The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Thiamine, S-Carbethoxy thiamineならびにThiamine propyl disulfideの酵母Kloeckera apiculataにたいする増殖促進性ならびに菌体への集積
Author(s)	篠田, 純男
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1262
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍)	篠田純男（しのだすみお）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 1487 号
学位授与の日付	昭和43年5月4日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**Thiamine, S-Carbethoxy thiamine ならびに Thiamine propyl disulfide の酵母 Kloeckera apiculata に対する増殖促進性ならびに菌体への集積**
論文審査委員	(主査) 教授 川崎近太郎 (副査) 教授 岩田平太郎　教授 青沼　繁　教授 上原喜八郎

論文内容の要旨

Kloeckera apiculata は Thiamine 要求性の酵母であるが本酵母は数種の Thiamine 誘導体により強く増殖が促進される。著者は Thiamine 誘導体の増殖促進性の原因を解明する目的で Thiamine propyl disulfide (TPD) ならびに S-Carbethoxythiamine (CET) の Kl. apiculata にたいする態度を検討し以下の知見を得た。

(1) Thiamine, CET および TPD の増殖促進性の比較

CET および TPD を添加して培養すると Kl. apiculata の増殖が Thiamine を添加した場合より促進されるのは濁度，菌体重量，タンパク質量ならびに菌数の測定結果から明らかである。しかしこれら2種の誘導体の増殖促進性には下記のような相違がみられた。CET, TPD または Thiamine を生理食塩水中で Kl. apiculata に集積させたのち培地を加えて培養すると CET は Thiamine より強い活性を示すのにたいして TPD は Thiamine と同等の活性を示した。一方，培地中で TPD を Cysteine 処理により，また CET をタカジアスターゼ処理により Thiamine に変化させたのち菌を接種して培養すると TPD は Thiamine より強い活性を示すのにたいして CET は Thiamine に等しい活性を示した。すなわち CET は CET の型で菌体に接触しそのまま菌体内にとりこまれたとき Thiamine より強い活性を示し，TPD は培地中で菌と接触することによって Cysteine により還元されたのちにおいても Thiamine に比べより強い活性を示すと考えられる。また Kl. apiculata の同調培養を行なうと Thiamine の増殖促進性との差が TPD を添加したときは対数増殖期の初期に，CET を添加したときは後期にあらわれた。

(2) Thiamine 誘導体と Thiamine 拮抗体の関連

Thiamine ならびにその誘導体の増殖促進性にたいする Thiamine 拮抗体の影響をしらべると CET および TPD は Thiamine より強い増殖促進性を示すにもかかわらずその増殖促進性は

Pyrithiamine および Oxythiamine によって Thiamine の場合より強く阻害された。しかしThiamine またはその誘導体をあらかじめ菌体に集積させたのち Oxythiamine を添加して培養するといずれも同様な阻害曲線が得られた。Thiamine およびその誘導体の集積段階における Oxythiamine の影響の差が増殖阻害の差となってあらわれたと考えられ，Thiamine とその誘導体の菌体への透過機構に相違があると思われる。

(3) 菌体中 Thiamine の存在型の変化

増殖に必要な最少量の Thiamine およびその誘導体を添加して培養した Kl. apiculata の菌体中 Thiamine 含量を測定すると総量にはほとんど差がないが Thiamine を添加して培養した菌体には 23～42％の Free thiamine が含まれるのにたいして CET，TPD を添加して培養した菌体の Thiamine はすべてリン酸化されて Thiamine diphosphate (TDP) として検出された。すなわち CET，TPD は添加されたものすべてが増殖に利用され得る TDP に変化していたのにたいして Thiamine は一部が増殖に利用され得ない遊離型として存在していた。このように TDP への変化率の差が増殖促進性の差となってあらわれたのであるが，この差の生じる原因として先にものべたように Thiamine と Thiamine 誘導体の菌体への透過機構に差があると思われるのでつぎに Thiamine ならびにその誘導体の集積態度につき検討した。

(4) Thiamine および Thiamine 誘導体の集積

酵母が Thiamine を集積する現象は古くから知られているが，Kl. apiculata は 2％ Glucose 中 pH4.7, 30°C，1時間の保温で，菌体量(乾燥物として)の10％におよぶ Thiamine を Free thiamine の型で集積した。集積された Thiamine は Thiaminase により分解されず，Thiamine を集積した酵母を機械的に破壊すると Thiamine はすべて溶出し細胞壁に結合したものは認められなかった。Thiamine を集積した Kl. apiculata に 0.8M 塩化ナトリウム溶液中で細胞壁溶解酵素を作用させ，Protoplast を調製すると約60％の Thiamine が細胞外に溶出した。Thiamine をほとんど含まない細胞から得られた Protoplast に Thiamine を添加すると Thiamine の集積がみられたが Intact cell に比べると集積量は低い。これらの事実は集積された Thiamine の大部分が原形質膜と細胞壁の間に局在することを示唆するものである。

Kl. apiculata に TDP (Cocorboxylase) を添加すると Thiamine とほぼ等しい量の集積がみられ，しかもすべて Free thiamine として検出された。酵母の細胞壁には Acid phosphatase が存在しておりその作用によって TDP が Thiamine に変化したものである、Protoplast を調製することによって Phosphatase を細胞から除去したときあるいは Phosphatase 阻害剤を添加したときには TDP の集積は阻害された。Thiamine が集積されるためには Free thiamine の型であることが必要と思われる。

TPD および CET の Kl. apiculata による集積は Thiamine に比べると非常に低いがごく少量の反応液中で酵母菌体に接触させると CET はほぼ濃度勾配に比例した細胞内移行量を示した。また細胞内では短時間の接触ではほとんど CET の型のまま検出された。CET を保有する細胞を大量の等張液で洗浄すると CET が細胞外に溶出した。すなわち CET は Simple diffusion によって原形質膜を透過して内部に入り，洗浄によりふたたび Simple diffusion によって流出したと考

えられる。一方 Thiamine または TPD を添加したとき洗浄による細胞からの流出は認められず，TPD を添加したとき TPD 自身は検出されず Thiamine のみが菌体内に検出された。TPD は Thiamine への変化が速やかなため原形質内にとじこめられて流出し得ないと考えられる。

〔結　　論〕

CET および TPD は Thiamine 要求性酵母 Kl. apiculata の増殖を対応量の Thiamine より強く促進する。これを解明するために各種の実験を行なってつぎの知見を得た。

(1) 増殖の経過を同調培養により比較しあるいは増殖各期の菌体中の Thiamine の存在型を Bioautography で検出し，また Antithiamine 化合物と CET または TPD との拮抗を検討した結果 CET は TPD に比べ安定で菌体中に一部 CET として増殖初期に検出されたのみでなく，TPD に比べ増殖の後期において Thiamine による増殖と差を生じた。

(2) CET または TPD を添加して培養した菌体には TDP のみが検出されたのにたいして Thiamine を添加して培養した菌体にはかなりの Free thiamine が検出された。CET と TPD は(1)のような相違を示したが，増殖に有効な TDP への菌体内での変化率が Thiamine より優れている点で両者は一致した態度を示した。

(3) Thiamine または Thiamine 誘導体を短時間菌体と接触させて集積実験を行なうと，Thiamine は多量に集積されるが，集積されたものの一部は原形質膜と細胞壁の間に Free thiamine としてとどまり Protoplast の調製によって溶出する。多量の CET を用いたとき Thiamine に比べ集積が悪いが Simple diffusion によって原形質内に透過し，TPD は Thiamine と CET の中間的な態度を示す。

(4) 以上の成績から培養初期の菌体を想定すると CET は菌体に透過した時点では CET の型であるが，大部分が原形質内に透過するので Thiamine を経て TDP に変化するにたいして，Thiamine を添加したとき一部は原形質膜と細胞壁の間に Free Thiamine として残るため CET を添加すると Thiamine を添加したときより高い TDP 含量となり強い増殖促進性となって現れるものとして説明できる。

論文の審査結果の要旨

S-Carbethoxythiamine および Thiamine propyl disulfide が Thiamine 要求性酵母 Kloeckera apiculata の増殖を対応量の Thiamine より強く促進する事実を解明するため，両物質の菌体内 Thiamine 復帰速度の差が同調培養時の速度差を生ずる原因であり，S-Carbethoxythiamine が単純拡散により原形質に透過し Thiamine diphosphate 含量を高めることを確認し，両物質の増殖時においての変化を明かにした。よって本論文は薬学博士の学位を授与するに価値あるものと判定した。