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

# 論　文　目　錄

篠　田　純　男

# 論　文　目　録

氏名　篠田純男

## 主　論　文

題名　Thiamine, S－Carbethoxythiamine 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

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の微生物活性(VII)　S－Carbalkoxythiamine の微生物活性(2)

昭和38年10月25日

ビタミン　28巻4号299頁

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の微生物活性(XI)　Carbalkoxythiamine と Thiamine propyl disulfide の Kloeckera apiculata にたいする活性

昭和39年10月25日

ビタミン　30巻4号 289頁

Activity of Carbethoxythiamine and Thiamine Propyl Disulfide on Kloeckera apiculata

昭和40年6月10日

The Journal of Vitaminology

11巻2号 153頁

1. ビタミン拮抗体にかんする研究(XVI)　Kloeckera apiculata にたいする Oxythiamine とビタミン $B_1$ 誘導体の拮抗

昭和42年11月25日

ビタミン　36巻5号　393頁

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の微生物活性(XIV)　酵母に集積されたビタミン $B_1$ の存在部位と細胞からの放出

昭和42年12月25日

ビタミン　36巻6号　530頁

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の微生物活性(XV)　Kloeckera apiculata によるビタミン $B_1$ 誘導体の集積

昭和42年12月25日

ビタミン　36巻6号　535頁

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の微生物活性(XVI)　Kloeckera apiculata の同調培養におよぼすビタミン $B_1$ 誘導体の影響

昭和42年12月25日

ビタミン　36巻6号　541頁

## 参 考 論 文

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の血球移行性(I)　Thiamine propyl disulfide と Thiothiamine との比較

昭和38年10月25日

ビタミン　28巻4号　310頁

Penetration of Modified Thiamine Compounds into Erythrocytes I. Comparison of Thiamine Propyl Disulfide and Thiothiamine

昭和39年6月10日

The Journal of Vitaminology　10巻2号154頁

1. ビタミン $B_1$ 誘導体の血球移行性(II)　Thiamine propyl disulfide と Dicarbethoxythiamine との比較

昭和39年4月25日

ビタミン　29巻4号　255頁

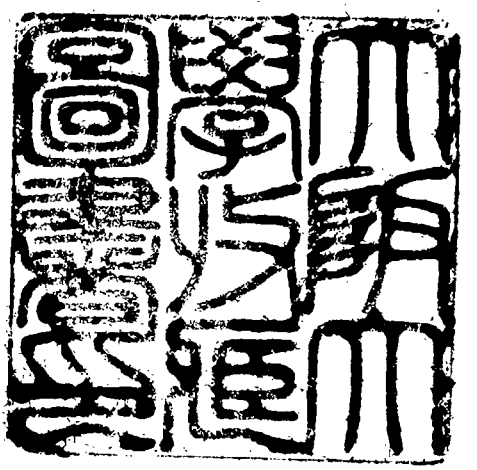
1. Hydroxyethylthiamine にかんする研究(I)　Hydroxyethylthiamine およびその関連化合物の微生物活性

昭和42年2月25日

ビタミン　35巻2号　140頁

# 論文内容の要旨

主論文題名　Thiamine, S—Carbethoxythiamine 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



学位申請者

氏名　篠田純男

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つて 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によつて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つ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つ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℃，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つた。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（Cocarboxylase）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つてＴＤＰがThiamineに変化したものである。Protoplastを調製することによつて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によつ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によつて流出したと考えられる。一方Thiamineまたは T P D 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、T P D を添加したとき T P D 自身は検出されずThiamineのみが菌体内に検出された。T P D 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

C E T および T P D 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つ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C E T または T P D との拮抗を検討した結果C E T は T P D に比べ安定で菌体中に一部C E T として増殖初期に検出されたのみでなく、T P D 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) C E T または T P D を添加して培養した菌体には T D P 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。C E T と T P D は(1)のような相違を示したが、増殖に有効な T D P 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の調製によつて溶出する。多量のＣＥＴを用いたときThiamineに比べ集積が悪いがSimple diffusionによつ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つて現れるものとして説明できる。

# Thiamine, S-Carbethoxythiamine 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

篠　田　純　男

# 目　　次

緒　　論

第1章　Thiamine, S-Carbethoxythiamine および Thiamine propyl disulfideのKl.apiculata にたいする増殖促進性 …… 3 ～ 12

第1節　Thiamine, S-Carbethoxythiamine および Thiamine propyl disulfide の Kl.apiculata にたいする増殖促進性の比較 …… 3 ～ 5

第2節　S-Carbethoxythiamine と Thiamine propyl disulfide の作用機序の相違 …… 6 ～ 10

第3節　考察ならびに小括 …… 11 ～ 12

第2章　Kl.apiculata における Thiamine 誘導体と Thiamine 拮抗体の関連 …… 13 ～ 20

第1節　Thiamine 誘導体と Pyrithiamine の拮抗 …… 13 ～ 14

第2節　Thiamine 誘導体と Oxythiamine の拮抗 …… 15 ～ 18

第3節　考察ならびに小括 …… 19 ～ 20

第3章　Thiamine, S-Carbethoxythiamine または Thiamine propyl disulfide 添加培養菌の菌体中の Thiamine の存在型の変化 …… 21 ～ 26

第1節　菌体中 Thiamine ならびに Thiamine diphosphate 量の変化 …… 21 ～ 24

第2節　考察ならびに小括 …… 25 ～ 26

第４章　Kl.apiculataによるThiamineおよび
Thiamine誘導体の集積……27 ～ 47
第１節　Kl.apiculataによるThiamineの集積……27 ～ 36
第２節　Kl.apiculataによるThiamineおよび
Thiamine diphosphateの集積……37 ～ 38
第３節　Thiamine, Thiamine propyldisulfide
またはS-Carbethoxythiamineの集積……39 ～ 41
第４節　考察ならびに小括……42 ～ 47
第５章　総括および結論……48 ～ 53
第１節　総　　括……48 ～ 51
第２節　結　　論……52 ～ 53

# 緒　　論

近年多くのThiamine誘導体が合成され実用化されてきたが、Thiamine誘導体のいくつかは増殖にThiamineを要求する微生物（乳酸菌、酵母、糸状菌など）にたいして対応量のThiamine以上の増殖促進効果を示すことが報告されている[(1)〜(4)]。しかしThiamineより強い効果がいかなる原因で発揮されるかについては未だ十分には解明されていない。Thiamine propyl disulfide（TPD）に代表される非対称Disulfide型誘導体は上記の微生物にたいしてThiamineより強い増殖促進効果を示すものが多く、当初Thiamineから分離されて生じるAlkylmercapto化合物が増殖を促進するのではないかと考えられたが、培地にThiamineとAlkylmercapto化合物との添加はThiamine単独添加にくらべ増殖に差を生じない[(5)(6)]。Thiamine誘導体はThiamineにくらべ水溶液中での安定度が高く、このためオートクレーブ処理あるいは培養中に分解される量が少ないためThiamineより高い活性を示すという推論も成り立つが、オートクレーブ処理を省略した場合でもやはり活性は高く、培養後の菌体のThiamine含量を比較するといずれを添加しても大差ないことからこの推論も否定された。TPDその他のThiamine誘導体は赤血球その他の動物細胞にThiamineより容易に透過することは多くの著者により報告されているが[(7)〜(11)]、乳酸菌[(6)(12)]、大腸菌[(13)]、酵母[(14)(17)]によるThiamine誘導体のとりこみはThiamineと同等もしくはそれ以下でとりこみ量の差からもThiamine誘導体の強い活性の原因を解明することはできない。　しかしThiamineとThiamine誘導体は構造的にかなり異なり、とりこみの機構あるいはとりこまれたThiamineの存在部位などが両者で異なると思われ、この点が活性の差となつてあらわれることが予想される。Kloeckera apiculata（IFO 0630）はThiamine要求性の酵母であるが、Thiamine誘導体をも

利用することができる。[3][4] 乳酸菌Lactobacillus fermentiがCysteineその他の還元性物質を培地に添加したときのみThiamine誘導体を利用し得るのにたいして本酵母はそのような物質の添加なしにThiamine誘導体を利用することが可能である。特にL.fermenti,[18] Escherichia coli 70-23,[19] Saccharomyces cerevisiae 7753[20]にたいして非常に活性の弱いS-Carbethoxythiamine(CET)によりThiamineより強く増殖が促進されるのは興味ある点である。著者はTPDおよびCETの2種のThiamine誘導体を中心としてKl.apiculataにたいする増殖促進性およびその作用機序について検索したので詳述する。

本文中には以外の略語を使用した。

CET : S-Carbethoxythiamine

TPD : Thiamine propyl disulfide

CBT : S-Carbobutoxythiamine

DCET : O, S -Dicarbethoxythiamine

TTFD : Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide

TATD : Thiamine -8-(methyl-6-acetyldihydrothioctate) disulfide

BTMP : S-Benzoylthiamine-O-monophosphate

SBT : S-Benzoylthiamine

TDS : Thiamine disulfide

TDP : Thiamine diphosphate

TMP : Thiamine monophosphate

μg Eq : Equivalent to μg thiamine

MB : Methylene blue

# 第1章　Thiamine, s-Carbethoxythiamine および Thiamine propyl disulfide の Kl.apiculata にたいする増殖促進性[21][22]

## 第1節　Thiamine, CET および TPD の Kl.apiculata にたいする増殖促進性の比較

### 実　験　方　法

(1)　Kl.apiculata の培養

Hoff-Jørgensen の変法培地（Tab. 1）を基礎培地として用いた。特に記した場合以外は基礎培地2mlをオートクレーブにて0.75Kg/cm²で滅菌し、無菌的に調製した試料液および無菌蒸留水を加えて全量4mlとし、前培養した Kl.apiculata の生理食塩水けん濁液を注射針より1滴加え30℃20時間静置培養した。

Tab. 1 Basal Medium for the Cultivation of Kl.apiculata (Double Strength)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Casamino Acids (Vitamin free) | 0.5g | Choline-HCl | 400 μg |
| Glucose | 4 g | Nicotinic Acid | 100 μg |
| Salt E* | 10 ml | Pyridoxine-HCl | 100 μg |
| 15% Na-Citrate-$5H_2O$ Solution | 5 ml | Ca-Pantothenate | 100 μg |
| 2% L-Asparagin Solution | 2 ml | Biotin | 1 μg |
| meso-Inositol | 2 mg | | |

Adjust the pH to 4.7 and add water to make 100 ml.

＊ Dissolve 22g $KH_2PO_4$, 17g KCl, 10g$(NH_4)_2SO_4$, 4g $CaCl_2$, 4g $MgSO_4$–$7H_2O$, 0.1g $FeCl_3$, 0.1g $MnSO_4$ and 10ml conc. HCl in water to make 1,000 ml.

(2) 濁度の測定

日立光電比色計またはコタキ光電比色計を用いて波長 610 mμにおいて測定した。

(3) 菌体重量の測定

培養液を 3,000 rpm 15分間遠沈して菌体を集め水にて2回洗浄後90℃にて恒量となるまで乾燥し（約2時間）秤量した。

(4) タンパク質量の測定

乾燥した菌体を秤量後Kjeldahl法により窒素量を求め、この値に6.25を乗じてタンパク質量とした。

(5) 菌数の測定

Thoma の血球計算盤を用いて測定した。

実 験 成 績

(1) 各誘導体の増殖促進性の比較－1（Fig. 1,2）

濁度測定法によるTPD，CET，CBTおよびDCET の増殖促進性をThiamineと比較し図示した。CET および TPD を添加した場合には対応量のThiamineを添加したときより高いO.D. を示したが（Fig.1）CBT およびDCETはCETとの構造的類似にもかかわらずThiamineより低い活性しか示さなかつた。（Fig. 2）

(2) 各誘導体の増殖促進性の比較－2（Tab. 2,3）

Thiamine，TPD および CET の増殖促進性を濁度、乾燥菌体重量、

Fig.1 **The Growth Stimulating Activity of Thiamine Derivatives on Kloeckera apiculata**

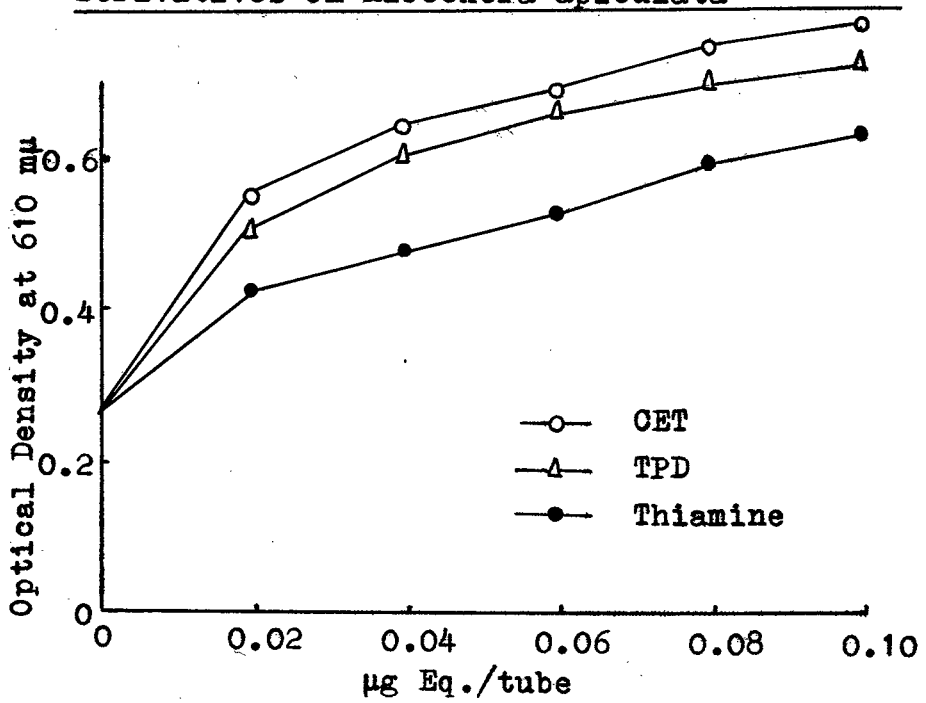
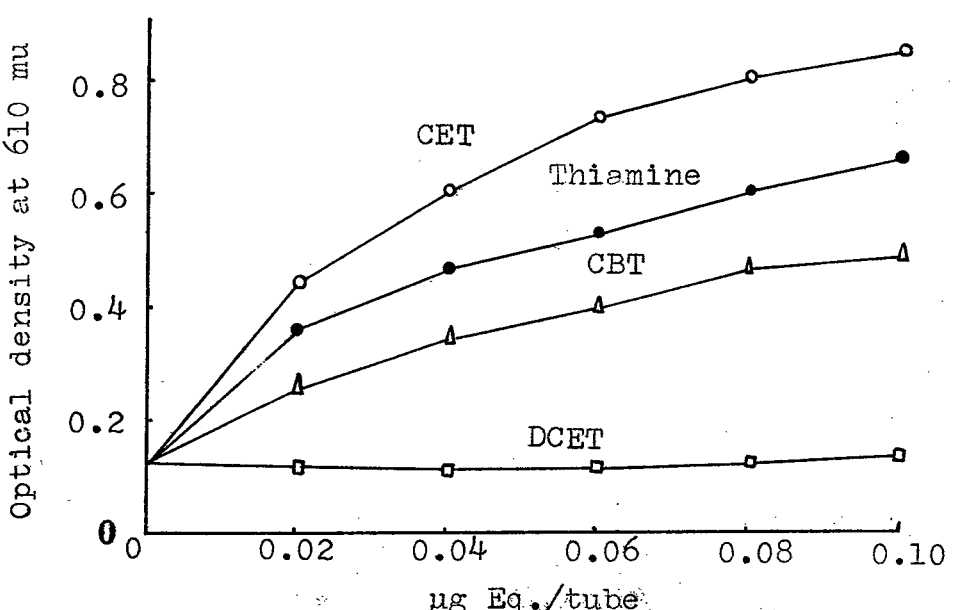



Fig.2 The Growth Stimulating Activity of Thiamine Derivatives on Kloeckera apiculata



Tab. 2 Optical Density, Cell Counts and Dry Weight of Cells after the Cultivation with Thiamine, CET or TPD

Concentration of samples: 0.5 μg Eq./40 ml

| | O.D. | Cell counts $\times 10^7$ cells/ml | Dry weight mg/ml |
|---|---|---|---|
| Thiamine | 0.527 | 4.01 | 0.23 |
| CET | 0.787 | 7.25 | 0.39 |
| TPD | 0.680 | 5.54 | 0.32 |

Tab. 3 Optical Density, Dry Weight and Protein Contents of the Cells after Cultivation with Thiamine or CET

Concentration of samples: 0.5 μg Eq./40 ml

| | O.D. | (A) Dry weight mg | (B) Protein mg | B/A |
|---|---|---|---|---|
| Thiamine | 0.83 | 14.6 | 8.5 | 0.57 |
| CET | 1.17 | 27.2 | 14.7 | 0.55 |

菌数およびタンパク質量の測定結果から比較し表示した。いずれの測定法を用いた場合にもＣＥＴ，ＴＰＤを添加した場合の増殖度はThiamineのそれよりも高い値であつた。また菌体重量を菌数で除した値およびタンパク質量を菌体重量で除した値は常に一定値を示した。すなわち菌の平均の大きさあるいは菌体構成分の組成には差がないと思われる。

## 第2節　TPDとCETの作用機序の相違

第1節に記したようにＴＰＤとＣＥＴはともにKl.apiculata にたいしてThiamineより強い増殖促進性を示すが、両者のThiamineへの還元性に大きい差がある。すなわちＴＰＤはCysteine, チオ硫酸ナトリウムなどの還元剤により容易にThiamineに変化するのにたいしてＣＥＴは還元剤の作用を受けず、酵素的にThiamineに変化し、動物組織による両者のThiamineへの変化速度にも大きな差がみられる。[24][25] この両者の菌体での活性機序について比較検討を行なつた。

### 実　験　方　法

(1)　Thiamine，ＣＥＴまたはＴＰＤを集積した酵母の培養

Thiamine量を制限した培地で培養して得られた菌体３０ mgを生理食塩水にけん濁し、0.0１Ｍ酢酸緩衝液にて pH 4.7としThiamine，ＣＥＴまたはＴＰＤ１０μg Eq. を加え３０℃１時間保温したところ添加されたThiamineもしくは誘導体はほぼ完全に菌体に集積されたので、これに培地を加えて４ ml 中に０～0.１μg Eq.のThiamineまたは誘導体を含むよう希釈し３０℃，２０時間培養後O.D.の測定を行なつた。

(2)　菌体抽出液のBioautography

菌体を生理食塩水で２回洗浄し0.１Ｎ塩酸で９０～９５℃、５分間抽出し、抽出液を東洋沪紙No.５０につけ　酢酸：ｎ－ブタノール：水＝１：４：５を展開溶媒として１夜展開し、風乾後沪紙を１０等分し各沪紙片を基礎培地に投入しKl.apiculata を接種して３０℃２０時間培養後増殖度を測定した。

(3) Cysteine処理後のThiamineまたはＴＰＤの増殖促進性

培地に終濃度５０mg％となるようにCysteine塩酸塩を加え、各量のThiamineまたはＴＰＤを添加し６０℃，３０分間保温し、冷後 Kl. apiculata を接種し３０℃，２０時間培養後増殖度を測定した。

(4) Takadiastase 処理後のThiamineまたはＣＥＴの活性

培地に終濃度２５０mg％となるようTakadiastase Ｂを加え、Thiamineもしくは ＣＥＴを加えて３７℃２４時間保温後１００℃，１５分間滅菌し、冷後Kl.apiculata を接種し３０℃，２０時間培養後増殖度を測定した。

(5) Kl.apiculataの同調培養法

N.Sando[26]，T.Yanagida[27]らの方法を参考として次の操作を行つた。Kl.apiculata の生理食塩水浮遊液を1,５００rpm，５分間遠沈する操作を８回繰返すことによつて菌の大きさをそろえ、得られた菌体を培地に高濃度（$10^9$ cells/ml）にけん濁させ３０℃，2時間保温したのち試料を含む培地で１００倍に希釈し３０℃で振とう培養を行なつた。１５分ごとに培養液４ml を分取し濁度の測定ならびに菌数の測定を行なつた。

## 実　験　成　績

(1) ThiamineまたはＣＥＴ集積菌の増殖度（Fig. ３）

ThiamineまたはＣＥＴを集積した菌体の２０時間静置培養後の増殖度をFig.3 に示した。Fig.1 の場合と同様ＣＥＴ添加時の増殖度はThiamine添加時よりも高く、ＣＥＴは生理食塩水中で菌体に集積されたときにもThiamineより高い増殖促進性を示した。

(2) ＣＥＴ添加培養時の菌体中存在型の検索（Fig. 4,5）

ThiamineまたはＣＥＴを集積した菌体を振とう培養し増殖度を継時的

に測定すると約5時間の培養で増殖度の差があらわれた（Fig.4）。

Fig.4 においてＣＥＴを添加して培養して得られた菌体の抽出液のBioautographyを行なうと培養開始後3時間の菌体にはＣＥＴが認められ、ＣＥＴはそのままの型で菌体にとりこまれていることが示された。

（Fig.5）

Fig.3 Growth of Kl.apiculata after the Accumulation of Thiamine or CET

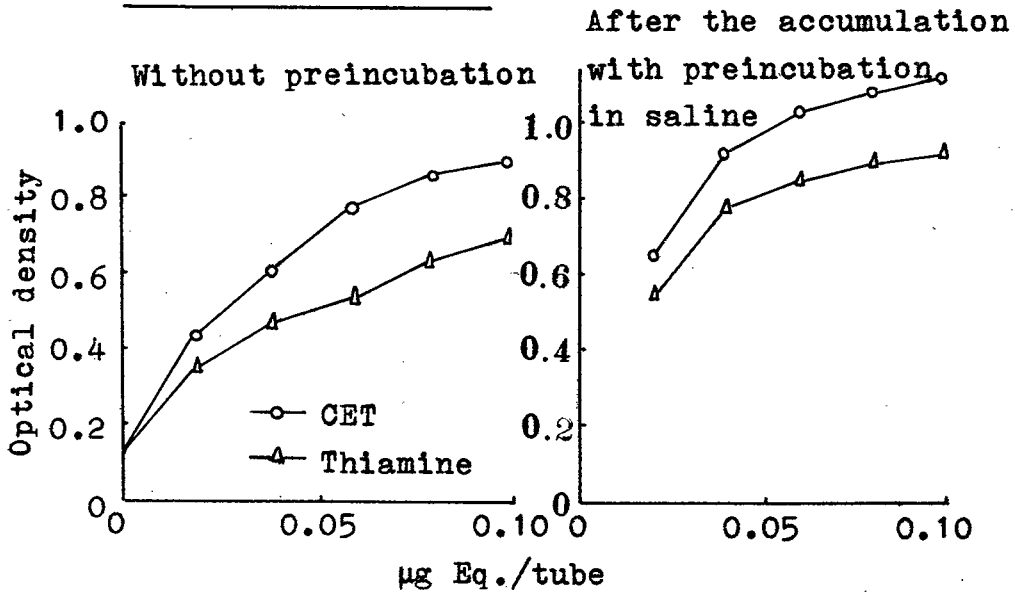



Fig.4 Growth of Cells Accumulated with Thiamine or CET

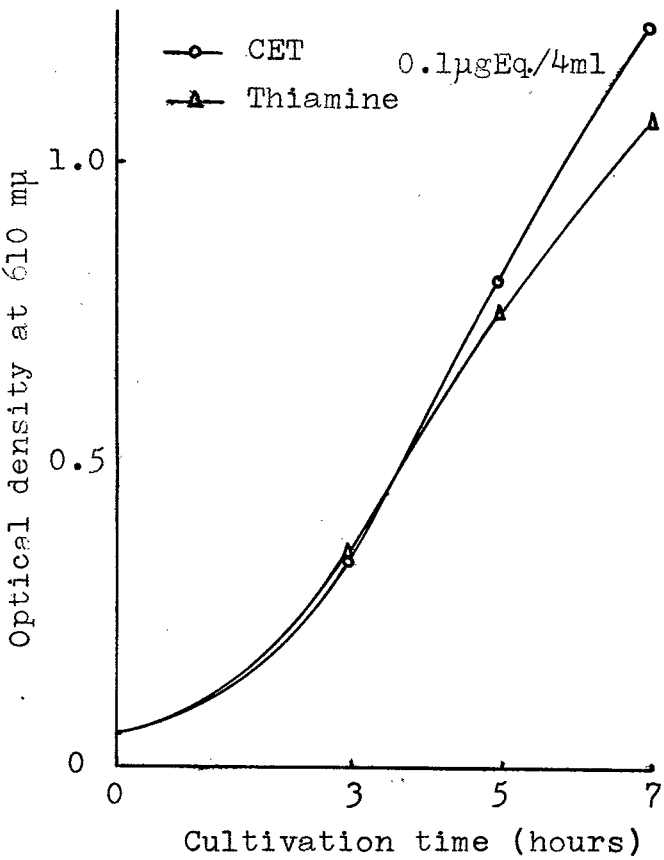
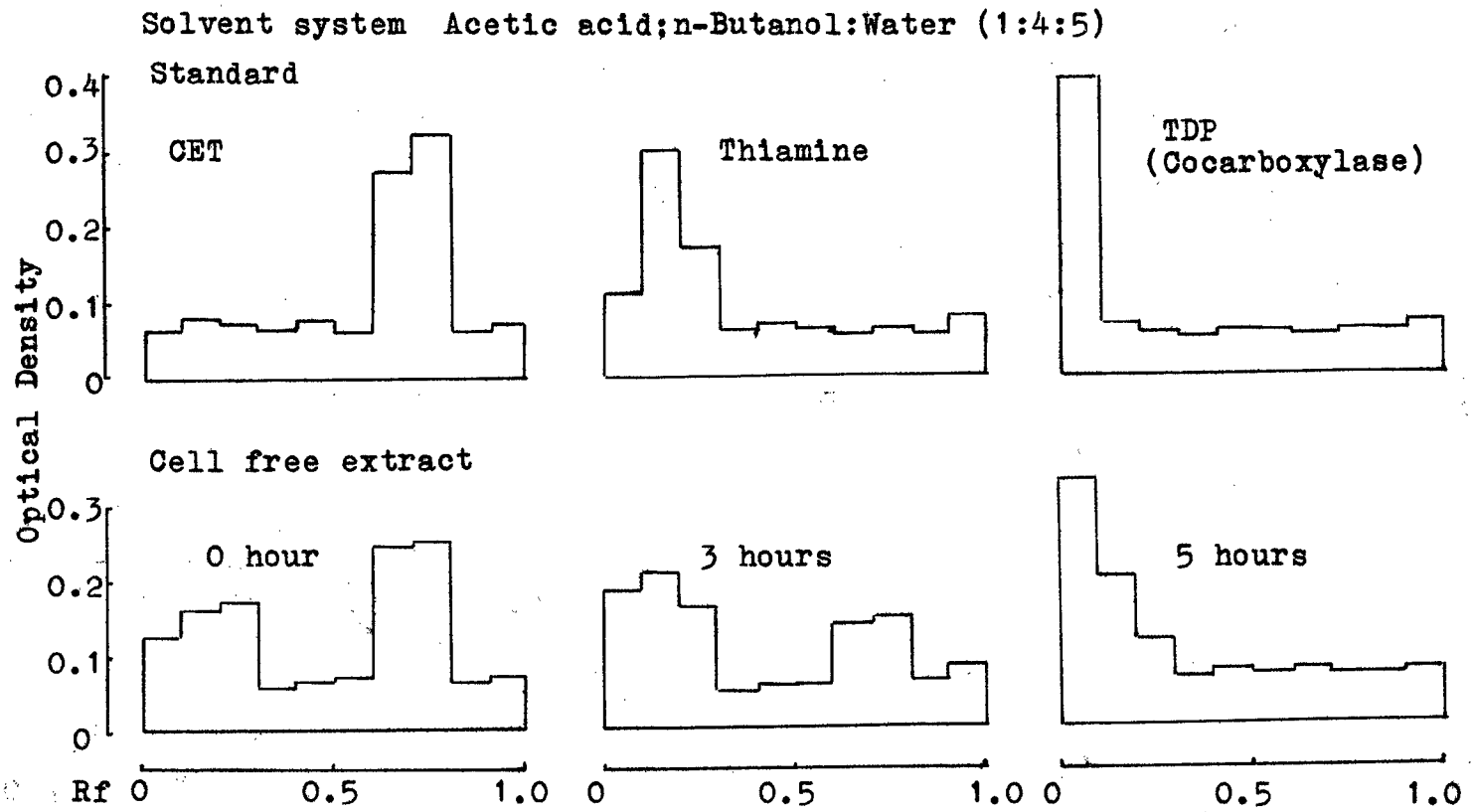


Fig.5 **Bioautography of Cell Free Extract of Kl.apiculata Cultured with CET**



g.6 Growth of Kl.apiculata after the Accumulation of Thiamine or TPD

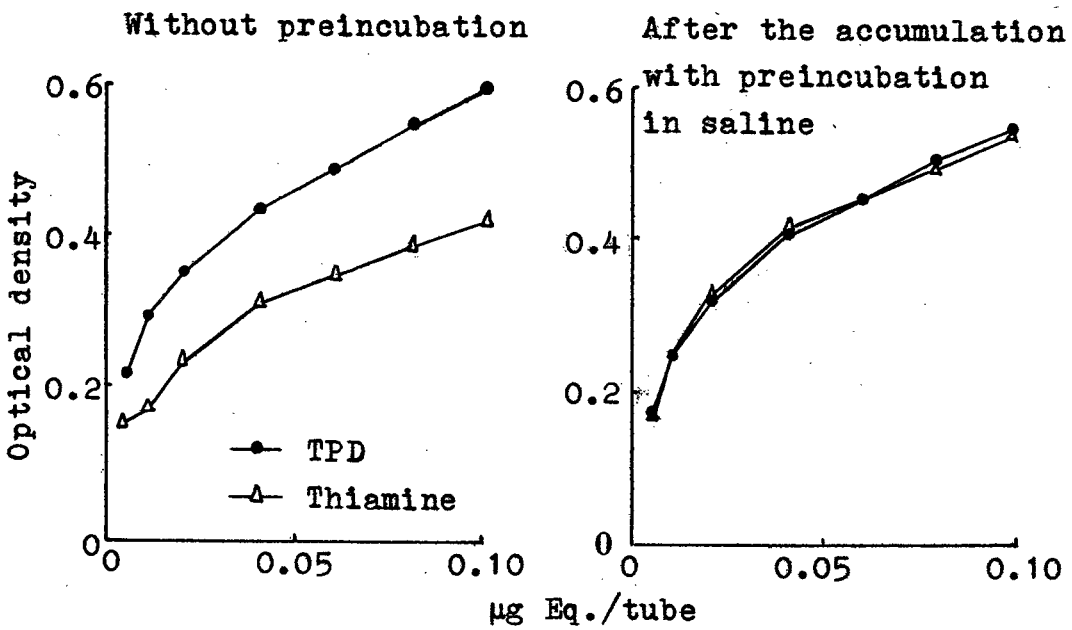



Fig.7 Effects of the Amounts of Inoculated Cells to the Activity of TPD or Thiamine

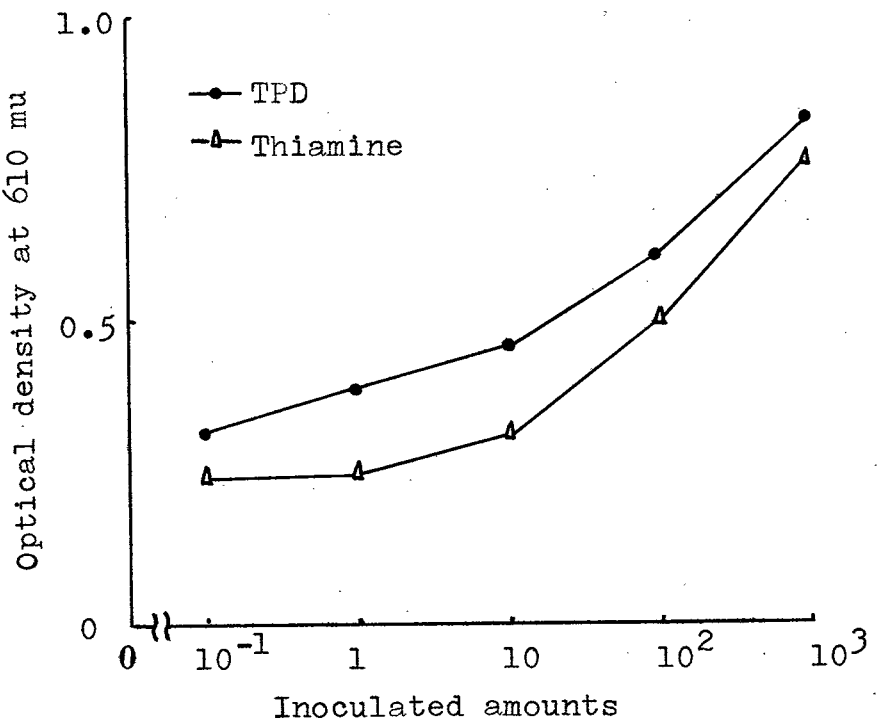


Fig.8 Activity of Thiamine or TPD after Cysteine Treatment on the Growth of Kl.apiculata

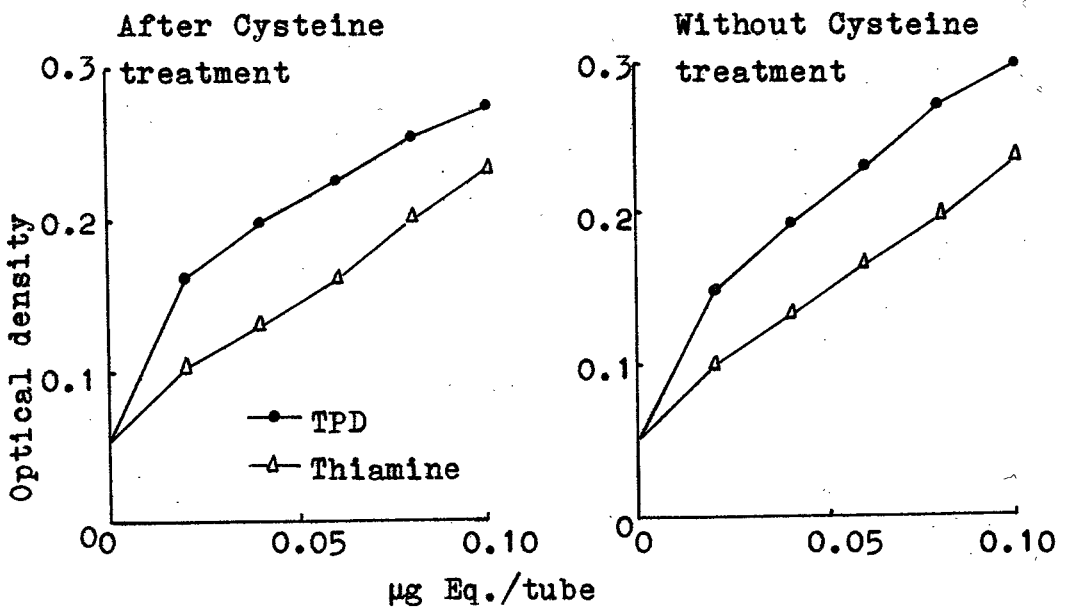
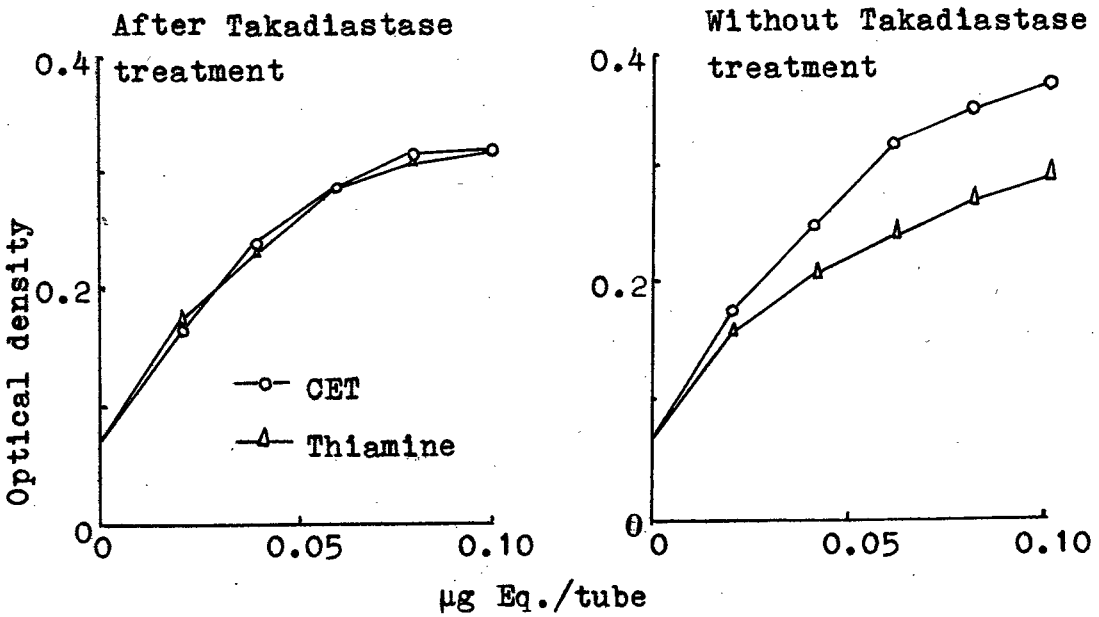



Fig.9 Activity of Thiamine or CET after Takadiastase Treatment on the Growth of Kl.apiculata



(3) ThiamineまたはＴＰＤ集積菌の増殖度（Fig. 6）

ＴＰＤを生理食塩水中で集積した菌の培養を行なうとThiamineと同一の増殖曲線が得られた（Fig.6）。なおＴＰＤは生理食塩水中で菌体に集積されたときすでに完全にThiamineに変化していた。

(4) ＴＰＤの増殖促進性におよぼす接種菌量の影響（Fig. 7）

Fig.6 の場合の接種菌量は通常の培養時の約$10^2$倍に相当する。接種菌量が多いためにThiamineと同程度の活性しか示さなかつたということが考えられるのでThiamineまたはＴＰＤ0.005 μgEg.含む培地に通常の培養時の$10^{-1}$～$10^3$倍の菌量を接種して培養すると接種菌量の多少にかかわらずＴＰＤはThiamineより強い増殖促進性を示した（Fig.7）。(3)の実験でＴＰＤがThiamineと同等の活性しか示さなかつたのは接種菌量の影響ではない。

(5) Cysteine処理後のThiamineおよびＴＰＤの増殖促進性（Fig. 8）

培地中でCysteine処理を行なつてＴＰＤをThiamineに変化させたのちに菌を接種したときの増殖度をThiamineにたいして同処理を行なつた場合の増殖度と比較した。ＴＰＤはCysteine処理をしない場合と同様Thiamineより高い活性を示した（Fig.8）。なお同条件でＴＰＤ 1 μgEqをCysteine処理したところ完全にThiamineに還元されたので上記実験でＴＰＤは菌を接種する以前にThiamineに変化していたことは明らかである。

(6) タカジアスターゼ処理後のThiamineまたはＣＥＴの増殖促進性(Fig.9)

ＣＥＴはタカジアスターゼ処理によつてThiamineに変化するが[23][29]、このような処理をしたのちにはＣＥＴはThiamineと同等の増殖促進性を示した（Fig.9）。

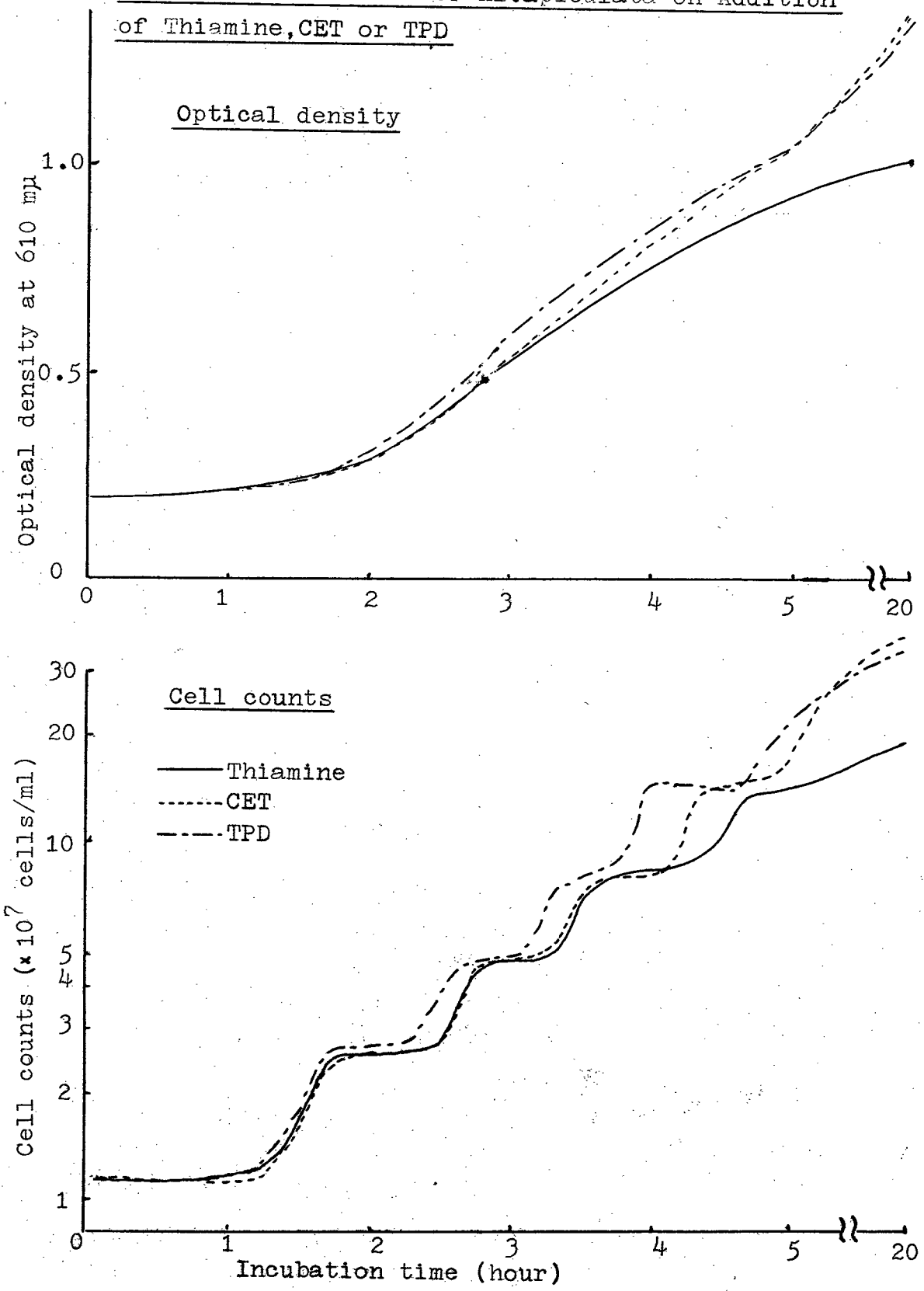
すなわちＴＰＤは菌との接触以前にThiamineに変化していてもなお

Thiamineより高い増殖促進性を示したが、ＣＥＴがThiamineより高い増殖促進性を示すためには菌との接触時にＣＥＴの型であることが必要と思われる。

(7) Kl.apiculataの同調培養におよぼすThiamine，ＴＰＤまたはＣＥＴの影響（Fig.10）

Thiamine．ＴＰＤまたはＣＥＴを添加して同調培養を行なうといずれを添加した場合も約１時間の誘導期ののち菌数が増加したがＴＰＤを添加したときには２回目の分裂がThiamineまたはＣＥＴを添加したときより早く起り、ＣＥＴを添加した場合Thiamine添加と同様に増殖するが４回目の分裂付近でThiamineとの差が顕著にあらわれた（Fig.10）。すなわちＴＰＤとＣＥＴは共に菌の一世代を短縮するがＴＰＤは対数増殖期の初期、ＣＥＴは対数増殖期の後期の増殖を促進するという違いがみられた。

Fig.10 Synchronized Culture of Kl.apiculata on Addition of Thiamine, CET or TPD



## 第3節　考察ならびに小括

### 考　　察

ＴＰＤおよびＣＥＴが対応量のThiamineに比べより強くKl.apiculataの増殖を促進することは第１節に示したように濁度、菌体重量、タンパク質および菌数の測定結果から、また第２節に示したように同調培養の成績から明らかである。ただし両者のKl.apiculata にたいする感度は異なつており第２節に示したようにＣＥＴを培地中でタカジアスターゼによつてThiamineに還元したのち接種するとKl.apicuiataはThiamine 添加時と同じ増殖度を示すが、ＣＥＴを生理食塩水中で菌体に集積させこれを培地に入れて培養するとThiamineより高い増殖度を示した。また培養初期には菌体内に一部ＣＥＴの型で残存することが確認された。ＣＥＴは培地の有無にかかわらずＣＥＴの型のまま菌体内に透過することによつてThiamineより強い増殖促進性を示すと考えられる。一方ＴＰＤは速やかにThiamineに還元されＴＰＤの型は検出されず、菌体との接触により容易にThiamineに還元される。また培地中でCysteineによりThiamineに還元したのちに接種してもKl.apiculataはThiamine添加時より高い増殖度を示した。また生理食塩水中で菌体に集積せしめこれを培地に加えて培養するとThiamineと同等の増殖促進性しか示さないことから培地の存在下でThiamineに変化することがThiamineより高い増殖促進性を示すために必要と思われる。Thiamine，ＣＥＴ，ＴＰＤを添加してKl.apiculata の同調培養を行なうとＴＰＤは対数増殖期の初期、ＣＥＴは後期に有効であつた。これはＴＰＤとＣＥＴのThiamineへの変化速度に関連するものであろう。以上のようにＣＥＴとＴＰＤはそれぞれ異なつた機構でThiamineより強い増殖促進性を示すと考えられる。

## 小　　括

ＣＥＴおよびＴＰＤはKl.apiculata の増殖を対応量のThiamineより強く促進するがその作用には次のような差がみられた。

(1) 生理食塩水中で菌体に集積せしめこれを培地に加えて培養したときの増殖促進性はＣＥＴはThiamineより高かつたのにたいしてＴＰＤはThiamine と同等であつた。

(2) 培養初期においてＣＥＴは一部そのままの型で菌体内に検出されたがＴＰＤはそのままでは検出されず速やかにThiamineに変化していた。

(3) 培地中でThiamineに還元したのち菌を接種して培養したときの増殖促進性はＣＥＴはThiamineと同等であつたのにたいしてＴＰＤはCysteine還元を行なつたのちもThiamineより高い値を示した。

(4) Kl.apiculata の同調培養を行なうとＴＰＤは対数増殖期の初期、ＣＥＴは後期にThiamineの増殖促進性との差を開いた。

# 第2章　Kl.apiculataにおけるThiamine誘導体とThiamine拮抗体の関連

Kl.apiculata におけるThiamineとThiamine拮抗体との関連についてはSakuragi[31]，川崎ら[32][33]により報告されているが、Thiamine誘導体については検討されていない。ＴＰＤおよびＣＥＴの増殖促進性がThiamine拮抗体によりいかなる影響をうけるかを検討した。

## 第1節　Thiamine誘導体とPyrithiamineの拮抗

### 実　験　方　法

基礎培地2 mlにThiamine誘導体溶液1 mlおよびPyrithiamine溶液1 mlを加え、Kl.apiculata を接種して30℃，20時間培養後610 mμ における濁度を測定した。

### 実　験　成　績

(1)　Thiamine誘導体の増殖促進性におよぼすPyrithiamineの影響

（Fig.11）

0.005 μgEq.のThiamine誘導体にたいして各量のPyrithiamine を添加したときの増殖阻害曲線（Fig.11）を示した。Pyrithiamine が存在しないとき各誘導体の増殖促進性はThiamineより高いが Pyri－thiamineの添加によりその増殖促進性は強く阻害された。

(2)　Thiamine誘導体にたいするPyrithiamineの抑制比（Tab. 4）

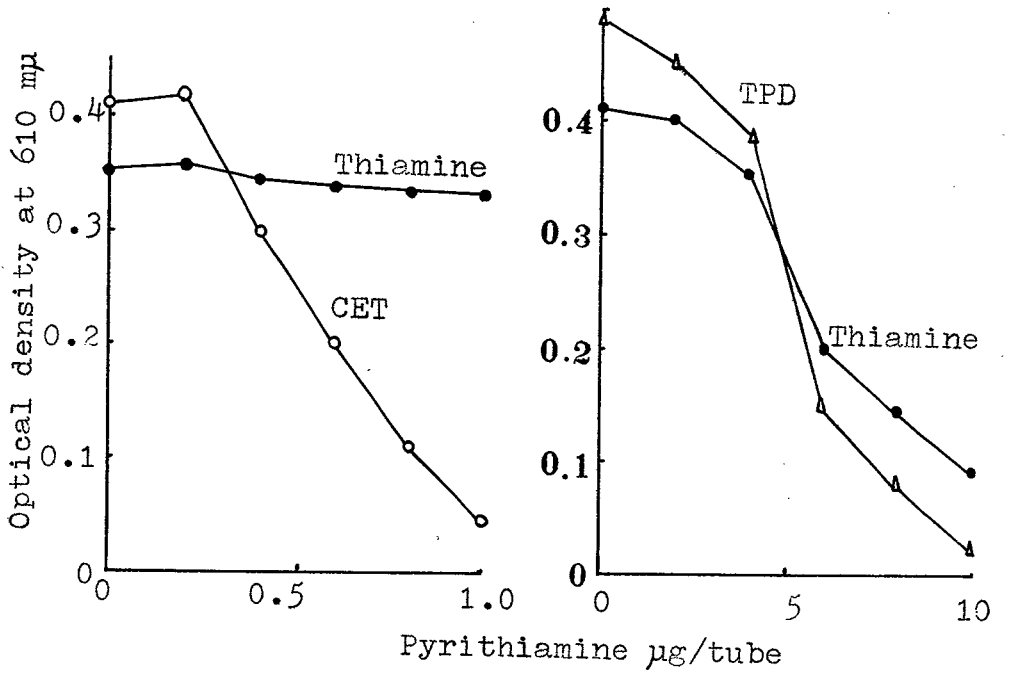
同様な実験を他の数種の誘導体についても行ない次式にしたがってPyri－thiamine による抑制比をThiamine等量比で算出しその結果をTab.

4に示した。

$$\text{抑制比} = \frac{50\%\text{阻害に要する Pyrithiamine 量}\ (\mu\text{gEq})}{\text{Thiamine または Thiamine 誘導体量}\ (\mu\text{gEq})}$$

Thiamineにたいする Pyrithiamine の抑制比は60で Sakuragi,[31] 川崎ら[33]の報告した値に一致した。TPDおよびその他の Disulfide 型誘導体にたいする抑制比は Thiamineにたいする抑制比に近い値であつたが、Acyl 型および Carbalkoxy型誘導体にたいする抑制比は Thiamineにたいする抑制比とかなり差があり、Pyrithiamine は Acyl 型および Carbalkoxy 型 誘導体の増殖促進性を強く阻害することが明らかとなつた。

Fig.11 The Influence of Pyrithiamine to the Growth Stimulation of Thiamine Derivatives




Tab.4 Inhibition Ratio of Pyrithiamine to Thiamine derivatives

| Compounds | Ratio |
|---|---|
| Thiamine | 60 |
| TPD | 52 |
| TTFD | 51 |
| TATD | 40 |
| TDS | 41 |
| BTMP | 6.1 |
| SBT | 6.3 |
| CET | 5.8 |

## 第2節　Thiamine誘導体とOxythiamineの拮抗[34]

第1節に用いたPyrithiamineは微生物においてもThiamineにたいして強い拮抗作用を示すが、本節に用いるOxythiamineは動物体内では強い拮抗作用を示すにもかかわらず、微生物においては拮抗作用は弱く、Kl. apiculataにおける拮抗比は約20,000と報告されている。[32]

### 実　験　方　法

(1)　Thiamine誘導体の増殖促進性にたいするOxythiamineの影響

第1節においてPyrithiamineの影響を検討した方法を用いた。

(2)　菌体中ThiamineもしくはThiamine誘導体の定量

菌体を生理食塩水にて2回洗浄後0.1N塩酸にて15分間煮沸抽出し、抽出液についてBrCN-Thiochrome法にてThiamine量の定量を行なつた。なおThiamine誘導体を含む抽出液については下記の処理を行なつてThiamine誘導体をThiamineに変化させたのちBrCN-Thiochrome反応を行なつた。

TPD：　検液1mlを酢酸緩衝液にてpH6となし500mg% Cysteine塩酸塩溶液1mlを加えて60℃、30分間保温する。

BTMP：　TPDと同様Cysteine処理を行なつたのち、pH4.5となし1%タカジアスターゼB液1mlを加え50℃、1時間保温する。

CET：　検液1mlにN－NaOH 1mlを加えて水浴中30℃、5分間反応後N－塩酸1.5mlを加えて酸性とする。

(3) 菌体中Oxythiamineの定量

(2)と同様にして得た抽出液をPrebullda法の変法[35]を用いて定量した。

実験成績

(1) Thiamine誘導体の増殖促進性にたいするOxythiamineの影響

(Fig.12)

Thiamine誘導体0.005 μgEqにたいして各量のOxythiamineを添加した場合の増殖阻害曲線(Fig.12)を示したが、本実験に用いたThiamine誘導体はOxythiamineが存在しないときにはThiamineより強い増殖促進性を示すにもかかわらずOxythiamineの添加によりThiamineの場合より強く影響を受けた。

(2) Thiamine誘導体にたいするOxythiamineの抑制比(Fig.13)

Pyrithiamineの場合と同様にして抑制比を計算したが、Thiamineにたいする抑制比と誘導体にたいする抑制比との差はPyrithiamineの場合より顕著であつた(Fig.13)。

(3) Thiamine誘導体の集積におよぼすOxythiamineの影響(Fig.14)

Fig.12,13のように抑制比に大きな差のみられる原因を検索するためThiamineおよび誘導体の菌体へのとりこみにたいしてOxythiamineがいかなる影響をおよぼしているかを検討した。Kl.apiculata 5 mg(乾燥重量)にたいしてThiamine誘導体 5 μgEqおよび各量のOxythiamineを添加しpH 4.7, 30℃1時間後の菌体中Thiamineもしくは誘導体量を測定すると、Thiamineの集積は10,000倍のOxythamineの添加によりはじめて阻害されたのにたいしてThiamine誘導体の集積はそれ以下のOxythiamineの添加により阻害され、増殖促進性にたいする影響と相関関係がみられた。

Fig.12 The Influence of Oxythiamine on the Growth Stimulation of Thiamine-derivatives on Kloeckera apiculata

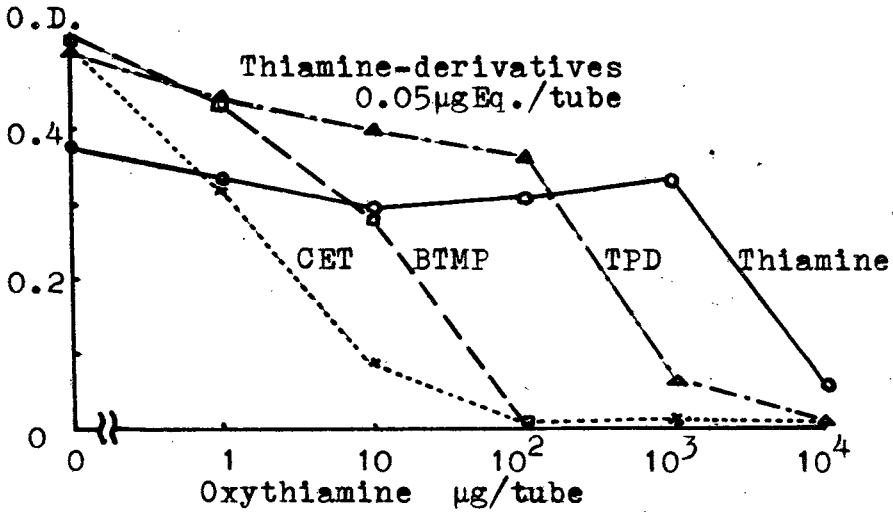
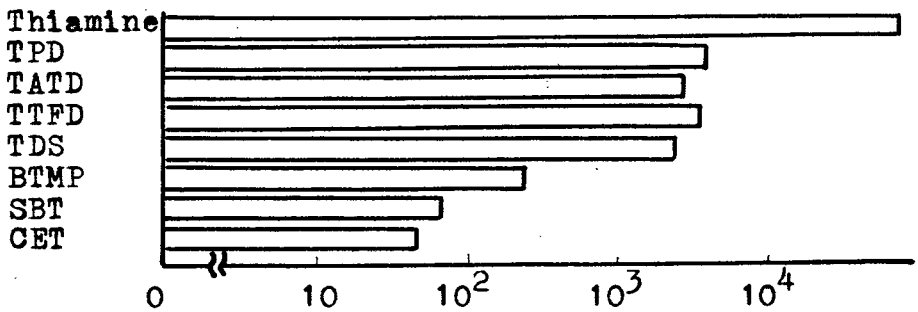



Fig.13 The Inhibition Ratio of Oxythiamine to Thiamine-derivatives on Kl.apiculata




$$\text{Ratio} = \frac{\text{Oxythiamine at 50\% inhibition}}{\text{Thiamine-derivatives}}$$

Fig.14 The Influence of Oxythiamine on the Accumulation of Thiamine-derivatives to Kloeckera apiculata

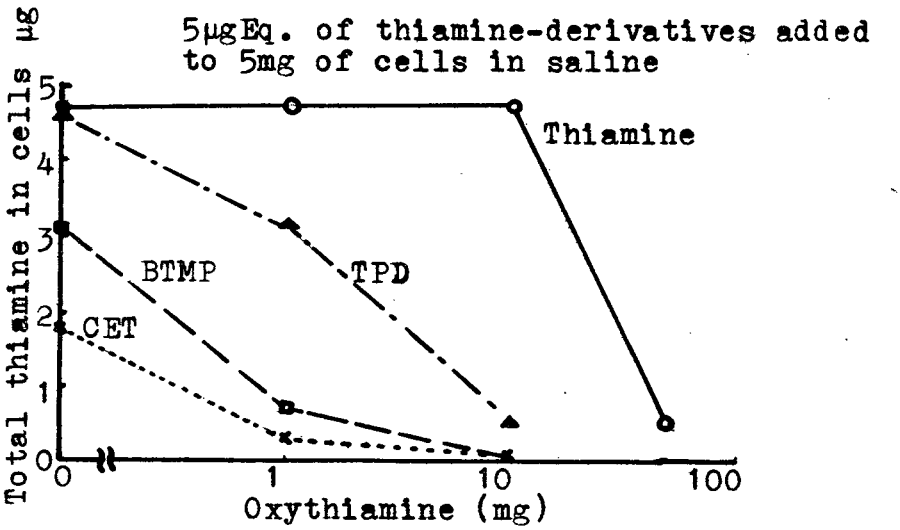
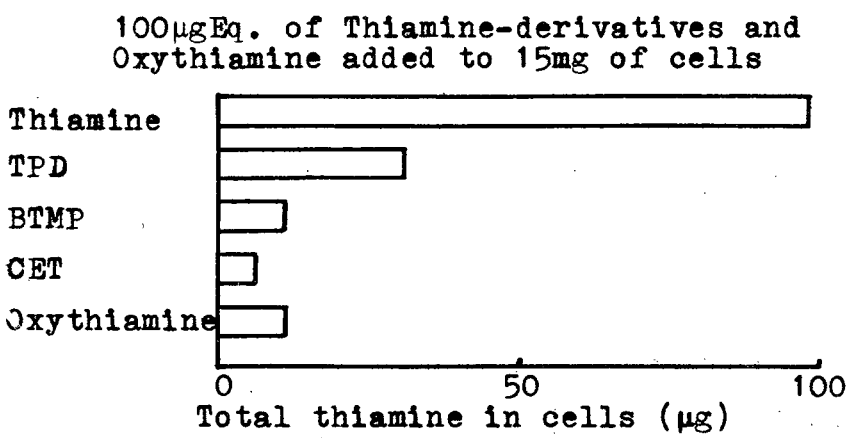



Fig.15 The Accumulation of Thiamine-derivatives and Oxythiamine to Kloeckera apiculata



(4) Thiamine 誘導体および Oxythiamine の集積（Fig.15）

Oxythiamine は Thiamine誘導体の集積を阻害するが、Oxythiamine 自身の集積量を Thiamine および Thiamine誘導体と比較すると Thiamine が最も集積され易く、ついでＴＰＤ，ＢＴＭＰ，ＣＥＴの順となり Oxythiamine はＣＥＴよりやや高い集積量を示した。すなわち Oxythiamine は Kl.apiculata により集積されるが集積量が低いため Thiamine とせり合つたとき Thiamine の集積にたいしてほとんど影響をおよぼし得ないのにたいして、Thiamine より集積量の低い誘導体にたいしては強く影響をおよぼすと考えられる。

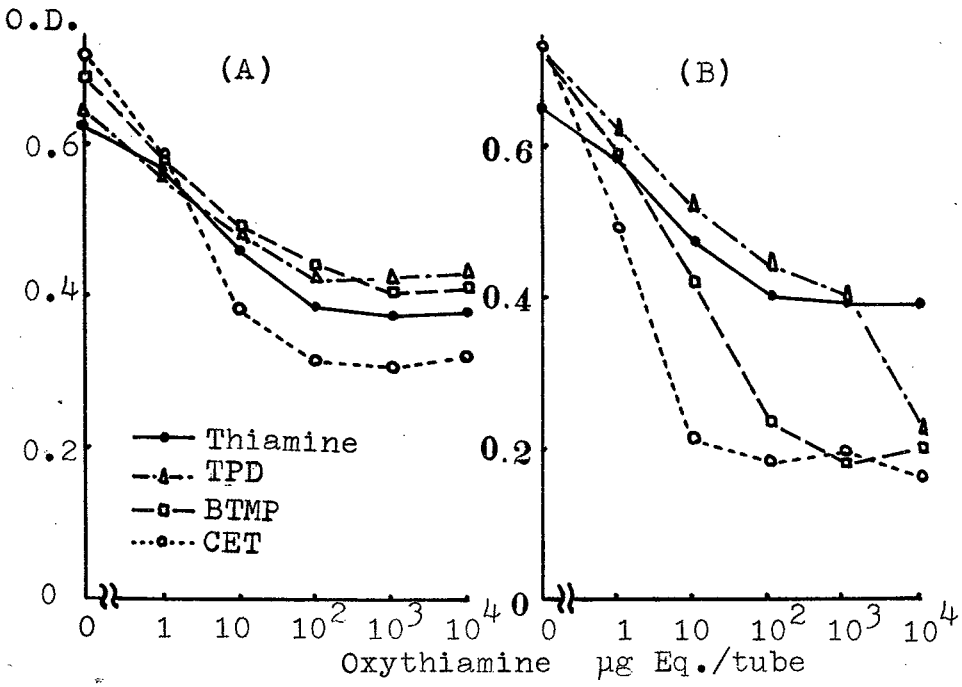
(5) Thiamine 誘導体集積菌の増殖におよぼす Oxythiamine の影響

（Fig.16）

Oxythiamine は Thiamine誘導体の集積を強く阻害するが、あらかじめ菌体に Thiamine誘導体を集積させたのち Oxythiamine を添加したとき、その増殖促進性にたいする影響がどのように変化するかを検討した。Kl.apiculata 30mg に Thiamine 誘導体 5 μgEq を添加し pH 4.7，30℃，1時間保温すると Thiamine誘導体はすべて菌体に集積された。この菌体を希釈して 0.05 μgEq の Thiamine 誘導体を含む菌体を試験管に入れ培地および各量の Oxythiamine を加えて 30℃ 20時間培養後増殖度を測定した（Fig.16A）。また対照として同一菌量にたいして Thiamine 誘導体および Oxythiamine を同時に添加した場合についても検討した（B）。Thiamine誘導体と Oxythiamine を同時に添加したとき各誘導体にたいする Oxythiamine の影響には差がみられたが、あらかじめ菌体に Thiamine誘導体を集積させたのち Oxythiamine を添加した場合ＣＥＴがやや影響を受け易かつたがＢＴＭＰおよびＴＰＤは Thiamine

と同様な態度を示した。したがつて Thiamine 誘導体の増殖促進性にたいする Oxythiamine の影響に差のみられる第1の原因は Thiamine誘導体の菌体による集積におよぼす Oxythiamine の影響の差であろう。

Fig.16 The Influence of Oxythiamine on the Growth of Kl.apiculata with Thiamine or its Derivatives




(A) Yeast cells containing 0.05μg thiamine or its equivalent derivatives

(B) The same amount of yeast cells in the broth containing 0.05μg thiamine or its derivatives

## 第3節　考察ならびに小括

### 考　　察

Thiamine誘導体のうちＣＥＴ，ＴＰＤおよびＢＴＭＰを選んで Kl. apiculata におけるOxythiamine およびPyrithiamine との拮抗をしらべたが、一般的にこれらのThiamine誘導体はThiamineに比べ Oxythiamineおよび Pyrithiamine による抑制作用をより強く受けた。この現象はOxythiamineの場合特に顕著にみられＣＥＴはThiamineの場合の１／1,０００のOxythiamineにより抑制作用を受けた。このことはＣＥＴその他のThiamine誘導体がThiamineに還元される前にThiamine拮抗体の影響を受けることを意味する。その一つとしてThiamineまたはその誘導体の膜透過にたいする影響[36]～[39]が考えられる。Thiamineを菌と接触させるときOxythiamine を添加するとThiamineの集積は１0,000倍のOxythiamineの添加によりはじめて阻害されたのにたいして、Thiamine誘導体の集積にたいしてはOxythiamineの阻害が容易に現われ、増殖促進性にたいする抑制作用と相関関係がみられた。あらかじめ菌体にThiamine誘導体を集積させたのちOxythiamineを添加して培養したときの阻害をみるとＴＰＤ，ＢＴＭＰにたいするOxythiamineの抑制作用はThiamineにたいするそれとほぼ同程度であつた。このことはＴＰＤ，ＢＴＭＰが菌体内で容易にThiamine に変化するためであつて、Oxythiamineが存在するときＴＰＤおよびＢＴＭＰが菌体に集積されてThiamineに変化することができないため強い抑制作用を受けたと考えられる。ＣＥＴについて同処理を行なつたとき抑制作用は回復されたがＴＰＤ，ＢＴＭＰのように完全には回復されなかつた。ＣＥＴは菌体に集積されにくくThiamineへの変化速度も緩やかなためこのような差を生じたのである。以上のことからOxythiamineがThiamine誘

導体の菌体による集積を強く阻害するためThiamineへの還元が抑制され、増殖促進性が抑制されたと考えられる。

## 小　　括

(1) Pyrithiamine およびOxythiamine はＣＥＴ，ＴＰＤ，ＢＴＭＰの Kl.apiculata にたいする増殖促進性をThiamineの増殖促進性より強く抑制した。

(2) Oxythiamine はThiamine誘導体の集積をThiamineの集積よりも強く阻害した。

(3) Thiamine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ＴＰＤ，ＢＴＭＰは菌体内で容易にThiamineに変化するのでOxythiamine による抑制作用はThiamineの場合と同等であつたが、ＣＥＴはThiamineへの変化が緩やかなためやや強い抑制作用を受けた。

(4) 以上から増殖促進性にたいするOxythiamine の影響の差の原因は菌体への集積段階における影響の差にあると推定した。

# 第3章　Thiamine，S－Carbethoxythiamine または Thiamine Propyl disulfide 添加培養菌の菌体中 Thiamine の存在型の変化[40]

第1章に記したようにＣＥＴ，ＴＰＤを添加して培養したときＣＥＴ，ＴＰＤは菌体中でThiamineに変化する。Thiamineは生体内ではリン酸化されてＴＤＰに変化し酵素系に組入れられて補酵素としての作用を示し、Free thiamineの型では作用を示すことができない。したがつて菌体中のＴＤＰ含量が高まればその菌の増殖が高まると考えられる。乳酸菌や大腸菌にとりこまれたThiamineは菌体内ではすべてＴＤＰに変化するが酵母の場合には常にFree thiamineが菌体中に検出される。ＣＥＴ，ＴＰＤを添加して培養したとき菌体中ＴＤＰ含量がThiamine添加の場合より高くなることが考えられるのでThiamine，ＣＥＴまたはＴＰＤを添加して培養した菌体中のThiamine含量ならびにその存在型について検討を行なつた。

## 第1節　菌体中 Thiamine ならびにＴＤＰ量の変化

### 実　験　方　法

(1)　菌体中 Thiamine およびＴＤＰ量の定量

菌体を生理食塩水で2回洗浄後0.1Ｎ塩酸にて15分間煮沸抽出し抽出液を直接BrCN－Thiochrome法にて定量することによりFree thiamine量を求め、さらに抽出液1 mlにたいして1％タカジアスターゼＢ液1mlを50℃，pH 4.5，2時間作用させたのち定量することによつてTotal thiamine量を求め、両測定値の差からリン酸化されたThiamine（ＴＤＰもしくはＴＭＰ）量を求めた。

(2) 菌体抽出液の Bioautography

(1)と同様にして得た抽出液を減圧下濃縮後東洋沪紙№５０につけ８０％エタノールにて展開した。Tab.5 に示したMacias R 培地[41]を２倍希釈し寒天を溶解したのちL.fermentiのけん濁液を混入し寒天平板を作製した。上記の沪紙を乾燥後寒天平板上に約１５分間貼りつけたのち沪紙を取り去り、３７℃，２０時間培養後L.fermentiの増殖帯からThiamine活性物質の存在を確認した。

Tab. 5 Macias R medium

| | | | |
|---|---|---|---|
| Casamino Acids (Vitamin free) | 1 g | Guanine | 2 mg |
| Glucose | 2 g | Uracil | 2 mg |
| D-Xylose | 0.4 g | Salt C* | 2 ml |
| Na-Citrate-$2H_2O$ | 1.0 g | Ca-Pantothenate | 100 μg |
| D,L-Tryptophan | 0.04g | Nicotinic Acid | 100 μg |
| L-Cysteine | 0.1 g | Riboflavin | 100 μg |
| $K_2HPO_4$ | 0.5 g | PABA | 200 μg |
| $CaCl_2$-$2H_2O$ | 0.1 g | Pyridoxine-HCl | 400 μg |
| $NH_4Cl$ | 0.2 g | Folic Acid | 20 μg |
| Adenine | 2 mg | Biotin | 2 μg |

Adjust the pH to 6.0 and add water to make 100 ml.

* Dissolve 0.2g NaCl, 0.8g $MnSO_4$-$7H_2O$, 4g $MgSO_4$-$7H_2O$ and 0.2g $FeSO_4$-$7H_2O$ in water to make 100 ml.

実　験　成　績

(1)　Thiamine，ＴＰＤ，ＣＥＴ添加培養菌の菌体中Thiamineの存在型の検索（Tab6.7. Fig.17）

増殖に必要な量より低いThiamine，ＣＥＴまたはＴＰＤを添加して培養したとき増殖度はＣＥＴ，ＴＰＤを添加した場合に高い値を示した。Total thiamine量にはあまり差がないが、Thiamine を添加して培養した菌体には２３～４２％のFree thiamineが検出されたのにたいしてＣＥＴまたはＴＰＤを添加して培養した菌体には Free thiamine はほとんど検出されずＴＤＰ（Bioautographyで確認）のみ検出された。また菌体１ml当りのＴＤＰ含量は２０時間の培養後にはほぼ等しい値を示し増殖度の差はＴＤＰへの変化率と比例していた（Tab.6）

１３時間培養した菌体の抽出液のBioautographyを行なうとThiamine添加培養菌にはFree thiamineおよびＴＤＰが検出され、ＣＥＴおよびＴＰＤ添加培養菌にはＴＤＰのみが検出された（Fig.17）。したがつてTab.6 に示したPhosphorylated thiamineはＴＤＰと考えることができる。

過剰量のThiamineまたはThiamine 誘導体を添加した場合には増殖度には差がみられないが、４μgEq添加のときThiamine添加培養菌には多量のFree thiamineが存在していたのにたいしてＣＥＴ，ＴＰＤを添加して培養した菌体には２～３％のFree thiamineしか検出されず他はリン酸エステルとして検出された。４０μgEq. 添加の場合Total thiamine 量はThiamine添加の場合最高値を示し、Free thiamine含有率を比較するとThiamine添加培養菌のFree thiamineは６１％で最高値を示した。ＣＥＴ添加培養菌のTotal thiamine量は低い値であつたがその大部分はＴＤＰであつた。（Tab.7）。以上のように増殖促進性の高

いＣＥＴおよびＴＰＤは菌体内で高率でＴＤＰに変化していることが示された。

(2) 増殖菌体中のThiamineの存在部位（Tab. 8）

Tab.6 と同条件にした菌を集め第4章第1節に記す方法によつてProtoplast を調製してThiamine含量（Total thiamine）を測定すると、Thiamine添加培養菌のThiamine溶出量がやや高かつたが、いずれの場合も大部分のThiamineがProtoplastすなわち原形質中に検出された。

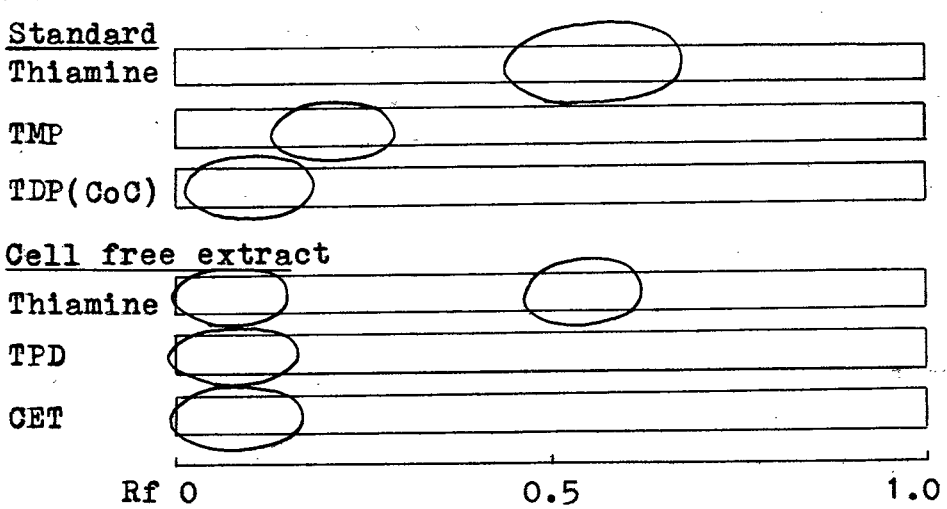
Tab. 6 Free and Phosphorylated Thiamine Contents of the Cells of Kl. apiculata after Cultivation with Thiamine, CET or TPD

Cultivated in 100ml of medium contained 2μgEq. of thiamine, CET or TPD

| | Cultivation time hours | Growth O.D. | Thiamine contents Phosphorylated μg | Free μg |
|---|---|---|---|---|
| Thiamine | 13 | 0.243 | 1.05(0.044)* | 0.75 |
| | 16.5 | 0.343 | 1.31(0.038) | 0.52 |
| | 20 | 0.390 | 1.38(0.035) | 0.42 |
| CET | 13 | 0.256 | 1.63(0.063) | 0.05 |
| | 16.5 | 0.393 | 1.78(0.045) | 0.05 |
| | 20 | 0.500 | 1.89(0.038) | 0.03 |
| TPD | 13 | 0.272 | 1.76(0.062) | 0.23 |
| | 16.5 | 0.390 | 1.81(0.046) | 0.10 |
| | 20 | 0.480 | 1.84(0.038) | 0.05 |

* ( ) : μg of phosphorylated thiamine/mg of cells

Fig.17 **Bioautography of Cell Free Extract of the Cells Cultured with Thiamine, CET or TPD**




**Solvent system : 80% Ethanol**

Tab.7

Free and Phosphorylated Thiamine Contents of the Cells of Kl.apiculata after Cultivation with Thiamine, CET or TPD

| Added amount µg Eq./50ml medium | | Growth O.D. | Thiamine contents Phosphorylated µg | % | Free µg | % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | Thiamine | 0.610 | 2.50 | 69 | 1.12 | 31 |
| | CET | 0.645 | 2.95 | 97 | 0.09 | 3 |
| | TPD | 0.630 | 3.40 | 98 | 0.08 | 2 |
| 40 | Thiamine | 0.640 | 13.5 | 39 | 21.3 | 61 |
| | CET | 0.645 | 4.8 | 74 | 1.7 | 26 |
| | TPD | 0.650 | 14.2 | 46 | 16.8 | 54 |

Tab.8

Release of Thiamine from the Cells Cultured with Thiamine, CET or TPD by the Treatment with Cell Wall Digestive Enzyme

Cells were harvested and treated with enzyme after the cultivation with 4µg Eq. of Thiamine, CET or TPD in 200 ml of medium for 13 hours.

| | Thiamine released | Thiamine contents of protoplasts |
|---|---|---|
| Thiamine | 0.95 µg | 2.37 µg |
| CET | 0.45 | 2.49 |
| TPD | 0.16 | 3.40 |

## 第2節　考察ならびに小括

### 考　　察

第1章でのべたようにＣＥＴおよびＴＰＤはKl.apiculataの増殖をThiamineより強く促進するがこれらの誘導体が増殖促進作用を示すためには菌体内でＴＤＰに変化されねばならない。菌体内のＴＤＰ含量の測定を行なうと、Thiamineを添加して培養した菌体中には多量のFree thiamineが検出されたのにたいしてＣＥＴ，ＴＰＤを添加して培養した菌体中にはＴＤＰのみが検出され、増殖後の菌体1 mg当りのＴＤＰ含量はいずれを添加してもほぼ等しかつた。すなわち菌体内のＴＤＰ含量に比例した増殖がみられたわけでＴＰＤ，ＣＥＴはThiamineより容易に菌体内でＴＤＰに変化すると考えられる。第1章で述べたようにＣＥＴとＴＰＤの作用機序には相違がみられ、培養初期にはＣＥＴは菌体内で一部ＣＥＴのまま検出されたが、本章では十分な増殖が起つてからのＴＤＰ含量を比較した。ＣＥＴ，ＴＰＤともにThiamine添加の場合より高いという点で両者は一致した態度を示した。両者のＴＤＰ含量を高めた機構については必らずしも同じでないであろう。Thiamine誘導体がＴＤＰに変化するためにはまずThiamineに還元される必要がある。それにもかかわらずThiamineよりリン酸化され易い点について未だ解明されていない。増殖に必要な最小量を添加した菌体からProtoplastを調製するとThiamineの一部は上清に流出したが、大部分のThiamineはProtoplast 中に残存した。すなわち増殖期の菌体中のThiamineはほとんど原形質内に存在すると思われる。菌を接種して菌体とThiamineまたはThiamine 誘導体が接触した時点においてそれらの原形質内への透過機構に相違があり、そのためにＴＤＰへの変化率が異なるということが考えられるのでこの問題について次章で検討した。

## 小　　括

ＣＥＴ，ＴＰＤ，Thiamineを添加して培養した菌体中のThiamineの存在部位ならびに存在型を検索するといずれも大部分は原形質内に存在し、ＣＥＴ，ＴＰＤを添加した場合すべてＴＤＰに変化していたのにたいしてThiamineを添加した場合には一部がFree thiamineとして残存しており、増殖度とＴＤＰ含量には相関関係がみられた。ＴＰＤ，ＣＥＴの高い増殖促進性はそれらがThiamineを添加した場合より高率でＴＤＰに変化するためと考えられる。

# 第4章　Kl.apiculataによるThiamineおよびThiamine誘導体の集積

第2章で一部記したように、また他の著者が酵母およびその他の微生物で認めたごとくThiamine誘導体の微生物によるとりこみはThiamineにくらべ低い値である。[6][12]〜[17] しかし動物細胞でみられるようにThiamineとThiamine誘導体の膜透過機構が異なることは十分予想されることである。酵母がThiamineを多量に集積する事実は多くの著者により報告されているが、[15][42]〜[46] 集積されたThiamineの存在部位あるいはなぜ多量のThiamineが集積されるかなど不明の点が多い。またKl.apiculataによるThiamineの集積についての報告は少ないのでThiamineならびにその誘導体のKl.apiculataによる集積について検討した。

## 第1節　Kl.apiculataによるThiamineの集積

実　験　方　法

(1)　菌体中Thiamineの定量

第2章第2節の方法によつた。

(2)　Thiaminase液の調整

シジミまたはハマグリの貝肉に6倍量の0.1Mリン酸緩衝液（pH 6.5）を加え摩砕後、10,000rpm 30分間遠沈して得られる上清、または普通ブイヨン培地にBacillus thiaminolyticus Matsukawa et Misawaを接種し30℃3日間培養して得られた培養液を遠沈して菌体を除いた上清液をThiaminase液として用いた。

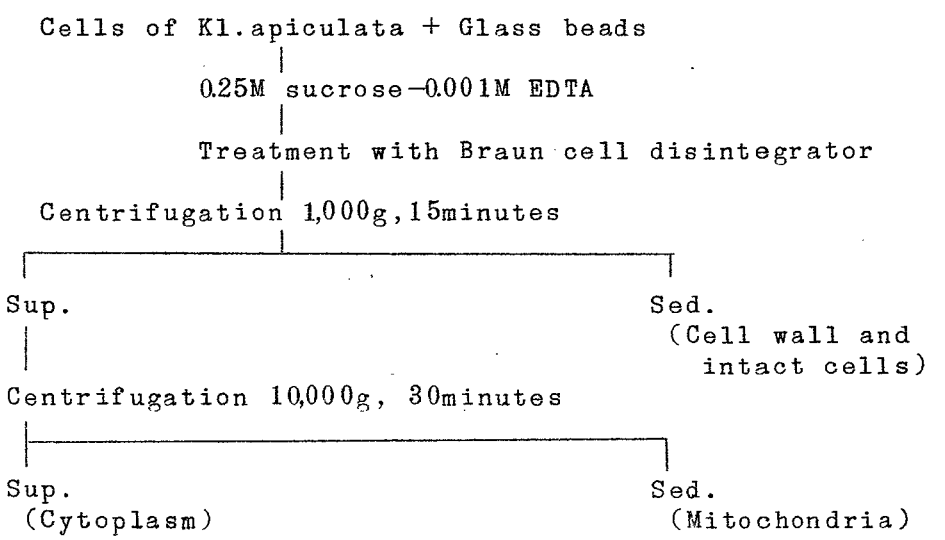
(3) Thiaminase 活性の測定

Thiamineを含む検液にThiaminase液、0.1Mリン酸緩衝液5mlおよび0.01Mピリジン1mlを加え水にて全量45mlとし30℃1時間保温後N塩酸5mlを加え15分間煮沸して反応を停止させたのち残存Thiamine量をBrCN−Thiochrome法にて定量した。反応前のThiamine量にたいする残存Tiamineの百分率をもつてThiaminaseにたいする安定度としてあらわした。

(4) 酵母細胞の機械的破壊法ならびに分画法

酵母300 mgを0.25M Sucrose − 0.001M EDTA液50mlにけん濁し、径0.45〜0.50mmのガラス玉30gを加えBraun細胞破壊機にて2,000rpmの振動を与えて細胞を破壊し継時的に一部を分取してFig.18のように遠沈分画した。同時にThoma の血球計算盤を用いて未破壊の細胞数を計算し、最初の菌数との差を求め細胞の破壊率を計算した。

Fig. 18 Destruction and Fractionation of Kl.apiculata



(5) ＭＢ染色性細胞数の測定[47]

Ｍ／１５リン酸緩衝液に溶解した0.０１％ＭＢ液を等量の菌液に加え、青く染色される菌数を Thoma の血球計算盤を用いて測定した。この条件で染色される酵母は死菌と見なすことができる。

(6) 酵母細胞壁溶解酵素

照井ら[48～50]により開発されたStreptomyces albidoflavusの産生する酵素ＨＣＷ（大和化成ＫＫ）を使用した。

(7) protoplastの調製

酵母に等張塩液（終濃度0.８Ｍ塩化ナトリウム、および0.０５Ｍ硫酸マグネシウムの混液）中で0.０７Ｍリン酸緩衝液に溶解した細胞壁溶解酵素および0.００３Ｍ　２－Mercaptoethanol　を３０℃で作用させた。Protoplast数の測定にはThoma の血球計算盤を用い、総細胞数および水により破壊されない細胞数（ Intact cell ）を測定し、両者の差をprotoplast数とした。Protoplast にたいする種々の操作は上記等張塩液中で行なつた。

実　験　成　績

(1) Thiamineの集積条件の検討（ Tab. 9, 10 Fig. 19 ）

Thiamineは増殖に用いる培地中で多量に Kl.apiculata により集積されるので培地成分を（ Tab. 9 )のように分け各成分溶液中でのThiamine集積量を測定するとPH4.7の緩衝液のみの溶液中でも２６μg/mg cells集積され、塩化ナトリウムその他の無機塩類の添加は集積を促進しないが、Glucose の添加により集積量は増大し増殖培地を用いたときと同程度の集積がみられた。すなわち培地成分のうち Glucose のみが集積を促進する因子として作用しているわけで、このようにGlucoseがThiamine の

集積を促進する事実はSuzuoki,[15] 棚瀬[48]らによりパン酵母において観察されている。

2％Glucose 溶液中で終濃度0.02Mのクエン酸緩衝液により pHを変化させて集積量を測定すると pH5 弱で集積量は最大に達した（Tab.10）同様な実験を酢酸緩衝液を用いて行なうと至適 pH は一致したが、集積量はクエン酸緩衝液のばあいより30％減少した。

pH 4.7のクエン酸緩衝液中 Glucose 濃度を変化させて30℃、1時間後の集積量を測定すると Glucose 量に応じて集積量は増加し、0.5％で最大に達して以後は平衡であつた（Fig.19）。なお温度は30℃前後、保温時間は約1時間で集積量が最大値を示した。

以上のようにKl.apiculataによるThiamineの集積条件について検討したが、至適条件においては菌体重量（乾燥物）の10％にもおよぶThiamineが集積された。なおいずれの測定結果でも集積されたThiamineはほとんどすべてFree thiamineであり、TDPに変化したものは認められなかつた。

Tab.9 The Accumulation of Thiamine by Kl.apiculata

(1) Influence of medium

10 mg of cells were incubated with 1 mg of thiamine at pH 4.7, 30°C for 1 hr.

| Medium | Accumulation of thiamine µg/mg cells |
|---|---|
| Water | 26 |
| 0.9% NaCl | 25 |
| 2% Glucose | 81 |
| Inorganic solution* | 24 |
| Basal medium** | 80 |

*$KCl$, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeCl_3$

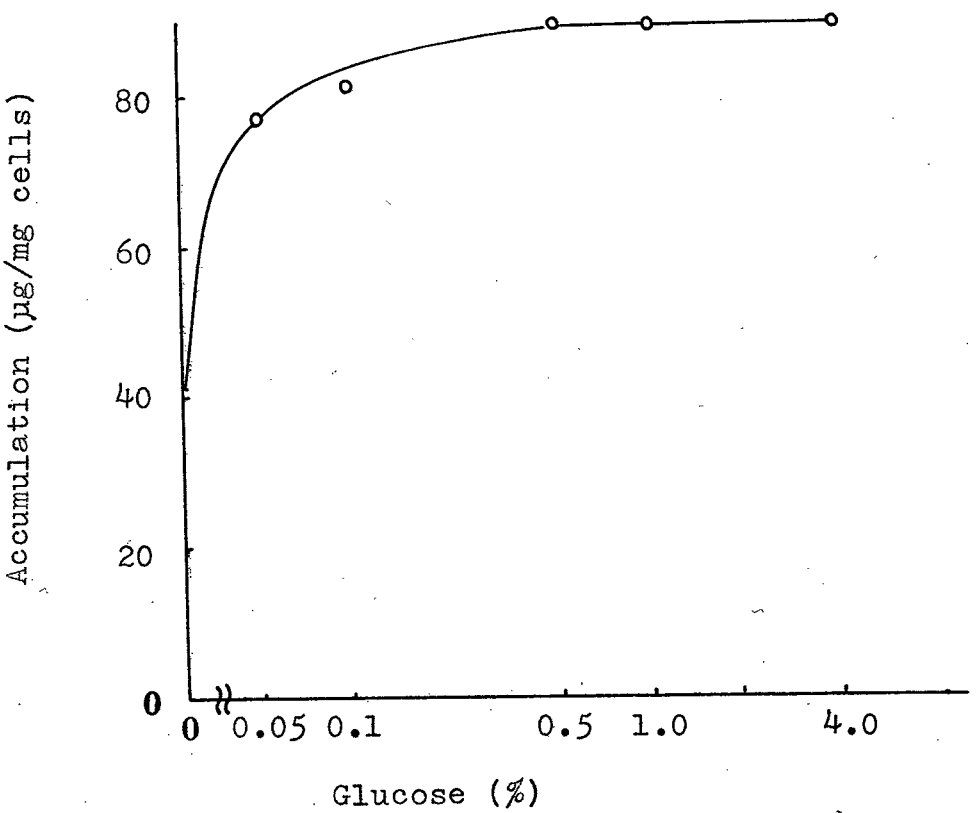
**Hoff-Jorgensen medium(2% Glucose, 0.25% Casamino acids Inorganic solution, Vitamin solution)

Tab.10 The Accumulation of Thiamine by Kl.apiculata

(2) Influence of pH

| pH | 1.9 | 3.0 | 4.0 | 4.5 | 4.9 | 5.3 | 6.3 | 7.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Accumulation of thiamine µg/mg cells | 55 | 69 | 101 | 108 | 122 | 116 | 97 | 10 |

Fig. 19 Influence of Glucose Concentration to the Accumulation of Thiamine



(2) 酵母に集積されたThiamineにたいするThiaminaseの影響

（Fig.20　Tab.11）

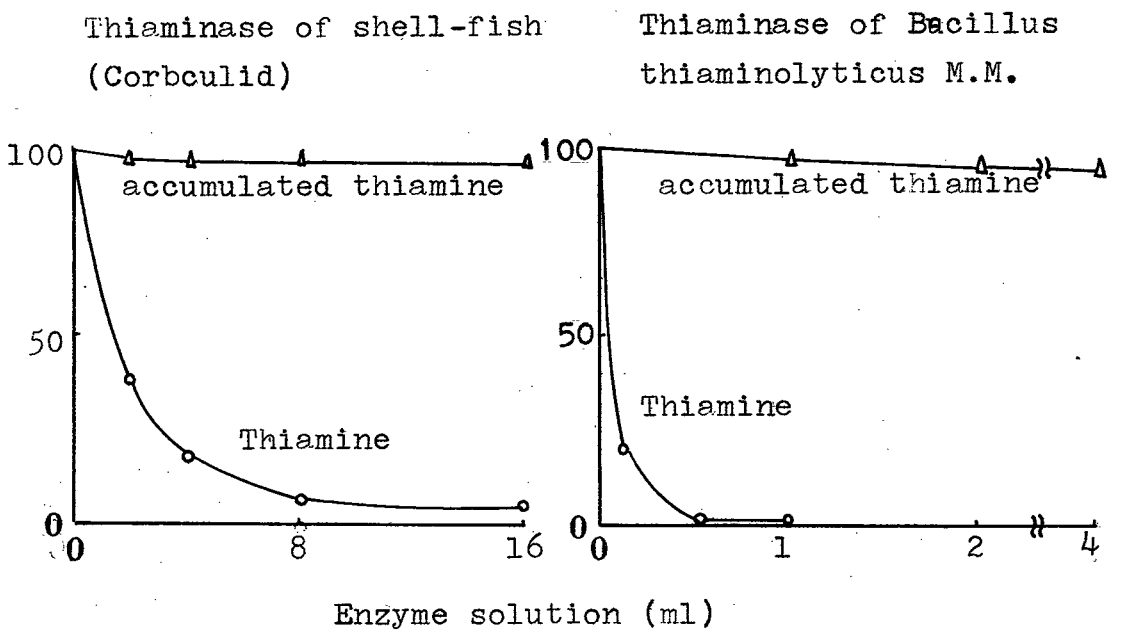
酵母細胞に集積されたThiamineにたいするThiaminase の影響を検討した。Thiamineを80.5 μg集積したKl.apiculata 1mg に Thiaminase液0.1～16 mlを反応させたのち残存 Thiamine量を定量し、同時に対照として酵母の存在しない状態でThiamine 100 μg にたいして同量の Thiaminase を反応させた（Fig.20）。シジミおよび B. thiaminolyticus の Thiaminase によつてThiamine は容易に分解されたが、Kl.apiculata により集積されたThiamine はほとんど分解されなかつた。Saccharomyces carlsbergensis（IFO 0565）またはSacch. cerevisiae（IFO 0305）に集積されたThiamine についても同様な検討を行なつたが、やはり酵母に集積されていないThiamineが完全に分解される条件で、これらの酵母に集積されたThiamine は分解を受けなかつた（Tab.11）。

(3) 機械的細胞破壊によるThiamine の溶出（Fig. 21）

菌体1 mgあたり100 μgの Thiamine を集積したKl.apiculata 300 mg を機械的に破壊し、Fig.18 にしたがつて遠沈分画して各分画の Thiamine量を測定した。この操作で1,000×g沈渣は未破壊の細胞ならびに細胞壁、10,000×g沈渣はミトコンドリアなどの顆粒成分、10,000×g上清は原形質成分ならびにその他の可溶性成分と考えることができる。Fig.21に示したように16分間の処理により細胞は完全に破壊されるが、細胞破壊と並行して Thiamine が 10,000×g上清に溶出し、16分後には1,000×gならびに10,000×gの沈渣にはほとんどThiamine は検出されなかつた。また10,000×g上清にトリクロロ酢酸、硫酸アンモ

ニウム、アセトンなどを加えて除タンパク質を行なうとThiamineはすべてその上清に検出された。すなわちThiamine は細胞壁その他の不溶成分またはタンパク質などと結合した型では存在しないと思われる。

Fig.20 The Influence of Thiaminase to Accumulated Thiamine




Tab.11

**Influence of Thiaminase of B.thiaminolyticus M.M. to Accumulated Thiamine on Yeast**

| Yeast | Accumulation | Decomposition |
|---|---|---|
| Kl.apiculata | 8.8 μg/mg cells | 1 % |
| Sacch.carlsbergensis | 5.1 | 0 |
| Sacch.cerevisiae | 8.1 | 0 |
| 10.0μg of Thiamine | | 95 |

Fig.21

**Release of Thiamine from the Cells of Kl.apiculata by the Mechanical Destruction**

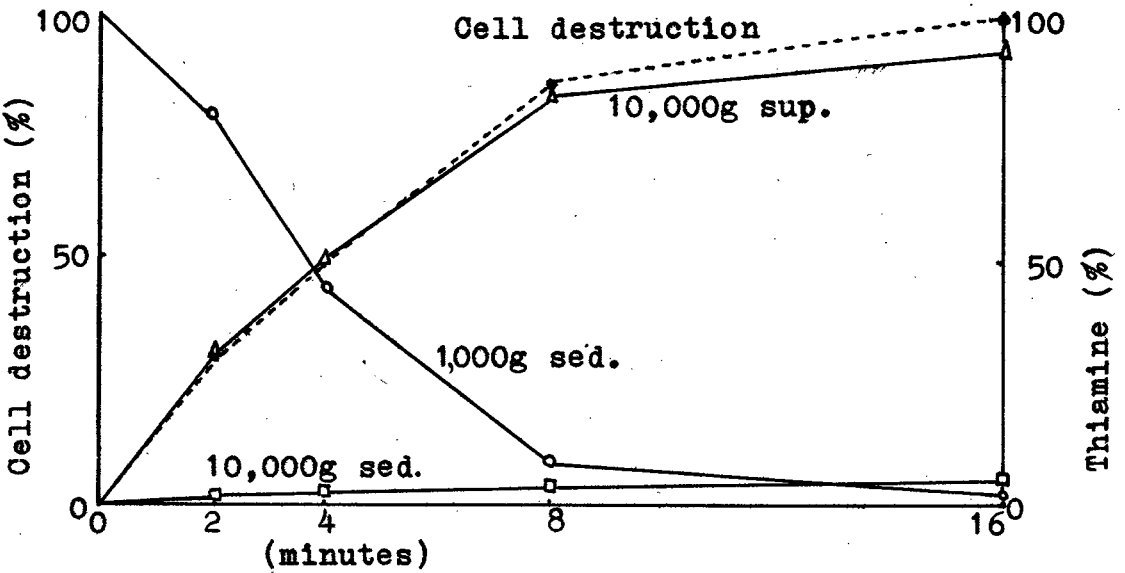


Fig.22

Kl.apiculata 10 mg and Thiamine 1 mg
Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour
Centrifuged
Sup.1 — Cell 1
Suspended in water
Centrifuged
Sup.2 — Cell 2
Suspended in 0.8M NaCl
Centrifuged
Sup.3 — Cell 3
Suspended in water
Centrifuged
Sup.4 — Cell 4
Suspended in 0.8M NaCl
Centrifuged
Sup.5 — Cell 5
Suspended in water
Centrifuged
Sup.6 — Cell 6

Thiamine in Sup.1~6 and MB positive cells in Cell 1~6 were assayed

Tab.12 Release of Thiamine from the Cells by Osmotic Shock (1)

| | Water → | 0.8M NaCl → | Water → | 0.8M NaCl → | Water |
|---|---|---|---|---|---|
| Thiamine Released (%) | 1 | 2.6 | 15.3 | 20.1 | 35.3 |
| MB positive cells (%) | 0 | 0 | 5.6 | 8.6 | 14.7 |

Fig.23

Release of Thiamine from the Cells by Osmotic Shock (2)

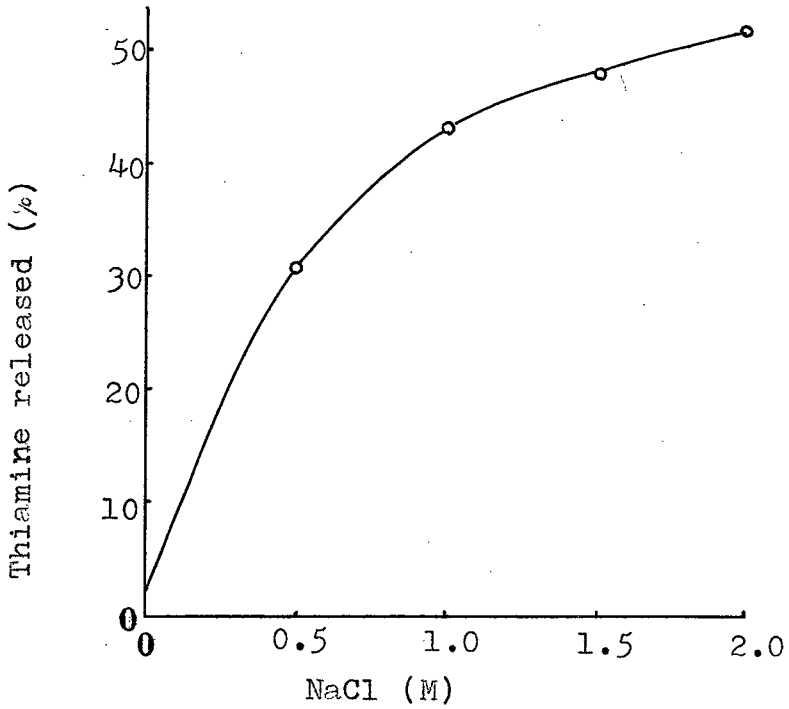
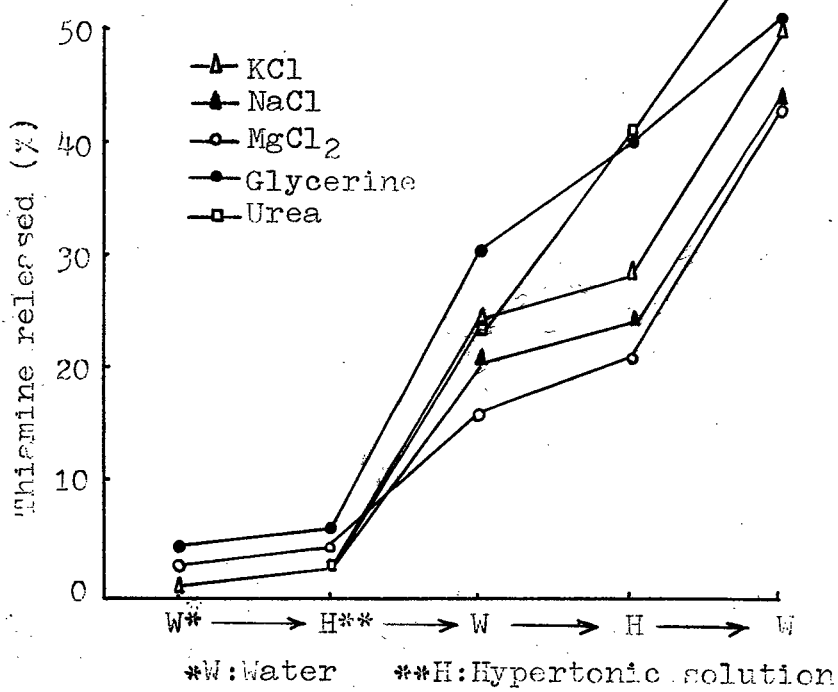



Fig.24 Release of Thiamine from the Cells by Osmotic Shock (3)



(4) 浸透圧変化によるThiamine の溶出 ( Tab.12 ,Fig.22,23,24 )

図の操作にしたがつて酵母に浸透圧変化を与えるとThiamineの溶出がみられた。酵母を単に水洗したときあるいは高張液にけん濁したときにはThiamineはほとんど溶出しないが、高張から低張に移したとき多量のThiamineが溶出し、2回の浸透圧変化を与えることによつて全集積量の35.3% が細胞外に溶出した ( Tab.12 )。このとき同時にMB染色性細胞数を測定すると操作が進むにつれて染色性細胞数は増加し最初の集積量にたいして35.3%のThiamineが溶出したときの染色性細胞数 ( 死菌数 ) は全細胞数の 14.7% で溶出Thiamineの割合の方が高く、かなりの細胞が■■活性を有するにもかかわらずThiamineを放出したと見ることができる。Thiamineを集積していない酵母に同様な浸透圧変化を与えてもThiamine集積酵母ほどに菌の死滅が起こらなかつた。

各濃度の塩化ナトリウム液中から水中に移したときのThiamine溶出量を図示したが浸透圧の差が大きいほどThiamine溶出量は多く、2M塩化ナトリウム液中から水に移したときには全集積量の 50%が溶出した。( Fig.23)

0.8M塩化ナトリウムと等張にした塩化カリウム ( 6.2% ) ,塩化マグネシウム ( 10.5% ), 尿素 ( 8.5% ) ,グリセリン ( 13.5% ) を用いて浸透圧変化を与えたときのThiamine溶出量累積値を図示したが、いずれを用いた場合にも塩化ナトリウムを用いた場合と同様のThiamineの溶出がみられた。( Fig.24 )

(5) Protoplastの生成におよぼすMercaptoethanolの影響（Fig.25）

2－Mercaptoethanolの添加量を変えてProtoplastを調製すると2－Mercaptoethanolの添加によりProtoplastの生成は促進された。得られたProtoplastは0.7～1.0Mの塩化ナトリウム溶液中で安定で、5,000rpm 以下の遠心分離によつて破壊されず従来報告された酵母のprotoplastの性状[51～53]に一致した。

(6) Protoplastの調製によるThiamineの溶出－1（Fig.26）

菌体1mg当り100μgのThiamineを集積した酵母に細胞壁溶解酵素を作用させProtoplastを調製し継時的に総菌数、Protoplast数ならびに上清および菌体中のThiamine量を測定した。30分の酵素処理で70%，2時間の処理で98%がProtoplastになりProtoPlastの生成にともなつてThiamineが細胞外に溶出したが、4時間後も約20%のThiamineが細胞内に残存していた。総菌数もかなり減少したので上清に検出されたThiamineにはProtoplastの破壊によつて溶出したThiamineも含まれるわけでこの点を考慮して測定直を補正するとProtoplast中には全集積Thiamineのうち約40%が存在したことになる。

(7) ProtoplastによるThiamineの集積（Tab.13）

Thiamineを集積していない細胞を用いてProtoplastを調製し、Thiamineを添加するとIntact cellにThiamineを添加した場合より集積量がはるかに少く、とくにGlucose の存在しないときにはほとんど集積されなかつた。

(8) Protoplastの安定性におよぼすThiamine量の影響（Fig.27）

Fig.26において示したように多量のThiamineを集積した酵母に細胞壁溶解酵素を作用させるとProtoplastの破壊すなわち菌数の減少が顕著であつたので、菌体1mg当り1.0，9.8 または91.0μgのThiamine を集積

Fig.25 Influence of 2-Mercaptoethanol to the Preparation of Protoplasts

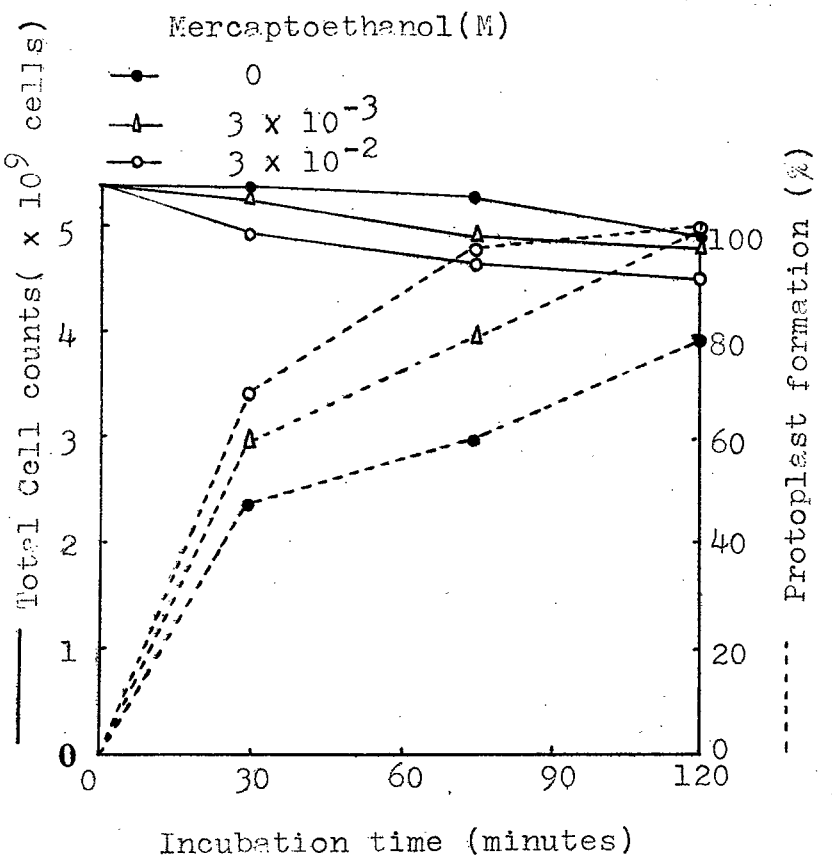
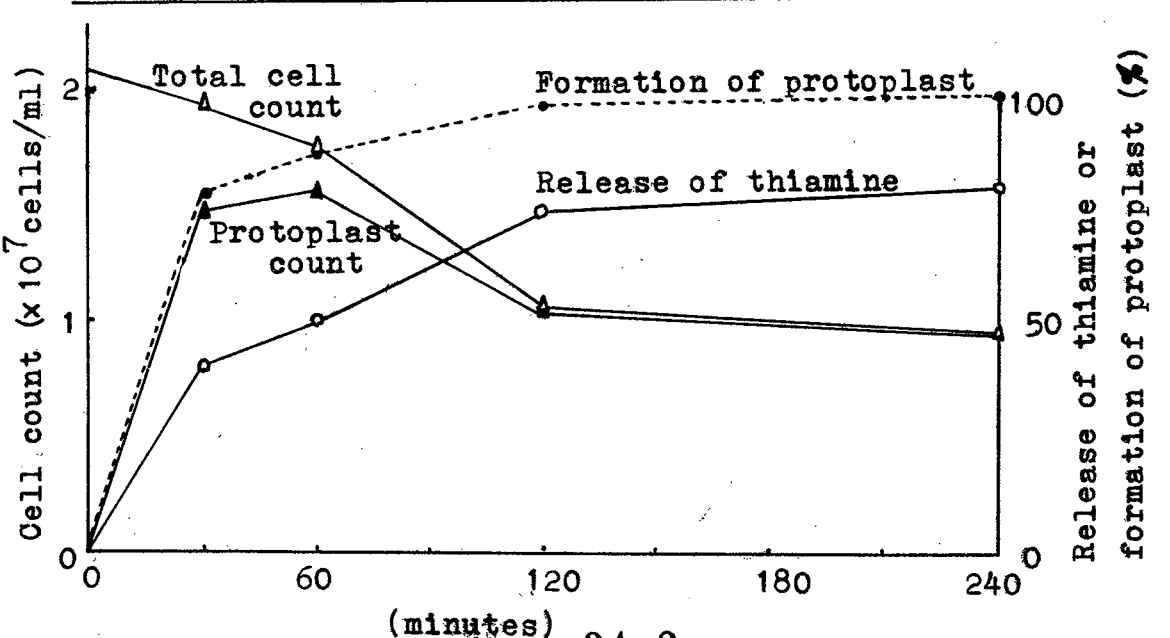



Fig.26

**Release of Thiamine from the Cells of Kl.apiculata during the Preparation of Protoplasts**

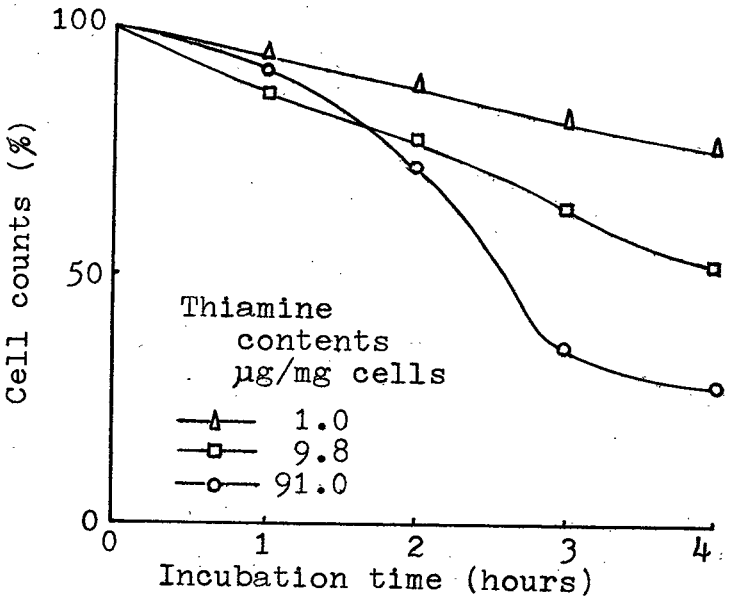


Tab. 13 Accumulation of Thiamine on Intact cells or Protoplasts

Cells : $3 \times 10^8$ cells
Thiamine : 200 µg
Incubated in isotonic solution at pH 4.7, 30°C for 1 hour

| Glucose | Protoplasts | Intact cells |
|---|---|---|
| 2 % | 41.7 µg | 112.7 µg |
| — | 2.3 | 97.7 |

Fig. 27 Influence of Accumulated Thiamine to the Stability of Protoplast

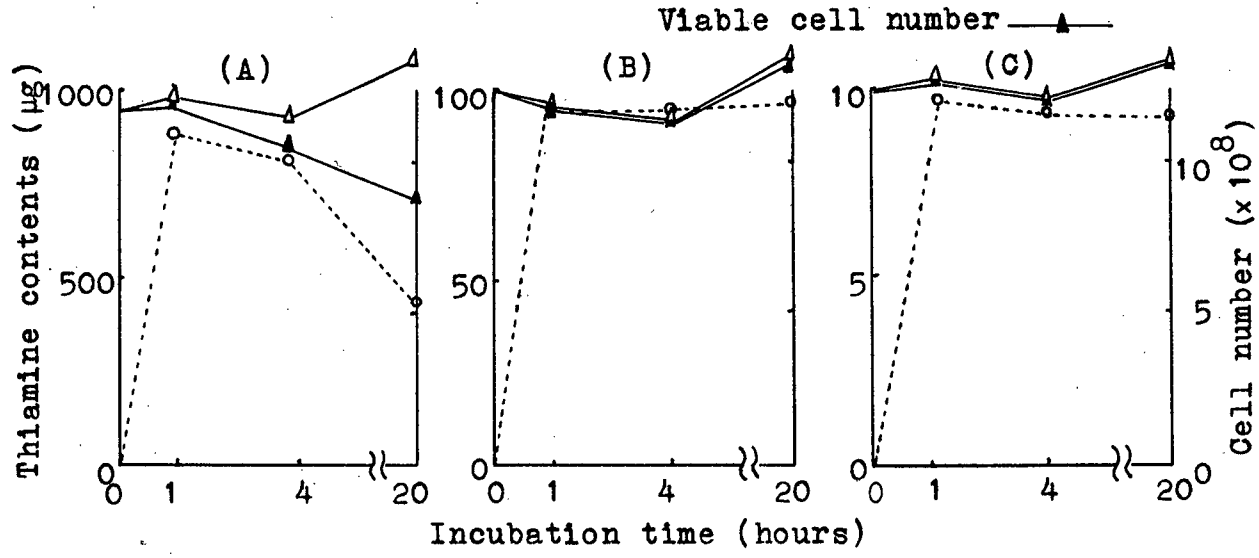



Tab. 14 Release of Thiamine from the Cells Accumulated with Thiamine by the Treatment with Cell Wall Digestive Enzyme

| Thiamine contents of intact cells | Thiamine released | Thiamine contents of protoplast |
|---|---|---|
| µg/mg cells | % | % |
| 91.0 | 48 | 52 |
| 9.8 | 53 | 47 |
| 1.0 | 59 | 41 |

Fig.28 Influence of Thiamine Contents to the Viability of Kl.apiculata

10mg of cells were incubated with (A)1000μg, (B)100μg or (C)10μg of thiamine in fermentation medium



した酵母にたいして細胞壁溶解酵素を作用させ継時的に菌数を測定するとThiamine含量の高い酵母ほどProtoplast数の減少が顕著であつた。なお1時間の酵素処理により90%以上がProtoplastになつていたので図には総菌数の変化のみを記した。

(9) Protoplastの調製によるThiamineの溶出－2（Tab.14）

Fig.27における3時間酵素処理の反応液について上清ならびに菌体中Thiamine含量を測定し、Protoplastの破壊により上清に流出したThiamine量を補正して得られる結果をTab.14に記した。

Fig.26の結果にくらべややProtoplast中のThiamine含量が高かつたが、集積Thiamine量にあまり関係なく常に50%前後がProtoplastの調製により細胞外に流出した。すなわち集積されたThiamineは常に一部は細胞壁付近に、一部は原形質内に存在すると思われる。

(10) 酵母の生存性におよぼすThiamine量の影響（Fig.28）

酵母を醗酵させたとき酵母の生存性にたいしてThiamine含量がどのように影響するかを検討するためAtkin－Schultz－Freyの醗酵液（Tab. 15）中でThiamineを添加し、集積Thiamine量ならびにMB染色性細胞数の変化を測定した（Fig.28）。10および100μgのThiamineを添加したときThiamineの集積量ならびにMB染色性細胞（死菌）数は20時間後にも変化しなかつたが、1,000μgを添加したときThiamineの集積量は1時間の場合の53%に減少し、MB染色性細胞数も1時間の場合には全菌数の1.6%であつたのにたいして20時間後には31%に増加した。すなわち多量に集積されたThiamineは直接あるいはそれが溶出することによつて酵母細胞に傷害を与えていると思われる

Tab. 15 Composition of the Medium for Fermentation-test

| | | | |
|---|---|---|---|
| Glucose | 15 g | $FeCl_3$ | 0.8 mg |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 5 g | $MnSO_4$ | 0.65 mg |
| $KH_2PO_4$ | 164 mg | Citric Acid | 3.5 g |
| $CaCl_2$ | 94.5 mg | $K_2HPO_4$ | 6.9 g |
| $MgSO_4$-$7H_2O$ | 750 mg | Nicotinic Acid | 4.9 mg |

Add water to make 1.000 ml.

## 第2節　Kl.apiculataによるThiamineおよびTDPの集積

TDPもThiamineと同様酵母により多量に集積されるが、この場合TDPは脱リン酸されFree thiamineとして菌体中に検出される。酵母の細胞壁付近には強いAcid phosphataseが存在し[57〜59]、このPhosphataseは培養上清にも流出することが認められている[17]。Phosphataseの作用でTDPが脱リン酸されFree thiamineとして検出されるのは当然であるが、Protoplast を調製することによつて菌体からPhosphataseを除去した場合、あるいはPhosphatase阻害剤を添加した場合にはTDPはどのように集積されるかについて検討した。

### 実　験　方　法

(1)　菌体中のThiamineもしくはTDP量の定量

菌体からの抽出は第2章第2節の方法にしたがい、第3章第1節の方法にしたがつてタカジアスターゼ処理の有無による測定値の差をTDP量とした。なお検液にモリブデン酸ソーダ（Phosphatase阻害剤[60]）が含まれる場合にはタカジアスターゼ処理が不能であるのでBrCN−Thiochrome 法における水層の螢光度を測定してTDP量を求めた。

### 実　験　成　績

(1)　ProtoplastまたはIntact cellによるThiamine，TDPの集積（Tab.16）

ProtoplastまたはIntact cellによるThiamineまたはTDPの集積量を測定するとIntact cellではThiamineとTDPは同量集積されTDPを添加した場合もすべてFree thiamineとして集積された。

Protoplastによる Thiamine の集積量は前節と同様 Intact cell にくらべると低いが、ＴＤＰを添加した場合にはさらに減少し、この場合にも集積されたものはほとんど遊離型として検出された。Protoplast および Intact cell の Acid phosphatase 活性をＴＤＰを基質として PH.4.7で測定すると、ここで用いた Protoplast の Phosphatase 活性は Intact cell の約５％であつた。わずかに残つた Phosphatase のためにＴＤＰが脱リン酸されて集積されたと思われる。

(2) Thiamine，ＴＤＰの集積におよぼすモリブデン酸塩の影響（ Tab.16 ）

Thiamineまたは ＴＤＰの集積におよぼすモリブデン酸ソーダの影響を検討すると Thiamineの集積は $10^{-1}$M のモリブデン酸塩により若干減少したが、それ以下の濃度ではまつたく変動しなかつた。ＴＤＰを添加したとき $10^{-3}$M 以下のモリブデン酸塩を添加しても Thiamineと同量しかも Free thiamineとして集積されたのにたいして $10^{-2}$Mのモリブデン酸塩により集積が阻害されて上清に多量のＴＤＰが残存し、$10^{-1}$M では完全に集積および Phophatase 活性が阻害された。したがつてＴＤＰが酵母に集積されるためにはそれが Phoaphatase 作用によつて Free thiamine に変化することが必要である。

Tab. 16 Accumulation of Thiamine or TDP by Kl.apiculata

$1.2 \times 10^9$ cells were incubated with 1 mg of Thiamine or TDP in 2% glucose medium at pH 4.7, 30°C for 1 hour

| | Thiamine | | TDP | |
|---|---|---|---|---|
| | Total | Free | Total | Free |
| | µg | µg | µg | µg |
| Protoplast | 185 | 175 | 70 | 60 |
| Intact cell | 375 | 375 | 370 | 375 |

Tab.17 Influence of Na-molybdate to the Accumulation of Thiamine or TDP

1 mg of cells were incubated with 100µg Eq. of Thiamine or TDP pH 4.7, 30°C for 1 hour

| Na-molybdate | Thiamine | | TDP | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sup | Cells | Sup | | Cells | |
| | | | F* | P** | F | P |
| M | µg | µg | µg | µg | µg | µg |
| $10^{-1}$ | 32 | 68 | 0 | 86 | 3 | 0 |
| $10^{-2}$ | 25 | 77 | 0 | 63 | 19 | 3 |
| $10^{-3}$ | 22 | 75 | 19 | 0 | 77 | 0 |
| $10^{-4}$ | 18 | 76 | 20 | 0 | 77 | 0 |
| 0 | 25 | 76 | 21 | 0 | 78 | 0 |

* F:Free thiamine ** P:Phosphorylated thiamine

## 第3節　Thiamine，ＴＰＤまたはＣＥＴの集積

### 実　験　方　法

(1)　菌体中Thiamine，ＴＰＤまたはＣＥＴの定量は第２章第２節に記した方法によつた。

(2)　Protoplastの調製ならびにその取扱いは本章第１節に記した方法にしたがつた。

### 実　験　成　績

(1)　Thiamine，ＣＥＴ，ＴＰＤの集積（Fig.29.30）

各誘導体の集積量を比較するとThiamineの集積量が最も高く、ついでＴＰＤ，ＣＥＴの順となつた（Fig.29）。ThiamineはTab.12に記したと同様Glucose 添加溶液中Intact cellによる集積が最も多く、反応液からGlucose を除いた場合あるいは細胞壁を除去してProtoplastにした場合集積量は減少し、ＴＰＤも同様な傾向がみられたがＣＥＴは本条件下ではほとんど集積されなかつた。なお図にはＴＰＤおよびＣＥＴを含むTotal thiamine 量を記したが、ＴＰＤを添加した場合には菌体中にはすべてFree thiamineとして存在し、ＣＥＴの場合本実験では集積が少なかつたので不正確ではあるが、若干のＣＥＴが菌体中に検出された。

Thiamine誘導体は動物細胞の膜をSimple diffusionによつて透過すると言われている。微生物細胞の原形質膜も動物細胞の細胞膜と同様単位膜構造を持つと言われておりSimple diffusion の起る可能性は十分考えられるのでその点を考慮して反応液量をできるだけ制限して内径約2.5 mmの小試験管中で細胞内移行量の測定を行なつた（Fig.30）。ここで用いた反応条件では細胞は全反応液の⅓を占める。Simple diffusion

により細胞内に移行したものは細胞を洗浄することにより細胞外に流出する可能性があるので集積量の測定には反応後の菌体の洗浄は行なわず、毛細管ピペットで上清をできるだけ分離して細胞内含有量を測定する方法もしくは上清 0.05㎖を分取してそれに含まれる量を定量し、細胞内含有量を次式により算出する方法によつた。

$$a = 100 - 2b$$

a：細胞内に含まれる Thiamine，ＣＥＴもしくはＴＰＤ量（μgEq）

b：上清 0.05㎖中に含まれる Thiamine，ＣＥＴもしくはＴＰＤ量（μgEq）

本実験でも Thiamine は Fig.29 と同様の傾向を示したが、添加量が少ないので Glucose 含有液中では添加された Thiamine がほぼ完全に集積され、Intact cell と Protoplast による集積量の差があまりみられなかつた。ＣＥＴの集積量は Thiamine にくらべると少ないが Fig.29 の場合よりも増加し、Glucose の有無あるいは細胞壁の有無にあまり関係なくほぼ一定量すなわち添加量の約⅓が細胞内に検出された。Cysteine 処理またはアルカリ処理を行なつて定量した値（ＴＰＤ，ＣＥＴを含む値）とそれらの処理を省略して得られた値との差からＴＰＤもしくはＣＥＴ量を算出して記したが、ＣＥＴを添加したときには細胞内にほとんどＣＥＴのまま検出されたのにたいしてＴＰＤを添加した場合にはＴＰＤ自身は細胞内にほとんど検出されなかつた。すなわちＣＥＴはそのままの型で Simple diffusion によつて原形質膜を透過し濃度勾配に平行した細胞内移行量を示すと考えられる。

Fig.29
Accumulation of Thiamine Derivatives by Kl.apiculata

Cell;$5\times10^8$cells, Thiamine derivatives;500μg Eq.
Total volume; 5ml
Incubated at pH4.7,30°C for 1 hour

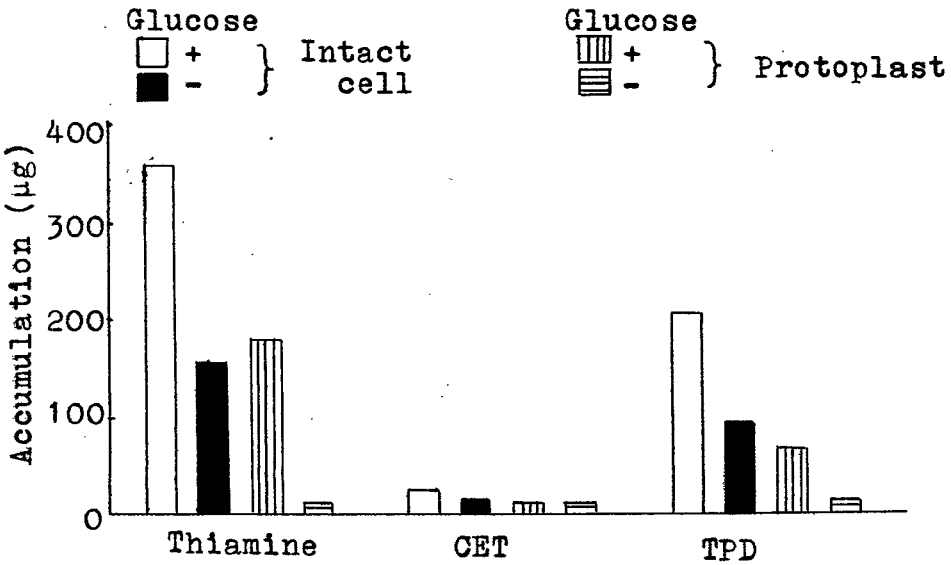



Fig.30
Accumulation of Thiamine Derivatives by Kl.apiculata

Cell volume; 0.05ml($9\times10^8$cells)
Thiamine derivatives solution; 0.10ml
Total volume; 0.15ml
Incubated at pH 4.7,30°C for 1 hour

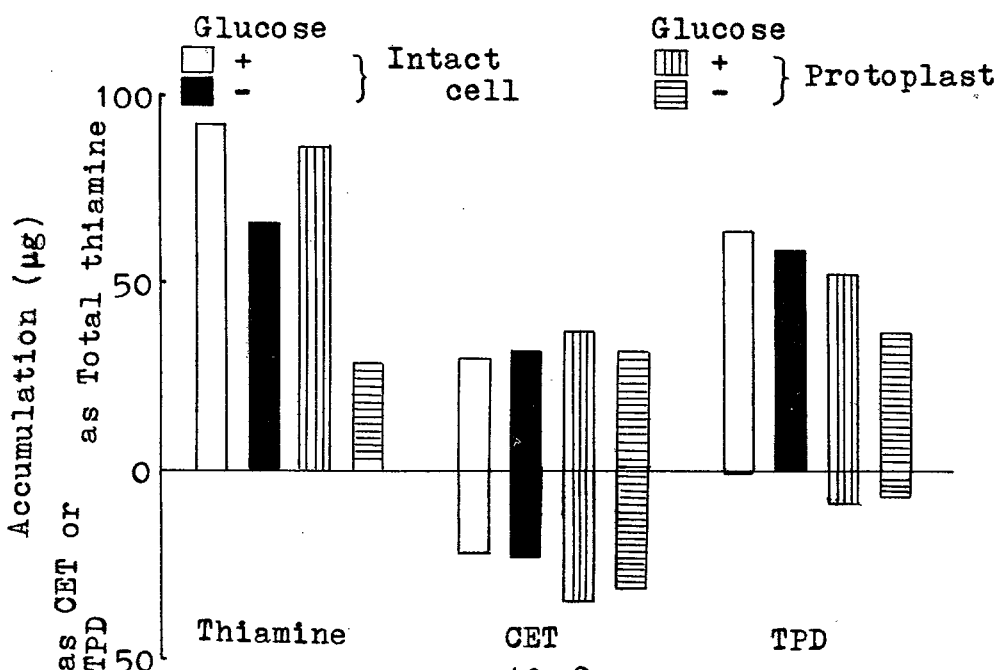


Fig.31 Method for Washing the Cells Accumulated with Thiamine, CET, TPD

Protoplast or Intact Cell 0.05ml($9\times10^8$ cells) + Thiamine-derivatives Solution 0.10ml(100μg Eq.)

Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour

Centrifuged

Cell 1 — Supernatant 1

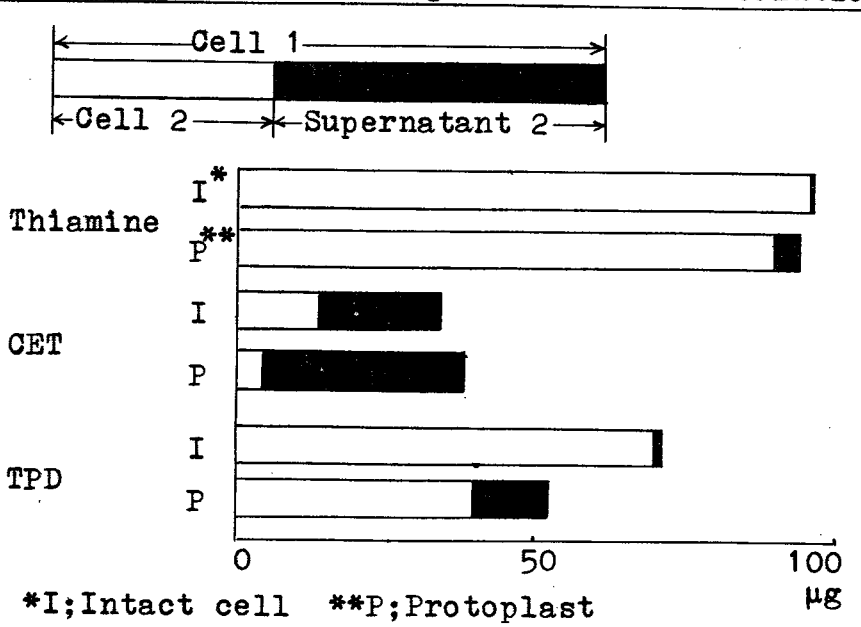
Suspended in 5 ml of Solution

Incubated at 30°C for 1 hour

Centrifuged

Cell 2 — Supernatant 2

Fig.32 **Release of Thiamine or Thiamine-derivatives from the Cells by the Washing with Isotonic Solution**



(2) 洗浄操作による集積物の流出（ Fig.31,32 ）

Simple diffusion により細胞内に移行したものは細胞を洗浄することによりふたたび Simple diffusion によつて細胞外に流出すると考えられる。そこで Fig.31 の操作にしたがつて Thiamine もしくはその誘導体を保有する細胞の洗浄を行ない各分画の Thiamine および誘導体量を測定した。Fig.30 と同条件で酵母細胞に Thiamine もしくは誘導体を接触させたのち細胞を多量の等張液にて洗浄した。最初の接触操作においては細胞は反応液の 1/3 を占めるが、洗浄操作においては全体の１／１００を占めるにすぎない。Cell 1 は洗浄前に細胞が保有していた Thiamine もしくは誘導体量、Supernatant 2 は洗浄により流出した量、Cell 2 は洗浄後の細胞が保有する量を示す。ＣＥＴ，ＴＰＤの場合 Cysteine 処理またはアルカリ処理を行なつて得た値のみを記した。Thiamine およびＴＰＤを添加した細胞からの洗浄による流出はごくわずかであるが、ＣＥＴを添加した細胞からは多量の流出が認められた（ Fig.32 ）。さらに流出したものを分離定量すると９５％がＣＥＴであつた。すなわちＣＥＴは Simple diffusion によつて原形質膜を出入りするために洗浄により流出し得るが、Thiamine は Active transport または独自の集積機構により細胞内にとりこまれるので洗浄により流出しないと考えられる。またＴＰＤは細胞内で容易に Thiamine に変化するため流出し得ないのであろう。

## 第4節　考察ならびに小括

### 考　　察

第3章でのべたようにＣＥＴ，ＴＰＤ添加培養菌のＴＤＰ含量はThiamine添加培養菌のそれよりも高く、これが増殖促進性の差となつてあらわれたと考えられる。このような高いＴＤＰ含量を示す原因としてThiamineとその誘導体の膜透過機構あるいは菌体内での存在部位に違いがあるのであろう。第3章に示したように増殖菌体中のThiamineは大部分原形質内に存在するが増殖初期においてThiamineまたはThiamine誘導体が菌体と接触したときそれが原形質内に透過する過程が問題となるがそれを追跡するのは困難である。本章ではThiamineまたはその誘導体を大量に短時間接触させて集積状態を観察し、第3章の実験成績と比較した。

酵母がThiamineを多量に集積する現象は古くからみとめられており、その集積量は増殖に要求される量をはるかにしのぐ量である。このようなThiamineの集積現象を検討することは増殖促進性とはまた別の問題として興味あることなので第1節においてKl.apiculataによるThiamineの集積について詳細に検討した。Kl.apiculataは2％Glucose溶液中pH 4.7，30°C 1時間の接触で菌体重量（乾燥物）の10％におよぶThiamineを集積した。このようにGlucoseが集積を促進することは鈴置[15]、棚瀬[43]らによつても報告されており、彼らの指摘したようにThiamineの集積は一種のActive transportと解釈される。市川ら[61]は清酒酵母に集積されたThiamineがThiaminaseの作用で分解されることを認め、Thiamineが酵母細胞壁の表面に付着して存在すると推定しているが、著者がKl.apiculataを用いて行なつた実験ではそのような現象は観察されなかつた。　しかしProtoplastを調製するとThiamineは大量に上清中に流出し、細胞を機

械的に破壊したときすべてのThiamineは可溶成分中に認められた。また菌に浸透圧変化を与えたとき、あるいは長時間醗酵させたときにも集積Thiamineの溶出がみとめられた。これらのことからThiamineは細胞壁表面に付着した状態で集積されたとは考えられず原形質膜より外側、おそらくは原形質膜と細胞壁の間に遊離な型で存在すると推定される。

Suomaleinen[62]らはパン酵母中のThiamineはほとんど原形質内に存在すると報告している。著者の実験でも第3章に記したように増殖至適量のThiamineを添加して培養した菌体のThiamineは13時間後には大部分原形質中に検出された。しかし短時間接触させたときにはTab.14に示したように集積量とは無関係にほぼ一定の比率で原形質内と原形質外にThiamineが存在した。したがつて培養時に添加されたThiamineは容易に菌体に集積されるが、集積されたものはその時点では原形質膜より外側に存在するのみで、その一部がしだいに原形質内に透過すると思われる。原形質膜と細胞壁の間にはAcid phosphataseが存在する[57]~[59]ので集積されたThiamineがすべて遊離型で存在することはうなづける。TDPを添加したときにもこのPhosphataseの作用でTDPはFree thiamineに変化して集積された。またProtoplastの調製によつてPhosphataseを除去するかあるいはモリブデン酸塩によつてPhosphataseを阻害するとTDPは集積されなかつた。この点から考えて酵母に多量のThiamineが集積されるにはFree thiamineの型が必要と思われる。

Thiamineを多量に集積した酵母は異常な状態にあるということができ、これを長時間醗酵させたときあるいは浸透圧変化を与えたときにはMB染色菌(死菌)が増し、これからProtoplastを調製すると不安定であつた。これらの事実は多量に集積されたThiamineが直接に原形質膜を害し、あるいはThiamineが溶出するときにも原形質膜に傷害を与えることを示唆する。

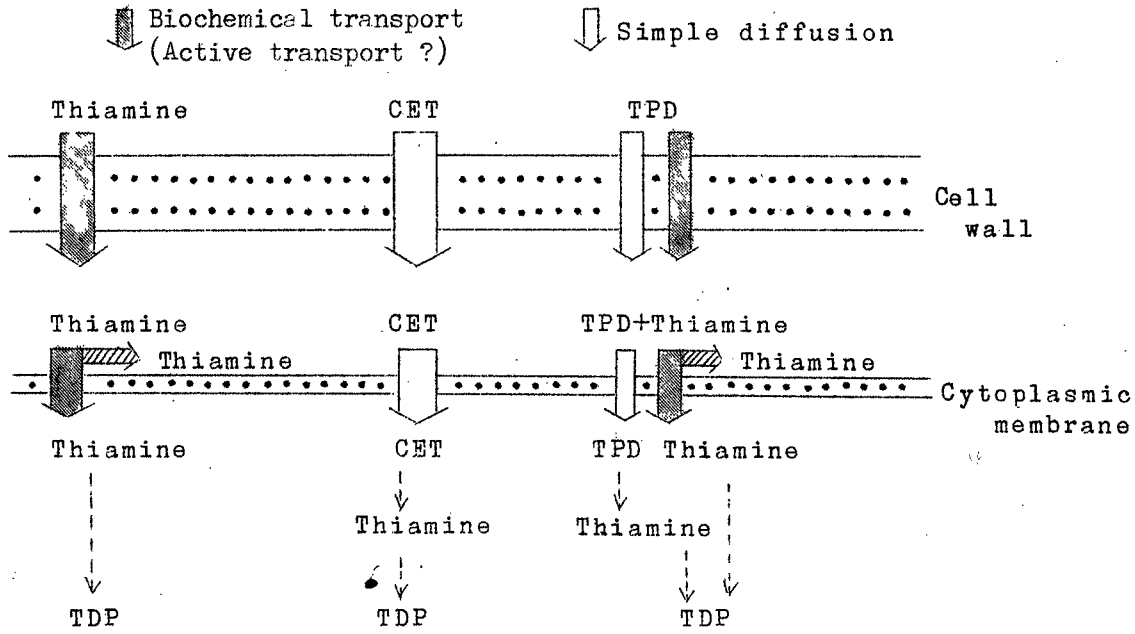
以上のようにThiamineはKl.apiculataにより多量に集積されるが、集積されたThiamineの大部分は原形質膜と細胞壁の間にFree thiamineとして局在し、集積されたThiamineが１００％増殖促進に役立つものではない。乳酸菌にThiamineを添加した場合Thiamineのとりこみ量は低く[6]、しかも菌体中のThiamineがＴＤＰとして存在するのに比べるとKl.apiculataによるThiamineの集積は他の微生物の場合と異なつた現象と思われる。

ＣＥＴおよびＴＰＤの集積を検討すると大量を短時間添加したときＣＥＴは濃度勾配に比例した細胞内移行量、洗浄による流出、Glucoseに無関係なとりこみなどの点からSimple diffusionによつて原形質内に移行すると考えられるが、Thiamineにみられたような菌体への異常集積はみとめられなかつた。ＣＥＴは大量添加したとき短時間ではProtoplast中に大部分ＣＥＴのまま検出されることからわかるように容易にはThiamineに変化しないのでＣＥＴの型でSimple diffusionにより膜を透過するのであろう。ＴＰＤはＣＥＴに比べThiamineに還元され易いのでThiamineとＣＥＴの中間的な態度を示した。このようにThiamine誘導体は菌体にとりこまれたときThiamineと共存するので単一物質の集積にはない複雑さがみられた。

以上大量のThiamineおよびThiamine誘導体の酵母による集積態度を検討した。この実験から培養時に少量のThiamineまたはThiamine誘導体が菌体と接触する時点の状態を考えることは必らずしも適切ではないが、一応Fig.33のような考察が可能である。大量添加実験ではＣＥＴの集積量はThiamineの集積量に比べ非常に低かつたが、増殖に至適な量が添加されたとき第３章で観察したように両者とも添加量がすべて菌体に集積された。著者が赤血球を用いて観察し報告したとおりThiamine誘導体を添加するとThiamine誘導体はSimple diffusionによつて細胞膜を透過するが、Thiamine誘導体が細胞内でThiamineに変化すれば流出が不能となり、細

胞内にとじこめられた形となるのでSimple diffusionによつて膜を透過したにもかかわらず、一見濃度勾配に逆らつた現象として観察され、高い細胞内移行量が測定される。[64] 今回の実験からＣＥＴをKl.apiculata に添加して培養したときにも同様なことが考えられる。ＣＥＴが安定であるためにThiamineと異なるSimple diffusionによる菌体への集積が起り原形質内に入り、ＣＥＴがThiamineに変化すれば原形質内のＣＥＴとしての濃度が低下するためそこに培地から新たにＣＥＴがSimple diffusionによつて透過する。このような現象を繰り返すことによつて最終的には添加されたＣＥＴのすべてが原形質内に集約されThiamineを経てＴＤＰに変化すると思われ、増殖が最大となつたときにはＴＤＰのみが検出された事実（第３章）をよく説明できる。しかしＣＥＴのThiamineへの変化がゆるやかなためＴＤＰの増加速度が遅く同調培養を行なうと対数増殖期の後期になつてはじめて高濃度のＴＤＰ含量となりThiamineとの増殖促進性の差を開くと考えられる。Thiamineを短時間接触させた細胞からProplastを調製するとその集積量の多少にかかわらず常にThiamineの一部は原形質膜の外側に、一部は内側に検出された。したがつて増殖に必要な最低量のThiamineが添加されたときにも原形質内への透過は制限されるので原形質膜と細胞壁の間にFree thiamineとして集積され、その一部が徐々に原形質内に透過してＴＤＰに変化するため原形質内のＴＤＰ含量はＣＥＴ添加時よりも低い値となると思われ、それ故にThiamineの増殖促進性はＣＥＴの増殖促進性よりも劣つたのであろう。一方ＴＰＤは容易にThiamineに変化するためThiamineとＣＥＴの中間的な機構をとると推定されるが、原形質内に透過してＴＤＰに変化し易い点でＣＥＴと同様である。またＣＥＴより速やかにThiamineに還元されるため速やかにＴＤＰ含量を増し、同調培養を行なうと対数増殖の初期にThiamineとの増殖促進性の差を開いたと思われる。

Fig.33
Transport of Thiamine,CET or TPD into Cells of Kl.apiculata



以上とくにＣＥＴとThiamineを中心としてそれらの菌体への透過機構を考察したが、最少量添加時にはＣＥＴがThiamineに比べ原形質内に透過し易く増殖中に原形質内のＴＤＰ含量を容易に高めることが増殖促進性においてThiamineとの差を生じた原因であると説明できる。

## 小　　括

(1) Kl.apiculataは２％Glucose溶液中３０℃，pH 4.7，１時間の接触で乾燥菌体重量の約１０％のThiamineを集積した。

(2) 集積されたThiamineはThiaminaseの作用を受けず、Protoplastの調製、浸透圧変化、機械的細胞破壊、長時間の醗酵などによつて大部分が溶出した。

(3) Thiamineを多量に集積した酵母はProtoplastを調製したとき不安定で、浸透圧変化を与えたときあるいは長時間醗酵させたときＭＢ染色菌（死菌）が増大した。

(4) Kl.apiculataはＴＤＰをFree thiamineに変化させて集積し、Phosphatase作用が除かれるとＴＤＰを集積することができなかつた。

(5) ＣＥＴ，ＴＰＤを大量に短時間菌体と接触させると集積量はThiamineに比べると低い値であつたが、ＣＥＴはSimple diffusionによつて原形質膜を透過することが示された。

(6) 以上からFig.33の透過経路を推定し、ＣＥＴの高い増殖促進性の原因がThiamineとは異なつた膜透過機構にあることを証明した。

# 第5章　総括および結論

## 第1節　総　　括

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つて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 Oxy－thiamine によつてThiamineの場合より強く阻害された。しかしThia－mine 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つ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つ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 pH 4.7 , 30 ℃ , 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つた。Thiamine を集積した Kl. apiculata に 0.8 M 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（Cocarboxylase）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つて TDP が Thiamine に変化したものである。Protoplast を調製することによつて 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によつ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によつ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。

## 第2節　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つ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の調製によつて溶出する。多量のＣＥＴを用いたときThiamineに比べ集積が悪いがSimple diffusionによつ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に変化するのにたいして、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つて現れるものとして説明できる。

本研究にあたり終始親切なご指導と本文のご校閲を賜わりました恩師川崎近太郎先生に厚くお礼申し上げます。

研究途上、適切なご助言をいただきました近藤雅臣先生、平岡栄一先生、金沢大学岡田幸蔵博士、静岡薬科大学富田勲博士ならびに衛生化学教室の皆様に感謝いたします。また試料をご分与いただきました本学工学部照井堯造教授、武田薬品工業、塩野義製薬、大和化成にお礼申し上げます。

# 参　考　文　献


1) Lilly,V.G., Barnett, H.O., Anderson, B.g.: Science 118, 548 (1953)

2) 藤原：ビタミン21, 477 (1960)

3) 川崎、平岡，島本：ビタミン 24, 27 (1961)

4) 川崎，山田：ビタミン 28,290 (1963)

5) 川崎，平岡，島本：ビタミン 28, 541 (1963)

6) 川崎，市川：ビタミン 投稿中

7) J. Suzuoki, T. Suzuoki: J. Biochem. 40, 11 (1953)

8) T. Tamaki, Y. Nose: J. Vitaminol. 1, 85 (1955)

9) 原田，河野，大良，斉藤，内海：ビタミン32, 464 (1965)

10) 森田，峰下：ビタミン 33, 67 (1966)

11) 川崎，富田，篠田：ビタミン 28, 310 (1963)

12) 川崎，永山：ビタミン 28, 305 (1963)

13) 藤井，川崎，能勢：ビタミン 35, 499 (1967)

14) 黒木：ビタミン 13, 275 (1957)

15) J. Suzuoki: J. Biochem. 42, 27 (1955)

16) 福井，大石，前田：ビタミン 35, 501 (1967)

17) 島本，花岡，馬場，平岡：ビタミン 35, 501 (1967)

18) 川崎，平岡，島本：ビタミン 28, 295 (1963)

19) 林，中山，坪田：ビタミン 25, 531 (1962)

20) 福井，谷，前田：ビタミン 25, 536 (1962)

21) 川崎，篠田：ビタミン 28, 299 (1963)

22) 川崎，篠田：ビタミン 30, 289 (1963)

23) Hoff— Jørgensen, H.,Hansen, B.: Acta, Chem. Scand. 9, 562 (1955)

24) 上原，堀井：ビタミン 25, 530 (1962)

25) 森田，峰下：ビタミン 33, 72 (1966)

26) N. Sando: J. Gen. Appl. Microbiol. 9, 233 (1963)

27) Y. Murayama, T. Yanagita: J. Bacteriol. 11, 542 ( (1956)

28) 川崎，小野，篠田：ビタミン 25, 520 (1962)

29) 山本，稲津，島：ビタミン 25, 498 (1962)

30) 川崎，篠田：ビタミン 36, 541 (1967)

31) Sakuragi, T.: Arch. Biochem. Biophys. 74. 362 (1958)

32) 平岡，島田：ビタミン 23, 213 (1961)

33) 川崎，山田，伊藤，倉田：ビタミン 32, 323 (1965)

34) 川崎，野瀬，篠田：ビタミン 36, 393 (1967)

35) L. Guiseppe, G. Rindi: Intern. Z. Vitaminforsch 22 (1964)

36) 川崎，岡田，藤田：ビタミン 30, 354 (1964)

37) 岩島，植村，増田：ビタミン 34, 490 (1966)

38) 平岡，紀氏：ビタミン 35, 500 (1967)

39) 峰下，村岡：ビタミン 35, 69 (1967)

40) 川崎，篠田，小野：ビタミン 36, 535 (1967)

41) Micias. R,. F. M.: Appl. Microbiol. 5, 249 (1957)

42) 川崎，篠田，小野：ビタミン 36, 530 (1967)

43) 棚瀬，岡田：農化 27, 534 (1953)

44) Eijkmann: J.Biol. Chem. 50, 312 (1922)

45) 高田，市川：ビタミン 7, 535 (1945)

46) 小林,高田:ビタミン 30, 381 (1964)

47) Fink — Kuhles: Allg. Brau. Hopf. 70, 1481 (1930)

48) 田端,照井:醱工 40, 366 (1962)

49) 田端,照井:醱工 41, 390 (1963)

50) 田端,照井:醱工 43, 766 (1965)

51) Eddy, A.A., Williamson, D.H.: Nature 179, 1252 (1957)

52) Mendoza, C.G., J.R. Villanueva: Nature 195, 1326 (1962)

53) Gascon,S., A.G. Ochoa, J.R. Villanueva: Can J. Microbiol. 11, 573 (1965)

54) 田端,今井,照井:醱工 43, 221 (1965)

55) Ohnishi, T., K. Kawaguchi, B. Hagihara: J. Biol. Chem. 241, 1797 (1966)

56) Schultz, A.S., L. Atkin, C.N. Frey: J. Am. Chem Soc. 59, 2467 (1973)

57) Suomaleinen, H., M. Linko, E. Oura: Biochim. Biophys. Acta 37, 482 (1960)

58) Mclellan, W.L. Jr., J.O. Lampen: Biochim. Biophys. Acta. 67, 324 (1963)

59) Scnmidt,G.,G. Bartsch, M.Laumont, T.Hermann, M. Liss : Biochemistry. 2, 126 (1963)

60) Steyn— Parve, E.P.: Biochim. Biophys. Acta 64, 13 (1962)

61) 小野,市川:ビタミン 7, 1024 (1954)

62) Suomaleinem, H.,T. Nurminen, E.Oura: Arch. Biochem Biophys. 118, 219 (1967)

63) 林:ビタミン 35, 405 (1967)

64) 川崎,篠田:ビタミン 29, 255 (1964)

全論文別刷

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (VII) S-Carbalkoxythiamineの微生物活性 (2)

大阪大学薬学部

川崎近太郎・篠田純男

ビタミン 第28巻 第4号 別冊

昭和38年10月25日発行

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (VII) S-Carbalkoxythiamineの微生物活性 (2)

大阪大学薬学部
川崎近太郎・篠田純男

# THE GROWTH-STIMULATING ACTIVITY OF THIAMINE DERIVATIVES ON THIAMINE-REQUIRING MICROORGANISMS

## (VII) S-CARBALKOXYTHIAMINES (2)

Chikataro KAWASAKI, and Sumio SHINODA
School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

Carbethoxythiamine (I) and carbobutoxythiamine (II) were both more absorbed by cells of *Kloeckera apiculata* than dicarbethoxythiamine (III), when an equimolar amount of each compound was incubated with a suspension of *Kloeckera* cells in saline. Thiamine-HCl was almost completely absorbed by *Kloeckera* cells on the same condition but it was not absorbed by heat-sterilized cells, while (I), (II) or (III) showed better absorption to sterilized cells than thiamine-HCl. (I) was always more active in stimulating the growth of *Kloeckera*. This was proved not only by comparison of optical densities of the brothes but also by that of dry weights and nitrogen contents of the cells after incubation although the thiamine content of *Kloeckera* cells corresponding to (I) was not proved to be higher than that to thiamine.

CET*1) が$B_1$要求性の酵母 *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630にたいして$B_1$-HCl相当量より強い増殖効果があり，CBT*2) は$B_1$より劣りDCET*3) はほとんど増殖効果がないことはすでに報告された[1]．$B_1$誘導体は$B_1$に分解されてから活性を示すのであるから本来は$B_1$と同等あるいはそれ以下の$B_1$活性を示すべきである．CETが*Kl. apiculata*にたいして$B_1$より優れた効果を示す原因を知るために*Kl. apiculata*にたいする態度を検討した．

## 実験方法および試料

### (1) 試　料

CET，CBTおよびDCETは塩野義研究所より送付された結晶を用いPPC*4) により$B_1$その他の混在は認められなかつた．

### (2) *Kl. apiculata*の培養

*Kl. apiculata*による$B_1$定量用培地[2] (培地*A*) またはReader培地[3]に0.5%の濃度に乾燥酵母エキスを加えたもの(培地*B*)を用いた．

### (3) 菌体による$B_1$集積量の測定

培地*A*または*B*で培養して得た菌体を遠沈し生理食塩水で2度洗浄したのち生理食塩水に懸濁しその一定量に*M*/10酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.7) 1 *ml*を加え，$B_1$またはCET液を加えて生理食塩水で全量5*ml*とし，30℃で一定時間保温後遠沈して上清と菌体に分けた．菌体は生理食塩水で2度洗浄して洗液は上清に合してつぎの操作を行なつた．

*a*) 菌体に0.1*M* 硫酸5 *ml* を加え5分間煮沸抽出後pH 5に調整し2%タカジアスターゼB液1 *ml* を加え45℃，2時間保温後水を加えて一定量とし，遠沈して上澄液を検液とした．

*b*) 上清部はpH 5に調整し1%タカジアスターゼB液1 *ml*を加え45℃，2時間保温後水を加えて一定量とし検液とした．

*a*) *b*)で得た検液を高濃度のタカジアスターゼ処理[4]またはアルカリ処理[5]によりCETを$B_1$に分解してから

*1) CET＝S-Carbethoxythiamine
*2) CBT＝S-Carbobutoxythiamine
*3) DCET＝O,S-Dicarbethoxythiamine
*4) PPC＝Paper partition chromatography

パームチット処理を行なつて常法通りBrCN法により$B_1$量を定量した．CBT，DCETもCETと同様に処理して定量した．

(4)　菌体重量の測定

遠沈し集めた菌体を2度生理食塩水で洗浄し，90℃，2時間乾燥後秤量した．

(5)　菌体蛋白質の測定

Kjeldahl法により窒素量を測定し，6.25を乗じて蛋白質量とした．

## 実　験　成　績

### (1)　$B_1$およびCETその他の*Kl. apiculata*による集積

$B_1$およびCETの33.7μg$B_1$-HCl*E*[*5]を培地Bで培養して得た菌体（湿菌重量700mg）の浮遊液に添加し15分，30分，60分，120分，5時間および18時間後の菌体による集積量を測定し図1の結果を得た．15分でCETは添加量の約69%，$B_1$は84%が菌体に集積され，CETは1～2時間で最高の集積を示したが以後しだいに集積量が減少した．つぎにCET，CBT，DCETおよび$B_1$を1時間菌体に接触したときの集積量を測定し，同時に10分間煮沸した菌体による集積も検討した（図2）．その結果CETとCBTは集積量にほとんど差がなく死菌によつてもいくらか集積されたが，生菌によりひじように多量集積される$B_1$は死菌にはまつたく集積されなかつた．

### (2)　CET，CBTおよび$B_1$集積菌の増殖

前実験においてCETは生理食塩水中で*Kl. apiculata*の菌体により集積されたが，この菌体を抽出してPPCを行なうと2時間程度の保温ではCETが菌体中に残存することを認めた．また上清中には$B_1$は認められず，CETのみが存在していた．すなわちCETは菌体外では$B_1$とならず菌体内にとりこまれてから$B_1$に分解されると考えられる．同様なことが培地に添加したCETについても考えられるのであらかじめCET，CBTおよび$B_1$を集積した菌体の培養を行なつた．生理食塩水中で培地*A*により得た菌体（乾燥重量約100mg）にCET，CBTおよび$B_1$の$10^{-2}$μモルを30℃で30分間接触させたところいずれも95～98%が集積されたので添加量全量が菌体に集積されたとみなした．この菌体を培地*A*で希釈して0.02，0.04，0.06，0.08，0.1μg$B_1$-HCl*E*/tubeのCET，CBTおよび$B_1$の集積菌液として18時間静

図1　*Kl. apiculata*によるCET，$B_1$の集積
添加量　$10^{-1}$μモル（33.7μg$B_1$-HCl*E*）

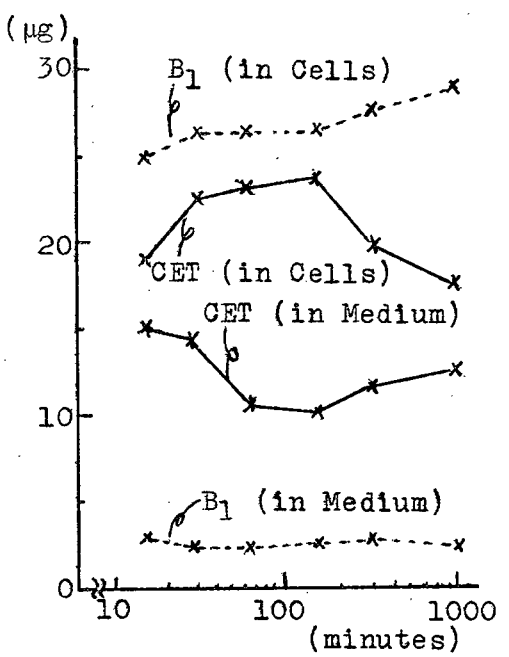
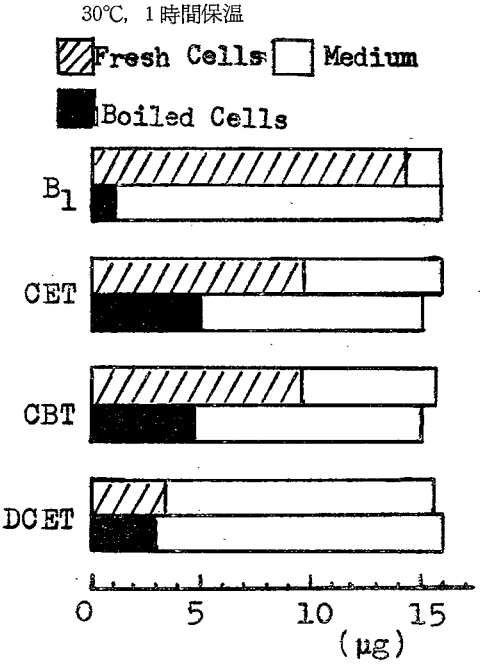



図2　CATおよび$B_1$の集積量の比較
添加量　$5\times10^{-2}$μモル（16.9μg$B_1$-HCl*E*）
30℃，1時間保温




*5)　$B_1$-HCl*E*＝$B_1$塩酸塩相当量

図3　*Kl. apiculata*にたいする活性
(1) 集積菌培養

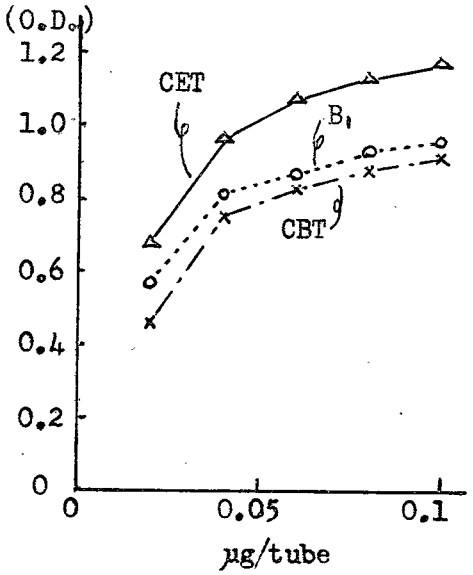
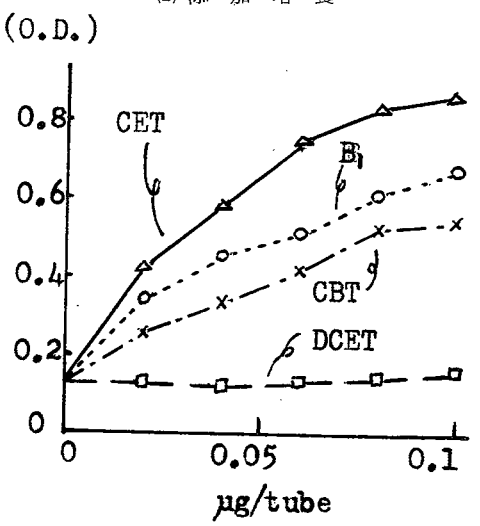



図4　*Kl. apiculata* にたいする活性
(2) 添加培養

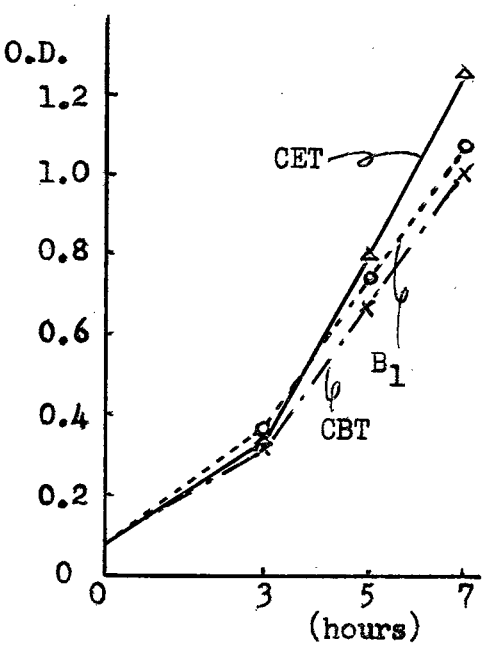



置培養した(図3). なお対照として通常の培養方法[1)2)](添加培養)によつても行なつた(図4). 図示のように集積菌培養でも添加培養でも CET がもつとも活性が高く，以下$B_1$>CBT>DCETの順となつた.

### (3) CETおよびCBT の増殖菌体中存在形の検出

CET と CBT の活性の差は増殖菌体中の菌体による$B_1$への分解速度の差に一因があるのではないかと考えBioautography により増殖中の菌体内の存在形の検出を試みた. 培養初期の菌体について検討するために培養は集積菌の振とう培養(72*rpm*)を行ないできるだけ大量の菌体を得た. 0, 3, 5, 7 時間後の OD[*6)] を測定してから(図5)，遠沈して菌体を集め生理食塩水で2回洗浄し 0.1*N* 硫酸で5分間90～95℃ で抽出し抽出液のPPCを行ないさらに *Kl. apiculata*を用いる Bioautography[1)]により検出した(図5). 図示のように CET, CBT ともに5時間以上の培養でほぼ完全に$B_1$に分解されており，CET と CBT の間に分解速度の著明な差はなかつた. なお0時間でもかなりの$B_1$が検出されたが培養開始までに CETおよび CBT を生理食塩水中で菌体に接触させているのでこのあいだに$B_1$に分解したものと思われる.

図5　CET, CBTおよび$B_1$集積菌の増殖
添加量 0.1μg $B_1$-HCl*E*/tube



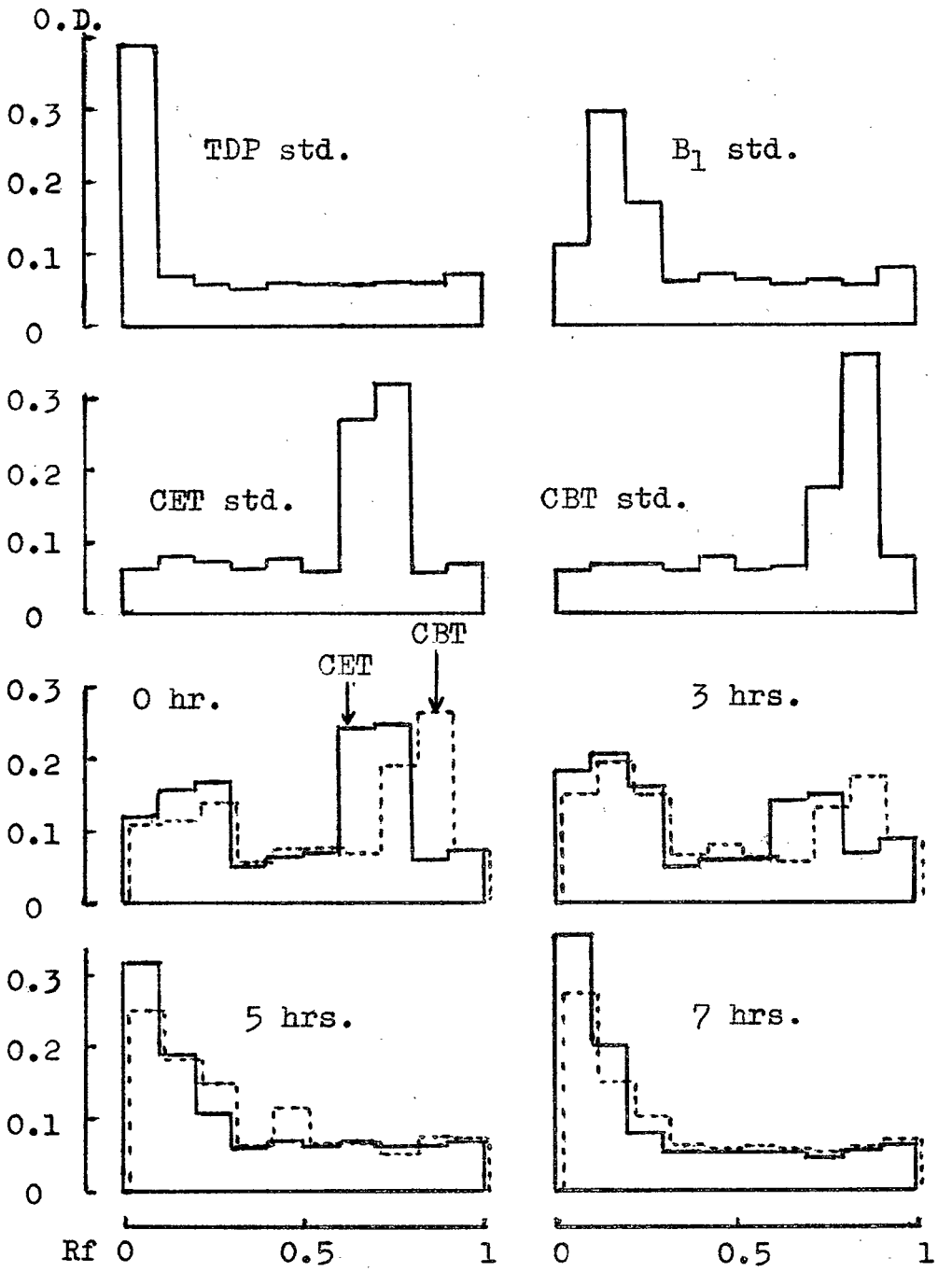

### (4) 菌体重量および蛋白質量の測定

従来菌の増殖度は610mμにおける OD を測定し OD の高いことから CET が$B_1$より強い活性を示すとしてきた. しかし菌の形態に変化があるとき同一の菌量で

*6) OD = Optical density

図6　Bioautographyによる CETおよびCBTの菌体中存在形の検出

展開溶媒：酢酸・*n*-ブタノール・水＝1：4：5
使用菌株：*Kloeckera apiculata*



も異なつたODを示すことが考えられる．CETとB1の活性の差をさらに明確にするために菌体量および蛋白質量の測定を行なつた．

CET, CBTおよびB1の0.5μg B1-HCl Eを含む培地A 40mlに菌を接種し，30℃で18時間培養後ODを測定し遠沈し，洗浄して菌体を集め乾燥後菌体重量および蛋白質量を測定した（表1）．この結果OD，菌体重量および蛋白質量のいずれもCET>B1>CBTの順となり，明らかにCETを添加して培養すれば大量の菌体が生産されることがわかつた．

### (5) 増殖後の菌体中B1量の測定

一般に酵母はB1を合成する能力を持つが *Kl. apiculata* のB1合成力がきわめて弱い．CETを添加すると菌のB1合成力が増してその結果菌の増殖がよくなることが考えられる．B1およびCETの10μgB1-HCl Eを含む培地A 400mlに菌を接種し18時間静置培養して得た菌体の乾燥重量および総B1量の測定を行なつた．結果は表2に示すとおりB1，CETのいずれを添加して培養してもB1量は添加量からほとんど増加せず，一方乾燥重量はCETを添加したばあいの方がはるかに多く，したがつて単位菌体あたりのB1量はB1を添加したばあいの方が多かつた．

## 考　　察

増殖後の菌体重量および蛋白質量の測定結果からCETを添加培養したとき，B1のばあいより増殖度の大であることは明らかである．

酵母がB1を集積することは多くの著者[6)7)8)]が認めるところであるが，菌体によるCETの集積量はB1より少なくCBTとほぼ等しかつた．したがつてCETがとくに増殖促進効果が優れているのは菌体への集積が容易であるためとは考え難い．図5，6においてCETは増殖を開始してからもなお菌体中に存在し，低い増殖促進効果しか示さないCBTと同じ速度でB1に分解されることからCETはB1としての効果だけでなく，他の増殖促進因子としても働くことが推察される．また増殖後の菌体が含む総B1量はCET，B1のいずれを添加したばあいでも添加量にほぼ等しく菌自身によるB1の合成はほとんど認められなかつた．CETは菌体内でB1に徐々に加水分解されるからCETがB1より優れた増殖効果を持つ原因としてCETのCarbethoxy基が意義を有すると思われるので今後の検討が必要である．

## 結　　論

1) *Kl. apiculata* の生理食塩水の浮遊液にB1誘導体を加え30℃で放置するときB1は容易に菌体中に集積されるが，CET=CBT>DCETの順で集積されB1に比べはるかに量が少ない．菌体を煮沸殺菌するとB1は集積されずCETおよびCBTはいくらか集積された．

2) CETおよびCBTはそのまま菌体にとりこまれ3～5時間の培養で徐々にB1に変化することをBioautographyで証明した．

3) CETがB1より強い増殖促進効果のあることを濁度による比較だけでなく，菌体重量および蛋白質量の測定によつても確認した．

4) 増殖後の菌体が含むB1量はB1，CETいずれを添加したばあいでも添加量にほぼ等しくB1の合成力はき

表1　静置18時間培養後の菌体重量および蛋白質量

添加量　0.5μgB1-HCl E/40ml

| | OD | A. 乾燥菌体重量 (mg) | B. 総蛋白質量 (mg) | B/A |
|---|---|---|---|---|
| B1 | 0.83 | 14.6 | 8.48 | 0.57 |
| CET | 1.17 | 27.2 | 14.73 | 0.55 |
| CBT | 0.79 | 13.2 | 7.67 | 0.60 |

表2　静置18時間培養後の菌体中B1量

添加量　10μg B1-HCl E/400ml

| | OD | A. 乾燥菌体重量 (mg) | B. 総B1量 (μg) | B/A |
|---|---|---|---|---|
| Blank | 0.16 | 21.5 | 0.62 | $2.9\times10^{-2}$ |
| B1 | 0.86 | 168.0 | 11.51 | $6.8\times10^{-2}$ |
| CET | 1.14 | 275.5 | 11.02 | $3.9\times10^{-2}$ |

わめてはずかである.

5) 以上の知見からCETはB1に変化して増殖効果を示すだけでなく増殖初期にはCETとして菌体に存在するのでCETそのものが増殖促進性を有するものと推察される. (昭38.7.29.受理)

なお終始ご指導下さいました武庫川女子大学岡田幸蔵博士に深謝いたします.

## 文　献

1) 川崎・平岡・島本：ビタミン **25**, 533 (1962); **28**, 295 (1963)
2) 川崎・平岡・島本：ビタミン **22**, 387 (1961)
3) 入谷：ビタミン **24**, 37 (1961)
4) 川崎・小野・篠田：ビタミン **25**, 520 (1962)
5) 山本・稲津・島：ビタミン **25**, 478 (1962)
6) Eijkman : J. Biol. Chem. **50**, 312 (1922)
7) 棚瀬・岡田：農化 **27**, 534 (1953)
8) 高田：ビタミン **7**, 535 (1954)

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (XI) Carbalkoxythiamine と Thiamine propyldisulfide の *Kloeckera apiculata* にたいする活性

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男

ビタミン 第30巻 第4号 別冊

昭和39年10月25日発行

# ビタミンB1誘導体の微生物活性

## (XI) Carbalkoxythiamine と Thiamine propyldisulfide の *Kloeckera apiculata* にたいする活性

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男

# THE GROWTH STIMULATING ACTIVITY OF THIAMINE DERIVATIVES ON THIAMINE REQUIRING MICROORGANISMS

## (XI) ACTIVITY OF CARBETHOXYTHIAMINE AND THIAMINE PROPYLDISULFIDE ON *KLOECKERA APICULATA*

Chikataro KAWASAKI and Sumio SHINODA

School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

Either carbethoxythiamine (CET) or thiamine propyldisulfide (TPD) is stronger in stimulating the growth of *Kloeckera apiculata* than equimolar thiamine-HCl, but the mode of action is different : CET, when preincubated with Taka-enzyme in the broth, showed the same growth stimulation as that with thiamine or Taka-enzyme treated carbobutoxythiamine. TPD, when preincubated with cysteine in the broth, stimulated the growth better than thiamine with cysteine. TPD, if preincubatad with a suspension of *Kloeckera* in saline, is easily reduced to thiamine and the yeast centrifuged showed the same growth as that preincubated with thiamine. As shown previously, CET is adsorbed in *Kloeckera* as CET and the adsorbed yeast showed better growth than thiamine-adsorbed yeast. CET itself gradually reverted into thiamine in the yeast, while TPD when it was added to the broth was quickly reduced to thiamine and yet it is more effective in stimulating the growth than thiamine. Growth-stimulating effects of the two compounds seemed to be based on different mechanisms.

CET*1) は $B_1$ 要求性酵母 *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630 の増殖を $B_1$-HCl より強く促進する．著者らはこの原因を探ぐるためCETの *Kl. apiculata* にたいする種々の態度を調べ報告した[1)2)]．TPD*2) などの非対称型 $B_1$-disulfide誘導体はCETと同じく *Kl. apiculata* の増殖を $B_1$ より強く促進する[3)]．CETとTPDの酵母にたいする態度を比較したので報告する．

## 実験方法

### (1) *Kl. apiculata* の培養

川崎ら[4)] の方法により Hoff-Jφrgensen[5)] の改良培地 2 ml に試料を無菌的に加え全量 4 ml とし，菌液を 1/3 皮下注射針により接種して30℃，20時間培養後日立光電比色計を用いて610mμ における濁度 (OD) を測定した．

### (2) 試料

$B_1$, CET, CBT*3) および TPD はすべて塩酸塩を無菌蒸留水に溶かして用いた．

## 実験成績

### (1) タカジアスターゼ処理したCET, CBTおよび$B_1$の活性

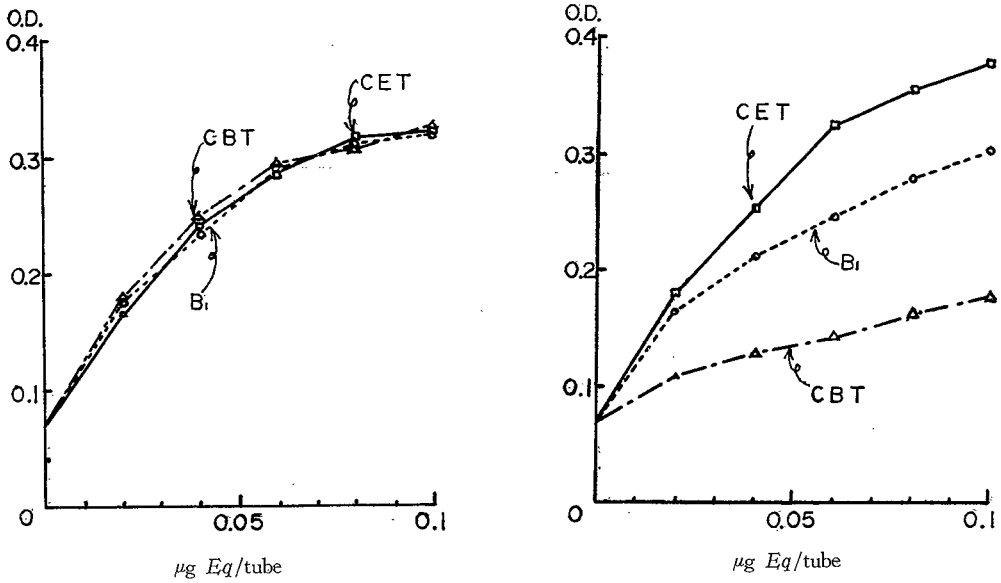
CET および CBT はタカジアスターゼにより $B_1$ に復帰するので[6)7)]，あらかじめタカジアスターゼの作用により $B_1$ に復帰せしめておいてから菌を接種したばあいの CET および CBT の活性を $B_1$ と比較した．培地 2 ml に CET, CBT または $B_1$ 0.02～0.1μg *Eq**4) を加えタカジアスターゼB液（酸性白土処理により $B_1$ を除いたもの）を終濃度 250mg% となるよう加え全量 4 ml として 37℃, 24時間保温後 100℃, 15分間滅菌（タカジアスタ

*1) CET = S-Carbethoxythiamine　*2) TPD = Thiamine propyldisulfide　*3) CBT = S-Carbobutoxythiamine

図1　タカジァスターゼ処理をしたCET, CBTおよびB₁の *Kl. apiculata* にたいする活性

(a)　250mg%タカジァスターゼで37℃, 24時間処理後菌を接種

(b)　タカジァスターゼ処理をせずに菌を接種

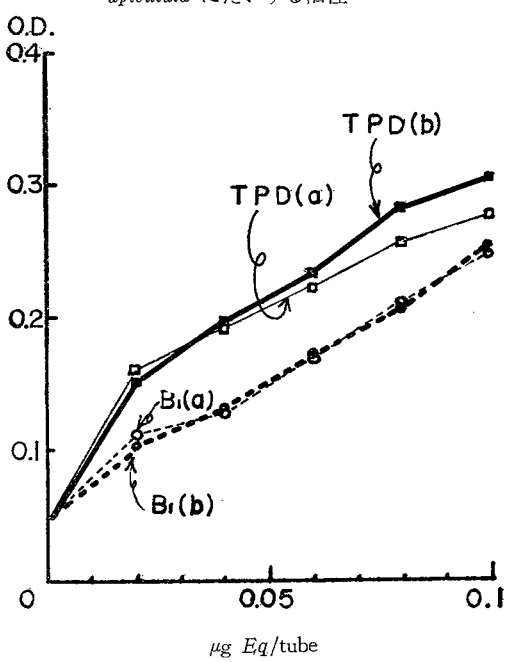



ーゼ中の雑菌を殺すため）し，冷後菌を接種した(図1-a)．また対照は培地にタカジアスターゼを加え試料を加えずに保温後滅菌し冷後試料を加えて菌を接種した(図1-b)．タカジアスターゼ処理しないときの活性はCET>B₁>CBTの順となつたがタカジアスターゼを用いてB₁に復帰せしめておくと3者はまつたく同じ活性を示した．

## (2)　システイン処理をしたTPDの活性

培地2 mlにCySH*5)-HClを終濃度50mg%になるように加えて滅菌し試料を加えて全量4 mlとして60℃, 30分間保温しTPDをB₁に復帰せしめたのち菌を接種し30℃, 20時間培養した(図2-a)．また対照は60℃, 30分間の保温を行なわずに菌を接種した(図2-b)．TPDはCETと異なり菌体外でB₁に復帰していてもなおB₁より高い活性を示した．なおTPD 1 μg *Eq*について本実験と同条件でCySH処理を行なつたところB₁生成率は102%であつたので図2-aに示したTPDはCySH処理で完全にB₁に復帰していたといえる．またCySHは*Kl. apiculata*の増殖を阻害するがこの濃度では阻害はわずかであつた．

図2　CySH処理したTPDおよびB₁の *Kl. apiculata* にたいする活性




(a)　50mg% CySH添加培地で60℃, 30分処理後菌を接種

(b)　CySH処理せずに菌を接種

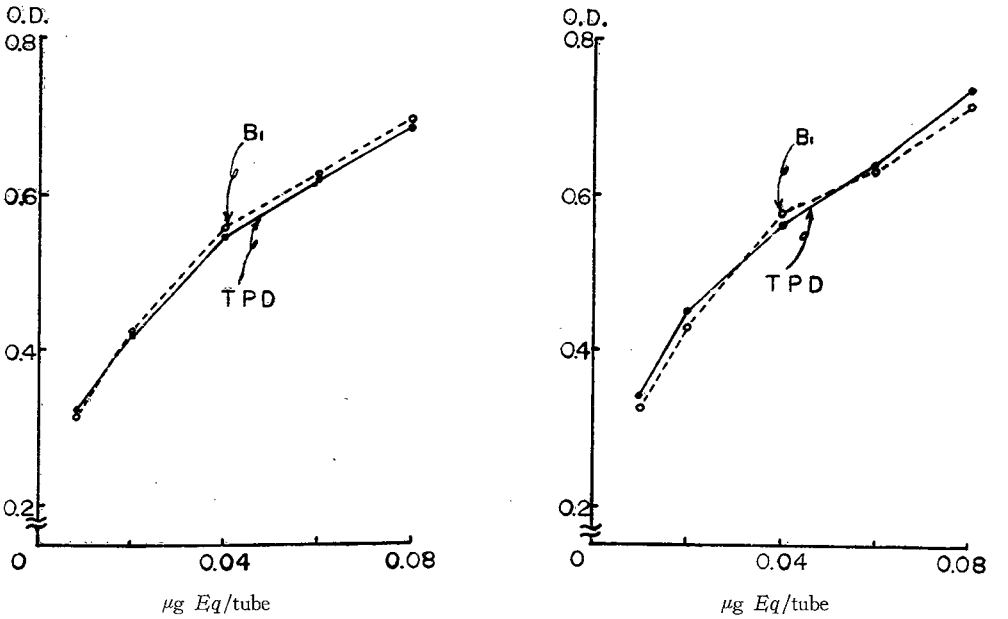
*4)　μg*Eq*＝μgB₁-HCl相当量

*5)　CySH＝Cysteine

図3　TPDまたはB₁を集積した *Kl. apiculata* の増殖

(a) 生理食塩水で集積遠沈して菌体を集め洗浄後培地で希釈

(b) 生理食塩水中で集積後遠沈をせず菌体の生理食塩水懸濁液のまま培地で希釈



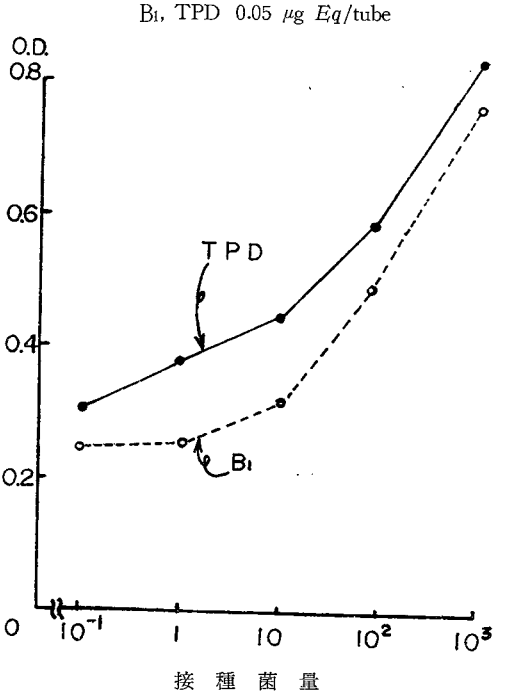

### (3) TPDまたはB₁を集積した菌体の増殖

CETは生理食塩水中で菌体に接触させると菌体にとりこまれ，この菌体を培地で希釈し培養すると同様に操作したB₁より高い活性を示す[2]．TPDについて同様の検討を行なつた．菌体(乾燥重量として30mg)の生理食塩水浮遊液にTPDまたはB₁ 10μg *Eq*を加え生理食塩水で全量5 m*l*として30℃，30分間保温した．この操作で添加したTPDおよびB₁は完全に菌体に集積されTPDはB₁に還元された．この菌体浮遊液を一部は遠沈して菌体を集め，菌体を生理食塩水で2度洗つたのち培地で希釈し（図3-a)，他の一部は遠沈せずそのまま培地で希釈して（図3-b)，それぞれ0.01～0.08μg *Eq*/tubeの集積菌液として30℃，20時間培養した．TPDは生理食塩水中で菌体に集積されたとき遠沈洗浄操作の有無にかかわらずB₁と同じ活性しか示さずCETとは態度を異にした．

### (4) TPDおよびB₁の *Kl. apiculata* にたいする活性：接種菌量の影響

(3)においてTPDがB₁と同じ活性しか示さなかつた原因のひとつとして通常の培養方法よりも接種菌量が多いことがあげられ，また *Lactobacillus fermenti* 36

図4　TPD, B₁の *Kl. apiculata* にたいする活性
接種菌量の影響
B₁, TPD 0.05 μg *Eq*/tube



において接種菌量の少ないほどTPDとB₁の活性の差があらわれやすい事実[8]があるので接種菌量の影響をしらべた．B₁またはTPD 0.05μg *Eq*を含む培地に通常の接種菌量の1/10～10³倍の菌を接種し30℃，20時間培養した(図4)．(3)における菌量は通常の菌量の約10～100倍であつたがこの範囲ではTPDはあきらかにB₁より高い活性を示した．

### (5) 菌体浮遊液によるTPDおよびCETのB₁への復帰

菌体(乾燥重量として約10mg)の生理食塩水浮遊液にTPDまたはCET 10μg *Eq*を添加しpH 4.7，30℃で保温し，一定時間後10%メタリン酸5 *ml*を加えて反応を止め，10分間水浴上で煮沸して菌体中B₁を抽出し遠沈後上清を用いて遊離B₁量および総B₁量（TPDおよびCETを含めたものを意味しTPDはCySH処理，CETはアルカリ処理[7]を行なつてB₁としてから求めた）をBrCN法により測定した（表1）．TPDはほぼ完全にB₁に復帰したがCETのB₁への変化はごくわずかで両者間に大きな差がみられた．

表1　菌体浮遊液によるTPDおよびCETからのB₁生成
TPD, CET：10μg *Eq*
菌体：10mg(乾燥重量)
全量：5 *ml*, 30℃, pH 4.7

| 保温時間(分) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TPD | 11%<br>(98)* | 96%<br>(94) | 95%<br>(96) | 97%<br>(96) | 98%<br>(98) | 94%<br>(96) |
| CET | 0<br>(96) | 7<br>(95) | 7<br>(99) | 8<br>(96) | 9<br>(100) | 12<br>(94) |

*（　）内は総B₁量(ただしTPDまたはCETを含めた値を示す)

## 考　　察

TPDおよびCETはともに*Kl. apiculata*の増殖をB₁より強く促進するが両者の*Kl. apiculata*にたいする態度には異なる点がみられた．CET，CBTは菌体外でB₁に復帰せしめたときB₁と同じ活性となるがTPDは菌体外でB₁復帰していてもB₁より強い活性を示した．両者ともにB₁になつてはじめて活性を示すのであるからB₁に復帰することにより生じたPropylmercapto基もしくはCarbethoxy基が活性に有効であると考えられるが著者の実験成績からPropylmercapto基は菌体外で，Carbethoxy基は菌体内で有効であるといえる．しかしここで注意すべきはCETをタカジアスターゼ処理したのち加熱滅菌したことで，もしCarbethoxy基が加熱操作で揮散してしまうならば上の推論は成りたたない．タカジアスターゼ中の雑菌による汚染を防ぐためタカジアスターゼ処理後滅菌したが，これはCET分解酵素を無菌的に作用させて比較することにより解明しうるであろう．逆に生理食塩水中でCET，TPDをとりこんだ菌体を培地で希釈するとCETはB₁より活性が高い[2]のにたいし，TPDはB₁と同じ活性しか示さない．これは(5)で示したようにTPDが生理食塩水中で菌体との接触により容易にB₁に復帰することが関連しているようであり，培地中で還元したときにはTPDがB₁より強い活性を示すことと著しい対比をなすものである．CETは生理食塩水中ではひじようにB₁に復帰しにくいが培地中で菌が増殖状態にあるとき徐々にB₁に戻る[1)2)]．以上のようにTPDとCETは*Kl. apiculata*にたいする態度にかなり差がみられ，次報で述べるようにB₁拮抗体による阻害の程度にも違いがみられる．両者はともに*Kl. apiculata*の増殖をB₁より強く促進するが，それぞれ異なつた機構によるものであると考えられる．

## 結　　論

TPD，CETはともに*Kl. apiculata*の増殖をB₁より強く促進するがつぎのような異なつた態度を示した．

(1) CETは菌体外でタカジアスターゼによりB₁に復帰したときB₁と同じ活性を示す．

(2) TPDは菌体外でCySHによりB₁に復帰したときもなおB₁より強い活性を示す．

(3) 生理食塩水中で菌体にとりこまれたTPDは培地で希釈して培養したときB₁と同じ活性しか示さないが，同様の操作をしたばあいCETはB₁より高い活性を示す．

(4) TPDは菌体の浮遊液により容易にB₁に還元されるが，CETはTPDに比べB₁に戻りにくい．

以上のようにTPDとCETは*Kl. apiculata*にたいして異なつた態度を示すので両者の活性は異なる機構によるものと考えられる．

(昭39. 7. 28. 受理)

## 文　　献

1) 川崎・平岡・島本：ビタミン　**28**, 295 (1963)
2) 川崎・篠田：ビタミン　**28**, 299 (1963)

3) 川崎・山田：ビタミン **28**, 290 (1963)
4) 川崎・平岡・島本：ビタミン **22**, 387 (1961)
5) Hoff-Jφrgensen, E., Hansen, B. : Acta Chem. Scand. **9**, 562 (1955)
6) 川崎・小野・篠田：ビタミン **25**, 520 (1962)
7) 山本・稲津・島：ビタミン **25**, 478 (1962)
8) 川崎・市川・篠田・森下：ビタミン **30**, 89 (1964)

# ACTIVITY OF CARBETHOXYTHIAMINE AND THIAMINE PROPYL DISULFIDE ON *KLOECKERA APICULATA*[1]

CHIKATARO KAWASAKI AND SUMIO SHINODA[2]

*School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka*

Reprinted from
THE JOURNAL OF VITAMINOLOGY
Vol. 11, No. 2. June 10, 1965

THE JOURNAL OF VITAMINOLOGY 11, 153—158 (1965)

# ACTIVITY OF CARBETHOXYTHIAMINE AND THIAMINE PROPYL DISULFIDE ON *KLOECKERA APICULATA*[1]

CHIKATARO KAWASAKI AND SUMIO SHINODA[2]

*School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka*

(Received March 8, 1965)

Carbethoxythiamine stimulates the growth of a thiamine-requring mutant, *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630, more than thiamine-HCl. To clarify the reason, various behaviors of CET toward *K. apiculata* was investigated by the authors (1, 2). Asymmetrical thiamine disulfide derivatives, such as TPD, promate the growth of *K. apiculata* like CET more than thiamine (3). In this paper, the behavior of CET toward the growth of *K. apiculata* is compared with that of TPD.

## EXPERIMENTAL

### 1. *Culture of K. apiculata*

To 2 ml of the medium improved by Hoff-Jφrgensen (5), as described by the author (4), the samples were added aseptically in a total volume of 4 ml. The cells were inoculated to the medium with a hypodermic syringe with a needle, 1/3 mm in diameter. After incubation at 30° for 20 hours, the growth of the cells was measured spectrophotometrically as the optical density at 610 mμ, using Hitachi Spectrophotometer.

### 2. *Samples*

Thiamine, CET, CBT and TPD, each as hydrochloride, were dissolved in sterilized distilled water.

### 3. *Determination of TPD and CET*

TPD was reduced to thiamine by cysteine treatment and the thiamine thus produced was determined as thiochrome by the BrCN method. CET was treated with alkali (7) and the thiamine thus produced was determined by the BrCN method.

## RESULTS

### 1. *Activities of CET, CBT and Thiamine Treated with Takadiastase*

As CET and CBT are known to be easily reduced to thiamine by Takadiastase

[1] The Growth-stimulating Activity of Thiamine Derivatives on Thiamine-requiring Microorganisms. XI. Following abbreviations are used: CET, carbethoxythiamine; TPD, thiamine propyl disulfide; CBT, *S*-carbobutoxythiamine.

[2] 川崎近太郎，篠田純男.

(6, 7), both derivatives were treated with Takadiastase to be converted into thiamine and the activities were compared with that of thiamine as follows. To 2 ml of the medium, CET, CBT or thiamine, equivalent to 0.02—0.1 μg thiamine, is added and, in addition, Takadiastase B (thiamine was removed by adsorption on acid clay) is added to give a final concentration of 250 mg per 100 ml in a total volume of 4 ml. The mixtures were incubated at 37° for 24 hours. Thereafter they were heated at 100° for 15 minutes for sterilization of the bacteria contaminated in Takadiastase solution and after cooling, the bacteria were inoculated (Fig. 1, A). The control test was made in the same way but without Takadiastase treatment (Fig. 1, B).

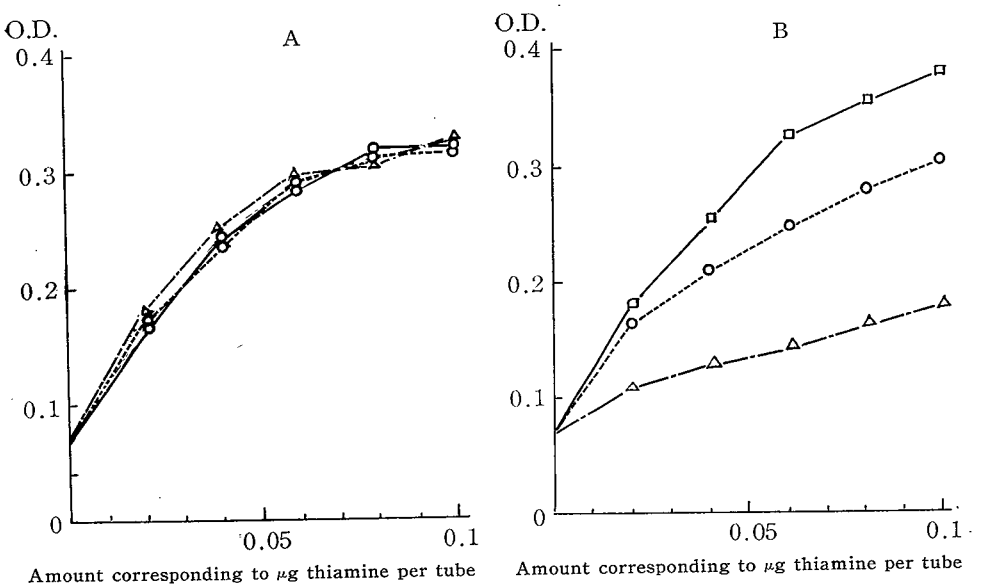



FIG. 1 *Activity of CET, CBT and Thiamine after Takadiastase Treatment on the Growth of K. apiculata*

A, inoculation was made after incubation at 37° for 24 hr with 250 mg Takadiastase per 100 ml

B, inoculation was made without Takadiastase treatment.

○, thiamine; □, CET; △, CBT.

Without Takadiastase treatment, the activity showed in the decreasing order of CET, thiamine, CBT, but after conversion to thiamine by Takadiastase all showed the same activity.

2. *Activity of TPD Treated with Cysteine*

To 2 ml of the medium, cysteine hydrochloride was added up to a final concentration of 50 mg per 100 ml. After sterilization the samples were added in a total volume of 4 ml. The mixtures were heated at 60° for 30 minutes to reduce TPD to thiamine. After inoculation, the whole were incubated at 30° for 20 hours (Fig. 2, A). The control tests were made with inoculation of the medium, but without heating at 60° for 30 minutes (Fig. 2, B). TPD showed, however, differing from CET, stronger stimulation of the growth than thiamine, though TPD had

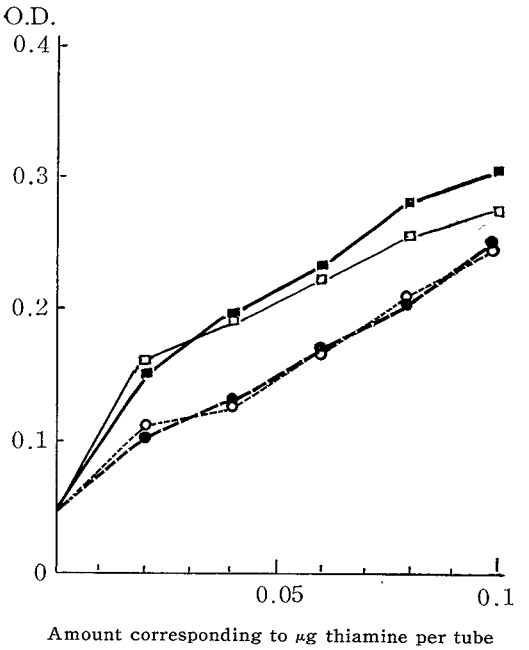



FIG. 2 *Activity of TPD and Thiamine Treated with Cysteine on the Growth of K. apiculata*

A, inoculation was made after treatment with 50 mg cysteine per 100 ml at 60° for 30 min.

B, inoculation was made without cysteine treatment.

□, TPD (A); ■, TPD (B); ○, thiamine (A); ●, thiamine (B).

been converted to thiamine extracelluarly. TPD equivalent to 1 μg thiamine produced 102 % thiamine after cysteine treatment under the same condition as described above. Therefore, TPD given in Fig. 2, A is assumed to have completely converted to thiamine after cysteine treatment. Cysteine is known to inhibit the growth of *K. apiculata*, but it was very slight at this concentration.

*3. Growth of the Cells Accumulated with TPD or Thiamine*

CET was taken up by the cells in the saline. If the cells thus treated were diulted with the medium and were incubated, it showed the activity greater than thiamine treated similarly (2). The same test was made with TPD as follows. To the cell suspension in saline (containing 30 mg dry weight of cells), TPD or thiamine, corresponding to 10 μg thiamine, was added in a total volume of 5 ml. The mixtures were heated at 30° for 30 minutes. With this treatment, TPD or thiamine added to the suspension was completely accumulated in the cells and TPD was reduced to thiamine. A part of the suspension was centrifuged and the cells were washed twice with saline and suspended in the medium (Fig. 3, A). The other part of the suspension was diluted immediately with saline (Fig. 3, B) without centrifugation. The suspensions containing the vitamin, equivalent to 0.01—0.08 μg thiamine, were cultured at 30° for 20 hours. TPD, accumulated in the cells being

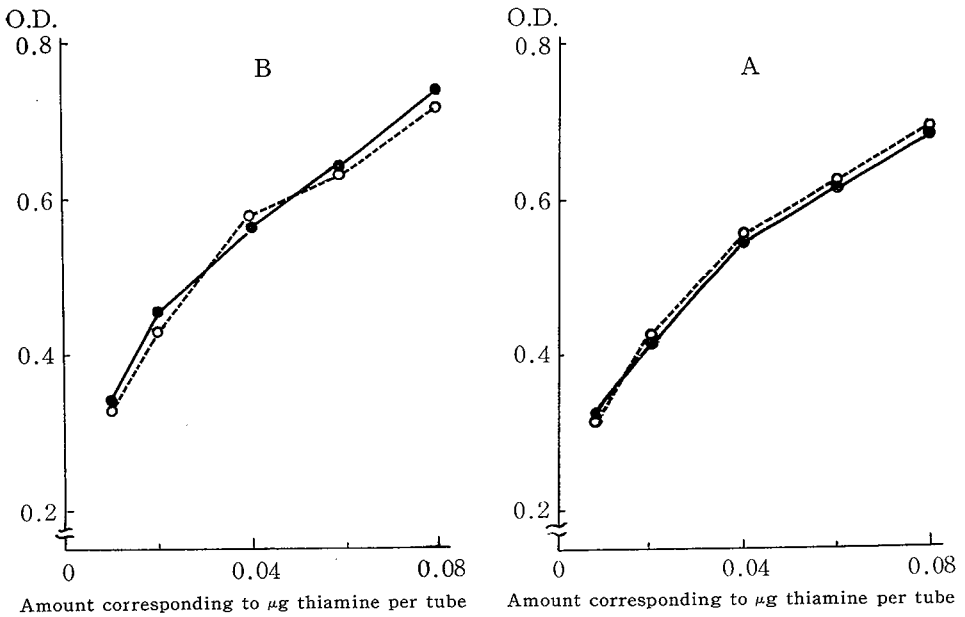



FIG. 3 *Growth of K. apiculata Accumulated TPD or Thiamine*

A, after accumulation of the vitamin in saline, the cells are collected and washed and diluted with the medium

B, after accumulation of the vitamin in saline, the cells are diluted with the medium without centrifugation.

○, thiamine; ●, TPD.

suspended in saline, showed the same activity as thiamine irrespective of the treatment of centrifugation and washing, a behavior quite different from CET.

*4. Activity of TPD and Thiamine on K. apiculata (Effects of the Amounts of the Cells Inoculated)*

That TPD showed the same activity on the growth of *K. apiculata* as thiamine may be due to the fact that more cells were inoculated than in the ordinary culture. On the other hand, it was observed in the culture of *Lactobacillus fermenti* 36 that the difference of the activities between TPD and thiamine was the more marked, the less bacteria were inoculated (8). The effects of the amounts of the inoculated *Kloeckera* were therefore investigated as follows. To the medium containing TPD or thiamine equivalent to 0.05 μg thiamine, the cells 0.1 to $10^3$ times the amount usually empolyed were inoculated and the whole were cultured at 30° for 20 hours (Fig. 4). In the experiment given above (Fig. 3), the yeast about 10 to 100 times the amount usually employed was used. Within this range, TPD showed definitely greater activity than thiamine.

*5. Reduction of TPD and CET to Thiamine by Cell Suspension*

To the cell suspension in saline containing the bacteria (about 10 mg as dry weight) was added TPD or CET equivalent to 10 μg thiamine and the whole was

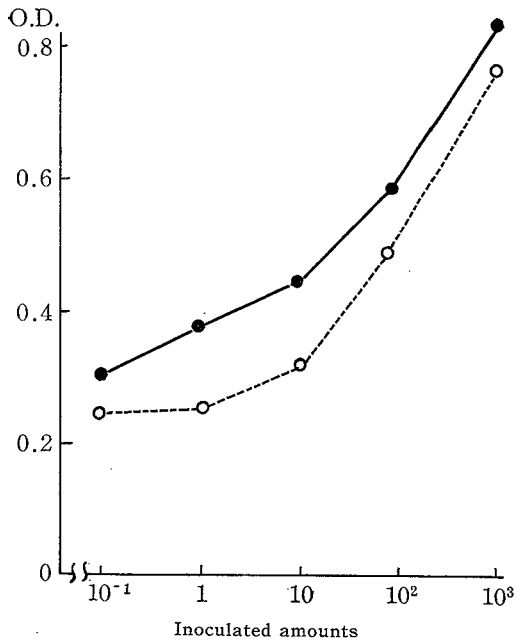



FIG. 4 *Activity of TPD and Thiamine on the Growth of K. apiculata (Effects of the Amounts of Inoculated Cells)*
Amounts of TPD and thiamine: equivalent to 0.05 μg thiamine per tube.
○, thiamine; ●, TPD.

incubated at pH 4.7 and 30°. After a certain period, the reaction was stopped by addition of 5 ml 10% metaphosphric acid, and the thiamine in the cells was extracted for 10 minutes in a boiling water bath. After centrifugation, the supernatant was assayed for free and total thiamine including TPD and CET (Table 1). Remarkable differences were observed between the conversion of TPD and CET into thiamine; TPD was completely reduced to thiamine but CET was a little reduced.

TABLE 1
*Formation of Thiamine from TPD and CET by Cell Suspension*
Amounts of TPD and CET, equivalent to 10 μg thiamine; cells, 10 μg (dry weight); total volume, 5 ml; 30°, pH 4.7.

| | Iucubation time (min) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| | | | *per cent* | | | |
| TPD | 11 (98)[a] | 96 (94) | 95 (96) | 97 (96) | 98 (98) | 94 (96) |
| CET | 0 (96)[a] | 7 (95) | 7 (99) | 8 (96) | 9 (100) | 12 (94) |

[a] Total thiamine estimated including TPD or CET.

## DISCUSSION

Both TPD and CET were shown to stimulate the growth of *K. apiculata* more than thiamine, but the behaviors of the two toward the yeast were different. CET and CBT showed the same activity as thiamine when they were reduced to thiamine extracellularly, whereas TPD showed the activity greater than thiamine, when it was converted to thiamine extracellularly. Both of them became active after conversion to thiamine. Therefore, the propylmercapto or carbethoxy radical which was produced during conversion to thiamine, is assumed to be effective for the growth. From the findings of the authors it is assumed that the propylmercapto group was effective extracellularly and carbethoxy radical intracellularly. But it is to be noted that CET was heat-sterilized after Takadiastase treatment. If the carbethoxy group is evaporated by heat sterilization, the above assumption may be untenable. To avoid the contamination in Takadiastase preparation, the suspension was sterilized after Takadiastase treatment, but the effect may be clarified by comparing the suspension after aseptic addition of CET-degrading enzyme. When the cells in which CET and TPD had been accumulated in saline were diluted with the medium, CET showed the activity greater than thiamine (2), but TPD was as active as thiamine. It may be due to the fact that TPD was easily reduced to thiamine by the contact with the cells in saline. It is a good contrast to the finding that TPD showed the activity greater than thiamine, when it was reduced in the medium. CET is hardly reduced to thiamine in saline, but was gradually reduced in the medium when the cells were in the accelerated growth (1, 2). It was thus concluded that TPD and CET stimulate the growth of *K. apiculata* but each of them behaves differently in the mechanism of growth-stimulation.

## SUMMARY

Both thiamine propyl disulfide (TPD) and *S*-carbethoxythiamine (CET) stimulate the growth of *K. apiculata* but they show the following different behaviors.

1. When CET is reduced to thiamine extracellularly by Takadiastase, it shows the same activity as thiamine on the growth of the bacterium.
2. When TPD is reduced to thiamine by cysteine extracellularly, it shows the activity greater than thiamine.
3. When TPD accumulated in the cells in saline are diluted with the medium and incubated, they show the same activity as thiamine, but when CET is treated in the same way, it showes the activity greater than thiamine.
4. TPD is easily reduced to thiamine in the presence of the yeast suspension but CET is slowly converted to thiamine on the same treatment.

## REFERENCES

1. Kawasaki, C., Hiraoka, E. and Shimamoto, T, *Vitamins*, **28,** 295 (1963).
2. Kawasaki, C. and Shinoda, S., *Vitamins* **28,** 299 (1963).
3. Kawasaki, C. and Yamada, C., *Vitamins* **28,** 290 (1963).
4. Kawasaki, C., Hiraoka, E. and Shimamoto, T., *Vitamins* **22,** 387 (1961).
5. Hoff-Jφrgensen, E and Hansen, B., *Acta Chem. Scand.* **9,** 562 (1955).
6. Kawasaki, C., Ono, Y. and Shinoda, S., *Vitamins* **25,** 520 (1962).
7. Yamamoto, R., Inazu, K. and Shima, K., *Vitamins* **25,** 478 (1962).
8. Kawasaki, C., Ichikawa, T., Shinoda, S. and Morishita, Y., *Vitamins* **30** 89 (1964).

# ビタミン$B_1$拮抗体にかんする研究

## (XVI) *Kloeckera apiculata* にたいする Oxythiamine とビタミン$B_1$誘導体の拮抗

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男・野瀬英代

ビタミン 第36巻 第5号 別冊

昭和42年11月25日発行

# ビタミン$B_1$拮抗体にかんする研究

## (XVI) *Kloeckera apiculata* にたいする Oxythiamine とビタミン$B_1$誘導体の拮抗

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男・野瀬英代

Vitamins (Japan) **36**, (5), 393-397 (1967)

# STUDIES ON ANTAGONISTS OF THIAMINE

## (XVI) COMPETITION OF OXYTHIAMINE TO MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS ON *KLOECKERA APICULATA*

Chikataro KAWASAKI, Sumio SHINODA and Hideyo NOSE

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka

Some of modified thiamine compounds stimulated the growth of *Kloeckera apiculata* more strongly than thiamine but the growth by these compounds was more effectively inhibited by oxythiamine than the growth by thiamine, inhibited by oxythiamine. 50% inhibition index to oxythiamine ; thiamine, 68,000 ; thiamine propyldisulfide (TPD), 4,600 ; benzoylthiamine monophosphate (BTMP), 210 and S-carbethoxythiamine (CET), 42. The accumulation of these compounds on *Kloeckera* cells was inhibited by oxythiamine ; inversely proportional to inhibition index. *Kloeckera* cells, when preincubated and accumulated with TPD or BTMP, were inhibited by oxythiamine on the growth test to the same extent as thiamine, whereas cells preincubated with CET were inhibited more strongly by oxythiamine than those with TPD or BTMP. These differences could be explained by the stability of CET and easy reversion of TPD or BTMP to thiamine.

$B_1$誘導体の多くは$B_1$要求性酵母 *Kloeckera apiculuta* IFO 0630 にたいして$B_1$対応量より強い増殖促進性を示す[1)2)3)]. $B_1$拮抗体である Oxy-$B_1$[*1)] は *Kl. apiculata* においては増殖阻害作用が非常に弱いことが報告されている[4)]. 今回$B_1$誘導体による *Kl. apiculata* の増殖促進性にたいして Oxy-$B_1$がいかなる影響をおよぼすかについて検討したので報告する.

## 実験方法および実験成績

### (1) $B_1$または$B_1$誘導体の増殖促進性にたいするOxy-$B_1$の影響

*Kl. apiculata* による $B_1$ 定量用培地[5)] 2 ml に各量の Oxy-$B_1$を加え滅菌後無菌的に調製した$B_1$または$B_1$誘導体0.05$\mu$g *Eq*[*2)]を加え全量 4 ml とし *Kl. apiculata*の生理食塩水浮遊液を注射針から 1 滴加え30℃で20時間培養後 610m$\mu$ における濁度を測定し図 1 の結果を得た.

Oxy-$B_1$が存在しないときには TPD[*3)], BTMP[*4)], CET[*5)] は$B_1$より高い増殖促進性を示したが$B_1$の増殖促進性は 1 mgのOxy-$B_1$でも阻害されず, 10mgの Oxy-$B_1$により阻害されるのにたいして各$B_1$誘導体の増殖促進性はいずれも$B_1$のばあいより少ない Oxy-$B_1$ により阻害を受けた.

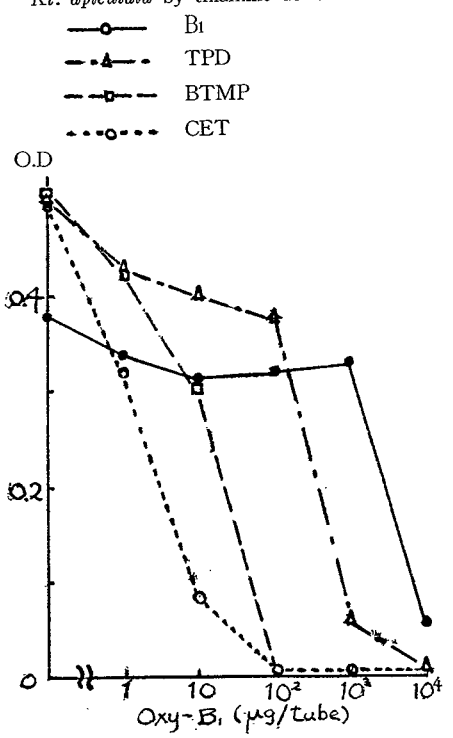
同様な実験を他の$B_1$誘導体を用いて試み次式にした

*1) Oxy-$B_1$ = Oxythiamine　*2) *Eq* = Equivalent to thiamine　*3) TPD = Thiamine propyldisulfide
*4) BTMP = S-Berzoylthiamine-O-monophosphate　*5) CET = S-Carbethoxythiamine

Table 1 Competitive inhibition ratio of oxythiamine to thiamine-derivatives on the growth of *Kl. apiculata*

| Thiamine | TPD | TATD | TTFD | TDS | BTMP | SBT | CET |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 68,000 | 4,600 | 3,100 | 4,400 | 2,800 | 210 | 81 | 42 |

Fig. 1 Influence of oxythiamine stimulation of *Kl. apiculata* by thiamine derivatives




がつて抑制比を計算して表1の結果を得た.

$$抑制比=\frac{50\%の増殖阻害に必要なOxy\text{-}B_1量}{B_1またはB_1誘導体量}$$

ここに用いた$B_1$誘導体はすべて$B_1$と同等もしくはそれ以上の増殖促進性を示したが，Oxy-$B_1$との抑制比はすべて$B_1$より低い値を示した. TATD*6), TTFD*7), TPDおよびTDS*8)はいずれもDisulfide構造を持つ$B_1$誘導体であるがこれらはほぼ等しい抑制比を示し，S-Acyl型誘導体であるSBT*9), BTMPおよびS-Carbalkoxy型であるCETはDisulfide型$B_1$誘導体よりさらに低い抑制比を示した.

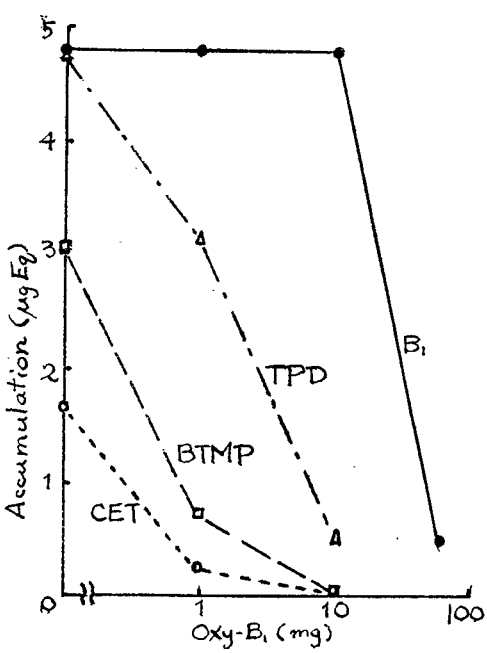
### (2) $B_1$誘導体の$B_1$への復帰におよぼすOxy-$B_1$の影響

$B_1$誘導体が$B_1$に復帰する過程をOxy-$B_1$が阻害するか否かを知るためつぎの実験を行なつた. *Kl. apiculata*のアセトン乾燥菌体を調製し，この30mgにTPDまたはCET 10μg *Eq*およびOxy-$B_1$ 0, 1, 10mgを添加しpH4.7, 30℃で保温後生成$B_1$量を測定した. TPDからの$B_1$生成率はOxy-$B_1$量に関係なく30～34%でOxy-$B_1$の影響はみられなかつたが，CETからの$B_1$生成率は本条件では5%前後で非常に低くOxy-$B_1$の影響を明らかにすることはできなかつた.

### (3) $B_1$誘導体の菌体への集積におよぼすOxy-$B_1$の影響

乾燥重量として約5mgに相当する菌体を生理食塩水にけん濁させ，$B_1$誘導体5μg *Eq*および各種のOxy-$B_1$

Fig 2 Influence of oxythiamine to the accummulation of thiamine derivatives on *Kl. apiculata*




*6) TATD = Thiamine 8-(methyl-6-acetyldihydrothioctate) disulfide *7) TTFD = Thiamine tetrahydrofurfuryldisulfide *8) TDS = Thiamine disulfide *9) SBT = S-Benzoylthiamine

Table 2 Accumulation of thiamine, thiamine-derivatives or oxythiamine on *Kl. apiculata* cells

| | Thiamine | TPD | BTMP | CET | Oxythiamine |
|---|---|---|---|---|---|
| Cells | 98μg | 75μg | 41μg | 12μg | 35μg |
| Supernatant | 3 | 23 | 56 | 82 | 61 |

15mg of cells were incubated with 100μg of thiamine, thiamine-derivatives or oxythiamine in saline at pH 4.7, 30℃ for 1 hour

を加え pH 4.7, 全量 5 ml とし30℃で1時間保温後遠沈により上清と菌体に分離し，菌体を生理食塩水で2度洗浄し洗液を上清に合した．菌体を 0.1*N* HCl 5 ml で10分間煮沸抽出して得た菌体抽出液および上清液の一定量に 1％タカジアスターゼ液 1 ml を加え pH 4.5 で45℃, 2時間保温後$B_1$量を BrCN-チオクロム螢光法で定量した．なお TPD はシステイン処理[6]，BTMP はシステインおよびタカジアスターゼ処理[7]，CETはアルカリ処理[8]を行なつて$B_1$としてから測定した(図2)．$B_1$の集積は50mgの Oxy-$B_1$ によつてはじめて阻害されたのにたいしてTPD, BTMP, CETの集積はいずれもより少ない量のOxy-$B_1$により阻害された．

### (4) $B_1$,$B_1$誘導体またはOxy-$B_1$の菌体への集積

前実験にみられるように$B_1$誘導体の集積には差が認められた．この差を明確にするため大量の$B_1$または$B_1$誘導体を菌体に添加して実験を行ない同時に Oxy-$B_1$ の集積量も測定した．乾燥重量約15mgの菌体に培地中で$B_1$, $B_1$誘導体またはOxy-$B_1$ 100μg *Eq* を加え以下(3)に従つて集積量を測定した(表2)．Oxy-$B_1$ の定量は Prebluda 法の改良法[9]に従がつた．集積量は $B_1$> TPD > BTMP> Oxy-$B_1$> CET となつたが，$B_1$は添加量のほとんどが菌体から検出されたので添加量を増せばさらに集積されると考えられる．

### (5) $B_1$または$B_1$誘導体を集積した菌の増殖におよぼすOxy-$B_1$の影響

(3)に示したように Oxy-$B_1$ は$B_1$誘導体の菌体への集積を阻害する．そこで$B_1$誘導体を集積した菌の増殖に与える影響について検討した．乾燥重量として30mgの菌体に$B_1$または$B_1$誘導体 5 μg *Eq* を添加し30℃, 1時間保温後遠沈して菌体を集め，その 1/100 にたいして各量のOxy-$B_1$を添加して培地にて全量 4 ml とし30℃, 20時間培養後濁度を測定した(図3-A)．なお30℃, 1時間保温後の菌体による集積量を測定したが，添加した$B_1$または$B_1$誘導体はいずれも完全に菌体に集積されており，TPD および BTMP では$B_1$に変化して検出され，CET では31％が$B_1$として，残りが CET として集積されていた．

同時に対照として(B)の実験を行なつたが(B)においては集積の操作を行なわず(A)と同一菌量にたいして Oxy-$B_1$と $B_1$または$B_1$誘導体を同時に添加した．(B)は図1と同じ実験をたんに接種菌量のみを多くして行なつたのであるから本来ならば図1と同じ傾向がみられるはずである．Oxy-$B_1$による影響の受け方が$B_1$ <TPD <BTMP <CET の順になるという点では図1と図3-Bとは一致した．一方(A)においてはこのような$B_1$誘導体間の明らかな差は認められず，TPD, BTMP は$B_1$と同様な阻害曲線を示したが，CET のみはやや強く Oxy-$B_1$により影響を受けた．

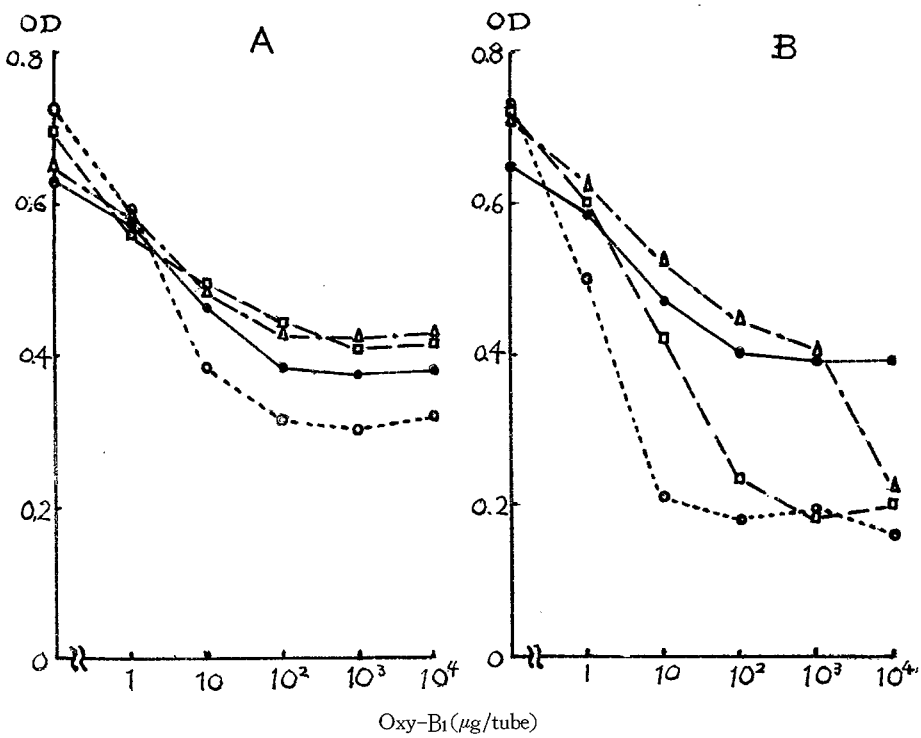
## 考　　察

$B_1$誘導体の多くは*Kl. apiculata*にたいして$B_1$より強い増殖促進性を持つが，Oxy-$B_1$ による影響を強く受け，影響の受け方には$B_1$誘導体の構造による共通性がみられた．CET は最も Oxy-$B_1$の影響を強く受け$B_1$のばあいの1/1,000の Oxy-$B_1$により増殖阻害を受けた．Oxy-$B_1$は生体内でリン酸化されてTDP*[10]と競合的に拮抗するといわれている．$B_1$誘導体は$B_1$となつてはじめて$B_1$活性を示すのであるから$B_1$に復帰してしまえば$B_1$と同じような態度でOxy-$B_1$と拮抗するはずである．今回の実験のようなばあいには$B_1$に復帰しがたい$B_1$誘導体において Oxy-$B_1$ の影響が強く現われたと考えられる．$B_1$誘導体が増殖促進性を示すためにはまず菌体に集積されなければならない．

岩島ら[10]はパン酵母の$B_1$ とりこみが50倍量の Oxy-$B_1$によつてあまり影響されないことを報告している

*10) TDP = Thiamine diphosphate

Fig. 3 Influence of oxythiamine to the growth of *Kl. apiculata* with thiamine and its derivatives




(A) Yeast cells containing 0.05μg thiamine or its equivalent derivatives
(B) The same amount of yeast cells in the broth containing 0.05μg thiamine or its derivatives

が，著者らの結果でも *Kl. apiculate* による $B_1$ 集積は Oxy-$B_1$ によつてあまり抑制されなかつた．しかし図2が示すように $B_1$誘導体の集積は Oxy-$B_1$により顕著に抑制され，この傾向は図1の増殖阻害の傾向と一致した．また生理食塩水中で$B_1$または$B_1$誘導体を菌体に集積させたのち Oxy-$B_1$を添加して培養すると TPDおよびBTMPはまつたく$B_1$と同じ態度を示した．したがつてこの2種の誘導体の集積が Oxy-$B_1$により強く抑制されるため増殖促進性が強く抑制されたのであろう．CET をあらかじめ菌体に集積させたのち Oxy-$B_1$を添加して増殖させると対照にくらべると$B_1$との差が少なくなるが，TPD, BTMPほどには阻害回復はみられなかつた．CET のばあい菌体に集積されたのちも一部はCET の型をとどめるので CET が菌体にとりこまれる段階をOxy-$B_1$が阻害すると同時にこの CET が$B_1$に変化するときにも Oxy-$B_1$が阻害作用を示すのかも知れない．アセトン乾燥菌体を用いてこの点を検討したがアセトン乾燥菌体の CET 分解力が弱いため結論を出し得なかつた．いずれにしても増殖阻害比の差の1つの原因は$B_1$誘導体の菌体による集積にたいする Oxy-$B_1$の影響の差ということができる．

図1と図3-Bは同じ実験を行なつたものであるが接種菌量が異なり，図3-Bは図1より大量の菌体を接種したものである．1～100μgのOxy-$B_1$を添加したばあいを比較すると図1では$B_1$にたいしてなんらの影響を与えないのにたいして図3-Bではかなりの影響を与え，Oxy-$B_1$を添加しないときよりも増殖度を減少せしめていた．このように大量の菌体を接種したときの方が低濃度の Oxy-$B_1$の影響を受け易い原因は不明であるが，1つの説明としてつぎのようなことが考えられる．表2からわかるように Oxy-$B_1$ の菌体への集積は$B_1$にくらべ困難である．1例として0.05μgの$B_1$および10μg の Oxy-$B_1$を異なつた菌量に添加したとき少ない菌量のばあい$B_1$はすべて菌体に集積されるが Oxy-$B_1$は$B_1$より集積力が弱く添加量も$B_1$より多いので一部しか集積されないであろう．一方，多量の菌体のばあ

いやはり$B_1$はすべて菌体に集積されるが菌量が多いため結果的には単位菌体が持つ$B_1$量は減少する．Oxy-$B_1$は菌体量が少ないばあいには多量に菌体外に残つていたのであるから菌体量が増せば総集積量は増加し，単位菌体の持つOxy-$B_1$量には変化がないであろう．したがつて単位菌体中のOxy-$B_1$量と$B_1$量の比は菌体量により変化し，多量の菌体のばあいには$B_1$にたいするOxy-$B_1$の量が増加し阻害作用が現われ易くなると考えることができる．

## 結　　論

(1) $B_1$誘導体の多くは*Kl. apiculata*にたいして$B_1$より強い増殖促進性を示すが，その増殖促進性はOxy-$B_1$により$B_1$のばあいより強く阻害され，拮抗比は$B_1$>TPD>BTMP>CETとなつた．

(2) Oxy-$B_1$は$B_1$誘導体の菌体への集積を阻害し，CET>BTMP>TPD>$B_1$の順に強く作用をおよぼした．

(3) あらかじめ$B_1$誘導体を菌体に集積させてからOxy-$B_1$を添加して培養するとTPDおよびBTMPは$B_1$と同じ態度を示し，CETのみがやや強くOxy-$B_1$の影響を受けた．

(4) Oxy-$B_1$は$B_1$誘導体の菌体への集積の段階および$B_1$への復帰の段階を阻害し，このために増殖促進性にたいする影響の受け方が各誘導体で異なつたと思われる．

(昭42. 10. 7. 受理)
(経費著者負担)

## 文　　献

1) 川崎・平岡・島本：ビタミン　**28**, 295(1963)
2) 川崎・篠田：ビタミン　**28**, 299(1963)
3) 川崎・山田：ビタミン　**28**, 290(1963)
4) 川崎・平岡・島本：ビタミン　**22**, 387(1961)
5) 平岡・島田：ビタミン　**23**, 213(1961)
6) 藤原：ビタミン定量法(八木国夫編) p. 22 (1954)
7) 伊藤・浜中・岡本・和田：ビタミン　**22**, 358 (1961)
8) 山本・稲津・島：ビタミン　**25**, 478(1962)
9) Guiseppe, L., Rindi, G. : Intern. Z. Vitaminforsch. **34**, 22(1964)
10) 岩島・植松・増田：ビタミン　**34**, 490(1966)

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (XIV) 酵母に集積されたビタミン$B_1$の存在部位と細胞からの放出

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男・小野照代

ビタミン 第36巻 第6号 別冊

昭和42年12月25日発行

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (XIV) 酵母に集積されたビタミン$B_1$の存在部位と細胞からの放出

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男・小野照代

Vitamins (Japan) **36**, (6), 530-534 (1967)

# THE GROWTH-STIMULATING ACTIVITY OF THIAMINE DERIVATIVES ON THIAMINE-REQUIRING MICROORGANISMS

## (XIV) THIAMINE, ACCUMULATED ON YEAST CELLS ; ITS DISTRIBUTION IN CELLS AND RELEASE FROM CELLS

Chikataro KAWASAKI, Sumio SHINODA and Teruyo ONO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka

Thiamine, when preincubated with yeast cells in glucose solution, was almost completely absorbed on cells. The thiamine on cells could not be destroyed on the incubation with crude thiaminase from *B. thiaminolyticus* or *Corbicula*, although it was easily released from the cells on the digestion with cell-wall-lytic enzyme from *Streptomyces albidoflavus*. The stability of protoplasts prepared from thiamine-accumulated *Kl. apiculata* cells was decreased inversely proportional to thiamine contents. The highly accumulated thiamine on yeast cells was partly released by osmotic shock or during the process of fermentation, corresponding to the decrease of viable cells. The thiamine was completely released from sedimentation fractions of cells, after the treatment with Braun cell-desintegrator. The thiamine accumulated on yeast cells, was found as free thiamine located in the concentrated status between cell-walls and cytoplasmic membranes.

次報[1]にのべるように酵母 *Kloeckera apiculata* は多量の$B_1$を集積する．小野・市川[2]は清酒酵母に集積された$B_1$が酵母細胞壁表面の粘質物に付着して存在すると推定し，Suomalainenら[3]はパン酵母中の$B_1$はすべて原形質内に存在すると推定している．著者らは *Kl. apiculata*に集積された$B_1$の存在部位について検索を加えた．

## 実験方法

**(1) 使用酵母**

*Kl. apiculata* IFO 0630, *Saccharomyces carlsbergensis* IFO 0565, *Sacch. cerevisiae* IFO 0305.

**(2) An*[1]液の調製**

シジミまたはハマグリを6倍量の0.1*M* リン酸緩衝液 (pH 6.5) と混和後磨砕し遠沈して得られた上清液または *Bacillus thiaminolyticus* Matsukawa *et* Misawa を普通ブイヨンにて30℃，3日間振とう培養して得た培養液の遠沈上清をAn I 液とした．

**(3) *Sacch. cerevisiae* および *Sacch. carlsbergensis*の培養**

Goodwin[9] の培地にて30℃，20時間培養して得た菌体を用いた．

**(4) *Kl. apiculata*の培養**

$B_1$集積量の測定および *Kl. apiculata* の Protoplast の調製は次報[1]に記した．

## 実験成績

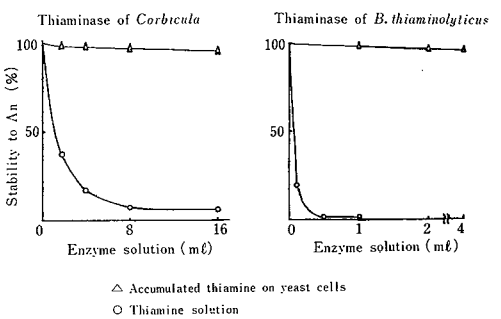
**(1) $B_1$を集積した酵母にたいするAn Iの**

* [1] An＝Thiaminase

### 作用

小野・市川[2]は清酒酵母に集積された$B_1$が貝類Anにより分解されることを報告しているのでこの点につき*Kl. apiculata*に集積された$B_1$について検討した．2%グルコース溶液中pH 4.7で1時間$B_1$と接触させ菌体1mg当り80μgの$B_1$を集積した菌体1mgに各量のAn液，0.01*M*ピリジン1ml，0.07*M*リン酸緩衝液(pH 6.5) 5mlを加え全量45mlとして30℃，1時間保温後*N* HCl 5mlを加え煮沸し，残存$B_1$量を測定した．対照として酵母に集積されていない$B_1$100μgにたいして同量のAn液を作用させて残存$B_1$量を測定した(図1)．

Fig. 1 Stability of accumulated thiamine to thiaminase



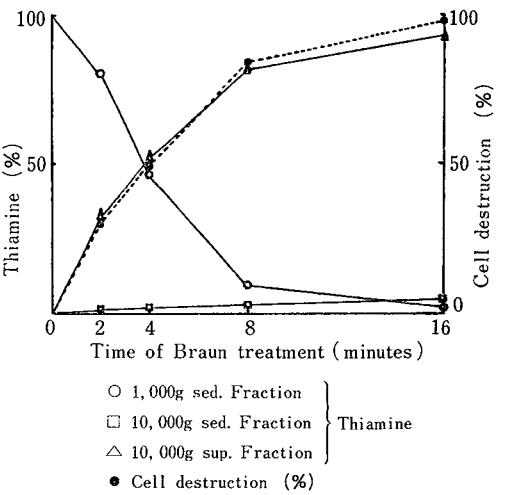

*B. thiaminolyticus* (M・M)およびシジミのAnはともに$B_1$を完全に分解する量でも集積された$B_1$にはなんら作用を示さなかつた．またハマグリのAnを用いたときにも同様な結果が得られた．さらに*B. thiaminolyticus* (M・M)のAnを*Sacch. cerevisiae*および*Sacch. carlsbergensis*に集積された$B_1$に作用させたが$B_1$分解作用を示さなかつた(表1)．

Table 1 Influence of thiaminase of B. *thiaminolyticus* to accumulated thiamine on yeasts
1mg of yeasts accumulated with thiamine were incubated with 1ml of enzyme solution at pH 6.5, 30℃ for 1 hour

| Yeast | Thiamine accumulated (μg/mg) | Thiamine decomposed (%) |
|---|---|---|
| *Kl. apiculata* | 8.8 | 1 |
| *Sacch. carlsbergensis* | 5.1 | 0 |
| *Sacch. cerevisiae* | 8.1 | 0 |
| Thiamine solution | 10.0 | 95 |

### (2) 機械的細胞破壊による集積$B_1$の溶出

Fig. 2 Cell destruction and release of thiamine by treatment with Braun cell desintegrator




菌体中約100μg/mgの$B_1$を集積した*Kl. apiculata* 300mgを終濃度0.25*M*ショ糖および0.001*M* EDTAを含む溶液50mlにけん濁し，径0.45～0.50mmのガラス玉30gを加えBraun細胞破壊機により2,000 *rpm*，16分間処理した．一部を分取しThomaの血球計算盤を用いて細胞の破壊率を測定後まず1,000×g，15分間遠沈しその上清をさらに10,000×g，30分間遠沈して各画分の$B_1$量を測定した(図2)．

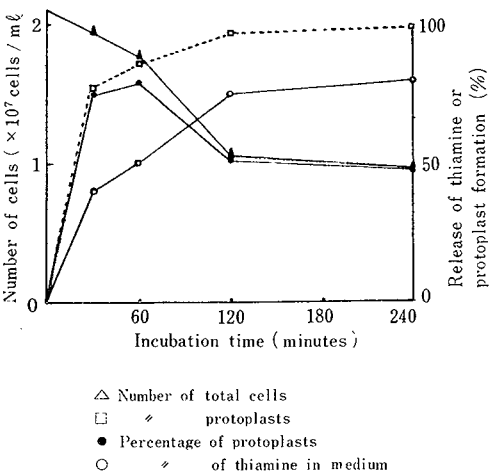
1,000×g沈渣は未破壊の細胞および細胞壁の画分であるが16分間の処理で細胞を完全に破壊したときこの細胞画分には$B_1$はほとんど存在しなかつた．10,000×g沈渣はミトコンドリア画分と考えられるがこの画分にも$B_1$は存在せず，$B_1$は16分の処理後にはすべて10,000×g上清に認められた．この画分を硫安，アセトン，トリクロル酢酸で除たんぱくすると$B_1$はほとんどこの上清に認められた．すなわち集積された$B_1$は細胞内で細胞壁や顆粒成分，たんぱく質などに結合して存在するのではないと考えられる．

### (3) 酵母細胞壁溶解酵素処理による集積$B_1$の溶出

菌体中約100μg/mgの$B_1$を集積した*Kl. apiculata* 12mgに等張塩液(終濃度0.8*M* NaCl・0.05*M* $MgSO_4$混液)中で*Streptomyces albidoflavus*より得られた酵母細胞壁溶解酵素をpH7.0，30℃で作用させ経時的に反応液の一部をとり総細胞数，Protoplast数および上清および菌体中$B_1$量を測定した．

その結果，図3のように30分の反応で全体の70%，2時間の反応で98%がProtoplastになり，Protoplast数の増加に伴ないB1は細胞外に溶出したが98%がProtoplastになつた2時間後にも約20%のB1が細胞中に残存していた．このとき総細胞数もかなり減少したので上清中に検出されたB1のなかには細胞の破壊によつて溶出したB1も含まれるわけでこの値を補正すると約40%のB1がProtoplast中に存在したことになる．

Fig. 3 Release of thiamine from cells in the process of digestion by cell-wall lytic enzyme




### (4) $B_1$集積酵母にたいする酵母細胞壁溶解酵素の作用

前記のようにB1を集積した酵母に細胞壁溶解酵素を作用させると総細胞数の顕著な減少がみられたのでB1集積量を変えて細胞壁溶解酵素を作用させ細胞数の変化を観察した．菌体1mg当り1, 9.8, 91μgのB1を含む菌体に(3)と同様にして細胞壁溶解酵素を作用させ総細胞数およびProtoplast数を測定した(図4)．1時間の反応でいずれのばあいも90%以上がProtoplastになつていたので図には総細胞数の変化のみを記した．B1集積量の多いほど総細胞数の減少は顕著であつた．多量に集積されたB1は原形質膜になんらかの傷害を与えていると思われる．

### (5) 滲透圧変化による集積$B_1$の溶出

低張液中に浮遊させるとProtoplastは破壊されこれに保有するB1は溶出するが，正常細胞に同様な滲透圧

Fig. 4 Influence of thiamine contents to the stability of protoplast prepared from thiamime-accumulated yeast cells

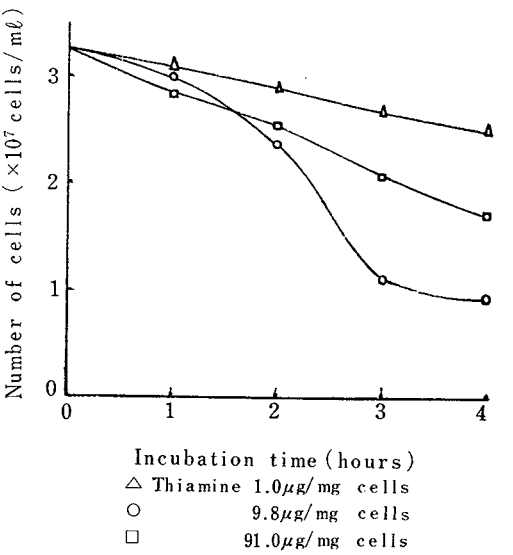



Table 2 Release of thiamine from cells of *Kl. apiculata* by osmotic shock
Thiamine accumulated : 98 μg/mg

| Process of osmotic shock | Water→ | 0.8*M* NaCl→ | Water→ | 0.8*M* NaCl→ | Water |
|---|---|---|---|---|---|
| Thiamine released | 1 | 2.7 | 15.3 | 20.1 | 35.3%* |
| MB-dyed cells | 0 | 0 | 5.6 | 8.6 | 14.7%* |

* The percentage showed accumulated values

変化を与えると細胞は破壊されないにもかかわらず集積されたB1が細胞外に溶出した．菌体中98μg/mgのB1を集積した*Kl. apiculata*10mgを0.8*M* NaClに浮遊させ遠沈して菌体を集め，つぎにこの菌体を水に浮遊させたのち遠沈する操作を2回繰り返えした．以上の操作ののち遠沈上清中のB1量を測定しその溶出量(累積値)を表2に記した．

同時に菌体の一部をとりpH 4.6のリン酸緩衝液に溶解したMB*2)を加えMB染色性の菌体数を測定した．高張液に浮遊したときにはあまりB1の溶出はみとめられなかつたが，この菌体を低張液に移すと多量のB1が溶出し2回の滲透圧変化を繰り返えすことにより全集積量の35%が菌体外に溶出したがこのときのMB染色

*2) MB = Methylene blue

Table 3 Influence of thiamine contents to the viability of *Kl. apiculata*
10mg of cells were incubated with (A) 1,000μg, (B) 100μg or (C) 10μg of thiamine

| | | | Incubation time (hours) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 4 | 20 |
| (A) | Thiamine contents (μg) | Total | 877 | 821 | 468 |
| | | Free | 877 | 788 | 414 |
| | Cell counts (×$10^9$) | Total | 1.24 | 1.14 | 1.38 |
| | | Viable* | 1.22 | 1.07 | 0.96 |
| (B) | Thiamine contents (μg) | Total | 96 | 97 | 98 |
| | | Free | 90 | 90 | 46 |
| | Cells counts (×$10^9$) | Total | 1.30 | 1.16 | 1.47 |
| | | Viable* | 1.27 | 1.13 | 1.42 |
| (C) | Thiamine contents (μg) | Total | 9.8 | 9.3 | 8.8 |
| | | Free | 6.5 | 3.7 | 0.6 |
| | Cell counts (×$10^9$) | Total | 1.37 | 1.15 | 1.35 |
| | | Viable* | 1.35 | 1.12 | 1.32 |

* Viable cells = Total cells − MB-dyed cells

性菌体は全体の15%であつた．MB染色は酵母の生死の判定に利用され死菌はMBに染色されるといわれるが[5]，今回の結果では$B_1$溶出量の比率は死菌の比率を上回わつた．滲透圧変化の差は大きいほど$B_1$溶出量は多く2*M* NaCl中から水に菌体を移すと1回の滲透圧変化で$B_1$溶出量は全集積量の60%に達した．また0.8*M* NaClと等張にしたKCl, $MgCl_2$, 尿素，グリセリンなどによる滲透圧変化によつても$B_1$の溶出が認められた．

### (6) 長時間保温時のMB染色菌体および集積$B_1$量の変化

Atkin・Schultz・Freyの発酵液10mlと菌体10mgに$B_1$ 0, 10, 100, 1000μgを添加し30℃に1, 4, 20時間保温し集積$B_1$量ならびにMB染色菌数を測定した(表3)．

10, 100μgの$B_1$を添加したとき総$B_1$集積量およびMB染色菌数には大きな変化がみられなかつたが結合型$B_1$量はしだいに増加した．1,000μgの$B_1$を添加したとき集積$B_1$量は1時間と4時間では変化しなかつたが，20時間後には減少し，このように長時間放置したのちも集積$B_1$のほとんどは遊離型であつた．MB染色菌数は31%に増加したが，(5)のばあいと同様MB染色性菌数よりも溶出した$B_1$の比率の方が上回わつた．表には記さなかつたがさらに保温を続けると48時間には$B_1$ 100μgを添加したばあいのMB染色菌数は11%であつたのにたいして1,000μg添加のばあいには54%に達した．すなわち多量の$B_1$を集積するほど菌は死滅し易いと思われる．

## 考　　察

*Kl. apiculata*に集積された$B_1$は本酵母に細胞壁溶解酵素を作用させて細胞壁を除去しProtoplastにすると集積$B_1$の大半が細胞外に溶出した．したがつて集積された$B_1$の大半が原形質膜より外側に存在すると思われる．市川・小野[2]は清酒酵母に集積された$B_1$が貝類Anにより分解されると報告し酵母に集積された$B_1$が細胞壁表面に付着して存在すると推定しているが著者が*Kl. apiculata*, *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis*に集積された$B_1$について検討した結果ではそのような現象は認められなかつた．また$B_1$がすべて細胞壁表面に存在するならば細胞壁溶解酵素の作用で速やかに細胞外に溶出すると思われる．酵母に集積された$B_1$が腸管から吸収されにくいという事実もあわせ考えるとき$B_1$が細胞壁表面に付着しているとは考えられない．$B_1$を集積した酵母を機械的に破壊すると$B_1$は容易に上澄液中に溶出し，細胞壁その他の不溶成分に結合した$B_1$は認められなかつた．以上の知見から集積された$B_1$は原形質膜もしくは原形質膜と細胞壁の間に存在すると

思われる．

Protoplast も$B_1$を保有する能力を持ち，Protoplast 中の$B_1$は原形質内部に存在するとも考えられるが原形質膜表面に$B_1$の局在部位があり，その部分がProtoplastの調製時に一部破壊され$B_1$が溶出し，一部は破壊されず$B_1$が残存して Protoplast 中に検出されたのかも知れない．短時間の$B_1$との接触により集積された$B_1$は遊離型でありリン酸化されるのにかなりの時間を要することから集積された時点では$B_1$が原形質内部に透過せず，酸性 Phosphatase の存在する原形質膜より外側に局在し，徐々に少量が原形質内に透過してリン酸化されると考える方が妥当と思われる．最近Suomalainen[3]はパン酵母の$B_1$はほとんど Protoplast 内に存在すると報告しているが，彼らの用いた酵母の$B_1$含量は今回著者らの用いたものにくらべ非常に少なく，その大半は酵母自身が生合成したものと考えられ培地中に添加した$B_1$を集積したばあいをおのずから異なるであろう．現在酵母の集積$B_1$について電子顕微鏡による Radioautographyを検討中であり追つて報告したい．

酵母に集積された$B_1$はほとんど遊離型であるが，著者らの実験では$B_1$を大量に集積した酵母の Protoplast は破壊され易く，長時間放置したときおよび滲透圧変化を与えたとき MB 染色性菌体の増加が著明であるなど酵母に悪影響をおよぼしている結果のみ得られている．これらの結果は市川ら[2]が$B_1$集積酵母を脱水したとき$B_1$が細胞外に溶出し，MB 染色性が増すと報告しているのに相通ずるものである．MB 染色性は原形質膜の Reductase の有無に左右されるといわれており，MB染色細胞が増加する事実はProtoplastが破壊され易いという事実とともに$B_1$が原形質膜付近に局在することを裏づけるものであろう．

## 結　　論

$B_1$を多量に集積した*Kl. apiculata*にたいして以下のような処理を行ない$B_1$の存在部位を検索した．

(1) *B. thiaminolyticus* (M・M)，シジミおよびハマグリのAnを作用させても集積$B_1$は分解されなかつた．

(2) Braun 細胞破壊機にて破壊すると$B_1$は可溶成分中にのみ見出され，除たんぱく操作後も$B_1$はその上清部分に検出された．

(3) 細胞壁溶解酵素を作用させて Protoplast を調製すると約60%の$B_1$が細胞外に溶出し，$B_1$を多量に集積した酵母から得られた Protoplast ほど安定性が低かつた．

(4) 高張→低張の滲透圧変化を与えると$B_1$の細胞外への溶出がみられ，発酵液中に長時間放置したときにも最大限に$B_1$を集積した酵母では$B_1$が溶出し，MB 染色性菌体すなわち死菌数が増加した．

以上を総合して考えるとき酵母に多量に集積された$B_1$の大部分は原形質膜もしくは原形質膜と細胞壁の間に遊離の型で局在すると推定される．

(昭42. 9. 27. 受理)

## 文　　献

1) 川崎・篠田・小野：ビタミン　**36**, 535(1967)
2) 小野・市川：ビタミン　**7**, 1024(1954)
3) Suomalainen, H., Nurminen, J., Oura, E. : Arch. Biochem. Biophys. **118**, 219(1967)
4) Goodwin, T.W., Johnson, D.B., Howells, D.J. : Biochem. J. **98**, 30(1966)
5) 実験化学講座：**25**, p. 33(1959) 丸善
6) Schultz, A.S., Atkin, L., Frey, C.N. : J. Am. Chem. Soc. **59**, 2467(1937)

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (XV) *Kloeckera apiculata*によるビタミン$B_1$誘導体の集積

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男・小野照代

ビタミン 第36巻 第6号 別冊

昭和42年12月25日発行

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (XV) *Kloeckera apiculata*によるビタミン$B_1$誘導体の集積

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男・小野照代

Vitamins (Japan) **36**, (6), 535-540 (1967)

# THE GROWTH-STIMULATING ACTIVITY OF THIAMINE DERIVATIVES ON THIAMINE-REQUIRING MICROORGANISMS

## (XV) ACCUMULATION OF THIAMINE DERIVATIVES ON THE CELLS OF *KLOECKERA APICULATA*

Chikataro KAWASAKI, Sumio SHINODA and Teruyo ONO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka

*Kloeckera apiculata*, when incubated with thiamine in 2 % glucose solution for 1 hour, absorbed thiamine to the amount of one-tenth the cell weight but protoplasts prepared from *Klosckera* cells absorbed thiamine incompletely to the amount far less than that of intact cells. Thiamine diphosphate (TDP) was absorbed by the cells as free thiamine to the same extent as thiamine used but TDP was poorly absorbed by protoplasts. TDP, when incubated with intact cells in glucose and molybdate ($M/10$), was not converted to free thiamine and no absorption of thiamine by cells was demonstrated. S-Carbethoxythiamine (CET) and thiamine propyl disulfide (TPD) stimulated the growth of the yeast more strongly than thiamine but the both were absorbed on cells to the less extent than thiamine. *Kl. apiculata*, however, when innoculated in the broth containing 2 $\mu$g of thiamine, CET or TPD, showed better growth and higher content of TDP in cells after incubation with CET or TPD than incubation with thiamine. CET, when incubated with higher quantity of the yeast cells, penetrated into cells by simple diffusion and was easily washed out by isotonic solution. Thiamine was accumulated on the cells completely and could not be washed out by isotonic solution. Penetration of CET into cytoplasm and conversion to TDP might be correlated with higher content of TDP in cells on growth tests.

CET*[1]およびTPD*[2]が$B_1$要求性酵母*Kloeckera apiculata*の増殖を$B_1$より強く促進することはすでに報告した[1)2)]. 著者らはこの原因が*Kl. apiculata*による集積の差によるものと考え$B_1$および$B_1$誘導体の集積量を測定したが$B_1$の方が容易に集積され，増殖促進性と集積量の間に相関関係はみられなかつた[2)]. しかし膜透過の機構が$B_1$と$B_1$誘導体とで異なりこれが活性の差となつて現われることが考えられるので今回$B_1$と$B_1$誘導体の*Kl. apiculata*による集積態度についてさらに検討を加えた.

## 実験方法

### (1) 使用菌株および$B_1$誘導体

菌株としては*Kloeckera apiculata* IFO 0630を用いた. CETと$B_1$は塩野義製薬から供与されたもの，TPDは松川らの方法[3)]で合成した.

### (2) 酵母細胞壁溶解酵素

*Streptomyces albidoflavus*の生産する酵素を大和化

*1) CET = S-Carbethoxythiamine　*2) TPD = Thiamine propyldisulfide

成より供与を受けて用いた.

(3) *Kl. apiculata*の培養

さきに報告した基礎培地[4]にB1を加え菌を接種して30℃で培養した.

(4) $B_1$および$B_1$誘導体の集積量の測定

菌体を生理食塩水で2回洗浄後0.1*N* $H_2SO_4$またはHClで15分間煮沸抽出し抽出液をpH 4.5に調整後4 *ml*に1%タカジアスターゼB液1 *ml*を加え50℃, 2時間保温したのちBrCN・Thc*3)法にてB1量を測定した. なおCETを添加したものについてはタカジアスターゼ処理前にアルカリ処理[5], TPDを添加したものについてはシスティン処理[6]を行なつた.

(5) *Kl. apiculata*のProtoplastの調製

対数増殖期にある菌体(OD 0.250になるよう菌を接種し30℃, 3時間振とう培養して得た菌体)を終濃度0.8*M* NaCl, 0.05*M* $MgSO_4$, 0.003*M* 2-Mercaptoethanolおよび0.03*M* リン酸緩衝液の混液中で細胞壁溶解酵素を30℃で2時間作用させた. 本反応で96～99%がProtoplastになつた. なおProtpolastの判定は細胞を水にけん濁したとき破壊されることにより行ない, 菌数の計算はThomaの血球計算盤を用いた. 調製したProtoplastの洗浄およびその後の操作には等張塩液(終濃度0.8*M* NaCl・0.05*M* $MgSO_4$混液)を用いた.

## 実験成績

### (1) $B_1$の集積におよぼす培地成分の影響

*Kl. apiculate*は基礎培地中でB1をよく集積するので培地成分を表1のように分け, 各溶液10*ml*中で菌体10mg(乾燥重量)にB1 1 mgを30℃, 1時間接触させたのち集積B1を測定した. 表1のように水または生理食塩水中でB1は集積されたが, グルコースの存在するとき集積量は最大となり他の成分は集積量を増加させる作用を示さなかつた.

Table 1 Accumulation of thiamine on *Kl. apiculata*

10mg(as dry matter) of cells were incubated with 1mg of thiamine in 10*ml* of medium at pH 4.7, 30℃ for 1 hour

| Medium | Thiamine accumulated*3) |
|---|---|
| Water | 26 |
| 0.9% NaCl | 25 |
| 2% Glucose | 81 |
| Inorganic solution*1) | 24 |
| Basal medium*2) | 80 |

*1) KCl, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $FeCl_3$
*2) Hoff-Jφrgensen medium (2% glucose, 0.25% casamino acid, inorganic solution and vitamin solution) *3) μg/mg of dry cells

### (2) $B_1$の集積におよぼすpHの影響

2%グルコース溶液中で終濃度0.01*M*のクエン酸緩衝液によりpHを変化させ30℃, 1時間後の集積量を測定するとpH1.9で乾燥酵母として55μg/mgとなりpHの増加につれて集積量は増加しpH 4.9で最高値122μg/mgを示し以後は減少してpH7.4では10μg/mgとなつた.

### (3) $B_1$の集積におよぼすグルコース濃度の影響

クエン酸緩衝液によりpH 4.7としグルコース濃度を0～4%として30℃, 1時間後のB1集積量を測定するとグルコース濃度の増加につれてB1集積量が増加し0.5%で最大となりそれ以上グルコースを増しても集積量は増加しなかつた.

### (4) 正常細胞およびProtoplastによる$B_1$, CET, TPDの集積(1)

5×$10^8$個の正常細胞またはProtoplastに等張塩液中B1, CET, TPD 500μg, *Eq**4)を添加しpH 4.7, 全量5 *ml*として30℃, 1時間保温後総B1集積量を測定した(表2). いずれのばあいでもB1が最もよく集積され, ついでTPD, CETの順であつた. B1およびTPDの集積は正常細胞でグルコースの存在するとき最大でグルコースまたは細胞壁の除去により集積量は減少した.

Table 2 Accumulation of thiamine derivatives on *Kl. apiculata*

Cells : 5×$10^8$ cells, Thiamine derivatives : 500μg*Eq*, Total volume : 5*ml*
Incubated at pH 4.7, 30℃ for 1 hour

| | Intact cells | | Protoplasts | |
|---|---|---|---|---|
| Glucose | + | − | + | − |
| Thiamine | 361* | 158* | 181* | 11* |
| CET | 25 | 15 | 12 | 13 |
| TPD | 208 | 96 | 69 | 14 |

* μg for 5×$10^8$ cells

*3) Thc=Thiochrome *4) *Eq*=Equivalent to thiamine

### (5) 正常細胞およびProtoplastによる$B_1$, CET, TPDの集積(2)

前述のようにCETの集積量は$B_1$にくらべると無視し得るほどに低い値である．赤血球などの動物細胞では$B_1$誘導体は単純拡散により細胞膜を透過するといわれているのでこの点について検討するため反応液の量をできるだけ制限して行なつた．すなわち前と同条件で内径約2.5mmの小試験管中$B_1$, CET, TPDを添加し全量0.15mlとして集積量を測定した．このとき菌体の体積は約0.05mlで全反応液の1/3を占める．なお単純拡散による細胞内移行量を測定するため反応後の菌体の洗浄は行なわず，上清をできるだけ完全に毛細管ピペットで吸い取るか，もしくは森田らがDCETの赤血球移行量の測定に用いた手技[7]により$B_1$または$B_1$誘導体の測定を行なつた．

その結果，表3に示すように$B_1$および$B_1$誘導体は濃度勾配に逆つて高い集積量を示したが，CETはグルコースの有無にかかわらず，また正常細胞でもProtoplastでもほぼ濃度勾配に比例して細胞内に移行した．またTPDを添加したときほとんどが$B_1$に変化して検出されたが，CETを添加したとき本条件下では大部分CETのままで菌体中に見出された．すなわちCETはそのままの型で単純拡散により膜を透過すると考えられる．

Table 3 Accumulation of thiamine derivatives on *Kl. apiculata*
Cell volume : 0.05ml ($9\times10^8$cells)
Thiamine derivatives : 100μg *Eq* (0.10ml)
Total volume : 0.15ml
Incubated at pH 4.7, 30℃ for 1 hour with (+)[1] or without(−)[2] glucose

| Compounds | Intact cells | | Protoplasts | |
|---|---|---|---|---|
| | + [1] | − [2] | + [1] | − [2] |
| Thiamine | 92μg | 66μg | 87μg | 29μg |
| CET | 30 (22)* | 32 (23) | 37 (35) | 29 (31) |
| TPD | 64 (1)** | 59 (0) | 52 (9) | 37 (7) |

* Thiamine as CET　　** Thiamine as TPD

### (6) $B_1$, CET, TPDを添加した菌体の洗浄

前述のようにCETが単純拡散により菌体内に透過するならばこの菌体をCETを含まない溶液中に移せば菌体内のCETは細胞外に流出するはずである．

図1のような操作を行ない各部分の総$B_1$量を測定した．菌体と$B_1$誘導体を接触させたとき菌体は全液量の1/3の体積を占めるが，洗浄操作では菌体は全液量の1/100を占めるにすぎない．測定結果は図2に記したが菌体1は最初に菌体に集積された$B_1$または$B_1$誘導体量，菌体2は洗浄後の菌体が保有する量，上清2は洗浄により流出した量を示す．$B_1$, TPDのばあいほとんど洗浄による流出は認められなかつたがCETは洗浄によりほとんどが菌体外に流出した．

Fig. 1 Procedure for washing the cells accumulated with thiamine, CET, TPD

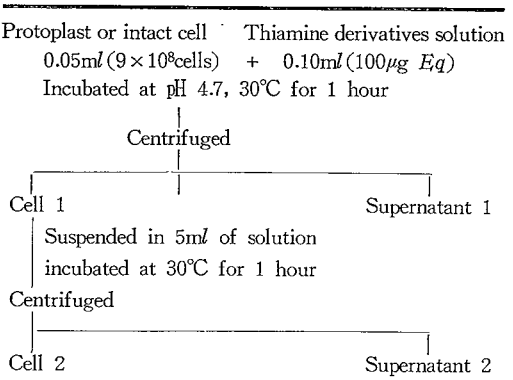
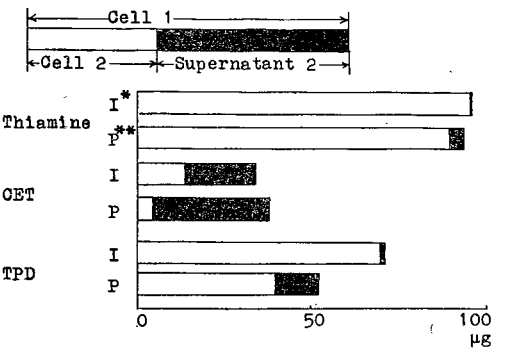



Fig. 2 Release of thiamine or thiamine derivatives from the cells by the washing with isotonic solution in the procedure of Fig. 1




*I : Intact cell　　**P : Protoplast

### (7) 正常細胞およびProtoplastによる$B_1$, TDPの集積

酵母に集積された$B_1$はほとんどが遊離型であり，またTDP*[5]を添加したときにも遊離型として集積される．酵母のAcid-Pase*[6]は原形質膜より外側にのみ存

*[5] TDP≒Thiamine diphosphate　　*[6] Pase=Phosphatase

在するといわれ[8)~10)] Protoplastにすると除去される．このような，Acid-Paseの存在しない状態でのTDPの集積を検討した．

$1.2\times10^9$ 個の菌体に$B_1$，TDP 1 mgを添加し，2％グルコースを含む等張塩液中でpH4.7，30℃，1時間保温後集積$B_1$量を測定すると表4のように正常細胞では$B_1$とTDPの集積量はほぼ等しいが，Protoplastではは$B_1$にくらべ集積量は低かつた．

Table 4 Accumulation of thiamine or TDP on *Kl. apiculata* cells

$1.2\times10^9$ cells were incubated with 1 mg of thiamine or TDP in 2% glucose solution at pH 4.7, 30℃ for 1 hour

| | Thiamine | | TDP | |
|---|---|---|---|---|
| | μg | μg | μg | μg |
| Protoplast | 185* | (175)** | 70* | (60)** |
| Intact cell | 375 | (375) | 370 | (375) |

* Total thiamine ** Values in bracket are free thiamine

また$B_1$，TDPのいずれを添加したときでも集積されたものはほとんど遊離型であつた．同時にProtoplastのPase活性をTDPを基質としてpH 4.7で測定すると正常細胞の5％であつた．Pase阻害剤であるモリブデン酸塩を添加して30℃，1時間後の集積量を測定すると$10^{-3}M$以下のモリブデン酸ナトリウムによつてはPaseは全く阻害されずTDPは$B_1$に変化して集積され上清中に残存するものも$B_1$に脱リン酸されていたが，$10^{-2}M$のモリブデン酸塩を添加したとき$B_1$の集積は全く阻害されないのにたいしてTDPの集積は阻害され上清中に多量のTDPが残存した(表5)．TDPはPaseの作用で$B_1$に変化することによりはじめて酵母に集積されると考えられる．

Table 5 Influence of molybdate to the accumulation of thiamine or TDP

1 mg of cells were incubated with 100μg*Eq* of thiamine or TDP in 2% glucose solution at pH 4.7, 30℃ for 1 hour

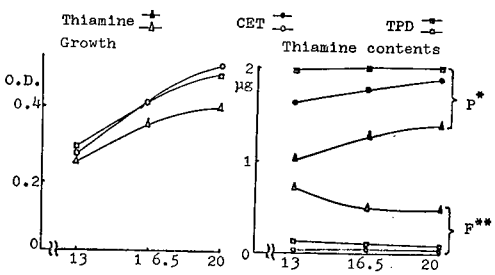
| Conc. of Na-molybdte | Thiamine | | TDP | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sup. | Cells | Sup. | | Cells | |
| *M* | μg | μg | μg | μg | μg | μg |
| $10^{-1}$ | 32** | 68** | 86* | (0)** | 0* | (3)** |
| $10^{-2}$ | 25 | 77 | 63 | (0) | 3 | (19) |
| $10^{-3}$ | 22 | 75 | 0 | (19) | 0 | (77) |
| $10^{-4}$ | 18 | 76 | 0 | (20) | 0 | (77) |
| 0 | 25 | 76 | 0 | (21) | 0 | (78) |

* Phosphorylated thiamine ** Free thiamine

## (8) 増殖菌体中$B_1$の存在型

*Kl. apiculata*により大量に集積された$B_1$はすべて遊離型であるが，微生物定量に用いる濃度に添加したばあいの菌体内の存在型を検討した．300ml の三角コルベンに$B_1$，CETまたはTPD 2 μg*Eq*を含む培地100mlを入れ*Kl. apiculata*を接種し30℃で培養後増殖ならびに菌体中遊離$B_1$および結合型$B_1$(TDP)を測定した(図3)．

Fig. 3 Free and phosphorylated thiamine contents of the cells of *Kl. apiculata* after cultivation with thiamine, CET or TPD (2 μg *Eq*)




*P : Phosphorylated thiamine
**F : Free thiamine

CET，TPDを添加したとき増殖度は$B_1$を添加したときより高値を示し，菌体$B_1$はほとんど結合型すなわちTDPとして検出された．一方$B_1$添加のばあいは27～40％が遊離$B_1$として検出された．これはBioautographyによつても確認した．また$B_1$添加濃度を増して4 μg *Eq*を50ml の培地に添加して20時間培養を行なつたが遊離型$B_1$の総$B_1$にたいする比は$B_1$添加31％，CET添加3％，TPD添加2％となり，他は結合型$B_1$として検出され，$B_1$添加培養菌のリン酸化率は低かつた．

## 考　　察

*Kl. apiculata*は至適条件においては菌体重量の10％にもおよぶ$B_1$を集積するが，集積された$B_1$がほとんどすべて遊離型であること，また集積量が異常とも思える高い値であることからみて集積された$B_1$のすべてが増殖に利用するためのものとは考えられない．前報[11)]でのべたように集積された$B_1$のほとんどは原形質膜ま

たは原形質膜と細胞壁の間に存在すると思われるがその付近にはAcid-Paseが存在しており[8)~10)]，集積された$B_1$が遊離$B_1$として存在するのは当然であろう．Protoplastを調製してPaseを除去するとTDPは$B_1$より集積されにくく，Pase阻害剤であるモリブデン酸塩を添加するとTDPの集積は阻害された．したがつて集積されるための$B_1$は遊離型であることが必要で，酵母細胞中に遊離$B_1$として存在することに意義があると思われる．能勢ら[12)]は*E. coli*がThiaminokinaseの作用で$B_1$をとりこむと報告しているが，酵母のばあい全く異なつた機構が考えられる．また林ら[13)]のいう$B_1$収着現象とも異なるものであろう．

$B_1$誘導体は動物細胞においては単純拡散により容易に細胞内に移行するのにたいして微生物細胞にはとりこまれにくい．しかし一般に動物細胞の実験では反応液にたいして細胞はかなりの体積を占めるが微生物実験では細胞の占める体積はごくわずかである．もし単純拡散による細胞内移行を問題にするならば反応液をできるだけ少くして細胞体積の比率を増す必要がある．

今回の著者らの実験においてCETは単純拡散により*Kl. apiculata*の原形質膜を透過することが示された．実際には培地中では細胞の占める体積はごくわずかであるが，単純拡散によつて原形質内に透過したCETが原形質内で$B_1$に変化すれば原形質内のCET濃度は下がりそこにふたたび原形質外からCETが透過し最終的にはCETが$B_1$に変化して原形質内に集約されるであろう．CETのままでも$B_1$よりは弱いが濃度勾配に逆つて菌体に集積される．しかしこのばあい細胞壁付近にはとどまらずに原形質内に透過すると思われる．

一方，$B_1$を添加したとき一部は原形質膜または細胞壁付近に遊離$B_1$として局在部位に残るため一部しか原形質内に透過しない．過剰量が添加されたときは$B_1$の方が多量に菌体に集積されるがSuboptimal量が添加されたならば$B_1$は一部しか原形質内に透過しないのにたいしてCETはほとんど原形質内に透過するため原形質内の総$B_1$量はCETを添加したばあいの方が高くなり，その結果TDP含量さらには増殖度が高くなると考えられる．TPDを添加したときCETと同じく単純拡散の起こることも考えられるがTPDは容易に$B_1$に戻り，また生理食塩水中で菌体に集積させたのち培地を加えて培養すると$B_1$と同じ活性しか示さない[14)]ことからCETとまつたく同じ機構とは考えられない．なんらかの培地成分の影響も考えられ今後の検討が必要である．

$B_1$誘導体の酵母によるとりこみにかんしては黒木[15)]，鈴置[16)]の報告があり，福井ら[17)]はBenzoylthiamine disulfideを*Sacch. cerevisiae*の培養に加えたときO-Benzoylthiamineの型で酵母の表面にゆるやかに結合すると述べているが，少なくとも*Kl. apiculata*においては$B_1$より強い活性を示す点から考えても$B_1$誘導体の細胞内透過性の差と考える方が妥当であろう．

## 結　　論

(1) *Kl. apiculata*は2%グルコースの存在下pH4.7, 30℃で1時間$B_1$と接触することにより菌体乾燥重量の10%にのぼる$B_1$を遊離$B_1$として集積した．

(2) 細胞壁を除去したProtoplastも$B_1$を集積するが，集積量は正常細胞にくらべると低かつた．TDPも$B_1$と同様集積されるがすべて遊離$B_1$に変化して検出されProtoplastによる集積量は$B_1$より低値であつた．特定部位おそらくは原形質膜付近で遊離$B_1$として存在することが酵母にとつて1つの意味を持つと思われる．

(3) CET, TPDの集積量は$B_1$より低いがCETは単純拡散により原形質膜を透過した．

(4) 増殖に必要な量のCET, TPDを添加して培養した菌体中にはTDPのみしか検出されないが$B_1$を添加して培養すると27～40%の遊離$B_1$が検出された．

(5) CETは単純拡散により細胞内に透過して$B_1$を経てTDPとなり増殖に利用されるのにたいして$B_1$では一部が原形質膜付近にとどまり遊離$B_1$として存在するため一部しか増殖に利用されずCETより低い増殖促進性を示したと思われる．　(昭42. 9. 27. 受理)

## 文　　献


1) 川崎・平岡・島本：ビタミン **28**, 295(1963)
2) 川崎・篠田：ビタミン **28**, 299(1963)
3) 松川・岩津・川崎：薬誌 **73**, 497(1953)
4) 川崎・平岡・島本：ビタミン **22**, 397(1961)
5) 山本・稲津・島：ビタミン **25**, 478(1962)
6) 藤原：ビタミン定量法(八木編)p. 22(1954)
7) 森田・峰下：ビタミン **33**, 67(1966)
8) Suomaleinen, H., Linko, M., Oura, E. : Biochim. Biophys. Acta **37**, 482(1960)
9) McLellam, W.L., Jr., Lampen, J.O.: Biochim. Biophys. Acta **67**, 324(1963)
10) Schmidt, G., Bartsch, G., Laumont, M., Her-

mann, T., Liss, M. : Biochemistry **2**, 126(1963)
11) 川崎・篠田・小野：ビタミン **36**, 530(1967)
12) 能勢：ビタミン **35**, 403(1967)
13) 林：ビタミン **35**, 405(1967)
14) 川崎・篠田：ビタミン **30**, 289(1964)
15) 黒木：ビタミン **13**, 275(1957)
16) Suzuoki, J. : J. Biochem. **42**, 27(1955)
17) 福井・大石・前田：ビタミン **26**, 380(1962)

# ビタミン$B_1$誘導体の微生物活性

## (XVI) *Kloeckera apiculata*の同調培養におよぼすビタミン$B_1$誘導体の影響

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男

ビタミン 第36巻 第6号 別冊

昭和42年12月25日発行

# ビタミンB1誘導体の微生物活性

## (XVI) *Kloeckera apiculata*の同調培養におよぼすビタミンB1誘導体の影響

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・篠田純男

Vitamins (Japan) **36**, (6), 541-543 (1967)

# THE GROWTH-STIMULATING ACTIVITY OF THIAMINE DERIVATIVES ON THIAMINE REQUIRING MICROORGANISMS

## (XVI) INFLUENCE OF THIAMINE DERIVATIVES ON THE GROWTH OF *KLOECKERA APICULATA* IN SYNCHRONIZED CULTURE

Chikataro KAWASAKI and Sumio SHINODA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka

*Kloeckera apiculata* cells repeatedly centrifuged at 1,500 *rpm*, were incubated in the broth at higher concentration of cell-counts for 2 or 4 hours and then they wer diluted with the broth containing thiamine or its derivatives ; synchronized growth of cells was observed on incubation for 2 - 6 hours. When thiamine, thiamine propyldisulfide (TPD) or S-carbethoxy-thiamine (CET) was added to the broth (0.125 $\mu$g equivalent), TPD stimulated the growth more quickly than thiamine at the first stage of growth, whereas CET and thiamine showed parallel synchronized growth, until at the last stage of logarithmic growth CET stimulated one more synchronized growth than thiamine. These differences of synchronized growth by TPD and CET will be originated from their different speed of conversion to thiamine.

B1誘導体のうちTPD*1)およびCET*2)はB1要求性酵母 *Kloeckera apiculata* IFO 0630の増殖を対応量のB1よりも強く促進する[1)2)]. 著者らはこの原因を解明するためB1誘導体の酵母にたいする種々の態度を検討してきたが今回B1またはB1誘導体を添加して *Kl. apiculata* の同調培養を行ない, B1誘導体の強い増殖促進性が増殖のいかなる時期に現われるかについて検討した. *Kl. apiculata*の同調培養法は報告されていないが他の酵母においては Yanagita[3)], Sando[4)] らにより報告されているのでそれらを参考として *Kl. apiculata*の同調培養を試みB1誘導体の影響をしらべた.

## 実験方法

### (1) *Kl. apiculata*の培養

さきに報告した基礎培地にB1またはB1誘導体を添加し, 菌を接種して30℃で振とう培養を行なつた.

### (2) 菌数ならびに濁度測定法

培養液の一部を分取し100℃, 5分煮沸して増殖を停止させ日立光電光度計にて610m$\mu$における濁度を測定後Thomaの血球計算盤を用いて総菌数を測定した.

## 実験成績

### (1) *Kl. apiculata*の同調培養法の検討

酵母の同調培養としては遠沈またはろ過により菌の大きさを一定とする方法, 熱処理をしたのち常温で培養する方法, 酵母を高濃度にけん濁して前培養したのち急激に希釈して培養する方法などが報告されている[3)~6)]. *Kl. apiculata*の生理食塩水浮遊液を1,500*rpm*で5分遠沈し上清を除き沈でんをふたたび生理食塩水

*1) TPD = Thiamine propyldisulfide *2) CET = S-Carbethoxythiamine

にけん濁して遠沈する操作を8回繰り返えした．この操作により菌の大きさをかなりそろえることができたので，この菌体を培地に移して振とう培養し菌数を継時的に測定したが菌数の増加は階段状とはならなかつた．さらに遠沈を繰り返えしてみたり遠沈操作における回転数を変えて行なつたが，思わしい結果が得られなかつた．そこで1500 *rpm*, 5分の遠沈を8回繰り返えして得た菌体を培地に $10^9$ cells/m*l* の濃度にけん濁させ30℃で2時間保温したのち菌体けん濁液を100倍の新しい培地に移して30℃で振とう培養を行なうと1時間あまりの誘導期ののち急激に菌数が約2倍に増加し，以後階段状の曲線を画いて菌数が増加した．また前培養時間を4時間としたときには誘導期がやや短縮されたが，以後は同様な増殖曲線を示した．なお対数増殖期にある酵母を顕微鏡で観察するとつねに大部分が出芽状態にあり，出芽していない細胞はあまり見られなかつた．おそらく娘細胞が成熟して母細胞から分離すれば速やかにつぎの出芽が始まるものと思われる．

Fig.　Method for the synchronized culture of *Kl. apiculata*

Cell suspensiod in saline solution
|
Centrifuged at 1,500 *rpm* for 5 min.
Repeated 8 times
|
Cells　　Supernatant
|
Suspended in the broth at $10^9$ cells/m*l*
Incubated at 30℃ for 2 or 4 hours
|
Diluted with the broth containing samples to 100 times
|
Incubated at 30℃

## (2)　同調培養におよぼす$B_1$誘導体の影響

図1の操作を行なうことによつて菌数の増加を階段状となし，同調培養をすることができたので$B_1$誘導体を添加しその影響をしらべた．$B_1$誘導体の添加量は0.0125$\mu$g($B_1$相当量)/m*l* とした．また前培養を非常に高濃度の菌けん濁液で行なわなければならないこと，および菌数測定の都合上接種菌量は微生物定量法における量の約$10^2$倍となつた．いずれを添加したばあいにも誘導期の長さは等しかつたが，TPD添加時には2回目の菌数の増加が$B_1$, CETのばあいより早く起こり以後$B_1$との差がしだいに大となつた．CET添加時には$B_1$とまつたく同様に菌数が増加したが，対数増殖期の後期に至つて$B_1$添加菌の増殖が衰ろえたときに$B_1$との差が現われ，なお菌数の増加がみられた．すなわちTPDは対数増殖期の初期に増殖を促進し，$B_1$添加よりも菌の1世代の長さを短縮し，CETは対数増殖期の後期に影響を与えると考えられる．なおこの傾向は濁度の測定結果からも菌数測定のばあいほど顕著ではないが観察すとことができた(図2,3)．

Fig. 2　Influence of thiamine, TPD or CET on the synchronized culture of *Kl. apiculata* (1) Cell counts

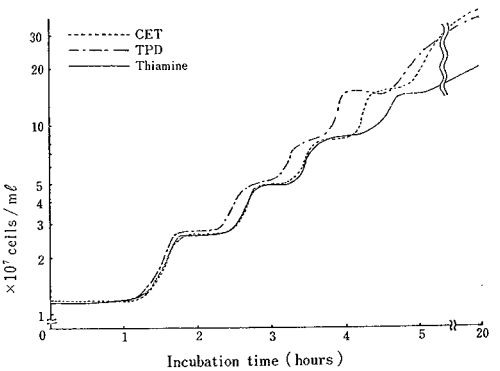
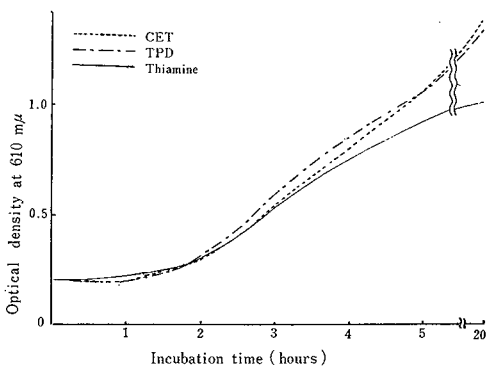



Fig. 3　Influence of thiamine, TPD or CET on the synchronized culture of *Kl. apiculata* (2) Optical density




## 考　　察

$B_1$, TPD, CETを添加して *Kl. apiculata*の同調培養を行なうとTPDとCETはやや異なつた増殖促進作用を示した．TPDを添加して培養すると対数期の初期に$B_1$との差を開き，2回目の菌数の増加が$B_1$添加のばあいより早く起こつたのにたいして，CETを添加したばあいには$B_1$との差が顕著に現われるのは対数期の

後期になつてからであつた．TPDは対数増殖期の菌の1世代の長さを短縮するのにたいしてCETは$B_1$添加菌の増殖が衰える時期すなわち静止期に入る時期に影響を与え，なお1世代の増殖を続行させると思われる．このような違いはこの2種の誘導体の$B_1$への復帰速度に関連するものであろう．前報[7]に記したようにCET, TPDが$B_1$より高い増殖促進性を示す直接の原因はこれらの誘導体を添加したとき遊離$B_1$の集積よりも原形質中のTDP*3)含量が$B_1$添加のばあいより高まるためであろう．そのさい菌体中のTDP含量を測定するとTPDを添加したばあい早期に高いTDP含量を示したのにたいしてCET添加のばあいにはTDP含量がゆるやかに増加した．TPDは速やかに$B_1$に変化するのでTDPに変化し易いが，CETは増殖中にも一部はそのまま残存し徐々に変化するのでTDP量の増加がゆるやかになつたと考えられる．したがつてTPDを添加すれば増殖初期の菌体中TDP量が$B_1$添加より高くなるので対数期に強く影響する．CET添加時には$B_1$への転換がおそく，対数期の後期に至つてはじめてTDP含量が$B_1$添加のばあいよりも顕著に高くなり$B_1$添加菌の増殖がすでに静止期に入ろうとする時点でなお増殖を続行させる作用を示したのであろう．

Nosohら[5]はパン酵母の同調培養を行なつて菌を形態的に観察し，出芽への誘導期および娘細胞の成熟期を明確に区別し同調させているが，著者らの実験では出芽に至る誘導期(出芽していない状態)がほとんど観察されず，つねに大部分の細胞が出芽状態で観察された．著者の用いた条件では(あるいは*Kl. apiculata*自身の性質として)出芽に至る誘導期が短く，娘細胞が母細胞から分離すれば速やかにつぎの出芽が始まるのではないかと考えられる．完全な同調培養法についてはなお検討を要するであろう．

*3) TDP＝Thiamine diphosphate

## 結　　論

*Kl. apiculata*を低速遠沈して菌の大きさをそろえ，培地に高濃度にけん濁して前培養したのち100倍に希釈して本培養することにより同調培養を行なうことができた．$B_1$, TPD, CETを添加して同調培養を行なうとTPDは対数期の初期の増殖を$B_1$より強く促進し，CETは$B_1$添加菌が静止期に入る時点でなお増殖を継続させる作用を示した．TPD, CETの強い増殖促進性が現われる時期が異なる原因はこの2種の誘導体の$B_1$への復帰速度の違いによると考えられる．

(昭42. 9. 25. 受理)

## 文　　献

1) 川崎・平岡・島本：ビタミン　**28**, 295(1963)
2) 川崎・篠田：ビタミン　**28**, 299(1963)
3) Maruyama, Y., Yanagita, J. : J. Bacteriol. **71**, 542(1956)
4) Sando, N. : J. Gen. Appl. Microbiol. **9**, 233 (1963)
5) Nosoh, Y., Takayama, A. : Plant Cell Physiol. **3**, 53(1962
6) Halvorson, H., Gorman, J., Tauro, P., Epstein, R., Laberge, M. : Fed. Proc. **23**, 1002(1964)
7) 川崎・篠田・小野：ビタミン　**36**, 535(1967)

# ビタミン$B_1$誘導体の血球移行性

## (I) Thiamine propyldisulfide と Thiothiamine との比較

大阪大学薬学部
川崎近太郎・富田　勲・篠田純男

ビタミン 第28巻 第4号 別冊
昭和38年10月25日発行

# ビタミン$B_1$誘導体の血球移行性

## (I) Thiamine propyldisulfide と Thiothiamine との比較

大阪大学薬学部
川崎近太郎・富田　勲・篠田純男

# PENETRATION OF MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS INTO ERYTHROCYTES

## (I) COMPARISON OF THIAMINE PROPYLDISULFIDE AND THIOTHIAMINE

Chikataro KAWASAKI, Isao TOMITA, and Sumio SHINODA
School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

Penetration of thiamine propyldisulfide (TPD) or thiothiamine ($SB_1$) into bovine erythrocytes was investigated upon their suspension in physiological saline solution. TPD was quickly absorbed by erythrocytes and the thiamine level in erythrocytes was either kept unchanged for 24 hours or not washed out by repeated shaking with saline solutions. $SB_1$ was found almost equally in erythrocytes and the supernatant, after incubation for one hour. $SB_1$ in erythrocytes was partly washed out by shaking with saline solution, as $SB_1$ existed as itself in the erythrocytes. TPD, when penetrated into blood cells, was reduced to thiamine which was no more washed out by saline solution. Only one spot of thiamine was demonstrated in hemolysate of the erythrocytes by means of paperchromatography.

TPD*1) あるいはTAD*2が洗浄した血球の浮遊液において$B_1$より優れた血球移行性を示し，血球中では遊離$B_1$またはTDP*3)として存在することは鈴置[1]の報告以来多くの著者により認められてきた．松川ら[2]はTADの血球移行性はその脂溶性に基づく単純拡散によるものであると推定した．$B_1$に比べて脂溶性が強いが，TPDと異なり動物組織によつて$B_1$になり得ないとされている[3)4)] $SB_1$*4)の血球移行性をTPDと比較した．

## 実験方法および試料

### (1) 使用した血球

脱フィブリンしたウシ血液を3,000*rpm*で10分遠沈して血球を集め，Krebs・Ringerリン酸緩衝液で2回洗浄しそのつど3,000*rpm*で10分間遠沈したものを用いた．

### (2) 血球移行量の測定

血球4 m*l*に$B_1$誘導体液1 m*l*および生理食塩水3 m*l*を加え，37℃で一定時間保温後，3,000*rpm*で遠沈して上清部と血球部に分け，血球部は生理食塩水で2度洗浄し洗液は上清部に合してつぎの操作を行なつた．

a) 血球部は0.1*N*硫酸15m*l*を加え煮沸抽出後pH4.5とし，3%タカジアスターゼB液1 m*l*を加え37℃で1夜保温後全量50m*l*としてヒダ濾紙で濾過し濾液の一定量を検液とした．

b) 上清部はpH4.5としてから2%タカジアスターゼB液1 m*l*を加え37℃で1夜保温後全量25m*l*としこの一定量を検液とした．

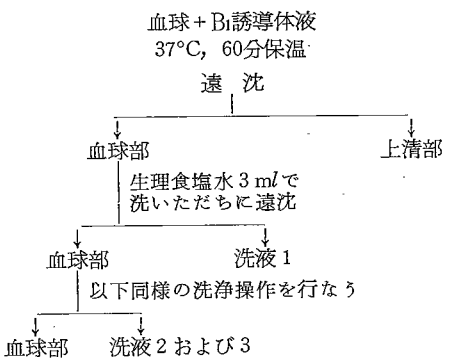
かく調製した検液に常法通りパームチット処理後BrCN法により$B_1$量を定量した．なおTPDおよび$SB_1$を添加したものはパームチット処理前につぎの操作を行なつた．すなわち，TPDは0.5%システイン液1 m*l*を加えpH6，60℃で30分保温し，$SB_1$は30%過酸化水素水数滴を加え50℃で5分振りまぜ酸化して$B_1$とした．

*1) TPD＝Thiamine propyldisulfide
*2) TAD＝Thiamine allyldisulfide
*3) TDP＝Thiamine diphosphate
*4) $SB_1$＝Thiothiamine

**(3) 血球の洗浄操作**

図1のごとく行なつた.

図1 血球洗浄操作




## 実験結果

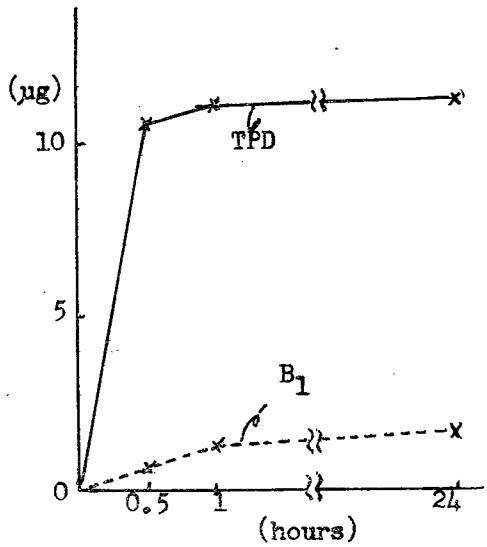
### (1) TPDおよびB₁の血球移行量

TPDおよびB₁の4×10⁻²μモル(13.5μgB₁-HCl*E*[*5)])を血球に添加し30分, 60分および24時間後の血球移行量を測定した(図2). TPDを添加したものは30分後には添加量の約80%が血球中に存在し, その値は60分さらに24時間後でもあまり変化しなかつた. 一方B₁を添加したものはごくわずかしか血球に移行せず, 24時間でも13%が血球中に検出されるにすぎなかつた.

### (2) 過酸化水素酸化によるSB₁の測定法

SB₁の定量にはBPO[*7)] 法[5)] が用いられているが著者らはこれを血液試料に応用したさい回収率が低下することを経験した. 過酸化水素がSB₁を酸化して定量的にB₁を生成することは周知の事実であるのでこれを血中SB₁の定量に応用した. まずSB₁標準液1～4×10⁻²μモル(3.37～13.5μgB₁-HCl*E*)に30%過酸化水素水5滴を加え50°C, 5分反応させ, 冷後バームチット処理を行ない以下常法通りBrCN法によつてB₁量を測定したところいずれも96～99%のB₁を生成した. そこで血球に添加したSB₁の回収実験を行ない表1の通り満足な回収結果を得た. なおバームチット処理を行なわずに定量するとまつたく螢光が認められなかつた. これは過剰の過酸化水素がThc[*7)]の生成を妨害しているものと思われる.

図2 TPDおよびB₁の血球移行量
添加量: 13.5μgB₁-HCl *E*
血球: 4 ml, 37°C




### (3) SB₁の血球移行量

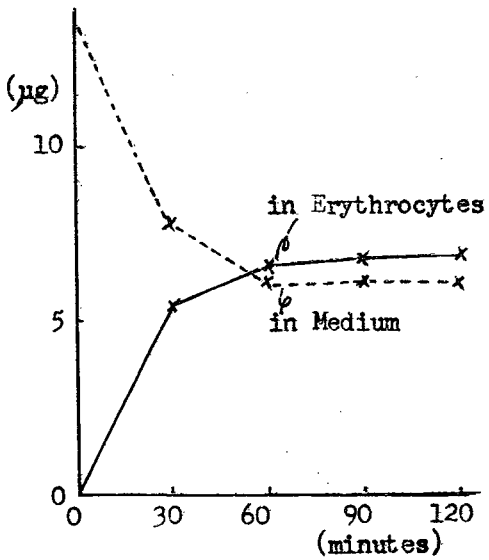
表1 血球添加SB₁の過酸化水素法による定量

| | SB₁添加量 (μg) | $H_2O_2$ | B₁としての検出量 | 回収量* |
|---|---|---|---|---|
| 主験 | 6.6 | + | 7.8 | 6.2 (94)** |
| | | − | 3.2 | |
| | 13.3 | + | 14.9 | 13.3 (100) |
| | | − | 4.2 | |
| 盲験 | 0 | + | 1.5 | |
| | | − | 1.6 | |

* 回収量＝(主験－盲験)×0.99　ただし SB₁-HCl 0.99μg は B₁-HCl 1μg に相当
** 回収率 (%)

*5) B₁-HCl*E*＝B₁塩酸塩相当量　*6) BPO＝Benzoyl peroxide　*7) Thc＝Thiochrome

図3　$SB_1$の血球移行量
添加量：13.5μg $B_1$-HCl *E*
血　球：4 ml, 37℃




$SB_1$の4×$10^{-2}$μモルを血球に添加し30, 60, 90および120分後の血球移行量を定量した(図3). 60分後で血球部と上清部の比はほぼ1：1になりこの比は90分さらに120分でもあまり変化しなかつた.

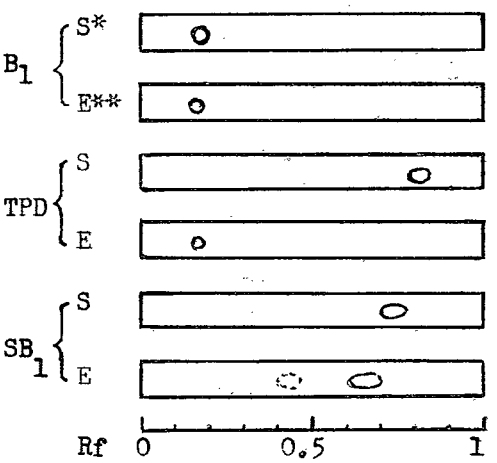
### (4)　$SB_1$, TPD および$B_1$添加血球の洗浄

$SB_1$,TPD および$B_1$の4×$10^{-2}$μモルを添加した血球を図1の操作に従つて洗液1, 2, 3, 血球部および上清部の中の$B_1$量を定量した(表2). $SB_1$は洗液中にかなりの量が検出され, とくに血球部を生理食塩水中で30分保温したばあいは洗液中の量が増加した. 一方$B_1$および TPD を添加した血球では37℃で30分保温したばあいでも洗液中への流出量はわずかであつた. さらに TPDの2×$10^{-1}$μモル(67.4μg $B_1$-HCl*E*)を添加したばあいについても検討したが(このとき血球中には58μg $B_1$-HCl*E* が移行していた)洗液中への流出量は0.3～0.5μg$B_1$-HCl*E*であつた.

### (5)　PPC[8] による血球中存在形の検出

$SB_1$,TPDおよび$B_1$を添加して37℃で60分保温した血球浮遊液を遠沈して血球部をとり, 生理食塩水で洗浄してから溶血, 除蛋白後遠沈しその上澄液を東洋濾紙No.50につけ酢酸・*n*-ブタノール・水(1：4：5)を展開溶媒として1夜展開し赤血塩・アルカリまたはDragendorff 試薬を用いて呈色せしめた(図4). TPD添加血球は$B_1$標品と一致する点に呈色し, TPD 標品

図4　PPCによる血球中存在形の検出
展開溶媒：酢酸・*n*-ブタノール・水(1：4：5)




* S：Standard
** E：in Erythrocytes

表2　血球洗浄による流出(単位 μg)
$B_1$誘導体添加量：13.5μg $B_1$-HCl *E*

| | 上清部 | 洗液 1 | 洗液 2 | 洗液 3 | 血球部 |
|---|---|---|---|---|---|
| S $B_1$ | 4.5* (4.5) | 1.6 (2.2) | 1.3 (0.8) | 1.0 (1.3) | 4.8 (3.4) |
| TPD | 1.6 (1.6) | 0.2 (0.2) | 0.2 (0.2) | 0.1 (0.1) | 11.3 (11.6) |
| $B_1$ | 11.5 (11.1) | 0.4 (0.5) | 0.4 (0.2) | 0.1 (0.1) | 1.2 (1.1) |

単位　μg $B_1$-HCl *E*
*（　）内は洗浄操作において生理食塩水を加えてから 37°C, 30分保温後遠沈したもの.

*8) PPC＝Paper partition chromatography

の部分にはDragendorff 呈色物質は認められなかつた．

$SB_1$添加血球はRf0.43およびRf 0.63に2斑点がみられたが，Rf0.43はRf0.63に比べごくうすい斑点であつた．Rf0.63は$SB_1$(Rf0.73)と思われるがこれを確認するため濾紙を10等分し各濾紙片を0.01*M*HCl で抽出後5％BPO液0.2mlを加えて振りまぜ，30％ NaOH 3 mlで強アルカリ性としてからイソブタノールで抽出し螢光度を測定した．その結果Rf0.63を含む第7画分が最高の螢光度を示し，Rf0.43を含む第5画分は第7画分の6％の螢光度を示すにすぎなかつた．BPOは$SB_1$を特異的にThcにするのでRf0.63の斑点は$SB_1$によるものでありRf0.43は$SB_1$が展開中に酸化されて$B_1$になつたものか，あるいは他の異物と考えられる．

## 考　　察

TPDその他の非対称型$B_1$-disulfideの血球移行性のよいことはTPDが$B_1$よりも脂質への親和性が強く脂質に富む血球膜への親和性が強いためといわれているが血球膜とTPDとの反応では$B_1$に比べいちじるしい結合性の差は証明されなかつた[6]．TPDは-SHによる還元性が強く容易に$B_1$になるが，血球移行性は血球膜に結合するかまたは膜を透過するときに$B_1$に還元され生成した$B_1$が血球内に取込まれることが考えられる．$B_1$は血球膜を透過し得ないので$B_1$は血球内に封入された形となる．同じように$B_1$に比べ脂溶性であり血球移行性のある$SB_1$は血球内でも$SB_1$のままであるので血球を溶血しないように生理食塩水で洗うと$SB_1$は流出する．TPDのばあはい血球を洗つても$B_1$がほとんど流出しない．もしTPDのままで存在すれば生理食塩水で流出できるはずである．血球中のTPDはすべて還元されて$B_1$として存在すると考えるとこの実験成績がよく説明できる．

血球中の$B_1$は溶血後PPCで証明したが，溶血操作でTPDも$B_1$に還元されるからこの証明は血球中の$B_1$の存在形を証明することにはならない．最近TPD-$^{35}$Sを用いた実験[7]で血球中に$B_1$が，血球外にPropyl-$^{35}$Sが証明されたので血球中ではTPDでなく$B_1$として存在することが確実であろう．

著者らの実験によると血球中の$B_1$は24時間放置しても変化しなかつたが，血球を破壊しないかぎり外部へ出る可能性が少ないので生体内での血球移行性はむしろ$B_1$を血球中に封入する形となり，しかも大部分が遊離の$B_1$であるので$B_1$利用上有効なものと考え難い．血球内の酵素系でTransketolaseは$B_1$欠乏に鋭敏に反応し酵素力が低下するといわれるが，血球移行性を非対称型$B_1$-disulfideの利点として強調しようとするならば多量の$B_1$が血球に移行したときのTransketolase活性その他にかんする影響を検討すべきであろう．

## 結　　論

1) TPDは血球浮遊液に加えるとき血球に大部分移行し，血球内の$B_1$含量は24時間後も変化しなかつた．$SB_1$は同条件で血球中に移行するが完全でなく血球中と上清中の比がほぼ1：1であつた．

2) 上の操作で得られた血球を生理食塩水で洗うと$SB_1$添加血球からは$SB_1$の流出が認められたが，TPD添加血球からはほとんど流出が認められなかつた．

3) $SB_1$は血球内で$SB_1$のまま存在するがTPDは血球内で$B_1$に還元されて存在するため生理食塩水で洗い出されないのであろう．

(昭38.7.29.受理)

## 文　　献

1) 鈴置・鈴置：J. Biochem. **40**, 11 (1953)
2) 松川・鈴置：ビタミン **6**, 626 (1953)
3) 須原・入谷：ビタミン **13**, 514 (1957)
4) 須原・入谷：ビタミン **14**, 327 (1958)
5) 川崎・堀尾：ビタミン **12**, 228 (1957)
6) 黒木：ビタミン **13**, 275 (1957)
7) 竹内・島津・小林：ビタミン **26**, 245 (1962)

# PENETRATION OF MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS INTO ERYTHROCYTES

## I. COMPARISON OF THIAMINE PROPYL DISULFIDE AND THIOTHIAMINE

CHIKATARO KAWASAKI, ISAO TOMITA AND SUMIO SHINODA[1]

*School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka*

(Received July 7, 1964)

Reprinted from
THE JOURNAL OF VITAMINOLOGY
Vol. 10, No. 2. June 10, 1964

THE JOURNAL OF VITAMINOLOGY 10, 154—160 (1964)

# PENETRATION OF MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS INTO ERYTHROCYTES

## I. COMPARISON OF THIAMINE PROPYL DISULFIDE AND THIOTHIAMINE

CHIKATARO KAWASAKI, ISAO TOMITA AND SUMIO SHINODA[1]

*School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka*

(Received July 7, 1964)

The fact that thiamine propyl disulfide (TPD) or thiamine allyl disulfide (TAD) in the suspension of washed erythrocytes was more quickly absorbed by erythrocytes than thiamine, and existed in the cells as free thiamine or thiamine diphosphate (TDP) was reported by Suzuoki (1), and many researcheres. Matsukawa *et al.* (2) assumed that the penetration of TAD into erythrocytes was due to simple diffusion because of its fat-solubility. Thiothiamine is known to be more fat-soluble than thiamine, but cannot be converted into thiamine by animal tissues, differing from TPD (3, 4). The penetration of thiothiamine into erythrocytes was therefore compared by the authors with that of TPD.

## EXPERIMENTAL

*1. Erythrocytes*

Defibrinated bovine blood was centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. The erythrocytes were washed twice with Krebs-Ringer phosphate buffer by centrifugation at 3,000 rpm for 10 minutes.

*2. Determination of the Amount of Thiamine Penetrated into Erythrocytes*

To 4 ml of erythrocyte suspension 1 ml of the solution of thiamine derivatives and 3 ml of a saline solution was added and the whole was kept 37° for a certain period. Serum and cells were separated by centrifugation at 3,000 rpm.

The cells were washed twice with a saline solution and the washings were added to the supernatant for the following treatment.

(*a*) To the cells 15 ml of 0.1 *N* sulfuric acid was added and the mixture was heated for extraction. The extract was adjusted to pH 4.5 and 1 ml of 3% Takadiastase B solution was added, followed by incubation at 37° overnight. Then water was filled up to 50 ml and the mixture was filtered through filter paper. An aliquot of the filtrate was used for the test.

(*b*) The supernatant was adjusted to pH 4.5 and 1 ml of 2% Tadadiastase B solution was added. The mixture was kept overnight at 37°. After adding water up to 25 ml, an aliquot of the mixture was used for further experiment.

[1] 川崎近太郎，富田勲，篠田純男.

The sample solutions thus prepared were treated with permutit and the amount of thiamine was determined by BrCN method. But the sample containing TPD or thiothiamine was treated as follows prior to permutit adsorption: To the sample containing TPD 1 ml of 0.5% cysteine solution was added and the mixture was incubated at 60° for 30 minutes at pH 6.0. To the solution containing thiothiamine several drops of 30% hydrogen peroxide was added and the thiothiamine was oxidized to thiamine by shaking at 50° for 5 minutes.

*3. Washing the Erythrocytes*

The suspension was treated as shown in Fig. 1.

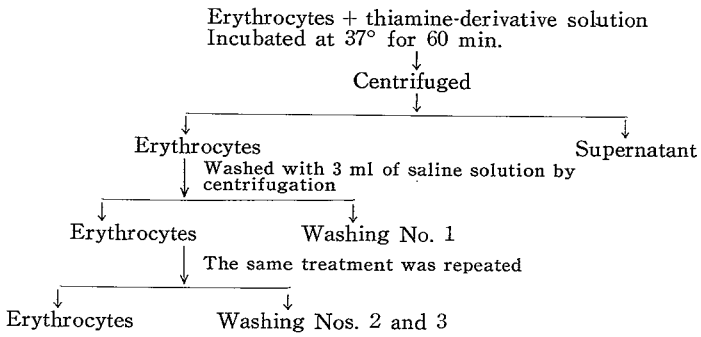



FIG. 1 *Washing the Erythrocytes*

## RESULTS

*1. Penetration of TPD or Thiamine into Erythrocytes*

$4\times10^{-2}$ $\mu$moles of TPD (equivalent to 13.5 $\mu$g thiamine-HCl) or thiamine was added to the erythrocytes. After 30, 60 minutes and 24 hours, the amount transfered into the erythrocytes was determined with the results given in Fig. 2. In the erythrocytes, to which TPD had been added, 80% of it was already found after 30 minutes, and the level was kept practically unchanged for 24 hours, whereas little was found in the cells after thiamine addition and as low as 13% was detected in the cells even after 24 hours.

*2. Determination of Thiothiamine by Oxidation with Hydrogen Peroxide*

Thiothiamine can be determined by benzoyl peroxide method, but when the method was applied to the sample containing blood, the recovery was found to be reduced. The well-known fact that thiothiamine is quantatively oxidized to thiamine by $H_2O_2$ was therefore applied to its determination in the blood. To 1 to $4\times10^{-2}$ $\mu$moles of thiothiamine (equivalent to 3.37 to 13.5 $\mu$g of thiamine-HCl) five drops of 30% hydrogen peroxide were added and the whole was kept at 50° for 5 minutes. After cooling, it was treated with permutit, followed by thiamine determination by the BrCN-thiochrome method. In all the cases, thiamine formed was 96—99%. The amount of thiothiamine added to blood was recovered satisfactorily as shown in Table I. However, without permutit treatment, no fluorescence appeared, possibly due to the inhibition of thiochrome formation by the excess

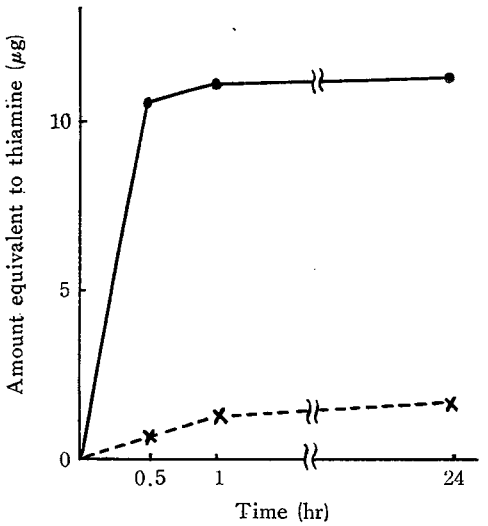



FIG. 2 *Amount of TPD or Thiamine Penetrated into Erythrocytes*
The amounts equivalent to 13.5 μg thiamine-HCl were added.
Erythrocytes, 4 ml, incubated at 37°
●, TPD; ×, thiamine

TABLE I
*Oxidation of Thiothiamine Added to Erythrocytes by Hydrogen Peroxide*

| | Thiothiamine added | $H_2O_2$ | Thiamine detected | Recovery[a] |
|---|---|---|---|---|
| | μg | | μg | |
| Sample | 6.6 | + | 7.8 | 6.2 (94)[b] |
| | | − | 3.2 | |
| | 13.3 | + | 14.9 | 13.3 (100) |
| | | − | 4.2 | |
| Blank | 0 | + | 1.5 | |
| | | − | 1.6 | |

[a] Recovery = (sample − blank) × 0.99 (0.99 μg of thiothiamine-HCl is equivalent to 1 μg of thiamine-HCl)
[b] Percentage of recovery

peroxide.

*3. Penetration of Thiothiamine into Erythrocytes*

$4\times10^{-2}$ μmoles of thiothiamine was added to erythrocytes and the amount penetrated into the erythrocytes was determined after 30, 60, 90 and 120 minutes. As can be seen from Fig. 3, the amount of thiothiamine in the cells was roughly the same as that in the supernatant after 60 minutes. This level remained almost unchanged even for 120 minutes.

*4. Washing the Erythrocytes Added with Thiothiamine, TPD or Thiamine*

The erythrocytes, to which $4\times10^{-2}$ μmoles each of thiothiamine, TPD or thiamine had been added, were washed as shown in Fig. 1 and the amount of thiamine in the washing 1, 2 and 3, the erythrocytes and the supernatant were

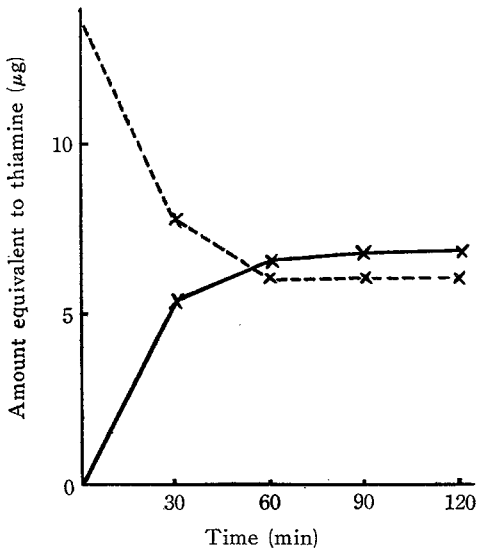



FIG. 3 *Amounts of Thiothiamine Penetrated into Erythrocytes*
The amounts equivalent to 13.5 μg thiamine-HCl were added. Erythrocytes 4 ml, incubated at 37°.
—, in erythrocytes; ---, in medium.

determined.

Much thiothiamine was detected in the washings and the amount markedly increased after incubation of the cells for 30 minutes in a saline solution. However, from the erythrocytes to which thiamine or TPD had been added, very little of it was washed out even after incubation at 37° for 30 minutes. In the experiment, in which $2\times10^{-1}$ μmoles of TPD (eqivalent to 67.4 μg thiamine-HCl) had been added, 58 μg thiamine was detected in the cells, but the amount in the washings was as low as 0.5 μg.

TABLE II
*Amounts of Thiamine Washed out of Erythrocytes*
Thiamine derivatives equivalent to 13.5 μg thiamine-HCl were added

| | Supernatant | Washing No. 1 | Washing No. 2 | Washing No. 3 | Erythrocytes |
|---|---|---|---|---|---|
| Thiothiamine | 4.5 (4.5) | 1.6 (2.2) | 1.3 (0.8) | 1.0 (1.3) | 4.8 (3.4) |
| TPD | 1.6 (1.6) | 0.2 (0.2) | 0.2 (0.2) | 0.1 (0.1) | 11.3 (11.6) |
| Thiamine | 11.5 (11.1) | 0.4 (0.5) | 0.4 (0.2) | 0.1 (0.1) | 1.2 (1.1) |

[a] The amounts determined after incubation at 37° for 30 minutes, followed by centrifugation.

### 5. *Forms of the Thiamine Present in the Erythrocytes*

The erythrocyte suspension incubated with thiothiamine, TPD or thiamine at

37° for 60 minutes was centrifuged. The cells were washed with a saline solution, followed by hemolysis. After depreteinization, the supernatant obtained by centrifugation was subjected to paper chromatography using Toyo Filter Paper No. 50 and developed with a solvent system, acetic acid-*n*-butanol-water (1 : 4 : 5), overnight. Alkaline ferricyanide solution or the Dragendorff reagent was used to visualize the spot (Fig. 4). From the erythrocytes, to which TPD had been added, the spot corresponding to thiamine was found but that corresponding to TPD was not

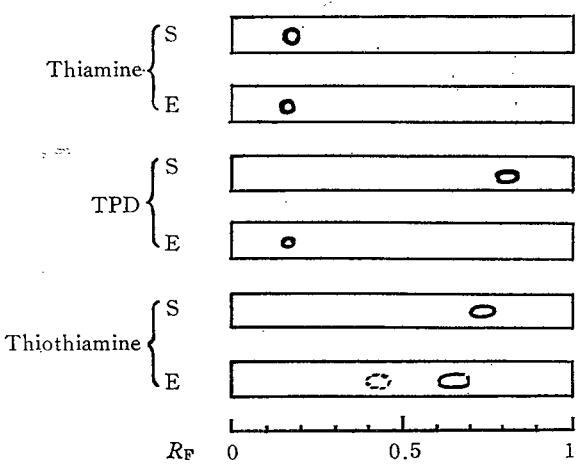



FIG. 4 *Identification of the Form of Thiamine Derivatives Present in Erythrocytes by Paper Chromatography*
Solvent system, acetic acid-*n*-butanol-water (1 : 4 : 5). S, standard; E, in erythrocytes.

detected with the Dragendorff reagent. From the erythrocytes to which thiothiamine had been added, two spots were found at $R_F$ 4.3 and 0.63, the former being fainter than the latter. $R_F$ 0.63 compound seemed to be thiothiamine ($R_F$ 0.73). For confirmation the following experiment was performed. The filter paper was cut into 10 equal portions; each was extracted with 0.01 *M* HCl; after addition of 0.2 ml of 5% benzoyl peroxide solution, the mixture was made strongly alkaline by adding 3 ml of 30% sodium hydroxide; following extraction with isobutanol, the fluorescence was determined. In the fraction 7 corresponding to $R_F$ 0.63 showed the most intensive fluorescence and the fraction 5 corresponding to $R_F$ 0.43 showed the fluorescence as low as 6% of that of the fraction 7. As benzoyl peroxide specifically turns thiothiamine into thiochrome, the spot $R_F$ 0.63 is due to thiothiamine, and the spot $R_F$ 0.43 seems to be due to the thiamine produced by oxidation of thiothiamine during development or other contaminant.

## DISCUSSION

The reason of easy penetration of TPD or other asymmetrical thiamine disulfides into erythrocytes is ascribed to its great affinity to stroma containing much lipids, to which TPD has greater affinity than thiamine. But no marked differences in

the combination of TPD or thiamine with stroma was found in the reaction of stroma and TPD (6). TPD is easily reduced to thiamine by SH-compounds and the penetration of TPD into erythrocytes is assumed to be due to its reduction to thiamine, which takes place during the combination with stroma or during the passage through stroma and the thiamine, once produced, cannot permeate the cell membrane and remains included in the cells. Thiothiamine like TPD is more fat-soluble than thiamine and readily penetrates the cells, but, differing from TPD, it remains in the cells as thiothiamine and by shaking the cells with a physiological saline solution without hemolysis, it is washed out of the cells. But in the case of TPD, thiamine cannot be washed out by shaking with a saline solution. If TPD were present *per se* in the cells, it should be washed out of the cells. The finding can easily be explained if we assume that the TPD in the cells has been entirely reduced to thiamine. Thiamine in the cells could be detected by paper chromatography of the hemolyzed solution, but TPD is partially reduced to thiamine during hemolysis. Therefore it cannot be the proof of the existence of thiamine in the cells. The experiments using TPD-$S^{35}$ (7) demonstrated the presence of thiamine in the cells and that of propyl-$S^{35}$ in the plasma so that it is certain that the vitamin exists in the cells as thiamine but not as TPD. According to the authors' experiments, the thiamine level in erythrocytes remained unchanged for 24 hours. There is scarcely any possibility of washing the thiamine out of the cells unless the cells are destroyed.

The penetration into erythrocytes causes thus the inclusion of thiamine into the cells, the majority being in the free form. It can hardly be believed that thiamine exists in a state beneficial for utilization.

Among the enzyme systems in erythrocytes transketolase is said to react sensitively to the deficiency of thiamine. In order to emphasize the good penetration into erythrocytes to be the benefit of the asymmetrical thiamine disulfides, the transketolase activity after penetration of much thiamine into erythrocytes should be investigated.

## SUMMARY

1. When thiamine propyl disulfide (TPD) is added to erythrocyte suspension, much of it penetrates into the cells and thiamine level remain unchanged for 24 hours. Thiothiamine penetrates also into the cells under the same condition but not complete, the ratio of thiothiamine in the cells to that in plasma being roughly 1 : 1.

2. When the erythrocytes after above treatment were washed with a saline solution, thiothiamine was washed out but TPD could hardly be washed out of the cells.

3. Thiothiamine exists *per se* in erythrocytes but TPD does not. It is present as thiamine after reduction in the cells and it cannot be washed out with a saline solution.

## REFERENCES

1. Suzuoki, J., *J. Biochem.* **40,** 11 (1953).

2. Matsukawa, T., and Suzuoki, J., *Vitamins* **6,** 626 (1953).
3. Suhara, T., and Iritani, N., *ibid* **13,** 514 (1957).
4. Suhara, T., and Iritani, N., *ibid*, **14,** 327 (1958).
5. Kawasaki, C. and Horio, T., *ibid*, **12,** 228 (1957).
6. Kuroki, T., *ibid*, **13,** 275 (1957).
7. Takenouchi, K., Aso, K. and Kobayashi, T., *ibid*, **26,** 245 (1962).

# ビタミン$B_1$誘導体の血球移行性

## (II) Thiamine propyldisulfide と Dicarbethoxythiamine との比較

大阪大学薬学部

川崎近太郎・篠田純男

ビタミン 第29巻 第4号 別冊

昭和39年4月25日発行

# ビタミン$B_1$誘導体の血球移行性

## (II) Thiamine propyldisulfide と Dicarbethoxythiamine との比較

大阪大学薬学部

川崎近太郎・篠田純男

# PENETRATION OF MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS INTO ERYTHROCYTES

## (II) COMPARISON OF THIAMINE PROPYLDISULFIDE AND DICARBETHOXYTHIAMINE

Chikataro KAWASAKI and Sumio SHINODA

School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

Thiamine propyl disulfide (TPD) or dicarbethoxythiamine (DCET) can penetrate into bovine erythrocytes either in whole blood or in suspension of erythrocytes in Krebs-Ringer phosphate buffer ; TPD, when added to a suspension of erythrocytes, was quickly and completely absorbed by the erythrocytes but DCET was only partly and gradually absorbed by them. When applied to whole blood, TPD was incompletely absorbed by erythrocytes, while DCET was absorbed by them to nearly the same percentage as in the case of a suspension. DCET in erythrocytes was washed out by repeated shaking with saline solutions, whereas no washing out of the erythrocytes which contained TPD, by saline was observed. DCET is rather stable either in erythrocytes or in serum ; slow reduction of DCET to thiamine was demonstrated by both paper partition chromatography and microbiologiaal assay using *Kloeckera apiculata*. TPD was quickly reduced to thiamine both by serum and by hemolyzed erythrocytes. The difference between TPD and DCET in their stability in blood systems is partly responsible for easy or slow penetration into erythrocytes.

前報[1]においてTPD*[1]の血球移行性を$SB_1$*[2]と比較して研究したがTPDの血球移行性の一要因として血球内に移行したとき容易に$B_1$に還元されることを指摘した．CAT*[3]類は他の$B_1$誘導体に比べ$B_1$になりにくく動物体内にCATの存在が証明されている[2]．CATは血球内で一部CATのまま存在すると考えられるからTPDの血球移行と異なつた態度を示すであろうことが予想される．CATのうちからDCET*[4]を選び血球移行性についてTPDと比較検討したので報告する．

## 実験方法

### (1) 使用した血液

脱フィブリンしたウシ血液を3,000*rpm*, 10分間遠沈して血球を集めKRP*[5]で2度洗浄しそのつど3,000*rpm*, 10分間遠沈して得た血球にKRPを加えて原血液と等容量の血球浮遊液とした．

### (2) 血球移行量の測定

血球浮遊液または全血4 m*l*に$B_1$誘導体1 m*l*を加え37℃で一定時間保温後8,000*rpm*, 5分間遠沈し血球部と上清部に分け血球部は生理食塩水3 m*l*で速やかに洗浄し洗液を上清部に合してつぎの操作を行なつた．

(a) 血球部は10%メタリン酸溶液20m*l*を加え水浴上15分間煮沸したのち全量50m*l*として濾過し濾液の一定量を検液とした．

(b) 上清部は10%メタリン酸溶液5 m*l*を加え水浴

*1) TPD=Thiamine propyldisulfide *2) $SB_1$=Thiothiamine *3) CAT=Carbalkoxythiamine
*4) DCET=O,S-Dicarbethoxythiamine *5) KRP=Krebs・Ringer phosphate buffer

上15分間煮沸したのち全量 25ml として沈でんのあるばあいは濾過後濾液の一定量を検液とした.

かく調製した検液を直接 BrCN 処理して Thiazole型 $B_1$ (OCET*[6]を含む)を定量し，さらにTPDのときはシステイン処理，DCETのときにはアルカリ処理[3]を行なつてからBrCN法により総$B_1$すなわち Thiazole型 $B_1$+Thiol型$B_1$ (TPDあるいはDCET, CET*[7])を定量し$B_1$塩酸塩として示した.

**(3)　DCETおよびTPD添加血球の洗浄操作**

洗浄した血球2 ml にDCET, TPDを添加し37℃, 15分間保温後遠沈して上清(画分Ⅰ)と血球に分け，この血球に生理食塩水5 ml を添加しただちに遠沈する操作を2度行ない得た上清を画分ⅡおよびⅢとした．さらに血球に生理食塩水5 ml を添加し37℃, 10分保温後遠沈する操作を2度行なつて上清を画分ⅣおよびⅤとし最後に血球を溶血抽出して画分Ⅵを得た.

**(4)　*Kloeckera apiculata* による$B_1$の定量**

川崎ら[4]の方法によつた.

## 実　験　結　果

### (1)　TPD, DCETの全血または血球浮遊液においての血球移行量の比較

玉置ら[5]はTPDの血球移行量は全血と血球浮遊液とでかなり異なることを報告しているのでまず全血について検討した．表1に示した条件で全血または血球浮遊液にTPD, DCET 0.2μモルを添加し37℃，1時間保温後上清部と血球部の総$B_1$量を測定した．DCETは全血と血球浮遊液とで血球移行量の差が認められなかつた．しかしTPDは血球浮遊液では添加量の93％が血球に移行したが全血では血球移行量が減少し血清部と血球部にほぼ1：1の比で存在した.

表1　TPD および DCET の全血または血球浮遊液における血球移行量の比較

| | DCET(μg) | | TPD(μg) | |
|---|---|---|---|---|
| | 血球部 | 上清部 | 血球部 | 上清部 |
| 全　血 | 28.6 (42) | 32.7 (49) | 31.6 (47) | 34.9 (52) |
| 血球浮遊液 | 27.8 (41) | 32.1 (48) | 63.1 (94) | 4.7 (7) |

TPD, DCET 0.2μモル(67.4μg $B_1$-HCl相当量)
全血または血球浮遊液　4 ml
全量　5 ml，37℃，1時間保温
$B_1$-HCl相当量として示し（　）内は添加量にたいする百分比

### (2)　TPD, DCET からの血清または溶血血球液による$B_1$生成量の比較

**1)　血　清**

(1)におけるTPDとDCETの態度の違いは血清の存在によるものと考えられる．血清2 ml にKRP 2 ml およびTPDまたはDCET 0.2μモルを加え全量5 ml として37℃，1時間保温し，以下上清部$B_1$の定量法に従つてチアゾール型$B_1$の定量を行なつた(表2)．DCETからは8％のチアゾール型 $B_1$ が検出されたにすぎなかつたがTPDは91％が$B_1$に還元されていた．$B_1$が血球移行性を示さないことは周知の事実であり著者らもすでに報告した[1]．したがつて(1)の全血のばあい添加されたTPDの一部が血清により$B_1$に分解されるため血球浮遊液に比べて血球移行量が少ないと考えられる.

表2　TPD, DCETからの血清による$B_1$生成量

| | $B_1$生成量(μg) | $B_1$生成率(％) |
|---|---|---|
| DCET | 5.1* | 8 |
| TPD | 61.1 | 91 |

* OCETを含む
TPD, DCET 0.2μモル(67.4μg, $B_1$-HCl相当量)
血清　2 ml，全量　5 ml
pH7，37℃，1時間保温

**2)　溶血血球液**

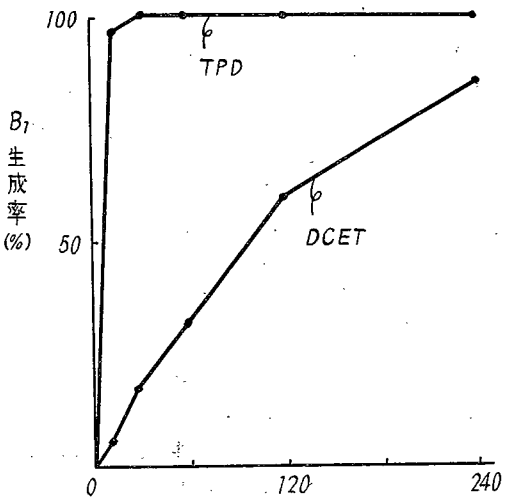
洗浄した血球に水を加えて原血液と等容量とし，さらに凍結融解して溶血させた液4 ml に TPD, DCET の0.2μモルを加え pH6.8, 全量10ml として37℃で保温し以下血球部$B_1$定量法に従つてチアゾール型$B_1$量を定量した(図1)．TPDは最初の測定で完全にチアゾール型$B_1$に還元されておりさらにシステイン処理を行なつても測定値は増さなかつた．DCETからは短時間ではチアゾール型$B_1$はわずかしか検出されずアルカリ処理で測定値が著明に増加しDCETがそのままの形でかなり残つていることがわかつた.

### (3)　血球移行量にたいする時間および濃度の影響

**1)　時間の影響**

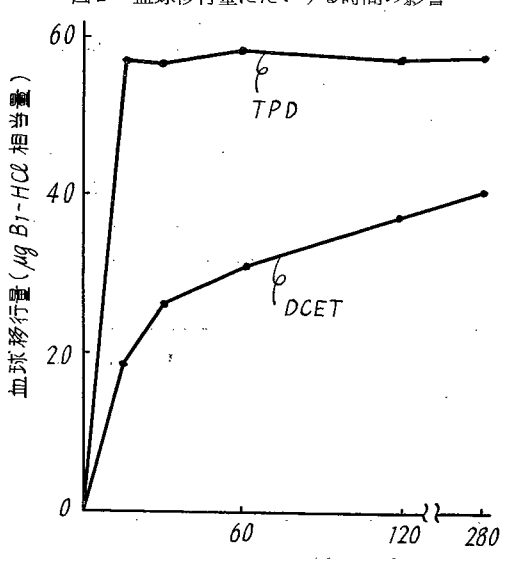
*6) OCET=O-Carbethoxythiamine　*7) CET=S-Carbethoxythiamine

図1　溶血血球液によるTPD, DCETからの$B_1$生成




TPD, DCET 0.2μモル(67.4μg $B_1$-HCl相当量)
溶血血球液 4ml, 全量10ml　pH6.8, 37℃保温

図2　血球移行量にたいする時間の影響



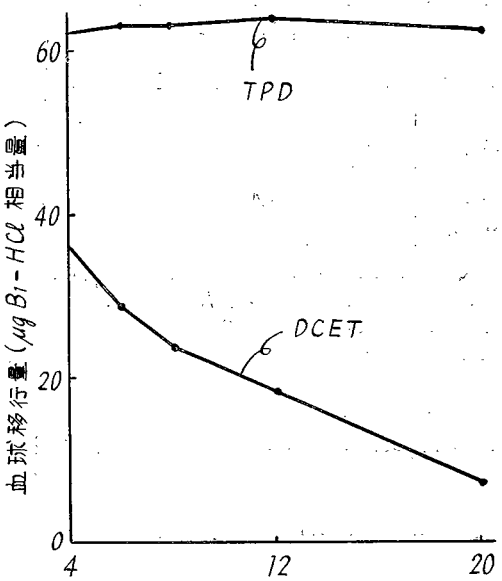

DCET, TPD 0.2μモル(67.4μg $B_1$-HCl 相当量)
血球浮遊液 4ml　全量 5ml　37℃保温

血球浮遊液を用いてTPD, DCETの血球移行量を経時的に調べると図2に示すようにTPDは15分以内に添加量(0.2μモル)の85%が血球に移行し以後変化しなかつたが，DCETは全体としてTPDより血球移行量が少なく保温時間とともに移行量が増した．

**2)　濃度の影響**

血球浮遊液3mlにTPD, DCET 0.2μモルを加えKRPで全量を4～20mlとし37℃で1時間保温して血球移行量を測定した．ただしこの実験では血球浮遊液は元の血液の3/4の液量としたので全量4mlのときがもとの血液と等容量となり全量20mlのときはもとの血液の5倍に希釈された．図3に示したようにTPDは液量に無関係に一定の血球移行量を示したが，DCETは液量と血球移行量がほぼ逆比例の関係となつた．

図3　血球移行量にたいする濃度の影響




DCET, TPD 0.2μモル(67.4μg $B_1$-HCl 相当量) 血球浮遊液 3ml, KRP 0～16ml, 全量4～20ml, 37℃, 1時間保温

## (4)　DCET添加血球のPPC[*8)]

TPDを添加した血球のPPCではTPDは自身は検出されず$B_1$のみが検出されることはすでに報告した[1)]．溶血血球液4mlにDCET 1mg($B_1$塩酸塩相当量)を添加し37℃で保温後0.2N塩酸・エタノールで抽出し全量を20mlとしてこの1mlを幅2cmの濾紙につけ，酢酸・n-ブタノール・水(1：4：5)で展開し乾燥後濾紙の両側巾5mm切り取りDragendorff試薬または赤血塩・アルカリ試薬で呈色させると$B_1$, OCET, DCETまた

*8) PPC＝Paper partition chromatography

はCETに相当する個所に呈色がみられたがDCETとCETはRf値が近いのでCETが分解の中間体としてできているか否かはこのPPCからは不明であつた．そこで残りの濾紙を第1画分（Rf0.1～0.23；$B_1$），第2画分(Rf0.23～0.5；OCET)），第3画分（Rf0.5～1.0；CETおよびDCFT)に分け0.1*N*塩酸で抽出し抽出液の一部をアルカリ処理後$B_1$量を定量し，さらに第3画分の抽出液の一部を*Kl. apiculata*による微生物定量法でCETとDCETの分別定量を行なつた．CETとDCETは*Kl. apiculata*の増殖促進性に量的な差があり[6)7)]この差を利用してCETとDCETの分別定量が可能である．表3に示したように第3画分の27～42％がCETとして検出された．以上のことから明かなようにDCETから$B_1$への中間段階にCET，OCETのいずれも検出された．

表3　濾紙抽出法によるDCET分解産物の分別定量

| Rfによる分類 | 0.10～0.23 ($B_1$) (μg) | 0.23～0.50 (OCET) (μg) | 0.50～1.00 (CETおよびDCET) (μg) |
|---|---|---|---|
| 60分後 | 1.5 | 5.1 | 17.2(4.1)* |
| 120分後 | 4.6 | 7.9 | 12.1(5.1)* |

$B_1$-HCl相当量として示し，（　）*内は微生物定量法によるCET量．ただし各標品のRf値はつぎの通りであつた．$B_1$：0.15，OCET：0.29，CET：0.68，DCET：0.75

### (5)　TPD，DCET添加血球の洗浄実験

前報[1)]で$SB_1$が血球内に$SB_1$の形で存在し，その親油性のゆえに膜透過が容易で生理食塩水で洗い出し得ることを報告した．(2)および(4)で示したようにDCETは血球内で一部はDCETの形で存在するから$SB_1$と同様に生理食塩水で洗い出し得ると思われる．実験方法(3)に従い血球洗浄を行ない表4の結果を得た．画分Ⅰ，Ⅱ，Ⅲで血球外に残つていたものは完全に除去されるから画分Ⅳ，Ⅴで検出されたものはいちど血球内に入つてから洗浄により流出したものである．DCETのばあい画分Ⅳに明らかな検出量の増加がみられⅣ，Ⅴを合した流出量は全体の12.4％となつた．画分Ⅵすなわち最後に血球に残つていたものはほとんどがチアゾール型$B_1$となつていた．一方TPDを添加したときは前報と同じく流出はまつたく認められなかつた．

## 考　　察

$B_1$誘導体の血球膜透過には脂溶性または脂質親和性が一因となつているが血球内で$B_1$に還元されると血球膜を透過できず血球内にとじこめられることになる．TPDとDCETはその血球移行性の態度には大きな違いが認められたが$B_1$への復帰度の難易と関係があるように思える．DCETの血球移行性は1種の拡散であり血球膜内外の濃度が平衡状態にあると考えれば著者らの実験を解釈し得る．すなわちDCETを血球に添加すると血球外の濃度に応じて血球に移行し$B_1$への分解が遅いため洗浄により血球外の濃度がさがるとふたたび膜を透過して血球外に流出し，また逆に長時間保温すると血球内で$B_1$に分解されるため血球内に入り結果的には時間とともに血球移行量が増す．TPDはDCETと同じく拡散により血球内に入り速やかに$B_1$に還元されて血球外に出られなくなり血球内にとどまるとも考えられるが，血球内にとりこまれる速度が速い点から血球膜とTPDの結合力が強く血球膜を透過のときDisulfide結合が切れ$B_1$がとりこまれPropylmercaptanまたその化合物を放出することが血球移行の因子とも考えられDCETに比べてより特異的なTPDの性質ということができる．

表4　TPD，DCET添加血球の洗浄実験

| | 上清部 | | | | 洗浄による流出 | | | 血球部 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 画分 | Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ | 計 | Ⅳ | Ⅴ | 計 | Ⅵ |
| DCET | 56.6 (12.5)* | 10.2 (1.3) | 1.8 (0.7) | 68.6 (14.5) | 9.8 (2.4) | 2.6 (0.5) | 12.4 (2.9) | 19.0 (18.3) |
| TPD | 4.5 (4.0) | 1.6 (1.5) | 1.2 (1.2) | 7.3 (6.7) | 0.3 (0.4) | 0.3 (0.2) | 0.6 (0.6) | 92.1 (92.3) |

添加量　0.5μモル（169μg $B_1$-HCl相当量）
単位：％
*（　）内はThiazole型$B_1$量

## 結　　論

TPD と DCET のウシ全血または血球浮遊液においての血球移行性を比較し両者の間に異なる点を見出した.

(1) 血球浮遊液からの血球移行量はDCETにおいては保温時間, 濃度に影響されるが, TPD ではそれらに無関係に一定の血球移行量を示した.

(2) 全血では TPD は血球浮遊液におけるより低い血球移行量を示したが, DCETは血球浮遊液と同様の血球移行量を示した.

(3) TPD は血清および血球で速やかに$B_1$に還元されるが, DCETは同条件で$B_1$へ復帰しがたく$B_1$の生成量が低かつた.

(4) DCET は添加した血球を生理食塩水で洗うと DCET の流出がみられたが, TPD を添加したばあい流出はほとんどおこらなかつた.

以上のことからDCETの血球移行性は単純な拡散によるものと考えられるが, TPD はたんに拡散だけでなく$B_1$に還元され易く還元された$B_1$が血球膜を透過しがたい点が関連していると思える. なおDCETの血球による分解産物としてCET, OCETおよび$B_1$をPPC および微生物法により検出した.

(昭39.2.22. 受理)

## 文　　献

1) 川崎・富田・篠田：ビタミン **28**, 310(1963)
2) 竹内・麻生・野崎：ビタミン **26**, 222(1962)
3) 山本・稲津・窪田：ビタミン **25**, 472(1962)
4) 川崎・平岡・島本：ビタミン **22**, 397(1961)
5) 玉置・能勢：J. Vitaminol. **1**, 85(1955)
6) 川崎・平岡・島本：ビタミン **28**, 295(1963)
7) 川崎・篠田：ビタミン **28**, 299(1963)

# Hydroxyethylthiamineにかんする研究

## (I) Hydroxyethylthiamineおよびその関連化合物の微生物活性

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・紀氏健雄・篠田純男

ビタミン 第35巻 第2号 別冊

昭和42年2月25日発行

# Hydroxyethylthiamineにかんする研究

## (I) Hydroxyethylthiamineおよびその関連化合物の微生物活性

大阪大学薬学部衛生化学教室

川崎近太郎・紀氏健雄・篠田純男

Vitamins (Japan) **35**, (2), 140-145 (1967)

# STUDIES ON HYDROXYETHYL-2′-THIAMINE

## (I) THE ACTIVITIES OF HYDROXYETHYL-2′-THIAMINE AND ITS RELATED COMPOUNDS ON MICROORGANISMS

Chikataro KAWASAKI, Takeo KISHI and Sumio SHINODA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Toyonaka

Hydroxyethylthiamine (HET) and its related compounds showed the following activities on thiamine-requiring microorganisms for the growth. (1) HET, hydroxypropylthiamine (HPT) and hydroxyisobutylthiamine (HIBT) stimulated the growth of *Lactobacillus fermenti* at the same rate as thiamine, but the O-acylated compounds of HET, HPT and HIBT showed lower activities than thiamine. (2) HET, HPT and their O-acylated compounds stimulated the growth of *Kloeckera apiculata* at the same rate with thiamine, but HIBT and its O-acylated compounds showed lower activities than thiamine. (3) The growth stimulating activities of D- and L-HET on *L. fermenti* and *Kl. apiculata* were almost same as thiamine, but the activity of D-HET was a little higher than L-HET. (4) *Kl. apiculata* and *Saccharomyces carlsbergensis*, grown in the broth containing HET, accumulated thiamine and HET *per se* in cells. HET, HPT and HIBT proved to be inhibitory to the growth of *Sacch. carlsbergensis* to the same extent as thiamine, but the O-acylated compounds of HET, HPT and HIBT showed lower inhibition than thiamine. The growth inhibitions by HET, HPT and HIBT were reversed by the addition of pyridoxine.

Breslowの仮説[1]以来HET-PP*[1]はピルビン酸の脱炭酸系における$B_1$の活性中間体として注目され，酵素系を用いての多くの実験によりそれを裏づける事実が得られている．HET*[2]は$B_1$要求性の乳酸菌*Lactobacillus fermenti*および*L. viridescens*にたいして$B_1$の約80%の活性を持つことがKrampitz[2]により報告され，村上ら[3]もD-およびL-HETの*L. fermenti*にたいする活性について報告している．今回HETおよびその関連化合物の試料の提供を受けたのでそれらの微生物活性を検討した．

## 実験方法および試料

### (1) 使用菌株

*L. fermenti* 36 (IFO 3071), *Kl. apiculata* (IFO 0630), *Sacch. carlsbergensis* (IFO 0565)

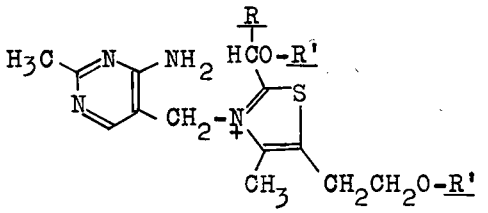
### (2) 菌の培養方法

川崎らの報告[4)5)6)]にしたがい滅菌した基礎培地2 mlに試料液を無菌的に加え全量4 mlとし注射針より菌液を1滴加え，培養後日立光電比色計を用いて610mμにおける濁度を測定した．

### 3) 試料

試料化合物の構造は次ページに示したが化合物I～VIIは武田薬品工業より，VIIIおよびIXは山之内製薬より供与されたものを用いた．いずれも滅菌蒸留水に溶解して試料液とした．なお以下の記述でたんにHETと記したものはDL体を意味する．

*1) HET-PP = α-Hydroxyethyl-2′-thiamine pyrophosphate



| | | R | R′ |
|---|---|---|---|
| I | HET*2) | $-CH_3$ | -H |
| II | AHET*3) | $-CH_3$ | $-COCH_3$ |
| III | PHET*4) | $-CH_3$ | $-COC_2H_5$ |
| IV | HPT*5) | $-CH_2CH_3$ | -H |
| V | AHPT*6) | $-CH_2CH_3$ | $-COCH_3$ |
| VI | HIBT*7) | $-CH(CH_3)_2$ | -H |
| VII | AHIBT*8) | $-CH(CH_3)_2$ | $-COCH_3$ |
| VIII | L-HET | | |
| IX | D-HET | | |

## 実　験　結　果

### (1) *L. fermenti* にたいする活性

$B_1$要求性乳酸菌*L. fermenti*にたいしては37℃, 20時間の培養で図1-Aの結果を得た．HETは$B_1$とほぼ等しい活性を示し，AHETおよびAHIBTのようなO-アセチル体は$B_1$より低い活性を示した．

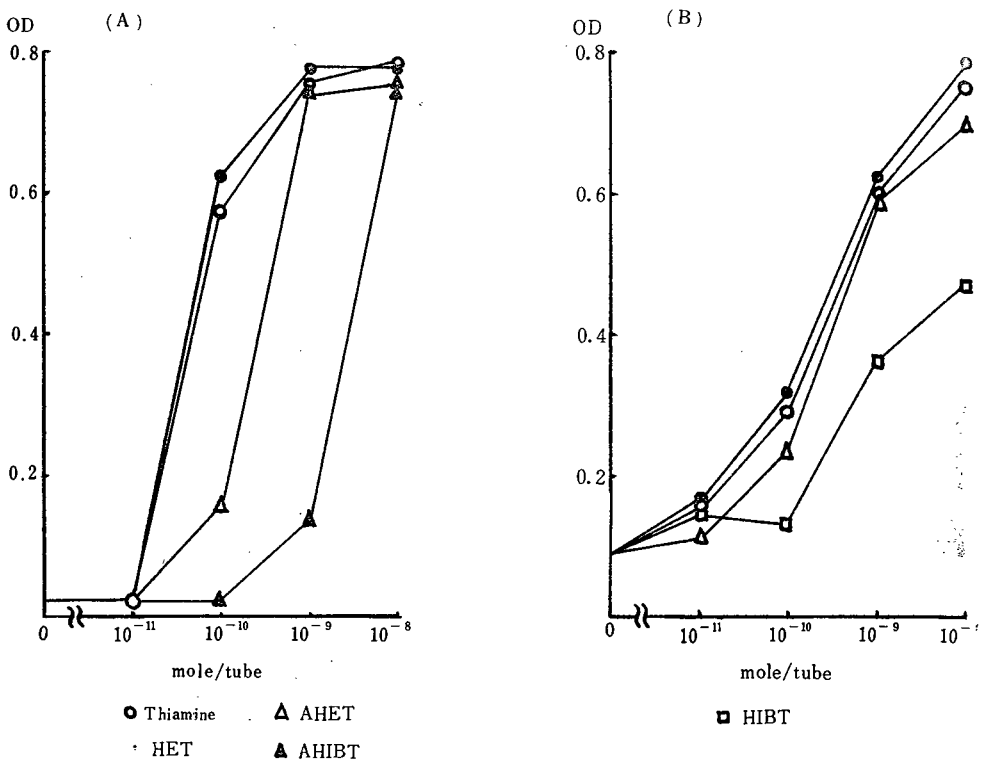
### (2) *Kl. apiculata*にたいする活性

$B_1$要求性酵母*Kl. apiculata*にたいしては図1-Bのごとく HIBTは$B_1$より活性が低く，HETおよびそのアセチル体は$B_1$と同等の活性を示した．

### (3) *Sacch. carlsbergensis*にたいする態度

*Sacch. carlsbergensis*は$B_1$により増殖が阻害され，

Fig. 1　The growth stimulating activities of HET and its related compounds on *L. fermenti* (A) and *Kl. apiculata* (B)




*2) HET＝α-Hydroxyethyl-2′-thiamine　*3) AHET＝O-Acetyl-α-hydroxyethyl-2′-thiamine
*4) PHET＝O-Propionyl-α-hydroxyethyl-2′-thiamine　*5) MPT＝α-Hydroxypropyl-2′-thiamine
*6) AHPT＝O-Acetyl-α-hydroxypropyl-2′-thiamine　*7) HIBT＝α-Hydroxyisobutyl-2′-thiamine
*8) AHIBT＝O-Acetyl-α-hydroxyisobutyl-2′-thiamine

$B_6$の添加でその阻害が回復される酵母である．本酵母にたいしてHETは$B_1$と同等の増殖阻害作用を示したが，AHETは$B_1$より増殖阻害作用がやや低く，AHPT

Fig. 2 The inhibitory effect of HET and its related compounds on the growth of *Sacch. carlsbergensis*

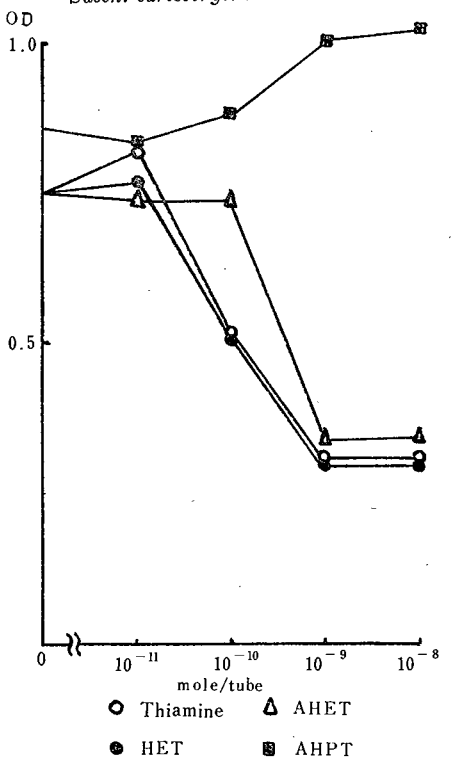


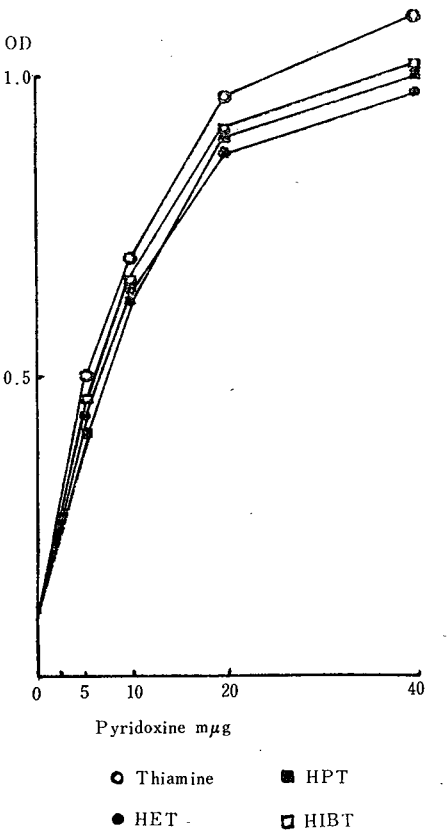

Table 1 The microbiological activities of HET and its related compounds

| | Ratio of growth stimulation* | | Ratio of growth inhibition* |
|---|---|---|---|
| | *L. fermenti* | *Kl. apiculata* | *Sacch. carlsbergensis* |
| Thiamine | 1 | 1 | 1 |
| HET | 1.11 | 1.25 | 1 |
| AHET | 0.17 | 0.91 | 0.18 |
| HPET | 0.13 | 1 | 0.13 |
| HPT | 1.11 | 0.91 | 1 |
| AHPT | 0.08 | 1 | 0** |
| HIBT | 1.11 | 0.09 | 1 |
| AHIBT | 1.02 | 0.23 | 0** |

* Ratio = (Dose of thiamine at 50% stimulation or inhibition)/(Dose of HET and its related compounds at 50% stimulation or inhibition)

** Growth-stimulating at higher concentraton

Fig. 3 The effect of pyridoxine on reversal of the growth inhibition by HET and its related compounds




にはまつたく阻害作用がなかつた(図2)．

同様にして以上3種の菌にたいする活性を他の化合物についても調べその結果をまとめて表1に記した．

*Sacch. carlsbergensis*にたいして増殖阻害を示したHET，HPT，HIBTおよび$B_1$ $10^{-6}$モルを含む培地に$B_6$を添加し培養するといずれも$B_6$により阻害の回復がみられた(図3)．

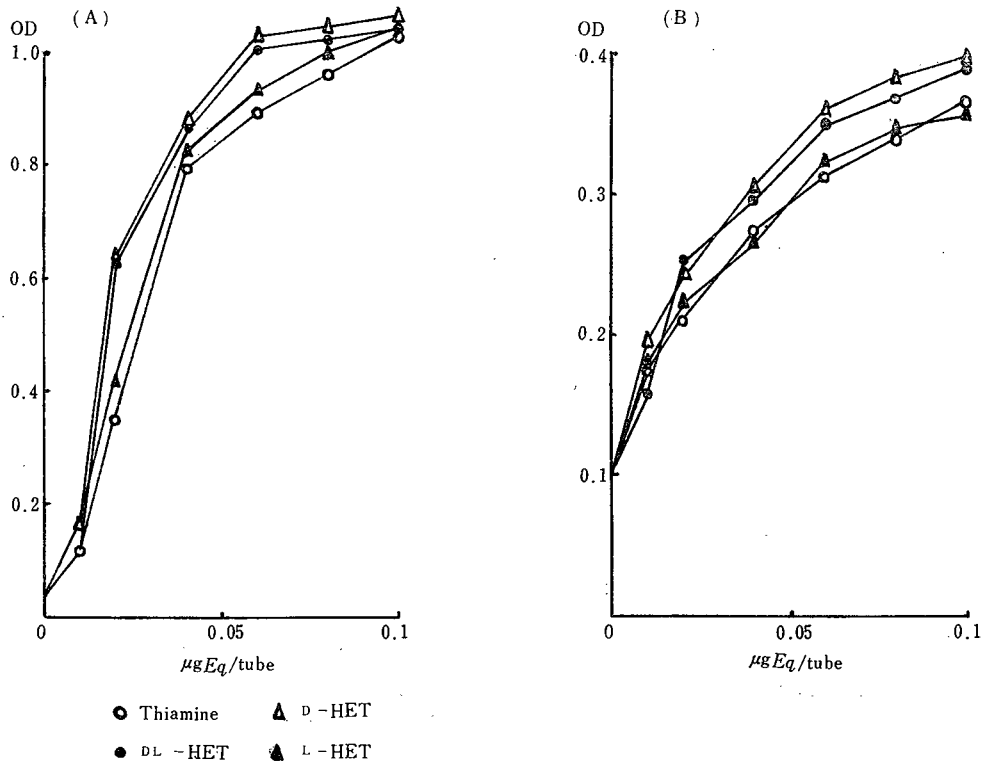
### (4) D-およびL-HETの活性

光学活性のD-およびL-HETの*L. fermenti*および*Kl. apiculata*にたいする活性をしらべると図4のように両菌にたいしてD-HETの方がやや高い活性を示した．

### (5) HETの*Kl. apiculata*による集積ならびに$B_1$への変化

HETまたは$B_1$ $1.5\times10^{-8}$〜$10^{-6}$モルを含む培地60ml

Fig. 4　The growth stimulating activities of D-, L- and DL-HET on *L. fermenti* (A) and *Kl. apiculata* (B)




*Kl. apiculata* を接種し30℃, 20時間培養し増殖度を測定後菌を遠沈して集め，生理食塩水で2回洗浄し，つぎのようにしてHETまたは$B_1$量を測定した．

上清液はそのまま検液とし，菌体は 0.1*N* $H_2SO_4$ で10分間煮沸抽出したものを検液とした．各検液の一定量に1％タカジアスターゼB液1 *ml*を加えpH4.5, 50℃で2時間保温後 BrCN-Thc*[9] 法またはフェリシアン-Thc法により$B_1$または HET 量を測定した．HETはフェリシアン塩と反応して Thc を生成するが，BrCN との反応では Thc を生じないのでフェリシアン塩による測定値と BrCNによる測定値の差を求めればHET量を知ることができる[3)7)8)]．しかし$B_1$とフェリシアン塩の反応では Thc の生成率は BrCN のばあいにくらべ低く[9)]，HET からの Thc生成率と一致しないことが多いのでHET, $B_1$の抽出液にたいする添加回収実験を行ない測定値を補正した(表2)．

$B_1$を添加して培養したとき HET の生成は認められなかつたが HET を添加して培養したとき培地中に残存するものはすべて HET であり菌体に集積されたものは一部$B_1$になり，残りは HETのまま存在していた．さらに菌体抽出液を東洋ろ紙No. 50につけ0.1*N* HCl・エチレングリコール・*n*-ブタノール(1：1：4)で展開し，*L. fermenti*による Bioautography を行なつたところ$B_1$およびHETが検出された．

Table 2　The accumulation of HET and its conversion to thiamine by *Kl. apiculata*

| Dose of sample (mμmole) | | Growth (O.D.) | Accumulation (mμmole) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Thiamine | HET | Total |
| Thiamine | 15 | 0.81 | 15 | 0 | 15 |
| | 150 | 0.80 | 148 | 0 | 148 |
| | 1500 | 0.81 | 636 | 0 | 636 |
| HET | 15 | 0.81 | 11 | 3 | 14 |
| | 150 | 0.81 | 90 | 65 | 155 |
| | 1500 | 0.82 | 231 | 495 | 726 |

*9) Thc＝Thiochrome

### (6) *Sacch. carlsbergensis* による HET の集積ならびに$B_1$への変化

$B_1$またはHET $1.5\times10^{-7}$モルまたは$1.5\times10^{-6}$モルを含む培地60ml ($B_6$不含)に*Sacch. carlsbergensis* を接種し30℃, 20時間振とう培養を行なつた．菌の増殖度を測定したのち遠沈して菌を集め，以下(5)の *Kl. apiculata* のばあいに準じて菌体および上清の$B_1$またはHET含量を測定した(表3)．

Table 3 The accumulation of HET and its convertion to thiamine by *Sacch. carlsbergensis*

| Dose of sample (mμmole) | | Growth (O.D.) | Accumulation (mμmole) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Thiamine | HET | Total |
| Thiamine | 150 | 0.80 | 150 | 0 | 150 |
| | 1500 | 0.78 | 480 | 0 | 480 |
| HET | 150 | 0.79 | 75 | 75 | 150 |
| | 1500 | 0.81 | 103 | 285 | 388 |
| None | | 1.42 | 8 | 0 | 8 |

添加した$B_1$または HET は試験管を用いた微生物定量では$10^{-8}$または$10^{-7}$モル/tubeに相当し十分な増殖阻害作用を示す量である．振とう培養を行なつたので菌の増殖度は高かつたが試料無添加のばあいに比べると著しい増殖阻害効果がみられた．添加した試料は$1.5\times10^{-7}$モルでは全部が菌体に，また$1.5\times10^{-6}$モルでは約30%が菌体に集積されており，$B_1$添加時には HET 生成がみられなかつたがHET添加時には*Kl. apiculata* のばあいと同様かなりの部分が HET のままで菌体に集積されていた．

## 考　　察

HET およびその関連化合物の微生物活性を総括すると表1のようになる．*L. fermenti* および *Sacch. carlsbergensis*にたいする作用には相関関係がみられ5′の側鎖 $-C_2H_4OH$のOH 基がエステル化されていない HET, HPT および HIBT は両菌にたいして$B_1$とほぼ等しい効果を示したが，それらのアシル体はいずれも$B_1$より低い作用しか示さなかつた．

*Kl. apiculata* にたいしては HET, HPT およびそれらのO-アシル体は$B_1$に等しい効果を示したが，HIBT およびそのO-アセチル体は$B_1$より効果が低く *Kl. apiculata* にたいしては OH 基がエステル化されているか否かは活性に影響しなかつた．

これらの知見は他の$B_1$誘導体により得られた従来の知見とほぼ一致するものである．しかし従来の$B_1$誘導体は$B_1$に復帰して$B_1$効果を示し，かなり$B_1$に復帰しにくい誘導体でも20時間の培養を行なつたのちには菌体に存在するものはすべて$B_1$になつていたが，HET を添加して*Sacch. carlsbergensis*および *Kl. apiculata* を培養したとき，かなりの量の HET が両菌から検出された．

著者らは他の実験で人およびシロネズミに HET を投与したときかなりの HET が尿中に排泄されることを認めた[11]．HET は$B_1$欠乏のシロネズミおよびジウシマツにたいして$B_1$と同等の成長効果を示すことが報告されている[12]．このように HET が$B_1$になりにくいにもかかわらず$B_1$と同等の活性を示す事実は HET のままリン酸化されて酵素系に組入れられる可能性を示唆するものであろう．しかし酵母は細胞壁の外側に多量の$B_1$をしかも遊離型のままで付着させることができる[13]．したがつて *Sacch. carlsbergensis* および *Kl. apiculata* の菌体から検出された HET は$B_1$とおなじように細胞壁付近に付着したものであろう．

Krampitzら[2]はDL-HETが*L. fermenti* にたいして$B_1$の約80%の活性を示すことからいずれか一方の光学活性体が$B_1$効果を示すのであろうと推論しているが，著者らの実験ではややD体の方が高い活性を示したがL体との差はあまりなかつた．同様な事実は村上らによつても報告されている[3]．D体のみがそのままの型で酵素系に組入れられると仮定することはこれらの結果から否定されるように思う．

## 結　　論

HET およびその関連化合物の微生物活性を調べつぎの知見を得た．

(1) HET, HPTおよび HIBTは$B_1$要求性乳酸菌*L. fermenti*にたいして$B_1$と同等の活性を示したが，それらのO-アシル体はいずれも$B_1$より活性が低かつた．

(2) HET, HPT およびそれらのO-アシル体は$B_1$要求性酵母*Kl. apiculata*にたいして$B_1$と同等の活性を示したがHIBTおよびそのO-アセチル体の活性は$B_1$よりも低かつた．

(3) HET, HPT および HIBT は$B_1$により増殖阻害を受ける酵母 *Sacch. carlsbergensis* にたいして$B_1$と同等の阻害効果を示したがそれらの O-アシル体の阻害は$B_1$より少なかつた．HET, HPTおよびHIBTによる増殖阻害は$B_6$の添加で回復した．

(4) D-およびL-HETの *L. fermenti* および *Kl. apiculata* にたいする活性は$B_1$にほぼ等しかつたが前者の方がやや高い活性を示した。

(5) HETを添加して培養した *Kl. apiculata* および *Sacch. carlsbergensis* の菌体から$B_1$のほかにHET自身が検出された。

終りに試料を提供された武田薬品工業KKならびに山之内製薬KKに感謝します。なお本報告の要旨は第21回日本薬学大会において発表した。

## 文　献

1) Breslow, R. : J. Am. Chem. Soc. **50**, 3719 (1958)
2) Krampitz, L.O., Greull, G., Suzuki, I. : Fed. Proc. **18**, 266(1959)
3) 村上・塩原・佐藤・服部・小谷：ビタミン **32**, 165(1965)
4) 川崎・平岡・島本：ビタミン **22**, 389(1961)
5) 川崎・平岡・島本：ビタミン **22**, 397(1961)
6) 川崎・山田：ビタミン **30**, 358(1964)
7) Shiobara, Y. : J. Biochem. **59**, 76(1966)
8) 川崎・篠田：ビタミン **32**, 291(1965)
9) 堀尾：ビタミン **21**, 515(1960)
10) 川崎・川田：ビタミン **28**, 290(1963)
11) 川崎・篠田：日本薬学会第22回大会(1966)
12) Shiobara, Y., Sato, N., Homma, H., Hattori, R., Murakami, M. : J. Vitaminol. **11**, 302 (1965)
13) 高田・市川：ビタミン **7**, 535(1954)