

フラビンモノヌクレオチドの光退色におよぼす プリン塩基の添加効果

(1988年2月24日受理)

円満字公衛

フラビンモノヌクレオチド (FMN) の水溶液の光退色速度はカフェインやプリン塩基の添加で抑制されるが、ピリミジン塩基や β -シクロデキストリン添加では逆に促進される。

安定化は FMN と複合体を形成することによると思われる。FMN の蛍光強度はカフェインやプリン塩基の添加により減少するが、ピリミジン塩基や β -シクロデキストリン添加では変わらない。FMN-カフェイン複合体の吸収ピークは FMN のピラジン環に由来する。FMN のキノン部分はカフェインによっておおわれていると考えられるが、 β -シクロデキストリンやピリミジン塩基ではおおわれていないと思われる。

1 緒 言

フラビンは光合成電子伝達系の一成分であり、その役割はフェレドキシンからニコチンアデニン二リン酸への電子伝達をつかさどることにある。フラビンモノヌクレオチド (以下, FMN と略記する) は励起クロロフィルからの電子受容体としてクロロフィル電極にしばしば添加されることがある¹⁾。しかし, FMN は光照射に対して不安定である。それゆえ生体内で FMN を安定化する配列を知り, FMN を光安定化することは光電気化学にとって有用である。他方, FMN は水溶性ビタミンの一種でその作用から成長促進性ビタミンとして知られている²⁾。ビタミン投与の観点からビタミン製剤を光安定化することは重要である。

著者は以前 Q スイッチ色素-ビス[1-(4-ジメチルアミノフェニル)-2-フェニルエタンジチオン]ニッケル(0)をシクロデキストリンに包接することによって光安定化³⁾、また、クロロフィル a をデオキシリボ核酸の塩基対間に挿入することによって光安定化した⁴⁾。さらに著者らは水溶液中でシクロデキストリンやカフェインの存在下でメチレンブルーを光安定化することを確認した⁵⁾。これらの安定化は色素の活性部位を複合体形成によっておおうことによって成就されたと思われる。

著者はメチレンブルーの光退色を阻害したプリン塩基やシクロデキストリン、またデオキシリボ核酸の成分であるピリミジン塩基の添加によって, FMN の光安定化を試みた。さらに著者らはプリン塩基の一種であるアデニンを分子内に含むフラビンアデニン二リン酸 (以下, FAD と略記する) の光安定性を研究した。

2 実 験

2.1 物 質

FMN, FAD, カフェインは半井化学の特級品を使用した。FMN, FAD, カフェインの構造を図 1, 2 に示す。ウリジン-5'-リン酸 (以下, 5'-UMP と略記する), グアノシン-5'-リン酸 (以下, 5'-GMP と略記する), イノシン-5'-リン酸 (以下, 5'-IMP と略記する), アデノシン-5'-リン酸 (以下, 5'-AMP と略記する) は Sigma 社の標品を精製せずに用いた。各種核酸の塩基部分の構造を図 3 に示す。 α, β, γ -シクロデキストリン (以下, α, β, γ -CD と略記する) は東京化成の特級品を使用した。

pH はリン酸緩衝液 (0.05 モル/l) で 6.0 に合せた。

水は再蒸留水を使用した。

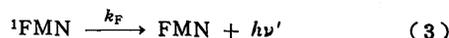
2.2 測 定

可視吸収スペクトルは島津 MPS-5000 自記分光光度計で、蛍光スペクトルは日本分光 FP-550 型蛍光分光計で測定した。

2.3 実験操作

光量の測定は文献にしたがって行なった⁶⁾。

光退色実験は所定濃度の FMN 水溶液に 500 W の超高圧水銀灯光を東芝 KL-40 フィルターを通した 400 nm の単色光を照射し、453 nm の吸光度の変化を調べ、下式から反応の量子収率を計算した。なお本反応は励起一重項経路であることがわかっている⁷⁾。



三菱電機株式会社材料研究所, 661 尼崎市塚口本町

1) F. Takahashi, K. Seki, R. Kaneko, K. Sato, Y. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 387(1981).

2) 桜井芳人編, “食品事典”, 同文書院 (1977) p.742.

3) 円満字公衛, 山口裕之, 日化, 1985, 128.

4) 円満字公衛, 日化, 1985, 1776.

5) 円満字公衛, 安藤虎彦, 日化, 1987, 1078.

6) 日本化学会編, 国分 洪, “実験化学講座, 光 [I]” 丸善 (1976) p.241.

7) P. S. Song, D. E. Metler, *Photochem. Photobiol.*, **6**, 691(1967).

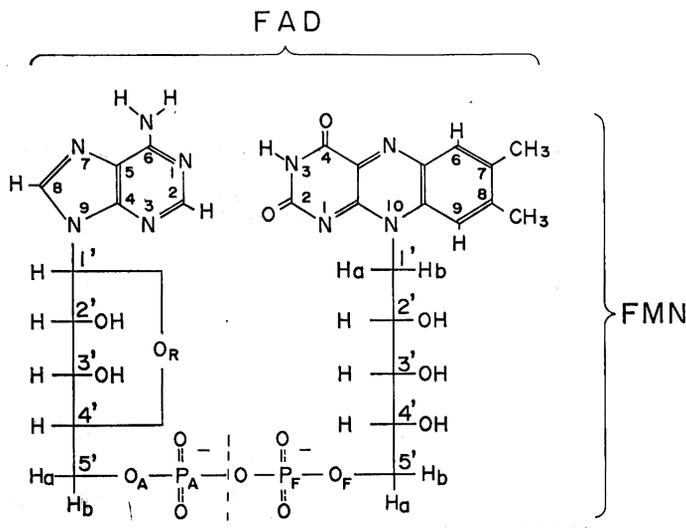


Fig. 1 Chemical structure of FMN and FAD

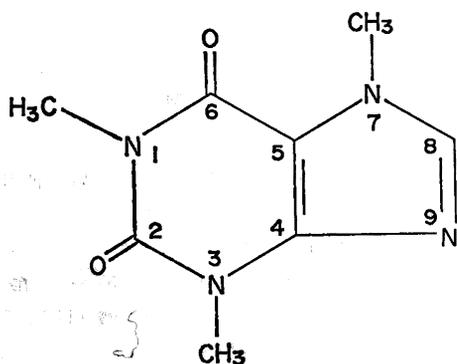
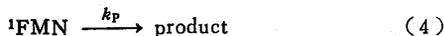


Fig. 2 Chemical structure of caffeine



ここで k_0 の中には項間交差も含めて考えている。

$$\frac{d[\text{FMN}]}{dt} = -I[1 - \exp(-\epsilon[\text{FMN}]l)] + k_0[{}^1\text{FMN}] + k_F[{}^1\text{FMN}] \quad (5)$$

$$\frac{d[{}^1\text{FMN}]}{dt} = I[1 - \exp(-\epsilon[\text{FMN}]l)] - k_0[{}^1\text{FMN}] - k_F[{}^1\text{FMN}] - k_p[{}^1\text{FMN}] \quad (6)$$

定常状態の仮定 ($d[{}^1\text{FMN}]/dt=0$) から

$$\frac{d[\text{FMN}]}{dt} = -\frac{k_p}{k_0 + k_F + k_p} I[1 - \exp(-\epsilon[\text{FMN}]l)] = -\Phi I[1 - \exp(-\epsilon[\text{FMN}]l)] \quad (7)$$

ここで量子収率 Φ は $k_p/(k_0 + k_F + k_p)$ である。

光退色阻害実験は FMN 溶液に所定濃度の阻害物質などを添加して行なった。退色比 R を $R = (\text{OD}_{\text{rin}} - \text{OD}_{\text{ini}}) / (\text{OD}_{\text{rin}}^0 - \text{OD}_{\text{ini}}^0)$ と定義する。ここで OD_{ini}^0 , OD_{rin}^0 は阻害物質非存在下での 10 分間の照射前後の OD, OD_{ini} , OD_{rin} は阻害物質存在下での 10 分間の照射前後の OD である。

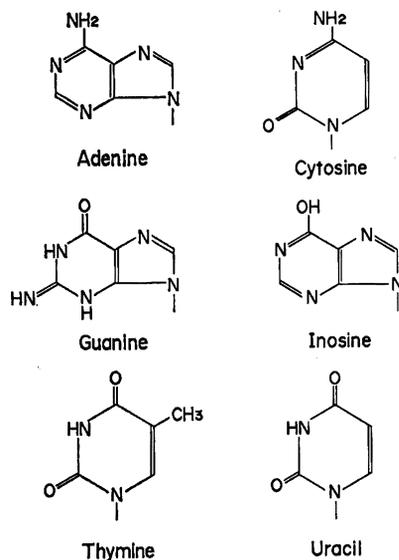


Fig. 3 Chemical structure of nucleic bases

蛍光消光実験は FMN 水溶液に適量の阻害特質を添加して行なった。

2.4 計算

分子軌道計算は三菱電機製 COSMO 900 を使用して, PPP プログラムによって行なった。

3 結果と考察

FMN 水溶液 (4.1×10^{-5} mol/l, pH 6.0) に好気条件下で 400 nm の単色光を照射すると図 4 に示すように FMN の 453 nm の吸収が減少した。このときの量子収率は 1.73×10^{-4} であった。

文献 8) によると好気条件下では FMN の光退色生成物は酸性 pH でルミクロムであるとされている。その生成の機構として図

8) 日本生化学会編, 八木国夫, 満田久郎, “生化学実験講座 3, ビタミンと補酵素”, 東京化学同人 (1975) p.127.

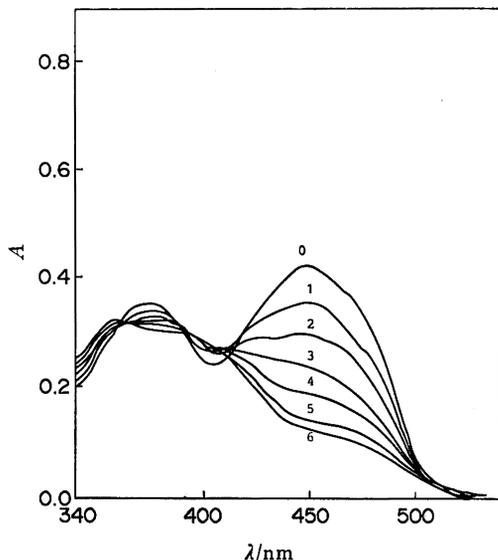


Fig. 4 Time dependence of photodegradation of FMN

[FMN]= 4.67×10^{-5} mol·dm⁻³, After 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 min., pH=6.0

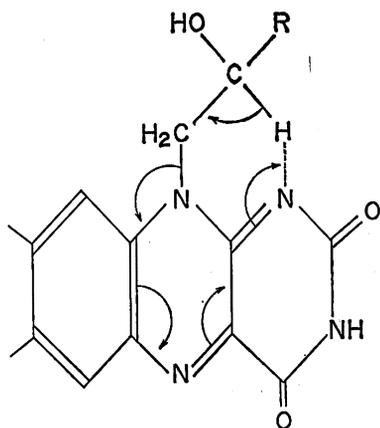


Fig. 5 Formation of lumichrome from the singlet excited state of FMN

5に示すようにイソアロキサジン環のN(1)とリボースのC(2')Hとの水素移動反応が端緒となるという。

色素の光退色を防止する方法として、シクロデキストリンやプリン塩基との複合体を形成する方法が考えられている。FMNに対してもこれらの方法が有効か否かを確かめるためFMN水溶液の系にプリン塩基をもつ5'-AMPを0.1~0.2 mol·dm⁻³添加すると添加した5'-AMP濃度にしたがって図6の白丸で示すように退色比が減少した。

FMNの光退色におよぼす5'-AMPの作用がメチレンブルーに対するカフェインの作用と同じか否かを調べるための1ステップとしてFMNと5'-AMPの平衡定数を求めた。図7にFMNと5'-AMPの混合水溶液とFMNのみの水溶液の差スペクトルを示す。添加した5'-AMP濃度C_Aと493nmの差スペクトルの高さOD。とから次式によってBenesi-Hildebrandプロット

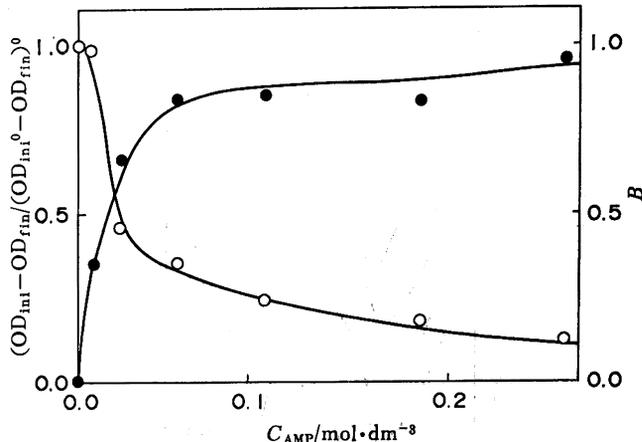


Fig. 6 Effect of addition of 5'-AMP on FMN photodegradation

[FMN]=0.1 mmol·dm⁻³, pH=6.0, I=2, 63 Ms⁻¹

B is the ratio of the complex concentration to total AMP concentration

を行なった⁹⁾。

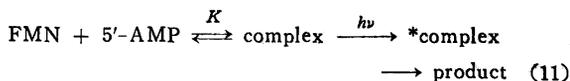
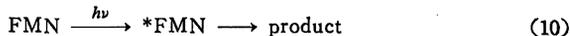
$$\frac{C_t}{OD_c} = \frac{1}{C_A \epsilon_b K} + \frac{1}{\epsilon_b} \quad (8)$$

ここでC_tはFMNの全濃度、ε_bは複合体のモル吸収光係数、Kは平衡定数である。このプロットの結果を図8に示す。図8において直線が得られることから、FMNと5'-AMPは1対1の複合体を形成していることが確認され、Kは76.8 l/molであることがわかった。

得られた平衡定数とFMN濃度(4.67×10⁻⁵M)および添加された5'-AMP濃度から(9)式を用いて複合体の形成した割合C_b/C_t(B=(C_b/C_t)×100%, C_b=形成された複合体の濃度)を求めて図6にプロットした。図からわかるように、FMNの退色比は複合体の形成した割合にしたがって減少している。

$$K = \frac{C_b}{(C_t - C_b)(C_A - C_b)} \quad (9)$$

ゆえにFMNは複合体を形成することによって光退色速度を減少するものと思われる。ただし、このとき複合体が95%以上存在していると思われる5'-AMP濃度0.267 mol/lのときも退色比は0.12であり、ゼロになっていないので形成された複合体も光によって分解しているものと考えられる。すなわち、(10)、(11)式が成り立つ。



FMNの三重項エネルギーは2.07 eV¹⁰⁾、5'-AMPのそれは2.65 eV¹¹⁾でフラビンの方がエネルギー準位が低く三重項一三重

9) H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703(1949).

10) P. F. Heelis, *Chem. Soc. Rev.*, **11**, 15(1982).

11) H. Fujita, H. Imamura, C. Nagata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 2017(1968).

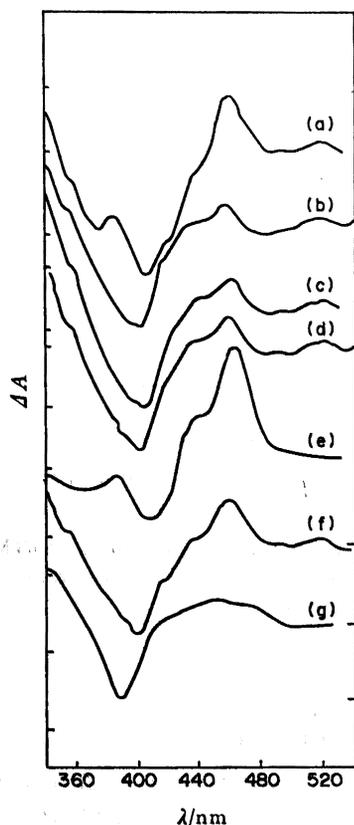


Fig. 7 Difference UV spectra between FMN aqueous solution in the presence of and in the absence of nucleic acids

- (a) : $[FMN]=4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[5'\text{-AMP}]=0.0115 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 (b) : $[FMN]=4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[5'\text{-UMP}]=0.0239 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 (c) : $[FMN]=4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[5'\text{-CMP}]=0.0138 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 (d) : $[FMN]=4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[5'\text{-IMP}]=0.0163 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 (e) : $[FMN]=0.1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[\text{Caffein}]=0.0495 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 (f) : $[FMN]=4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[5'\text{-GMP}]=8.91 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 (g) : $[FMN]=0.1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[\beta\text{-CD}]=0.0125 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
 pH=6.0

項エネルギー移動は起こりえない。

また、クロロフィル a をデオキシリボ核酸の塩基対間に挿入した場合も色素の退色速度が低下するという同様の現象が認められている⁴⁾。クロロフィル a をデオキシリボ核酸に包接したときはプリン塩基とともにピリミジン塩基が光安定化に寄与していると思われる。そこで FMN に対するピリミジン塩基の添加効果について検討した。FMN 水溶液にピリミジン塩基の一種をもつ 5'-UMP を添加して退色速度を測定した。その結果、図 9 に示すように 5'-UMP の濃度とともに光退色比は増大した。

図 7 と 10 に FMN と各種核酸モノマーの混合液と FMN のみの水溶液との差スペクトルを示す。図から一般にプリン塩基

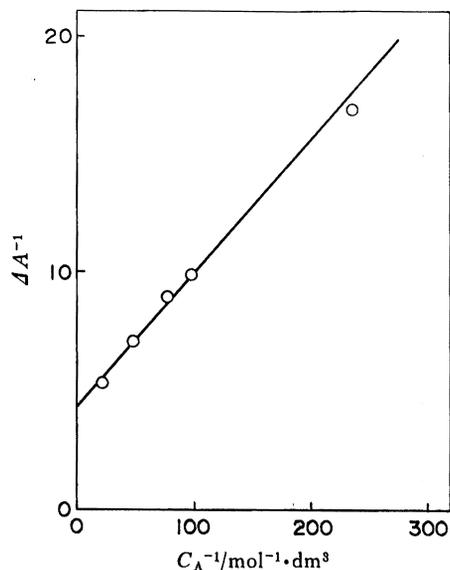


Fig. 8 Hildebrand plot for the complex between FMN and 5'-AMP

$[FMN]=4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH=6.0

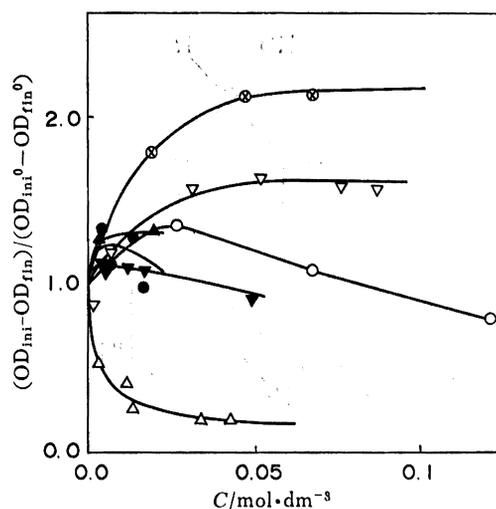


Fig. 9 Effect of addition of various nucleic acids on FMN photodegradation

$[FMN]=0.1 \text{ mmol/dm}^3$, pH=6.0, $I=2.63 \text{ Ms}^{-1}$
 —○—: IMP, —△—: GMP, —●—: DNA,
 —□—: UMP, —▽—: CMP, —▲—: poly U,
 —▼—: RNA

(5'-IMP を除く) では 453 nm のスペクトルが 493 nm に移動しているのに対して、ピリミジン塩基 (5'-IMP を含む) では 453 nm のスペクトル変化は少なく、むしろ 378 nm のスペクトルが青シフトしていることがわかった。これに対して図 7 と表 1 に FMN の光退色比におよぼす各種核酸の添加効果を示す。図から 5'-GMP の方が 5'-AMP よりも添加効果が大いだが、これは FMN と 5'-GMP の平衡定数が FMN と 5'-AMP のそれよりも大きいからと考えられる。しかし、表 1 から 100% 複合体を形成すると 5'-GMP も 5'-AMP も同じ効果であることから複合体

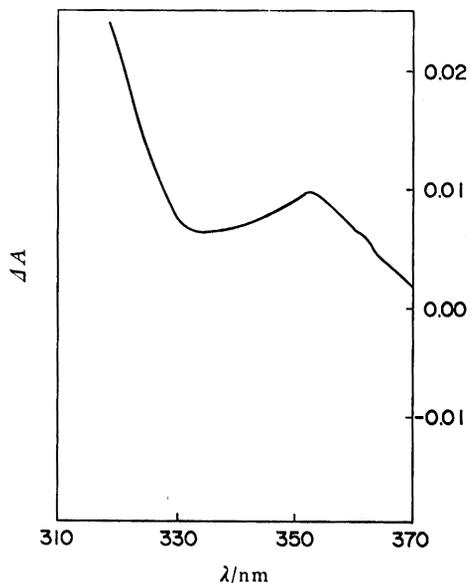


Fig. 10 Difference UV spectrum between FMN aqueous solution in the presence of and in the absence of 5'-IMP

[FMN]= 4.67×10^{-5} mol·dm⁻³, [5'-IMP]=0.0163 mol·dm⁻³, pH=6.0

Table 1 Effect of addition of various nucleic acid on photodegradation of FMN

Additant	$\frac{(OD_{int}-OD_{fin})}{(OD_{int}^0-OD_{fin}^0)}$	I/I_0^a
none	1.00	—
GMP	0.21	0.0303
AMP	0.22	0.0311
IMP	0.81	0.0535
UMP	2.16	0.294
CMP	1.60	0.130
poly U	1.33	0.418
caffeine	0.30	0.0131
FAD	0.25	0.487

a) Adding 1 mol·dm⁻³.

の構造は同一であろうと想像される。

図と表からプリン塩基は退色を防止するがピリミジン塩基は退色を促進することがわかった。この理由は後で述べる。

同様に FMN の光退色に対する α, β, γ -CD の添加効果を研究した。FMN に α, β, γ -CD を添加すると図 11 に示すように α, β, γ -CD 濃度にしたがって光退色比は少し増大する。 α, β, γ -CD の添加効果の原因を調べるために差スペクトルを測定した。図 7 に FMN と β -CD の混合溶液と FMN のみの溶液との差スペクトルを示す。図から 378 nm のピークが β -CD との相互作用によってシフトしていることがわかった。これは 5'-AMP との差スペクトルでは 453 nm の吸収が変化しているのと異なる点である。

378 nm のピークは HOMO と第二励起軌道のエネルギー差に対応しているのでこのシフトの原因を調べるため、Pariser-Parr-Pople 法による π 電子近似半経験的分子軌道計算を行なっ

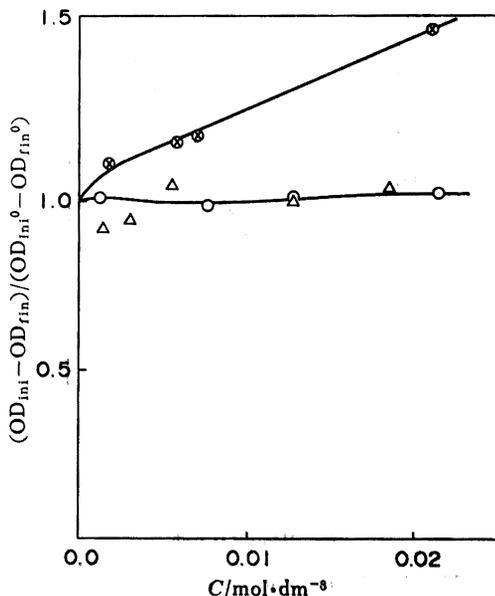


Fig. 11 Effect of addition of cyclodextrin on FMN photodegradation

[FMN]=0.1 mmol/dm³, pH=6.0, $I = 2.63 \text{ Ms}^{-1}$
 —○—: α -CD, —△—: β -CD, —□—: γ -CD

た。HOMO の波動関数 $\psi_0 = C_1\chi_1 + \dots + C_{16}\chi_{16}$ と第二励起軌道関数 $\psi_2 = C_1'\chi_{16}' + \dots + C_{16}'\chi_{16}'$ との重なり積分 ($S = \sum C_i C_i'$) をとると FMN のキレン環の S は 0.51, ピラジン環の S は 0.25, キノン環の S は 0.14 となり、第二励起軌道と HOMO の重なり積分はキレン環が大きく、378 nm のピークはおもにキレン環に由来していることがわかった。また同様に HOMO と LUMO の重なり積分を調べると 453 nm のピークはピラジン環に由来していることがわかる。

FMN と β -CD の混合溶液と FMN のみの溶液との差スペクトルでは 453 nm の吸収ピークは変化しないことから β -CD によって FMN はキレン環のみを包接されていると考えられる。FMN がメチレンブルーのように β -CD への包接によって安定化しないのはキノン環が包接されていないからだと思われる。そして FMN の退色速度が増すのはイソアロキサジン環の N(1) とリボスプロトンの相互作用がリボス部分の運動が制限されるので増大されることによると思われる。FMN の β -CD への包接の強さをみるため図 12 に β -CD と FMN の Hildebrand プロットを示す。図から FMN と β -CD の平衡定数は 12.6 l/mol と計算された。

プリン塩基ではたとえば 5'-AMP は図 13 に示すような構造でイソアロキサジン環のキノン環をブロックして FMN と相互作用していると考えられる¹¹⁾。しかしピリミジン塩基は図 14 に示すような構造でイソアロキサジン環のキレン環と相互作用していると考えられる¹²⁾。すなわちイソアロキサジン環の N(1) をおおってリボスプロトンとの相互作用を妨げているか否かにより、退色速度への効果に差がみられるものと考えられる。ピリミジン塩基で退色速度が増えるのはピリミジンの N の幾何学的条件

12) P. S. Song, "Flavins and Flavoproteins" Ed. by E. S. Slater, Elsevier, Amsterdam (1965) p. 37.

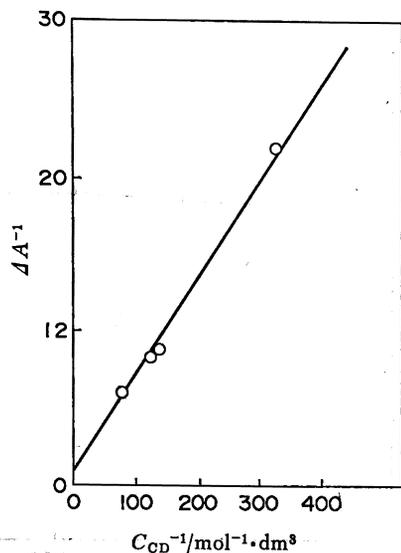


Fig. 12 Hildebrand plot for the complex between FMN and β -cyclodextrin
 $[FMN] = 4.67 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH=6.0

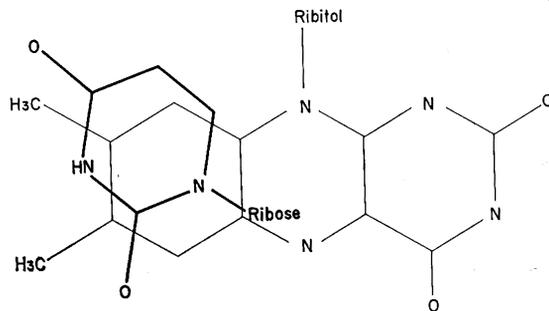


Fig. 14 The spatial relationship of pyrimidine and lumiflavin molecules in the compound IX

への包接によって光安定化したのは、ピリミジン塩基がプリン塩基と水素結合によって分子集合体を形成して一重項酸素の活性点をブロックするからと考えられる。

FMN の蛍光強度は 5'-AMP 添加により減少する。これは FMN と 5'-AMP の複合体が低い量子収率の蛍光強度をもつからである。1 mole/l の核酸添加時の蛍光強度と無添加時の蛍光強度の比を表 1 に示す。表に示すように退色速度を減少させる物質は蛍光強度をいちじるしく減少させ、退色速度を減少させない物質は蛍光強度に大きな変化を与えないことがわかった。これは 468 nm 励起による蛍光であることから、453 nm のピークすなわちピラジン環の吸収に影響を与える物質のみ蛍光スペクトルに変化を与えたからと考えられる。

FAD は水中ではイソアロキサジン環とプリン塩基であるアデニン環が相互作用して存在する¹⁴⁾¹⁵⁾。このことから FAD のフラビン部分も同様に安定であろうと推定される。フラビン部分とアデニンがスタックした FAD の蛍光寿命は FMN の約半分になることが知られている¹⁶⁾。表 1 に示すように光退色比は 0.25 である。ゆえに FAD はイソアロキサジン環がアデニン環と相互作用して光安定化していると考えられる。

4 結 論

- (1) 5'-AMP 添加によってイソアロキサジン環の N(1) がブロックされることにより FMN の光退色比は減少する。
- (2) 5'-UMP 添加によってピリミジン環が FMN に付加することにより FMN の退色比は増大する。
- (3) β -CD 添加によってイソアロキサジン環の N(1) とリボースのプロトンの相互作用が強められ、FMN の光退色速度は少し増大する。
- (4) FAD はアデニン部分との分子内錯体形成により FMN よりも光退色比が小さい。

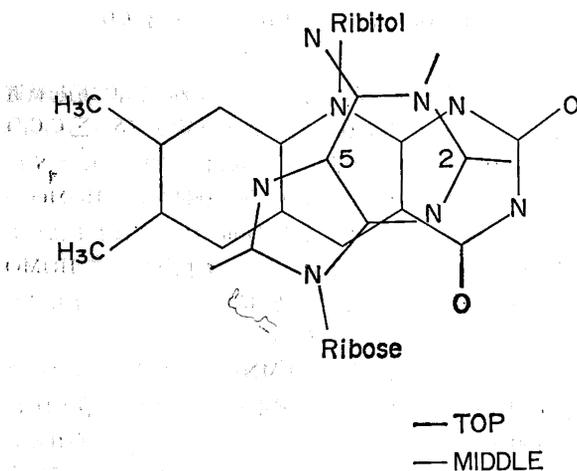


Fig. 13 A projection of the crystal structure of the intermolecular complex of FMN

5'-AMP taken perpendicular to the plane of the aromatic ring

が適合してピリミジンとイソアロキサジン環との付加体を形成するからと考えられる¹³⁾。

メチレンブルーの光退色速度が β -CD 添加によって減少したのはメチレンブルーの一重項酸素の活性点が β -CD によって包接され、一重項酸素に対してブロックされたからと考えられる。また、クロロフィル a がピリミジン塩基を含むデオキシリボ核酸

13) "Photochemistry of Heterocyclic Compounds" Ed. O. Buchardt, Wiley Inter Science New York (1976).

14) M. Kainosho, Y. Kyogoku, *Biochemistry*, 11, 741 (1972).

15) 円満字公衛, 日化, 1986, 79.

16) H. J. W. G. Visser, *Photochem. Photobiol.*, 40, 703 (1984).

Inhibition of Photofading Reaction of Flavin Mononucleotide with Purine Bases

Koe ENMANJI

*Materials and Electronic Device Laboratory, Mitsubishi Electric Corp.;
Tsukaguchi-Honmachi, Amagasaki-shi 661 Japan*

An aqueous solution of flavin mononucleotide (FMN) was photostabilized by addition of caffeine and purine bases. However it was destabilized by the addition of pyrimidine bases or β -cyclodextrin, which are generally known to stabilize dyes. Caffeine and purine bases suppress the decoloration of FMN by the formation of a complex with FMN. The fluorescence intensity of FMN decreased by addition of caffeine and purine bases but did not change by addition of pyrimidine bases or β -cyclodextrin. The difference UV spectra of FMN-caffeine complex had a peak at 493 nm and this absorption peak was due to the pyrazine ring of FMN. The quinone moiety of FMN molecule is considered to be covered by caffeine but not to be covered by pyrimidine bases or β -cyclodextrin.

