

綜 説
-----

佐久間礼三郎, 石黒伊三雄: Flavin Adenine Dinucleotide の抽出分離と生理作用について

Reizaburo Sakuma and Isao Ishiguro: On the Separation and Physiological Actions of Flavin Adenine Dinucleotide

1. 緒 言
2. FAD の分離法
  - 2-1. FAD の分離法の概略
  - 2-2. Warburg・Christian による方法 (その1)
  - 2-3. Warburg・Christian による方法 (その2)
  - 2-4. Dimant・Sandi・Huennekens による方法
  - 2-5. 八木・石黒による方法
  - 2-6. Whitby による方法
  - 2-7. 桑田・増田による方法
  - 2-8. FAD の化学的合成法
  - 2-9. P<sup>32</sup>-Labeled FAD の簡易調製法
3. FAD の生合成について
  - 3-1. B<sub>2</sub> の生体内における運命
  - 3-2. FR から FMN への合生成
  - 3-3. FMN から FAD への合生成
4. FAD の生理作用

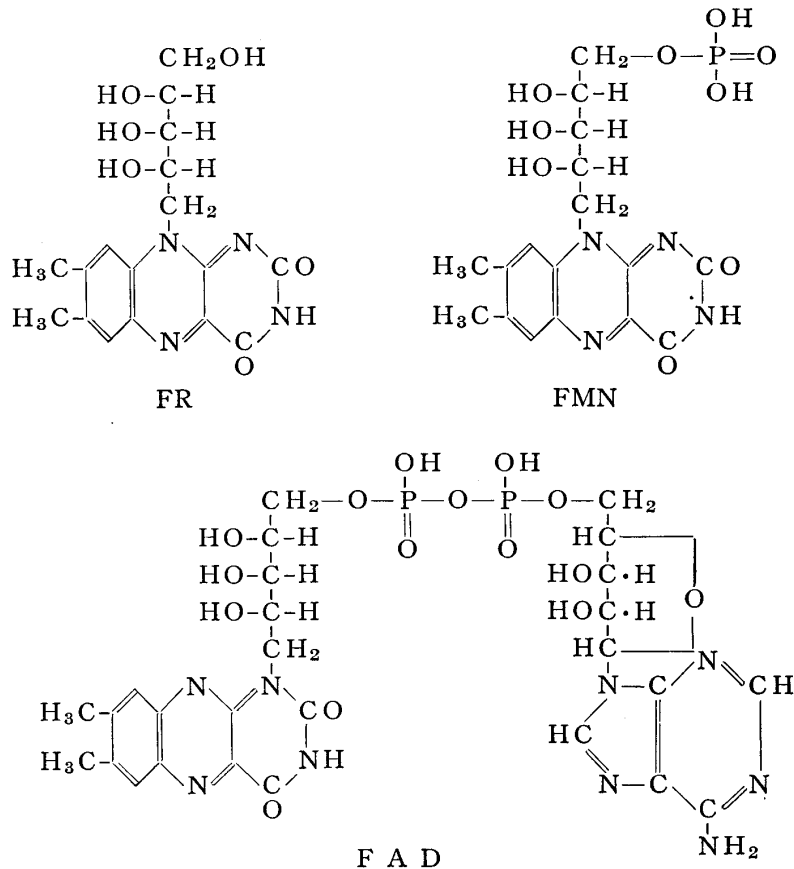
### 1. 緒 言

リボフラビン (ビタミンB<sub>2</sub>) の研究は他の多くのビタミン類と同様に「欠乏症」の研究によって始められたが、これまでの大多数の研究者達は「その欠乏症がいかなる機作で起きるか」という問題を解決するために多くの努力を払ってきた。そして今日では B<sub>2</sub> は成長に必要な“黄色のビタミン”として生体酸化に重要な役割を演ずることが明らかとなった。

B<sub>2</sub> が必須栄養素であることはいうまでもないが、それが生体構成要素としてではなく、作用物質として生体代謝に重要であることは種々の証拠によって明示されている。そしてこの B<sub>2</sub> がどのような形で生理作用にあずかるかということは B<sub>2</sub> の作用機作を知る上に最も重要なことである。ここに述べる Flavin adenine dinucleotide (FAD) は B<sub>2</sub> の活性物質として知られているもので、その化学構造も明らかとなり、現在では医薬品として製剤化されている。そこでわれわれはこの FAD の抽出分離法とその生理的意義について、これまでの知見を総括して見よう。

従来から B<sub>2</sub> の研究においてはその欠乏症状の発生の機転を解明するために種々の栄養試験が行われ、次いで化学的定量法の確立に伴って B<sub>2</sub> の体内における役割とか分布に関する問題が取扱われてきた。それによると高等動物の体内には B<sub>2</sub> は3つの化合物、すなわち狭義の B<sub>2</sub> である Free riboflavin (FR)、その磷酸エステルである Flavin mononucleotide (FMN) および更にアデニール酸の結合した Flavin adenine dinucleotide

(FAD) として分布し, それらの生理的意義はそれぞれ異なることが明らかにされた。



ところで, 高等動物の体内に分布する B<sub>2</sub> の大部分は FAD で, FMN や FR は痕跡程度しか含まれていない。したがって体内における B<sub>2</sub> は FR から FMN, FMN から FAD に合成されて初めて作用するものと考えられ, これに関する報告も多く見られる。このことから B<sub>2</sub> の欠乏症は B<sub>2</sub> そのものの欠乏か, または FAD のような活性物質の欠損あるいは FR から FAD への移行過程の障害等の複雑な原因によって起きるものと考えられる。そこで B<sub>2</sub> の研究においてはこのような活性物質の生体内における作用機作やその物質の供給源についての問題が本質的に重要であり, 「欠乏症発生」の機転の解明においても基本的な事柄である。

次にこのような栄養学的な研究とは別個に酵素学的な研究も以前から行われている。すなわち 1933 年 Warburg, Christian<sup>1)</sup> が酵母から新しい酸化酵素を発見し, この酵素から蛍光を持った黄色色素を分離した。そして Theorell<sup>2)</sup> によってその黄色色素が B<sub>2</sub> の磷酸エステルであることが明らかにされた。これによって B<sub>2</sub> の生理作用の一つの大きな方向が指示され, B<sub>2</sub> と補酵素との関係について数多くの知見が発表された。現在までに知られている酵素について述べれば DPN-チトクローム C 還元酵素, ジャッフォラーゼ, キサンチン酸化酵素などはいずれも FAD を補酵素としており, 一方 FMN の方は TPN-チトクローム C 還元酵素や L-アミノ酸化酵素などごく限られたものではあるがやはり補酵素となっている。これに反して FR はフラビン酵素の補酵素とはならないことが分った。このことは生体内における B<sub>2</sub> の 3 型化合物分布の状態からも類推されるところである。

このように B<sub>2</sub> に関する栄養学的な検索と酵素学的な研究の結びつきによって B<sub>2</sub> の生理的意義が解明され, B<sub>2</sub> と体内代謝との関連性が明らかとなった。

以上のことから生体内で最も多く分布し、黄色酵素の共通の補酵素として重要な働きをしている FAD が B<sub>2</sub> の生理的意義を主に支配しているということができるので、これに関する分離法と生理作用について以下に略述する。

## 2. FAD の分離法

### 2-1. FAD の分離法の概略

FAD 分離の研究は黄色酸化酵素の発見された当時に始まり、その単離は 1938 年 Warburg, Christian<sup>3)</sup> が馬の腎臓あるいは肝臓から有機溶媒を用いてバリウム塩として結晶化したのが最初であって、FAD には FMN とアデニール酸との結合した C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>9</sub>P<sub>2</sub>O<sub>15</sub> (分子量 785) の組成が与えられた。その後多くの研究が実施されたが、その大部分は Warburg<sup>3)</sup> らの方法を基礎とし、微量物質の取扱技術の発達に伴ってその操作過程を改良したものが多く、また抽出材料としては動物臓器、酵母が主に用いられている。

Warburg らが最初に行った分離法は馬の肝臓または腎臓をアセトン処理し、その残渣をアルコールと水で抽出し三塩化酢酸で除蛋白した後 FAD を銀塩とした。そしてこれを硫酸で処理し、遊離した FAD を p-クレゾールで抽出し、水へ転溶させ、バリウム塩として沈澱させたものである。また Warburg<sup>13)</sup> らは、酵母からも操作方法を変えて FAD を収得している。

その後、Hellerman・Lindsay・Bovarnick<sup>4)</sup>、Stadie・Zapp<sup>5)</sup> も同様に FAD の精製を行っている。また Burton<sup>6)</sup> はパン酵母から FAD の粗銀塩を取出した後アルミナを用いて吸着クロマトグラフィーで精製し、Dimant・Sanadi・Huennekens<sup>7)</sup> も同様の操作を行った後更に Celite の塔による分配クロマトグラフィーにて精製している。これらとは別に Crammer<sup>8)</sup> は比較的試料の少ないものに含まれる B<sub>2</sub> についてフェノール抽出を行って、その濃縮液を調製し、これを濾紙クロマトグラフィーで B<sub>2</sub> 3 型を簡易に検出する方法を考案したが、八木・石黒<sup>9)</sup> はこの方法で FAD の精製を試み、生化学的実験に充分利用できるような FAD を Chromatopile<sup>10)11)</sup> を用いて分離精製した。最近 Whitby<sup>10)11)</sup> はパン酵母から Warburg の方法により粗 FAD を分離し、これについてセルローズカラムによる分配クロマトグラフィーを行い、純度 91% の FAD を得た。

以上のように FAD の調製は有機溶媒による精製ではなかなか高純度のものは得難く、少しでも純度を高くするためと操作をできるだけ簡易化するために、吸着クロマト、濾紙クロマト、カラムクロマト、更にはイオン交換樹脂等を用いた分離法が考案されている。しかし抽出材料に含まれる含量が少ないから、これらの分離法においては FAD を得ようとするためにはどうしてもかなり多量の材料を大量扱わねばならず、それに伴って操作が複雑となるため煩わしさがある。ところが近年桑田<sup>12)</sup>らはこれまでの材料とは全く異なった E. Ashbyii の菌体を用い、その抽出方法も簡易化し、合理的な方法によって好収量に目的物の得られることを報告した。この方法によって、これまでのものに比べ高純度の FAD が容易に得られるようになった。すなわち桑田らは E. Ashbyii の深部培養法で得た B<sub>2</sub> の粗製品をペーパークロマトグラフィーで調べた際、これに FAD の夾雑していることを認め、更にこれを詳細に検討したところ菌体内に多量の FAD の含まれることが明らかとなった。そこでこの菌体を抽出材料として FAD の分離を試み、これが好収量で得られることを確めた。その概略は菌体をフェノール抽出して B<sub>2</sub> の濃縮液を作り、ベンジルアルコール処理して FR を除き、FAD を含む水層を減圧濃縮した後、アルコールを加えて FAD を沈澱させる。この粗 FAD を少量の水に溶解し、ハイドロサルフィドを加えると FAD は還元型となって沈澱する。これをアルコールから再結晶し、材料 1 kg から純度 81% の FAD を 2100mg 得ている。この方法は他の方法とは格段の相違あるすばらしいものであって、現在 FAD

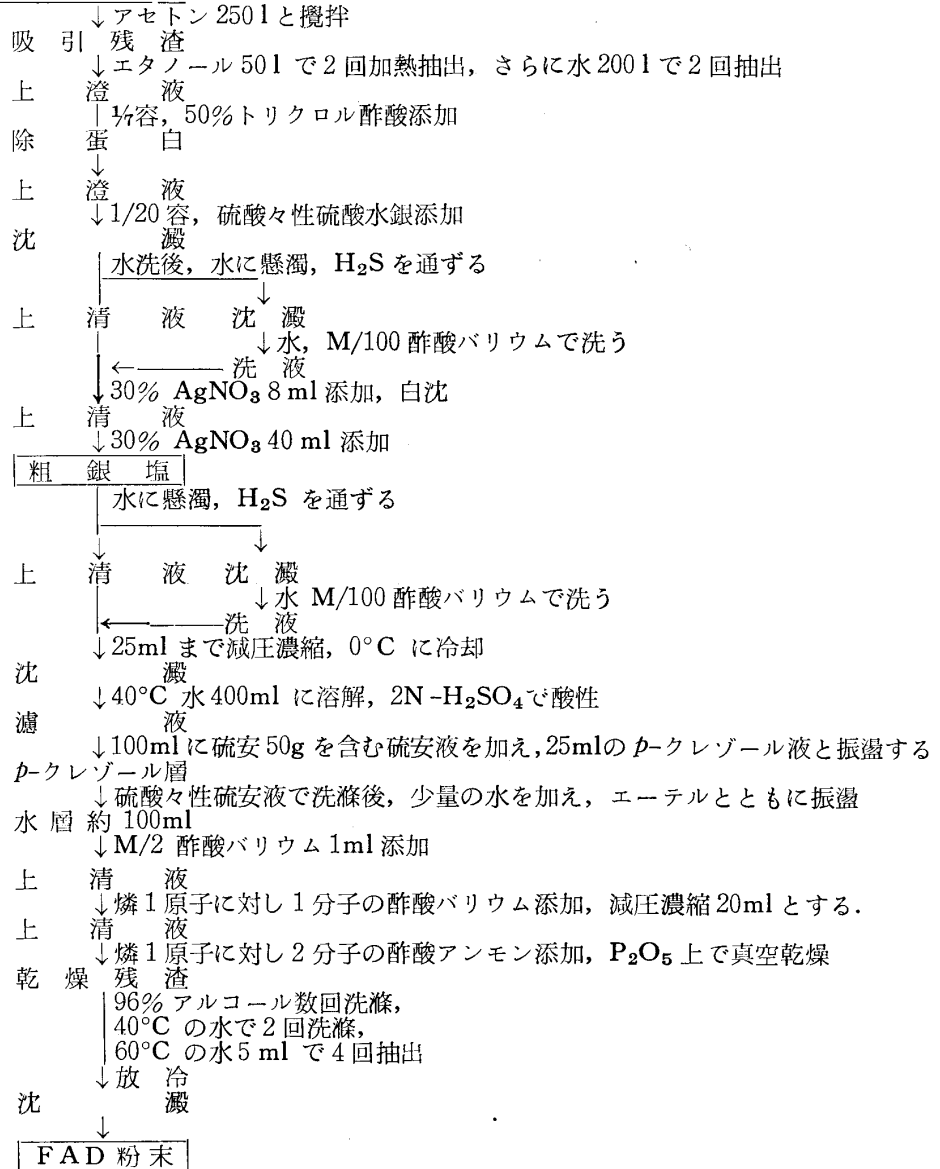
の工業的製産に利用されている。以上に述べた分離法は FAD を収得する方法であるが、このような天然材料を利用する方法とは別に化学的合成法も検討され、これに成功している。しかしこの方法は操作が複雑で、収量も悪いので実際には未だ利用されるまでに至っていない。

以下にこれらの抽出分離法の主なるもの6種を表に示す。

2-2. Warburg・Christian<sup>3)</sup>による方法(その1)

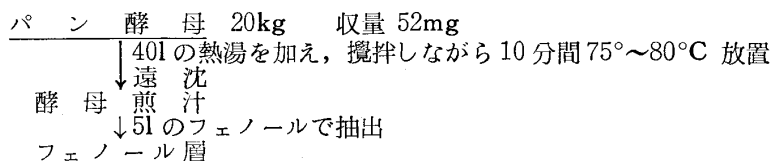
抽出材料: 馬の腎臓又は肝臓

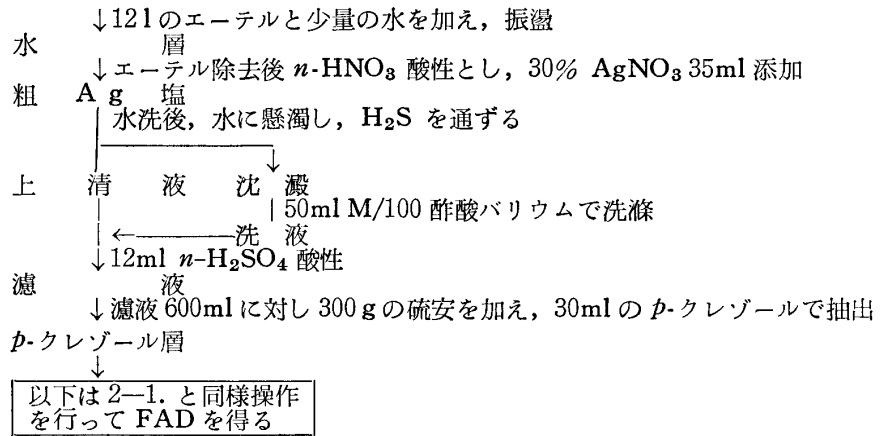
馬の肝臓又は腎臓 50kg 収量 65mg (純度 50~100%)



2-3. Warburg・Christian<sup>13)</sup>による方法(その2)

抽出材料: パン酵母

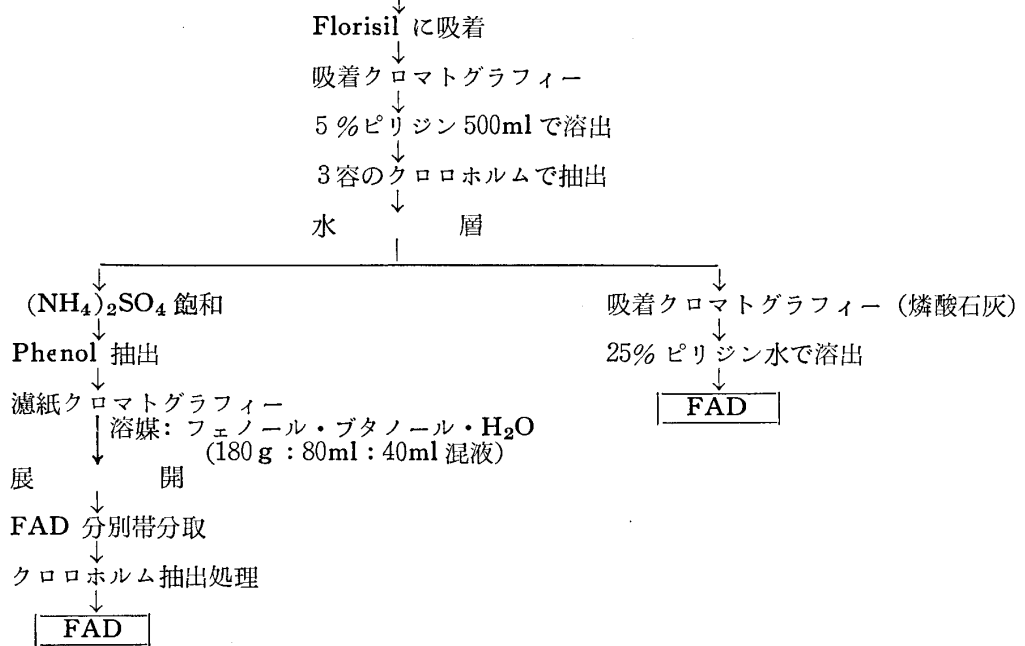




2-4. Dimant・Sandi・Huennekens による方法<sup>7)</sup>

抽出材料：豚肝臓

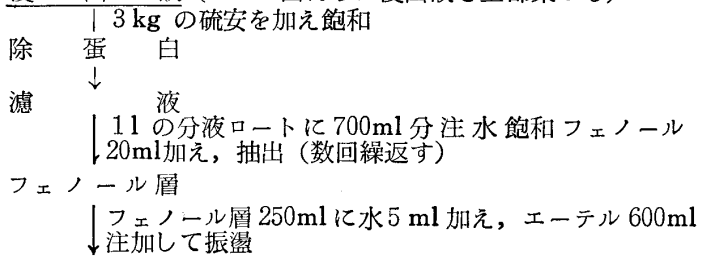
豚肝臓→細切→(組織 150g に脱イオン水 450ml 加える)→Waring Blender にて 磨砕→浸出  
 →+70m 150% 三塩化醋酸→除蛋白→黄色浸出液

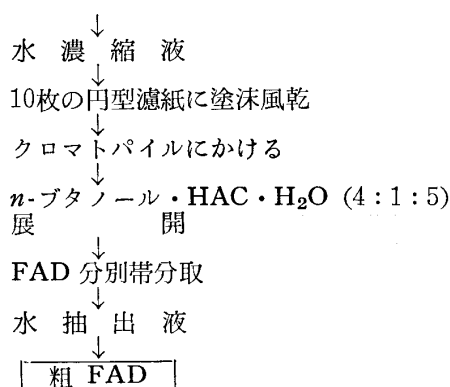


2-5. 八木・石黒による方法<sup>9)</sup>

抽出材料：豚肝臓

豚肝臓 6kg → 細切 → 80°C 温水 2l を加え、10 分間加温 → 乳鉢で磨砕 →  
 → 80°C, 15 分間浸出 → 温時濾過 → 残渣に温水 1l を加え、80°C, 15 分間  
 再浸出 → 温時濾過 → 浸 出 液 (2~3 回行った浸出液を全部集める)



2-6. Whitby による方法<sup>10)</sup>

抽出材料: パン酵母

パ ン 酵 母 281b

↓  
Wanburg・Christian の方法粗 銀 塩

↓ 水 140ml に懸濁, KCl 添加, 硝酸々性

上 清 液

↓ 硫酸飽和, 20ml *p*-クレゾール振盪*p*-クレゾール層

↓ 40ml 水, エーテル添加

水 層

↓  
濾紙クロマトグラフィー (*n*-ブタノール・HAC・H<sub>2</sub>O, 4:1:5)

粗 F A D

↓  
カラムクロマトグラフィー (*n*-ブタノール・*n*-プロパノール・H<sub>2</sub>O, 2:2:1)

FAD 部分分取

↓  
35°C 乾 燥↓  
浸 出↓  
FAD 水 溶 液↓  
減 圧 濃 縮 (2 ml まで)↓  
エタノール, エーテル, 水混液  
洗 滌↓  
P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 乾 燥F A D2-7. 桑田・増田による方法<sup>12)</sup>抽出材料: *E. Ashbyii* 菌体*E. Ashbyii* 菌体

↓ 3 倍容水, 80°C, 10分間加温

濾 液

↓ HAC 酸性 0°C 1 夜放置

濾 液

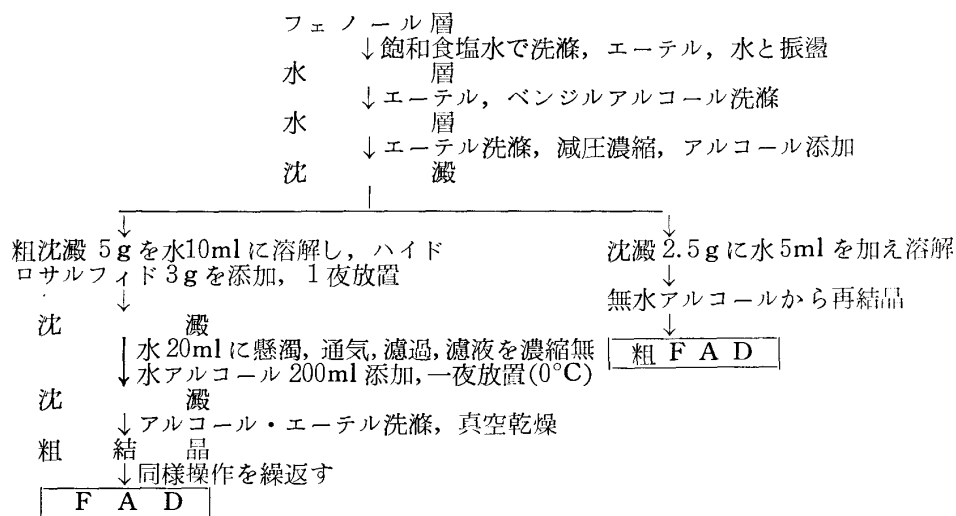
↓ 硫酸添加

除 蛋 白

↓

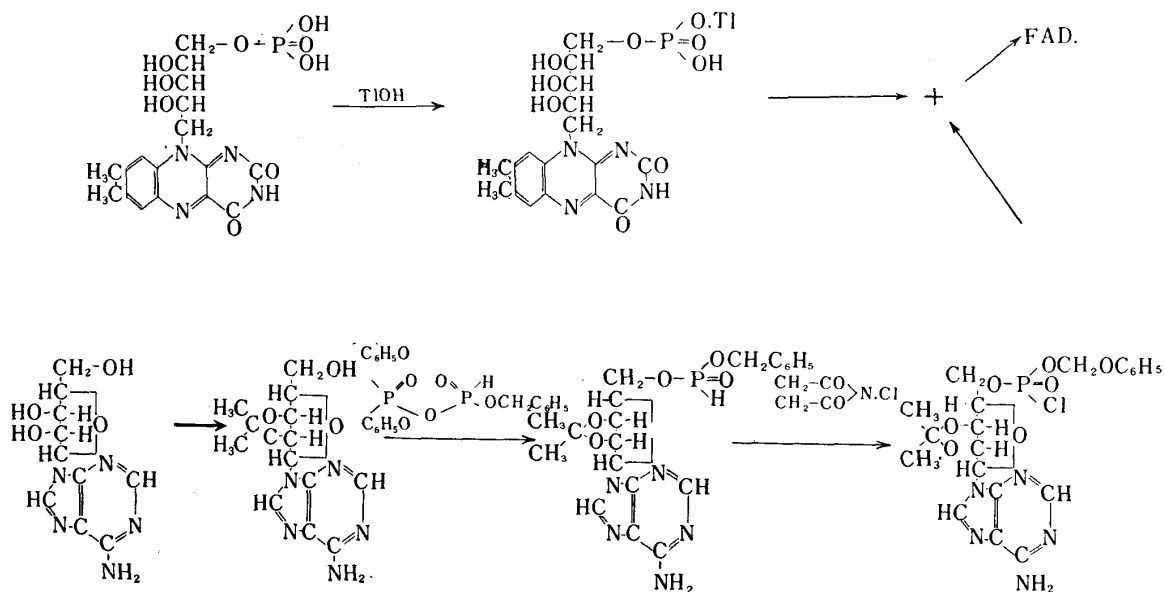
濾 液

↓ 水飽和フェノール添加



## 2-8. FAD の化学的合成法

Christie・Kenner・Todd<sup>14)</sup> は 2'/3-*o*-Isopropylidene-adenosine-5'-benzylphosphate と Riboflavin-5'-phosphate とを縮合させ, 生成した FAD をカラムクロマトグラフィーで精製して得ているが, 収量が非常に悪い実用にはならない. その概略を示すと次のようである.



## 2-9. P<sup>32</sup>-Labeled FAD の簡易調製法

近年物質代謝の研究に同位元素をトレーサーとした実験が多く用いられるようになったが, B<sub>2</sub> の体内代謝の研究においても同位元素でラベルしたものがあれば, 生体内の推移を観察するのに極めて有効な手段と考えられる. この目的に最も手近かな物質は生体内に多く分布する FAD の磷酸基に P<sup>32</sup> を導入した P<sup>32</sup>-Labeled FAD である. そこで著者の一人石黒ら<sup>15)</sup> は本物質の生物学的な簡易調製法について既に検討し, B<sub>2</sub> 代謝の研究に利用している. その調製法の概略は次のようである. 実験材料は正常な家兔の耳静脈から P<sup>32</sup> 磷酸塩溶液

2mc と 2mg/cc の FMN 溶液 1 ml を注射し, 6 時間後に屠殺し, 脱血した肝臓を用いた. このような前処理を施した肝臓を用いて以下 2—4. の項で述べた方法に従って  $P^{32}$ -Labeled FAD を調製する. しかしこの方法で得られた FAD には  $P^{32}$  を含む種々の Nucleotide や注射した  $P^{32}$  が含まれると思われたので, 更に 5% クエン酸ソーダとイソアミルアルコールの等容混液を用いて 2 相溶媒クロマトグラフィーを行い, 生物学的にはほぼ単一な物質を調製した. またこの  $P^{32}$ -Labeled FAD を 30% 三塩化酢酸で加水分解することによって  $P^{32}$ -Labeled FMN も調製することができる.

このような物質は従来方法では観察することのできなかつた反応機構の問題や  $B_2$  代謝における微細変化を動的に検索することができる点で便利である.

### 3. FAD の生合成について

#### 3—1. $B_2$ の生体内における運命

生体内へ与えられた  $B_2$  がどのような経緯で臓器組織に移行し, 生理作用にあずかるかという問題についてはかなり以前から研究が行われていたが, その詳細な観察は Crammer<sup>8)</sup> が生物体中に含まれるフラビン化合物をペーパークロマトグラフィーで分離する方法を考案したことにより実験が容易となり, それらの全貌が明らかとなった. すなわち  $B_2$  は, 経口的に与えられた場合は勿論であるが, 非経口的に与えられたものでも, その大部分は一度腸管内に集まり, 小腸粘膜で磷酸化されながら吸収されるのである. たとえば注射された FR は肝臓から胆汁中に多量排泄され, 小腸で磷酸化されて吸収される機会を得る. また注射された FR の大部分は極めて迅速に尿中に排泄されることも知られている.<sup>16)17)</sup> 生体内における  $B_2$  は FR の形では貯溜能力がなく, 酵素学的に有効な FMN や FAD に変化して存在するわけである. 従って生体内へは FR の形では移行しない. 丁度糖が吸収される際と類似の機作によって吸収される. このように投与された  $B_2$  は第一に腸粘膜で変化を受け, FMN として吸収され, 各臓器組織に移行してから FAD にまで合成されると云われている. このような事実は *in vivo* による実験や *in vitro* の酵素学的な証明によっても明らかである. すなわち八木<sup>18)</sup> はラットに FR, FMN, FAD を注射した場合の臓器組織における  $B_2$  含量の経時的变化について観察しているが, それによると FR を注射した場合には小腸, 腎臓, 肝臓のみに増量し, 他の臓器には著しい変化がない. 小腸には注射後著しく増量が認められ, その際 FMN の増量が著しい. また腎臓や肝臓では FAD が増加している. なお, FMN を注射した場合には小腸に FMN が著しく増量し, 腎臓や肝臓には FAD の増量が認められた. さらに FAD を与えた場合には小腸に FAD と FMN が増量し, 肝臓, 腎臓および心臓では FAD が増量したと述べている. このような成績からすると生体内における FR から FAD への合成機転に関係する臓器としては小腸, 肝臓, 腎臓が考えられ, とくに FR から FMN への変化は小腸内で行われるものと推察される.

また生体内における  $B_2$  は, その殆んどが FAD であるが, 尿中には全くこれが認められず, その大部分が FR として排泄されている.

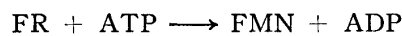
以上のことから生体内に投与された  $B_2$  の大部分は小腸粘膜で FMN となり, それが肝臓や腎臓に運ばれて FAD に合成され, 生理的な機能にあずかるものと考えられる. そして臓器組織における FAD は FR にまで分解されて尿中に排泄される.

#### 3—2. FR から FMN への生合成

前述のように生体内における FR は小腸粘膜において FMN に合成されることは容易に推察されるが, これに関する酵素学的な証明も以前から行われている.



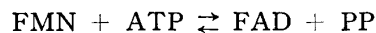
すでに Rudy<sup>19)</sup> はネズミの小腸のグリセリン抽出物に FR と無機磷酸塩を作用させ B<sub>2</sub> の 燐 酸 エステルの生成を認めている。また Hübner・Verzár<sup>20)</sup> および Pulver・Verzar<sup>21)</sup> もネコ、ネズミ、ブタの小腸粘膜のアセトン乾燥粉末から同様に合成されることを報告している。八木<sup>22)</sup> は小腸粘膜のアセトン乾燥粉末に ATP, Mg<sup>2+</sup> 共存下で FR を作用させ、ペーパークロマトグラム上に FMN の生成を確認した。このように高等動物における FR から FMN の合成は種々の事実から小腸粘膜で行われることは明らかであるが、しかしこれらの実験に用いられた酵素標品はかなり粗雑なもので、酵素反応機構を解明するには至っていない。その後 Kearney・England<sup>23)24)</sup> は酵母から FR と ATP, または ADP から FMN を合成する酵素を抽出し、Flavokinase と命名して本反応機構を明らかにした。この反応は Mg<sup>2+</sup> と高エネルギー燐酸化合物の存在を必要とし、無機燐酸を利用しないもので、その反応は次の式で示される。



なおこの反応は非可逆的であって、かなり特異性のある酵素である。また本反応の逆反応は別の酵素 phosphatase で行われることも明かになった。

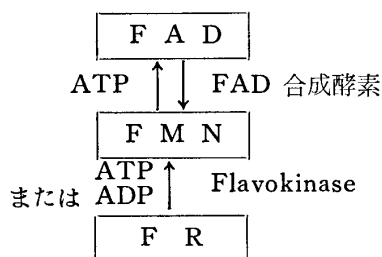
### 3-3. FMN から FAD への生合成

FR が Flavokinase によって FMN に生合成されることはさきの酵母や小腸粘膜における実験から明らかであるが、高等動物においては肝臓や腎臓で更に FAD まで合成されることは多くの *in vivo* の実験によって示された。また酵素的な研究では Schrecker・Kornberg<sup>25)</sup> が酵母から抽出した精製酵素を用いてこれを認めている。この反応は ATP と Mg<sup>2+</sup> の共存下に FMN が FAD に合成され、その反応機構は次のようである。



これは FMN と ATP がピロ燐酸を失って直接結合する反応で、FMN の過剰が存在すれば ATP の 60% が FAD に合成され、Mg<sup>2+</sup> の存在が必須因子となっている。この反応系において勝沼ら<sup>26)</sup> は P<sup>32</sup>-Labeled FMN を用いて FMN の P が FAD に incorporate されることを認め、反応機構を明らかにした。

以上述べたように生物体における FAD は少なくとも 2 種の酵素系により FR から FMN へ、FMN から FAD へと合成されるもので、その過程は次のように図示される。

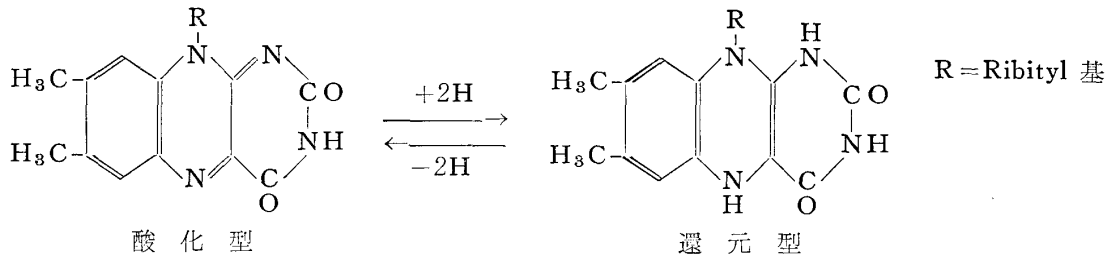


ここで興味あることは、第 1 の酵素系は非可逆的の反応により FMN が生成され、第 2 の酵素系では可逆反応により FAD が合成されることである。また高等動物では、これらの酵素系がそれぞれ別な臓器組織にあって FAD の供給にあずかっている。そして FMN から FAD への酵素活性が極めて高いことは、生体内 B<sub>2</sub> 分布の特異性とも結び付くものである。

### 4. FAD の生理作用

さきに述べたように高等動物体内に分布する B<sub>2</sub> は、その大部分が FAD であるから、B<sub>2</sub> の生理作用を知

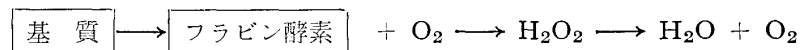
るためには FAD の作用機作を理解することが必要である。B<sub>2</sub> と補酵素との関係は Warburg, Christian が酵母から新しい黄色酸化酵素を発見し、補酵素として取出された黄色色素が B<sub>2</sub> の磷酸エステルであることにより始められた。B<sub>2</sub> の黄色はその構造の Isoalloxazine 核内に存在する N<sub>1</sub> と N<sub>10</sub> との間にある共役二重結合に起因するものである。そして B<sub>2</sub> はこの部分で水素を受容し共役二重結合を失って無色となり、酸化されれば再び黄色に戻る。



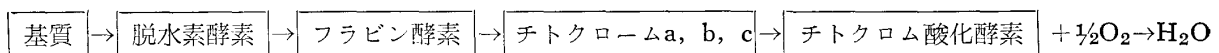
このような B<sub>2</sub> の化学的性質が FAD の補酵素作用の重要な部分となり、生体内酸化還元系にあずかるものと説明されている。次に FAD を補酵素とする酵素を列記すれば次表のようである。

	酵 素 名	基 質	水 素 受 容 量	補 酵 素
1)	diaphorase	還元型助酵素 I 還元型助酵素 II	チトクローム C	FAD
2)	xanthine 酸化酵素	キサンチン ヒポキサンチン アルデヒド	O <sub>2</sub>	FAD
3)	D-amino 酸酸化酵素	D-amino 酸	O <sub>2</sub>	FAD
4)	Straub の黄色酵素	還元型助酵素 I 還元型助酵素 II	O <sub>2</sub>	FAD
5)	合成黄色酵素	還元型助酵素 I 還元型助酵素 II	O <sub>2</sub>	FAD
6)	Hass の黄色酵素	還元型助酵素 I 還元型助酵素 II	O <sub>2</sub>	FAD
7)	フマル酸加水系酵素	還元助酵素	フ マ ー ル 酸	FAD
8)	glucose 酸化酵素	D-glucose	O <sub>2</sub>	FAD

これらの酵素はすべて可逆的に水素を捕捉または離脱を行って水素の運搬体となり、生体酸化にあずかっている。このうちで直接基質に作用するものと脱水素酵素系を介して行われ、電子伝達系に関与するものがある。例えば Xanthine 酸化酵素, D-Amino 酸酸化酵素, Glucose 酸化酵素などはそれぞれの物質に直接作用し、基質から水素を FAD が取り、更にこれを分子状酸素に与える酵素系であって、次のような機構で行われている。



FAD を補酵素とする酵素で最も大切なのは、エネルギーの産生と利用に関与する酵素群であっていわゆる呼吸酵素と呼ばれている酵素系のメンバーとして作用しているものである。この酵素は次のような酵素系の中核的な立場を占め、水素の運搬に関与している。



このように FAD の酵素学的意義は糖質、脂肪および蛋白質の代謝に関連しているばかりでなく、oxidative phosphorylation に関与してエネルギーの生産に重要な作用を持つものである。

文 献

- 1) Warburg, O., Christian, W.: *Biochem. Z.*, **266**, 377 (1933).
- 2) Theorell, H.: *Naturwiss.* **22**, 289 (1934).
- 3) Warburg, O., Christian, W.: *Biochem. Z.* **298**, 150 (1938).
- 4) Hellerman, L., Lindsay, A., Bovarmick, M. R.: *J. Biol. Chem.* **163**, 553 (1946).
- 5) Stadie, W. C., Zapp, J. A.: *J. Biol. Chem.* **150**, 165 (1943).
- 6) Burton, K.: *Biochem. J.* **48**, 458 (1951).
- 7) Dimant, E., Sanadie, D., Huennekens, M.: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5440 (1952).
- 8) Crammer, J. L.: *Nature.* **191**, 349 (1948).
- 9) 八木, 石黒: *ビタミン*, **3**, 29 (1950).
- 10) Whitby, L. G.: *Biochem. J.* **54**, 437 (1953).
- 11) Whitby, L. G.: *Biochem. Biophys. Acta.* **15**, 148 (1954).
- 12) Masuda, J., Sawa, Y., Asai, M., Kuwada, T.: *J. Vitaminology.* **1**, 185 (1955).
- 13) Warburg, O., Christian, W.: *Biochem. Z.* **296**, 294 (1938).
- 14) Christie, S. M. H., Kenner, G. W., Todd, A. R.: *J. Chem. Soc.* 46 (1954).
- 15) 堀田, 石黒, 杉浦, 勝沼, 小島, 菱木, 池上: *ビタミン*, **14**, 578 (1958).
- 16) 八木, 加藤, 菊地: *ビタミン*, **7**, 128 (1954).
- 17) 八木, 奥田, 三浦: *ビタミン*, **7**, 378 (1954).
- 18) Yagi, K.: *J. Biochem.* **41**, 757 (1954).
- 19) Rudy, H.: *Naturwiss.* **23**, 286 (1935).
- 20) Hübner, H., Verzár, F.: *Helv. Chem. Acta.* **21**, 1006 (1938).
- 21) Pulver, R., Verzár, F.: *Enzymologia.* **6**, 333 (1939).
- 22) 八木: *医学と生物学.* **19**, 233 (1951).
- 23) Kearney, E. B., England, S.: *Arch. Biochem.* **32**, 222 (1951).
- 24) Kearney, E. B., England, S.: *J. Biol. Chem.* **193**, 821 (1951).
- 25) Schrecker, A. W., Kornberg, A.: *J. Biol. Chem.* **182**, 795 (1950).
- 26) 渡会, 板谷, 内田, 石川, 勝沼: *ビタミン*, **8**, 331 (1955).