

鶏卵卵白より Flavine Adenine Dinucleotide の精製

宮崎 幸恵・奥村ミサヲ

Purification of Flavine Adenine Dinucleotide from Egg White

Sachie Miyazaki and Misao Okumura

序 言

既報¹⁾において、鶏卵卵白には FR* のみならず、結合型フラビンである FAD*²、FMN*³ も存在することを認めた。その後、長瀬ら²⁾によっても同様の方法でその存在が確認されたが、今回はさらに卵白より抽出したビタミン B₂ をペーパークロマトグラフィーにより再度精製を行ない、そのうち FAD につき蛍光法と酸素吸収法により純度検定を行い、酵素学的にかなり純度の高い FAD が得られたのでその結果を報告する。

実 験 材 料

卵白は市販の鶏卵より分離使用した。DL-アラニンは半井化学薬品製のものを、その他の一般試薬は片山化学製のものを使用した。また酸素吸収測定用のアポ酵素はブタの腎臓より抽出し、後述の方法³⁾⁴⁾により調製したものを使用した。

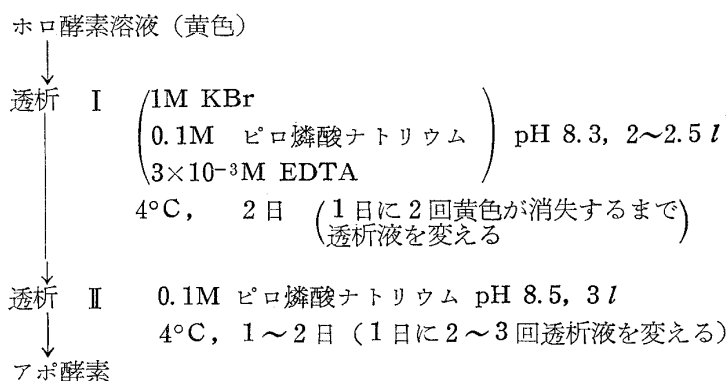
実 験 方 法

1. 鶏卵卵白よりビタミン B₂ の抽出

既法の方法¹⁾に準じて行った。すなわち10ケの鶏卵より得られた卵白約 300 ml を蒸留水で7倍に希釈の後、pH を 4.7 に調整して温水抽出を行い、次いで硫酸塩析、フェノール抽出によって得られた B₂ を完全に回収の後、水に展溶、ペーパー(東洋沓紙 No. 51)上に帯状に塗布、n-ブタノール：酢酸：水 (4:1:5, V/V/V) で一昼夜下降法により展開した。同時に展開した標準溶液より推定して FAD 部分を切りとり、水で数回抽出をくり返し、フェノール抽出、水に展溶の操作を経て FAD を回収し再びペーパーに塗布、5%第2リン酸ソーダ溶液にて7時間展開を行った。これより得られた FAD 部分を前述のごとく水で抽出、フェノール濃縮、

1*; Rivoflavin, 2*; Flavine Adenine Dinucleotide, 3*; Flavine Mononucleotide

表3 ホロ酵素よりアポ酵素の調製



3. FAD の蛍光測定

FAD の蛍光は、Lumiflavin 蛍光法⁵⁾により測定した (表4)。なお純粋な FAD 標準溶液についてもその蛍光を測定して Sample の蛍光強度と比較検討した。

表4 FADの蛍光測定

	FR標準液 (0.11 g/ml)	卵白FAD	盲検
	2 ml	2 ml	2 ml
1N-NaOH	2	2	2
	光分解	30分	
CH ₃ COOH	0.2	0.2	0.2
蛍光強度 (%)	A	B	C

卵白 FAD濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

$$= 0.11 \times \frac{B-C}{A}$$

蛍光測定には、コタキ製八木式微量蛍光光度計を使用した。

4. D-アミノ酸酸化酵素のアポ酵素による FAD の検索

八木らの方法⁶⁾により測定した (表5)。すなわち、0.1M DL-アラニン⁶⁾を基質とし $\frac{1}{60}$ M ピロリン酸緩衝液 pH 8.3 中 [アポ酵素 500 μg , FAD 溶液 10^{-8} M 程度を含む反応液 (液量 3 ml)] で 20°C で反応を行い、FAD 量に応じて酵素の吸収量を観察し、標準 FAD のそれと比較した。酵素の吸収測定には Beckman 社製の溶存酸素計を、recorder は東亜電波製の Toacorder を使用した。

表5 FADの活性測定

DL-アラニン (0.1M)	0.5 ml
FAD (1×10^{-8} M)	10~40 μl
$\frac{1}{60}$ M ピロリン酸緩衝液 (pH 8.3)	2.39~2.36 ml
攪拌	20°C
アポ酵素	100 μl
活性測定 (酸素吸収量)	mole/l/分

実験結果及び考察

1. 卵白より抽出した FAD の蛍光強度

図1に示すごとく、標準 FAD と同様、同じ直線上のほぼ同じ位置に plot されていることから明らかにこの蛍光は FAD であると認められた。同量でありながら標準 FAD よりも蛍光強度が少ないのは未だ完全に精製されていないためと思われる。

2. 卵白より抽出した FAD の酸素吸収量

図2にみられるように蛍光強度の場合と同様標準 FAD と同じ直線上に plot された。また、標準 FAD よりもやや少ない吸収は蛍光強度の場合と同様の傾向を示した。しかし、蛍光量に相当する酸素吸収量を示した。

以上の結果より卵白より抽出、粗精製した FAD は蛍光、酸素吸収ともに標準 FAD と平行し、その傾向が蛍光、酸素吸収とも一致することから明らかに FAD であることが確認された。さらに一段階精製すれば純品に近いものが得られると思う。そしてこの FAD はフ化にいたるまで徐々に増大することが認められていること²⁾からフ化前の初期段階（7日以内）に卵白より大量に FAD を分離精製することが可能と思われる。また、これにより安価な FAD 標品が得られることと思う。

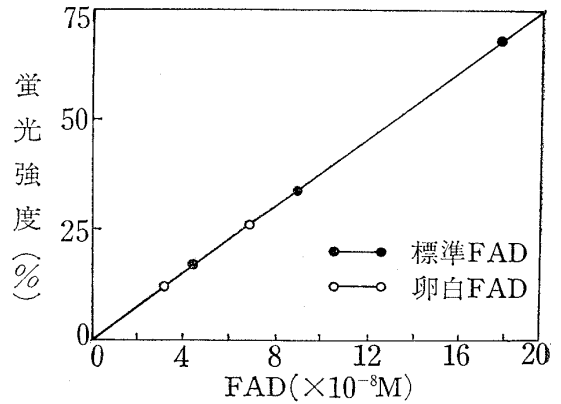


図1 卵白中 FAD の蛍光強度

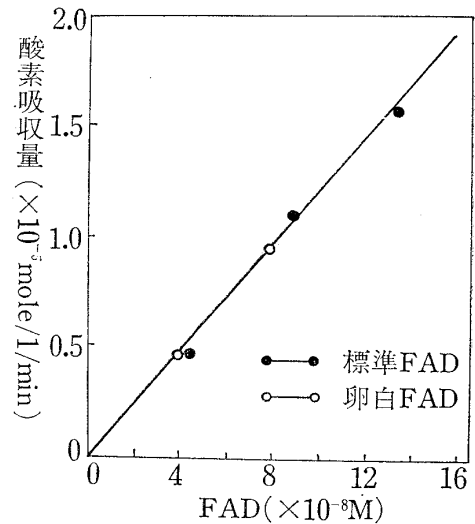


図2 卵白中 FAD の酸素吸収量

要 約

鶏卵卵白より FAD を抽出、精製し純品にほぼ近い標品を得ることができた。

参 考 文 献

1. 小林ミサヲ, 恩田京子 (1968): 東海学園女子短期大学紀要 5号, 53-56.
2. Yagi, K. and Nagase, F. (1975): J. Nutr. Sci. Vitaminol., **26**, 27-30.
3. Yagi, K. (1971): Method in Enzymology, **18** (B), 608-622.
4. Massey, V. and Curti, B. (1966): J. Biol. Chem., **241** (14) 3417-3423.
5. Yagi, K. (1971): Method in Enzymology, **17** (B), 290-296.
6. Yagi, K., Naoi, M., Harada, M., Okamura, K., Hidaka, H., Ozawa, T. and Kotaki, A. (1967): J. Biochemistry, **61** (5), 580-597.