



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

論文目録

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 B₁ 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 B₁ 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 B₁ 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 B₁ 誘導体の微生物活性 (XIV) 酵母に集積されたビタミン B₁ 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 B₁ 誘導体の微生物活性 (XV) *Kloeckera apiculata*
によるビタミン B₁ 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 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

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 B₁ 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 B₁ 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

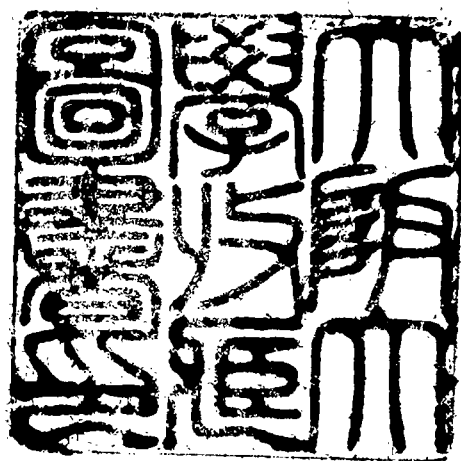
1. Hydroxyethylthiamine にかんする研究(I) Hydroxyethylthiamine およびその関連化合物の微生物活性

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 C E T および T P D 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 Pyriethiamine 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 C E T , T P D 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 (T D P) として検出された。すなわち C E T , T P D は添加されたものすべてが増殖に利用され得る T D P 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 T D P 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0.8 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 (Coccarboxylase)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。

TDP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対して 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、TDP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

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)} ⁽⁶⁾⁽¹²⁾ ⁽¹³⁾ ⁽¹⁴⁾⁽¹⁷⁾乳酸菌、大腸菌、酵母による 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⁽¹⁸⁾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*⁽¹⁹⁾ 70-23,
Saccharomyces cerevisiae⁽²⁰⁾ 7753 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。

C E T : S-Carbethoxythiamine

T P D : Thiamine propyl disulfide

C B T : S-Carbobutoxythiamine

D C E T : O, S'-Dicarbethoxythiamine

T T F D : Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide

T A T D : Thiamine -8-(methyl-6-acetyldihydrothioctate)
disulfide

B T M P : S-Benzoylthiamine- β -monophosphate

S B T : S-Benzoylthiamine

T D S : Thiamine disulfide

T D P : Thiamine diphosphate

T M P : Thiamine monophosphate

μ g Eq : Equivalent to μ g thiamine

M B : Methylene blue

第1章 Thiamine, s-Carbethoxythiamine

および Thiamine propyl disulfide

の *Kl.apiculata* に対する増殖促

進性⁽²¹⁾⁽²²⁾

第1節 Thiamine, CET および TPD の *Kl.apiculata*

に対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 2 ml をオートクレーブにて 0.75 Kg/cm^2 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 4 ml 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°C 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- $5\text{H}_2\text{O}$ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4g CaCl_2 ,
4g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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 $610 \text{ m}\mu$ 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

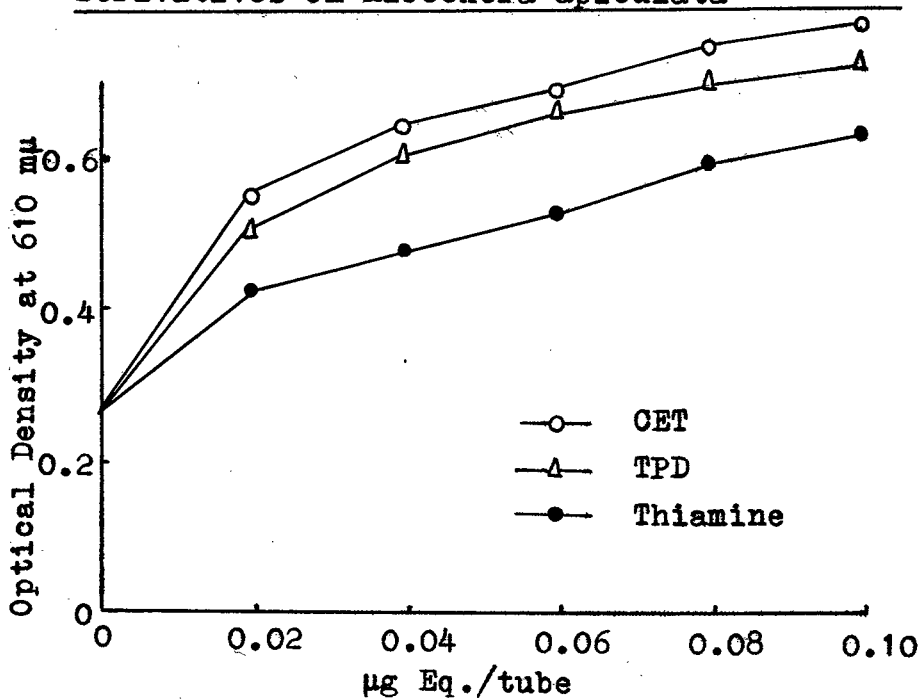
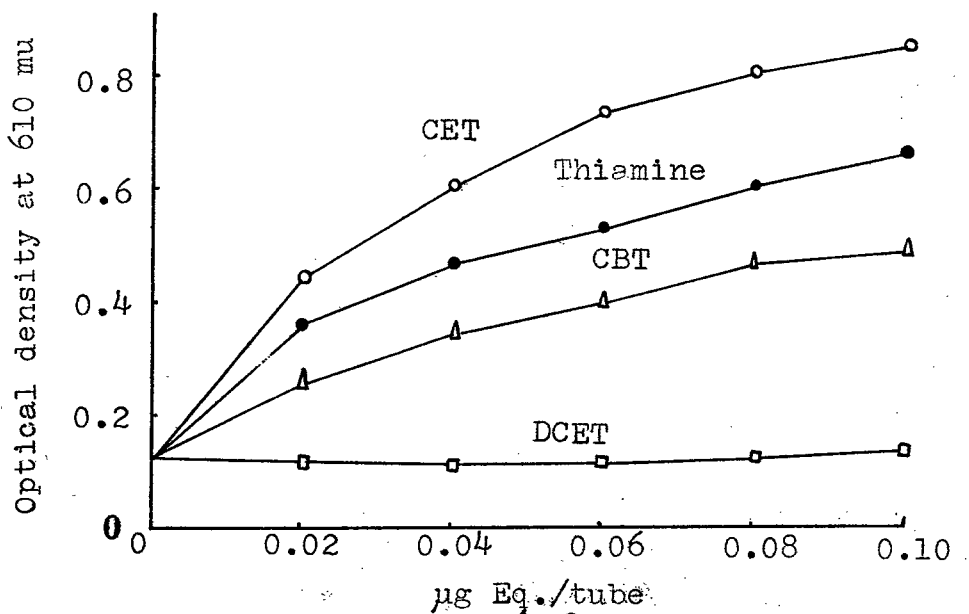


Fig.2 The Growth Stimulating Activity of Thiamine Derivatives on Kloeckera apiculata



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

Concentration of samples: 0.5 μ g 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 μ g 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 C E T , T P D 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に変化するのに対して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⁽²⁴²⁵⁾への変化速度にも大きな差がみられる。この両者の菌体での活性機序について比較検討を行なった。

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、0.01 M 酢酸緩衝液にて pH 4.7としThiamine, CETまたはTPD 10 μ g 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0~0.1 μ g 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. の測定を行なった。

(2) 菌体抽出液のBioautography

菌体を生理食塩水で2回洗浄し0.1 N 塩酸で90~95℃、5分間抽出し、抽出液を東洋汙紙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、風乾後汙紙を10等分し各汙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 T P D の増殖促進性

培地に終濃度 50 mg % となるように Cysteine 塩酸塩を加え、各量の Thiamine または T P D を添加し 60 °C , 30 分間保温し、冷後 K1. apiculata を接種し 30 °C , 20 時間培養後増殖度を測定した。

(4) Takadiastase 処理後の Thiamine または C E T の活性

培地に終濃度 250 mg % となるよう Takadiastase B を加え、Thiamine もしくは C E T を加えて 37 °C 24 時間保温後 100 °C , 15 分間滅菌し、冷後 K1. apiculata を接種し 30 °C , 20 時間培養後増殖度を測定した。

(5) K1. apiculata の同調培養法

⁽²⁶⁾ N. Sando, ⁽²⁷⁾ T. Yanagida らの方法を参考として次の操作を行つた。

K1. apiculata の生理食塩水浮遊液を 1,500 rpm, 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 °C , 2 時間保温したのち試料を含む培地で 100 倍に希釈し 30 °C で振とう培養を行なつた。15 分ごとに培養液 4 ml 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 C E T 集積菌の増殖度 (Fig. 3)

Thiamine または C E T 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 C E T 添加時の増殖度は Thiamine 添加時よりも高く、C E T 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) C E T 添加培養時の菌体中存在型の検索 (Fig. 4, 5)

Thiamine または C E T を集積した菌体を振とう培養し増殖度を継続的

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

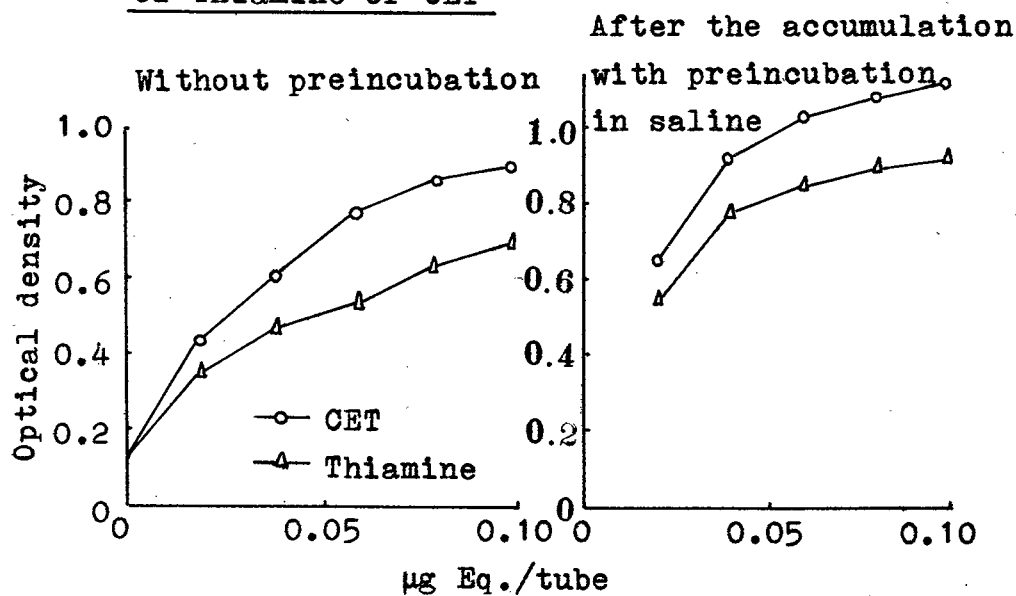


Fig.4 Growth of Cells Accumulated with Thiamine or CET

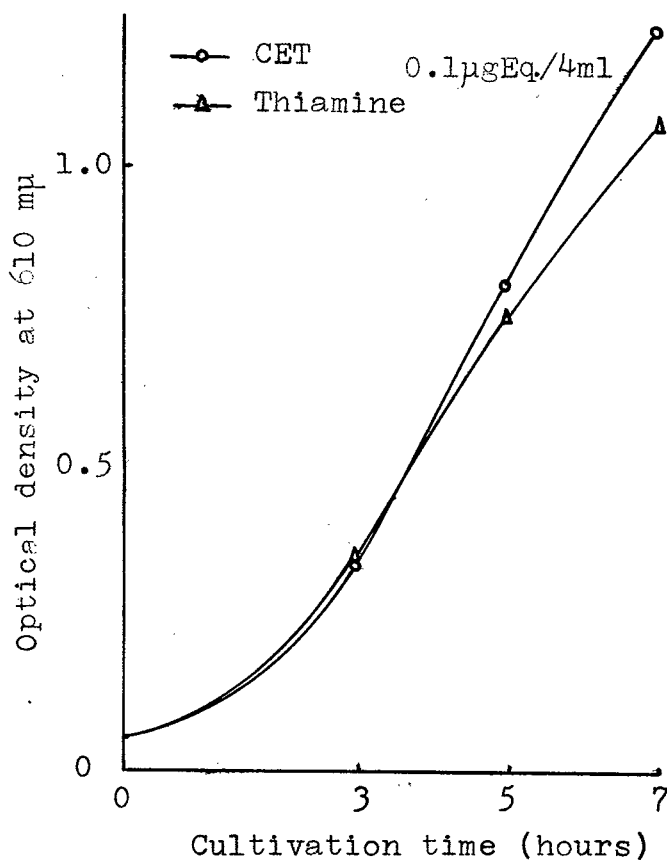
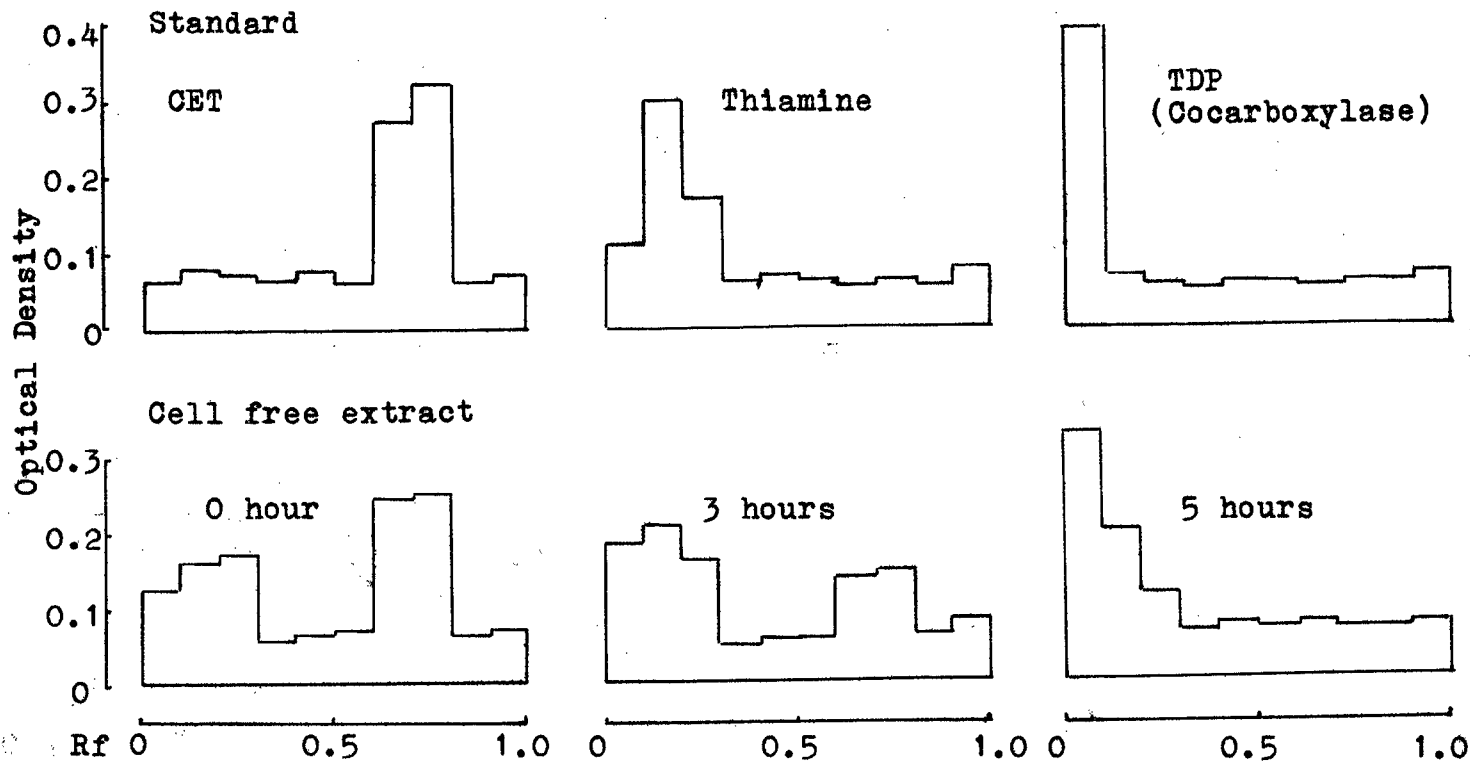


Fig.5

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

Solvent system Acetic acid;n-Butanol:Water (1:4:5)



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

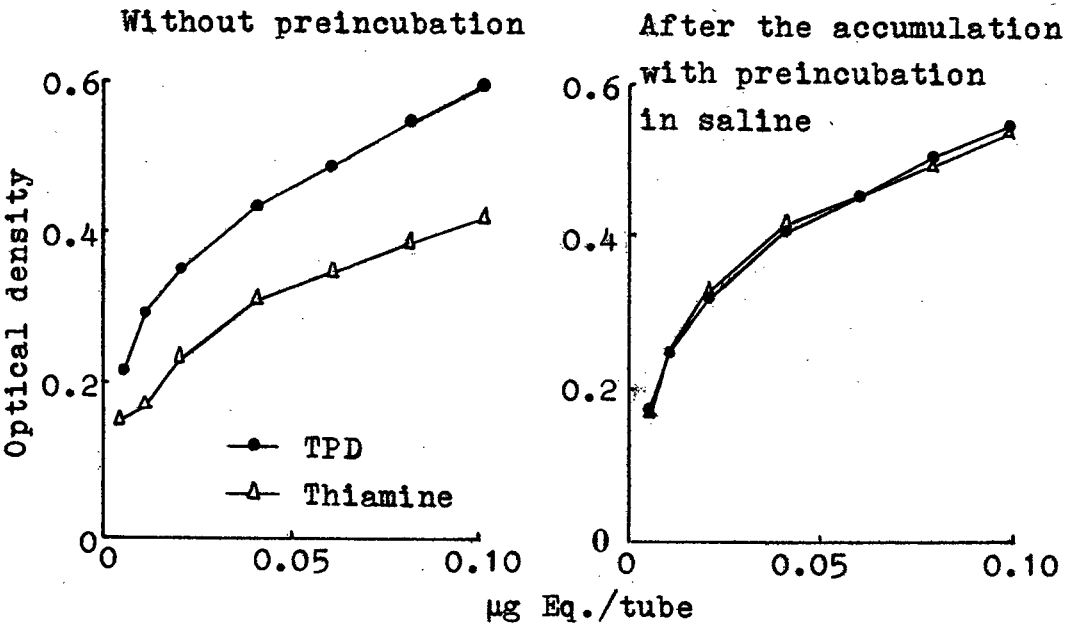


Fig.7 Effects of the Amounts of Inoculated Cells
to the Activity of TPD or Thiamine

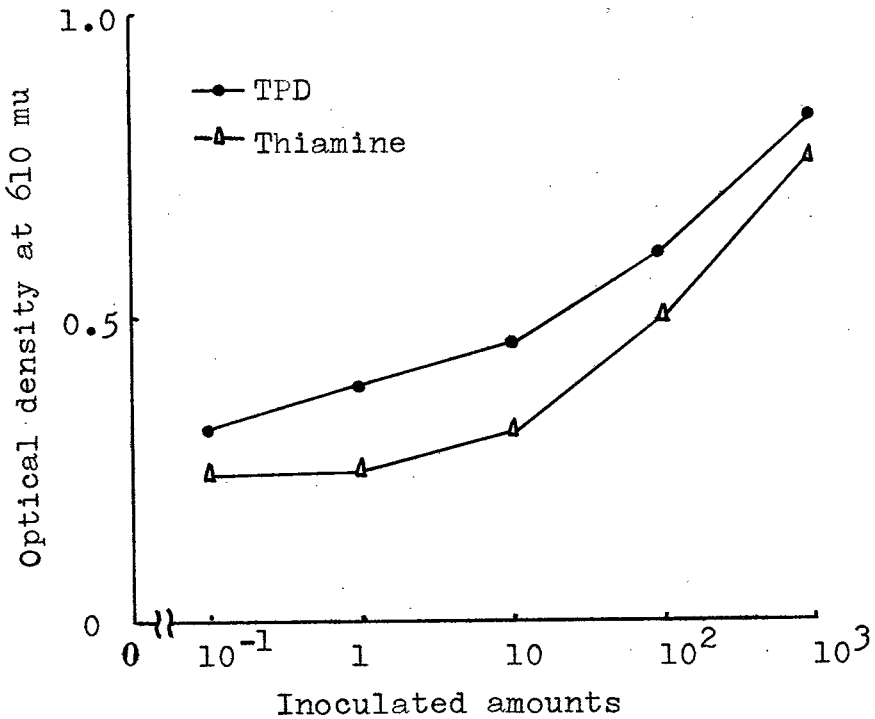


Fig.8 Activity of Thiamine or TPD after Cysteine Treatment
on the Growth of Kl.apiculata

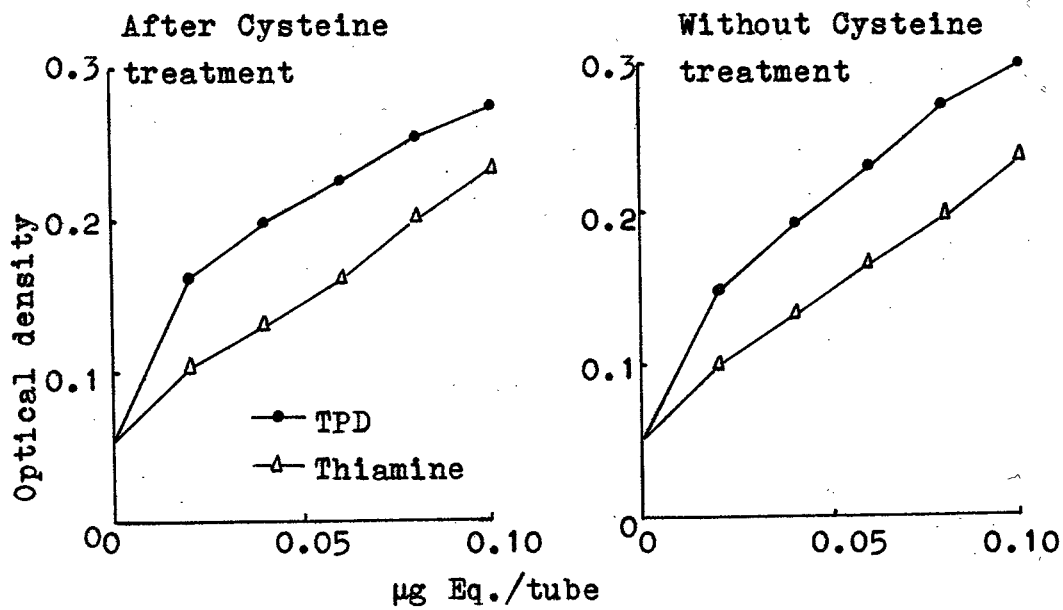
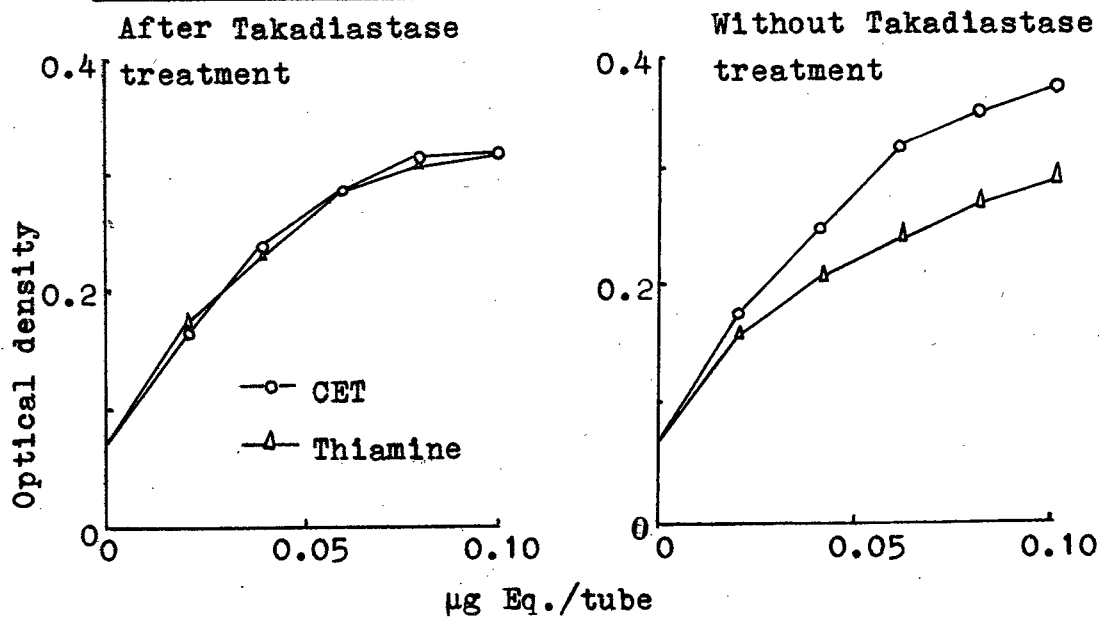


Fig.9 Activity of Thiamine or CET after Takadiastase
Treatment on the Growth of Kl.apiculata



(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TPD $0.05 \mu\text{gEq}$ 含む培地に通常の培養時の $10^{-1} \sim 10^3$ 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 $1 \mu\text{gEq}$ 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、この⁽²³⁾⁽²⁴⁾ような処理をしたの⁽²³⁾⁽²⁴⁾ちにはCETはThiamineと同等の増殖促進性を示した (Fig. 9)。

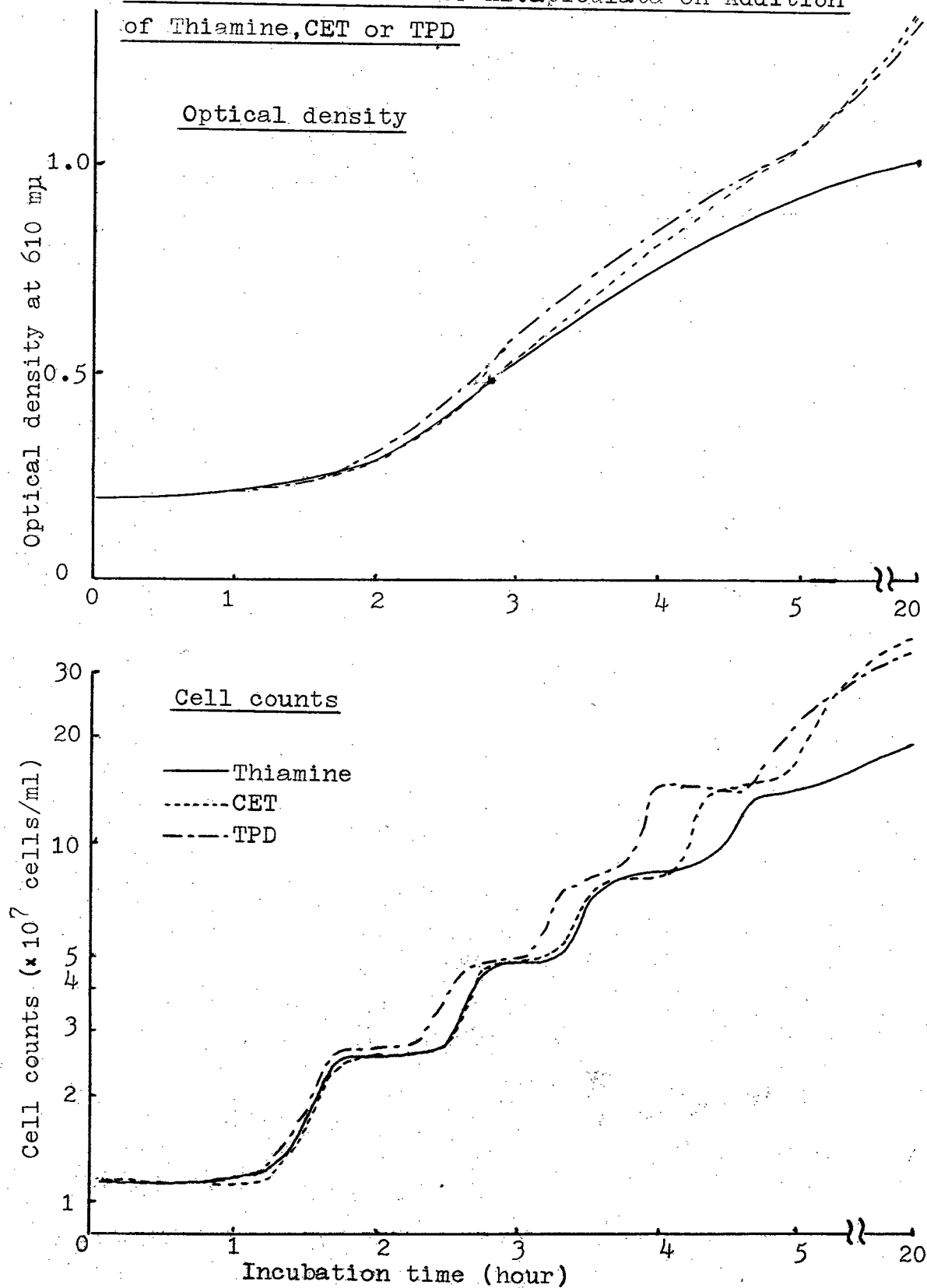
すなわちTPDは菌との接触以前にThiamineに変化していてもなお

Thiamineより高い増殖促進性を示したが、C E T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C E T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, T P DまたはC E Tの影響 (Fig.10)

Thiamine, T P DまたはC E T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T P Dを添加したときには2回目の分裂がThiamineまたはC E Tを添加したときより早く起り、C E T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T P DとC E Tは共に菌の一世代を短縮するがT P Dは対数増殖期の初期、C E T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

T P D および C E T 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* にたいする態度は異なっており第2節に示したように C E T 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.apiculata* は Thiamine 添加時と同じ増殖度を示すが、C E T 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 C E T の型で残存することが確認された。C E T は培地の有無にかかわらず C E T 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 T P D は速やかに Thiamine に還元され T P D 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, C E T, T P D を添加して *Kl.apiculata* の同調培養を行なうと T P D は対数増殖期の初期、C E T は後期に有効であつた。これは T P D と C E T 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 C E T と T P D 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

C E T および T P D 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 C E T は Thiamine より高かつたのにたいして T P D は Thiamine と同等であつた。
- (2) 培養初期において C E T は一部そのままの型で菌体内に検出されたが T P D 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 C E T は Thiamine と同等であつたのにたいして T P D 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 T P D は対数増殖期の初期、C E T 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, 川崎ら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。^{(31) (32/33)} TPD および CBT 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)

0.05 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 Pyrithiamine 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)

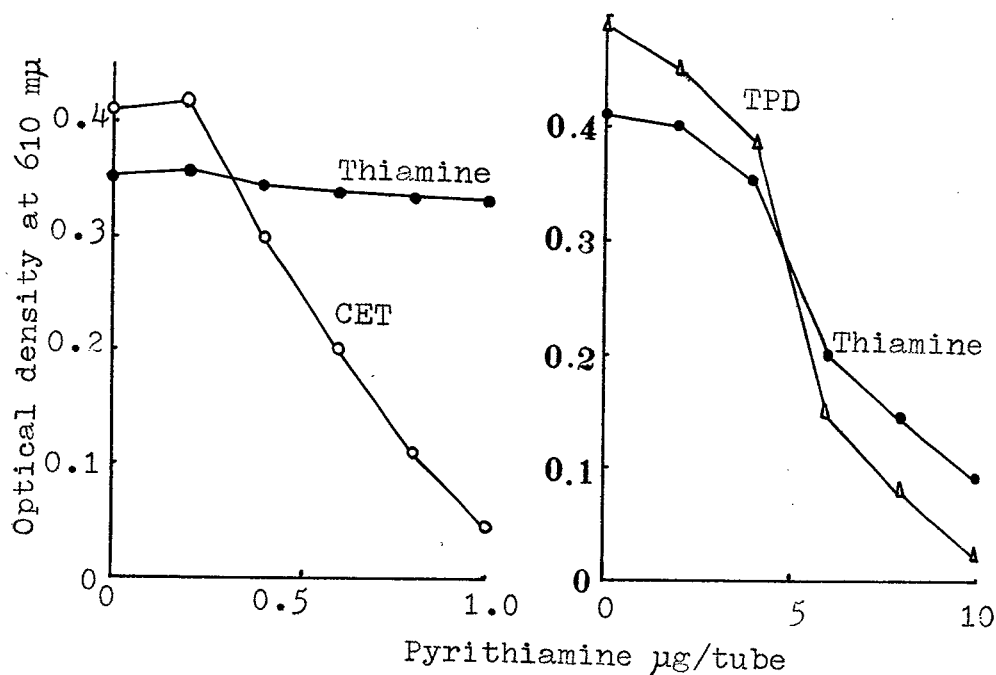
同様な実験を他の数種の誘導体についても行ない次式にしたがつて Pyrithiamine による抑制比を Thiamine 等量比で算出しその結果を Tab.

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, 川⁽³¹⁾
崎らの報告⁽³³⁾した値に一致した。T P D 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、*K1. 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 0.1 N 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 量の定量を行なった。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って Thiamine 誘導体を Thiamine に変化させたのち BrCN-Thiochrome 反応を行なった。

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

B T M P : T P D と同様 Cysteine 処理を行なったのち、pH 4.5 となし 1 % タカジアスターゼ B 液 1 ml を加えて 50 °C、1 時間保温する。

C E T : 検液 1 ml に N - NaOH 1 ml を加えて水浴中 30 °C、5 分間反応後 N - 塩酸 1.5 ml 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 0.05 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)

Pyriithiamine 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 Pyriithiamine 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 °C 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 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

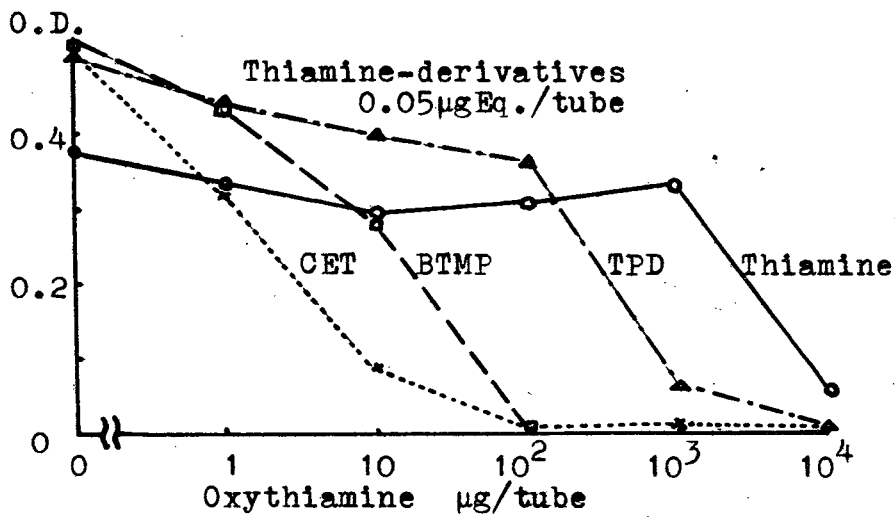


Fig.13 The Inhibition Ratio of Oxythiamine to
Thiamine-derivatives on Kl.apiculata

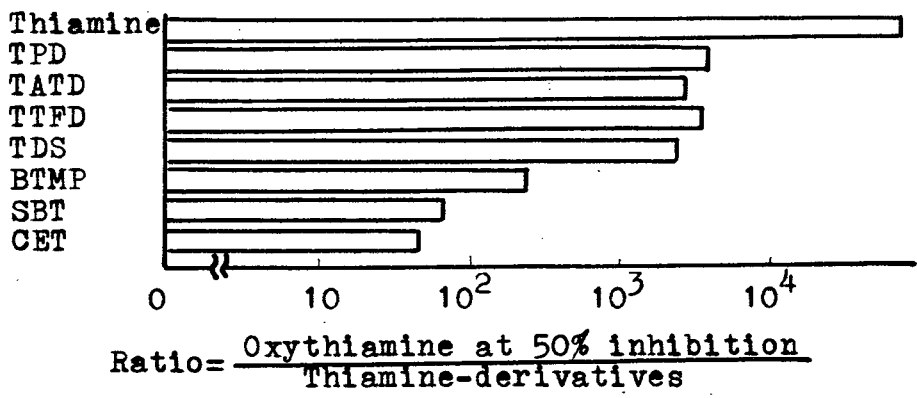


Fig.14 The Influence of Oxythiamine on the Accumulation of Thiamine-derivatives to Kloeckera apiculata

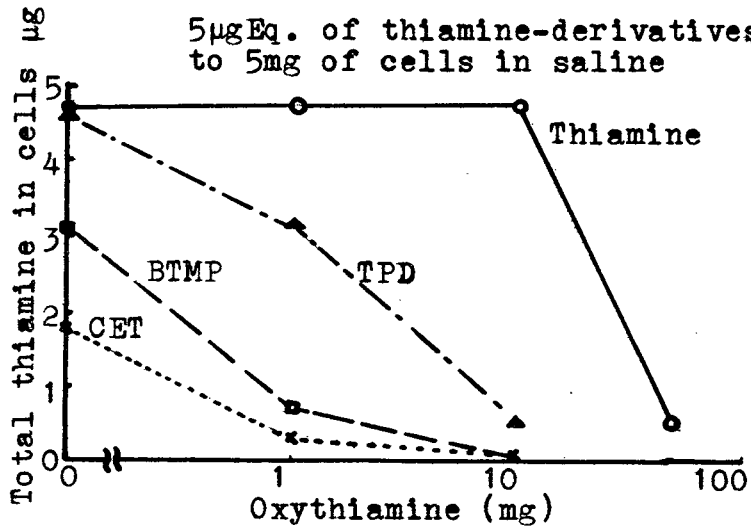
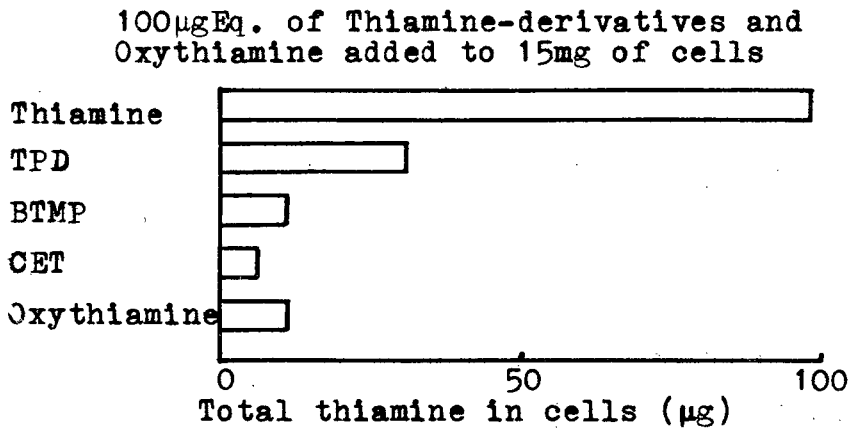


Fig.15 The Accumulation of Thiamine-derivatives and Oxythiamine to Kloeckera apiculata



(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 T P D , B T M P , C E T の順となり Oxythiamine は C E T 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。

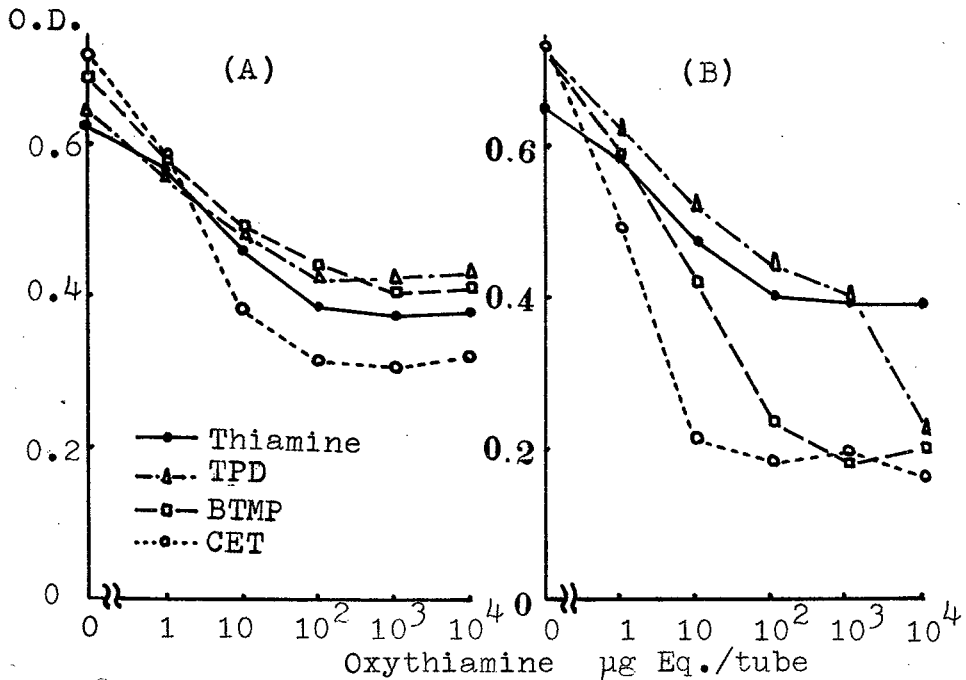
(5) Thiamine 誘導体集積菌の増殖におよぼす Oxythiamine の影響

(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 μ gEq を添加し pH 4.7 , 30 $^{\circ}$ C , 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 μ gEq 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 $^{\circ}$ C 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 C E T がやや影響を受け易かつたが B T M P および T P D は Thiamine

と同様な態度を示した。したがって 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が考えられる。^{(30)~(32)} Thiamineを菌と接触させるとき Oxythiamine を添加すると Thiamineの集積は $1,000$ 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) Pyriithiamine および Oxythiamine は C E T , T P D , B T M P 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 T P D , B T M P 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 の場合と同等であったが、C E T 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 C E T, T P D を添加して培養したとき C E T, T P D 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 T D P 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。したがって菌体中の T D P 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 T D P 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。C E T, T P D を添加して培養したとき菌体中 T D P 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, C E T または T P D 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った。

第1節 菌体中 Thiamine ならびに T D P 量の変化

実 験 方 法

(1) 菌体中 Thiamine および T D P 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1mlにたいして1%タカジアスターゼB液1mlを50℃, pH4.5, 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(T D PもしくはT M P)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汙紙⁽⁴⁾ No. 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。上記の汙紙を乾燥後寒天平板上に約 15 分間貼りつけたのち汙紙を取り去り、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 ₂ O	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 ₂ HPO ₄	0.5 g	PABA	200 μg
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.1 g	Pyridoxine-HCl	400 μg
NH ₄ Cl	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 MnSO₄-7H₂O, 4g MgSO₄-7H₂O and 0.2g FeSO₄-7H₂O in water to make 100 ml.

実 験 成 績

- (1) Thiamine , T P D , C E T 添加培養菌の菌体中 Thiamine の存在型の検索 (Tab 6.7. Fig.17)

増殖に必要な量より低い Thiamine , C E T または T P D を添加して培養したとき増殖度は C E T , T P D 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 が検出されたのに対して C E T または T P D 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 T D P (Bioautography で確認) のみ検出された。また菌体 1 ml 当りの T D P 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 T D P 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 T D P が検出され、C E T および T P D 添加培養菌には T D P のみが検出された (Fig.17)。したがって Tab.6 に示した Phosphorylated thiamine は T D P 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^養度には差がみられないが、4 μ gEq 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対して C E T , T P D 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。40 μ gEq. 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。C E T 添加培養菌の Total thiamine 量は低い値であつたがその大部分は T D P であつた。 (Tab.7)。以上のように増殖促進性の高

いC E TおよびT P Dは菌体内で高率でT D P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。

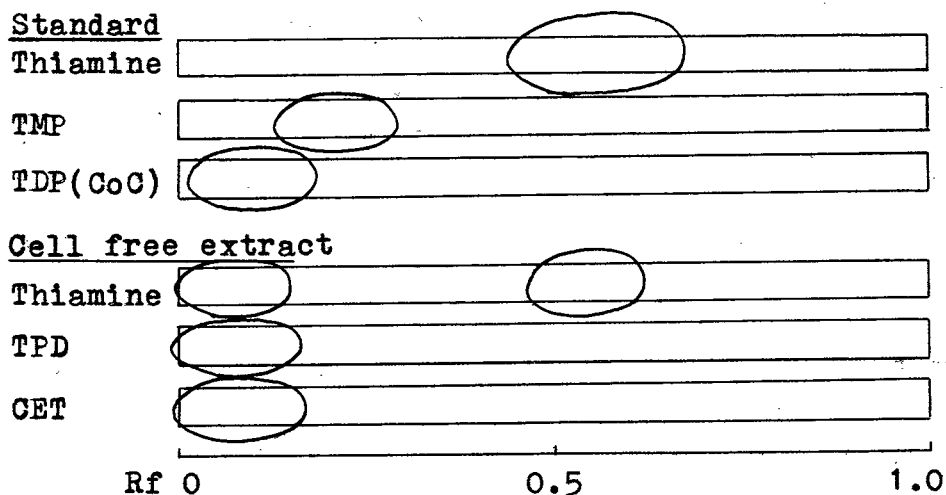
Tab. 6 Free and Phosphorylated Thiamine Contents of the Cells of Kl. apiculata after Cultivation with Thiamine, CET or TPD

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

	Cultivation time hours	Growth OD.	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		Growth O.D.	Thiamine contents			
μg Eq./50ml medium			Phosphorylated		Free	
			μg	%	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 $4\mu\text{g}$ Eq. of Thiamine, CET or
TPD in 200 ml of medium for 13 hours.

	Thiamine released	Thiamine contents of protoplasts
Thiamine	$0.95\mu\text{g}$	$2.37\mu\text{g}$
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1mg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説明されていない。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

C E T , T P D , 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、C E T , T P Dを添加した場合すべてT D P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T D P含量には相関関係がみられた。T P D , C E T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T D P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^{(15)(42)~(46)}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、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節の方法によった。

(2) Thiaminase 液の調整

シジミまたはハマグリ of 貝肉に6倍量の0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を加え摩砕後、10,000 rpm 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 °C 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。

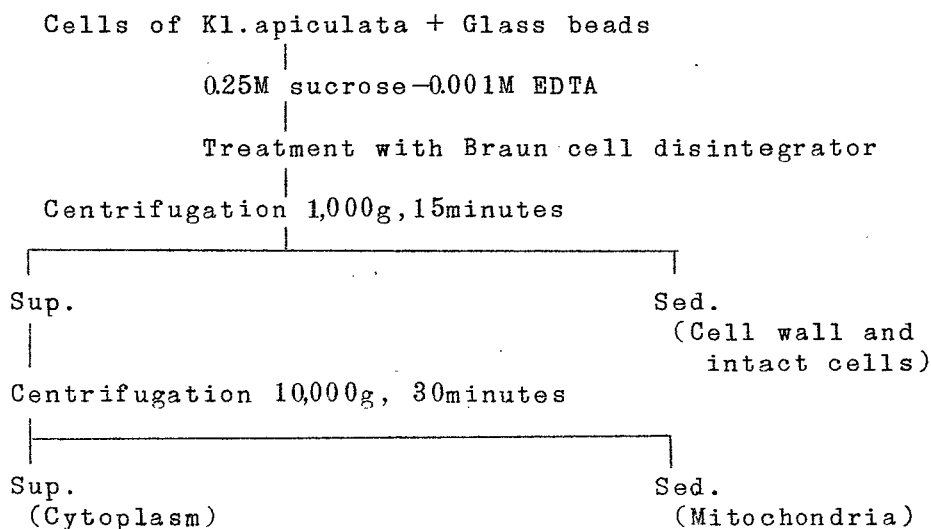
(3) Thiaminase 活性の測定

Thiamineを含む検液に Thiaminase 液、0.1 M リン酸緩衝液 5 ml および 0.01 M ピリジン 1 ml を加え水にて全量 45 ml とし 30 °C 1 時間保温後 N 塩酸 5 ml 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 Thiamine 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 0.25 M Sucrose - 0.001 M EDTA 液 50 ml にけん濁し、径 0.45 ~ 0.50 mm のガラス玉 30 g を加え Braun 細胞破壊機にて 2,000 rpm 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) M B 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

^{(48)~(50)}
照井らにより開発された *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 0.8 M 塩化ナトリウム、および 0.05 M 硫酸マグネシウムの混液) 中で 0.07 M リン酸緩衝液に溶解した細胞壁溶解酵素および 0.003 M 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った。

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 $26 \mu\text{g}/\text{mg cells}$ 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,⁽⁴⁵⁾ 棚瀬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 0.02 M 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 pH 5 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 濃度を变化させて 30 °C、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 °C 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, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, MgSO₄, MnSO₄, FeCl₃

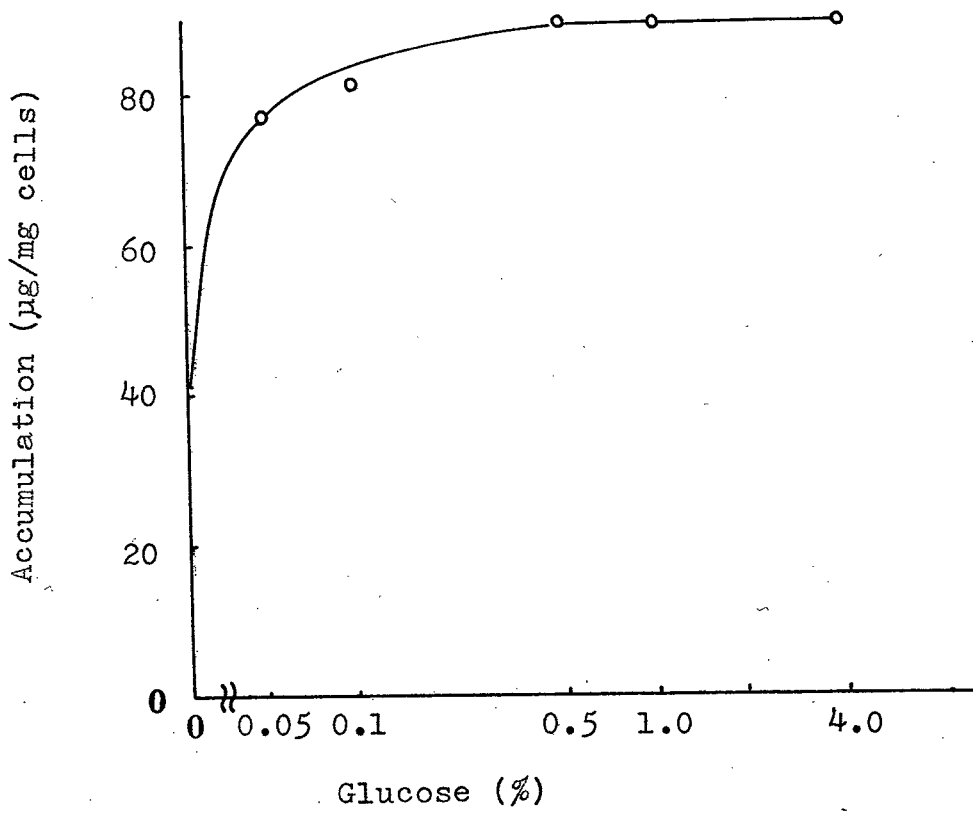
**Hoff-Jorgensen medium (2% Glucose, 0.25% Casamino acids, Inorganic solution, Vitamin solution)

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)

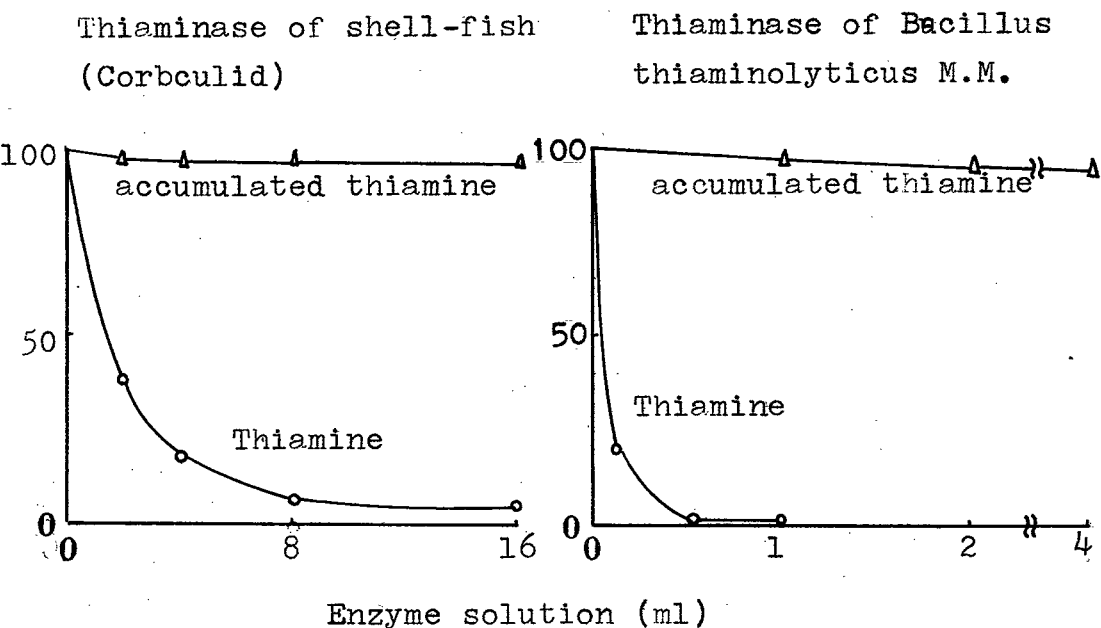
酵母細胞に集積された Thiamine にたいする Thiaminase の影響を検討した。Thiamine を $80.5 \mu\text{g}$ 集積した *Kl.apiculata* 1mg に Thiaminase 液 $0.1 \sim 1.6\text{ml}$ を反応させたのち残存 Thiamine 量を定量し、同時に対照として酵母の存在しない状態で Thiamine $100 \mu\text{g}$ にたいして同量の Thiaminase を反応させた (Fig.20)。シジミおよび *B.thiaminolyticus* の Thiaminase によつて Thiamine 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 1mg あたり $100 \mu\text{g}$ の Thiamine を集積した *Kl.apiculata* 300mg 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 $1,000 \times g$ 沈渣は未破壊の細胞ならびに細胞壁、 $10,000 \times g$ 沈渣はミトコンドリアなどの顆粒成分、 $10,000 \times g$ 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 $10,000 \times g$ 上清に溶出し、16 分後には $1,000 \times g$ ならびに $10,000 \times g$ の沈渣にはほとんど Thiamine は検出されなかつた。また $10,000 \times g$ 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

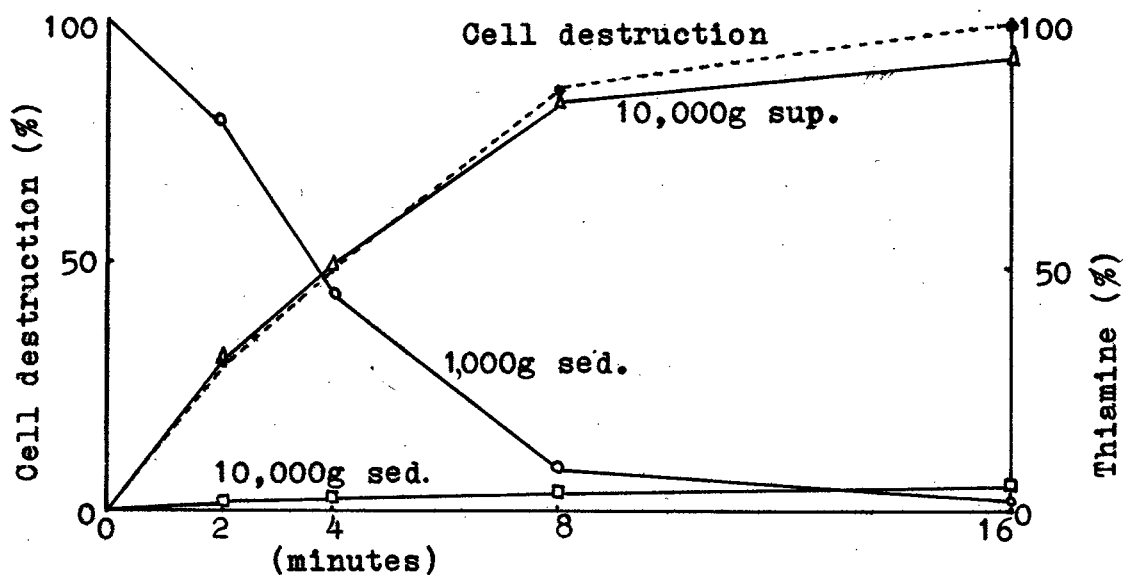
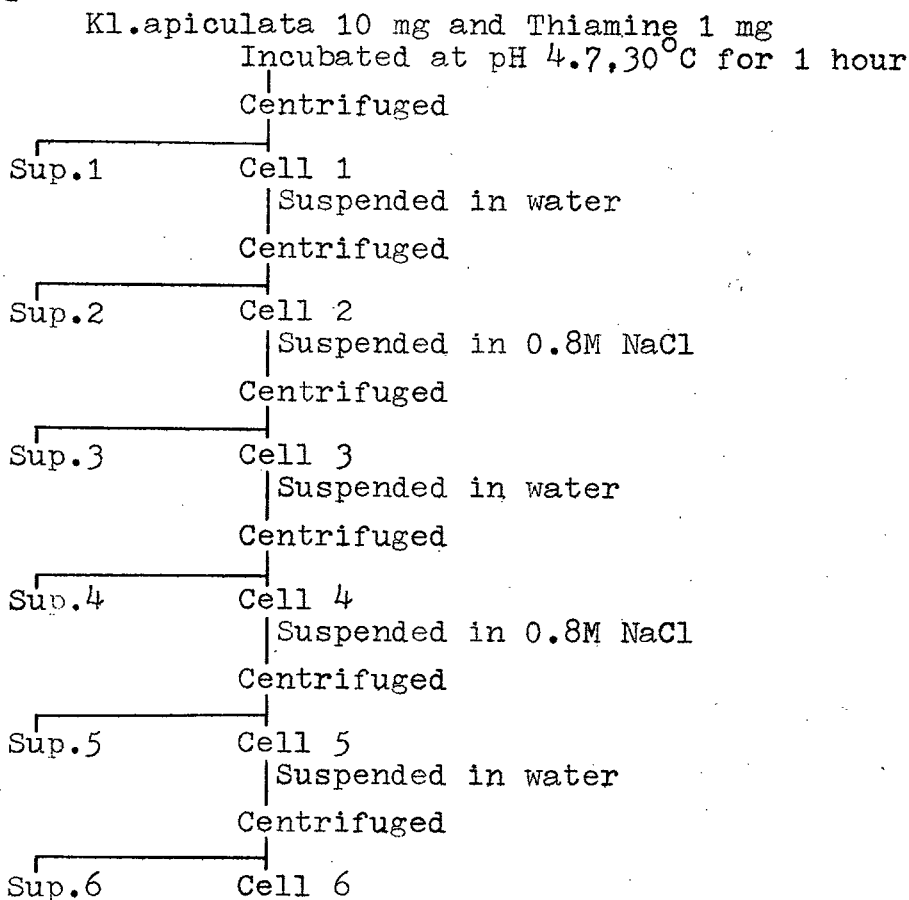


Fig.22



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)

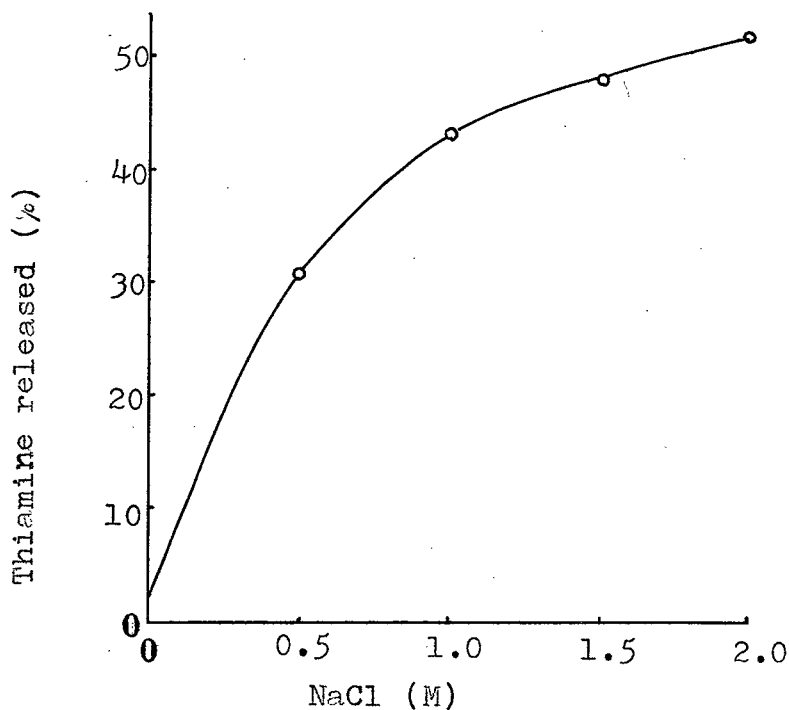
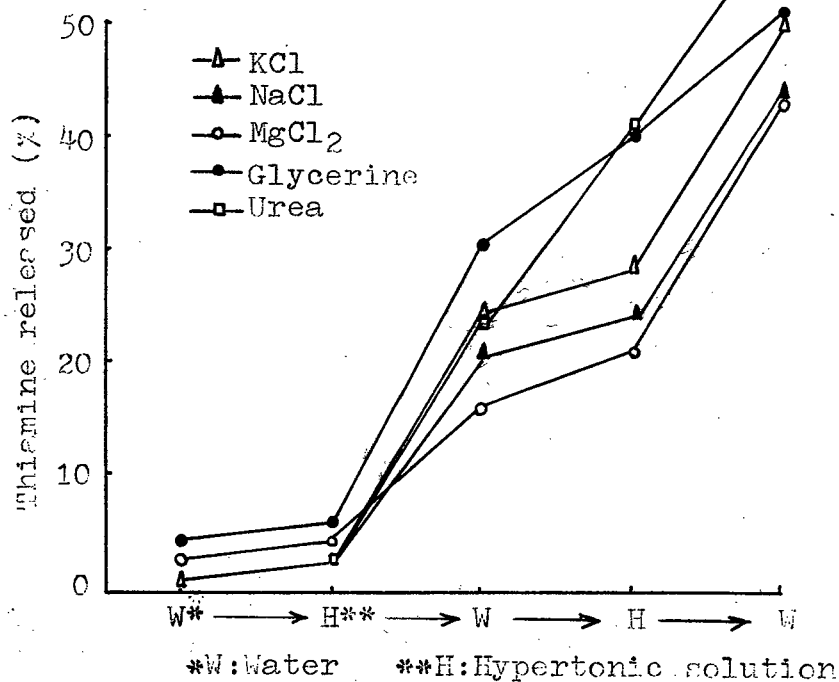


Fig.24 Release of Thiamine from the Cells
by Osmotic Shock (3)



(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 M B 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、2 M 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)

0.8 M 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、5000rpm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⁵⁰⁻⁶⁰protoplastの性状に一致した。

(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を調製し経時的に総菌数、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も含まれるわけが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ははるかに少く、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

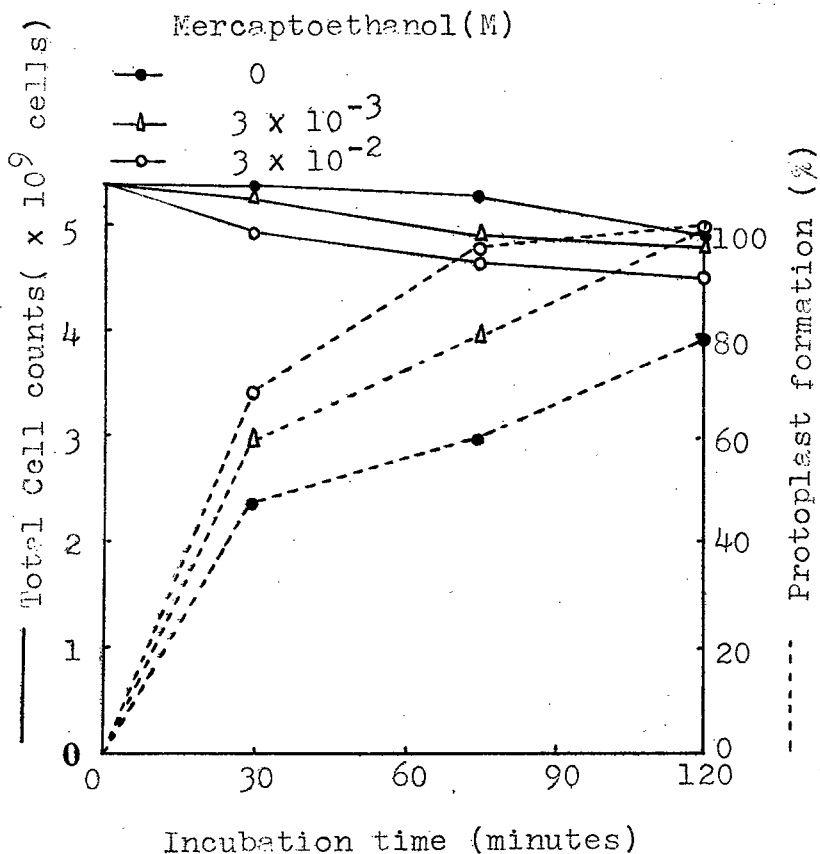
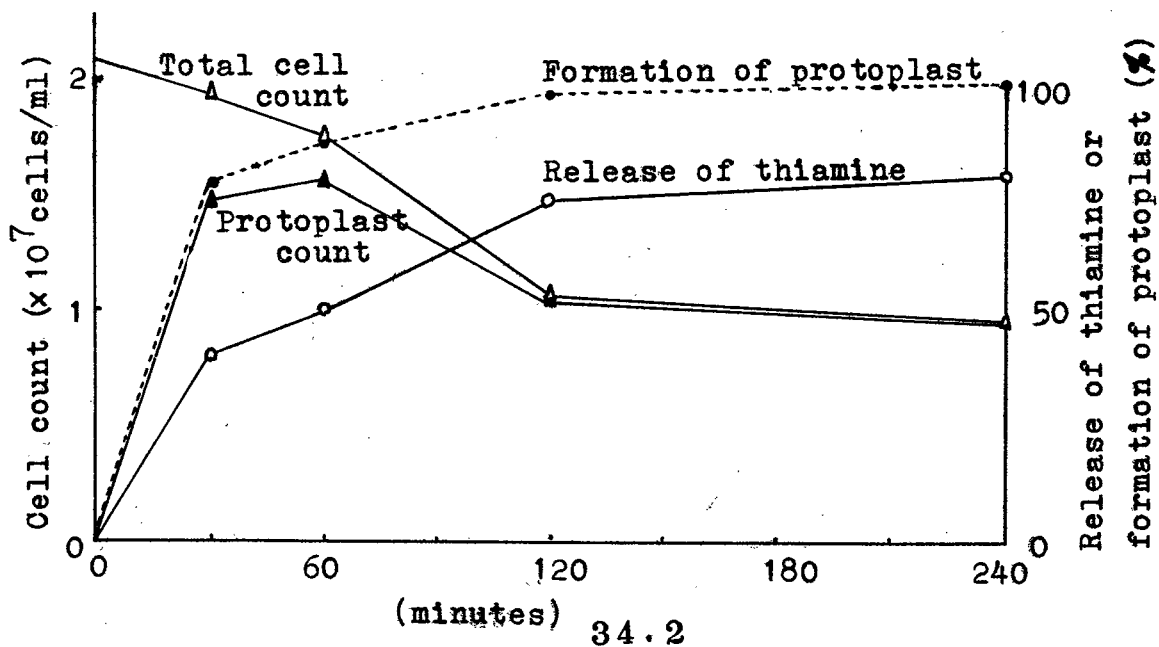


Fig.26

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 : 3×10^8 cells

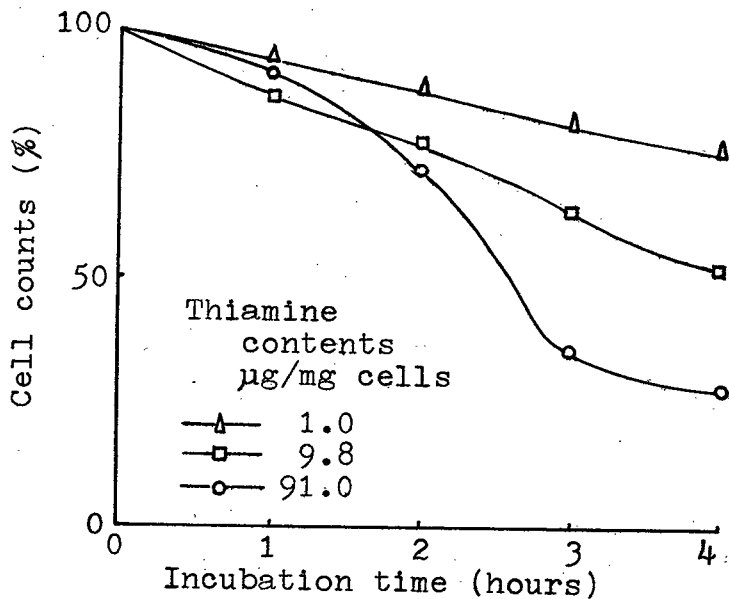
Thiamine : 200 μg

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

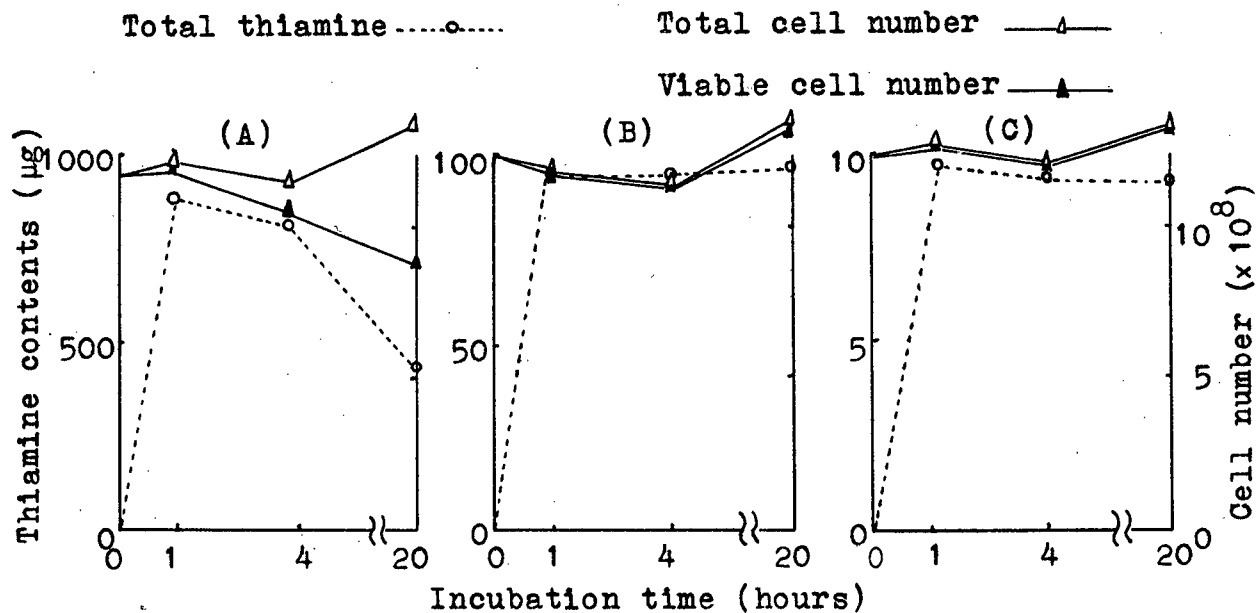


Tab. 14 Release of Thiamine from the Cells Accumulated with Thiamine by the Treatment with Cell Wall Digestive Enzyme

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)1000 μ g, (B)100 μ g
or (C)10 μ g 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 M B 染色性細胞数の変化を測定した (Fig.28)。10 および 100 μ g の Thiamine を添加したとき Thiamine の集積量ならびに M B 染色性細胞 (死菌) 数は 20 時間後にも変化しなかつたが、1,000 μ g 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、M B 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) ₂ SO ₄	5 g	MnSO ₄	0.65 mg
KH ₂ PO ₄	164 mg	Citric Acid	3.5 g
CaCl ₂	945 mg	K ₂ HPO ₄	6.9 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	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、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 法における水層の蛍光度を測定して 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、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っ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滑に多量の TDP が残存し、 $10^{-1}M$ では完全に集積および Phosphatase 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 Phosphatase 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

1.2×10^9 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 $\frac{1}{3}$ 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量を測定する方法もしくは上清 0.05ml を分取してそれに含まれる量を定量し、細胞内含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 , C E T もしくは T P D 量
(μ gEq)

b : 上清 0.05ml 中に含まれる Thiamine , C E T もしくは T P D 量
(μ gEq)

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。C E T 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 1/2 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 (T P D , C E T 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 T P D もしくは C E T 量を算出して記したが、C E T を添加したときには細胞内にほとんど C E T のまま検出されたのにたいして T P D を添加した場合には T P D 自身は細胞内にほとんど検出されなかつた。すなわち C E T 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.apiculataCell; 5×10^8 cells, Thiamine derivatives; 500 μ g Eq.

Total volume; 5ml

Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour

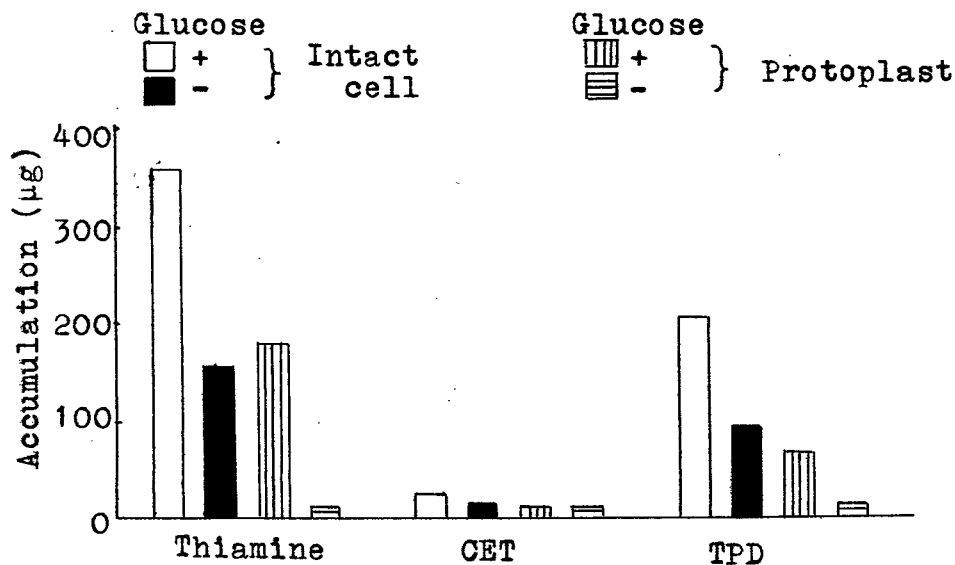


Fig.30

Accumulation of Thiamine Derivatives by Kl.apiculataCell volume; 0.05ml (9×10^8 cells)

Thiamine derivatives solution; 0.10ml

Total volume; 0.15ml

Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour

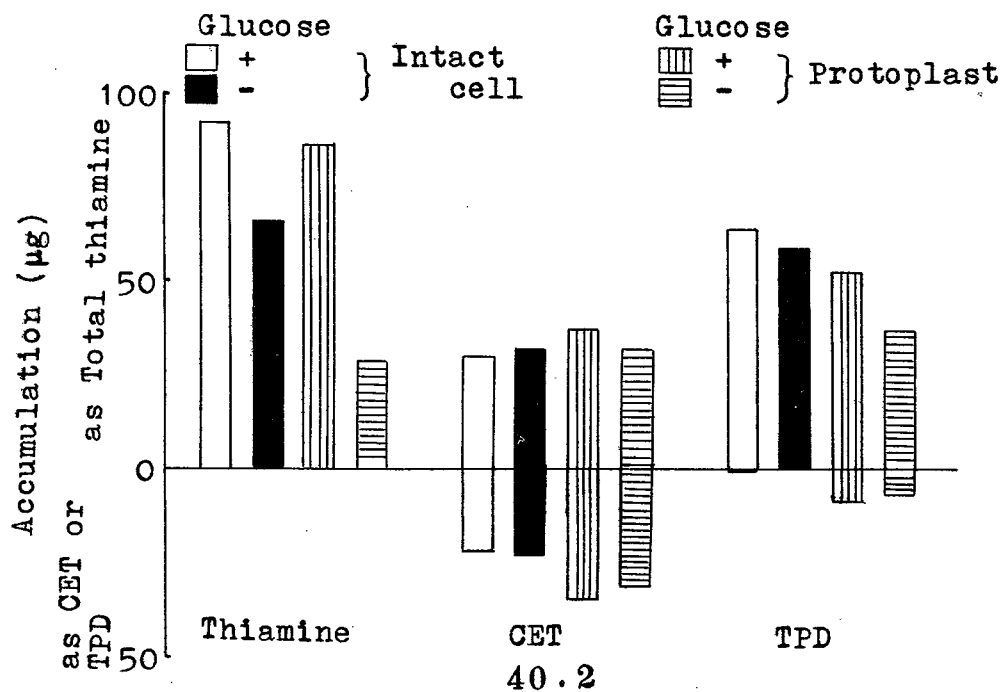


Fig.31 Method for Washing the Cells Accumulated with Thiamine, CET, TPD

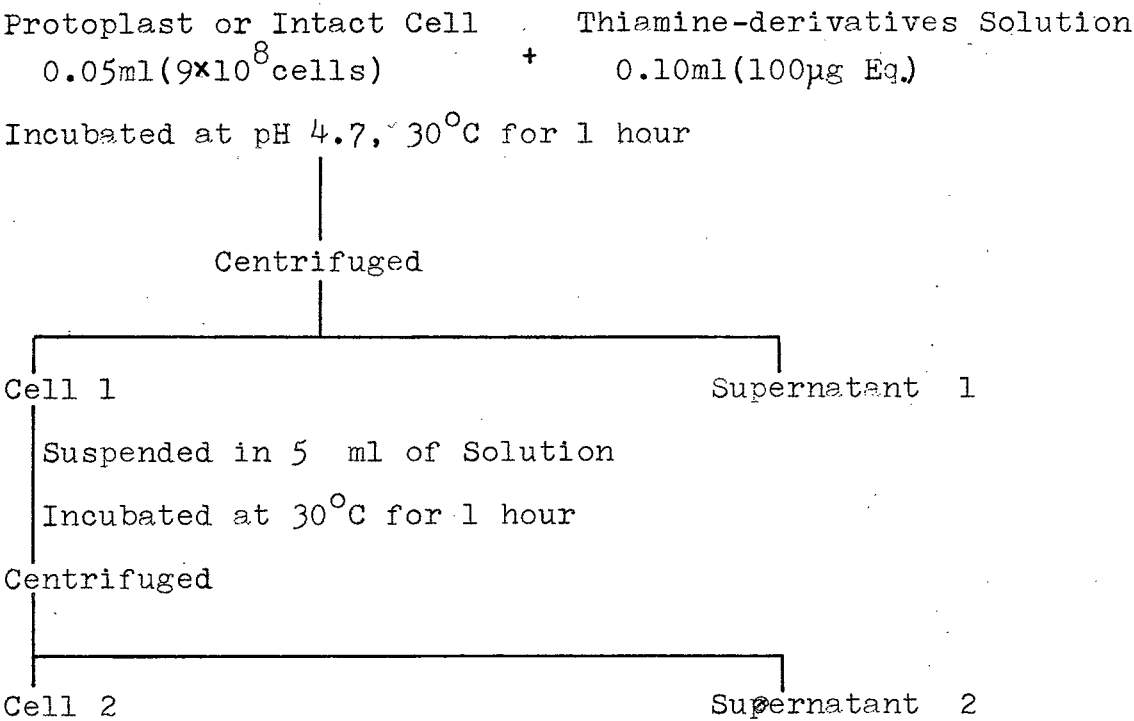
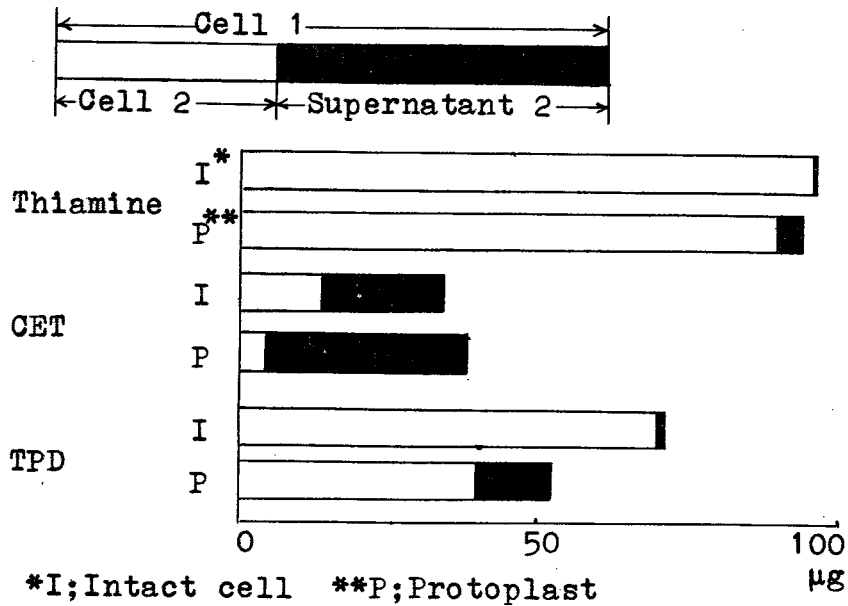


Fig.32 Release of Thiamine or Thiamine-derivatives from the Cells by the Washing with Isotonic Solution



(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 $\frac{1}{3}$ を占めるが、洗浄操作においては全体の $\frac{1}{100}$ 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⁽¹⁵⁾を集積した。このようにGlucose⁽⁴³⁾が集積を促進することは鈴置、棚瀬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⁽⁶⁾と解釈される。市川ら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。

⁶²⁾
Suomaleinen⁶²⁾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。したがっ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。^{67)~69)} 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 は集積されなかった。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。

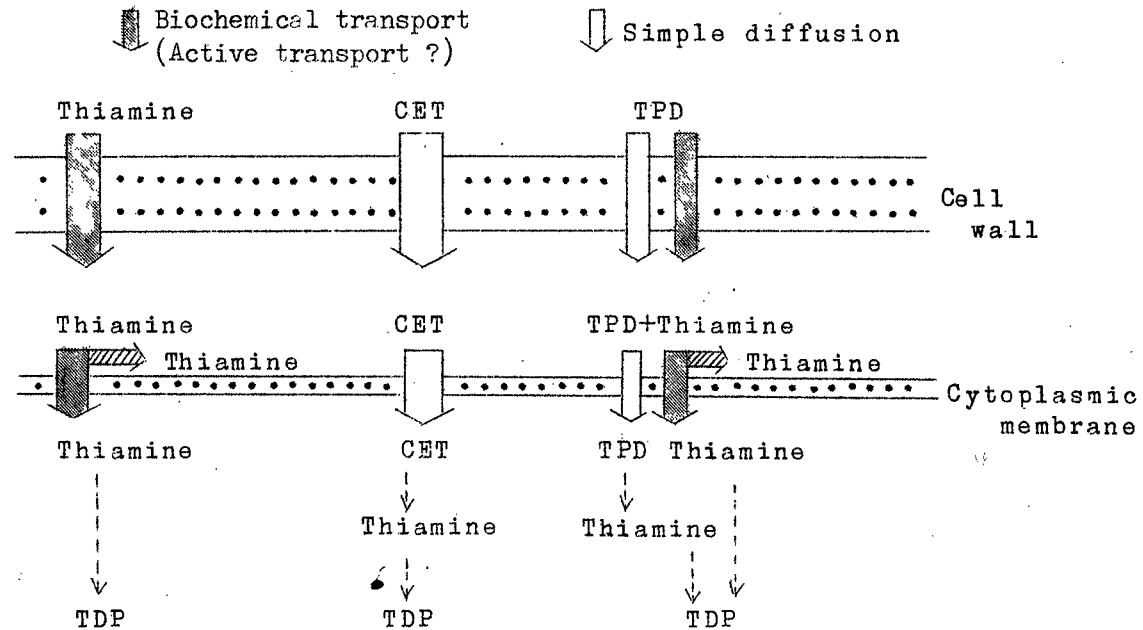
以上のように Thiamine は *Kl.apiculata* により多量に集積されるが、集積された Thiamine の大部分は原形質膜と細胞壁の間に Free thiamine として局在し、集積された Thiamine が 100% 増殖促進に役立つものではない。⁽⁶⁾ 乳酸菌に Thiamine を添加した場合 Thiamine のとりこみ量は低く、しかも菌体中の Thiamine が TDP として存在するのに比べると *Kl.apiculata* による Thiamine の集積は他の微生物の場合と異なつた現象と思われる。

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 C E T 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。C E T 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、C E T が Thiamine に変化すれば原形質内の C E T としての濃度が低下するためそこに培地から新たに C E T 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 C E T のすべてが原形質内に集約され Thiamine を経て T D P に変化すると思われる、増殖が最大となつたときには T D P のみが検出された事実(第3章)をよく説明できる。しかし C E T の Thiamine への変化がゆるやかなため T D P 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 T D P 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 T D P に変化するため原形質内の T D P 含量は C E T 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 C E T の増殖促進性よりも劣つたのであろう。一方 T P D は容易に Thiamine に変化するため Thiamine と C E T 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 T D P に変化し易い点で C E T と同様である。また C E T より速やかに Thiamine に還元されるため速やかに T D P 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 C E T 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 C E T が Thiamine に比べ原形質内に透過し易く増殖中に原形質内の T D P 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 °C , 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 M B 染色菌 (死菌) が増大した。
- (4) *Kl.apiculata* は T D P を Free thiamine に変化させて集積し、Phosphatase 作用が除かれると T D P を集積することができなかった。
- (5) C E T , T P D 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、C E T 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、C E T 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、C E T 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 C E T および T P D 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 C E T , T P D 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 (T D P) として検出された。すなわち C E T , T P D は添加されたものすべてが増殖に利用され得る T D P 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 T D P 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 °C , 1 時間の保温で、菌体量 (乾燥物として) の 10 % におよぶ Thiamine を Free thiamine の型で集積した。集積された Thiamine は Thiaminase により分解されず、Thiamine を集積した酵母を機械的に破壊すると Thiamine はすべて溶出し、細胞壁に結合したものは認められなかつた。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 (Coccarboxylase) 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。

TDP および CET の Kl. apiculata による集積は Thiamine に比べると非常に低い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

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C E T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、T P DはThiamineとC E T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C E Tは菌体に透過した時点ではC E T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T D P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C E Tを添加す

ると Thiamine を添加したときより高い T D P 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、適切なお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: 醸工 40, 366 (1962)
- 49) 田端, 照井: 醸工 41, 390 (1963)
- 50) 田端, 照井: 醸工 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: 醸工 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) Schmidt, 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) Suomaleinen, 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)

ビタミンB₁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B₁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B₁要求性の酵母 *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630 にたいしてB₁-HCl 相当量より強い増殖効果があり, CBT^{*2)} はB₁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⁾。B₁誘導体はB₁に分解されてから活性を示すのであるから本来はB₁と同等あるいはそれ以下のB₁活性を示すべきである。CETが*Kl. apiculata*にたいしてB₁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B₁その他の混在は認められなかった。

(2) *Kl. apiculata*の培養

*Kl. apiculata*によるB₁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B₁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, B₁またはCET液を加えて生理食塩水で全量5 mlとし, 30°C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った。

a) 菌体に0.1M硫酸5 mlを加え5分間煮沸抽出後pH5に調整し2%タカジアスターゼB液1 mlを加え45°C, 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pH5に調整し1%タカジアスターゼB液1 mlを加え45°C, 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B₁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

バ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°C、2 時間乾燥後秤量した。

(5) 菌体蛋白質の測定

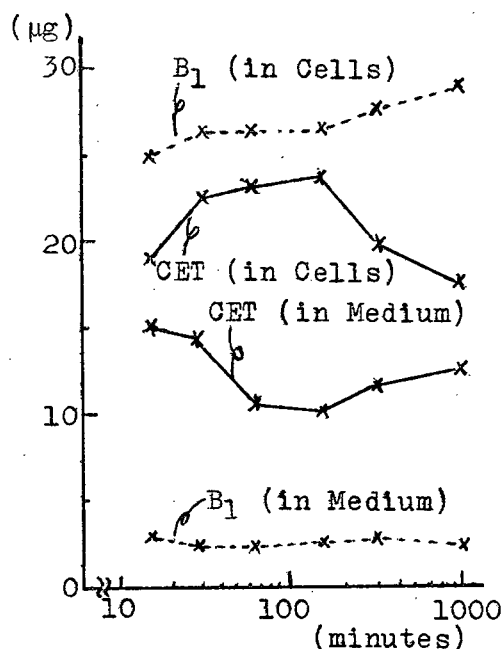
Kjeldahl 法により窒素量を測定し、6.25 を乗じて蛋白質量とした。

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 $33.7\mu\text{g } B_1\text{-HClE}^{*5}$ 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

図 1 *Kl. apiculata* による CET, B_1 の集積
添加量 $10^{-2}\mu\text{mol}$ ($33.7\mu\text{g } B_1\text{-HClE}$)

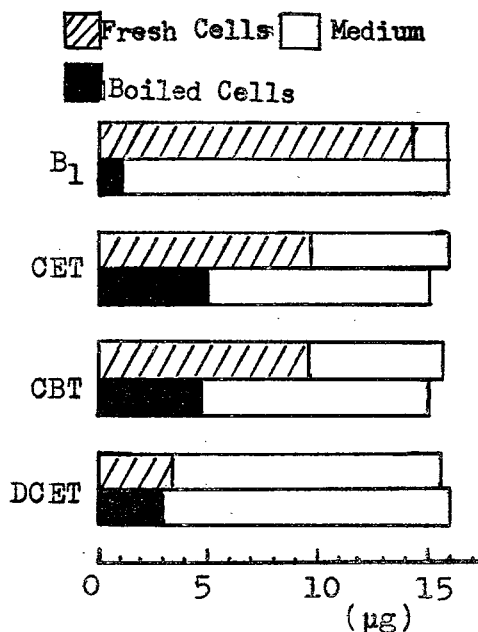


10 分間煮沸した菌体による集積も検討した (図 2)。その結果 CET と CBT は集積量にほとんど差がなく死菌によつてもいくらか集積されたが、生菌によりひじょうに多量集積される B_1 は死菌にはまったく集積されなかつた。

(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 $10^{-2}\mu\text{mol}$ を 30°C 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ものとみなした。この菌体を培地 A で希釈して 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, $0.1\mu\text{g } B_1\text{-HClE/tube}$ の CET, CBT および B_1 の集積菌液として 18 時間静

図 2 CAT および B_1 の集積量の比較
添加量 $5 \times 10^{-2}\mu\text{mol}$ ($16.9\mu\text{g } B_1\text{-HClE}$)
30°C, 1 時間保温



*5) $B_1\text{-HClE} = B_1$ 塩酸塩相当量

図3 *Kl. apiculata*にたいする活性
(1) 集積菌培養

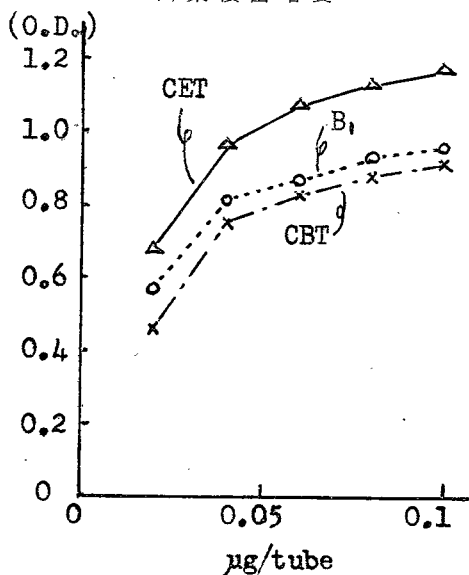
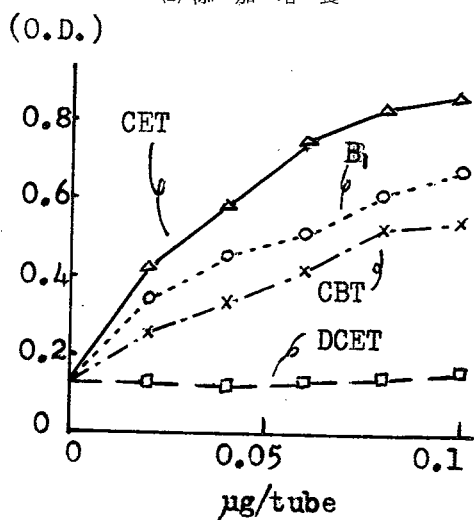


図4 *Kl. apiculata*にたいする活性
(2) 添加培養

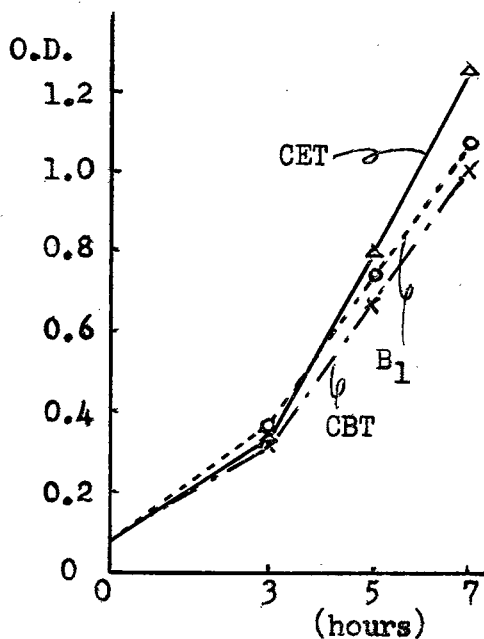


置培養した(図3). なお対照として通常の培養方法¹⁾²⁾(添加培養)によつても行なつた(図4). 図示のように集積菌培養でも添加培養でも CET がもつとも活性が高く, 以下 $B_1 > CBT > DCET$ の順となつた.

(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(72rpm)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0.1N硫酸で5分間90~95°Cで抽出し抽出液のPPCを行ないさらに*Kl. apiculata*を用いるBioautography¹⁾により検出した(図5). 図示のようにCET, CBTともに5時間以上の培養ではほぼ完全に 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 に分解したものである.

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



(4) 菌体重量および蛋白質量の測定

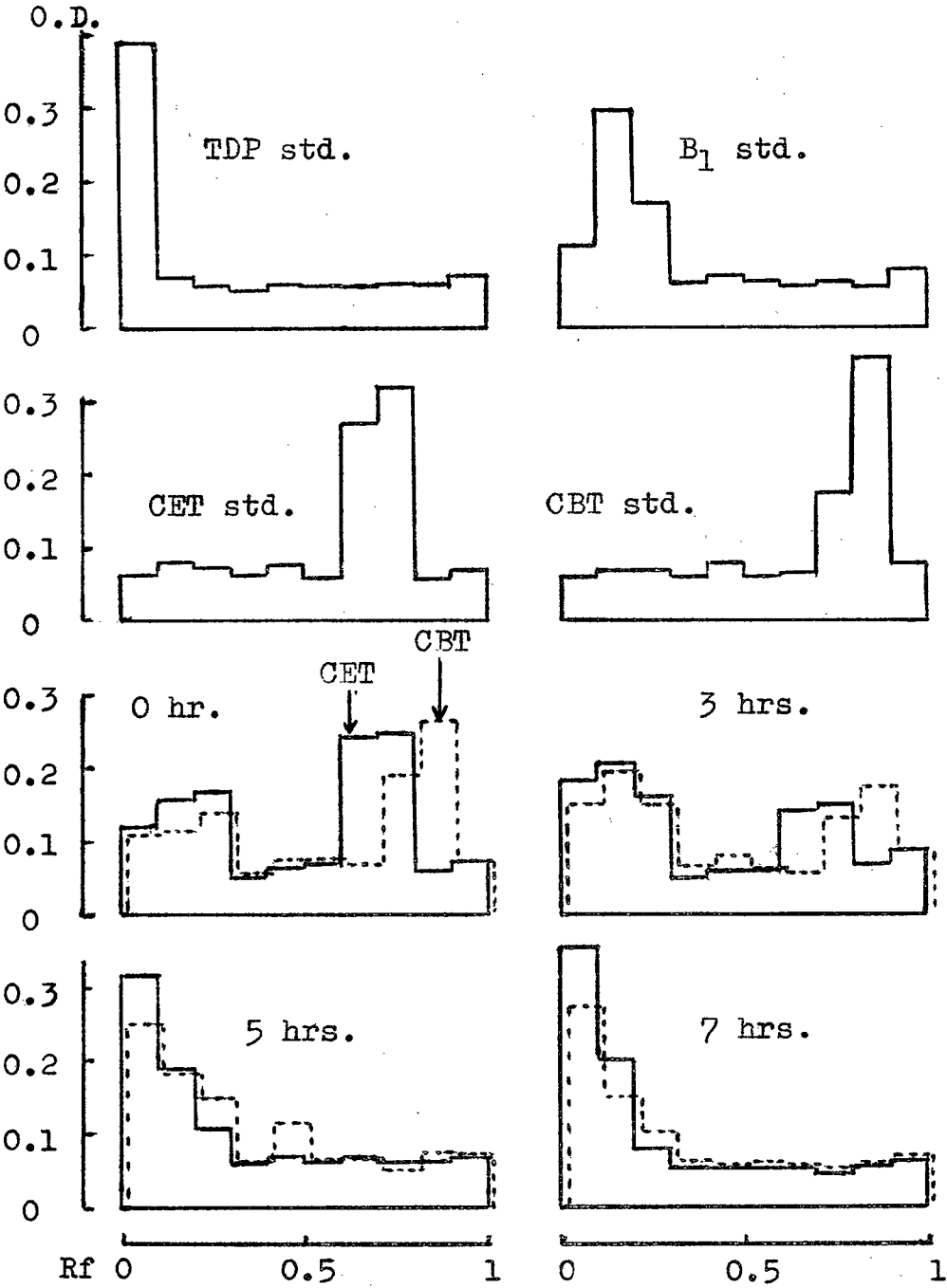
従来菌の増殖度は610mµにおけるODを測定しODの高いことからCETが B_1 より強い活性を示すとしてきた. しかし菌の形態に変化があるとき同一の菌量で

*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 0.5 μ g 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 10 μ g B₁-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で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。また増殖後の菌体を含む総 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 誘導液を加え 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 Bio-autography 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) 増殖後の菌体を含む 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 0.5 μ g B₁-HCl E/40ml

	O D	A. 乾燥菌体重量 (mg)	B. 総蛋白質量 (mg)	B/A
B ₁	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 10 μ g B₁-HCl E/400ml

	O D	A. 乾燥菌体重量 (mg)	B. 総 B ₁ 量 (μ g)	B/A
Blank	0.16	21.5	0.62	2.9 $\times 10^{-2}$
B ₁	0.86	168.0	11.51	6.8 $\times 10^{-2}$
CET	1.14	275.5	11.02	3.9 $\times 10^{-2}$

わめてはずかである。

5) 以上の知見から CET は B_{12} に変化して増殖効果を示すだけでなく増殖初期には CET として菌体中存在するので 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

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

(XII) 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 preincubated 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B₁要求性酵母 *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630 の増殖をB₁-HCl より強く促進する。著者らはこの原因を探究するため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B₁-disulfide誘導体はCETと同じく *Kl. apiculata* の増殖をB₁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-Jørgensen⁵⁾ 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°C、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

B₁, 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

(I) タカジアスターゼ処理した CET, CBT および B₁ の活性

CET および CBT はタカジアスターゼにより B₁ 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 B₁ に復帰せしめておいてから菌を接種したばあい CET および CBT の活性を B₁ と比較した。培地 2 ml に CET, CBT または B₁ 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 B₁ 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°C、24 時間保温後 100°C、15 分間滅菌 (タカジアスターゼ)

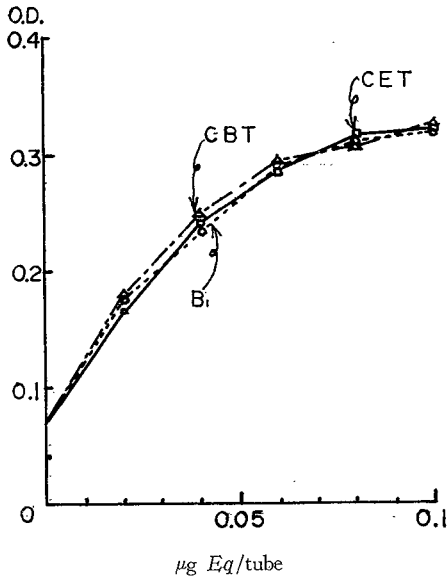
*1) CET = S-Carbethoxythiamine

*2) TPD = Thiamine propyldisulfide

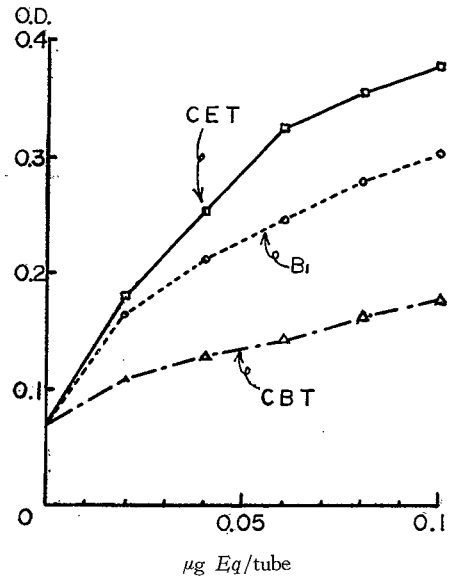
*3) CBT = S-Carbobutoxythiamine

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

(a) 250mg% タカジアスターゼで 37°C, 24時間処理後菌を接種



(b) タカジア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 $CET > B_i > CBT$ の順となつたがタカジアスターゼを用いて B_i に復帰せしめておくとも 3 者はまっ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°C, 30 分間保温し TPD を B_i に復帰せしめたのち菌を接種し 30°C, 20 時間培養した(図 2-a)。また対照は 60°C, 30 分間の保温を行わずに菌を接種した(図 2-b)。TPD は CET と異なり菌体外で B_i に復帰していてもなお B_i 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 B_i 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 B_i 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。

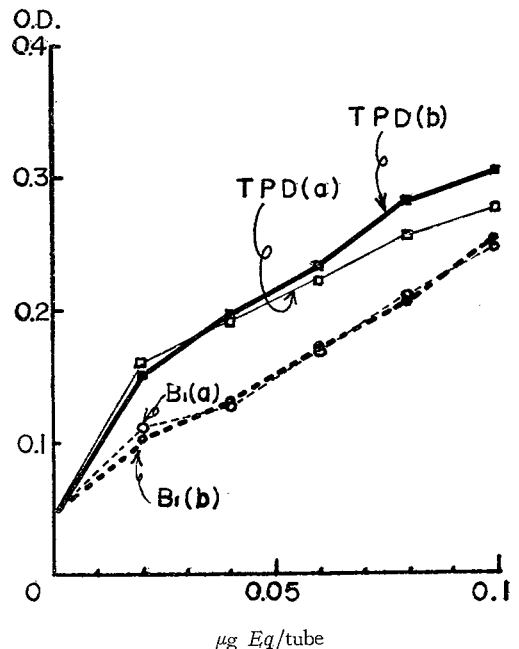
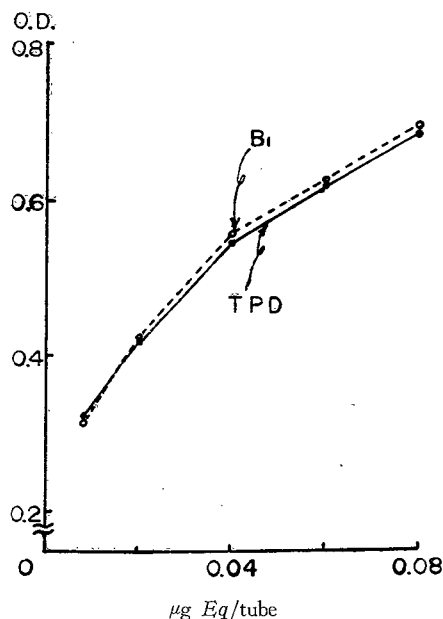
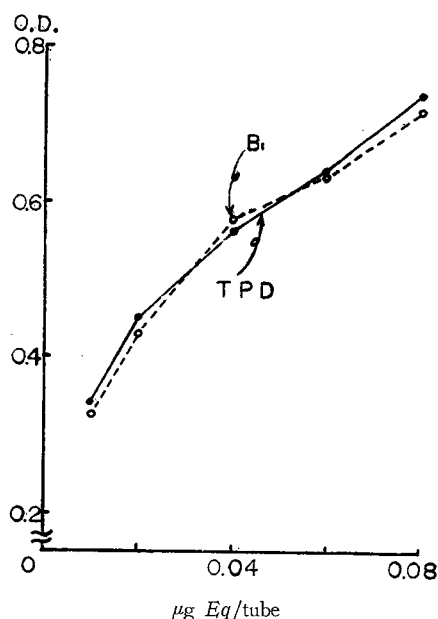
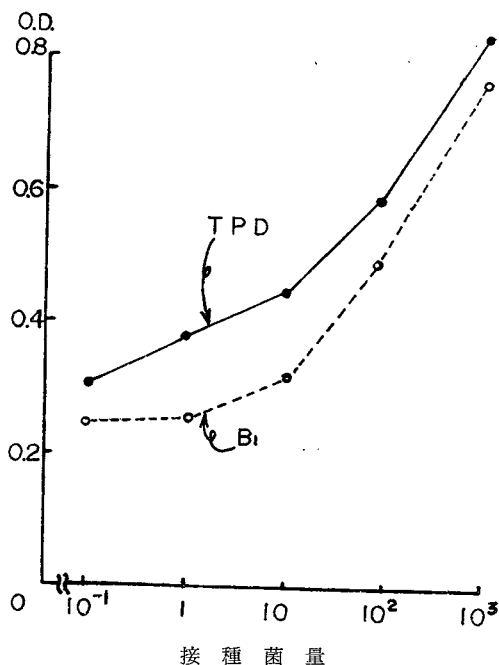
図2 $CySH$ 処理した TPD および B_i の *Kl. apiculata* にたいする活性(a) 50mg% $CySH$ 添加培地で 60°C, 30 分処理後菌を接種(b) $CySH$ 処理せずに菌を接種*4) $\mu g Eq = \mu g B_i-HCl$ 相当量*5) $CySH = Cysteine$

図3 TPD または B_1 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 B_1 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 B_1 より高い活性を示す²⁾。TPD について同様の検討を行なった。菌体(乾燥重量として30mg)の生理食塩水浮遊液に TPD または B_1 10 μ g Eq を加え生理食塩水で全量 5 ml として 30°C, 30 時間保温した。この操作で添加した TPD および B_1 は完全に菌体に集積され TPD は B_1 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 度洗っ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 0.01~0.08 μ g Eq/tube の集積菌液として 30°C, 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 B_1 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 B_1 の *Kl. apiculata* にたいする活性：接種菌量の影響

(3) において TPD が B_1 と同じ活性しか示さなかっ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, B_1 の *Kl. apiculata* にたいする活性
接種菌量の影響 B_1 , TPD 0.05 μ g Eq/tube

において接種菌量の少ないほど TPD と B_1 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。 B_1 または TPD $0.05\mu\text{g}$ E_q を含む培地に通常の接種菌量の $1/10 \sim 10^3$ 倍の菌を接種し 30°C 、20 時間培養した(図 4)。(3)における菌量は通常の菌量の約 $10 \sim 100$ 倍であつたがこの範囲では TPD はあきらかに B_1 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 B_1 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 $10\mu\text{g}$ E_q を添加し pH 4.7, 30°C で保温し、一定時間後 10% メタリン酸 5ml を加えて反応を止め、10 分間水浴上で煮沸して菌体中 B_1 を抽出し遠沈後上清を用いて遊離 B_1 量および総 B_1 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 B_1 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 B_1 に復帰したが CET の B_1 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 B_1 生成
TPD, CET : $10\mu\text{g}$ E_q
菌体 : 10mg (乾燥重量)
全量 : 5ml , 30°C , pH 4.7

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

* () 内は総 B_1 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 B_1 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 B_1 に復帰せしめたとき B_1 と同じ活性となるが TPD は菌体外で B_1 復帰していても B_1 より強い活性を示した。両者ともに B_1 になつてはじめて活性を示すのであるから B_1 に復帰することにより生じた Propylmercapto 基もしくは Carboxy 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、

Carboxy 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 Carboxy 基が加熱操作で揮散してしまうならば上の推論は成り立たない。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のであろう。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 B_1 より活性が高い²⁾のにたいし、TPD は B_1 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 B_1 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 B_1 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じょうずに B_1 に復帰しにくい培地中で菌が増殖状態にあるとき徐々に B_1 に戻る¹¹²⁾。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 B_1 拮抗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 B_1 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 B_1 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 B_1 に復帰したとき B_1 と同じ活性を示す。
- (2) TPD は菌体外で CySH により B_1 に復帰したときもなお B_1 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 B_1 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 B_1 より高い活性を示す。

(4) TPD は菌体の浮遊液により容易に B_1 に還元されるが、CET は TPD に比べ B_1 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-Jørgensen, 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 SHINODA²

School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

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

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

CHIKATARO KAWASAKI AND SUMIO SHINODA²

School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

(Received March 8, 1965)

Carbethoxythiamine stimulates the growth of a thiamine-requiring 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, promote 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-Jørgensen (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).

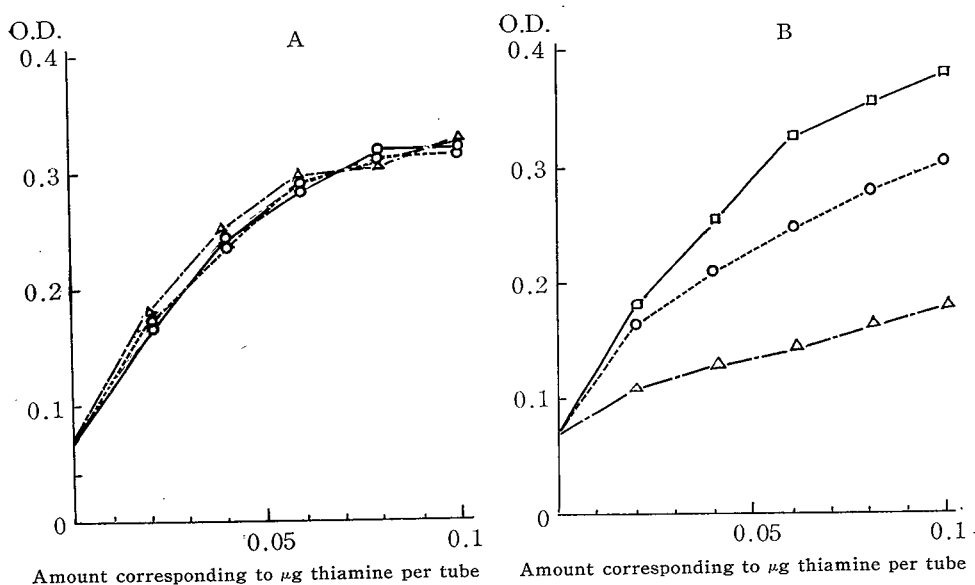


FIG. 1 Activity of CET, CBT and Thiamine after Takadiastase Treatment on the Growth of *K. apiculata*

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

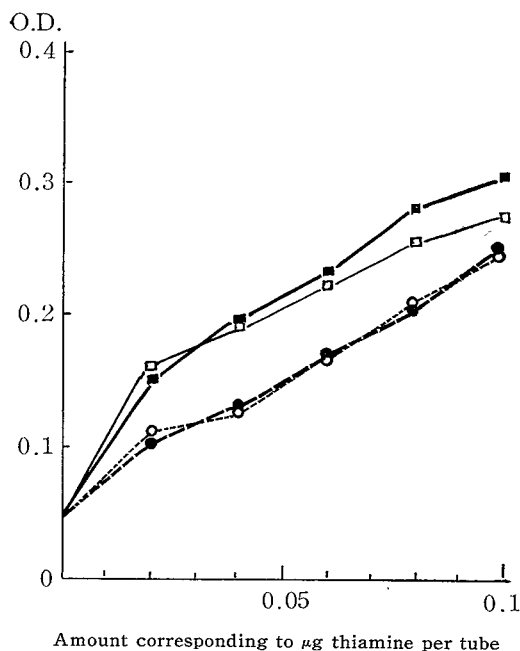


FIG. 2 Activity of TPD and Thiamine Treated with Cysteine on the Growth of *K. apiculata*

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 extracellularly. 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 diluted 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

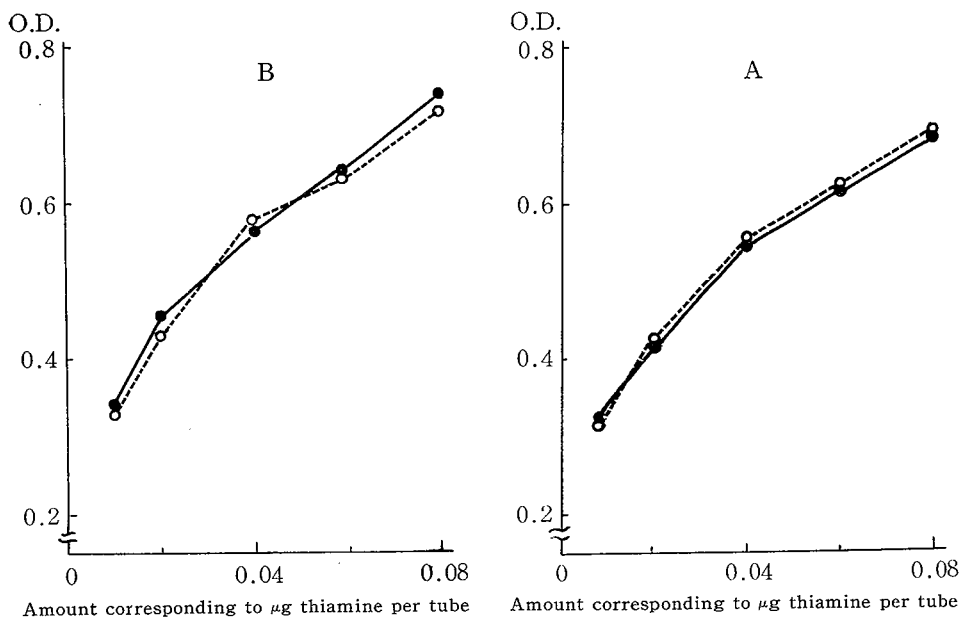


FIG. 3 Growth of *K. apiculata* Accumulated TPD or Thiamine

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 $0.05 \mu\text{g}$ thiamine, the cells 0.1 to 10^3 times the amount usually employed 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 $10 \mu\text{g}$ thiamine and the whole was

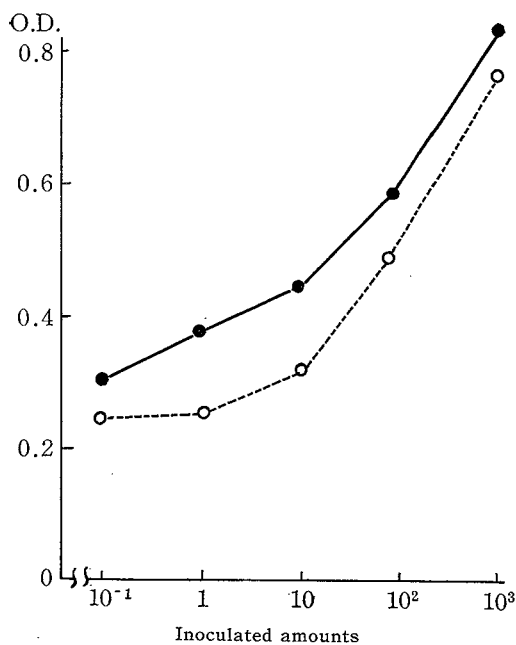


FIG. 4 Activity of TPD and Thiamine on the Growth of *K. apiculata* (Effects of the Amounts of Inoculated Cells)

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 % metaphosphoric 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.

	Incubation time (min)					
	0	20	40	60	80	100
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 shows 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-Jørgensen, 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B₁拮抗体にかんする研究

(XVI) *Kloeckera apiculata* にたいする Oxythiamine と
ビタミンB₁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B₁拮抗体にかんする研究

(XVI) *Kloeckera apiculata* にたいする Oxythiamine と ビタミンB₁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.

B₁誘導体の多くはB₁要求性酵母 *Kloeckera apiculata* IFO 0630 にたいしてB₁対応量より強い増殖促進性を示す¹⁾²⁾³⁾。B₁拮抗体であるOxy-B₁^{*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B₁誘導体による *Kl. apiculata* の増殖促進性にたいしてOxy-B₁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) B₁またはB₁誘導体の増殖促進性に たいするOxy-B₁の影響

Kl. apiculata による B₁ 定量用培地⁵⁾ 2 ml に各量の

Oxy-B₁を加え滅菌後無菌的に調製したB₁またはB₁誘導体0.05μg 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610mμにおける濁度を測定し図1の結果を得た。

Oxy-B₁が存在しないときにはTPD^{*3)}, BTMP^{*4)}, CET^{*5)}はB₁より高い増殖促進性を示したがB₁の増殖促進性は1 mgのOxy-B₁でも阻害されず、10mgのOxy-B₁により阻害されるのにたいして各B₁誘導体の増殖促進性はいずれもB₁のばあいより少ないOxy-B₁により阻害を受けた。

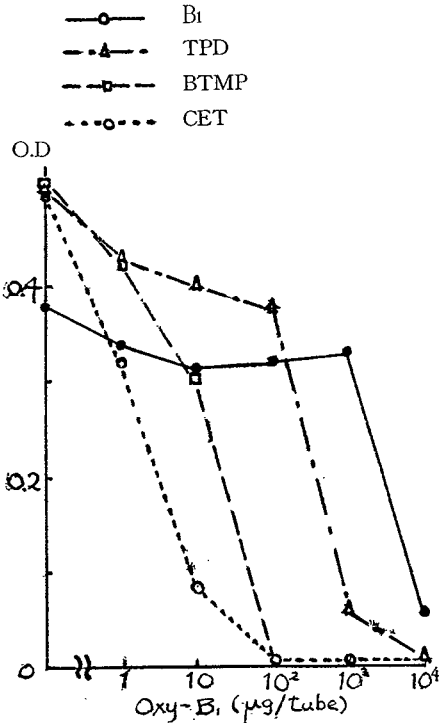
同様な実験を他のB₁誘導体を用いて試み次式にした

*1) Oxy-B₁=Oxythiamine *2) Eq=Equivalent to thiamine *3) TPD=Thiamine propyldisulfide
*4) BTMP=S-Benzoylthiamine-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。

$$\text{抑制比} = \frac{\text{50\%の増殖阻害に必要なOxy-B}_1\text{量}}{\text{B}_1\text{またはB}_1\text{誘導体量}}$$

ここに用いたB₁誘導体はすべてB₁と同等もしくはそれ以上の増殖促進性を示したが、Oxy-B₁との抑制比はすべてB₁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B₁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B₁誘導体よりさらに低い抑制比を示した。

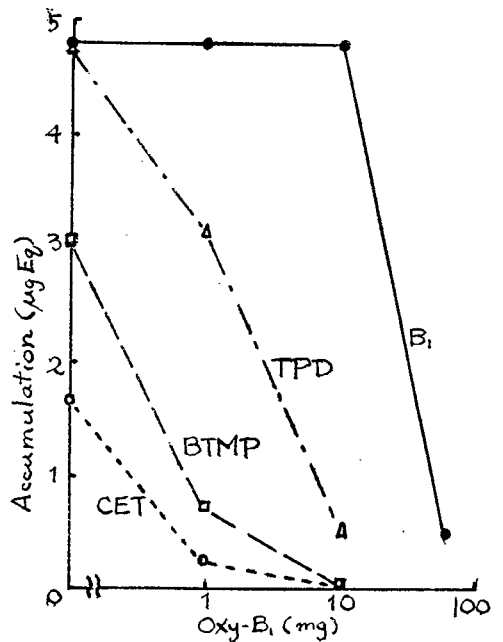
(2) B₁誘導体のB₁への復帰におよぼすOxy-B₁の影響

B₁誘導体がB₁に復帰する過程をOxy-B₁が阻害するかどうかを知るためつぎの実験を行なった。*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-B₁ 0, 1, 10mgを添加しpH4.7, 30°Cで保温後生成B₁量を測定した。TPDからのB₁生成率はOxy-B₁量に関係なく30~34%でOxy-B₁の影響はみられなかったが、CETからのB₁生成率は本条件では5%前後で非常に低くOxy-B₁の影響を明らかにすることはできなかった。

(3) B₁誘導体の菌体への集積におよぼすOxy-B₁の影響

乾燥重量として約5 mgに相当する菌体を生理食塩水にけん濁させ、B₁誘導体5 μg Eqおよび各種のOxy-B₁

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



*6) TATD = Thiamine 8-(methyl-6-acetyldihydrothioctate) disulfide
hydrofurfuryldisulfide

*8) TDS = Thiamine disulfide

*7) TTFD = Thiamine tetra-
*9) SBT = S-Benzoylthiamine

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

	Thiamine	TPD	BTMP	CET	Oxythiamine
Cells	98 μ g	75 μ g	41 μ g	12 μ g	35 μ g
Supernatant	3	23	56	82	61

15mg of cells were incubated with 100 μ g of thiamine, thiamine-derivatives or oxythiamine in saline at pH 4.7, 30°C for 1 hour

を加え pH 4.7, 全量 5 ml とし 30°C 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 0.1N 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% タカシアスターゼ液 1 ml を加え pH 4.5 で 45°C, 2 時間保温後 B₁量を BrCN-チオクロム 蛍光法で定量した。なお TPD はシステイン処理⁶⁾, BTMP はシステインおよびタカシアスターゼ処理⁷⁾, CET はアルカリ処理⁸⁾を行なつて B₁としてから測定した(図 2)。B₁の集積は 50mg の Oxy-B₁ によつてはじめて阻害されたのたいては TPD, BTMP, CET の集積はいずれもより少ない量の Oxy-B₁ により阻害された。

(4) B₁, B₁誘導体または Oxy-B₁ の菌体への集積

前実験にみられるように B₁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 B₁または B₁誘導体を菌体に添加して実験を行ない同時に Oxy-B₁ の集積量も測定した。乾燥重量約 15mg の菌体に培地中で B₁, B₁誘導体または Oxy-B₁ 100 μ g Eq を加え以下(3)に従つて集積量を測定した(表 2)。Oxy-B₁ の定量は Prehluda 法の改良法⁹⁾に従がつた。集積量は B₁>TPD>BTMP>Oxy-B₁>CET となつたが, B₁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) B₁または B₁誘導体を集積した菌の増殖におよぼす Oxy-B₁ の影響

(3)に示したように Oxy-B₁ は B₁誘導体の菌体への集積を阻害する。そこで B₁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 B₁または B₁誘導体 5 μ g Eq を添加し 30°C, 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-B₁ を添加して培地にて全量 4 ml とし 30°C,

20 時間培養後濁度を測定した(図 3-A)。なお 30°C, 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 B₁または B₁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 B₁に変化して検出され, CET では 31% が B₁として, 残りが CET として集積されていた。

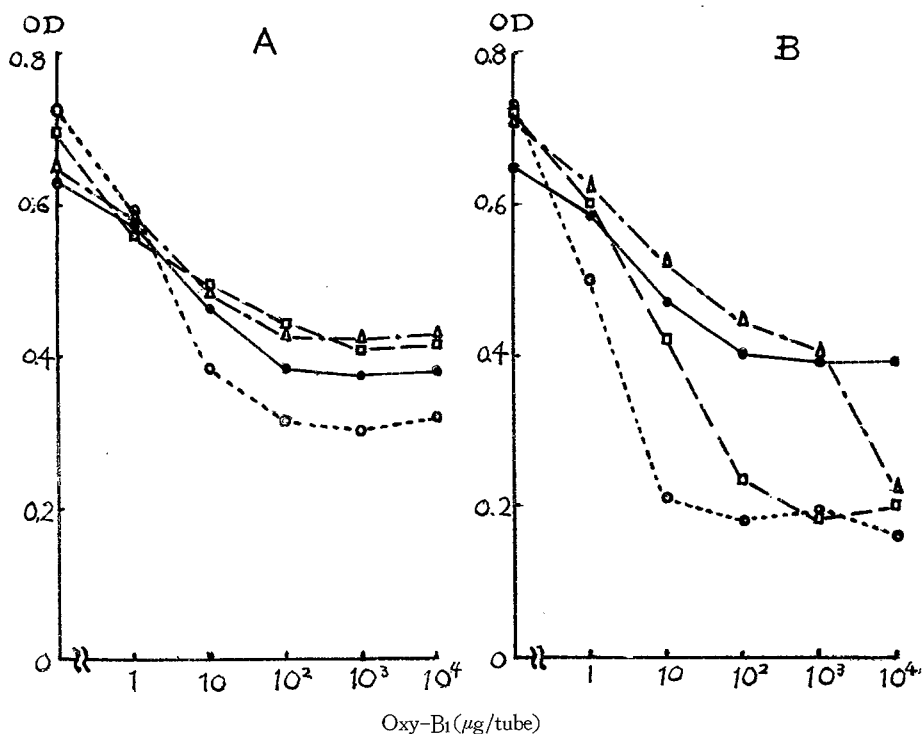
同時に対照として (B) の実験を行なつたが (B) においては集積の操作を行なわず (A) と同一菌量にたいして Oxy-B₁と B₁または B₁誘導体を同時に添加した。(B) は図 1 と同じ実験をたんに接種菌量のみを多くして行なつたのであるから本来ならば図 1 と同じ傾向がみられるはずである。Oxy-B₁ による影響の受け方が B₁<TPD<BTMP<CET の順になるという点では図 1 と図 3-B とは一致した。一方(A)においてはこのような B₁誘導体間の明らかな差は認められず, TPD, BTMP は B₁と同様な阻害曲線を示したが, CET のみはやや強く Oxy-B₁ により影響を受けた。

考 察

B₁誘導体の多くは *Kl. apiculata* にたいして B₁より強い増殖促進性を持つが, Oxy-B₁ による影響を強く受け, 影響の受け方には B₁誘導体の構造による共通性がみられた。CET は最も Oxy-B₁ の影響を強く受け B₁ のばあいの 1/1,000 の Oxy-B₁ により増殖阻害を受けた。Oxy-B₁ 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。B₁誘導体は B₁ となつてはじめて B₁ 活性を示すのであるから B₁ に復帰してしまえば B₁ と同じような態度で Oxy-B₁ と拮抗するはずである。今回の実験のようなばあいには B₁ に復帰しがたい B₁ 誘導体において Oxy-B₁ の影響が強く現われたと考えられる。B₁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 B₁ とりこみが 50 倍量の Oxy-B₁ 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 0.05 µg thiamine or its equivalent derivatives

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

が、著者らの結果でも *KL. apiculata* による B₁ 集積は Oxy-B₁ 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 B₁ 誘導体の集積は Oxy-B₁ 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 B₁ または B₁ 誘導体を菌体に集積させたのち Oxy-B₁ を添加して培養すると TPD および BTMP はまったく B₁ 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-B₁ 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-B₁ を添加して増殖させると対照にくらべると B₁ 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-B₁ が阻害すると同時にこの CET が B₁ に変化するときにも Oxy-B₁ 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 B₁ 誘導体の菌体による集積にたいする Oxy-B₁ 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。1~100 µg の Oxy-B₁ を添加したばあいを比較すると図 1 では B₁ 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-B₁ 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-B₁ 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-B₁ の菌体への集積は B₁ にくらべ困難である。1 例として 0.05 µg の B₁ および 10 µg の Oxy-B₁ を異なつた菌量に添加したとき少ない菌量のばあい B₁ はすべて菌体に集積されるが Oxy-B₁ は B₁ より集積力が弱く添加量も B₁ 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B₁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を持つB₁量は減少する。Oxy-B₁は菌体量が少ないばあいには多量に菌体外に残っ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-B₁量には変化がないであろう。したがって単位菌体中のOxy-B₁量とB₁量の比は菌体量により変化し、多量の菌体のばあいにはB₁にたいするOxy-B₁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) B₁誘導体の多くはKl. *apiculata*にたいしてB₁より強い増殖促進性を示すが、その増殖促進性はOxy-B₁によりB₁のばあいより強く阻害され、拮抗比はB₁>TPD>BTMP>CETとなつた。

(2) Oxy-B₁はB₁誘導体の菌体への集積を阻害し、CET>BTMP>TPD>B₁の順に強く作用をおよぼした。

(3) あらかじめB₁誘導体を菌体に集積させてからOxy-B₁を添加して培養するとTPDおよびBTMPはB₁と同じ態度を示し、CETのみがやや強くOxy-B₁の影響を受けた。

響を受けた。

(4) Oxy-B₁はB₁誘導体の菌体への集積の段階およびB₁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B₁誘導体の微生物活性

(XIV) 酵母に集積されたビタミンB₁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B₁誘導体の微生物活性

(XIV) 酵母に集積されたビタミンB₁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B₁を集積する。小野・市川²⁾は清酒酵母に集積されたB₁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B₁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B₁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0.1M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°C, 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

Goodwin⁹⁾の培地に30°C, 20時間培養して得た菌体を用いた。

(4) *Kl. apiculata*の培養

B₁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

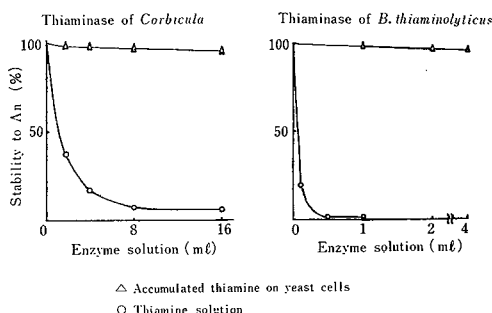
(1) B₁を集積した酵母にたいする An I の

* 1) An = Thiaminase

作用

小野・市川²⁾は清酒酵母に集積されたB₁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B₁について検討した。2 % グルコース溶液中 pH 4.7 で1時間B₁と接触させ菌体1 mg 当り80 μ gのB₁を集積した菌体1 mgに各量のAn液, 0.01 M ピリジン 1 ml, 0.07 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 5 ml を加え全量45 ml として30°C, 1時間保温後N HCl 5 ml を加え煮沸し, 残存B₁量を測定した。対照として酵母に集積されていないB₁100 μ gにたいして同量のAn液を作用させて残存B₁量を測定した(図1)。

Fig. 1 Stability of accumulated thiamine to thiaminase



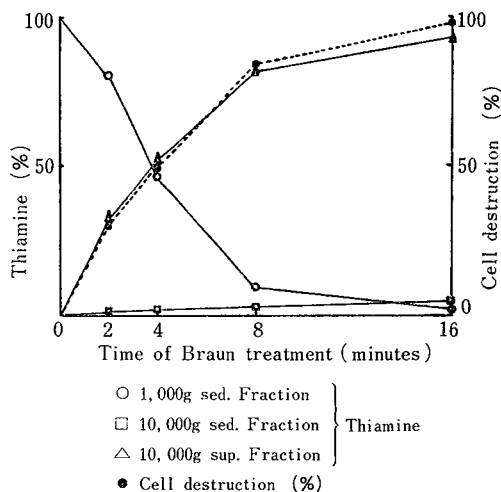
B. thiaminolyticus (M・M)およびシジミのAnはともにB₁を完全に分解する量でも集積されたB₁にはなんら作用を示さなかつた。またハマグリAnを用いたときにも同様な結果が得られた。さらに *B. thiaminolyticus* (M・M)のAnを *Sacch. cerevisiae* および *Sacch. carlsbergensis* に集積されたB₁に作用させたがB₁分解作用を示さなかつた(表1)。

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°C for 1 hour

Yeast	Thiamine accumulated (μ g/mg)	Thiamine decomposed (%)
<i>Kl. apiculata</i>	8.8	1
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	5.1	0
<i>Sacch. cerevisiae</i>	8.1	0
Thiamine solution	10.0	95

(2) 機械的細胞破壊による集積B₁の溶出

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



菌体中約100 μ g/mgのB₁を集積した *Kl. apiculata* 300 mgを終濃度0.25 M ショ糖および0.001 M EDTAを含む溶液50 mlにけん濁し, 径0.45~0.50 mmのガラス玉30 g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 \times g, 15分間遠沈しその上清をさらに10,000 \times g, 30分間遠沈して各画分のB₁量を測定した(図2)。

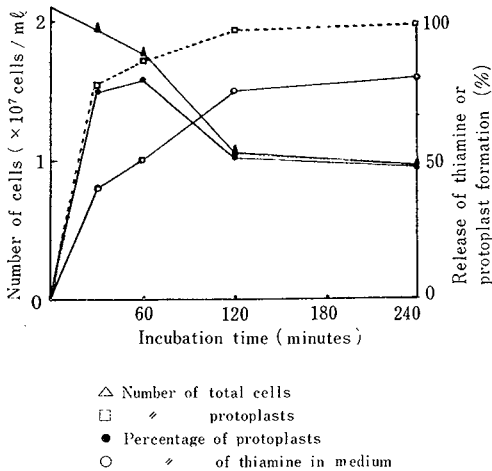
1,000 \times g沈渣は未破壊の細胞および細胞壁の画分であるが16分間の処理で細胞を完全に破壊したときこの細胞画分にはB₁はほとんど存在しなかつた。10,000 \times g沈渣はミトコンドリア画分と考えられるがこの画分にもB₁は存在せず, B₁は16分の処理後にはすべて10,000 \times g上清に認められた。この画分を硫酸, アセトン, トリクロル酢酸で除たんぱくするとB₁はほとんどの上清に認められた。すなわち集積されたB₁は細胞内で細胞壁や顆粒成分, たんぱく質などに結合して存在するのではないと考えられる。

(3) 酵母細胞壁溶解酵素処理による集積B₁の溶出

菌体中約100 μ g/mgのB₁を集積した *Kl. apiculata* 12 mgに等張塩液(終濃度0.8 M NaCl・0.05 M MgSO₄混液)中で *Streptomyces albidoflavus* より得られた酵母細胞壁溶解酵素をpH 7.0, 30°C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B₁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になった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) B₁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になっ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B₁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 thiamine-accumulated yeast cells

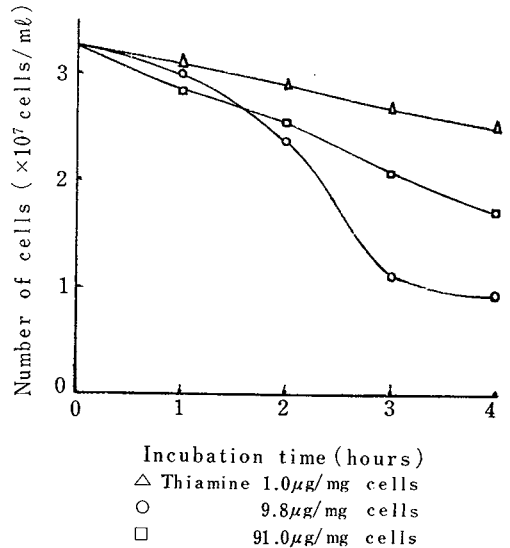


Table 2 Release of thiamine from cells of *Kl. apiculata* by osmotic shock
Thiamine accumulated : 98 μg/mg

Process of osmotic shock	Water	→0.8M NaCl	→Water	→0.8M 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0.8M 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回繰り返した。以上の操作のち遠沈上清中の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) 1,000 μ g, (B) 100 μ g or (C) 10 μ g of thiamine

			Incubation time (hours)		
			1	4	20
(A)	Thiamine contents (μ g)	Total	877	821	468
		Free	877	788	414
	Cell counts ($\times 10^9$)	Total	1.24	1.14	1.38
		Viable*	1.22	1.07	0.96
(B)	Thiamine contents (μ g)	Total	96	97	98
		Free	90	90	46
	Cells counts ($\times 10^9$)	Total	1.30	1.16	1.47
		Viable*	1.27	1.13	1.42
(C)	Thiamine contents (μ g)	Total	9.8	9.3	8.8
		Free	6.5	3.7	0.6
	Cell counts ($\times 10^9$)	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B₁溶出量の比率は死菌の比率を上回つた。滲透圧変化の差は大きいほどB₁溶出量は多く2M NaCl中から水に菌体を移すと1回の滲透圧変化でB₁溶出量は全集積量の60%に達した。また0.8M NaClと等張にしたKCl, MgCl₂, 尿素, グリセリンなどによる滲透圧変化によつてもB₁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B₁量の変化

Atkin・Schultz・Freyの発酵液10mlと菌体10mgにB₁ 0, 10, 100, 1000 μ gを添加し30℃に1, 4, 20時間保温し集積B₁量ならびにMB染色菌数を測定した(表3)。

10, 100 μ gのB₁を添加したとき総B₁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B₁量はしだいに増加した。1,000 μ gのB₁を添加したとき集積B₁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B₁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B₁の比率の方が上回つた。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

B₁ 100 μ g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1,000 μ g添加のばあいには54%に達した。すなわち多量のB₁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B₁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B₁の大半が細胞外に溶出した。したがつて集積されたB₁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B₁が貝類Anにより分解されると報告し酵母に集積されたB₁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B₁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B₁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B₁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B₁が細胞壁表面に付着しているとは考えられない。B₁を集積した酵母を機械的に破壊するとB₁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B₁は認められなかつた。以上の知見から集積されたB₁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_{12} を保有する能力を持ち、Protoplast 中の B_{12} 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_{12} 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_{12} が溶出し、一部は破壊されず B_{12} 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_{12} との接触により集積された B_{12} 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_{12} 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Suomalainen⁹⁾ はパン酵母の B_{12} 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_{12} 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_{12} 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_{12} について電子顕微鏡による Radioautography を検討中であり追って報告したい。

酵母に集積された B_{12} はほとんど遊離型であるが、著者らの実験では B_{12} 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_{12} 集積酵母を脱水したとき B_{12} 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_{12} 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_{12} 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_{12} 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_{12} は分解されなかつた。
- (2) Braun 細胞破壊機にて破壊すると B_{12} は可溶成分中のみ見出され、除たんぱく操作後も B_{12} 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_{12} が細胞外に溶出し、 B_{12} を多量に集積した酵母から得られた Protoplast は安定性が低かつた。
- (4) 高張→低張の滲透圧変化を与えると B_{12} 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_{12} を集積した酵母では B_{12} 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_{12} 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., Oora, 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B₁誘導体の微生物活性

(XV) *Kloeckera apiculata*によるビタミンB₁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B₁誘導体の微生物活性

(XV) *Kloeckera apiculata*によるビタミンB₁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 *Kloeckera* 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-Carboxymethylthiamine (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 inoculated in the broth containing 2 μ 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B₁要求性酵母*Kloeckera apiculata*の増殖をB₁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B₁およびB₁誘導体の集積量を測定したがB₁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B₁とB₁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B₁とB₁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B₁誘導体

菌株としては*Kloeckera apiculata* IFO 0630を用いた。CETとB₁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-Carboxymethylthiamine

*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°Cで培養した。

(4) B₁およびB₁誘導体の集積量の測定

菌体を生理食塩水で2回洗浄後0.1N H₂SO₄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°C, 2時間保温したのちBrCN・The^{*)}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⁾を行なった。

(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°C, 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 MgSO₄, 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°Cで2時間作用させた。本反応で96~99%がProtoplastになった。なおProtoplast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 MgSO₄混液)を用いた。

実験成績

(1) B₁の集積におよぼす培地成分の影響

*Kl. apiculata*は基礎培地中でB₁をよく集積するので

Table 1 Accumulation of thiamine on *Kl. apiculata*

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

Medium	Thiamine accumulated ^{*)}
Water	26
0.9% NaCl	25
2% Glucose	81
Inorganic solution ^{*)1)}	24
Basal medium ^{*)2)}	80

^{*)1)} KCl, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂, MgSO₄, FeCl₃

^{*)2)} Hoff-Jørgensen medium (2% glucose, 0.25% casamino acid, inorganic solution and vitamin solution) ^{*)3)} μg/mg of dry cells

培地成分を表1のように分け、各溶液10ml中で菌体10mg(乾燥重量)にB₁1 mgを30°C, 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った。

(2) B₁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°C, 1時間後の集積量を測定するとpH 1.9で乾燥酵母として55 μg/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122 μg/mgを示し以後は減少してpH 7.4では10 μg/mgとなった。

(3) B₁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°C, 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った。

(4) 正常細胞およびProtoplastによるB₁, CET, TPDの集積(1)

5×10⁸個の正常細胞またはProtoplastに等張塩液中B₁, CET, TPD 500 μg, Eq^{*)4)}を添加しpH 4.7, 全量5 mlとして30°C, 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 : 5×10⁸ cells, Thiamine derivatives : 500 μgEq, Total volume : 5 ml
Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour

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

* μg for 5×10⁸ cells

^{*)3)} The = Thiochrome

^{*)4)} Eq = Equivalent to thiamine

(5) 正常細胞およびProtoplastによるB₁, CET, TPDの集積(2)

前述のように CET の集積量は B₁ 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 B₁ 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 B₁, 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细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 B₁ または B₁ 誘導体の測定を行なつた。

その結果、表3に示すように B₁ および B₁ 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 B₁ 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 (9×10^8 cells)
Thiamine derivatives : 100 μ g Eq (0.10ml)
Total volume : 0.15ml
Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour with (+)¹⁾ or without (-)²⁾ glucose

Compounds	Intact cells		Protoplasts	
	+ 1)	- 2)	+ 1)	- 2)
Thiamine	92 μ g	66 μ g	87 μ g	29 μ g
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) B₁, 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 B₁ 量を測定した。菌体と B₁ 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 B₁ または B₁ 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。B₁, 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

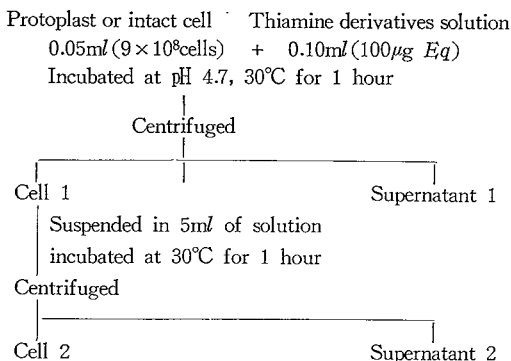
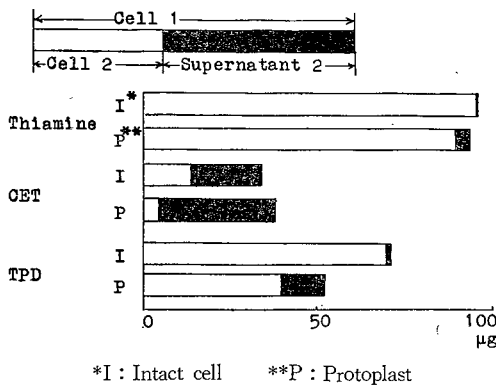


Fig. 2 Release of thiamine or thiamine derivatives from the cells by the washing with isotonic solution in the procedure of Fig. 1



*I : Intact cell **P : Protoplast

(7) 正常細胞およびProtoplastによるB₁, TDPの集積

酵母に集積された B₁ 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。

1.2×10^9 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 pH 4.7, 30°C, 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 TDP 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

1.2×10^9 cells were incubated with 1 mg of thiamine or TDP in 2% glucose solution at pH 4.7, 30°C for 1 hour

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

* Total thiamine free thiamine

** Values in bracket are

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°C, 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ならして TDP の集積は阻害され上

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

1 mg of cells were incubated with $100 \mu\text{g} E_q$ of thiamine or TDP in 2% glucose solution at pH 4.7, 30°C for 1 hour

Conc. of Na-molybdate	Thiamine		TDP			
	Sup.	Cells	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)

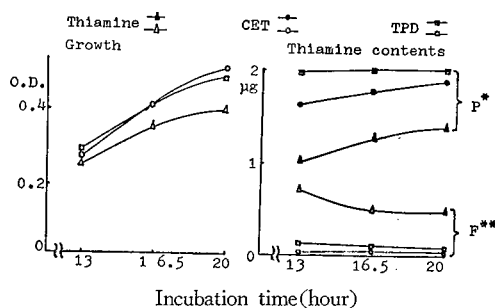
* Phosphorylated thiamine ** Free thiamine

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。

(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 $2 \mu\text{g} E_q$ を含む培地 100ml を入れ *Kl. apiculata* を接種し 30°C 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 ($2 \mu\text{g} E_q$)



*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 $4 \mu\text{g} E_q$ 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B₁が遊離B₁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B₁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。したがって集積されるためのB₁は遊離型であることが必要で, 酵母細胞中に遊離B₁として存在することに意義があると思われる。能勢¹²⁾はE. coliがThiaminokinaseの作用でB₁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¹³⁾のいうB₁収着現象とも異なるものであろう。

B₁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B₁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B₁に変化して原形質内に集約されるであろう。CETのままでB₁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, B₁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B₁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B₁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B₁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B₁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B₁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B₁と同じ活性しか示さない¹⁴⁾ことからCETとまっ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。

B₁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B₁より強い活性を示す点から考えてもB₁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°Cで1時間B₁と接触することにより菌体乾燥重量の10%にのぼるB₁を遊離B₁として集積した。

(2) 細胞壁を除去したProtoplastもB₁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B₁と同様集積されるがすべて遊離B₁に変化して検出されProtoplastによる集積量はB₁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B₁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B₁より低い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B₁を添加して培養すると27~40%の遊離B₁が検出された。

(5) CETは単純拡散により細胞内に透過してB₁を経てTDPとなり増殖に利用されるのにたいしてB₁では一部が原形質膜付近にとどまり遊離B₁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

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 were 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-carbethoxythiamine (CET) was added to the broth (0.125 µg 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 Yanagita³⁾, Sando⁴⁾ 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°Cで振とう培養を行なった。

(2) 菌数ならびに濁度測定法

培養液の一部を分取し100°C、5分煮沸して増殖を停止させ日立電光光度計にて610mµ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

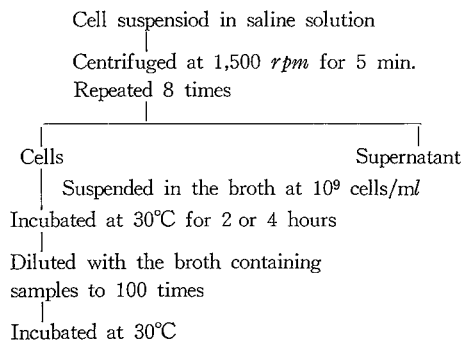
酵母の同調培養としては遠沈またはろ過により菌の大きさを一定とする方法、熱処理をしたのち常温で培養する方法、酵母を高濃度にけん濁して前培養したのち急激に希釈して培養する方法などが報告されている^{3)~6)}。*Kl. apiculata* の生理食塩水浮遊液を1,500rpmで5分遠沈し上清を除き沈殿をふたたび生理食塩水

*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った。さらに遠沈を繰り返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った。そこで1500 rpm, 5分の遠沈を8回繰り返して得た菌体を培地に 10^9 cells/ml の濃度にけん濁させ30°C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°C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書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った。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*



(2) 同調培養におよぼすB₁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B₁誘導体を添加しその影響をしらべた。B₁誘導体の添加量は0.0125μg(B₁相当量)/ml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10²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B₁, CETのばあいより早く起こり以後B₁との差がしだいに大となつた。CET添加時には

B₁とまっ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B₁添加菌の増殖が衰へたときにB₁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、B₁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らる。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ることができた(図2,3)。

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

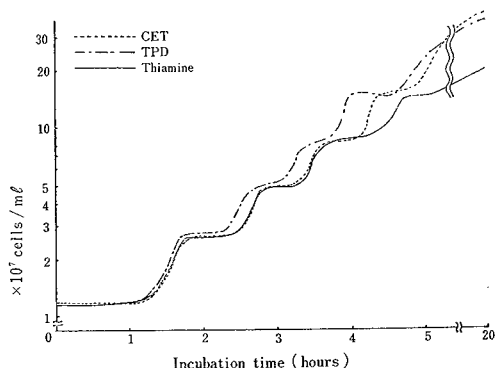
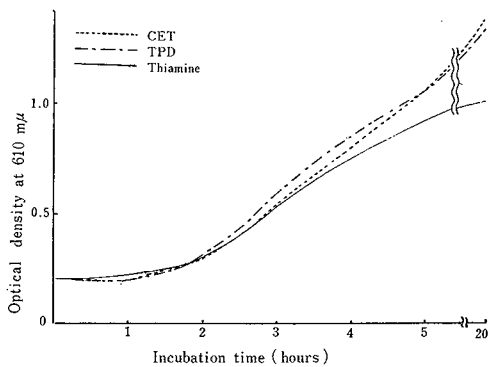


Fig. 3 Influence of thiamine, TPD or CET on the synchronized culture of *Kl. apiculata*
(2) Optical density



考 察

B₁, 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B₁との差を開き、2回目の菌数の増加がB₁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B₁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B₁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B₁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B₁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B₁の集積よりも原形質中のTDP^{*3)}含量がB₁添加のばあいより高まるためであらう。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B₁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B₁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B₁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B₁添加のばあいよりも'顕著に高くなりB₁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き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らう。

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。B₁, 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B₁より強く促進し、CETはB₁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B₁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)

*3) TDP=Thiamine diphosphate

ビタミンB₁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B₁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 (SB₁) 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. SB₁ was found almost equally in erythrocytes and the supernatant, after incubation for one hour. SB₁ in erythrocytes was partly washed out by shaking with saline solution, as SB₁ 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B₁より優れた血球移行性を示し、血球中では遊離B₁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。B₁に比べて脂溶性が強いが、TPDと異なり動物組織によつてB₁になり得ないとされている³⁾⁴⁾SB₁^{*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3,000rpm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3,000rpm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4mlにB₁誘導体液1mlおよび生理食塩水3mlを加え、37°Cで一定時間保温後、3,000rpm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った。

a) 血球部は0.1N硫酸15mlを加え煮沸抽出後pH4.5とし、3%タカジアスターゼB液1mlを加え37°Cで1夜保温後全量50ml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1mlを加え37°Cで1夜保温後全量25ml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B₁量を定量した。なおTPDおよびSB₁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った。すなわち、TPDは0.5%システイン液1mlを加えpH6、60°Cで30分保温し、SB₁は30%過酸化水素水数滴を加え50°Cで5分振りまぜ酸化してB₁とした。

*1) TPD=Thiamine propyldisulfide

*3) TDP=Thiamine diphosphate

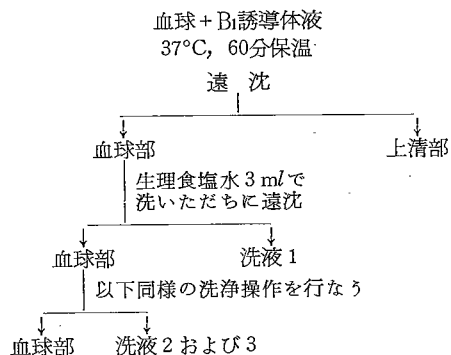
*2) TAD=Thiamine allyldisulfide

*4) SB₁=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

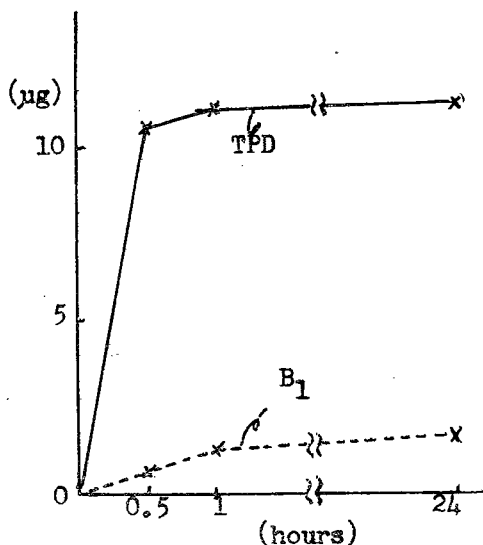
TPDおよびB₁の $4 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ ($13.5 \mu\text{g B}_1\text{-HClE}^{*5)}$ を血球に添加し30分, 60分および24時間後の血球移行量を測定した(図2)。TPDを添加したものは30分後には添加量の約80%が血球中に存在し, その値は60分さらに24時間後でもあまり変化しなかつた。一方B₁を添加したものはごくわずかしき血球に移行せず, 24時間でも13%が血球中に検出されるにすぎなかつた。

(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

図2 TPDおよびB₁の血球移行量

添加量: $13.5 \mu\text{g B}_1\text{-HClE}$
血 球: 4 ml, 37°C



中SB₁の定量に応用した。まずSB₁標準液 $1 \sim 4 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ ($3.37 \sim 13.5 \mu\text{g B}_1\text{-HClE}$)に30% 過酸化水素水5滴を加え50°C, 5分反応させ, 冷後パ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。なおパームチット処理を行わずに定量するとまったく蛍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。

(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

	SB ₁ 添加量 (μg)	H ₂ O ₂	B ₁ 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 0.99 μg は B₁-HCl 1 μg に相当

** 回収率 (%)

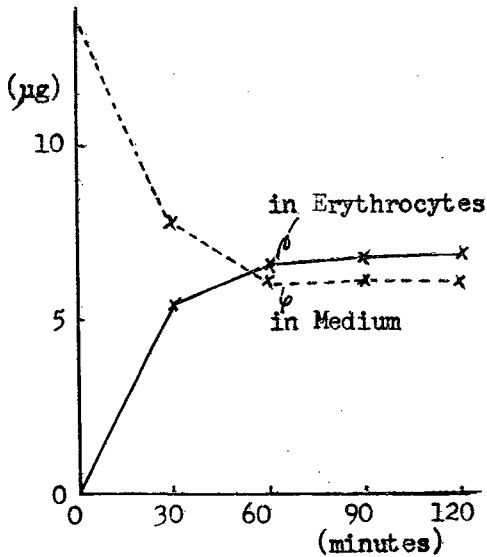
*5) B₁-HClE = B₁塩酸塩相当量

*6) BPO = Benzoyl peroxide

*7) Thc = Thiochrome

図3 SB_1 の血球移行量

添加量: $13.5\mu\text{g Bi-HCl E}$
血 球: $4\text{ ml}, 37^\circ\text{C}$



SB_1 の $4 \times 10^{-2}\mu$ 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った。

(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 $4 \times 10^{-2}\mu$ モルを添加した血球を図1の操作に従って洗液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°C で30分保温したばあ

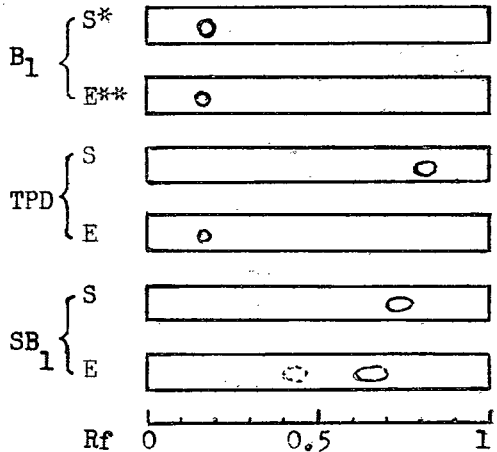
いでも洗液中への流出量はわずかであった。さらにTPDの $2 \times 10^{-1}\mu$ モル($67.4\mu\text{g Bi-HCl E}$)を添加したばあいについても検討したが(このとき血球中には $58\mu\text{g Bi-HCl E}$ が移行していた)洗液中への流出量は $0.3 \sim 0.5\mu\text{g Bi-HCl E}$ であった。

(5) PPC⁸⁾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°C 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: $13.5\mu\text{g Bi-HCl E}$

	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 $\mu\text{g Bi-HCl E}$

* () 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った。

SB_i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に比べごく小さい斑点であった。Rf0.63はSB_i(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0.01M HClで抽出後5% BPO液0.2mlを加えて振りまぜ、30% NaOH 3ml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った。BPOはSB_iを特異的にThcにするのでRf0.63の斑点はSB_iによるものでありRf0.43はSB_iが展開中に酸化されてB_iになったものか、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_i-disulfideの血球移行性のよいことはTPDがB_i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といわれているが血球膜とTPDとの反応ではB_iに比べいちじるしい結合性の差は証明されなかった⁶⁾。TPDは-SHによる還元性が強く容易にB_i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_iに還元され生成したB_iが血球内に取込まれることが考えられる。B_iは血球膜を透過し得ないのでB_iは血球内に封入された形となる。同じようにB_iに比べ脂溶性であり血球移行性のあるSB_iは血球内でもSB_i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_iは流出する。TPDのばあいは血球を洗ってもB_i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_i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_iは溶血後PPCで証明したが、溶血操作でTPDもB_iに還元されるからこの証明は血球中のB_iの

存在形を証明することにはならない。最近TPD-³⁵Sを用いた実験⁷⁾で血球中にB_iが、血球外にPropyl-³⁵Sが証明されたので血球中ではTPDでなくB_i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_iは24時間放置しても変化しなかったが、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_iを血球中に封入する形となり、しかも大部分が遊離のB_iであるのでB_i利用上有効なものと考え難い。血球内の酵素系でTransketolaseはB_i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_i-disulfideの利点として強調しようとするならば多量のB_i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_i含量は24時間後も変化しなかった。SB_i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であった。

2) 上の操作で得られた血球を生理食塩水で洗うとSB_i添加血球からはSB_i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った。

3) SB_iは血球内でSB_iのまま存在するがTPDは血球内でB_i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 SHINODA¹

School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

(Received July 7, 1964)

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

PENETRATION OF MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS INTO ERYTHROCYTES

I. COMPARISON OF THIAMINE PROPYL DISULFIDE AND THIOTHIAMINE

CHIKATARO KAWASAKI, ISAO TOMITA AND SUMIO SHINODA¹

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 researchers. 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% Takadiastase 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.

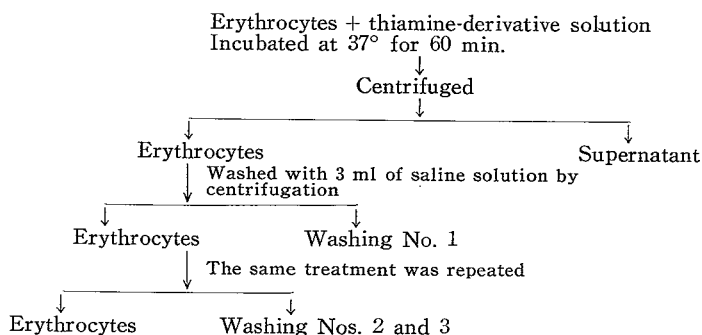


FIG. 1 Washing the Erythrocytes

RESULTS

1. Penetration of TPD or Thiamine into Erythrocytes

4×10^{-2} μ moles of TPD (equivalent to 13.5 μ g thiamine-HCl) or thiamine was added to the erythrocytes. After 30, 60 minutes and 24 hours, the amount transferred 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 quantitatively oxidized to thiamine by H_2O_2 was therefore applied to its determination in the blood. To 1 to 4×10^{-2} μ moles of thiothiamine (equivalent to 3.37 to 13.5 μ 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

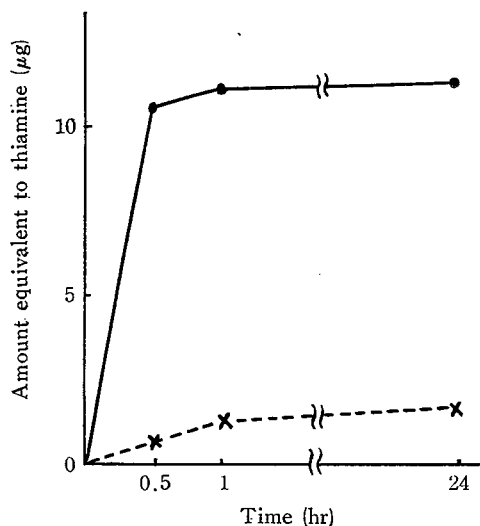


FIG. 2 Amount of TPD or Thiamine Penetrated into Erythrocytes
The amounts equivalent to 13.5 μg thiamine-HCl were added.
Erythrocytes, 4 ml, incubated at 37°
●, TPD; ×, thiamine

TABLE I
Oxidation of Thiothiamine Added to Erythrocytes by Hydrogen Peroxide

	Thiothiamine added	H ₂ O 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) \times 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

4×10^{-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 4×10^{-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

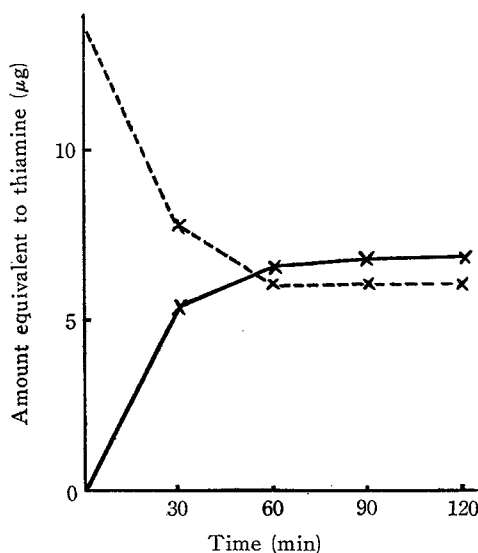


FIG. 3 *Amounts of Thiothiamine Penetrated into Erythrocytes*

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 2×10^{-1} μmoles of TPD (equivalent 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 deproteinization, 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

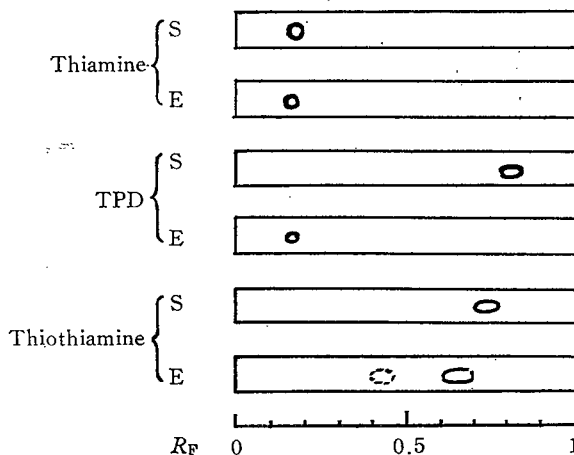


FIG. 4 Identification of the Form of Thiamine Derivatives Present in Erythrocytes by Paper Chromatography
Solvent system, acetic acid-*n*-butanol-water (1:4:5). S, standard; E, in erythrocytes.

detected with the Dragendorff reagent. From the erythrocytes to which thiothiamine had been added, two spots were found at R_F 0.43 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-S³⁵ (7) demonstrated the presence of thiamine in the cells and that of propyl-S³⁵ 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B₁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B₁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 microbiological 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SB₁^{*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B₁に還元されることを指摘した。CAT^{*3)}類は他のB₁誘導体に比べB₁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3,000rpm, 10分間遠沈して血球を集めKRP^{*5)}で2度洗浄しそのつど3,000rpm, 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4mlにB₁誘導体1mlを加え37°Cで一定時間保温後8,000rpm, 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3ml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20mlを加え水浴上15分間煮沸したのち全量50ml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5mlを加え水浴

*1) TPD = Thiamine propyldisulfide *2) SB₁ = 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に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 B₁ (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 B₁ すなわち Thiazole 型 B₁ + Thiol 型 B₁ (TPD あるいは DCET, CET*⁷) を定量し B₁ 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°C, 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°C, 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 B₁ 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ける血球移行量の比較

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 0.2 μmol を添加し 37°C, 1 時間保温後上清部と血球部の総 B₁ 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

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 0.2 μmol (67.4 μg B₁-HCl 相当量)

全血または血球浮遊液 4 ml

全量 5 ml, 37°C, 1 時間保温

B₁-HCl 相当量として示し () 内は添加量にたいする百分比

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。

(2) TPD, DCET からの血清または溶血血球液による B₁ 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 0.2 μmol を加え全量 5 ml として 37°C, 1 時間保温し、以下上清部 B₁ の定量法に従つてチアゾール型 B₁ の定量を行なつた(表 2)。DCET からは 8 % のチアゾール型 B₁ が検出されたにすぎなかつ

表 2 TPD, DCET からの血清による B₁ 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 0.2 μmol (67.4 μg, B₁-HCl 相当量)

血清 2 ml, 全量 5 ml

pH 7, 37°C, 1 時間保温

たが TPD は 91 % が B₁ に還元されていた。B₁ 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 B₁ 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。

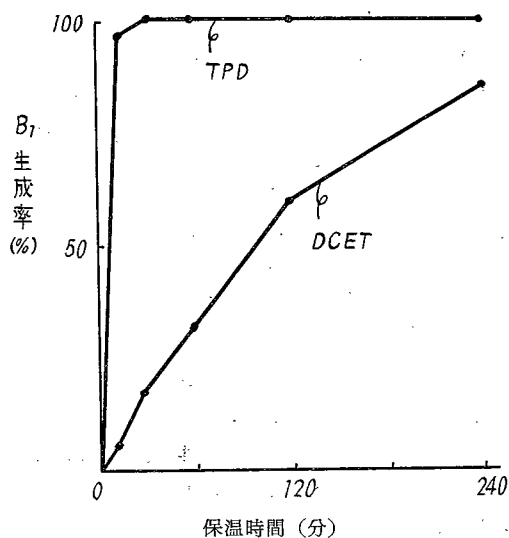
2) 溶血血球液

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 0.2 μmol を加え pH 6.8, 全量 10 ml として 37°C で保温し以下血球部 B₁ 定量法に従つてチアゾール型 B₁ 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 B₁ 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 B₁ はわずかし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っ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

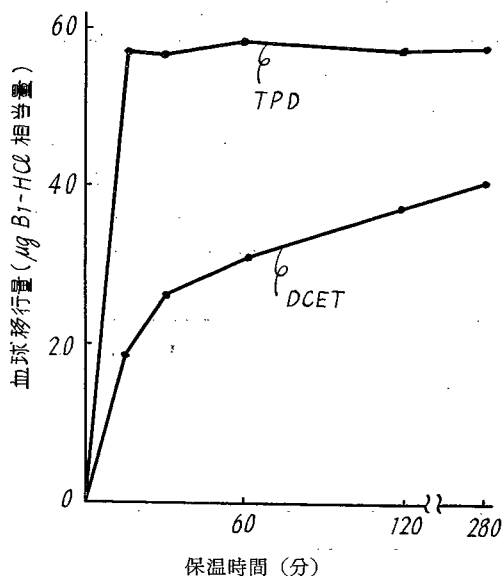
1) 時間の影響

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

図1 溶血血球液による TPD, DCET からの B_i 生成

TPD, DCET $0.2\mu\text{mol}$ ($67.4\mu\text{g } B_i\text{-HCl}$ 相当量)
 溶血血球液 4ml, 全量 10ml pH6.8, 37°C 保温

図2 血球移行量にたいする時間の影響



DCET, TPD $0.2\mu\text{mol}$ ($67.4\mu\text{g } B_i\text{-HCl}$ 相当量)
 血球浮遊液 4ml 全量 5ml 37°C 保温

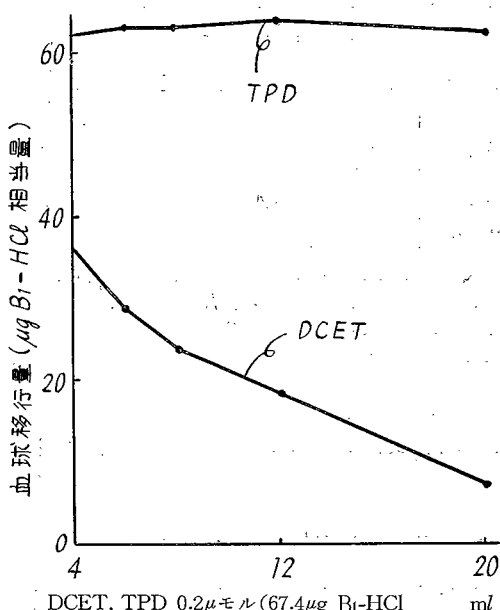
血球浮遊液を用いて TPD, DCET の血球移行量を経時的に調べると図2に示すように TPD は 15分以内に添加量 ($0.2\mu\text{mol}$) の 85% が血球に移行し以後変化しな

かったが, 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 $0.2\mu\text{mol}$ を加え KRP で全量を 4~20ml とし 37°C 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 のときは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

図3 血球移行量にたいする濃度の影響



DCET, TPD $0.2\mu\text{mol}$ ($67.4\mu\text{g } B_i\text{-HCl}$ 相当量) 血球浮遊液 3ml, KRP 0~16ml, 全量 4~20ml, 37°C , 1 時間保温

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った。

(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_i 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_i 塩酸塩相当量) を添加し 37°C 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_i , 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; B₁)、第2画分(Rf0.23~0.5; OCET)、第3画分(Rf0.5~1.0; CETおよびDCET)に分け0.1N塩酸で抽出し抽出液の一部をアルカリ処理後B₁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⁾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

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)*

B₁-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。B₁: 0.15, OCET: 0.29, CET: 0.68, DCET: 0.75

検出された。以上のことから明かなようにDCETからB₁への中間段階にCET, OCETのいずれも検出された。

(5) TPD, DCET添加血球の洗浄実験

前報¹⁾でSB₁が血球内にSB₁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SB₁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で血球外に残っ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っ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っていたものはほとんどがチアゾール型B₁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ったく認められなかつた。

考 察

B₁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B₁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B₁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B₁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B₁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B₁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B₁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の性質といふことができる。

表4 TPD, DCET添加血球の洗浄実験

画 分	上 清 部				洗浄による流出			血 球 部
	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 B₁-HCl相当量)

単位: %

* () 内は Thiazole 型B₁量

結 論

TPD と DCET のウシ全血または血球浮遊液における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_{12} に還元されるが、DCETは同条件で B_{12} へ復帰しがたく B_{12} の生成量が低かった。

(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った。

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_{12} に還元され易く還元された B_{12} が血球膜を透過しがたい点に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_{12} 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B₁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B₁要求性の乳酸菌*Lactobacillus fermenti* および *L. viridescens* にたいしてB₁の約80%の活性を持つことが Krampitz²⁾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、培養後日光灯電比色計を用いて 610m μ 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

B₆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B₁と同等の増殖阻害作用を示したが, AHETはB₁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*

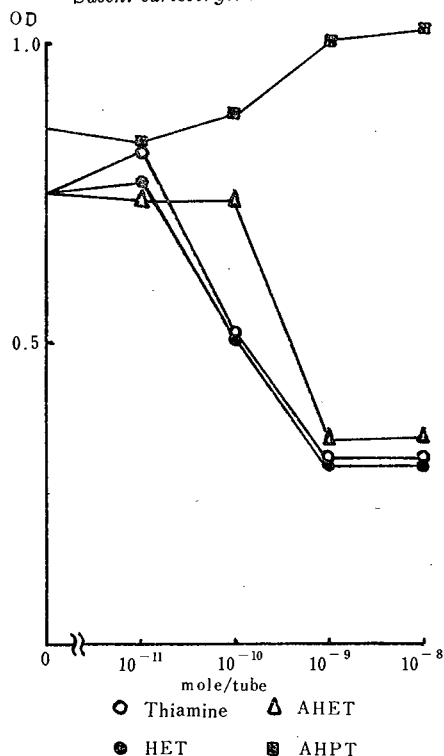


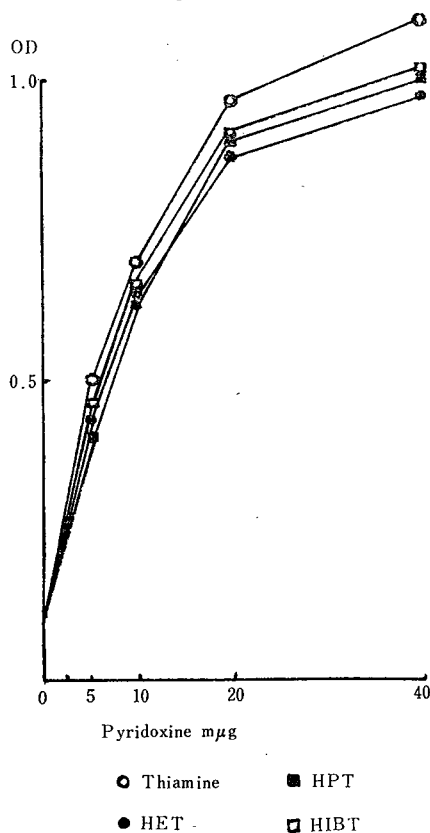
Table 1 The microbiological activities of HET and its related compounds

	Ratio of growth stimulation*		Ratio of growth inhibition*
	<i>L. fermenti</i>	<i>Kl. apiculata</i>	<i>Sacch. carlsbergensis</i>
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 concentration

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



にはまったく阻害作用がなかった(図2)。

同様に以上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。

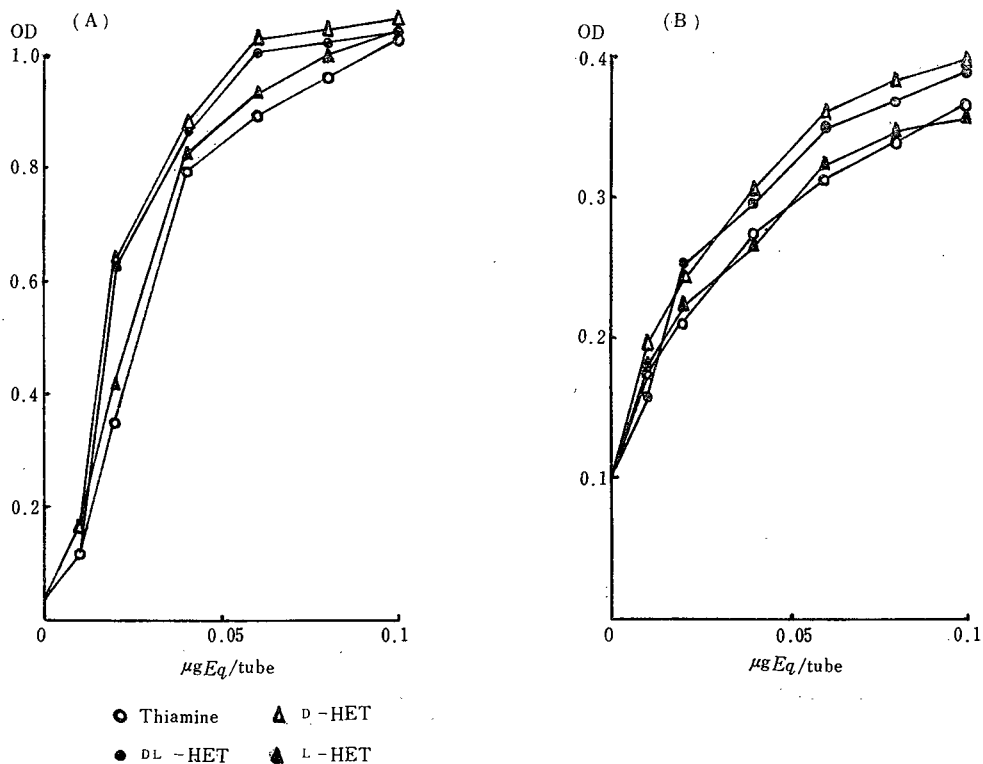
*Sacch. carlsbergensis*にたいして増殖阻害を示した HET, HPT, HIBTおよびB₁10⁻⁶モルを含む培地にB₆を添加し培養するといずれもB₆により阻害の回復がみられた(図3)。

(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B₁への変化

HETまたはB₁1.5×10⁻⁸~10⁻⁶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°C, 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 B₁ 量を測定した。

上清液はそのまま検液とし, 菌体は 0.1N H₂SO₄ 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 pH 4.5, 50°C で 2 時間保温後 BrCN-The*⁹⁾ 法またはフェリシアン-*The* 法により B₁ または HET 量を測定した。HET はフェリシアン塩と反応して *The* を生成するが, BrCN との反応では *The* 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 B₁ とフェリシアン塩の反応では *The* の生成率は BrCN のばあいにくらべ低く⁹⁾, HET からの *The* 生成率と一致しないことが多いので HET, B₁ 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)。

B₁ を添加して培養したとき HET の生成は認められなかったが HET を添加して培養したとき培地中に残

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

Dose of sample (μmole)	Growth (O.D.)	Accumulation (μmole)		
		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

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 B₁ 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 0.1N 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 B₁ および HET が検出された。

*⁹⁾ The = 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 1.5×10^{-7} モルまたは 1.5×10^{-6} モルを含む培地 60ml (B_6 不含) に *Sacch. carlsbergensis* を接種し 30°C, 20 時間振とう培養を行なった。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 conversion to thiamine by *Sacch. carlsbergensis*

Dose of sample (μ mole)	Growth (O.D.)	Accumulation (μ mole)		
		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。振とう培養を行なったので菌の増殖度は高かっ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 1.5×10^{-7} モルでは全部が菌体に、また 1.5×10^{-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 生成がみられなかったが 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った。

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った。

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 時間の培養を行なったのちには菌体に存在するものはすべて B_1 になっていたが、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 シ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 になりにくいかかわらず B_1 と同等の活性を示す事実は HET のままり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⁾。したがって *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った。同様な事実は村上らによっ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たの知見を得た。

(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 より活性が低かった。

(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 よりも低かった。

(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 より少なかった。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B₁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B₁のほか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回日本薬学会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)

