラサイクリン核中の非芳香性 6 角環 A 環であることが知られている.³⁾ この A 環には tricarbonyl methane 原子団構造が存在しており DHA はこの A 環ときわめて関係深い構造をもっている. 著者は従来 DHA を中心とする pyrone 系および benzopyrone 系化合物, 特に 4-hydroxy-coumarin 系化合物の合成的研究に従事し, その化学構造と抗菌作用との関係につき種々検討を重ねて来た.⁴⁾ しかしながら今回, 全

1) Location: Kuramoto-cho, Tokushima.

2) T. Ukita, D. Mizuno, T. Tamura, T. Yamakawa, S. Nojima, 薬誌, 71, 234 (1951).

3) 浮田忠之進, “応微研シンポジウム I. 細胞の増殖,” 1959, p. 202.

4) 井口定男, 久恒和仁, 薬誌, 77, 94 (1957); *idem, ibid.*, 薬誌, 77, 98 (1957); S. Iguchi, K. Hisatsune, M. Himeno, S. Muraoka, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 7, 324 (1959); S. Iguchi, K. Hisatsune, S. Goto, E. Futagami, H. Miyake, J. Iida, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 8, 1 (1960); 松村久吉, 井口定男, 久恒和仁, 竜原 徹, 小林祐子, 薬剤学, 19, 24 (1957).

く新しい観点に立って以下述べるような DHA の作用機作に関する研究を生体代謝反応において本質的に重要な役割を演ずる flavin 補酵素との関連において新に試みた。Riboflavin (FR), flavin adenine dinucleotide (FAD) および flavin mononucleotide (FMN) 等の flavin はその水溶液中において特有の螢光を放つ。著者は先きにこの flavin 水溶液の螢光がデハイドロ酢酸ナトリウム (DHA-Na) の共存によって顕著に抑制されること (flavin 螢光の消光現象 quenching) をはじめて見出した。⁵⁾ Flavin の螢光に対する消光作用は caffein⁶⁾ や phenol⁷⁾ 等によって起こることがすでに見出されている。この現象はこれら化合物と flavin との間に一種の interaction が起こりその結果両者の間に一種の complex が形成されるために起こることが明らかにされている。特に phenol-flavin 間の interaction に関しては八木ら⁸⁾ によって広範な研究がなされており DHA-Na も当然 flavin との間に水溶液中で interaction を起こして一種の complex を形成することが推測される。Flavin はビタミン B₂ 群として生体反応において本質的に重要な役割を演ずる補酵素であり細菌の重要な成長因子の 1 つでもある。これを補酵素とするいわゆる flavin 酵素は酸化還元系, 電子伝達系, 酸化的燐酸化等の生体における最も重要な代謝反応に関与している。著者は DHA-Na による flavin 螢光の消光に関する新事実の発見から当然 DHA-Na と flavin との間に一種の interaction が生ずることを予測し, さらに進んでこの interaction の結果, 当然 flavin を補酵素とする flavin 酵素に対して DHA-Na が酵素阻害を呈することを予見し, DHA-Na の抗菌機作の本質に迫るべき 1 つの試みとして本研究を企画した。本報においては flavin-DHA-Na 間の interaction に関する物理化学検討の結果を報告する。Flavin 酵素の 1 つの酵素モデルとして取上げた精製 D-アミノ酸酸化酵素に対する DHA-Na の阻害作用, およびその阻害の酵素反応速度論的解析についてはすでに予報⁹⁾ で報告したが詳細は次報において報告する。

実 験 の 部

本実験において用いられた DHA-Na ($C_8H_6O_4Na$) は台糖ファイザー K.K 製品を含水 EtOH で再結したものを使用した。今回使用した flavin のうち FR は東京化成, FAD はワカモト製薬, FMN は Nutritional Biological Corporation (U.S.A.) の各社製品を使用した。FAD の純度は 89.4% で各 Flavin の濃度は, すべて 450 $m\mu$ での吸収によって測定した。

Triacetic acid lacton $C_8H_6O_3$, mp 188° は DHA の decarboxylation¹⁰⁾ によって, 2,6-dimethyl- γ -pyrone $C_7H_8O_2$, mp 136° は山口ら¹¹⁾ の記載に従い, 4,6-dimethyl- α -pyrone $C_7H_8O_2$, mp 48—50° は iso-dehydroacetic acid の decarboxylation¹²⁾ によってそれぞれ合成された。Triacetic acid lacton は当量の NaOH によって Na 塩とし, 他の 2 つの pyrone はそのまま pH 7.2 の 0.25M phosphate buffer に溶解して使用した。

緩衝系としては pH 5.8 と 7.2 においては 0.25M phosphate buffer を用い, pH 8.3 と 8.6 においては 0.1M pyrophosphate buffer を用いた。

螢光消光実験: Flavin の緩衝溶液 (10 γ /ml) に各濃度の DHA-Na を共存せしめた測定資料液を 2° または 20° の恒温槽に 30 分間つけたのち, できるだけすみやかに 2° または 20° の恒温槽においてその螢光エネルギーを測定した。測定には八木式螢光光度計 (川瀧 K.K.) を用い, 螢光励起フィルターとしては同機付属のフィルター UV₂ を使用した。

吸収スペクトル測定: FR, FMN 各 20 γ /ml および FAD 40 γ /ml の濃度の緩衝溶液を調製し, これに各濃度の DHA-Na を共存させた。各測定資料液は螢光消光実験の場合と同様に処理したのち, 20° において Beckman 分光光度計 DK₂ を用いて各 flavin の吸収スペクトルおよび吸収の強さを測定した。

光分解阻止実験: FR, FMN 各 20 γ /ml, FAD 40 γ /ml の溶解を調製し, これに各濃度の DHA-Na を共存せしめた後, 各溶液に対して室温において螢光燈, または直射日光を照射せしめた。HDA-Na を含まない対照の flavin 溶液の色が肉眼的にほとんど消失した時, 各溶液の吸収スペクトルを Beckman 分光光度計 DK₂ を用いて測定した。

可溶化実験: L 字型振盪管に FR の一定量 (10 mg) を秤量し, これに種々の量の DHA-Na を投入して pH 7.2 の 0.1M phosphate buffer 10 ml を加え 30° の恒温槽で 6—7 時間振盪を行なった。平衡に達したのち静置

5) 久恒和仁, 薬誌, 83, 109 (1963).

6) G. Weber, *Biochem. J.*, 47, 114 (1950).

7) K. Yagi, J. Okuda, T. Ozawa, K. Okada, *Biochem. Z.*, 328, 138 (1957).

8) K. Yagi, *Biochem. Biophys. Acta*, 35, 102 (1959).

9) 久恒和仁, 薬誌, 83, 111 (1963).

10) J.N. Collie, *J. Chem. Soc.*, 1891, 609.

11) 山口誠太郎, “有機合成化学,” 修養社, 1951, p. 233.

12) N.R. Smith, R.H. Wyiey, *Org. Synthesis*, 32, 57 (1952).

した上澄液より 1 ml を採取し、同じ buffer で正確に 10 ml とし 450 m μ での吸光度 optical density (OD) を測定した。

成 績

(I) DHA-Na の共存による Flavin 水溶液の蛍光の消光 Quenching

FAD 溶液 (10 γ /ml) pH 7.2 に各濃度の DHA-Na を共存させたとき、DHA-Na の濃度が大であるほど FAD の蛍光が抑制され 0.4M DHA-Na の共存下では FAD の蛍光はほとんど消光することが肉眼的に観察された。この際、共存する DHA-Na それ自体の吸収は蛍光励起フィルター UV₂ を通して来る Flavin に対する蛍光励起光に影響を与えないことが認められた。

つぎに各 flavin 溶液 (10 γ /ml) に各濃度の DHA-Na を共存させたときの蛍光エネルギーを測定した (Fig. 1)。DHA-Na が共存しない flavin 溶液の蛍光エネルギーを 100% とするとき、各 flavin とも、その蛍光エネルギーが共存する DHA-Na 濃度の増加につれ顕著に減少すること、換言すれば DHA-Na によって flavin の蛍光が抑制されることが示された。

この現象は酸性領域 pH 5.8, 中性領域 pH 7.2, ならびにアルカリ性領域 pH 8.6 のいずれの pH においても同様に観察された。終末濃度 0.45M の DHA-Na の共存下では各 flavin の蛍光は 98—99% 抑制され、前述のごとくその蛍光は肉眼的には全く消失した。この消光現象は pH 5.8—8.6 の範囲内では pH の変化によって顕著な差を示さなかったが、各 pH を通じて蛍光の消光は FR が最大で FR がそれにつき FAD が最小であった。

DHA-Na による flavin の蛍光消光におよぼす温度の影響は FAD の場合を例にとり Fig. 2 に示した。同一温度の DHA-Na の共存下において温度が上昇すると抑制されていた蛍光が復元する傾向、すなわち DHA-Na による消光効果がやや低下する傾向が認められた。この傾向は FAD においてももっとも大きく観察された。

以上、flavin 特有の蛍光が水溶液中において DHA-Na の共存により顕著に抑制されることが示された。この現象は Caffeine⁶⁾ や Phenol⁷⁾ の場合と同様、DHA-Na と flavin との間に水溶液中において一種の interaction

Fig. 1. Quenching Effect of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) on Fluorescence of Flavin at pH 7.2

concentration of flavins=10 γ /ml in 0.25M phosphate buffer, pH 7.2, AT 20°. FAD=flavin adenine dinucleotide, FMN=Flavin mononucleotide, FR=riboflavin

Fig. 2. Effect of Temperature on the Quenching Action of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) on Fluorescence of FAD

concentration of FAD=10 γ /ml in 0.25M phosphate buffer, pH 7.2

を生じ、その結果、両者間にある種の complex が形成されることが示すものと考えて差し支えないと思われる。

(II) DHA-Na の共存による Flavin の吸収スペクトルの変化

Flavin が示す吸収スペクトルの 2 つの peak のうち、長波長側の最大吸収波長は FR および FMN の場合は $445\text{ m}\mu$ 、FAD の場合は $450\text{ m}\mu$ で DHA-Na の吸収とは全く重複しない。したがって flavin-DHA-Na 間の interaction を DHA-Na の共存によって起こる各 flavin の吸収の変化からも証明する目的で以下の実験を行なった。FR, FAD (各 $20\gamma/\text{ml}$) および FAD ($40\gamma/\text{ml}$) 溶液に各濃度の DHA-Na を共存させた場合の吸収スペクトルを測定した結果、たとえば Fig. 3 に FR の場合を例にとって示すごとく、3 flavin とも DHA-Na の共存により $445\text{ m}\mu$ または $450\text{ m}\mu$ での最大吸収波長が長波長側へ移動する現象が認められた (ただし pH 8.6 における FAD の場合は例外)。しかも、その吸収の強さも同時に減少し、最大吸収波長の移動と同波長における吸収の減少度は共存する DHA-Na の濃度が大であるほど大きいことが Table I および Table IV に示すように認められた。かくて flavin-DHA-Na 間の interaction は DHA-Na の共存による flavin の吸収スペクトルの変化によっても示されたものと考えられる。

TABLE I. Changes in Absorption Spectra of Flavins caused by Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) in Aqueous Solutions at 20°

pH	Flavin (concentration)	Concentration of DHA-Na added (M)	Shift of λ_{max} ($\text{m}\mu$) ^{a)}	Decrease in optical density (OD) at $450\text{ m}\mu$
7.2	FR ($20\gamma/\text{ml}$)	0.40	5.0	0.083
	FMN ($20\gamma/\text{ml}$)	0.45	5.0	0.041
	FAD ($40\gamma/\text{ml}$)	0.45	1.3	0.044
8.3	FMN ($20\gamma/\text{ml}$)	0.45	2.5	0.054
	FAD ($40\gamma/\text{ml}$)	0.45	0	0.038

a) λ_{max} : maximum absorption wavelength

(III) DHA-Na による Flavin の光分解阻止作用

flavin は水溶液中において非常に容易に光分解を受ける。この Flavin の光分解は phenol のごとく flavin と水溶液中において interaction を起こして一種の complex

Fig. 3. Changes in Absorption Spectrum of Riboflavin caused by Sodium Dehydroacetate (DHA-Na)

concentration of riboflavin = $20\gamma/\text{ml}$ in 0.25M phosphate buffer, pH 7.2, AT 20°

Fig. 4. Inhibitory Effect of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) on Photodegradation of FAD

concentration of FAD = $40\gamma/\text{ml}$ in 0.25M phosphate buffer, pH 7.2, AT 20° control: without Exposure to light.

を形成する物質が存在する場合は著しく阻止される.¹³⁾ Flavin-DHA-Na 間の interaction を flavin の光分解に対する阻止の点から示す目的で検討した結果は FAD の場合を例にとり Fig. 4 に示した.

DHA-Na が共存しない flavin 単独の溶液では約 5 時間の日光の照射によってその吸収スペクトルは完全にくずれ去り、急激な光分解の程度がうかがわれた. しかし DHA-Na が共存した場合には flavin の光分解は顕著に抑制され、しかも DHA-Na の濃度が増加するにつれて flavin の光分解に対する阻止作用が増加することが認められた. この DHA-Na による flavin に対する光分解阻止作用は pH 5.8, 7.2 ならびに 8.6 の各 pH 領域において観察された. Phenol は弱酸性、ならびに中性領域においてのみ flavin に対する光分解阻止作用を示し、DNA-Na は phenol とは異なる様相を示すことが認められた.

(IV) Riboflavin (FR) に対する DHA-Na の可溶化作用

Flavin-DHA-Na 間の interaction の結果、flavin の溶解性に変化が起ることが期待されるので水に対して難溶解の FR に対する DHA-Na の可溶化作用が検討された. 対照として難溶性薬物の可溶化剤として一般に広く用いられるニコチン酸アミドを使用した. 各濃度の DHA-Na の共存下において飽和量以上の FR を含む緩衝液 (pH 7.2) を振とう (30°), 平衡後の上清の 450 m μ での吸光度が測定された. FR 飽和溶液の 450 m μ での吸光度は DHA-Na の共存により明らかに増加することが認められた. しかもそのとき、DHA-Na の濃度と吸光度との間には少くとも $3 \times 10^{-2}M$ までは直線関係が成立することが示された (Fig. 7 参照). FR の検量曲線から DHA-Na の共存によって見かけ上、増加する FR の濃度を示すと Table II に示すとおりである. これらの

TABLE II. Relationship between Apparent Concentration of Riboflavin Solution and Concentration of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) added (pH 7.2, 30°)

Concentration of DHA-Na added (M/liter)	Apparent concentration of riboflavin (mg/ml)	Increase in apparent concentration of riboflavin (mg/ml)
0	0.105	0
0.00708	0.119	0.014
0.00947	0.123	0.018
0.01812	0.131	0.026
0.02523	0.142	0.037
0.02982	0.151	0.046
Nicotinamide (control)		
0.0300	0.123	0.014

成績から、DHA-Na が FR に対して明らかに可溶化作用を示すことが認められ、その可溶化能は対照のニコチン酸アミドのそれよりも 2 倍以上も強力であった. 今この可溶化現象が FR-DHA-Na interaction の結果生ずる complex の溶解度が FR のそれよりも大であることに帰因するものであると考えることができるならば、FR に対する DHA-Na の可溶化作用は前述の flavin の蛍光の消光、吸光スペクトルの変化、ならびに光分解阻止等の諸作用と同様、flavin と DHA-Na との間に interaction が起こることを証明する一つの証拠と見て差し支えないものと考えられる.

(V) Flavin-DHA-Na 間の Interaction に対する定量的検討

前述の諸実験の成績により DHA-Na が水溶液中において flavin との間に interaction を起こし、その結果、両者の間に一種の complex が形成されると考えらるべき事実が示された. この flavin-DHA-Na complex の解離恒数について以下 3 つの方法により検討が加えられた.

1. Flavin の蛍光消光をもとにした Flavin-DHA-Na Complex の解離恒数 K_{if} の測定 (蛍光法)

Weber⁶⁾ は Caffein による FR の蛍光に対する消光作用に基づいて両者間の Ccomplex の解離恒数 K_{if} を測定した. この Weber の方法に準拠して、式

$$I_0/I - 1 = 1/K_{if} \cdot C \quad (1)$$

13) 八木國夫, “フラビンの生化学,” 第 1 版, 共立出版, 1956, p. 13.

を用い, flavin-DHA-Na complex の解離恒数 K_{if} を測定した. ただし, I_0 は蛍光消光物質 (Quencher) 添加前の flavin 溶液の蛍光エネルギー量, C は Quencher の濃度を示す. この場合, flavin の総量が Quencher の量に比して無視できるほど小であることが必要である. いま flavin の濃度が $10\gamma/\text{ml}$ の水溶液に $1 \times 10^{-2} - 6 \times 10^{-2}\text{M}$ の DHA-Na が共存する系では, flavin の総量は例えば FR の場合は $7 \times 10^{-6}\text{M}$ で DHA-Na の濃度に比して無視できるほど小である. したがって (1) 式から横軸の DHA-Na の濃度に対して $I_0/I-1$ を縦軸にプロットして得られる直線の勾配の逆数から flavin-DHA-Na complex の解離恒数 K_{if} が測定できる (この方法をここでは蛍光法と呼ぶ). DHA-Na 濃度に対して $I_0/I-1$ をプロットした結果は Fig. 5 に示すとおりである. FAD および FMN の場合には原点を通るほとんど直線に近い線が得られたが, FR の場合には原点を通るがやや上方に向って彎曲する曲線が得られた. この $I_0/I-1$ プロットがやや上方に彎曲する傾向は phenol¹³⁾ やヨードカリ¹⁴⁾ の場合と全く同様であることが認められた. したがって解離恒数 K_{if} は phenol¹³⁾ の場合に準拠してこの曲線の原点を通る切線の勾配の逆数から測定した (Table III).

pH 5.8—8.6 の領域では pH の変化は K_{if} の値に対してほとんど影響を与えないことが認められ, この pH 領域では各 flavin と DHA-Na との complex の K_{if} 値はおおよそ 10^{-2}M/liter の order であることが認められた. つぎに温度の K_{if} におよぼす影響を検討したが, 温度の上昇にともない K_{if} の値は各 flavin とともに増加する傾向が認められた.

2. Flavin のスペクトルの変化に基づく Flavin-DHA-Na Complex の解離恒数 K_{if} の測定 (吸収スペクトル法)

DHA-Na の共存により flavin の $455\text{ m}\mu$ または $450\text{ m}\mu$ における最大吸収波長が長波長側へ移動し, 同時にその吸収の強さが減少することは前項 (II) において示された. この現象に基づき八木ら⁷⁾ の方法に準拠して, 式により

$$1/\eta = \alpha K_{if}/p + \alpha \quad (2)$$

flavin-DHA-Na complex の解離恒数 K_{if} が測定された. ただし $1/\eta = \Delta S/\Delta i$, Δi は本実験の場合 DHA-Na の共存によって起る flavin の吸光度の変化量, ΔS は DHA-Na の共存により起る吸光度の最大変化量の半分と考えられる量, α は常数, p は DHA-Na の濃度である. この方法は Δi の値が相当大である場合は正確であるが小さい場合はかなり誤差が大きい不利をとるが, 概略値を求めて一応の参考にする意味でこの方法で検

Fig. 5. Quenching Effect of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) on the Fluorescence of Flavin. ($I_0/I-1$) Plot against the Concentration of DHA-Na

I and I_0 correspond to the fluorescent intensity of FAD with and without various concentrations of DHA-Na respectively. concentration of Flavin = $10\gamma/\text{ml}$ in 0.25M phosphate buffer pH 5.8, AT 20°

TABLE III. Dissociation Constants of Flavin-DHA-Na (Sodium Dehydroacetate) Complexes obtained by Means of Fluorometry at Different pH

pH	Dissociation constant at 20°		
	FR-DHA-Na complex $K_{if,FR}$ (10^{-2}M/liter)	FMN-DHA-Na Complex $K_{if,FMN}$ (10^{-2}M/liter)	FAD-DHA-Na complex $K_{if,FAD}$ (10^{-2}M/liter)
5.8	2.67	3.34	4.65
7.2	2.47	4.88	5.71
8.6	2.00	3.08	3.45

14) G. Weber, *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 185 (1948).

TABLE IV. Relationship between Decrease in Optical Density of Riboflavin at 445 m μ and the Concentration of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) (pH 7.2, 20°)

Concentration of DHA-Na added (M)	Decrease in optical density at 445 m μ Δi	$\eta = \frac{\Delta i}{\Delta S^a}$
0.08	0.042	1.000
0.1	0.050	1.191
0.2	0.070	1.667
0.3	0.076	1.809

^a) Half amount of approximate maximum decrease in optical density at 445 m μ of riboflavin solution caused by addition of DHA-Na.

討した (この方法をここでは吸収スペクトル法と呼ぶ). 共存する DHA-Na の濃度に対する Δi , および ΔS を 0.42 とした場合の η の値は Table IV に示すとおりである. (2) にしたがって DHA-Na の濃度の逆数に対し $1/\eta$ をプロットすることにより Fig. 6 に示す直線が得られた. この直線の勾配から 20° における FR-DHA-Na complex の解離恒数 ($K_{if,FR}$) = 1.9×10^{-1} M/liter (pH 7.2); FMN-DHA-Na complex の解離恒数 ($K_{if,FMN}$) = 3.7×10^{-1} M/liter (pH 7.2) および FAD-DAH-Na complex の解離恒数 ($K_{if,FAD}$) = 7.4×10^{-2} M/liter (pH 8.3) が測定された. これら吸収スペクトル法によって測定された K_{if} 値は $K_{if,FAD}$ を除いて蛍光法と後述の可溶化法で得られる測定値よりもかなり大きい値が得られることが認められた. しかし, phenol-flavin complex の場合にも吸収スペクトル法による K_{if} 値が蛍光法によるこれよりも 1 桁大きく出ることにはすでに八木ら⁷⁾によって指摘されているところである.

3. Flavin (FR) の溶解度増加に基づく Flavin-DHA-Na Complex の解離恒数 K_{if} の測定(可溶化法)

前項 (IV) において水に難溶性の FR の溶解度が DHA-Na の共存により顕著に増加することが明らかにされた. この DHA-Na の FR に対する可溶化作用に基づき Higuchi¹⁵⁾ の方法に準拠し $A/A_0 = C/K_{if} + 1$ (3) 式を用いて FR-DHA-Na complex の解離恒数 $K_{if,FR}$ が求められた. ただし A_0 は DHA-Na を添加しないときの FR 飽和溶液上澄液の 450 m μ での吸光度, A は DHA-Na が添加された FR 飽和溶液上澄液の平衡時の

Fig. 6. Effect of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) on Light Absorption by Riboflavin. Plot against Reciprocal of Concentration of DHA-Na

Signs are the same as in Table IV. [DHA-Na] = concentration of DHA-Na, concentration of riboflavin = 20 μ /ml 1N 0.25M phosphate buffer, pH 7.2, at 20°

Fig. 7. Effect of Sodium Dehydroacetate (DHA-Na) on the Solubility of Riboflavin in Water. A/A_0 Plot against Concentration of DHA-Na

A and A_0 correspond to optical density of riboflavin at 450 m μ with and without DHA-Na respectively. The experimental condition were the same as in Fig. 9.

450 m μ の吸光度, C は共存する DHA-Na の濃度である. pH 7.2 において共存する DHA-Na の濃度に対して A/A_0 をプロットした結果は Fig. 7 に示すとおりで, 截片 1 を通る直線が得られた (ただし 30°). この直線の勾配の逆数から $K_{if-FR}=6.7 \times 10^{-2}$ M/liter (pH 7.2) が測定された. この値は対照に用いたニコチン酸アミドと FR との complex の解離恒数 1.6×10^{-1} M/liter よりも小で, DHA-Na の FR に対する interaction が大きいことを物語った. この方法 (可溶化法) による K_{if-FR} の値はさきに螢光法によって得られた $K_{if-FR}=2.5 \times 10^{-2}$ M/liter (pH 7.2) (ただし 20°) に比較するとやや大きい, ほぼ近似的によく一致することが認められた.

TABLE V. Dissociation Constants of Flavin-DHA-Na (Sodium Dehydroacetate) Complexes obtained by Means of Different Methods

pH	Method	Dissociation constant at 20°		
		FR-DHA-Na complex K_{if-FR} (10^{-2} M/liter)	FMN-DHA-Na complex K_{if-FMN} (10^{-2} M/liter)	FAD-DHA-Na complex K_{if-FAD} (10^{-2} M/liter)
7.2	fluorometry	2.47	4.88	5.70
	spectrophotometry	1.87		
	solubilization	6.7		
8.3	fluorometry	2.57	3.34	3.85
	spectrophotometry			7.4

螢光法, 吸収スペクトル法, ならびに可溶化法によって測定された K_{if} の主な測定値は比較のため, まとめて Table V に示した. 3 方法による測定値は吸収スペクトル法による K_{if-FR} (pH 7.2) 以外は近似的によく一致し, 大体 10^{-2} M/liter order であることが認められた. 予報⁹⁾ において DHA-Na による D-アミノ酸酸化酵素に対する阻害作用の酵素反応速度論的解析の結果, $K_{if-FAD}=2.7 \times 10^{-2}$ M/liter (ただし pH 8.3, 36°) が測定されている. 今回の物理化学的測定値はこの値とも近似的によく符合した.

(VI) DHA-Na 関連化合物の化学構造と, その Flavin の螢光に対する消光作用との関係

DHA-Na と flavin との間の interaction の結果, 両者の間に complex が形成される場合, その interaction が両分子のどの部分をとおして行なわれるかを知ることができれば, この interaction, 換言すれば complex の結合の本態をうかがう手がかりが得られるという意味でははなはだ興味あると思われる. しかし複雑な構造の isoalloxazine 核をもつ flavin の関連導誘体を数多く合成することは容易ではないので, 本研究では合成が比較的容易である DHA の方の関連 pyrone 誘導体を用いて, それらの化学構造と flavin に対する螢光消光作用との関係を検討した. 実験に使用した DHA 関連誘導体は, triacetic acid lactone (TAL), 2,6-dimethyl- γ -pyrone ならびに 2,4-dimethyl- α -pyrone である. それらの化学構造は Table VI に示した. TAL は DHA の基本母核 pyrone 環, 3 位の enol 性 -OH 基, および 6 位の -CH₃ 基はもっているが 4 位の -COCH₃ 側鎖をもたない化合物である. 2,6-Dimethyl- γ -pyrone は TAL と同様に DHA の 3 位 -COCH₃ 側鎖をもたず, さらに 4 位の -OH 基をももたずに代りに 4 位が -C=O となっていて TAL や DHA の 4 位の keto-enol 互変異性が一応 keto 型に固定されていると見なしてよい構造をもっている. 2,4-Dimethyl- γ -pyrone は TAL の 4 位 -OH 基をもたず, その代りに -CH₃ が置換されている化合物である.

Fig. 8. Quenching Effect of Triacetic Acid Lactone (Na Salt) of Fluorescence of FMN

TAL-Na=triacetic acid lactone (Na salt), DHA-Na=sodium dehydroacetate, concentration of FMN=10 μ /ml 1N 0.25M phosphate buffer, pH 8.3, at 20° ●●●●●: intensity of fluorescence, ○—○—○; $I_0/I-1$ plot

まず triacetic acid lactone Na 塩 (TAL-Na) の共存下における flavin の蛍光の消光の有無を DHA-Na との比較において検討した. FMN の場合は DHA-Na にはやや劣るが FAD の場合にはむしろ DHA-Na よりも強く flavin の蛍光を顕著に抑制することが認められた (Fig. 8).

TAL 濃度 (横軸) に対する $I_0/I-1$ プロット (縦軸) は DHA-Na の場合と同様, 原点を通り, やや上方に向って彎曲する曲線を示した. したがって先の DHA-Na の場合と同じくこの曲線の原点を通る切線の勾配の逆数から FMN-TAL-Na complex の解離定数 $K_{\text{TAL-FAD}}=4.6 \times 10^{-2} \text{M/liter}$ (pH 8.3, 20°) および FAD-TAL-Na complex の解離定数 $K_{\text{TAL-FAD}}=4.7 \times 10^{-2} \text{M/liter}$ (pH 8.3, 20°) が測定された. これらの値は同一条件下で測定して得られる DHA-Na の $K_{\text{if-FMN}}=3.4 \times 10^{-2} \text{M/liter}$ ならびに $K_{\text{if-FAD}}=3.85 \times 10^{-2} \text{M/liter}$ と比較してあまり変わらないことが認められた. したがって flavin の蛍光消光を惹起する flavin-DHA-Na interaction には少なくとも DHA-Na の pyrone 核 3 位 $-\text{COCH}_3$ 側鎖は本質的には関与していないことが示された. つぎに 2,6-dimethyl- γ -pyrone と 2,4-dimethyl- γ -pyrone の 2 化合物につき検討した結果, 両者とも flavin に対する蛍光消光をほとんどもたないことが認められた. したがって TLA-Na の flavin に対する蛍光消光作用には少なくとも pyrone 環 4 位の enol 性 $-\text{OH}$ 基の存在が必要であることが示された. 対照として検討した phenol は八木ら⁷⁾によって flavin との間に interaction を起こすことがすでに明らかにされているが, 当然のことながら顕著な蛍光消光作用を示した. しかも phenol 濃度に対する $I_0/I-1$ プロットも原点を通る上方に向って彎曲する曲線を示し, この点においても phenol, DHA-Na ならびに TAL-Na のフェノール性, または enol 性 $-\text{OH}$ 基をもつ 3 化合物が flavin の蛍光消光に関連して同じ傾向をもつことが認められた. 以上の成績 (Table VI) から推論すると, flavin の蛍光の消光をもたらす flavin-DHA-Na interaction の少なくとも DHA

TABLE VI. Quenching Effect of Pyrone Derivatives structurally related to Dehydroacetic Acid on Fluorescence of Flavins

Compound	Chemical structure	Quenching effect	Dissociation constant with flavins ($K_{\text{if-FMN}}$ or $K_{\text{if-FR}}^a$) pH 8.3, 20°M/liter)
Dehydroacetic acid		### (sodium salt)	$K_{\text{if-FMN}}=2.5 \times 10^{-2}$ (sodium salt)
Triacetic acid lacton		### (sodium salt)	$K_{\text{if-FMN}}=4.6 \times 10^{-2}$ (sodium salt)
2,6-Dimethyl- γ -pyrone		±	$K_{\text{if-FMN}} > 1$
2,4-Dimethyl- α -pyrone		±	$K_{\text{if-FMN}} > 1$
Phenol (control)		###	$K_{\text{if-FR}}=2.0 \times 10^{-2} \text{ }^b$

a) $K_{\text{if-FMN}}$: dissociation constant with FMN (flavin mononucleotide)

$K_{\text{if-FR}}$: dissociation constant with FR (riboflavin)

b) pH 5.8

分子側における interaction の site は pyrone 環 4 位の enol 性 -OH 基であることが示唆されたものと考えられる。

考 察 と 総 括

DHA-Na の共存によって惹起される flavin 水溶液の物理化学的性状の変化をいろいろ追究してつぎのごとき成績が得られた。すなわち、pH 5.8—8.6 の領域において DHA-Na の共存は (1) Flavin 特有の蛍光を顕著に消光せしめる。 (2) Flavin の吸収スペクトルに変化を生ぜしめ 445 m μ または 450 m μ での最大吸収波長が長波長側へ移動し、同時にその吸収の強さが減少する。 (3) Flavin の光分解を強く抑制する。 (4) 水に難溶性の FR に対して溶解度増加作用 (可溶化作用) を呈する等の 4 つの現象を起すことが明らかとなった。これらの成績はいずれも DHA-Na が水溶液中において flavin との間に interaction を起こすことを証明するものと考えられる。さらにこの interaction の結果、両者間に一種の complex が生成されると見て差し支えないように考えられる。この flavin-DHA-Na complex の解離恒数 K_{if} の値は蛍光法、吸収スペクトル法、ならびに可溶化法の 3 方法によってそれぞれ測定された。それらの測定値を比較するに、測定値がかなり大きく出る傾向をもつと考えられる⁷⁾ 吸収スペクトル法では他の 2 方法に比較するとやはり 1 桁近く大きい値を示した。しかしながら蛍光法と可溶化法によると flavin-DHA-Na complex は大体 2×10^{-2} — 6×10^{-2} M/liter の解離恒数をもって結合していることが推定できた。この値は予報⁹⁾ にて報告した DHA-Na による精製 D-アミノ酸酸化酵素に対する阻害作用の酵素反応速度論的解析によって測定される $K_{if, FAD} = 2.7 \times 10^{-2}$ M/liter とよく一致するところから、蛍光法、および可溶化法によって測定された K_{if} の値はその信頼性は高いものと考えられる。

本研究において DHA の pyrone 環の 4 位 enol 性 -OH 基が flavin-DHA-Na interaction における DHA-Na 分子側の結合の site であることが示唆された。この enol 性 -OH 基は tricarbonyl methane 原子団構造の一部分でこの点、はなはだ興味が深い。一方、この interaction の flavin 分子側の site はどこであるかということは大いに興味がもたれるが lumiflavin を用いて定性的に検討した結果は lumiflavin の蛍光がやはり DHA-Na の共存によって消光する現象が認められた。Lumiflavin は riboflavin の ribityl 基側鎖を欠きその代りに -CH₃ 基をもった methyl-isoalloxazine である。この化学構造を加味して推論を進めると flavin-DHA-Na interaction は、あるいは DHA 分子の 4 位 enol 性 -OH 基と flavin 分子の isoalloxazine 核 1 位、または 10 位の N 原子との間に形成される水素結合に主に基づくもので、その結果起こる二重結合の共軛系の変化によって flavin の蛍光の消光や吸収スペクトルの変化が惹起されるのではないかという可能性も考えられる。しかしこの考えは現段階ではあくまで推論の域を出ない。

以上、浮田ら²⁾ のいわゆる tricarbonyl methane 原子団化合物の 1 つであり、いわばその構造上の最小のヒナ型とも見なしうる DHA-Na が flavin との間に interaction を起こし、その結果両者の間に一種の complex を形成することが明らかにされた。flavin は生体代謝反応において本質的に重要な役割を演ずる flavin 酵素の補酵素である。ビタミン B₂ 群として、また微生物の成長因子として生体および微生物代謝に重要な役割をもっている。このことを考慮するとき、この現象が DHA のみならず広く tricarbonyl methane 原子団系抗菌性物質一般の作用機作の上に大きな意義をもつことが想像される。事実、DHA-Na はもとより典型的 tricarbonyl methane 原子団化合物の 1 つである 3-butyryl-4-hydroxy-coumarin が、flavin 酵素の 1 つである D-アミノ酸酸化酵素を補酵素 FAD との関連において阻害することが著者によって見出されており、⁹⁾ 詳細は次報において報告される。

謝辞 本研究を実施するにあたり御指導鞭撻を賜った九大医学部 武谷健二教授、同薬学部 井口定男教授、名大 八木国夫教授に深謝する。またきわめて有益なる示唆と批判を頂いた東大 水野伝一教授、可溶化実験に御協力頂いた九大薬学部 後藤茂助教授、ならびに FAD を多量御分与下さったワカモト製薬 大地国威技術部長の好意に深謝する。