

ヒト赤血球のNADPH-フラビン還元酵素の精製とその性質

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Yubisui, Toshitsugu メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00018854

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ヒト赤血球の NADPH-フラビン還元酵素の 精製とその性質

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

指 吸 俊 次

(昭和53年5月23日受付)

ヘモグロビン (Hb) は、そのヘム鉄が、2価 (還元型) の時にのみ、分子状酸素の吸着脱離を行なうことが出来るが、ヘム鉄が、何らかの原因で酸化されたもの (メトヘモグロビン、メト Hb) は、もはや酸素を結合しえない。ヒト赤血球内で、種々の原因で形成されるメト Hb は、全 Hb の数%程度であると考えられているが、赤血球内には、メト Hb を還元する種々の系があり、常にメト Hb 蓄積量を、正常時で、約 1% 以下に抑える働きをしている¹⁾。上述の還元系とは、1) アスコルビン酸、還元型グルタチオン等の低分子物質による非酵素的還元系と、2) NADH 及び、NADPH 依存性のメト Hb 還元酵素系である²⁾。正常赤血球内では、NADH-依存性メト Hb 還元酵素系が、主にメト Hb の還元を行なっているが、この酵素が、遺伝的に欠損するメト Hb 血症が、Gibson ら³⁾及び、Scott ら⁴⁾によって報告された。この酵素は、最近になって、Hultquist と Passon⁵⁾ 及び Sugita ら⁶⁾によって、NADH-チトクロム b₅還元酵素であることが明らかにされた。一方、NADPH 依存性メト還元酵素は、種々の観察から、正常赤血球中では、メト Hb 還元に果す役割は少ないと考えられている⁷⁾。しかし、上述のように、遺伝性メト Hb 血症の場合には、この酵素が、メト Hb の還元を、不十分とはいえない、かつ、その活性化は、治療に結びついているので、その存在意義は大である。我々は、最近、メト Hb 還元の研究中に、NADPH 依存性酵素が、生理的物質であるフラビンでよく安定化されること、及び、この酵素によるメト Hb の還元が、フラビン添加でよく促進されることを見出し⁸⁾、この酵素が、フラビン還元活性を持っていることを明らかにした⁹⁾。本研究では、NADPH-依存性酵素を、高純度に精製し、その性質を明らかにするとともに、本酵素によるメト Hb の還元機構、及びこれに対するフラビンの関与について明らかにすることを目的として研究を進めた。

実験材料と方法

I. 試薬と材料

正常ヒト血液は、東京日赤血液センターより、期限切れのものを得て実験に用いた。NADP, NADPH, NADH は、Sigma 社、または、ペリンガー社のものを用いた。その他の試薬は、市販のもので、特級のものを用いた。

II. 分光学的測定

分光学的測定は、日立 124 型自記分光光度計、及び、ユニオン SM401 型自記分光光度計を用いて行なった。

III. 酵素活性の測定

a) フラビン還元活性は、フラビン (FMN, FAD または、riboflavin) を電子受容体として、下記の反応液中で行なった⁹⁾。最終 2.0 ml の反応液中に、50mM リン酸緩衝液 (pH4.8 または、7.5)、100 μ M フラビン、100 μ M NADPH, 1mM EDTA を加え、最後に、適当量の酵素を加えて反応を開始させた。反応は、酸素存在下では、340nm での NAD(P)H による吸光度の減少速度を、また、無酸素状態では、340nm での吸光度の減少、または、フラビンによる、445nm または、450nm での吸光度の減少速度を追跡して測定した。

b) メト Hb 還元活性は、576nm での吸光度の増加、または、630nm での吸光度の減少を追跡した⁹⁾。反応液 2.0 ml には、50mM リン酸緩衝液 (pH7.0)、100 μ M NAD(P)H, 100 μ M FMN、(または、他の電子伝達体)、50 μ M メト Hb, 1mM EDTA を含み、最後に、適当量の酵素を加えて反応を開始させた。

c) ジアホラゼ活性は、2,6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) を電子受容体として測定した⁹⁾。反応液 2.0 ml 中に、50mM リン酸緩衝液 (pH7.5)、100 μ M NAD(P)H, 75 μ M DCIP, 1mM EDTA を含み、最後に、酵素を加えて反応を開始させ、600nm での DCIP の吸光度の減少を測定した。

Purification and Properties of NADPH-Flavin Reductase from Human Erythrocytes.
Toshitsugu Yubisui, Department of Biochemistry, (Professor Yoshimasa Yoneyama),
School of Medicine, Kanazawa University.

IV. 電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は, Orstein¹⁰⁾ 及び, Davis¹¹⁾ の方法に従って行なった。また, 泳動後, 酵素活性は, Kaplan と Beutler¹²⁾ の方法に従い, 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) を最終電子受容体として検出した。等電点電気泳動は, Svesson¹³⁾ の方法に従って行なった。Carrier ampholine は, pH 範囲が, 6~9 のものを用い, 最終濃度が, 約 1% になるように加えた。本研究では, 蔗糖濃度勾配の代わりに, 酵素の安定化のために, グリセリンによる濃度勾配, 0~30% を用いて行ない, 安定化剤としてさらに, 0.2mM Dithiothreitol (DTT) を加えた。等電点電気泳動は, 40~48 時間行なった。

V. 分子量の測定

酵素の分子量は, ゲル濾過法, 及び, sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む PAGE 法によって測定した。ゲル濾過は, Sephadex G-75, または, Ultrogel AcA 54 を用いて, Andrews¹⁴⁾ の方法に従って行なった。ゲルカラム (2.8 × 85cm) は, 予じめ, 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5, 1mM EDTA, 0.1mM DTT を含む) で平衡化し, 酵素を, 単独に, または, 分子量既知の標準物質とともに, ゲル濾過を行なった。SDS-PAGE は, Weber と Osborn¹⁵⁾ の方法に従い, ゲル濃度 5% または, 10% で電気泳動を行なった。分子量既知の物質として, ウマ心筋チトクロム c (12,400), クジラミオグロビン (17,800), 酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (36,000),

卵アルブミン (46,000), ウシ血清アルブミン (68,000) を用いた。

VI. 酵素の精製⁹⁾

正常ヒト血液を, 低速 (3,000 回転) 遠心し, 血清, 白血球などを除去した後, さらに, 0.9% 生理食塩水で 3 回洗浄する。洗浄赤血球 1 容に対し, 3 容の冷 1mM メルカプトエタノール (MSH) を加え, 攪拌, 溶血させる。30 分後, 溶血液の pH を, 塩酸で, 6.4~6.5 に調整し, 赤血球膜を, 遠心除去する。上清は直ちに, NaOH で中和し, これに, 1.5 容の 1mM MSH を加え稀釈する。これを, 予じめ, 2mM リン酸緩衝液 (pH7.0, 1mM-MSH を含む) で平衡化した diethyl aminoethyl (DEAE) セルロースカラム (6 × 30cm) にかけて, 酵素を吸着させ, Hb を除く。溶血液が, カラムを流れきると, 1mM MSH を含む 5mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で, カラムに残っている Hb を出来るだけ洗い流したあと, 100mM リン酸緩衝液 (pH7.0, 0.1mM DTT を含む) で, 酵素を溶出した。分画された溶出液のうち, 酵素活性の強い画分を集め, 硫酸分画を行ない, 飽和度, 40%~70% の間に沈殿する画分を集めた。集めた沈殿を, 最少量の 50mM リン酸緩衝液 (pH7.5, 1mM EDTA, 0.1mM DTT を含む) にとかし, Ultrogel カラム (5 × 85cm) にかける。酵素は, 同じ緩衝液で溶出し, 活性の強い画分を集め, ゲル濾過を, 同じ条件下でくり返す。2 度目のゲル濾過を, 注意深く行ない, 混在する NADH- 及び, NADPH- ジアホラーゼを分離する。分離した NADPH- ジアホラーゼ画分を, 再び, 硫酸で, 飽和度

表 1. 精製のまとめ

Fractions	Total activity ^(a)	Protein (g)	Specific activity ^(b)	Yield (%)
1 Hemolysates	380	4070	0.093	100
2 DEAE-cellulose	116	46.3	2.51	30.5
3 Ultrogel AcA 54	73.6	10.7	6.88	19.4
4 DE-32	65.5	8.2	8.0	17.2
5 (NH ₄) ₂ SO ₄ , (40-70%)	63.0	4.3	14.7	16.6
6 Ultrogel AcA 54	58.1	2.63	24.6	15.3
7 CM-32	16.2	0.055	296	4.3
8 Ultrogel AcA 54	11.8	0.035	333	3.1
9 Electrofocusing	6.03	0.021	281.7	1.6

a) Total activity; μ moles hemoglobin reduced/min.

b) Specific activity; μ moles hemoglobin reduced/min./mg.

70%で酵素を沈澱させて濃縮し、10mMリン酸緩衝液(pH6.8, 1mM EDTA, 0.1mM DTTを含む)に透析する。透析した酵素を、次に、同緩衝液で平衡化した Carboxymethyl (CM) セルロースカラム(2×20cm)にかける。カラムを、同じ緩衝液で洗うと、色素蛋白は、全て流れてしまい、酵素は、リン酸緩衝液の、10mMから100mM(pH6.8)の濃度勾配を用いて溶出すると、リン酸濃度の、約50mM附近で溶出されてくる。この画分を集めて、再び硫酸で濃縮したのち、10mMリン酸緩衝液(pH7.5, 1mM EDTA, 0.1mM DTT)に透析する。透析した標品を、次に、分離用等電点電気泳動にかける。電気泳動後、NADPH-フラビン還元酵素活性を測定して、酵素画分を集め、最後に、不純蛋白と、carrier ampholineを除くために、Ultrogel カラムでゲル濾過を行ない、最終標品を得た。

VII. フラビンの分析

精製酵素のフラビンは、酵素に、最終濃度が、5%に

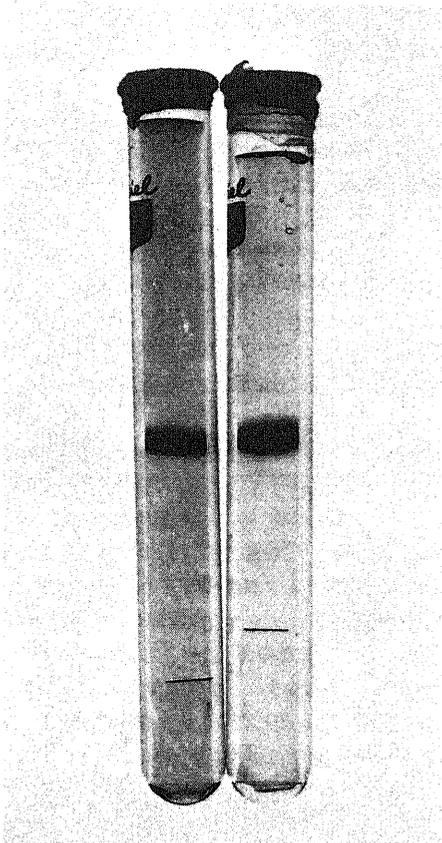


図1. 精製酵素の SDS-PAGE

ゲル(左) - 15µg, (右) - 30µg タンパク使用.

なるように trichloroacetic acid (TCA) を加えて除蛋白した上清をとり、 K_2HPO_4 を加えて中和し、蛍光強度を測定した¹⁶⁾。標準として、FMN を用いて、相対蛍光強度を測定した。蛍光強度は、日立 MPF-4 蛍光自記分光光度計を用いて測定した。

結 果

I. 酵素の精製

酵素は、表 I に示すように、溶血液から、比活性で、約3,500倍精製され、収量は、約2%であった。純度は、SDS-PAGE法で調べると、図1に示すように、単一のバンドを示し、単一蛋白質に精製されたことが明らかである。

II. 精製酵素の性質

1) 吸収スペクトル-精製酵素は、278nmに吸収極大、283nmに肩を示すが、可視部には、全く吸収がなかった(図2)。

2) フラビン含量-精製酵素のフラビン含量を、蛍光分析法で測定したが、酵素の5% TCA 上清には、殆んど蛍光が認められず、計算上、酵素 3.27×10^4 モル当り、FMN 1モル以下しかなく、事実上、フラビン含量は、0であると考えられる(図3)。

3) 酵素の分子量-酵素の分子量は、ゲル濾過、及び SDS-PAGEで、2.1~2.2万と推定した。

4) 電子受容体-精製酵素の電子受容体について、種々の物質について調べた結果を、表2に示した。天然物質のうち、フラビンのみが、効率よく電子を受容したが、メトHbや、チトクロム類など、殆んど物質が、電子受容体となり得なかった。人工色素では、DCIP、メチレンブルーなどが、効率よく電子を受容した。

5) pHの効果-NADPH-フラビン還元活性、DCIP

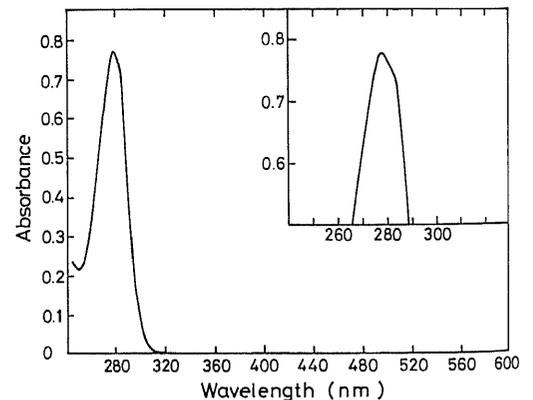


図2. 精製酵素の吸収スペクトル.

挿入図-吸収極大の拡大図

還元活性に対する pH の効果を、図 4 に示した。フラビン還元活性の至適 pH は 4.8 であった。DCIP 還元活性は、酸性側で強かったが、pH6 以下では、非酵素的還元が強く、色素が赤変するので、通常は、pH7.5 で

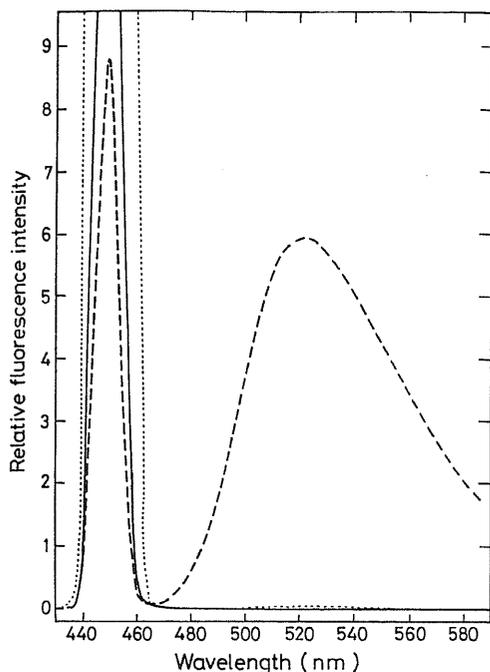


図 3. 精製酵素のフラビン定量
破線-FMN, 実線-酵素の 5% TCA, 上清, 点線-
実線の 1/10 スケール。

測定した。

6) NADPH-フラビン還元活性-酵素によるフラビンと、NADPH の酸化還元の当量比を調べた。ツンベルグ管の主室に、酵素とフラビンを、副室に、NADPH を入れ、脱気して Q ガス (99.05%ヘリウム+0.95%ブタン) と置換したのち、両者を混合して反応を開始させ、スペクトル変化を測定した。333nm または、340nm で NADPH の変化を、445nm で、FMN の変化を測定した。表 3 に示すように NADPH の酸化量と、FMN の還元量とは、ほぼ 1:1 であった。図 5 に、FMN の還元の経時変化を示した。酵素の、NADPH 及

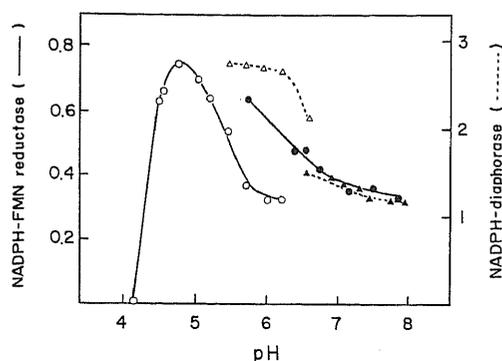


図 4. 酵素活性に与える pH の効果
実線-NADPH-フラビン還元活性
点線-NADPH-ジアホラーゼ活性
○, △-シトレート-リン酸緩衝液
●, ▲-リン酸緩衝液

表 2. 精製酵素の電子受容体特異性

Electron acceptors	Concentration (μM)	A _{340nm} /min \times 5
None	—	0
FMN	50	0.080
FAD	50	0.036
Riboflavin	50	0.056
GSSG	50	0.0012
Menadione	50	0.003
Hemin	50	0.001
Methylene blue	50	0.124
2, 6-Dichlorophenolindophenol	50	0.718
Ferricyanide	50	0.006

A_{340nm}/min = 0: Methemoglobin, Cytochromes *b₅*, *c* and P-450, Biopterin, Ferredoxin, Adrenodoxin, Pyridoxal-5'-phosphate and its derivatives.

び、FMN riboflavin, FAD に対するミハエリス定数は、それぞれ、 $2\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $90\mu\text{M}$ であった。

7) 種々の試薬の活性に対する効果-フラビン還元活性に与える種々試薬の影響を調べた結果を表 4¹⁷⁾ に示した。フラビンの誘導体であるアテブリン、プロフラビン、アクリノールは、 0.5mM で強い阻害を示した。また、bathocuproine sulfonate, diethyl dithiocarbamate などのキレート剤では、弱い阻害、または、阻害が全く認められず、また、鉄、銅と強く結合することが知られているシアンでも全く阻害が認

められなかった。さらに、鉄、銅両イオンを反応液に加えても活性化が見られず、むしろ銅イオンで阻害が見られた。これらの結果は、酵素に、鉄、銅などの金属イオンが結合して、活性に関与しているという可能性を否定するものである。蛋白質の SH 基に結合することが知られている N-ethylmaleimide, monoiodoacetate は、 1mM では、全く阻害を示さなかったが、p-chloromercuribenzoate, HgCl_2 は、 10^{-5}M で強い阻害を示し、SH 基が、何らかの形で、活性に関与していることを示唆している。金属イオンの

表 3. 酵素による NADPH-フラビン還元反応の当量比関係

Experiment	NADPH added (μM)	FMN added (μM)	Time	NADPH oxidized (nmoles)	FMN reduced (nmoles)	$\frac{\text{NADPH oxidized}}{\text{FMN reduced}}$
1	74	51	40 min	21.8	16.0	1.36
2	142	154	150 min	116.6	88.0	1.30
3	66	58	65 min	17.6	10.7	1.04

表 4. フラビン還元活性に与える種々試薬の影響

Addition	Concentration (mM)	Relative activity
None	—	100%
Atebrin	0.5	80
Proflavin hemisulfate	0.5	42
Acrinol	0.5	45
Bathocuproine sulfonate	0.5	20.3
o-Phenanthroline	0.5	40.6
8-Hydroxyquinoline	0.5	77
Diethyldithiocarbamate	0.5	120.3
Catalase	(500 units)	97.1
Superoxide dismutase	(27 units)	54.3
Potassium cyanide	1.0	119
PCMB	0.01	34.8
HgCl_2	0.01	14.3
N-Ethylmaleimide	1.0	100
Monoiodoacetate	1.0	110
Inositolhexaphosphate	1.0	111
2, 3-Diphosphoglycerate	1.0	65.7

うち、 Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} は、活性に影響を与えなかったが、 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Se^{2+} , SeO_3^{2-} は、弱い阻害を示した。

8) メトHbの還元-酵素によるメトHbの還元を、種々条件下で測定した。図6に示すように、電子伝達体が存在しないと、酵素は、全くメトHbを還元しない(control)。しかし、FMN, riboflavinを $50\mu\text{M}$ 加えると、速やかにメトHbが還元され、FADでも、前二者の約半分の速度で、メトHbが還元された。メチレンブルーは、微量($0.5\mu\text{M}$)で、フラビンと同程度の、メトHbの還元をもたらすことができる。

考 察

ヒト赤血球の NADPH-メトHb還元酵素

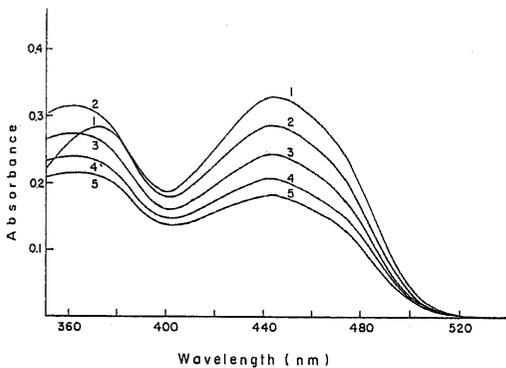


図5. 酵素によるFMN-還元のスpekトル変化
1) 反応前, 2) 反応開始後5分, 3) 15分, 4) 30分, 5) 60分

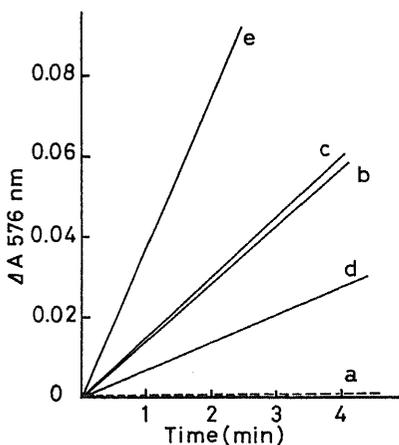


図6. 酵素によるメトHb還元
a) control, b) FMN $50\mu\text{M}$ c) riboflavin $50\mu\text{M}$, d) FAD $50\mu\text{M}$, e) methylene blue $0.5\mu\text{M}$.

は、Scottら¹⁰⁾の研究以来、本来の基質であるべきメトHbの還元活性が弱いために、色素DCIPの還元、つまり、ジアホラーゼ活性を、指標として研究が進められて来た。また、この酵素は、メチレンブルー存在下で速やかなメトHb還元活性を示すことも知られた¹⁹⁾。このように、色素を加えないとこの酵素は、活性が認められないという不明瞭な事実を残したまま、充分研究がなされなかった。我々は、最近、メトHb還元を研究中に、生理的物質であるフラビンが、いわゆる「NADPH-メトHb還元酵素」を安定化し⁹⁾、さらに、メトHb還元を促進することを見出した。このフラビンの効果は、しかし、NADH-チトクロム b_5 還元酵素では、全く見られなかった⁹⁾。精製酵素の電子受容体として、十数種の天然物質について調べた限りでは、フラビン以外に効率よく電子を受容するものは、見つかっていない。また、この酵素によるフラビン還元を、活性化するものはないかを検討したが、見あたらなかった¹⁷⁾。精製酵素のフラビンに対するミカエリス定数は、FMN, riboflavinで $50\mu\text{M}$, FADで $90\mu\text{M}$ とかなり大きい⁹⁾。しかし、ヒト赤血球中の遊離フラビン濃度は、通常かなり低い(約 $1\mu\text{M}$)ので、正常状態では、この酵素は充分機能していないと考えられる。この酵素に対するフラビンの効果についての問題点としては、フラビンが、この酵素に強く結合して、いわゆる補欠分子族として作用するかどうかということ、あるいは、この酵素が、本来は、フラビンを結合した酵素であるが、精製中に、部分変性によって、フラビンが遊離したのではないかと考えられる。このため、酵素の安定化剤として、FMN, EDTA, NADPH, MSH, DTTなどを、加えて精製を行なったが、いずれの場合も、フラビンを含まない酵素が得られた。酵素に対するフラビンの結合は、きわめて弱く、フラビンと、長時間インクベートしても、ゲル濾過で容易に、ほぼ完全に、フラビンを除去出来る。本酵素が、本来フラビンを結合した形で存在するかどうかについては、成熟赤血球になる一段階前の、網状赤血球に、この酵素が、フラビンを結合した形で存在するかどうかを調べることで、解答または、示唆が、得られるであろう。

以上の結果から、本酵素は、フラビン還元活性をもつ酵素であり、本酵素によるメトHb還元は、まず、酵素によるフラビンの還元がおり、ついで、還元型フラビンによるメトHbの非酵素的還元によると説明出来る。還元型フラビンによるメトHbの非酵素的還元は、別の実験により確認された。

メトHb血症に対する治療剤として、従来、本酵素を

活性化するために、メチレンブルーが投与されて来た。これは、メチレンブルーが、速効性があるためでもあったが、酵素の生理的電子受容体が、不明なために、有効な治療剤が見つからないためでもあった。しかし、フラビンが、この酵素の生理的電子受容体であることが判明した現在、フラビンは、色素などの投与で見られるような副作用を、もたらさない良好なメトHb血症の治療剤として期待出来る。

結 語

1) ヒト赤血球から、従来、NADPH-メトHb還元酵素と呼ばれていた酵素を、電気泳動的に単一に精製し、本酵素が、フラビン還元酵素であることを、明らかにした。

2) 酵素には、ヘミンや、フラビン、または金属イオンなどの補欠分子族は、含まれていない。

3) 本酵素は、メトHbを直接には還元出来ないが、フラビンを加えると、速やかな還元が見られる。フラビンを、微量のメチレンブルーでおきかえることが出来る。

4) フラビンは、生理的物質であり、色素(メチレンブルーなど)を用いた場合に見られるような副作用がなく、遺伝性メトHb血症や、薬物による一過性のメトHb血症の良好な治療薬として期待出来る。

御指導、御校閲を戴いた、米山良昌教授に感謝いたします。また、本研究遂行中、討論、助言をいただいた、教室員各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Kiese, M., Methemoglobinemia, A Comprehensive Treatise, p. 26, CRC Press, Cleveland, Ohio (1974).
- 2) Scott, E. M., : Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism (ed. by Beutler, Grune and Stratton) New York and London, p. 102 (1968).

- 3) Gibson, Q. H., Biochem. J., 42, 13 (1948).
- 4) Scott, E. M., and Hoskins, D. D., : Blood, 13, 795 (1958).
- 5) Hultquist, D. E., and Passon, P. G., : Nature (New Biol), 229, 252 (1971).
- 6) Sugita, Y., Nomura, S., and Yoneyama, Y., : J. Biol. Chem., 246, 6072 (1971).
- 7) Sass, M. D., : Clin. Chim. Acta, 21, 101 (1968).
- 8) Yubisui, T., Okamoto, H., Tanishima, K., Takeshita, M., and Yoneyama, Y., : The 16th International Congress of Hematology, Abst. p. 85 (Kyoto) (1976).
- 9) Yubisui, T., Matsuki, T., Tanishima, K., Takeshita, M., and Yoneyama, Y., : Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 174 (1977).
- 10) Orstein, L., : Ann. New York Acad. Sci., 121, Art., 2, 321 (1964).
- 11) Davis, B. J., : Ann. New York Acad. Sci., 121, Art., 2, 404 (1964).
- 12) Kaplan, J. C., and Beutler, E., : Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 605 (1967).
- 13) Svesson, H., : Arch. Biochem. Biophys., Suppl., 1, 132 (1972).
- 14) Andrews, P., : Biochem. J., 91, 222 (1964).
- 15) Weber, K., and Osborn, M., : J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969).
- 16) Burch, H. B., Bessey, O. A., and Lowry, O. H., : J. Biol. Chem., 175, 457 (1948).
- 17) Yubisui, T., Matsuki, T., Takeshita, M., and Yoneyama, Y., : E. J. Biochem., submitted (1978).
- 18) Scott, E. M., Duncan, I. W., and Ekstrand, V., : J. Biol. Chem., 240, 481 (1965).
- 19) Kiese, M., : Methemoglobinemia, A Comprehensive Treatise, p. 19, CRC Press, Cleveland, Ohio (1974).

A b s t r a c t

1) A NADPH-dehydrogenase, which has been called "NADPH-methemoglobin reductase", was exhaustively purified from human erythrocytes to a homogeneous protein judging from the electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate. The enzyme was found to be a NADPH-flavin reductase based on its electron acceptor specificity.

2) The enzyme did not contain a prosthetic group such as hemin, flavin or metal

ion.

3) The enzyme could not reduce methemoglobin directly, but in the presence of flavin in the reaction mixture, a rapid reduction of methemoglobin was observed. The flavin in the reaction mixture could be replaced by methylene blue.

4) Flavin, a physiological substance, will be a good therapeutic agent for the patients with hereditary methemoglobinemia or drug-induced acute methemoglobinemia, because flavins will not give side-effects which are observed with the artificial dyes such as methylene blue.