



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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文目錄

篠田純男



論 文 目 錄

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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 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 卷 4 号 255 頁

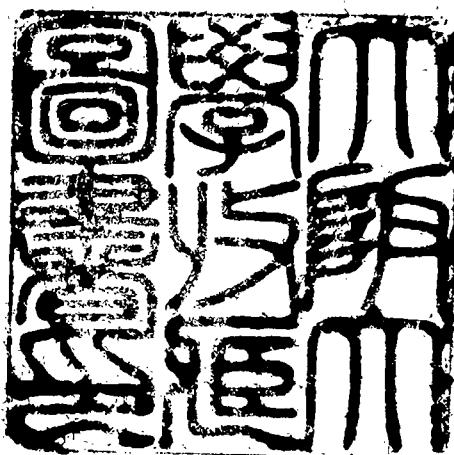
1. Hydroxyethylthiamine にかんする研究(I) Hydroxyethylthiamine およびその関連化合物の微生物活性

昭和 42 年 2 月 25 日

ビタミン 35 卷 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 (T P D) ならびに S-Carbethoxythiamine (C E T) 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。一方地中で TPD を Cysteine 培処理により、また CET をタカジアスター処理により Thiamine に変化させたのち菌を接種して培養すると TPD は Thiamine より強い活性を示すのにたいして CET は Thiamine に等しい活性を示した。すなわち CET は CET の型で菌体に接触しそのまま菌体内にとりこまれたとき Thiamine より強い活性を示し、TPD は培地中で菌と接触することによつて Cysteine により還元されたのちにおいても Thiamine に比べより強い活性を示すと考えられる。また *Kl.apiculata* の同調培養を行なうと Thiamine の増殖促進性との差が TPD を添加したときは対数増殖期の初期に、CET を添加したときは後期にあらわれた。

(2) Thiamine 誘導体と Thiamine 拮抗体の関連

Thiamine ならびにその誘導体の増殖促進性にたいする Thiamine 拮抗

体の影響をしらべると CET および TPD は Thiamine より強い増殖促進性を示すにもかかわらずその増殖促進性は Pyritthiamine よび Oxythiamine によって Thiamine の場合より強く阻害された。しかし Thiamine またはその誘導体をあらかじめ菌体に集積させたのち Oxythiamine を添加して培養するといずれも同様な阻害曲線が得られた。Thiamine や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 やその誘導体を添加して培養した *Kl. apiculata* の菌体中 Thiamine 含量を測定すると総量にはほとんど差がないが Thiamine を添加して培養した菌体には 23 ~ 42 % の Free thiamine が含まれるのにたいして CET, TPD を添加して培養した菌体の Thiamine はすべてリン酸化されて Thiamine diphosphate (TDP) として検出された。すなわち CET, TPD は添加されたものすべてが増殖に利用され得る TDP へ変化していたのにたいして Thiamine は一部が増殖に利用され得ない遊離型として存在していた。このように TDP への変化率の差が増殖促進性の差となつてあらわれたのであるが、この差の生じる原因として先にも述べたように 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きに Thiamine ならびにその誘導体の集積態度につき検討した。

(4) Thiamine や 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%によぶThiamineをFree thiamineの型で集積した。集積されたThiamineはThiaminase IC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 IC 0.8M塩化ナトリウム溶液中で細胞壁溶解酵素を作用させ、Protoplastを調製すると約60%のThiamineが細胞外に溶出した。Thiamineをほとんど含まない細胞から得られたProtoplast IC Thiamineを添加するとThiamineの集積がみられたがIntact cell IC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 IC TDP (Cocarboxylase)を添加するとThiamineとほぼ等しい量の集積がみられ、しかもすべてFree thiamineとして検出された。酵母の細胞壁にはAcid phosphataseが存在しておりその作用によつてTDPがThiamine IC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。

T P DおよびC E TのKl.apiculata ICによる集積はThiamine IC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C E T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C E Tの型のまま検出された。C E Tを保有する細胞を大量の等張液で洗浄するとC E Tが細胞外に溶出した。すなわちC E T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きの知見を得た。

- (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。

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 Pyritthiamine の拮抗	13 ~ 14
第2節 Thiamine 誘導体と Oxythiamine の拮抗	15 ~ 18
第3節 考察ならびに小括	19 ~ 20
第3章 Thiamine, S-Carbethoxythiamine または Thiamine propyl disulfide 添加培養菌の 菌体中の Thiamine の存在型の変化	21 ~ 26
第1節 菌体中 Thiamine ならびに Thiamine diphosphate 量の変化	21 ~ 24
第2節 考察ならびに小括	25 ~ 26

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

緒論

近年多くの Thiamine 誘導体が合成され実用化されてきたが、Thiamine 誘導体のいくつかは増殖に Thiamine を要求する微生物（乳酸菌、酵母、糸状菌など）にたいして対応量の Thiamine 以上の増殖促進効果を示すことが報告されている。^{(1)～(4)} しかし Thiamine より強い効果がいかなる原因で発揮されるかについては未だ十分には解明されていない。 Thiamine propyl disulfide (TPD) に代表される非対称 Disulfide 型誘導体は上記の微生物にたいして Thiamine より強い増殖促進効果を示すものが多く、当初 Thiamine から分離されて生じる Alkylmercapto 化合物が増殖を促進するのではないかと考えられたが、培地に Thiamine と Alkylmercapto 化合物との添加は Thiamine 単独添加にくらべ増殖に差を生じない。⁽⁵⁾⁽⁶⁾ Thiamine 誘導体は Thiamine にくらべ水溶液中での安定度が高く、このためオートクレーブ処理あるいは培養中に分解される量が少ないので Thiamine より高い活性を示すという推論も成り立つが、オートクレーブ処理を省略した場合でもやはり活性は高く、培養後の菌体の Thiamine 含量を比較するといずれを添加しても大差ないことからこの推論も否定された。 TPD その他の Thiamine 誘導体は赤血球その他の動物細胞に Thiamine より容易に透過することは多くの著者により報告されているが、^{(7)～(11)} 乳酸菌、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

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

本文中には以外の略語を使用した。

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 tetrahydrofuryl disulfide

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

B T M P : S-Benzoylthiamine-9-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* にたいする増殖促
進性⁽²⁰²²⁾

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

実験方法

(1) *Kl.apiculata* の培養

Hoff-Jørgensen の変法培地 (Tab. 1) を基礎培地として用いた。
特に記した場合以外は基礎培地 2 ml をオートクレーブにて 0.75 Kg/cm² で
滅菌し、無菌的に調製した試料液および無菌蒸留水を加えて全量 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)	0.5 g	Choline-HCl	400 µg
Glucose	4 g	Nicotinic Acid	100 µg
Salt E*	10 ml	Pyridoxine-HCl	100 µg
15% Na-Citrate-5H ₂ O Solution	5 ml	Ca-Pantothenate	100 µg
2% L-Asparagine 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 KH₂PO₄, 17g KCl, 10g(NH₄)₂SO₄, 4g CaCl₂, 4g MgSO₄-7H₂O, 0.1g FeCl₃, 0.1g MnSO₄ 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 m μ 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 °C にて恒量となるまで乾燥し(約 2 時間)秤量した。

(4) タンパク質量の測定

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

(5) 菌数の測定

Thoma の血球計算盤を用いて測定した。

実験成績

(1) 各誘導体の増殖促進性の比較 - 1 (Fig. 1, 2)

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

(2) 各誘導体の増殖促進性の比較 - 2 (Tab. 2, 3)

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

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

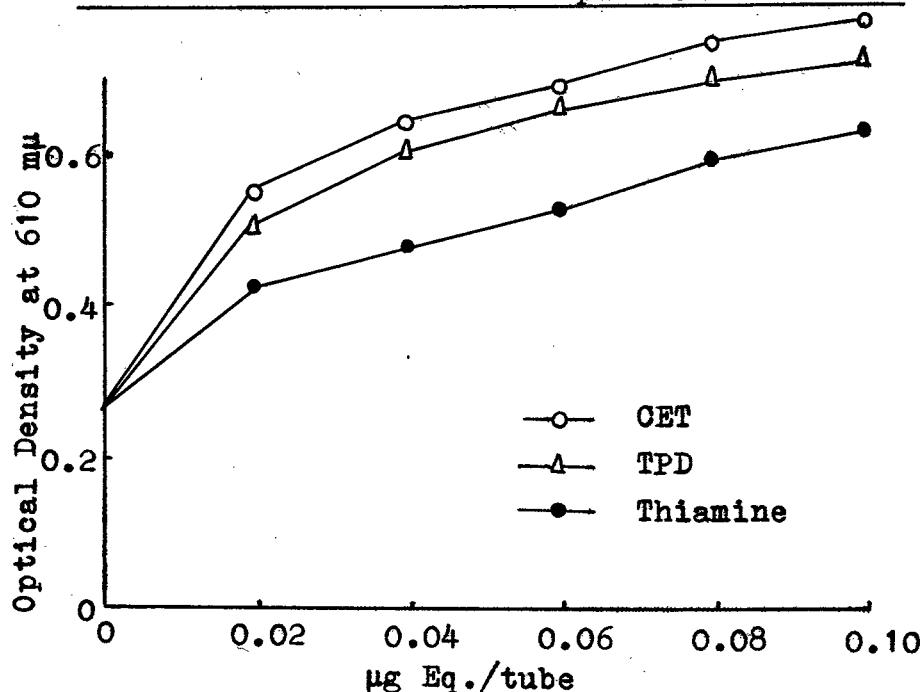
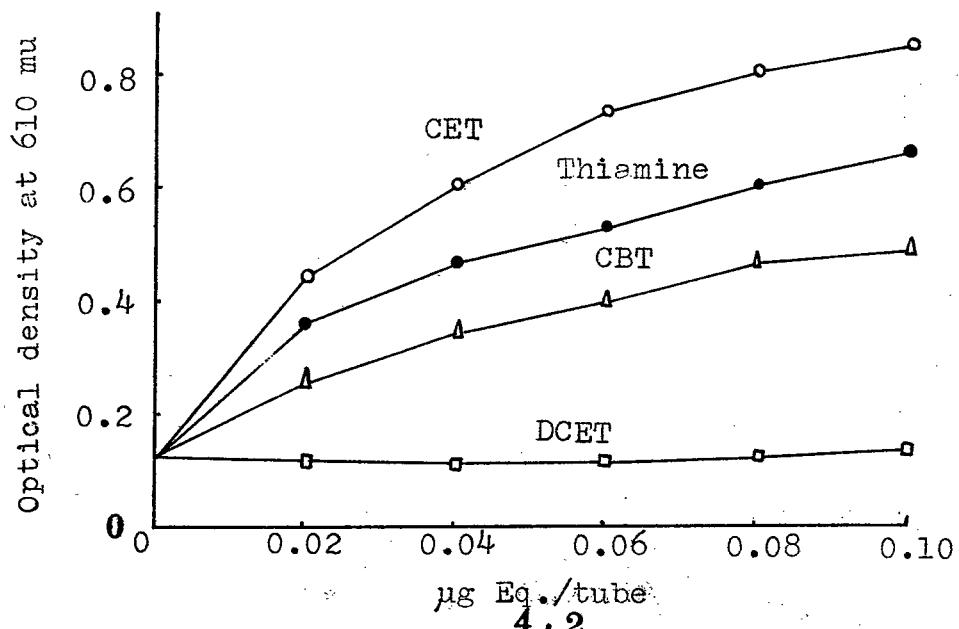


Fig. 2 The Growth Stimulating Activity of Thiamine Derivatives on Kloeckera apiculata



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

Concentration of samples: 0.5 µg Eq./40 ml

	O.D.	Cell counts x 10 ⁷ cells/ml	Dry weight mg/ml
Thiamine	0.527	4.01	0.23
CET	0.787	7.25	0.39
TPD	0.680	5.54	0.32

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

Concentration of samples: 0.5 µg Eq./40 ml

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

菌数およびタンパク質量の測定結果から比較し表示した。いずれの測定法を用いた場合にも 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 に変化するのにたいして CET は還元剤の作用を受けず、酵素的に Thiamine に変化し、動物組織による両者の Thiamine⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ 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つた。

実験方法

(1) Thiamine, CET または TPD を集積した酵母の培養

Thiamine 量を制限した培地で培養して得られた菌体 3.0 mg を生理食塩水にけん濃し、0.01 M 酢酸緩衝液にて pH 4.7 とし Thiamine, CET または TPD 1.0 μg Eq. を加え 30 °C 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 μg Eq. の Thiamine または誘導体を含むよう希釈し 30 °C, 20 時間培養後 O.D. の測定を行なつた。

(2) 菌体抽出液の Bioautography

菌体を生理食塩水で 2 回洗浄し 0.1 N 塩酸で 90 ~ 95 °C, 5 分間抽出し、抽出液を東洋沪紙 No. 50 につけ 醋酸 : n-ブタノール : 水 = 1 : 4 : 5 を展開溶媒として 1 夜展開し、風乾後沪紙を 1.0 等分し各沪紙片を基礎培地に投入し *Kl.apiculata* を接種して 30 °C 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 分間保溫し、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 時間保溫後 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) (27)
N. Sando, 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 (10⁹ cells/ml) にけん濁させ 30 °C, 2 時間保溫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時の

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

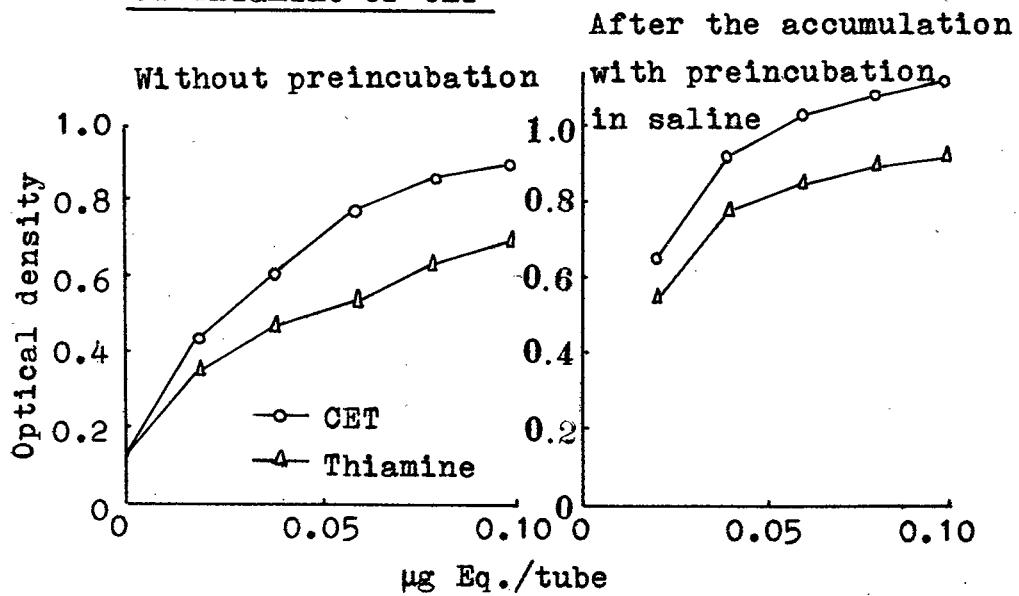


Fig.4 Growth of Cells Accumulated with
Thiamine or CET

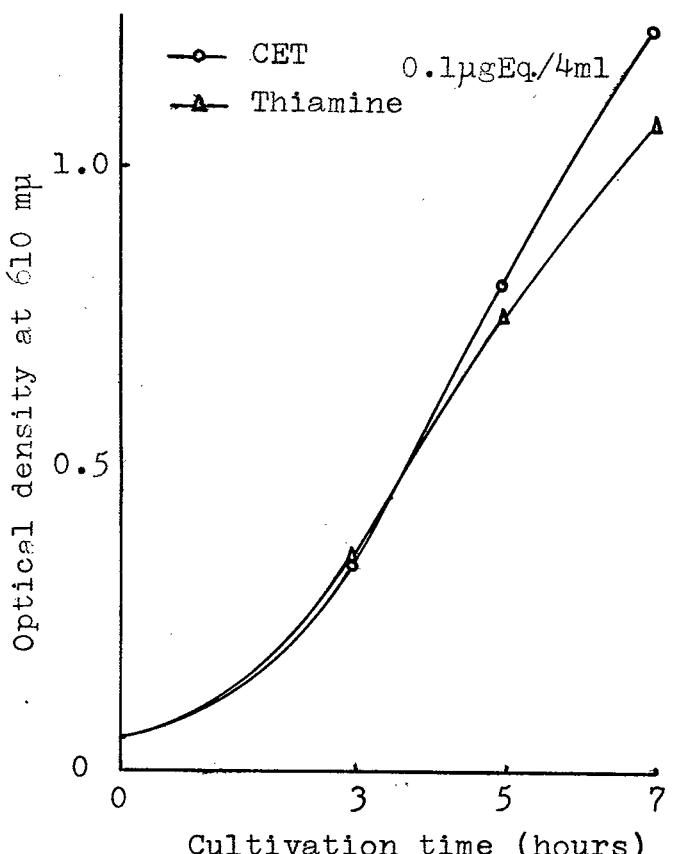
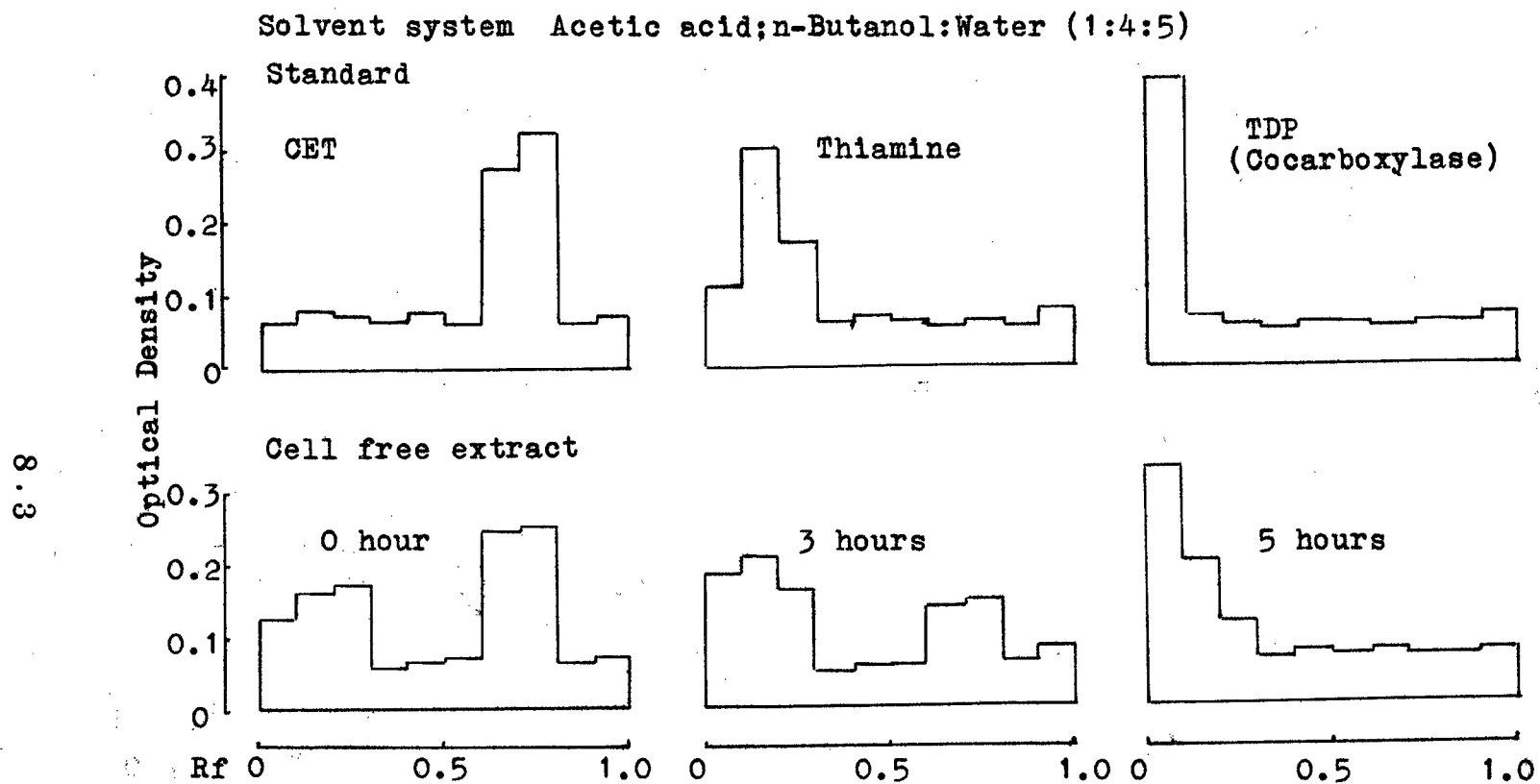


Fig.5 Bioautography of Cell Free Extract of Kl.apiculata Cultured with CET



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

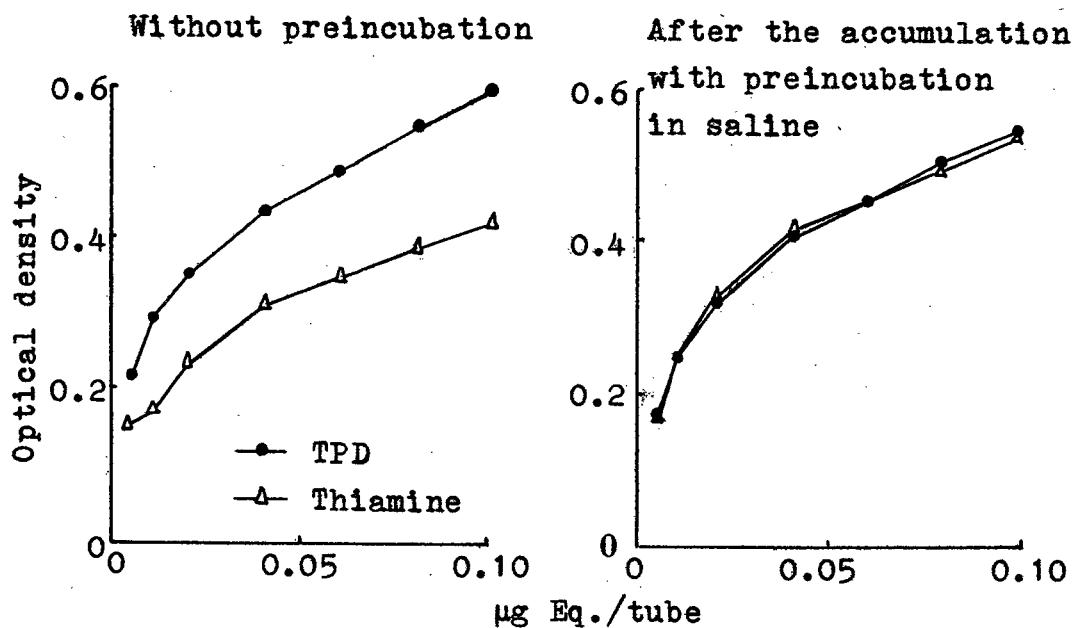


Fig.7 Effects of the Amounts of Inoculated Cells to the Activity of TPD or Thiamine

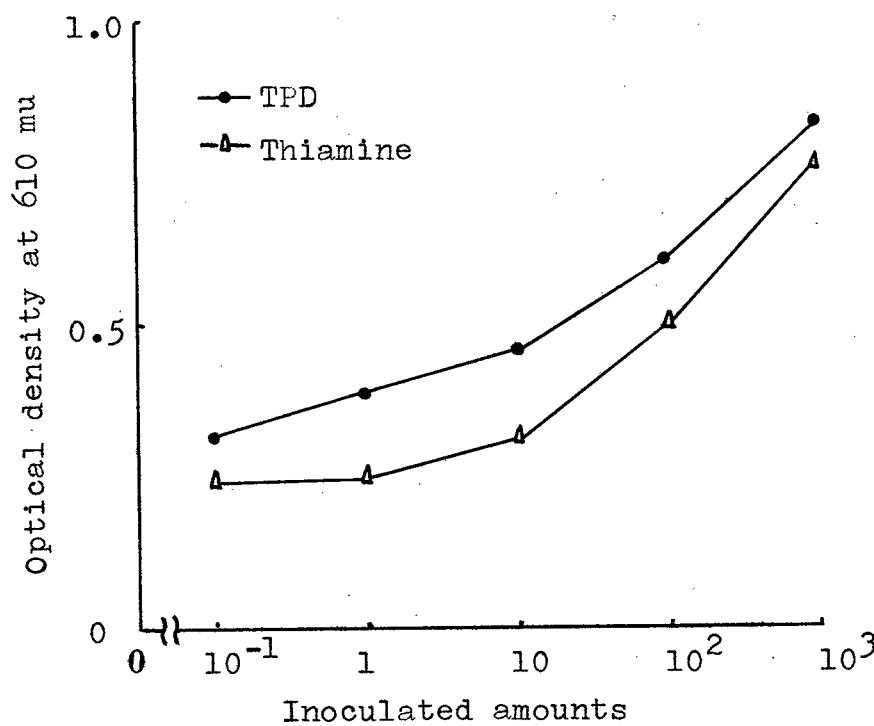


Fig.8 Activity of Thiamine or TPD after Cysteine Treatment
on the Growth of *Kl.apiculata*

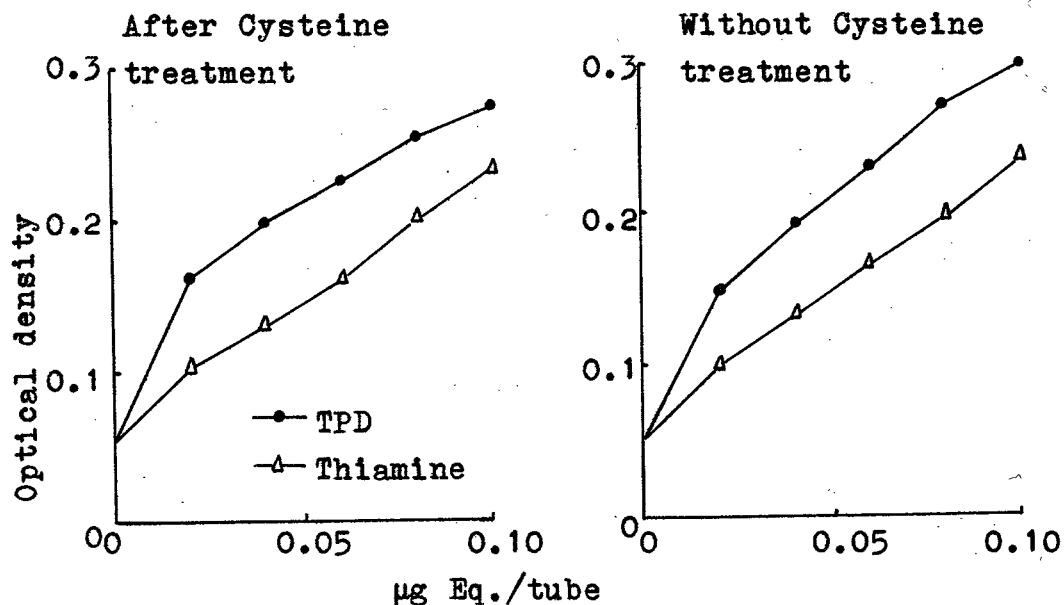
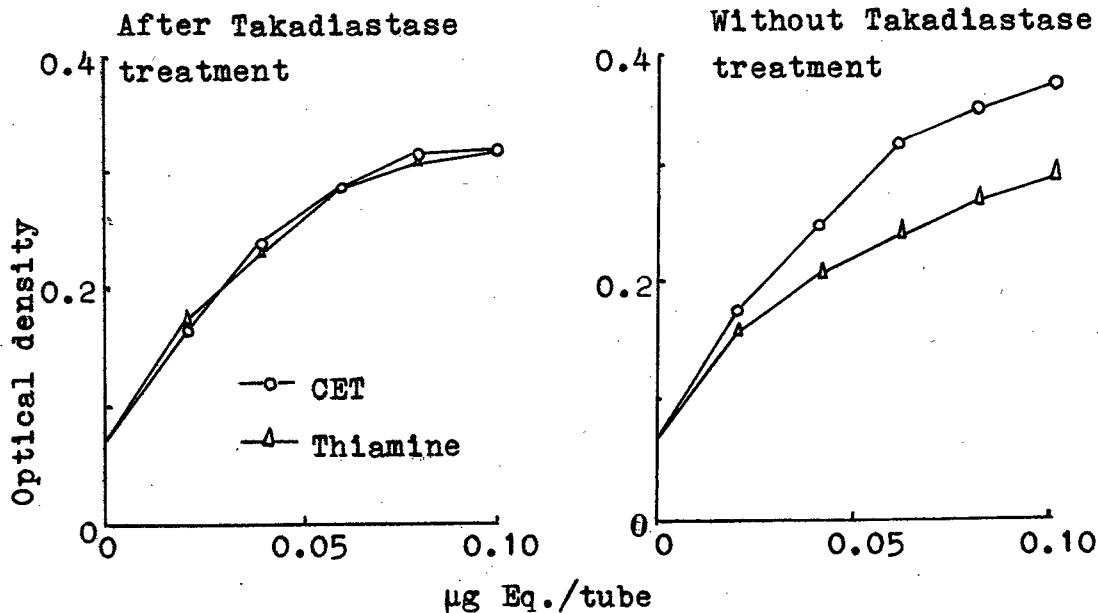


Fig.9 Activity of Thiamine or CET after Takadiastase
Treatment on the Growth of *Kl.apiculata*



(3) Thiamine または T P D 集積菌の増殖度 (Fig. 6)

T P D 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 T P D 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) T P D 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を考えられるので Thiamine または T P D $0.05 \mu\text{g Eq}$ 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 T P D は Thiamine より強い増殖促進性を示した (Fig. 7)。

(3) の実験で T P D 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 处理後の Thiamine および T P D の増殖促進性 (Fig. 8)

培地中で Cysteine 处理を行なつて T P D 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。 T P D は Cysteine 处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 T P D $1 \mu\text{g Eq}$ を Cysteine 处理したところ完全に Thiamine に還元されたので上記実験で T P D 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) タカジアスターーゼ処理後の Thiamine または C E T の増殖促進性 (Fig. 9)

C E T はタカジアスターーゼ処理によって Thiamine に変化するが、このような処理をしたのちには C E T は Thiamine と同等の増殖促進性を示した (Fig. 9)。

すなわち T P D は菌との接触以前に Thiamine に変化していてもなお

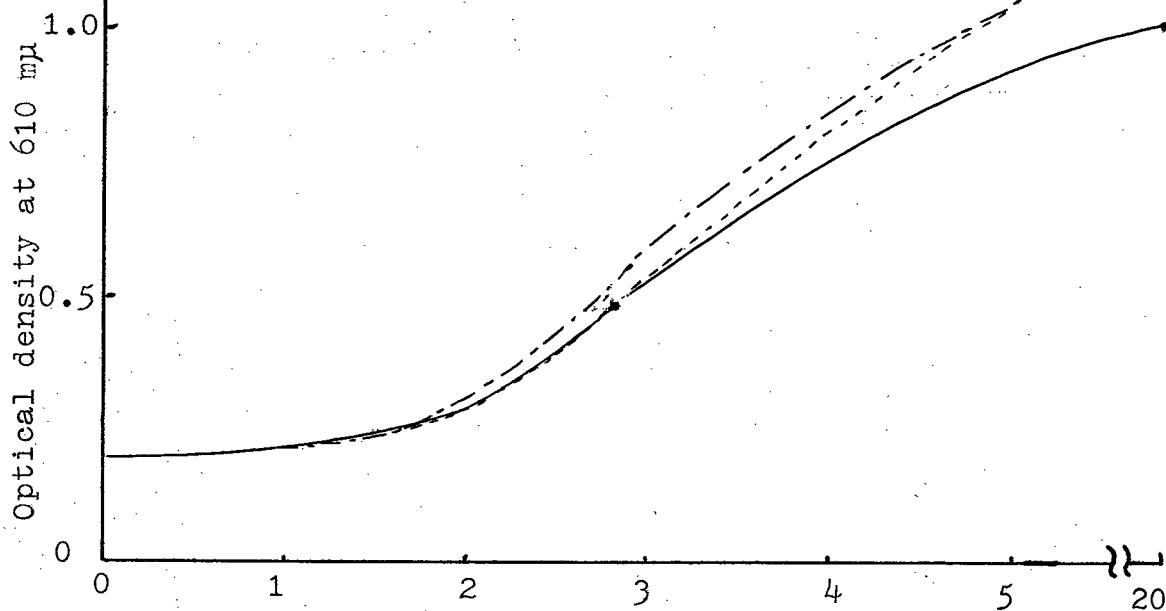
Thiamineより高い増殖促進性を示したが、C E TがThiamineより高い増殖促進性を示すためには菌との接触時にC E Tの型であることが必要と思われる。

(7) *Kl.apiculata*の同調培養における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。

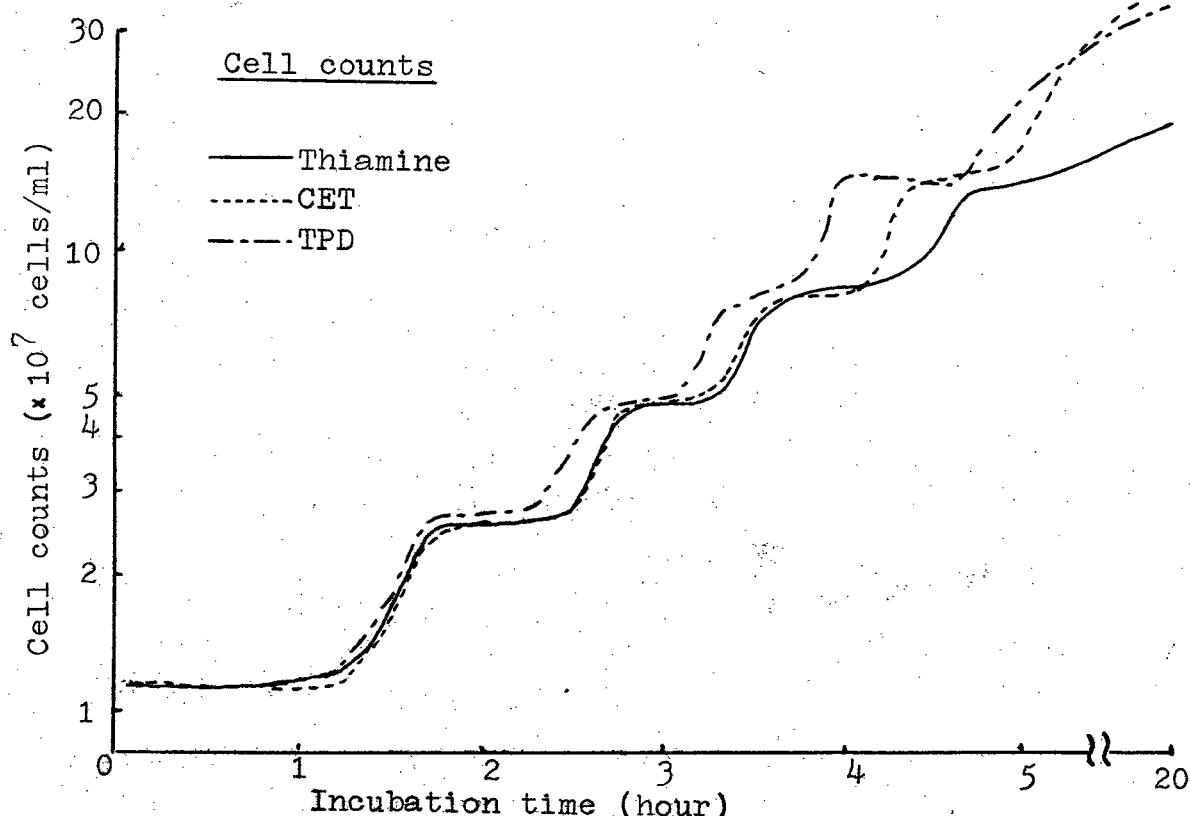
Fig.10 Synchronized Culture of *Kl.apiculata* on Addition of Thiamine, CET or TPD

Optical density



Cell counts

— Thiamine
- - - CET
- · - 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つており第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 はそれぞれ異なる機構で 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 と同等であった。
- (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 と同等であったのにたいして 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。 T P D および C E T 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。
^{(31) (32)(33)}

第1節 Thiamine 誘導体と Pyritthiamine 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 Pyritthiamine 溶液 1 ml を加え、 *Kl.apiculata* を接種して 30 °C, 20 時間培養後 610 m μ 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 Pyritthiamine の影響

(Fig.11)

0.05 μ g Eq. の Thiamine 誘導体について各量の Pyritthiamine を添加したときの増殖阻害曲線 (Fig.11) を示した。 Pyritthiamine 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 Pyritthiamine の添加によりその増殖促進性は強く阻害された。

(2) Thiamine 誘導体に対する Pyritthiamine の抑制比 (Tab. 4)

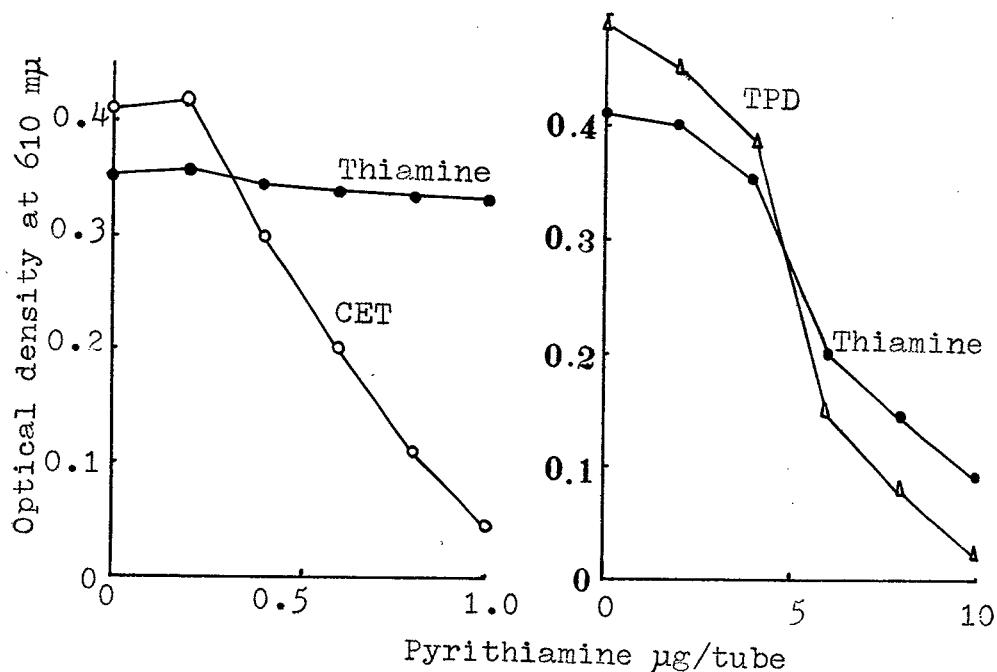
同様な実験を他の数種の誘導体についても行ない次式にしたがつて Pyritthiamine による抑制比を Thiamine 等量比で算出しその結果を Tab.

4に示した。

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

(31)
Thiamineにたいする Pyritthiamine の抑制比は 60 で Sakuragi, 川
(32) 崎らの報告した値に一致した。 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、 Pyritthiamine 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 Pyritthiamine 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⁽³²⁾ と報告されている。

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 Pyritthiamine 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 量の定量を行なつた。なお Thiamine 誘導体を含む抽出液については下記の処理を行なつて Thiamine 誘導体を Thiamine に変化させたのち BrCN-Thiochrome 反応を行なつた。

T P D : 検液 1 ml を酢酸緩衝液にて pH 6 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 処理を行なつたのち、pH 4.5 となし 1 % タカジアスター B 液 1 ml を加え 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 法の変法を用いて定量した。⁽³⁵⁾

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)

Pyritthiamine 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 Pyritthiamine 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

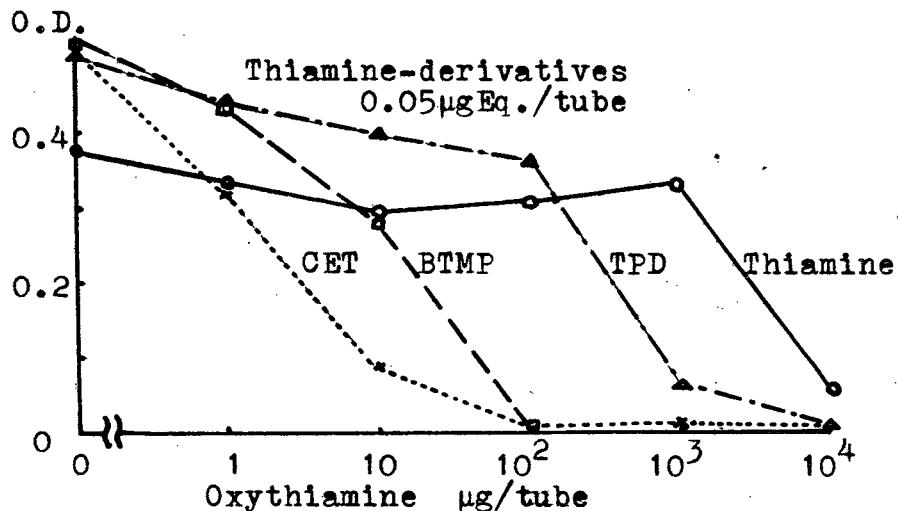


Fig.13 The Inhibition Ratio of Oxythiamine to
Thiamine-derivatives on Kl.apiculata

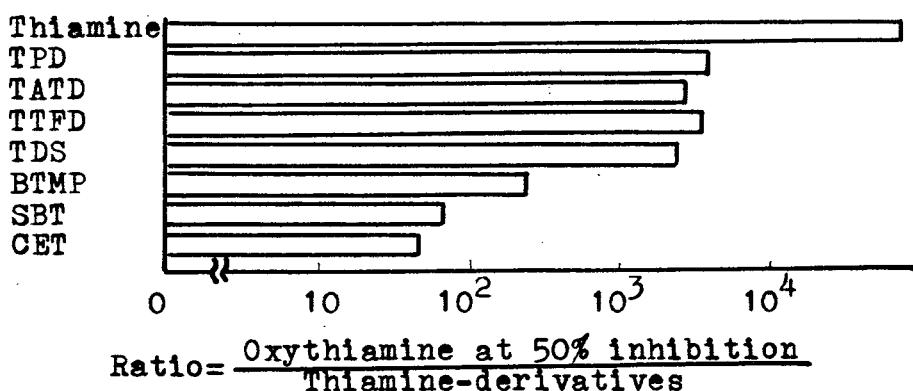


Fig.14 The Influence of Oxythiamine on the Accumulation of Thiamine-derivatives to *Kloeckera apiculata*

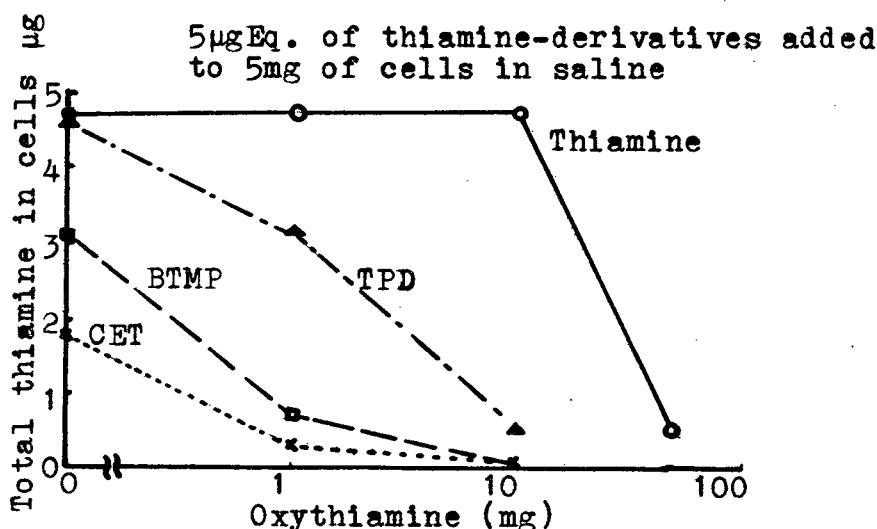
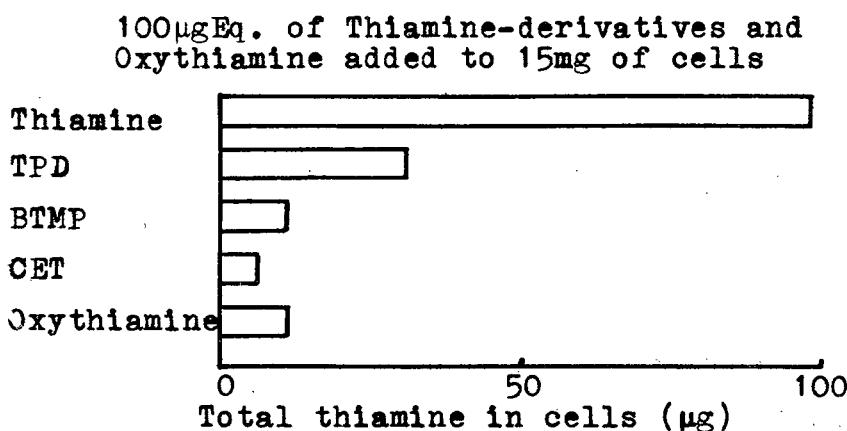


Fig.15 The Accumulation of Thiamine-derivatives and Oxythiamine to *Kloeckera apiculata*



(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であって、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。

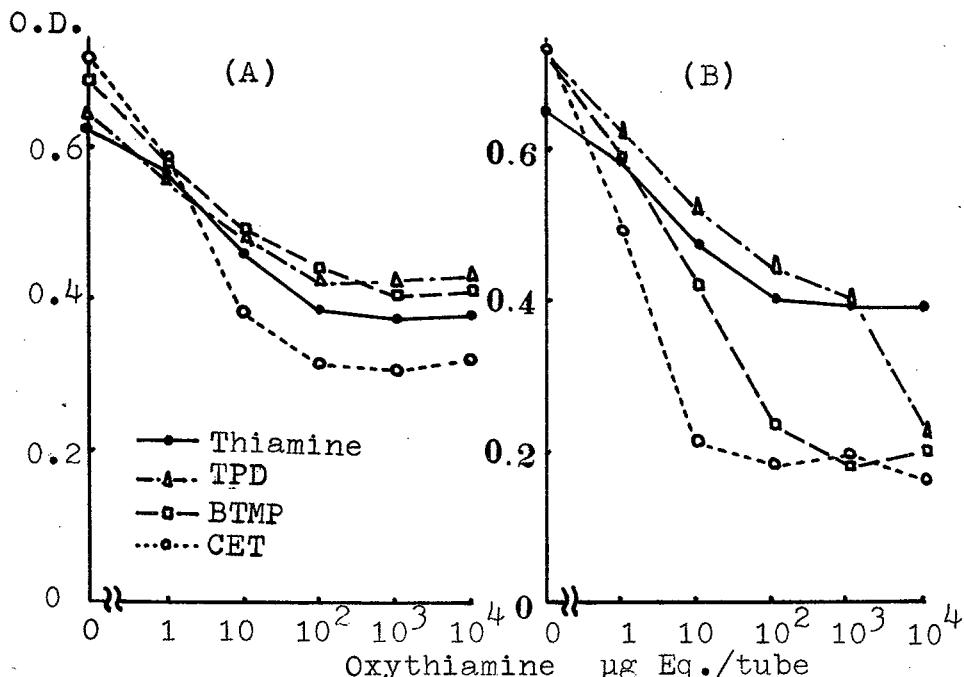
(5) Thiamine 誘導体集積菌の増殖によよぼす Oxythiamine の影響

(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 $\mu\text{g Eq}$ を添加し pH 4.7 , 30 °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 $\mu\text{g Eq}$ 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 °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。したがつて Thiamine 誘導体の増殖促進性にたいする Oxythiamine の影響に差のみられる第 1 の原因は Thiamine 誘導体の菌体による集積によぼす 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 0.05 μg thiamine or its equivalent derivatives

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

第3節 考察ならびに小括

考 察

Thiamine誘導体のうちC E T , T P D およびB T M Pを選んで K1. apiculata における Oxythiamine および Pyritthiamine 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 Pyritthiamine 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 C E T 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 C E T 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。 Thiamine を菌と接触させると Oxythiamine を添加すると Thiamine の集積は 10,000 倍の Oxythiamine の添加によりはじめて阻害されたのにたいして、 Thiamine 誘導体の集積にたいしては Oxythiamine の阻害が容易に現われ、増殖促進性にたいする抑制作用と相関関係がみられた。あらかじめ菌体に Thiamine 誘導体を集積させたのち Oxythiamine を添加して培養したときの阻害をみると T P D , B T M P 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 T P D , B T M P 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 T P D および B T M P 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。 C E T 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 T P D , B T M P のように完全には回復されなかつた。 C E T 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 誘導体の膜透過にたいする影響が考えられる。^{(36)～(39)}

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) Pyritthiamine 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 の場合と同等であつたが、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。したがつて菌体中の 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つた。

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 0.1 N 塩酸にて 15 分間煮沸抽出し抽出液を直接 BrCN-Thiochrome 法にて定量することにより Free thiamine 量を求め、さらに抽出液 1 ml にたいして 1 % タカジアスター B 液 1 ml を 50 °C, pH 4.5, 2 時間作用させたのち定量することによって 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沪紙 No.50 につけ 80% エタノールにて展開した。⁽⁴⁾ 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。上記の沪紙を乾燥後寒天平板上に約 15 分間貼りつけたのち沪紙を取り去り、37°C, 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
		Uracil	2 mg
Glucose	2 g	Salt C*	2 ml
D-Xylose	0.4 g	Ca-Pantothenate	100 μg
Na-Citrate-2H ₂ O	1.0 g	Nicotinic Acid	100 μg
D,L-Tryptophan	0.04 g	Riboflavin	100 μg
L-Cysteine	0.1 g	PABA	200 μg
K ₂ HPO ₄	0.5 g	Pyridoxine-HCl	400 μg
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.1 g	Folic Acid	20 μg
NH ₄ Cl	0.2 g	Biotin	2 μg
Adenine	2 mg		

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 が検出されたのにたいして 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)。したがつて 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度には差がみられないが、 4 $\mu\text{g Eq}$ 添加のとき Thiamine 添加培養菌には多量の Free thiamine が存在していたのにたいして 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ノ酸エステルとして検出された。 40 $\mu\text{g Eq}$ 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

〜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
2 μ g Eq. of thiamine, CET or TPD

	Cultivation time	Growth hours	Thiamine contents	
			Phosphorylated	Free
			μ g	μ g
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

* () : μ g of phosphorylated thiamine/mg of cells

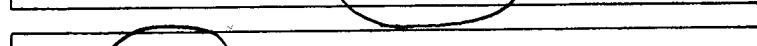
Fig.17 Bioautography of Cell Free Extract of the Cells Cultured with Thiamine, CET or TPD

Standard

Thiamine



TMP



TDP(CoC)

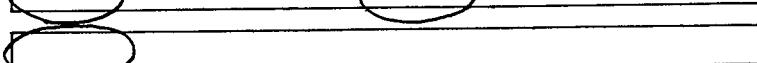


Cell free extract

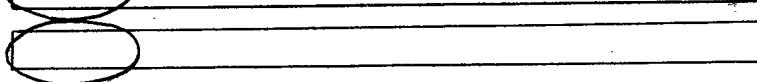
Thiamine



TPD



CET



Rf 0

0.5

1.0

Solvent system : 80% Ethanol

Tab.7

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

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

Tab.8

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

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

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

第2節 考察ならびに小括

考 察

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

小 括

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めたごとく Thiamine 誘導体の微生物によるとりこみは Thiamine にくらべ低い値である。^{(6)(12)～(17)} しかし動物細胞でみられるように Thiamine と Thiamine 誘導体の膜透過機構が異なることは十分予想されることである。酵母が Thiamine を多量に集積する事実は多くの著者により報告されているが、^{(15)(42)～(48)} 集積された Thiamine の存在部位あるいはなぜ多量の Thiamine が集積されるかなど不明の点が多い。また *Kl.apiculata* による Thiamine の集積についての報告は少ないので Thiamine ならびにその誘導体の *Kl.apiculata* による集積について検討した。

第1節 *Kl.apiculata* による Thiamine の集積

実験方法

(1) 菌体中 Thiamine の定量

第2章第2節の方法によつた。

(2) Thiaminase 液の調整

シジミまたはハマグリの貝肉に 6 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を加え摩碎後、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。

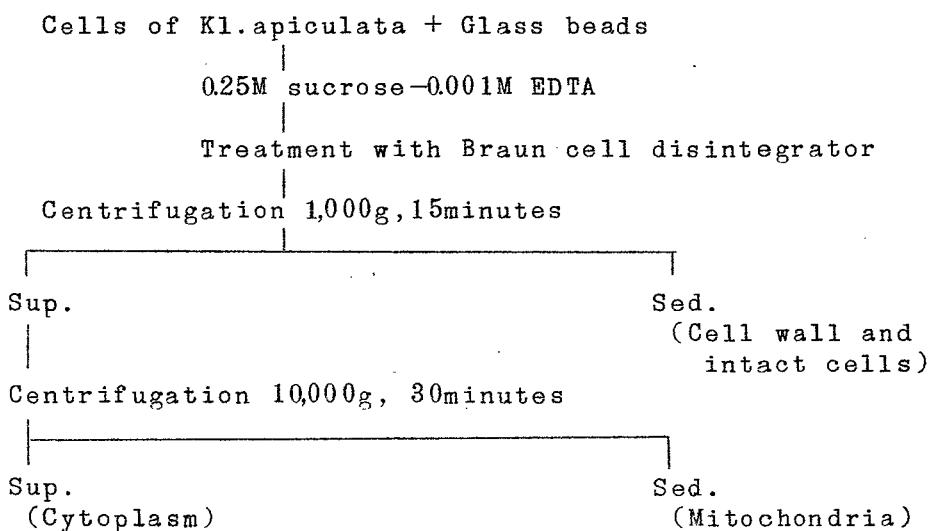
(3) Thiaminase 活性の測定

Thiamineを含む検液に Thiaminase液、0.1M リン酸緩衝液 5 ml および0.01M 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 Tiamine の百分率をもつて Thiaminase にたいする安定度としてあらわした。

(4) 酵母細胞の機械的破壊法ならびに分画法

酵母 300 mg を 0.25M Sucrose - 0.001M EDTA 液 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) MB 染色性細胞数の測定 ⁽⁴⁷⁾

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

(6) 酵母細胞壁溶解酵素

^{(48)~(50)} 照井らにより開発された *Streptomyces albidoflavus* の產生する酵素 H C W (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°C で作用させた。Protoplast 数の測定には Thoma の血球計算盤を用い、総細胞数および水により破壊されない細胞数 (Intact cell) を測定し、両者の差を protoplast 数とした。Protoplast にたいする種々の操作は上記等張塩液中で行なつた。

実験成績

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

Thiamine は増殖に用いる培地中で多量に *Kl.apiculata* により集積されるので培地成分を (Tab. 9) のように分け各成分溶液中の Thiamine 集積量を測定すると PH 4.7 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

(15) (48)

集積を促進する事実は Suzuki, 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 濃度を変化させて 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, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 , MgSO_4 , MnSO_4 , FeCl_3

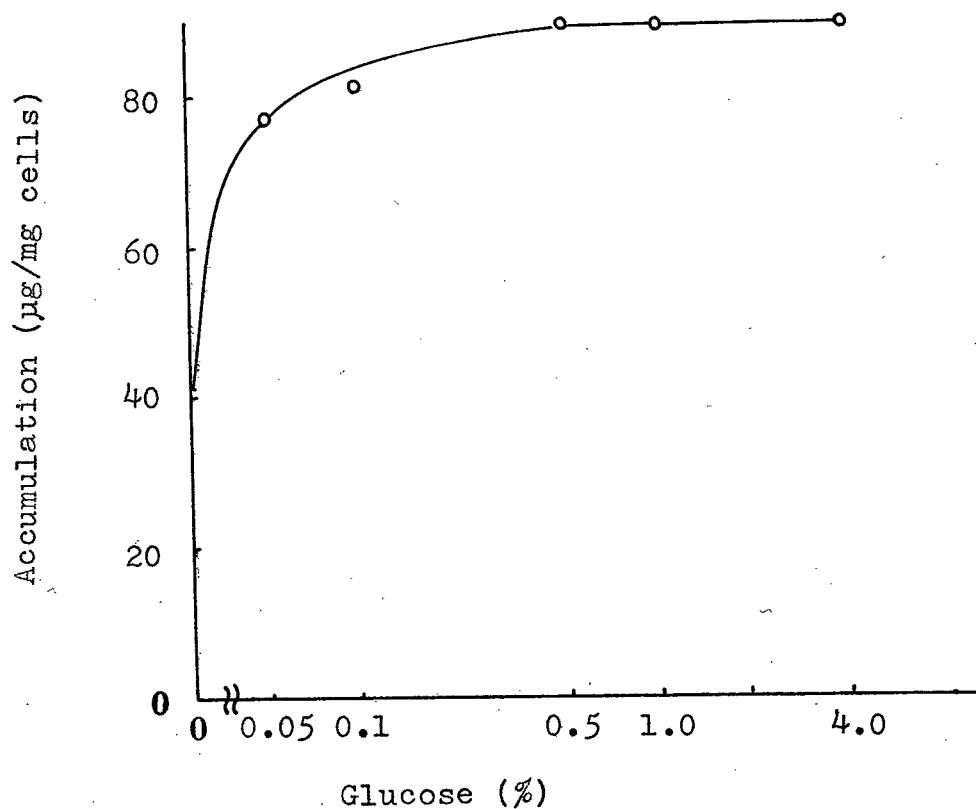
**Hoff-Jorgensen medium(2% Glucose, 0.25% Casamino acids
Inorganic solution, Vitamin solution)

Tab.10 The Accumulation of Thiamine by Kl.apiculata

(2) Influence of pH

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

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



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

(Fig. 20 Tab. 11)

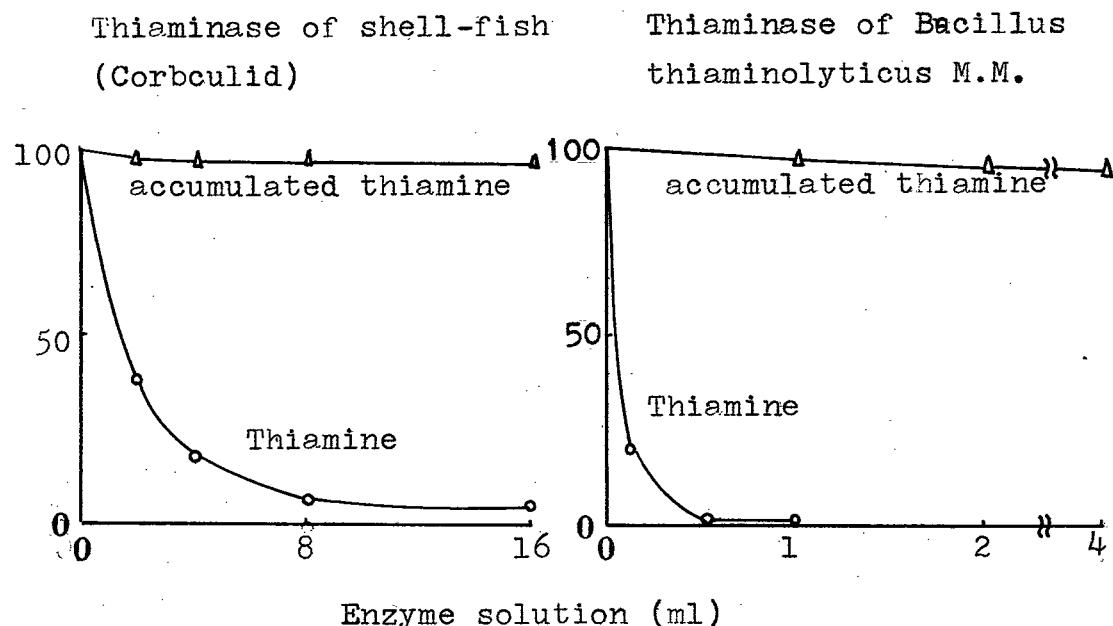
酵母細胞に集積された Thiamine にたいする Thiaminase の影響を検討した。Thiamine を $8\text{--}0.5\ \mu\text{g}$ 集積した *Kl.apiculata* 1mg に Thiaminase 液 $0.1\sim1.6\text{ ml}$ を反応させたのち残存 Thiamine 量を定量し、同時に对照として酵母の存在しない状態で Thiamine $100\ \mu\text{g}$ にたいして同量の Thiaminase を反応させた (Fig. 20)。シジミおよび *B. thiaminolyticus* の Thiaminase によって Thiamine は容易に分解されたが、*Kl.apiculata* により集積された Thiamine はほとんど分解されなかつた。*Saccharomyces carlsbergensis* (IFO 0565) または *Sacch. cerevisiae* (IFO 0305) に集積された Thiamine についても同様な検討を行なつたが、やはり酵母に集積されていない Thiamine が完全に分解される条件で、これらの酵母に集積された Thiamine は分解を受けなかつた (Tab. 11)。

(3) 機械的細胞破壊による Thiamine の溶出 (Fig. 21)

菌体 1 mgあたり $100\ \mu\text{g}$ の Thiamine を集積した *Kl.apiculata* 300 mg を機械的に破壊し、Fig. 18 にしたがつて遠沈分画して各分画の Thiamine 量を測定した。この操作で $1,000\times g$ 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
<i>Kl.apiculata</i>	8.8 µg/mg cells	1 %
<i>Sacch.carlsbergensis</i>	5.1	0
<i>Sacch.cerevisiae</i>	8.1	0
10.0µg of Thiamine		95

Fig. 21

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

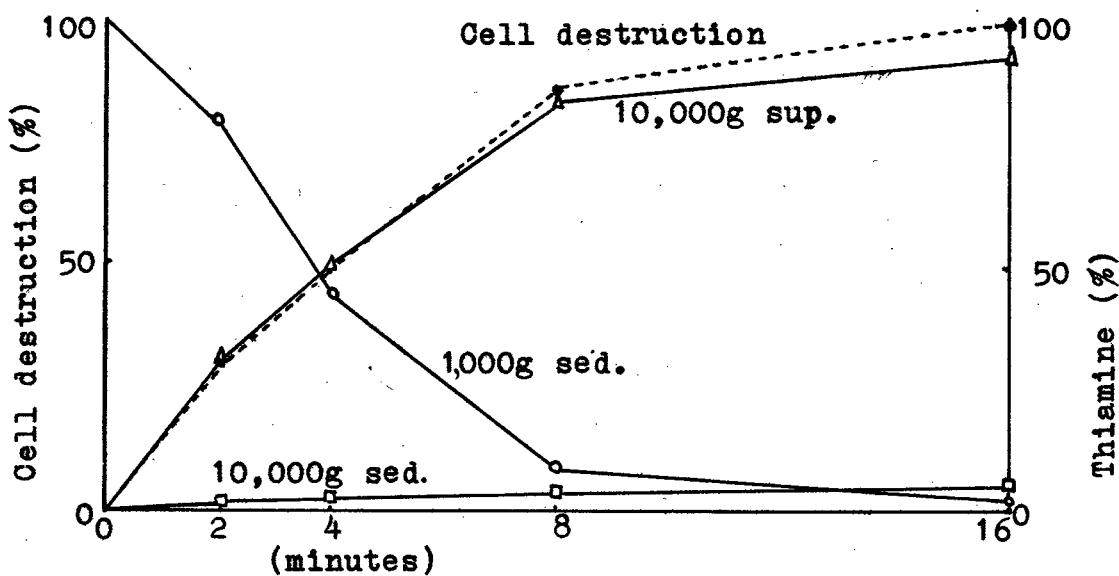
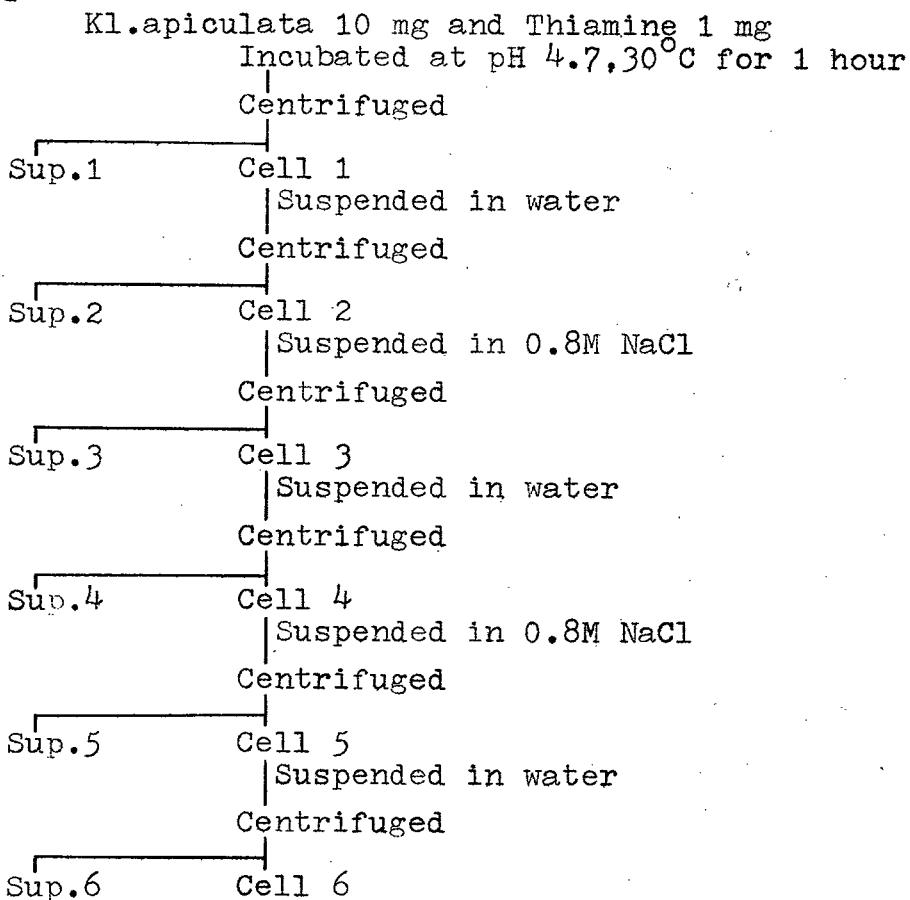


Fig.22



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)

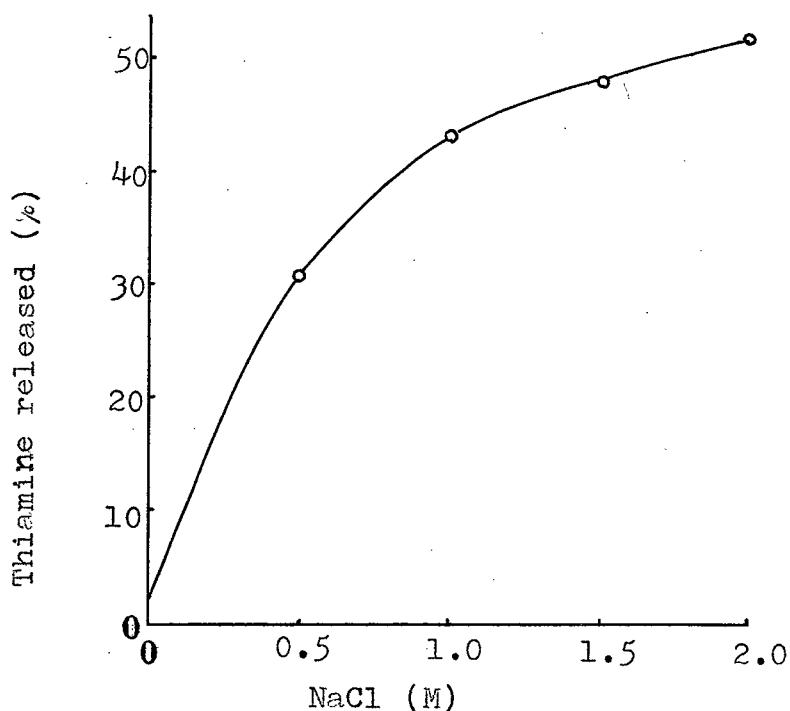
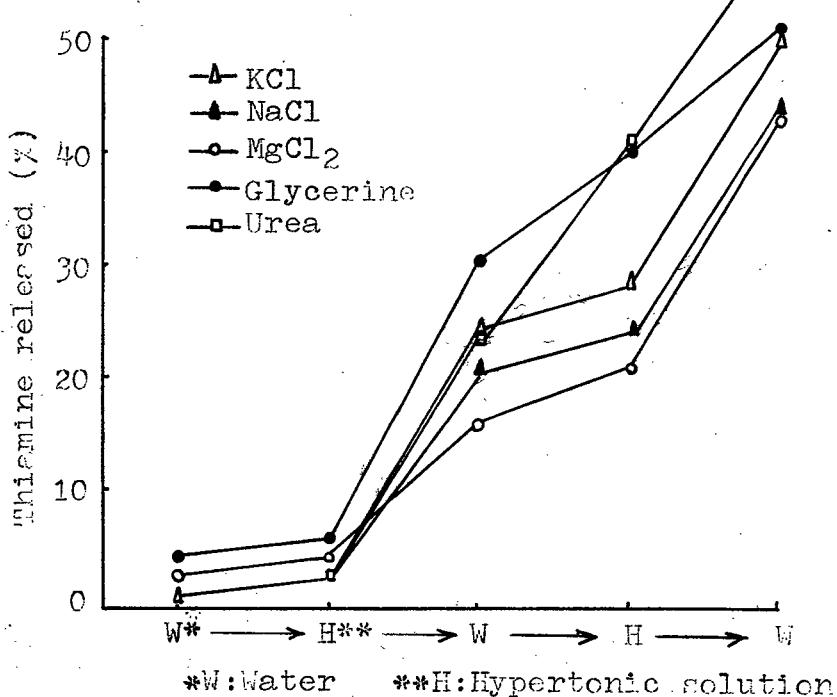


Fig.24 Release of Thiamine from the Cells
by Osmotic Shock (3)



(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、

5,000 rpm 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
50~50
protoplast 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 1 mg 当り 100 µg 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 繼時的に総菌数、 Protoplast 数ならびに上清および菌体中の Thiamine 量を測定した。 30 分の酵素処理で 70%, 2 時間の処理で 98% が Protoplast になり Protoplast の生成にともなつて Thiamine が細胞外に溶出したが、 4 時間後も約 20% の Thiamine が細胞内に残存していた。 総菌数もかなり減少したので上清に検出された Thiamine には Protoplast の破壊によつて溶出した Thiamine も含まれるわけでこの点を考慮して測定直を補正すると Protoplast 中には全集積 Thiamine のうち約 40% が存在したことになる。

(7) Protoplast による Thiamine の集積 (Tab. 13)

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

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

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

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

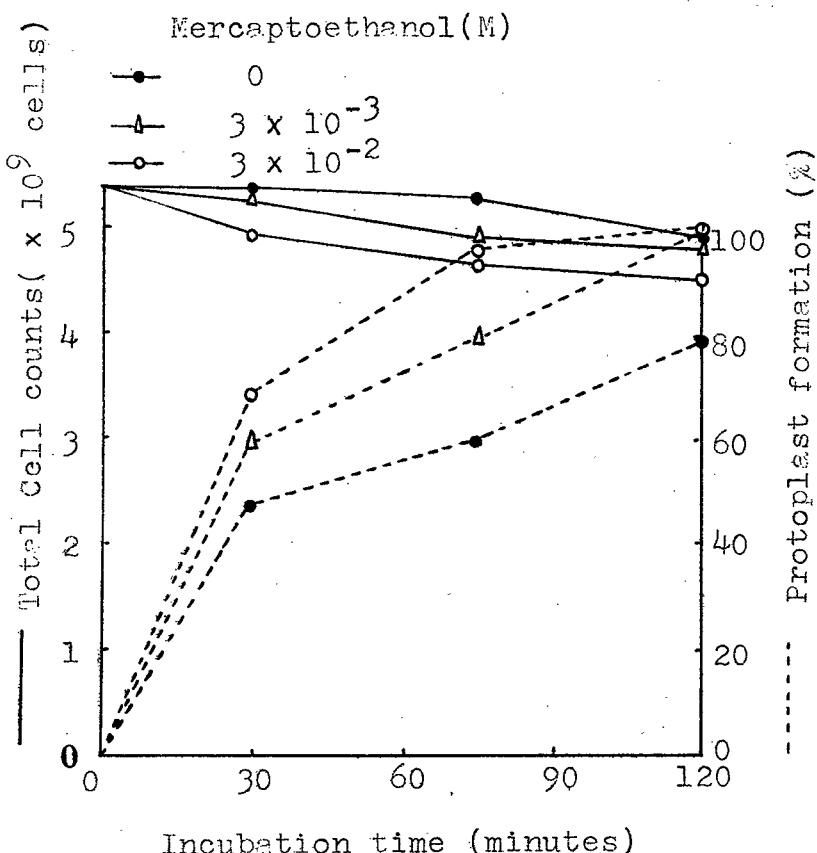
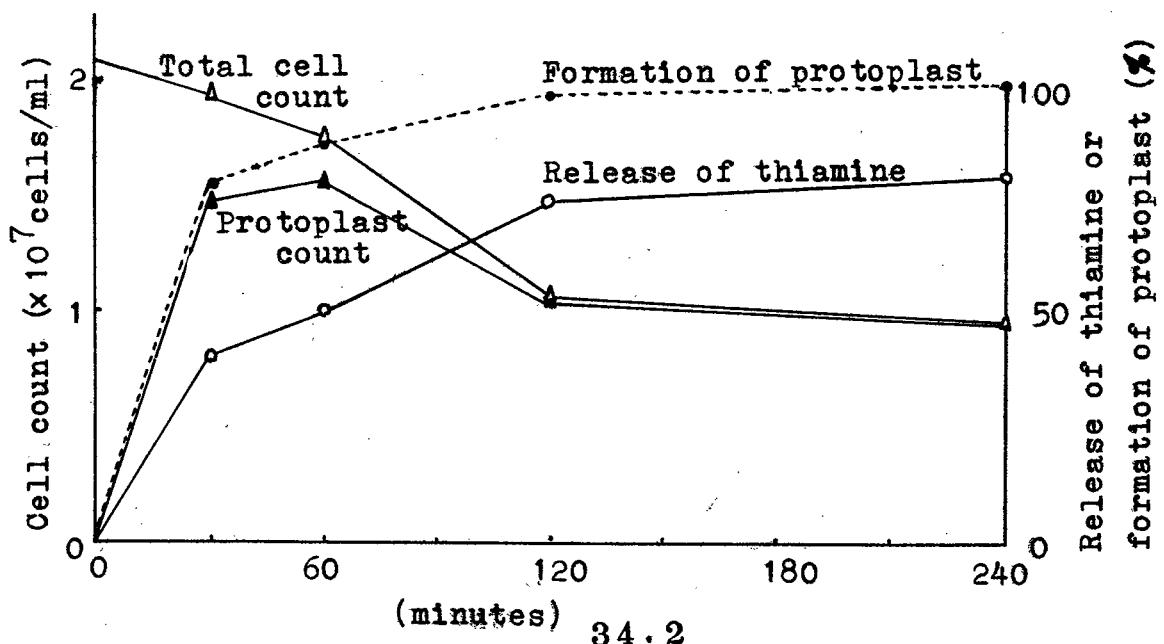


Fig.26

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

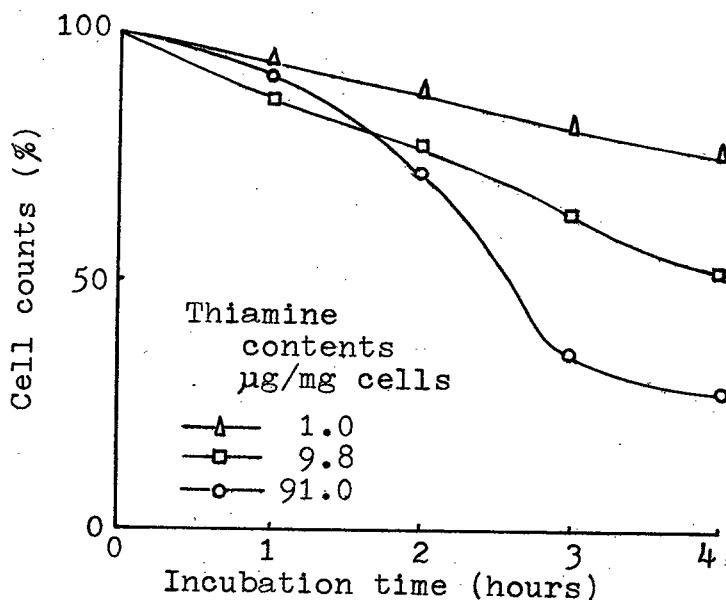


Tab. 13 Accumulation of Thiamine on
Intact cells or Protoplasts

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

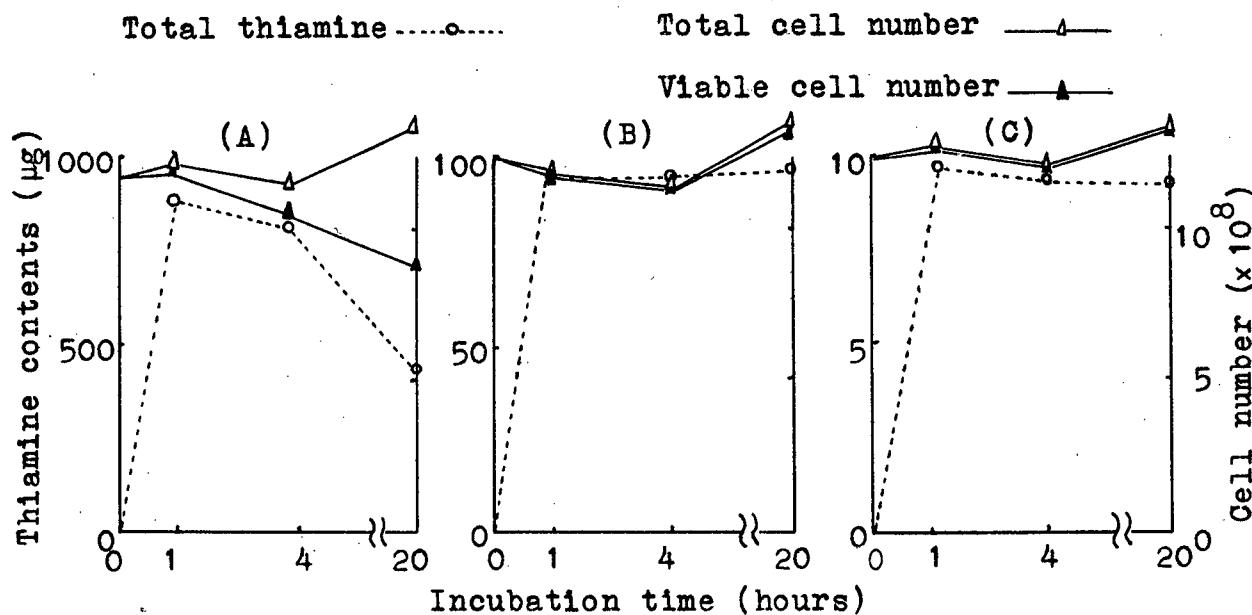


Tab. 14 Release of Thiamine from the Cells Accumulated with Thiamine by the Treatment with Cell Wall Digestive Enzyme

Thiamine contents of intact cells $\mu\text{g}/\text{mg}$ cells	Thiamine released %	Thiamine contents of protoplast %
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 になつてゐ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)

酵母を醸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 の醸酵液 (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 μg 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 μg 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	94.5 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。^{57~59} 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。⁽¹⁷⁾

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⁶⁰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) が含まれる場合にはタカジアスター⁶⁰ゼ処理が不能であるので BrCN-Thiochrome 法における水層の螢光度を測定して TDP 量を求めた。

実験成績

(1) Protoplast または Intact cell による Thiamine,

TDP の集積 (Tab. 16)

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

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

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

Thiamine または TDP の集積におよぼすモリブデン酸ソーダの影響を検討すると Thiamine の集積は $10^{-1}M$ のモリブデン酸塩により若干減少したが、それ以下の濃度ではま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清に多量の 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 100 μg 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 によっ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なわず、毛細管ピペットで上清をできるだけ分離して細胞内含有量を測定する方法もしくは上清 0.05ml を分取してそれに含まれる量を定量し、細胞内含有量を次式により算出する方法によつた。

$$a = 100 - 2b$$

a : 細胞内に含まれる Thiamine, CET もしくは TPD 量
($\mu\text{g Eq}$)

b : 上清 0.05ml 中に含まれる Thiamine, CET もしくは TPD 量
($\mu\text{g Eq}$)

本実験でも Thiamine は Fig. 29 と同様の傾向を示したが、添加量が少ないので Glucose 含有液中では添加された Thiamine がほぼ完全に集積され、 Intact cell と Protoplast による集積量の差があまりみられなかつた。 CET の集積量は Thiamine にくらべると少ないが Fig. 29 の場合よりも増加し、 Glucose の有無あるいは細胞壁の有無にあまり関係なくほぼ一定量すなわち添加量の約 1/3 が細胞内に検出された。 Cysteine 処理またはアルカリ処理を行なつて定量した値 (TPD, CET を含む値) とそれらの処理を省略して得られた値との差から TPD もしくは CET 量を算出して記したが、 CET を添加したときには細胞内にほとんど CET のまま検出されたのにたいして TPD を添加した場合には TPD 自身は細胞内にほとんど検出されなかつた。 すなわち CET はそのままの型で Simple diffusion によつて原形質膜を透過し濃度勾配に平行した細胞内移行量を示すと考えられる。

Fig.29

Accumulation of Thiamine Derivatives by Kl.apiculataCell; 5×10^8 cells, Thiamine derivatives; 500 μ g Eq.

Total volume; 5ml

Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour

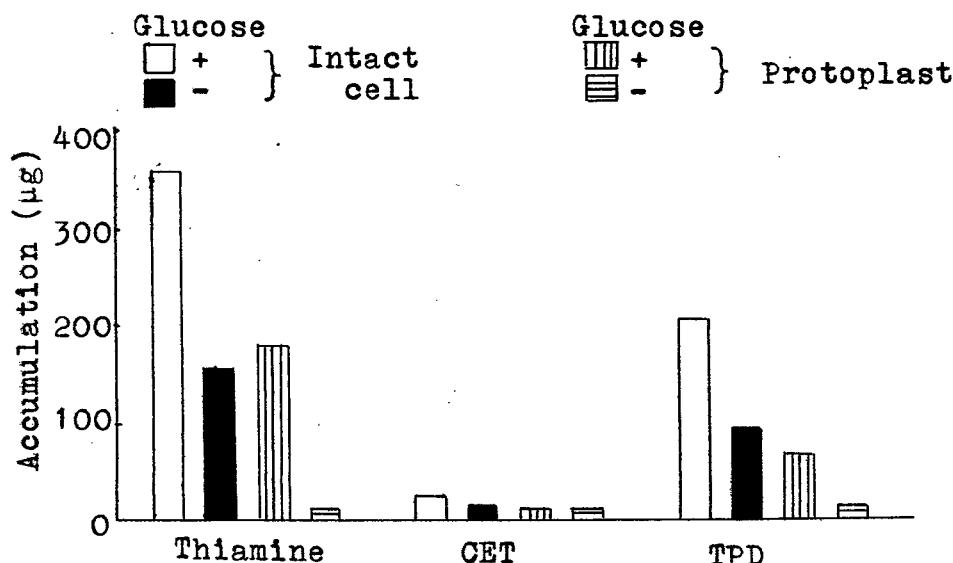


Fig.30

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

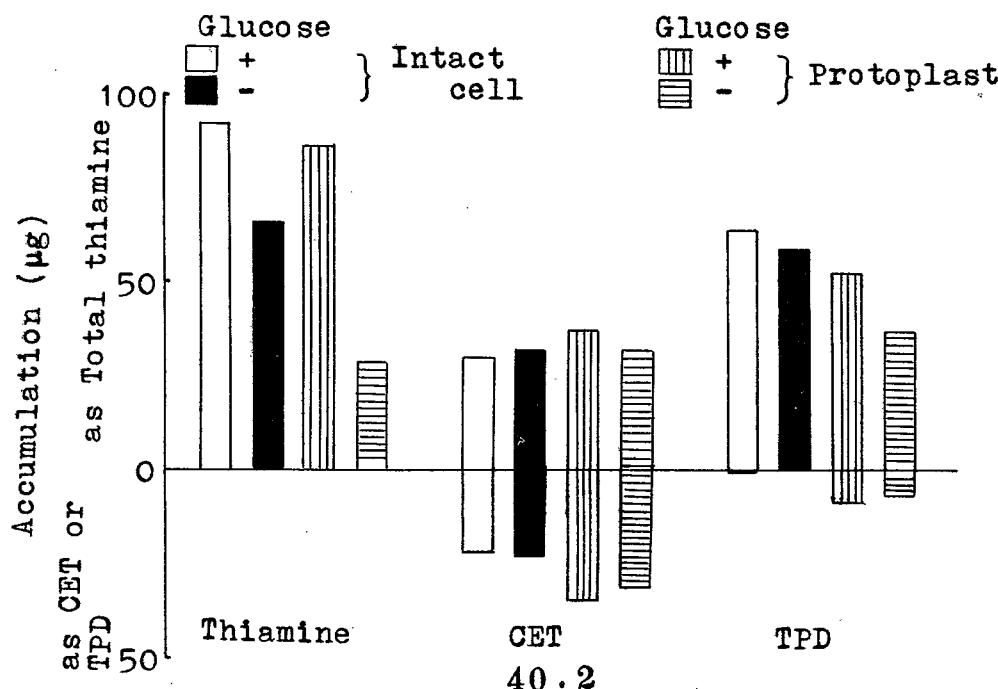


Fig.31 Method for Washing the Cells Accumulated with Thiamine, CET, TPD

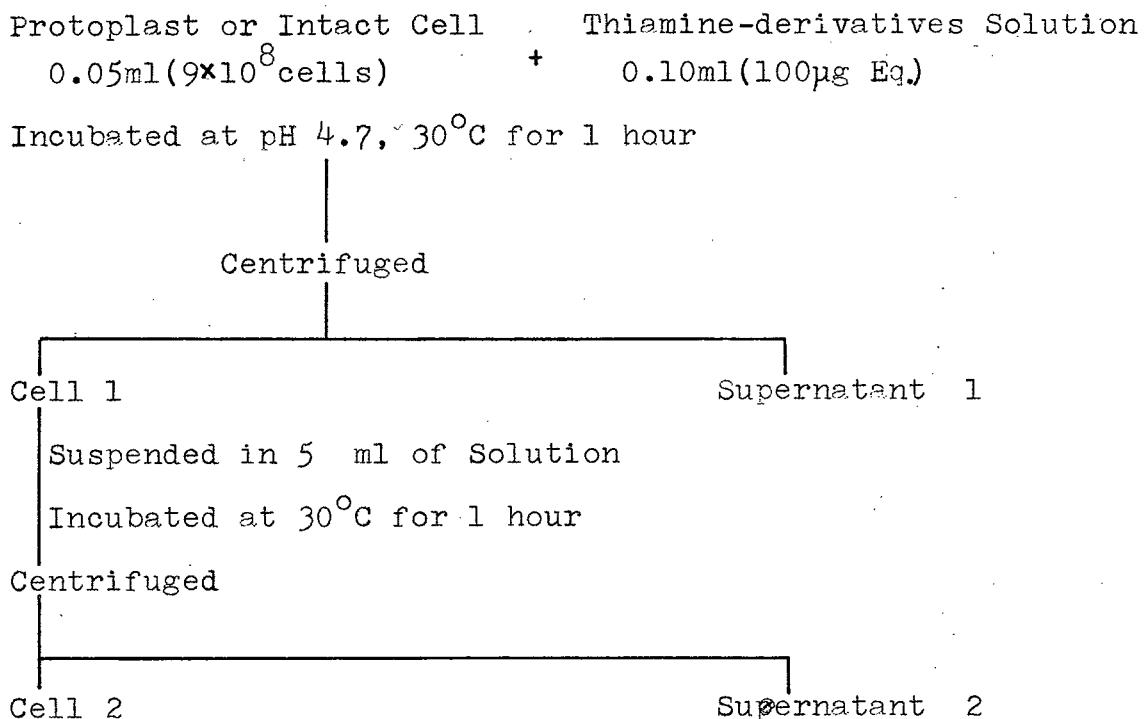
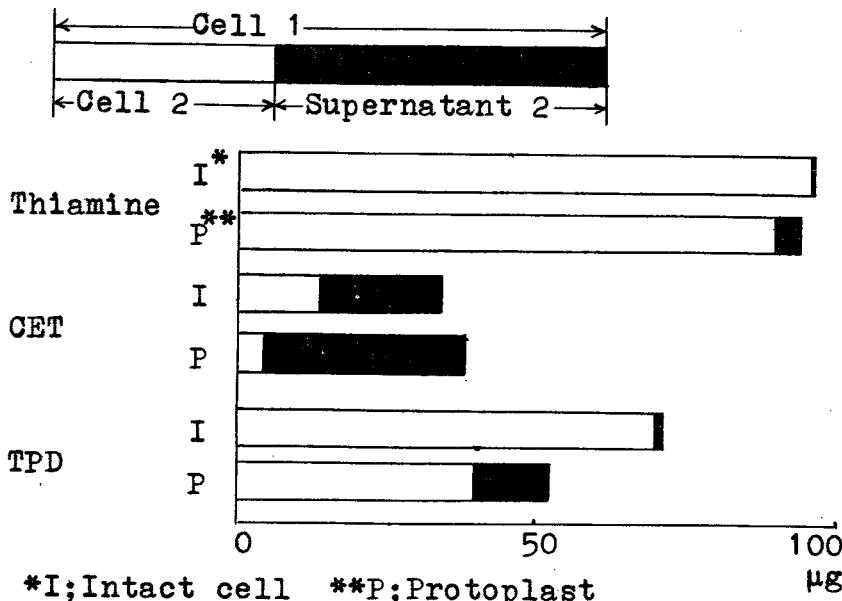


Fig.32 Release of Thiamine or Thiamine-derivatives from
the Cells by the Washing with Isotonic Solution



(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 によっ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 $1/100$ 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。C E T, T P D の場合 Cysteine 处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 T P D 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、C E T 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見分離定量すると 95% が C E T であった。すなわち C E T は Simple diffusion によっ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 T P D は細胞内で容易に Thiamine に変化するため出し得ないのである。

第4節 考察ならびに小括

考 察

第3章でのべたように C E T , T P D 添加培養菌の T D P 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 T D P 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) (43)} を集積した。このように Glucose 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⁽⁶¹⁾ 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 Suomaleinen らはパン酵母中の Thiamine はほとんど原形質内に存在すると報告している。著者の実験でも第 3 章に記したように増殖至適量の Thiamine を添加して培養した菌体の Thiamine は 13 時間後には大部分原形質中に検出された。しかし短時間接触させたときには Tab. 14 に示したように集積量とは無関係にほぼ一定の比率で原形質内と原形質外に Thiamine が存在した。したがつて培養時に添加された Thiamine は容易に菌体に集積されるが、集積されたものはその時点では原形質膜より外側に存在するのみで、その一部がしだいに原形質内に透過すると思われる。原形質膜と細胞壁の間には Acid phosphatase ^{63~69} 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。TDP を添加したときにもこの Phosphatase の作用で TDP は Free thiamine に変化して集積された。また Protoplast の調製によつて Phosphatase を除去するかあるいはモリブデン酸塩によつて Phosphatase を阻害すると TDP は集積されなかつた。この点から考えて酵母に多量の Thiamine が集積されるには Free thiamine の型が必要と思われる。

Thiamine を多量に集積した酵母は異常な状態にあるといふことができ、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 M B 染色菌（死菌）が増し、これから Protoplast を調製すると不安定であつた。これらの事実は多量に集積された Thiamine が直接に原形質膜を害し、あるいは Thiamine が溶出するときにも原形質膜に傷害を与えることを示唆する。

以上のように Thiamine は *Kl.apiculata* により多量に集積されるが、集積された Thiamine の大部分は原形質膜と細胞壁の間に Free thiamine として局在し、集積された Thiamine が 100% 増殖促進に役立つものではない。乳酸菌に Thiamine を添加した場合 Thiamine のとりこみ量は低く、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。⁽⁶⁾

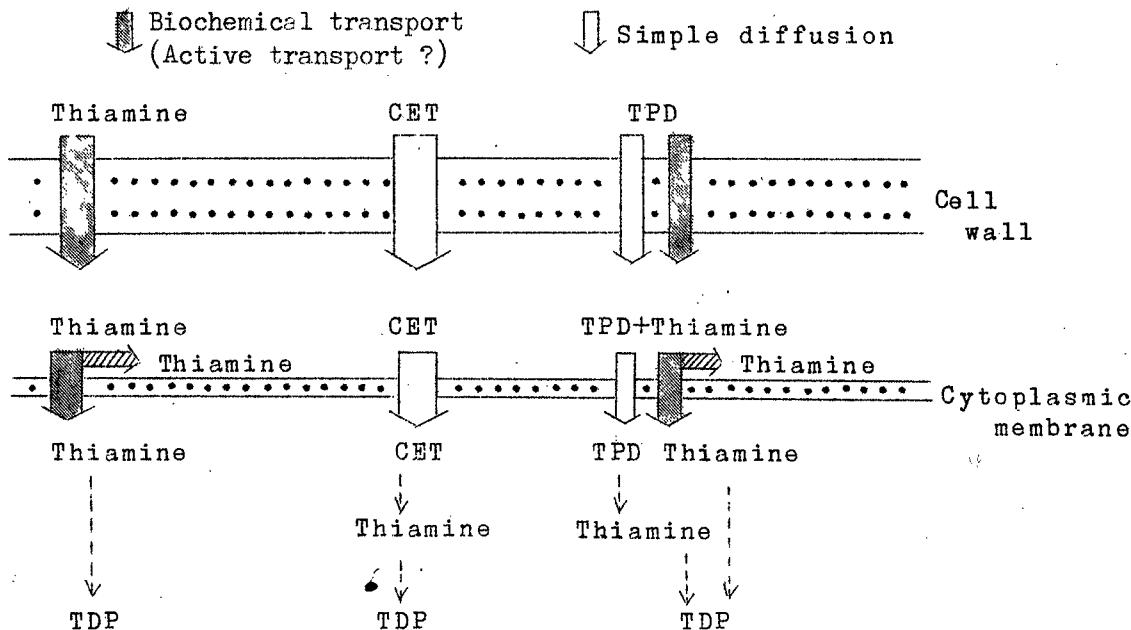
CET および TPD の集積を検討すると大量を短時間添加したとき CET は濃度勾配に比例した細胞内移行量、洗浄による流出、Glucose に無関係なとりこみなどの点から Simple diffusion によって原形質内に移行すると考えられるが、Thiamine にみられたような菌体への異常集積はみとめられなかつた。CET は大量添加したとき短時間では Protoplast 中に大部分 CET のまま検出されることからわかるように容易には Thiamine に変化しないので CET の型で Simple diffusion により膜を透過するのであろう。TPD は CET に比べ Thiamine 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 と共に存するので单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 によっ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 によっ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 によって透過する。このような現象を繰り返すことによっ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、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でき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、長時間の醸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醸酵させたとき 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つた。
- (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ったが、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 とは異なる膜透過機構にあることを証明した。

第5章 総括および結論

第1節 総括

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

(1) Thiamine, C E T および T P D の増殖促進性の比較

C E T および T P D 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。C E T, T P D 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 C E T は Thiamine より強い活性を示すのにたいして T P D は Thiamine と同等の活性を示した。一方培地中で T P D を Cysteine 処理により、また C E T をタカジアスター処理により Thiamine に変化させたのち菌を接種して培養すると T P D は Thiamine より強い活性を示すのにたいして C E T は Thiamine に等しい活性を示した。すなわち C E T は C E T 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、T P D 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 T P D 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 Pyritthiamine および Oxy-thiamine によって Thiamine の場合より強く阻害された。しかし Thiamine またはその誘導体をあらかじめ菌体に集積させたのち Oxythiamine を添加して培養するといずれも同様な阻害曲線が得られた。Thiamine およびその誘導体の集積段階における Oxythiamine の影響の差が増殖阻害の差とな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 (TDP) 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 TDP に変化していたのにたいして Thiamine は一部が増殖に利用され得ない遊離型として存在していた。このように TDP への変化率の差が増殖促進性の差となつてあらわれたのであるが、この差の生じる原因として先にものべたように Thiamine と Thiamine 誘導体の菌体への透過機構に差があると思われる所以につき検討した。

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

TPD および CET の *Kl. apiculata* による集積は Thiamine に比べると非常に低いがごく少量の反応液中で酵母菌体に接触させると CET はほぼ濃度勾配に比例した細胞内移行量を示した。 また細胞内では短時間の接触ではほとんど CET の型のまま検出された。 CET を保有する細胞を

大量の等張液で洗浄すると C E T が細胞外に溶出した。すなわち C E T は Simple diffusion によって原形質膜を透過して内部に入り、洗浄によりふたたび Simple diffusion によって流出したと考えられる。一方 Thiamine または 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 への変化が速やかため原形質内にとじこめられて流出し得ないと考えられる。

第2節 結論

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

- (1) 増殖の経過を同調培養により比較しあるいは増殖各期の菌体中の Thiamine の存在型を Bioautography で検出し、また Antithiamine 化合物と CET または TPD との拮抗を検討した結果 CET は TPD に比べ安定で菌体中に一部 CET として増殖初期に検出されたのみでなく、 TPD に比べ増殖の後期において Thiamine による増殖と差を生じた。
- (2) CET または TPD を添加して培養した菌体には TDP のみが検出されたのにたいして Thiamine を添加して培養した菌体にはかなりの Free thiamine が検出された。 CET と TPD は(1)のような相違を示したが、増殖に有効な TDP への菌体内での変化率が Thiamine より優れている点で両者は一致した態度を示した。
- (3) Thiamine または Thiamine 誘導体を短時間菌体と接触させて集積実験を行なうと、 Thiamine は多量に集積されるが、集積されたもの的一部は原形質膜と細胞壁の間に Free thiamine としてとどまり Protoplast の調製によって溶出する。多量の CET を用いたとき Thiamine に比べ集積が悪いが Simple diffusion によって原形質内に透過し、 TPD は Thiamine と CET の中間的な態度を示す。
- (4) 以上の成績から培養初期の菌体を想定すると CET は菌体に透過した時点では CET の型であるが、大部分が原形質内に透過するので Thiamine を経て TDP に変化するのにたいして、 Thiamine を添加したとき一部は原形質膜と細胞壁の間に Free thiamine として残るため CET を添加す

ると Thiamine を添加したときより高い TDP 含量となり強い増殖促進性となつて現れるものとして説明できる。

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

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

参 考 文 献

- 1) Lilly, V.G., Barnett, H.O., Anderson, B.g.: Science 118, 548 (1953)
- 2) 藤原: ビタミン 21, 477 (1960)
- 3) 川崎、平岡、島本: ビタミン 24, 27 (1961)
- 4) 川崎、山田: ビタミン 28, 290 (1963)
- 5) 川崎、平岡、島本: ビタミン 28, 541 (1963)
- 6) 川崎、市川: ビタミン 投稿中
- 7) J. Suzuoki, T. Suzuoki: J. Biochem. 40, 11 (1953)
- 8) T. Tamaki, Y. Nose: J. Vitaminol. 1, 85 (1955)
- 9) 原田、河野、大良、斎藤、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. Hagiwara: J. Biol. Chem. 241, 1797 (1966)
- 56) Schultz, A.S., L. Atkin, G.N. Frey: J. Am. Chem Soc. 59, 2467 (1973)
- 57) Suomaleinen, H., M. Linko, E. Oura: Biochim. Biophys. Acta 37, 482 (1960)
- 58) McMillan, 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 broths 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 Bi 要求性の酵母 *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630 にたいして Bi-HCl 相当量より強い増殖効果があり、CBT^{*2} は Bi 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⁾。Bi 誘導体は Bi に分解されてから活性を示すのであるから本来は Bi と同等あるいはそれ以下の Bi 活性を示すべきである。CET が *Kl. apiculata* にたいして Bi 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 Bi その他の混在は認められなかつた。

(2) *Kl. apiculata* の培養

Kl. apiculata による Bi 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(pH 4.7) 1 ml を加え、Bi 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つた。

a) 菌体に 0.1M 硫酸 5 ml を加え 5 分間煮沸抽出後 pH 5 に調整し 2% タカジアスター 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 pH 5 に調整し 1% タカジアスター 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 B 液⁴⁾ または アルカリ処理⁵⁾ により CET を Bi 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 Bi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

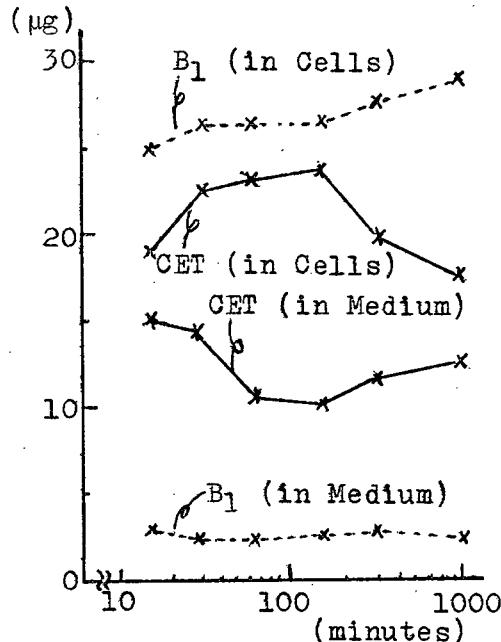
Kjeldahl 法により窒素量を測定し、6.25 を乗じて蛋白質量とした。

実験成績

(1) B₁およびCETその他の*Kl. apiculata*による集積

Bi および CET の 33.7 μg Bi-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%, Bi は 84% が菌体に集積され、CET は 1 ~ 2 時間に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 Bi 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, Bi の集積
添加量 10⁻¹ μモル (33.7 μg Bi-HClE)



*5) Bi-HClE = Bi 塩酸塩相当量

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 Bi は死菌にはまったく集積されなかつた。

(2) CET, CBT および B₁ 集積菌の増殖

前実験において CET は生理食塩水中で *Kl. apiculata* の菌体により集積されたが、この菌体を抽出して PPC を行なうと 2 時間程度の保温では CET が菌体中に残存することを認めた。また上清中には Bi 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 Bi とならず菌体内にとりこまれてから Bi 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 Bi 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 Bi の 10⁻² μモルを 30°C で 30 分間接觸させたところいずれも 95~98% が集積されたので添加量全量が菌体に集積されたとみなした。この菌体を培地 A で希釀して 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 μg Bi-HClE/tube の CET, CBT および Bi の集積菌液として 18 時間静

図 2 CAT および B₁ の集積量の比較
添加量 5 × 10⁻² μモル (16.9 μg Bi-HClE)
30°C, 1 時間保温

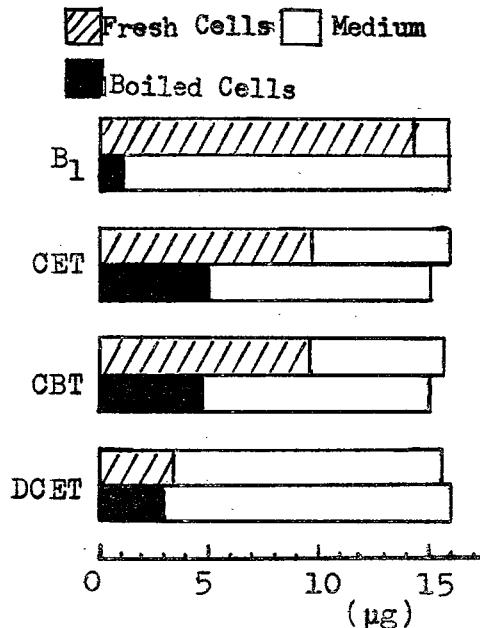
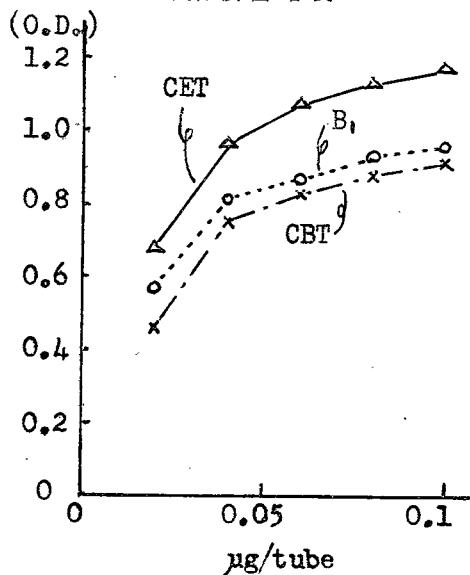
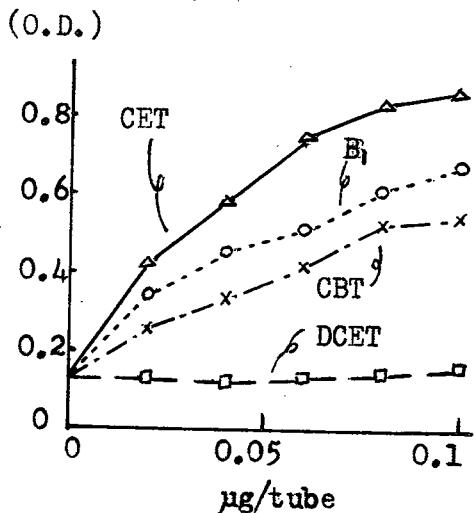


図3 *Kl. apiculata*にたいする活性

(1) 集積菌培養

図4 *Kl. apiculata*にたいする活性

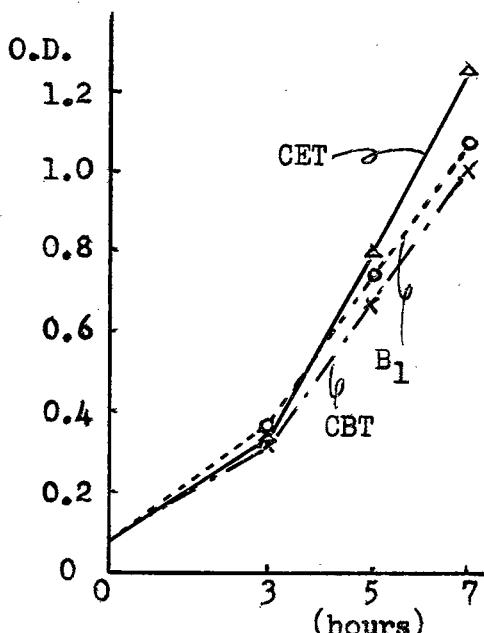
(2) 添加培養



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 Biへの分解速度の差に一因があるのではないかと考え Bioautography により増殖中の菌体内の存在形の検出を試みた。培養初期の菌体について検討するために培養は集積菌の振とう培養(72 rpm)を行ないできるだけ大量の菌体を得た。0, 3, 5, 7 時間後の OD^{*6)}を測定してから(図5)，遠沈して菌体を集め生理食塩水で2回洗浄し 0.1N 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 とともに 5 時間以上の培養ではほぼ完全に Bi 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 Bi に分解したものと思われる。

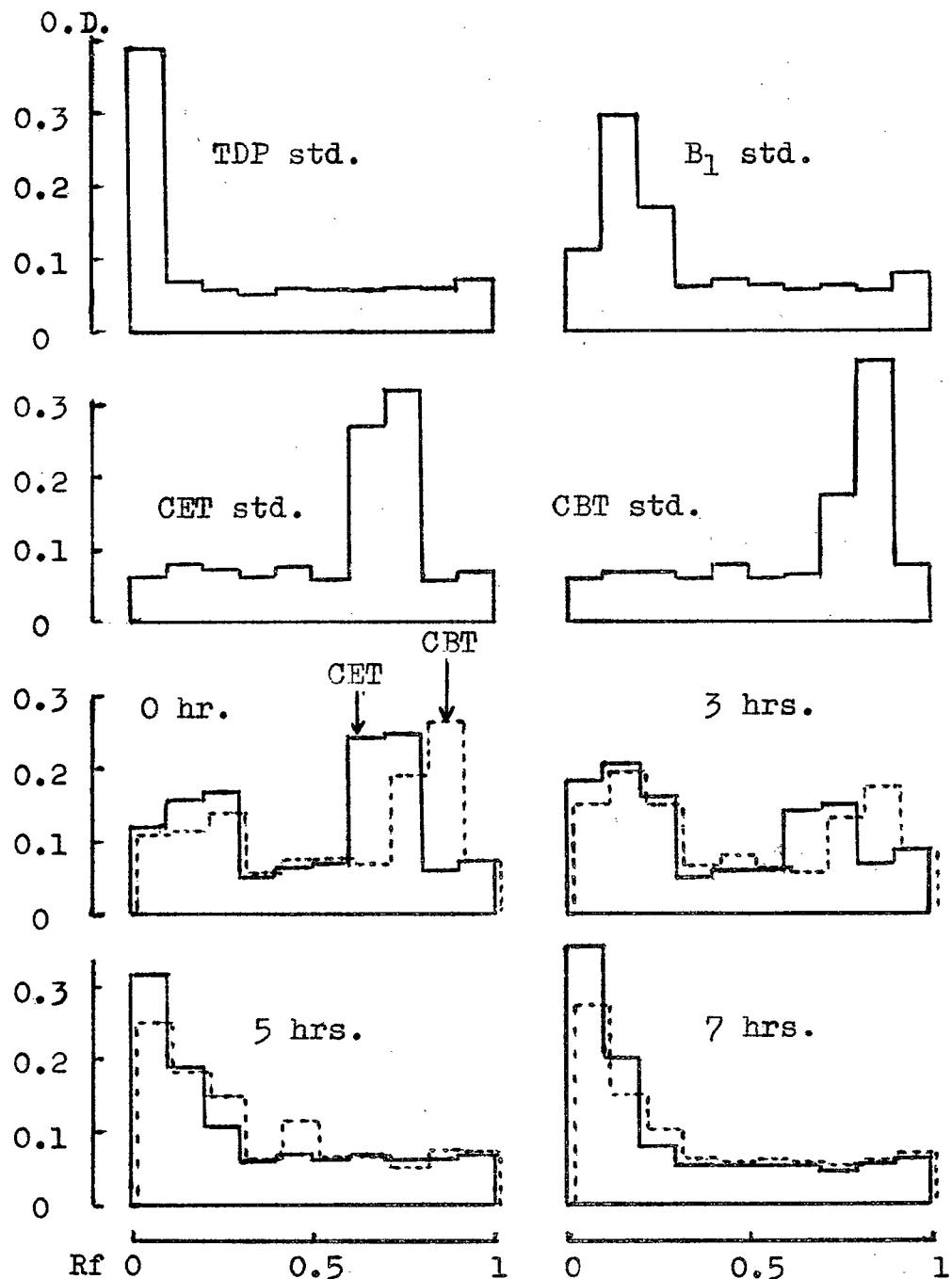
図5 CET, CBT および B_1 集積菌の増殖
添加量 0.1 µg Bi-HClE/tube

(4) 菌体重量および蛋白質量の測定

従来菌の増殖度は 610 m μ 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Bi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Biの0.5μg Bi-HCl Eを含む培地A 40mlに菌を接種し、30°C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量および蛋白質量を測定した(表1)。この結果OD、菌体量および蛋白質量のいずれもCET>Bi>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Bi量の測定

一般に酵母はBiを合成する能力を持つが*Kl. apiculata*のBi合成功がきわめて弱い。CETを添加すると菌のBi合成功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。BiおよびCETの10μg Bi-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Bi量の測定を行なつた。結果は表2に示すとおりBi, CETのいずれを添加して培養してもBi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Bi量はBiを添加したばあいの方が多い。

考 察

増殖後の菌体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、Bi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Bi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Biよりも少なくCBTとほぼ等しかつた。したがつてCETがとくに増殖促進効果が優れているのは菌体への集積が容易であるためとは考え難い。図5, 6においてCETは増殖を開始してからもなお菌体中に存在し、低い増殖促進効果しか示さないCBTと同じ速度でBiに分解されることからCETはBiとしての効果だけでなく、他の増殖促進因子としても働くことが推察される。また増殖後の菌体が含む総Bi量はCET, Bi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Biの合成はほとんど認められなかつた。CETは菌体内でBiに徐々に加水分解されるからCETがBi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所以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Bi誘導体を加え30°Cで放置するときBiは容易に菌体中に集積されるが、CET=CBT>DCETの順で集積されBiに比べるかに量が少ない。菌体を煮沸殺菌するとBi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Biに変化することをBioautographyで証明した。
- 3) CETがBi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、菌体量および蛋白質量の測定によつても確認した。
- 4) 増殖後の菌体が含むBi量はBi, CETいずれを添加したばあいでも添加量にほぼ等しくBiの合成功はき

表1 静置18時間培養後の菌体量および蛋白質量
添加量 0.5μg Bi-HCl E/40ml

	O D	A. 乾燥菌体量 (mg)	B. 総蛋白質量 (mg)	B/A
Bi	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Bi量
添加量 10μg Bi-HCl E/400ml

	O D	A. 乾燥菌体量 (mg)	B. 総 Bi 量 (μg)	B/A
Blank	0.16	21.5	0.62	2.9×10^{-2}
Bi	0.86	168.0	11.51	6.8×10^{-2}
CET	1.14	275.5	11.02	3.9×10^{-2}

わめてはづかである。

5) 以上の知見から CET は Bi₃₊に変化して増殖効果を示すだけでなく増殖初期には CET として菌体に存在するので CET そのものが増殖促進性を有するものと推察される。
(昭38.7.29.受理)

なお終始ご指導下さいました武庫川女子大学岡田幸藏博士に深謝いたします。

文 獻

- 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・稻津・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

(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

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 CARBETHOXYSPIRULINONE AND THIAMINE PROPYLDISULFIDE ON *KLOECKERA APICULATA*

Chikataro KAWASAKI and Sumio SHINODA

School of Pharmacy, Osaka University, Toyonaka

Either carbethoxyspirulinone (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 Bi 要求性酵母 *Kloeckera apiculata* IFO No. 0630 の増殖を Bi-HCl より強く促進する。著者らはこの原因を探るため CET の *Kl. apiculata* にたいする種々の態度を調べ報告した^②。TPD^③ などの非対称型 Bi-disulfide 誘導体は CET と同じく *Kl. apiculata* の増殖を Bi より強く促進する^④。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^⑤ の方法により Hoff-Jørgensen^⑥ 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 610 mμ における濁度 (OD) を測定した。

(2) 試 料

Bi, CET, CBT^⑦ および TPD はすべて塩酸塩を無菌蒸留水に溶かして用いた。

実験成績

(1) タカジアスター処理した CET, CBT および B₁ の活性

CET および CBT はタカジアスターにより Bi に復帰するので^{⑧⑨}、あらかじめタカジアスターの作用により Bi に復帰せしめておいてから菌を接種したばあいの CET および CBT の活性を Bi と比較した。培地 2 ml に CET, CBT または Bi 0.02~0.1 μg Eq^⑩ を加えタカジアスター B 液 (酸性白土処理により Bi を除いたもの) を終濃度 250 mg% 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

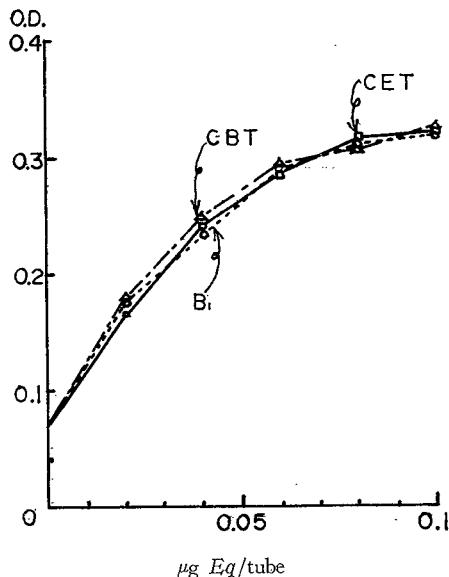
*1) CET = S-Carbethoxyspirulinone

*2) TPD = Thiamine propyldisulfide

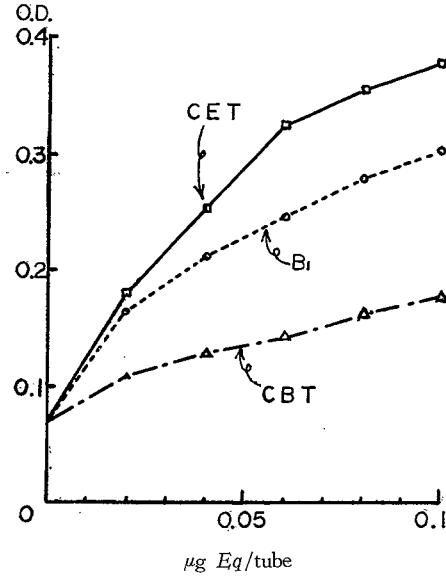
*3) CBT = S-Carbobutoxythiamine

図1 タカジアスターを処理した CET, CBT および Bi の *Kl. apiculata* にたいする活性

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



(b) タカジアスターを処理せずに菌を接種



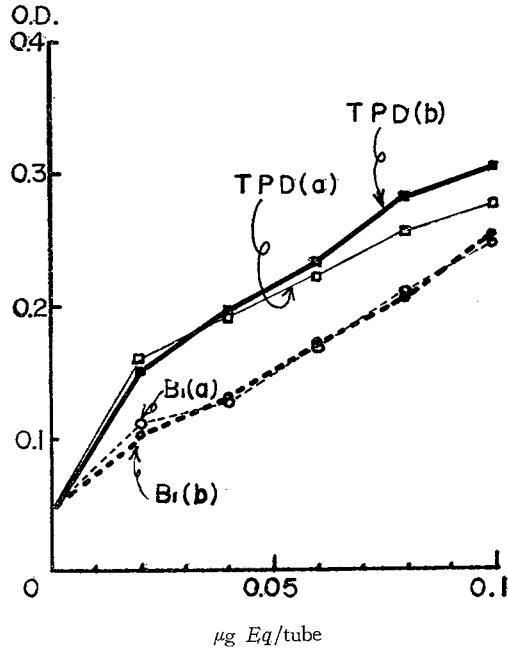
一ゼ中の雑菌を殺すため)し、冷後菌を接種した(図1-a)。また対照は培地にタカジアスターを加え試料を加えず保溫後滅菌し冷後試料を加えて菌を接種した(図1-b)。タカジアスターを処理しないときの活性は CET>Bi>CBT の順となつたがタカジアスターを用いて Bi に復帰せしめておくと 3 者はまったく同じ活性を示した。

(2) システイン処理をした TPD の活性

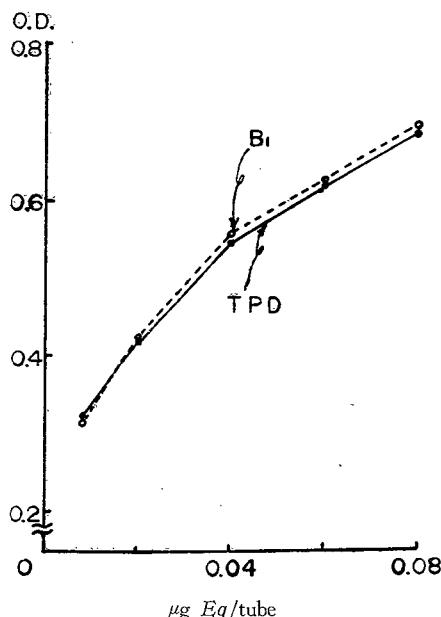
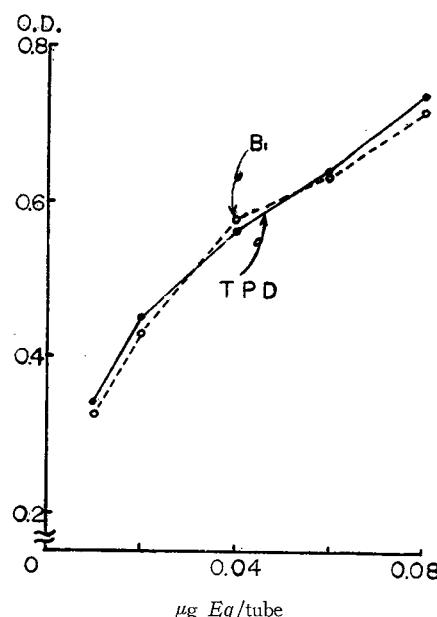
培地 2 ml に CySH*5)-HCl を終濃度 50mg% になるよう加えて滅菌し試料を加えて全量 4 ml として 60°C, 30 分間保溫し TPD を Bi に復帰せしめたのち菌を接種し 30°C, 20 時間培養した(図2-a)。また対照は 60°C, 30 分間の保溫を行なわずに菌を接種した(図2-b)。TPD は CET と異なり菌体外で Bi に復帰していてもなお Bi より高い活性を示した。なお TPD 1 μg Eq について本実験と同条件で CySH 処理を行なつたところ Bi 生成率は 102% であつたので図2-a に示した TPD は CySH 処理で完全に Bi 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。

*4) $\mu\text{g Eq} = \mu\text{g Bi-HCl}$ 相当量

*5) CySH = Cysteine

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

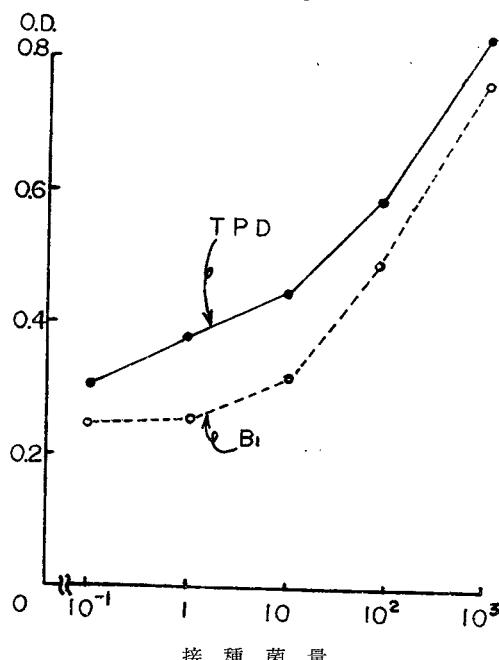
(a) 50mg% CySH 添加培地で 60°C, 30 分処理後菌を接種
 (b) CySH 处理せずに菌を接種

図3 TPD またはB₁を集積した *Kl. apiculata* の増殖(a) 生理食塩水で集積遠沈して菌体を集め
洗浄後培地で希釈(b) 生理食塩水中で集積後遠沈をせず菌体
の生理食塩水懸濁液のまま培地で希釈(3) TPD またはB₁を集積した菌体の増殖

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

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

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

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

において接種菌量の少ないほど TPD と 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 $\mu\text{g Eq}$ を含む培地に通常の接種菌量の 1/10~10³ 倍の菌を接種し 30°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 10~100 倍であつたがこの範囲では TPD は 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 $\mu\text{g Eq}$ を添加し pH 4.7, 30°C で保温し、一定時間後 10% メタリン酸 5 ml を加えて反応を止め、10 分間水浴上で煮沸して菌体中 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 处理、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 B_1 CN 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 $\mu\text{g Eq}$
菌体 : 10mg(乾燥重量)
全量 : 5 ml, 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 Carbethoxy 基が活性に有効であると考えられるが著者の実験成績から Propylmercapto 基は菌体外で、

Carbethoxy 基は菌体内で有効であるといえる。しかしここで注意すべきは CET をタカジアスター β 处理したのち加熱滅菌したこと、もし Carbethoxy 基が加熱操作で揮散してしまうならば上の推論は成り立たない。タカジアスター β 中の雑菌による汚染を防ぐためタカジアスター β 处理後滅菌したが、これは CET 分解酵素を無菌的に作用させて比較することにより解明しうるであろう。逆に生理食塩水中で CET, TPD をとりこんだ菌体を培地で希釀すると 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ひじょうに B_1 に復帰しにくいが培地中で菌が増殖状態にあるとき徐々に B_1 に戻る^{1,2)}。以上のように TPD と CET は *Kl. apiculata* にたいする態度にかなり差がみられ、次報で述べるように B_1 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、それ程異なる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る態度を示した。

(1) CET は菌体外でタカジアスター β 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 は培地で希釀して培養したとき 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 に戻りにくく。

以上のように TPD と CET は *Kl. apiculata* にたいして異なる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・稻津・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 CARBETHOXYSPIRULINONE 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 CARBETHOXITHIAMINE 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 m μ , 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).

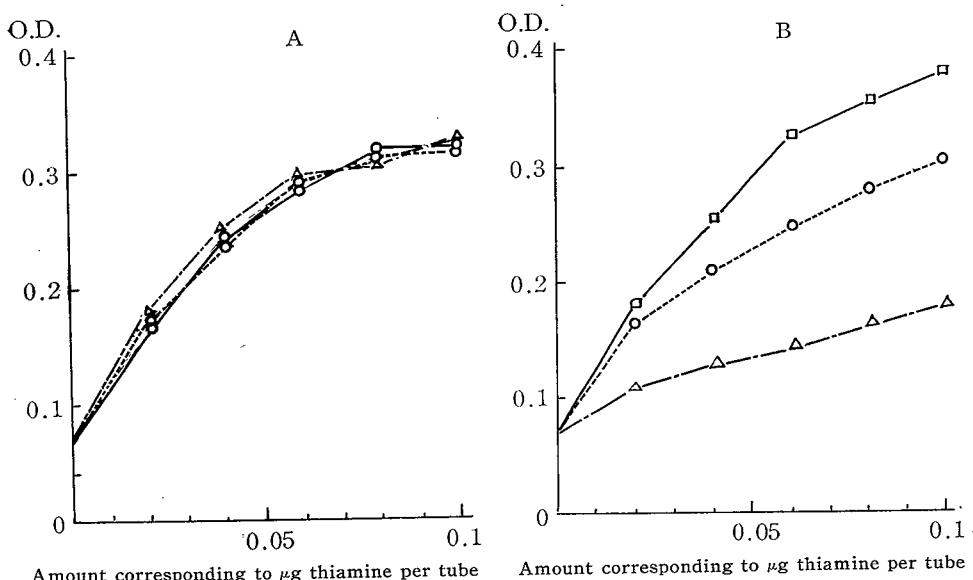


Fig. 1. Activity of CET, CBT and Thiamine after Takadiastase Treatment on the Growth of *K. apiculata*

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

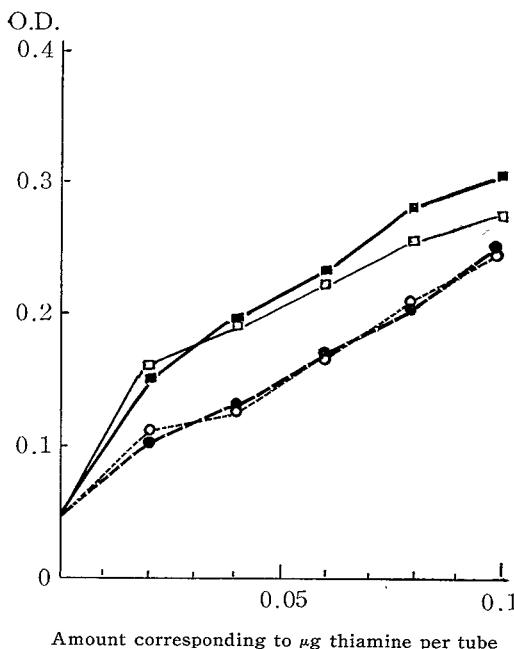


FIG. 2. Activity of TPD and Thiamine Treated with Cysteine on the Growth of *K. apiculata*

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

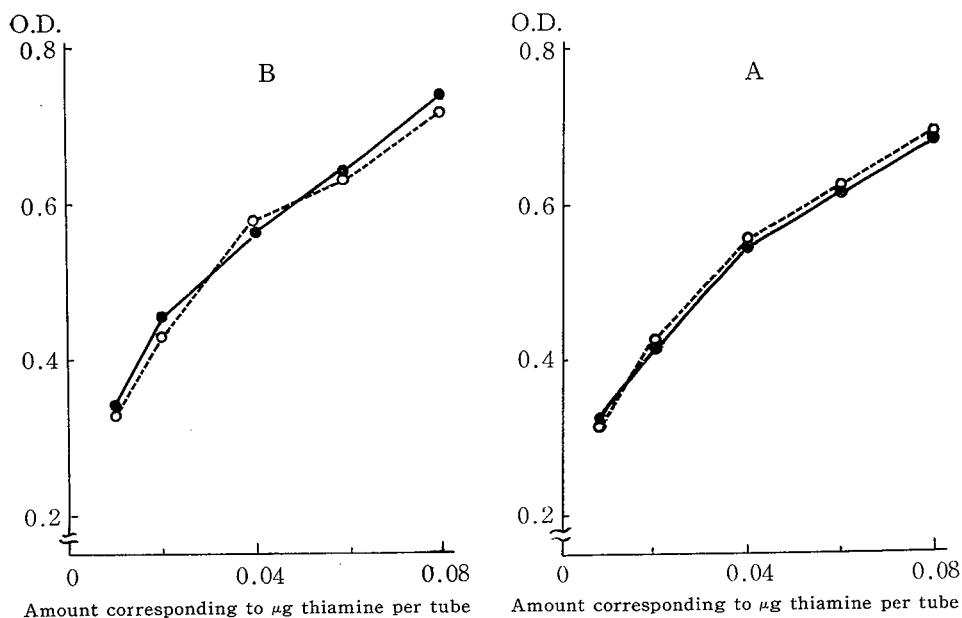


FIG. 3. Growth of *K. apiculata* Accumulated TPD or Thiamine
 A, after accumulation of the vitamin in saline, the cells are collected
 and washed and diluted with the medium
 B, after accumulation of the vitamin in saline, the cells are diluted
 with the medium without centrifugation.
 ○, thiamine; ●, 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 μg thiamine, the cells 0.1 to 10³ 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 μg thiamine and the whole was

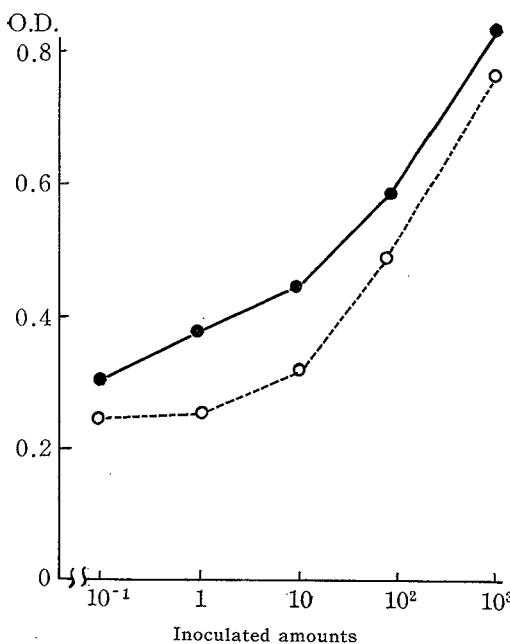


FIG. 4 Activity of TPD and Thiamine on the Growth of *K. apiculata*
(Effects of the Amounts of Inoculated Cells)

Amounts of TPD and thiamine: equivalent to 0.05 µg thiamine per tube.
○, thiamine; ●, TPD.

incubated at pH 4.7 and 30°. After a certain period, the reaction was stopped by addition of 5 ml 10% 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 I
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

(XVII) *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 propyl disulfide (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-B₁¹⁾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 0.05 μg Eq²⁾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°C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 TPD³⁾, BTMP⁴⁾, CET⁵⁾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

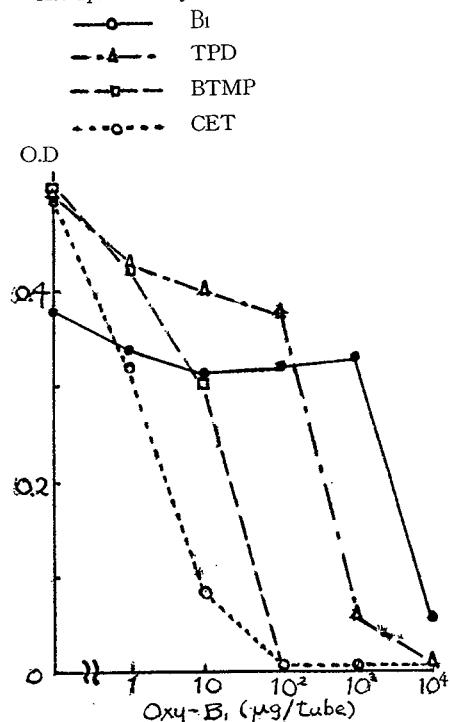
*1) Oxy-B₁=Oxythiamine *2) Eq=Equivalent to thiamine *3) TPD=Thiamine propyl disulfide

*4) BTMP=S-Berzoylthiamine-O-monophosphate *5) CET=S-Carbethoxythiamine

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

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

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



がつて抑制比を計算して表1の結果を得た。

$$\text{抑制比} = \frac{\text{50%の増殖阻害に必要なOxy-B1量}}{\text{BiまたはBi誘導体量}}$$

ここに用いたBi誘導体はすべてBi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Bi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Bi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Bi誘導体よりさらに低い抑制比を示した。

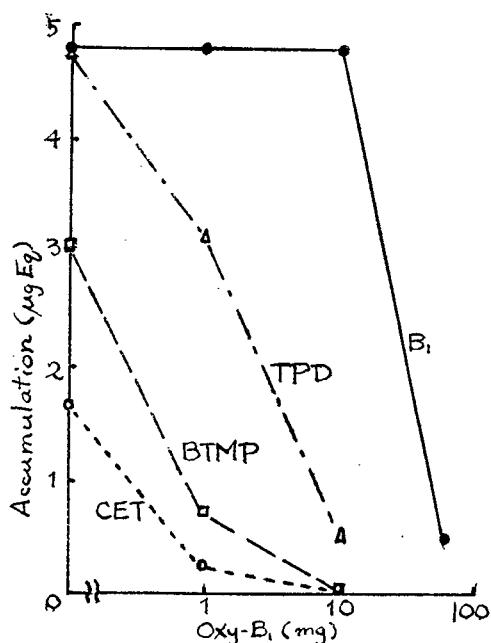
(2) Bi誘導体のBiへの復帰によばす Oxy-B1の影響

Bi誘導体がBiに復帰する過程をOxy-B1が阻害するか否かを知るためつきの実験を行なつた。*Kl. apiculata*のアセトン乾燥菌体を調製し、この30mgにTPDまたはCET 10μg EqおよびOxy-B1 0, 1, 10mgを添加し pH4.7, 30°Cで保温後生成Bi量を測定した。TPDからのBi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つたが、CETからのBi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つた。

(3) Bi誘導体の菌体への集積によばす Oxy-B1の影響

乾燥重量として約5mgに相当する菌体を生理食塩水にけん濁させ、Bi誘導体5μg 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-acetylhydrothioate) disulfide *7) TTFD = Thiamine tetrahydrofurfuryldisulfide

*8) TDS = Thiamine disulfide

*9) SBT = S-Benzoylthiamine

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

	Thiamine	TPD	BTMP	CET	Oxythiamine
Cells	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-チオクロム螢光法で定量した。なお TPD はシステイン処理⁶⁾, BTMP はシステインおよびタカシアスターーゼ処理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 によってはじめて阻害されたのにたいして TPD, BTMP, CET の集積はいずれもより少ない量の Oxy-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 の菌体に培地中に 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 Prebluda 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。

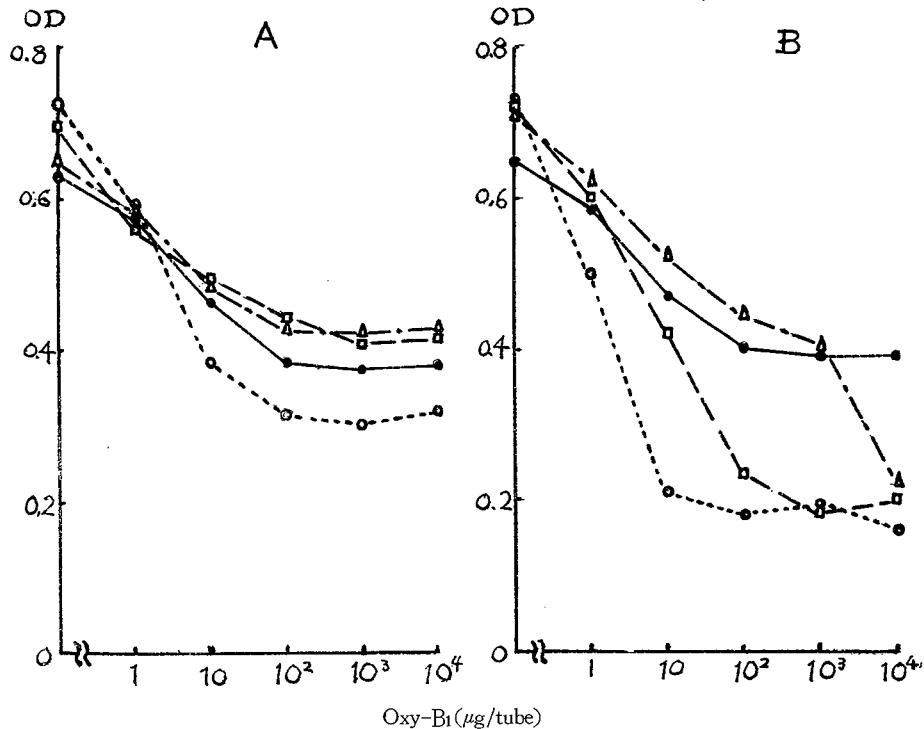
同時に対照として(B)の実験を行なつたが(B)においては集積の操作を行なわず(A)と同一菌量にたいして Oxy-B₁ と B₁ または B₁誘導体を同時に添加した。(B)は図 1 と同じ実験をたんに接種菌量のみを多くして行なつたのであるから本来ならば図 1 と同じ傾向がみられるはずである。Oxy-B₁ による影響の受け方が B₁ < TPD < BTMP < CET の順になるという点では図 1 と図 3-B とは一致した。一方(A)においてはこのような B₁誘導体間の明らかな差は認められず、TPD, BTMP は B₁ と同様な阻害曲線を示したが、CET のみはやや強く Oxy-B₁ により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

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

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

論を出し得なかつた。いずれにしても増殖阻害比の差の 1 つの原因是 B_1 誘導体の菌体による集積にたいする Oxy- B_1 の影響の差といふことができる。

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 μ g の Oxy- B_1 を添加したばあいを比較すると図 1 では B_1 にたいしてなんらの影響を与えないのにたいして図 3-B ではかなりの影響を与える、Oxy- B_1 を添加しないときよりも 増殖度を減少せしめていた。このように大量の菌体を接種したときの方が低濃度の Oxy- B_1 の影響を受け易い原因是不明であるが、1 つの説明としてつぎのようなことが考えられる。表 2 からわかるように Oxy- B_1 の菌体への集積は B_1 にくらべ困難である。1 例として 0.05 μ g の B_1 および 10 μ g の Oxy- B_1 を異なる菌量に添加したとき少ない菌量のばあい B_1 はすべて菌体に集積されるが Oxy- B_1 は B_1 より集積力が弱く添加量も B_1 より多いので一部しか集積されないであらう。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が持つ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つて
いたのであるから菌体量が増せば総集積量は増加し、
単位菌体の持つOxy-B₁量には変化がないであろう。
したがつて単位菌体中の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。

(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・稻津・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⁾に述べるように酵母 *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)と混和後磨碎し遠沈して得られた上清液または *Bacillus thiaminolyticus* Matsukawa et Misawa を普通ブイヨンにて30℃, 3日間振とう培養して得た培養液の遠沈上清をAn I液とした。

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

Goodwin⁹⁾の培地にて30℃, 20時間培養して得た菌体を用いた。

(4) *Kl. apiculata* の培養

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

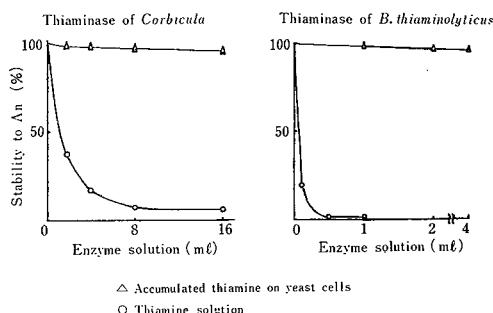
(1) B₁を集積した酵母にたいする An I の

* 1) An = Thiaminase

作用

小野・市川¹²⁾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 μg の B₁ を集積した菌体 1 mg に各量の An 液, 0.01 M ピリシン 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 B₁ 100 μg について同量の 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



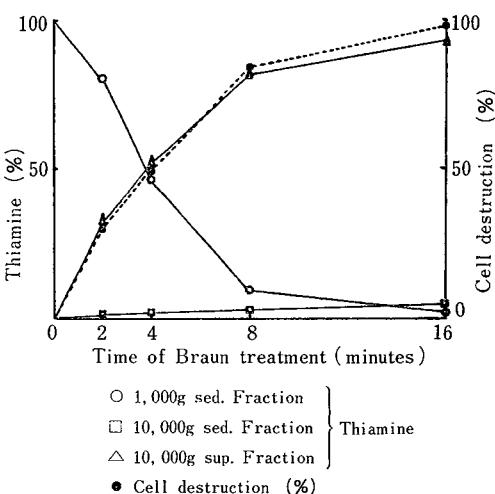
B. thiaminolyticus (M・M) およびシジミの An はともに B₁ を完全に分解する量でも集積された B₁ にはなら作用を示さなかつた。またハマグリの An を用いたときにも同様な結果が得られた。さらに *B. thiaminolyticus* (M・M) の An を *Sacch. cerevisiae* および *Sacch. carlsbergensis* に集積された B₁ に作用させたが B₁ 分解作用を示さなかつた(表 1)。

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 (μg/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 μg/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 × g, 15 分間遠沈しその上清をさらに 10,000 × g, 30 分間遠沈して各画分の B₁ 量を測定した(図 2)。

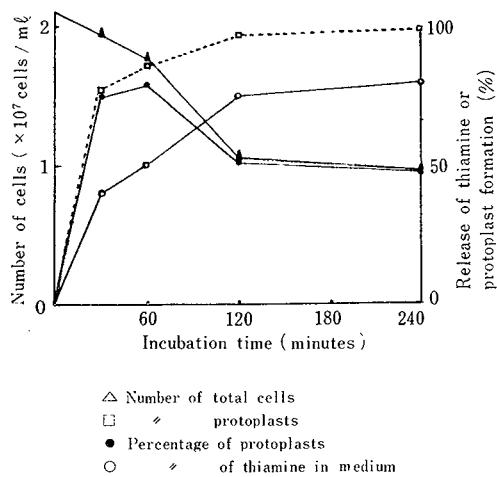
1,000 × g 沈渣は未破壊の細胞および細胞壁の画分であるが 16 分間の処理で細胞を完全に破壊したときこの細胞画分には B₁ はほとんど存在しなかつた。10,000 × g 沈渣はミトコンドリア画分と考えられるがこの画分にも B₁ は存在せず、B₁ は 16 分の処理後にはすべて 10,000 × g 上清に認められた。この画分を疏安、アセトン、トリクロロ酢酸で除たんぱくすると B₁ はほとんどこの上清に認められた。すなわち集積された B₁ は細胞内で細胞壁や顆粒成分、たんぱく質などに結合して存在するのではないかと考えられる。

(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 μg/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 で作用させ経時に反応液の一部を取り総細胞数、 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になつた2時間後にも約20%のB₁が細胞中に残存していた。このとき総細胞数もかなり減少したので上清中に検出されたB₁のなかには細胞の破壊によつて溶出したB₁も含まれるわけでこの値を補正すると約40%のB₁がProtoplast中に存在したことになる。

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



(4) 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組合せにおいても90%以上がProtoplastになつていたので図には総細胞数のみを記した。B₁集積量の多いほど総細胞数の減少は顕著であつた。多量に集積されたB₁は原形質膜になんらかの傷害を与えていると思われる。

(5) 渗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、正常細胞に同様な渗透圧

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

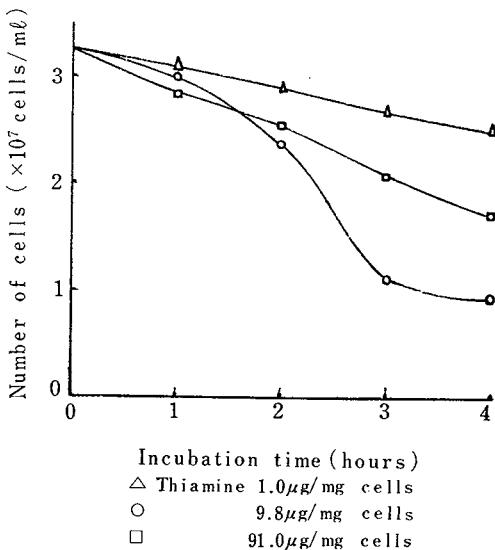


Table 2 Release of thiamine from cells of *Kl. apiculata* by osmotic shock

Thiamine accumulated : 98 μg/mg

Process of osmotic shock	Water → 0.8M NaCl → Water → 0.8M NaCl → Water				
	1	2.7	15.3	20.1	35.3%*
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。以上の操作のうち遠沈上清中の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MB²⁾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回の渗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
(B)	Cell counts ($\times 10^9$)	Total	1.24	1.14	1.38
		Viable*	1.22	1.07	0.96
(C)	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
	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Bi溶出量の比率は死菌の比率を上回わつた。滲透圧変化の差は大きいほどBi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Bi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 Bi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Bi量の変化

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

10, 100 μ gのBiを添加したとき 総 Bi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Bi量はだいに増加した。1,000 μ gのBiを添加したとき集積Bi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Bi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Biの比率の方が上回わつた。表には記さなかつたがさらに保温を続けると48時間には

Bi 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Bi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Bi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Biの大半が細胞外に溶出した。したがつて集積されたBi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Biが貝類Anにより分解されると報告し酵母に集積されたBi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Bi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Bi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Bi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Biが細胞壁表面に付着しているとは考えられない。Biを集積した酵母を機械的に破壊するとBi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Biは認められなかつた。以上の知見から集積されたBi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 Bi₁を保有する能力を持ち、Protoplast 中のBi₁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Bi₁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Bi₁が溶出し、一部は破壊されずBi₁が残存して Protoplast 中に検出されたのかも知れない。短時間のBi₁との接触により集積されたBi₁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Bi₁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Suomalainen³⁾はパン酵母のBi₁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Bi₁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合成したものと考えられ培地中に添加したBi₁を集積したばかりをおのづから異なるであろう。現在酵母の集積Bi₁について電子顕微鏡による Radioautographyを検討中であり追つて報告したい。

酵母に集積されたBi₁はほとんど遊離型であるが、著者らの実験ではBi₁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Bi₁集積酵母を脱水したときBi₁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するものである。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Bi₁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

Bi₁を多量に集積した *Kl. apiculata* にたいして以下のようないくつかの処理を行ないBi₁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Bi₁は分解されなかつた。
- (2) Braun 細胞破壊機にて破壊するとBi₁は可溶成分中にのみ見出され、除たんぱく操作後もBi₁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Bi₁が細胞外に溶出し、Bi₁を多量に集積した酵母から得られた Protoplast ほど 安定性が低かつた。
- (4) 高張→低張の滲透圧変化を与えるとBi₁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Bi₁を集積した酵母ではBi₁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 Bi₁の大部分は原形質膜もしくは原形質膜と細胞壁の間に遊離の型で局在すると推定される。

(昭42. 9. 27. 受理)

文献

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

ビタミン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

大阪大学農学部衛生化学教室

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-Carbethoxythiamine (CET) and thiamine propyl disulfide (TPD) stimulated the growth of the yeast more strongly than thiamine but the both were absorbed on cells to the less extent than thiamine. *Kl. apiculata*, however, when inoculated in the broth containing 2 μg 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-Carbethoxythiamine

*2) TPD=Thiamine propyl disulfide

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4mlに1%タカシアスターZ B液1mlを加え50°C、2時間保温したのちBrCN-Thc^{*3)}法にてB₁量を測定した。なおCETを添加したものについてはタカシアスターZ処理前にアルカリ処理⁵⁾、TPDを添加したものについてはシスティン処理⁶⁾を行なつた。

(5) *Kl. apiculata*のProtoplastの調製

対数増殖期にある菌体(OD 0.250になるよう菌を接種し30°C、3時間振とう培養して得た菌体)を終濃度0.8M NaCl、0.05M MgSO₄、0.003M 2-Mercaptoethanolおよび0.03M 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になつた。なおProtoplastの判定は細胞を水にけん渾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0.8M NaCl・0.05M 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 ^{*3)}
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) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 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B₁ 1mg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つた。

(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0.01Mのケン酸緩衝液により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 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mg}$ を示し以後は減少してpH 7.4では10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ となつた。

(3) B₁の集積におよぼすグルコース濃度の影響

ケン酸緩衝液により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つた。

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

5×10^8 個の正常細胞またはProtoplastに等張塩液中B₁, CET, TPD 500 μg , Eq^{*4)}を添加し pH 4.7, 全量5ml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 : 5×10^8 cells, Thiamine derivatives : 500 μg Eq, Total volume : 5ml
Incubated at pH 4.7, 30°C for 1 hour

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

* μg for 5×10^8 cells

*3) Thc=Thiochrome

*4) Eq=Equivalent to thiamine

(5) 正常細胞およびProtoplastによる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 Bi 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、上清ができるだけ完全に毛細管ピペットで吸い取るか、もしくは森田らがDCETの赤血球移行量の測定に用いた手技⁷⁾により B₁または Bi 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 Bi 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 × 10⁸cells)
Thiamine derivatives : 100μg 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	
	+	-	+	-
Thiamine	92μg	66μg	87μg	29μg
CET	30 (22)*	32 (23)	37 (35)	29 (31)
TPD	64 (1)**	59 (0)	52 (9)	37 (7)

* Thiamine as CET ** Thiamine as TPD

(6) 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

ば菌体内的 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 Bi 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 Bi 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 ののはあいほとんど洗浄による流出は認められなかつかが 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

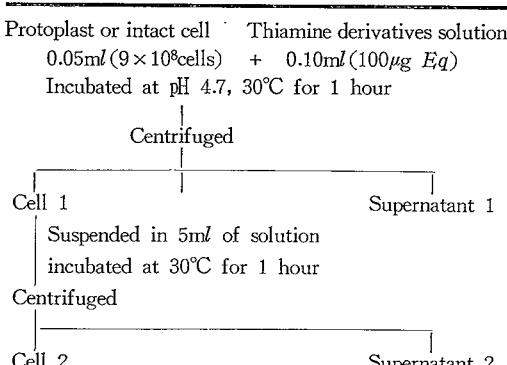
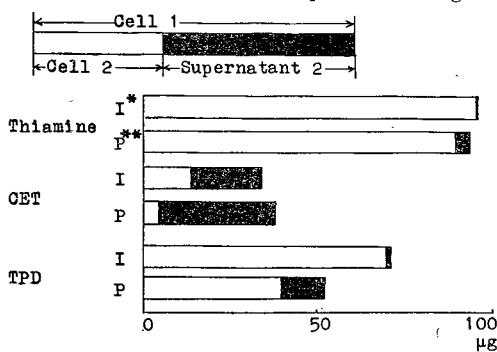


Fig. 2 Release of thiamine or thiamine derivatives from the cells by the washing with isotonic solution in the procedure of Fig. 1



*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 TDP⁵⁾ を添加したときにも遊離型として集積される。酵母の Acid-Pase⁶⁾ 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 になると除去される。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Bi, TDP 1 mgを添加し、2%グルコースを含む等張塩液中でpH4.7, 30°C, 1時間保温後集積Bi量を測定すると表4のように正常細胞ではBiとTDPの集積量はほぼ等しいが、Protoplast ではTDPはBi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

** Values in bracket are free thiamine

またBi, 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った。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%であった。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Biに変化して集積され上清中に残存するものもBi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 Bi の集積は全く阻害されないのでたいていして 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 $100 \mu\text{g Eq}$ of thiamine or TDP in 2% glucose solution at pH 4.7, 30°C for 1 hour

Conc. of Na-molybdtc	Thiamine		TDP	
	Sup.	Cells	Sup.	Cells
M	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)

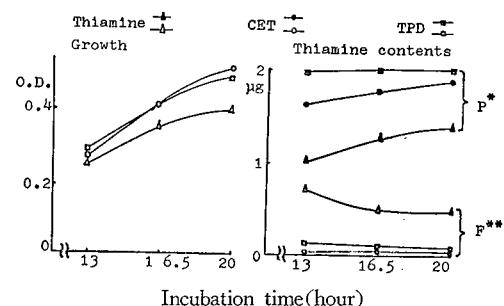
* Phosphorylated thiamine ** Free thiamine

清中に多量のTDPが残存した(表5)。TDPはPaseの作用でBi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Biの存在型

*Kl. apiculata*により大量に集積されたBiはすべて遊離型であるが、微生物定量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の三角コルベットにBi, CETまたはTPD 2 μg Eq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Biおよび結合型Bi(TDP)を測定した(図3)。

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



*P : Phosphorylated thiamine

**F : Free thiamine

CET, TPDを添加したとき増殖度はBiを添加したときより高値を示し、菌体Biはほとんど結合型すなわちTDPとして検出された。一方Bi添加のばあいは27~40%が遊離Biとして検出された。これはBioautographyによつても確認した。またBi添加濃度を増して4 μg Eqを50mlの培地に添加して20時間培養を行なつたが遊離型Biの総Biにたいする比はBi添加31%, CET添加3%, TPD添加2%となり、他は結合型Biとして検出され、Bi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Biを集積するが、集積されたBi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Bi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Bi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Biが遊離Bi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Biより集積されにくく, Pase阻害剤であるモリブデン酸塩を添加するとTDPの集積は阻害された。したがつて集積されるためのBiは遊離型であることが必要で, 酵母細胞中に遊離Biとして存在することに意義があると思われる。能勢ら¹²⁾は*E. coli*が Thiaminokinase の作用でBiをとりこむと報告しているが, 酵母のばあい全く異なる機構が考えられる。また林ら¹³⁾のいうBi吸着現象とも異なるものであろう。

Bi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が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 Bi 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 Bi に変化して原形質内に集約されるであろう。CET のままで Bi 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, Bi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Bi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 Bi 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 Bi は一部しか原形質内に透過しないのにつれて CET はほとんど原形質内に透過するため原形質内の総 Bi 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 Bi 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 Bi 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。

Bi誘導体の酵母によるとりこみにかんしては黒木¹⁵⁾, 鈴置¹⁶⁾の報告があり, 福井ら¹⁷⁾は Benzoylthiamine disulfide を *Sacch. cerevisiae* の培養に加えたとき O-Benzoylthiamine の型で酵母の表面にゆるやかに結合するとしているが, 少なくとも *Kl. apiculata*においては Bi より強い活性を示す点から考えても Bi 誘導体の細胞内透過程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 pH 4.7, 30°C で 1 時間 Bi と接触することにより菌体乾燥重量の 10% にのぼる Bi を遊離 Bi として集積した。

(2) 細胞壁を除去した Protoplast も Bi 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 Bi と同様集積されるがすべて遊離 Bi に変化して検出され Protoplast による集積量は Bi より低値であった。特定部位おそらくは原形質膜付近で遊離 Bi として存在することが酵母にとって 1 つの意味を持つと思われる。

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

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

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

(XVII) *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

(XVII) *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 propyl disulfide (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TPD¹⁾およびCET²⁾はB₁要求性酵母 *Kloeckera apiculata* IFO 0630³⁾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つた。

(2) 菌数ならびに濁度測定法

培養液の一部を分取し100°C, 5分煮沸して増殖を停止させ日立光電光度計にて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

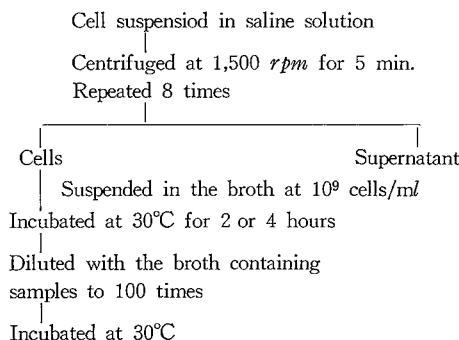
酵母の同調培養としては遠沈またはろ過により菌の大きさを一定とする方法、熱処理をしたのち常温で培養する方法、酵母を高濃度にけん摺して前培養したのち急激に希釀して培養する方法などが報告されている^{3)~6)}。 *Kl. apiculata*の生理食塩水浮遊液を1,500rpmで5分遠沈し上清を除き沈でんをふたたび生理食塩水

*1) TPD = Thiamine propyl disulfide

*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つた。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つた。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ち急激に菌数が約2倍に増加し、以後階段状の曲線を画いて菌数が増加した。また前培養時間を4時間としたときには誘導期がやや短縮されたが、以後は同様な増殖曲線を示した。なお対数増殖期にある酵母を顕微鏡で観察するとつねに大部分が出芽状態にあり、出芽していない細胞はあまり見られなかつた。おそらく娘細胞が成熟して母細胞から分離すれば速やかにつぎの出芽が始まるものと思われる。

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



(2) 同調培養によよぼすB₁誘導体の影響

図1の操作を行なうことによって菌数の増加を階段状としなし、同調培養をすることができるので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 $0.0125\mu\text{g}$ (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ぬこと、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100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添加菌の増殖が衰えたときに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ると考えられる。なおこの傾向は濁度の測定結果からも菌数測定のばあいほど顕著ではないが観察すとことができた(図2,3)。

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

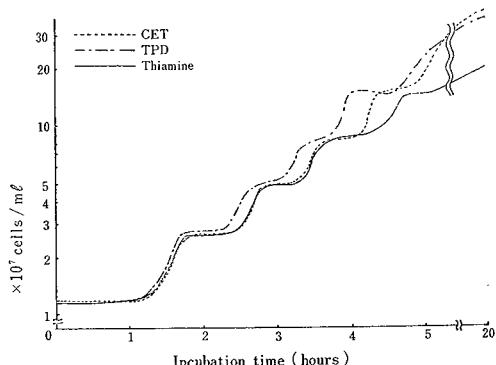
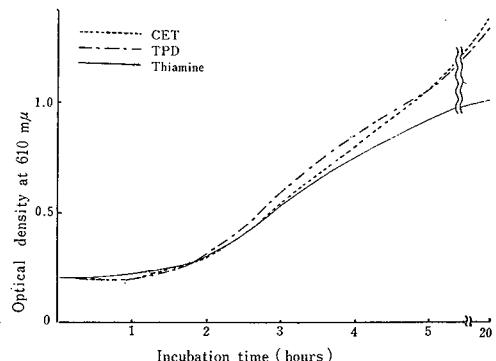


Fig. 3 Influence of thiamine, TPD or CET on the synchronized culture of *Kl. apiculata*
(2) Optical density



考 察

B₁、TPD、CETを添加して*Kl. apiculata*の同調培養を行なうとTPDとCETはやや異なる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Bi添加菌の増殖が衰える時期すなわち静止期に入る時に影響を与える。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Biへの復帰速度に関連するものであろう。前報²⁾に記したようにCET, TPDがBiより高い増殖促進性を示す直接の原因是これらの誘導体を添加したとき遊離Biの集積よりも原形質中のTDP^{*3)}含量がBi添加のばいより高まるためであろう。そのさい菌体中のTDP含量を測定するとTPDを添加したばい早期に高いTDP含量を示したのにたいしてCET添加のばいにはTDP含量がゆるやかに増加した。TPDは速やかにBi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Bi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Bi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Bi添加のばいよりも顕著に高くなりBi添加菌の増殖がすでに静止期に入ろうとする時点でお増殖を続行させる作用を示したのである。

Nosohら⁵⁾はパン酵母の同調培養を行なつて菌を形態的に観察し、出芽への誘導期および娘細胞の成熟期を明確に区別し同調させているが、著者らの実験では出芽に至る誘導期(出芽していない状態)がほとんど観察されず、つねに大部分の細胞が出芽状態で観察された。著者の用いた条件では(あるいは*Kl. apiculata*自身の性質として)出芽に至る誘導期が短く、娘細胞が

母細胞から分離すれば速やかにつぎの出芽が始まるのではないかと考えられる。完全な同調培養法についてはなお検討を要するであろう。

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渦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。Bi, 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Biより強く促進し、CETはBi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Bi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 熊・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つた。

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バームチット処理後BrCN法によりB₁量を定量した。なおTPDおよびSB₁を添加したものはバームチット処理前につぎの操作を行なつた。すなわち、TPDは0.5%システィン液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分振りませ酸化してB₁とした。

*1) TPD = Thiamine propyldisulfide

*2) TAD = Thiamine allyldisulfide

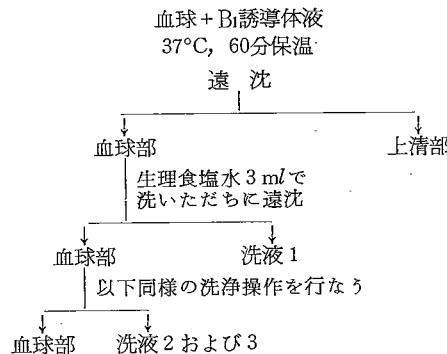
*3) TDP = Thiamine diphosphate

*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



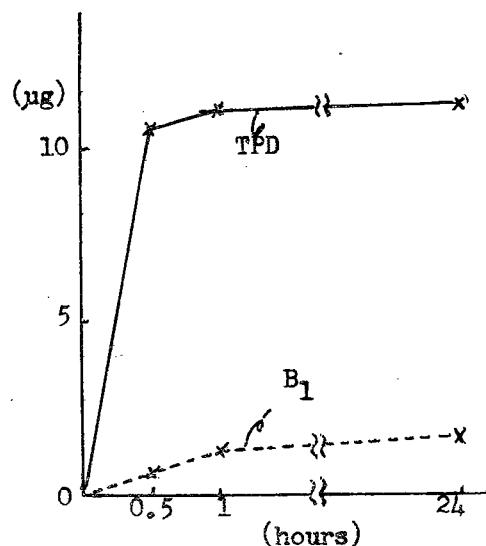
実験結果

(1) TPD および B₁ の血球移行量

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

(2) 過酸化水素酸化による SB₁ の測定法

SB₁ の定量には BPO^{*6} 法⁵⁾ が用いられているが著者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: $13.5 \mu\text{g Bi-HCl E}$
血球: 4 mL, 37°C

中 SB₁ の定量に応用した。まず SB₁ 標準液 $1 \sim 4 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ ($3.37 \sim 13.5 \mu\text{g Bi-HCl E}$) に 30% 過酸化水素水 5 滴を加え 50°C, 5 分 反応させ、冷後ペーパーチー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。なおペーパーチート処理を行なはずに定量するとまったく螢光が認められなかつた。これは過剰の過酸化水素が Thc^{*7} の生成を妨害しているものと思われる。

(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	Biとしての検出量	回収量*
主 験	6.6	+	7.8	6.2 (94)**
		-	3.2	
盲 験	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 Bi-HCl 1 μg に相当

** 回収率 (%)

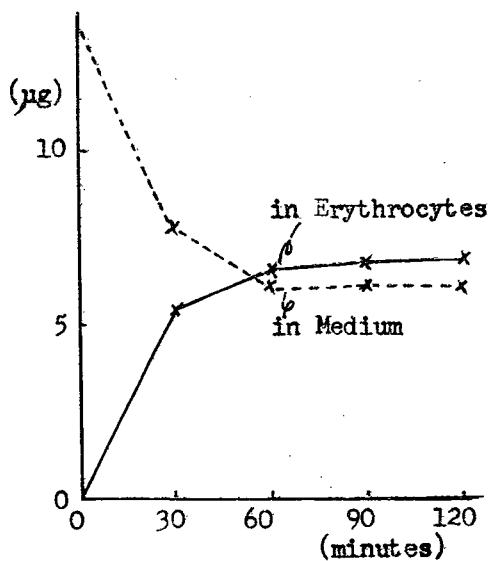
*5) Bi-HCl E = Bi塩酸塩相当量

*6) BPO = Benzoyl peroxide

*7) Thc = Thiochrome

図3 SB₁の血球移行量

添加量: 13.5μg Bi-HCl E
血 球: 4 ml, 37°C



SB₁の $4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ を血球に添加し30, 60, 90および120分後の血球移行量を定量した(図3)。60分後で血球部と上清部の比はほぼ1:1になりこの比は90分さらに120分でもあまり変化しなかつた。

(4) SB₁, TPD およびBi₁添加血球の洗浄

SB₁, TPD およびBi₁の $4 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ を添加した血球を図1の操作に従つて洗液1, 2, 3, 血球部および上清部の中のBi量を定量した(表2)。SB₁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Bi₁およびTPD を添加した血球では37°Cで30分保温したばあ

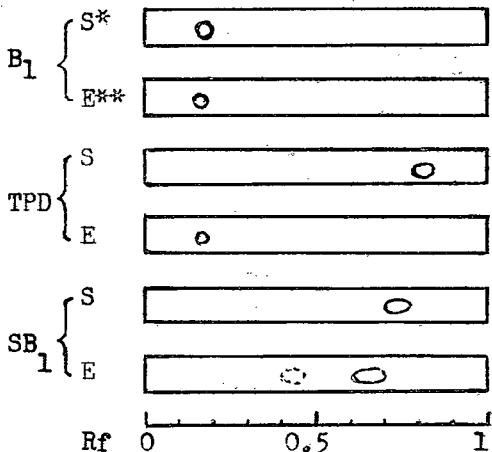
いでも洗液中への流出量はわずかであつた。さらにTPDの $2 \times 10^{-1} \mu\text{M}$ (67.4μg Bi-HCl E)を添加したばあいについても検討したが(このとき血球中には58μg Bi-HCl Eが移行していた)洗液中への流出量は0.3~0.5μg Bi-HCl Eであつた。

(5) PPC⁸⁾ による血球中存在形の検出

SB₁, TPD およびBi₁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にかけ酢酸・n-ブタノール・水(1:4:5)を展開溶媒として1夜展開し赤血塗・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Bi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)

Bi₁誘導体添加量: 13.5μg Bi₁-HCl E

	上 清 部	洗 液 1	洗 液 2	洗 液 3	血 球 部
S Bi 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)
Bi ₁	11.5 (11.1)	0.4 (0.5)	0.4 (0.2)	0.1 (0.1)	1.2 (1.1)

単位 μg Bi₁-HCl E

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

*8) PPC = Paper partition chromatography

の部分にはDragendorff 呈色物質は認められなかつた。SB₁添加血球はRf0.43およびRf 0.63に2斑点がみられたが、Rf0.43はRf0.63に比べごくうすい斑点であつた。Rf0.63はSB₁(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を加えて振りませ、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つた。BPOはSB₁を特異的にThclにすることでRf0.63の斑点はSB₁によるものでありRf0.43はSB₁が展開中に酸化されてBiになつたものか、あるいは他の異物と考えられる。

考 察

TPD その他の非対称型Bi-disulfide の血球移行性のよいことは TPD がBiよりも脂質への親和性が強く脂質に富む血球膜への親和性が強いためといわれているが血球膜と TPDとの反応ではBiに比べいちじるしい結合性の差は証明されなかつた⁶⁾。TPDは-SHによる還元性が強く容易にBi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Biに還元され生成したBiが血球内に取込まれることが考えられる。Biは血球膜を透過し得ないのでBiは血球内に封入された形となる。同じようにBiに比べ脂溶性であり血球移行性のあるSB₁は血球内でも SB₁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 SB₁は流出する。TPDのはあはい、血球を洗つてもBi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Bi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Biは溶血後PPCで証明したが、溶血操作でTPDも Biに還元されるからこの証明は血球中の Bi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 Biが、血球外に Propyl-³⁵Sが証明されたので血球中では TPDではなくBi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Biは24時間放置しても変化しなかつたが、血球を破壊しないかぎり外部へ出る可能性が少ないので生体内での血球移行性はむしろBiを血球中に封入する形となり、しかも大部分が遊離のBiであるのでBi利用上有効なものと考え難い。血球内の酵素系でTransketolase はBi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Bi-disulfide の利点として強調しようとするならば多量のBi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Bi含量は24時間後も変化しなかつた。SB₁は同条件で血球中に移行するが完全でなく血球中と上清中の比がほぼ1:1であつた。
- 2) 上の操作で得られた血球を生理食塩水で洗うとSB₁添加血球からは SB₁の流出が認められたが、TPD 添加血球からはほとんど流出が認められなかつた。
- 3) SB₁は血球内で SB₁のまま存在するがTPDは血球内でBiに還元されて存在するため生理食塩水で洗い出されないのであろう。
(昭38.7.29.受理)

文 献

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

PENETRATION OF MODIFIED THIAMINE COMPOUNDS INTO ERYTHROCYTES

I. COMPARISON OF THIAMINE PROPYL DISULFIDE AND THIOTHIAMINE

CHIKATARO KAWASAKI, ISAO TOMITA AND SUMIO 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 Suzuki (1), and many researcheres. Matsukawa *et al.* (2) assumed that the penetration of TAD into erythrocytes was due to simple diffusion because of its fat-solubility. Thiothiamine is known to be more fat-soluble than thiamine, but cannot be converted into thiamine by animal tissues, differing from TPD (3, 4). The penetration of thiothiamine into erythrocytes was therefore compared by the authors with that of TPD.

EXPERIMENTAL

1. *Erythrocytes*

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

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

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

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

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

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

¹ 川崎近太郎, 富田勲, 篠田純男。

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

3. Washing the Erythrocytes

The suspension was treated as shown in Fig. 1.

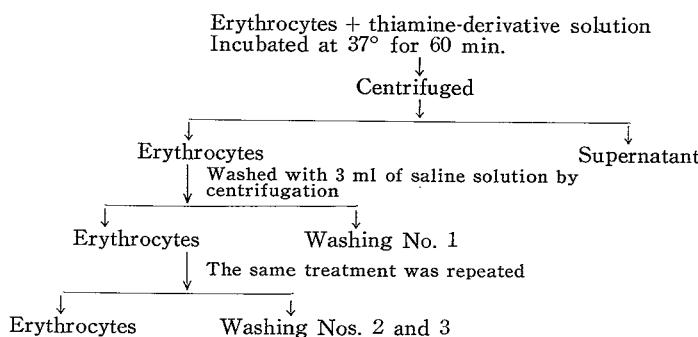


FIG. 1. *Washing the Erythrocytes*

RESULTS

1. Penetration of TPD or Thiamine into Erythrocytes

4×10^{-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

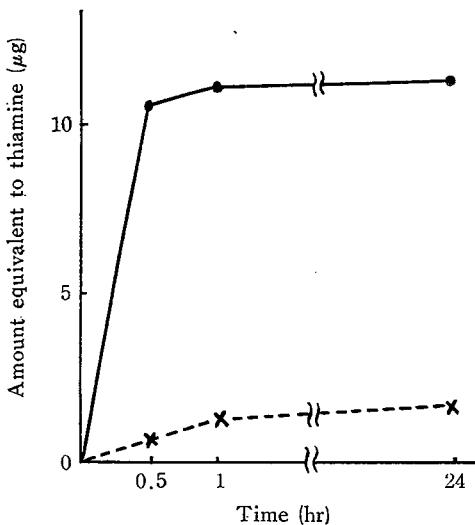


FIG. 2. Amount of TPD or Thiamine Penetrated into Erythrocytes
The amounts equivalent to 13.5 μg thiamine-HCl were added.
Erythrocytes, 4 ml, incubated at 37°
●, TPD; ×, thiamine

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
	13.3	—	3.2	
		+	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

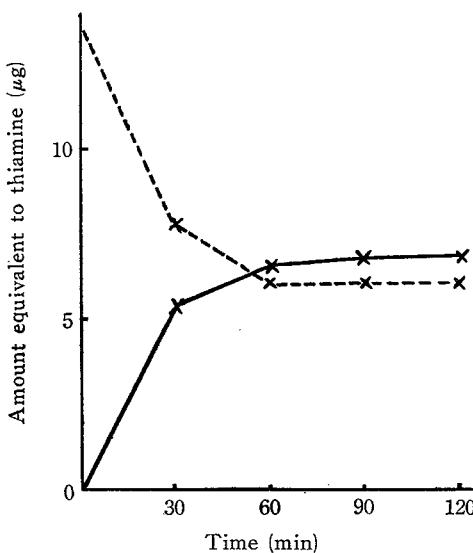


FIG. 3 *Amounts of Thiothiamine Penetrated into Erythrocytes*
The amounts equivalent to 13.5 µg thiamine-HCl were added.
Erythrocytes 4 ml, incubated at 37°.

—, 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

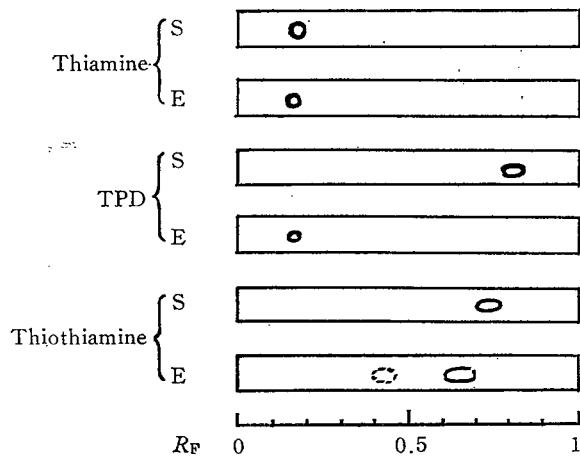


FIG. 4. *Identification of the Form of Thiamine Derivatives Present in Erythrocytes by Paper Chromatography*
Solvent system, acetic acid-*n*-butanol-water (1:4:5). S, standard;
E, in erythrocytes.

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 Suuoki, 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 DICARBETHOXYSYTHIAMINE

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Biに還元されることを指摘した。CAT^{*3)}類は他のBi誘導体に比べBi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の血球移行と異なる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Bi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 处理して Thiazole型 Bi (OCET⁶⁾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Biすなわち Thiazole型 Bi + Thiol型 Bi (TPDあるいは DCET, CET⁷⁾)を定量し Bi 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 2ml 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 5ml を添加しただに遠沈する操作を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 5ml 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Biの定量

川崎ら⁴⁾の方法によつた。

実験結果

(1) TPD, DCETの全血または血球浮遊液においての血球移行量の比較

玉置ら⁵⁾は TPD の血球移行量は全血と血球浮遊液とでかなり異なることを報告しているのでまず全血について検討した。表1に示した条件で全血または血球浮遊液に TPD, DCET 0.2μモルを添加し 37°C, 1 時間保温後上清部と血球部の総Bi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 0.2μモル (67.4μg Bi-HCl相当量)

全血または血球浮遊液 4ml

全量 5ml, 37°C, 1 時間保温

Bi-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球液による Bi 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 2ml に KRP 2ml より TPD または DCET 0.2μモルを加え全量 5ml として 37°C, 1 時間保温し、以下上清部 Bi の定量法に従つてチアゾール型 Bi の定量を行なつた(表2)。DCET からは 8 % のチアゾール型 Bi が検出されたにすぎなかつ

表2 TPD, DCET からの血清による Bi 生成量

	Bi 生成量(μg)	Bi 生成率(%)
DCET	5.1*	8
TPD	61.1	91

* OCET を含む

TPD, DCET 0.2μモル (67.4μg, Bi-HCl相当量)

血清 2ml, 全量 5ml

pH7, 37°C, 1 時間保温

たが TPD は 91 % が Bi に還元されていた。Bi 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 Bi 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

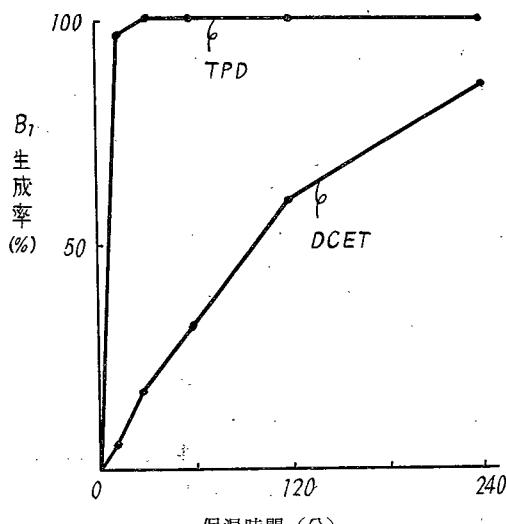
洗浄した血球に水を加えて原血液と等容量とし、さらに凍結融解して溶血させた液 4ml に TPD, DCET の 0.2μモルを加え pH6.8, 全量 10ml として 37°C で保温し以下血球部 Bi 定量法に従つてチアゾール型 Bi 量を定量した(図1)。TPD は最初の測定で完全にチアゾール型 Bi に還元されておりさらにシステイン処理を行なつても測定値は増さなかつた。DCET からは短時間ではチアゾール型 Bi はわずかしか検出されずアルカリ処理で測定値が著明に増加し DCET がそのままの形でかなり残っていることがわかつた。

(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

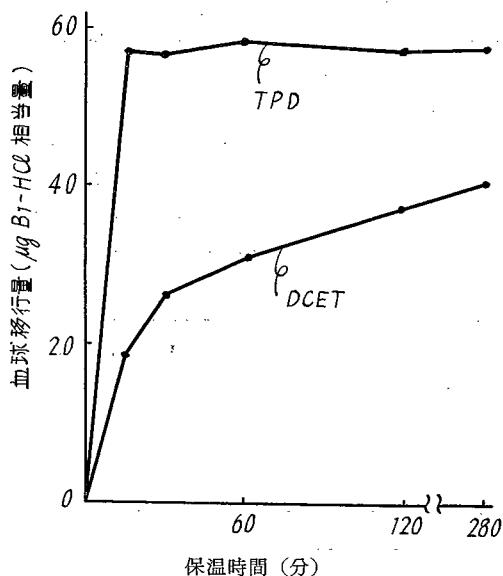
*6) OCET = O-Carbethoxythiamine *7) CET = S-Carbethoxythiamine

図 1 溶血血球液による TPD, DCET からの Bi 生成



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

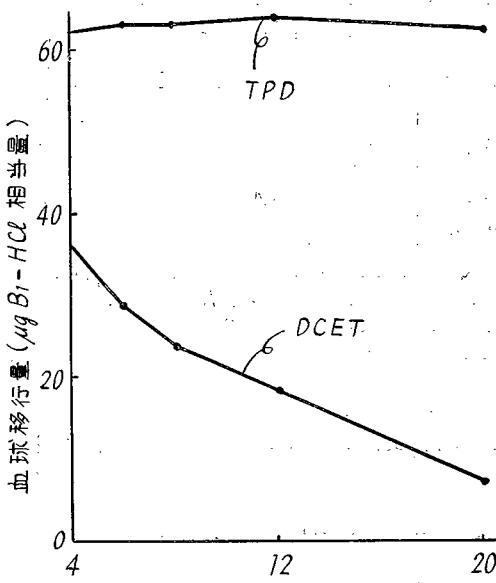
血球浮遊液を用いて TPD, DCET の血球移行量を経時的に調べると図 2 に示すように TPD は 15 分以内に添加量 (0.2μモル) の 85% が血球に移行し以後変化しな

かつたが、DCET は全体として TPD より血球移行量が少なく保温時間とともに移行量が増した。

2) 濃度の影響

血球浮遊液 3ml に TPD, DCET 0.2μモルを加え KRP で全量を 4~20ml とし 37°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 0.2μモル (67.4μg Bi-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つた。

(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 Bi 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 (Bi 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 の滤紙につけ、酢酸・n-ブタノール・水 (1:4:5) で展開し乾燥後滤紙の両側面 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 Bi, 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; Bi), 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Bi量を定量し、さらに第3画分の抽出液の一部を *Kl. apiculata*による微生物定量法で CETとDCETの分別定量を行なつた。CETとDCETは *Kl. apiculata*の増殖促進性に量的な差があり^{6,7)}この差を利用してCETとDCETの分別定量が可能である。表3に示したように第3画分の27~42%が CETとして

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 (Bi) (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)*

Bi-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。Bi : 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Bi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で血球外に残つていたものは完全に除去されるから画分IV, Vで検出されたものはいちど血球内に入つてから洗浄により流出したものである。DCETのばあい画分IVに明らかな検出量の増加がみられ IV, Vを合した流出量は全体の12.4%となつた。画分VIすなわち最後に血球に残つていたものはほとんどがチアゾール型Biとなつてゐた。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

Bi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っているが血球内でBi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Biへの復帰度の難易と関係があるようと思える。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Bi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Bi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Bi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Biがとりこまれ Propylmercaptanまたその化合物を放出することが血球移行の因子とも考えられDCETに比べてより特異的なTPDの性質ということができる。

表4 TPD, DCET 添加血球の洗浄実験

画 分	上 清 部			洗浄による流出			血 球 部	
	I	II	III	計	IV	V		
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 Bi-HCl相当量)

単位: %

* ()内は Thiazole 型Bi量

結論

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

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

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

(3) TPD は血清および血球で速やかに Bi₁に還元されるが、DCET は同条件で Bi₁へ復帰しがたく Bi₁の生成量が低かつた。

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

以上のことから DCET の血球移行性は単純な拡散によるものと考えられるが、TPD はたんに拡散だけでなく Bi₁に還元され易く還元された Bi₁が血球膜を透過しがたい点が関連していると思える。なお DCET の血球による分解産物として CET, OCET および Bi₁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・稻津・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 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 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、酵素系を用いて多くの実験によりそれを裏づける事が得られている。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)

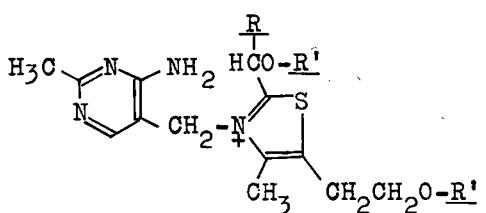
(2) 菌の培養方法

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、培養後日立光電比色計を用いて 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 と記したもののはDL体を意味する。

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



		R	R'
I	HET ^{*2)}	-CH ₃	-H
II	AHET ^{*3)}	-CH ₃	-COCH ₃
III	PHET ^{*4)}	-CH ₃	-COC ₂ H ₅
IV	HPT ^{*5)}	-CH ₂ CH ₃	-H
V	AHPT ^{*6)}	-CH ₂ CH ₃	-COCH ₃
VI	HIBT ^{*7)}	-CH(CH ₃) ₂	-H
VII	AHIBT ^{*8)}	-CH(CH ₃) ₂	-COCH ₃
VIII	L-HET		
IX	D-HET		

実験結果

(1) *L. fermenti* にたいする活性

B₁要求性乳酸菌*L. fermenti*にたいしては37°C, 20時間の培養で図1-Aの結果を得た。HETはB₁とはほぼ等しい活性を示し、AHETおよびAHIBTのようなO-アセチル体はB₁より低い活性を示した。

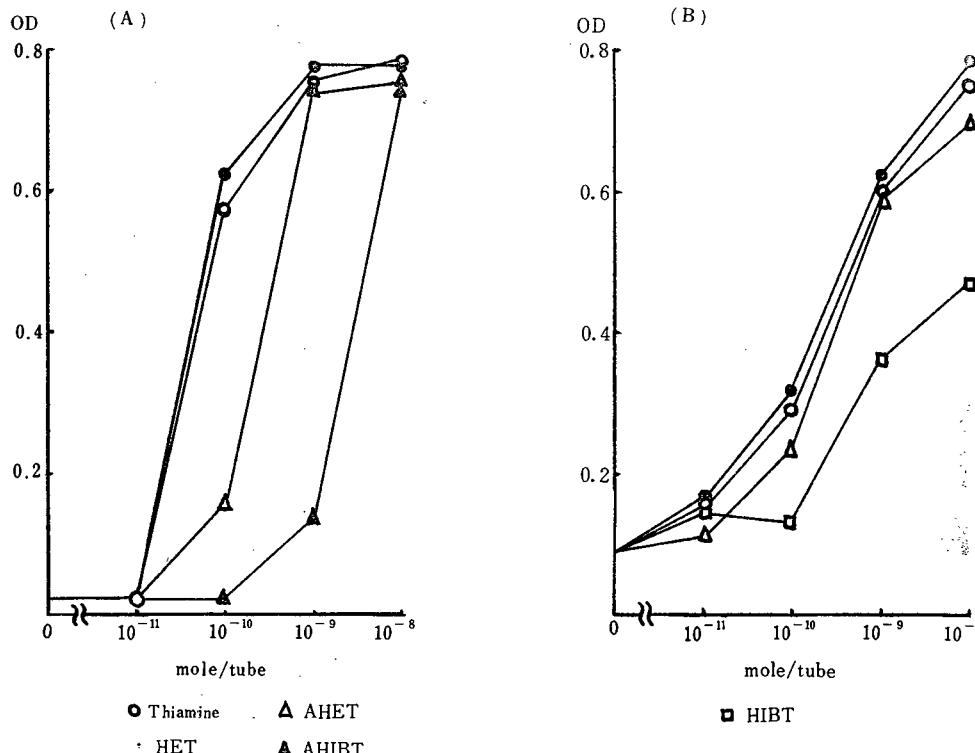
(2) *Kl. apiculata* にたいする活性

B₁要求性酵母*Kl. apiculata*にたいしては図1-BのごとくHIBTはB₁より活性が低く、HETおよびそのアセチル体はB₁と同等の活性を示した。

(3) *Sacch. carlsbergensis* にたいする態度

*Sacch. carlsbergensis*はB₁により増殖が阻害され、

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



*2) HET = α -Hydroxyethyl-2'-thiamine *3) AHET = O-Acetyl- α -hydroxyethyl-2'-thiamine

*4) PHET = O-Propionyl- α -hydroxyethyl-2'-thiamine *5) MPT = α -Hydroxypropyl-2'-thiamine

*6) AHPT = O-Acetyl- α -hydroxypropyl-2'-thiamine *7) HIBT = α -Hydroxyisobutyl-2'-thiamine

*8) AHIBT = O-Acetyl- α -hydroxyisobutyl-2'-thiamine

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

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

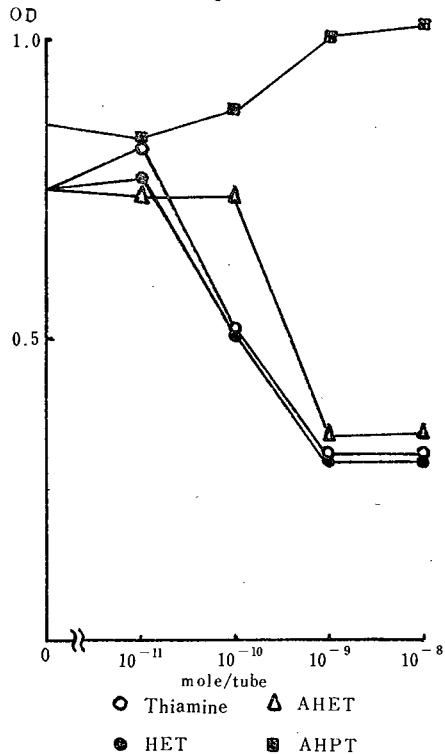


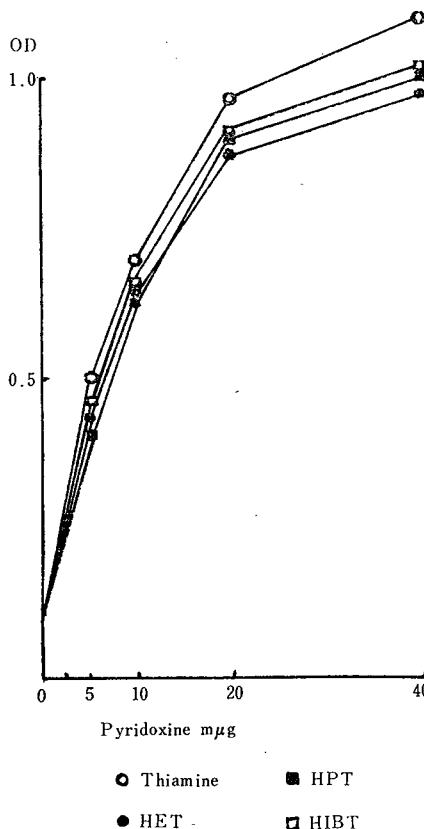
Table 1 The microbiological activities of HET and its related compounds

	Ratio of growth stimulation*		Ratio of growth inhibition*	
	<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つた(図2)。

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

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

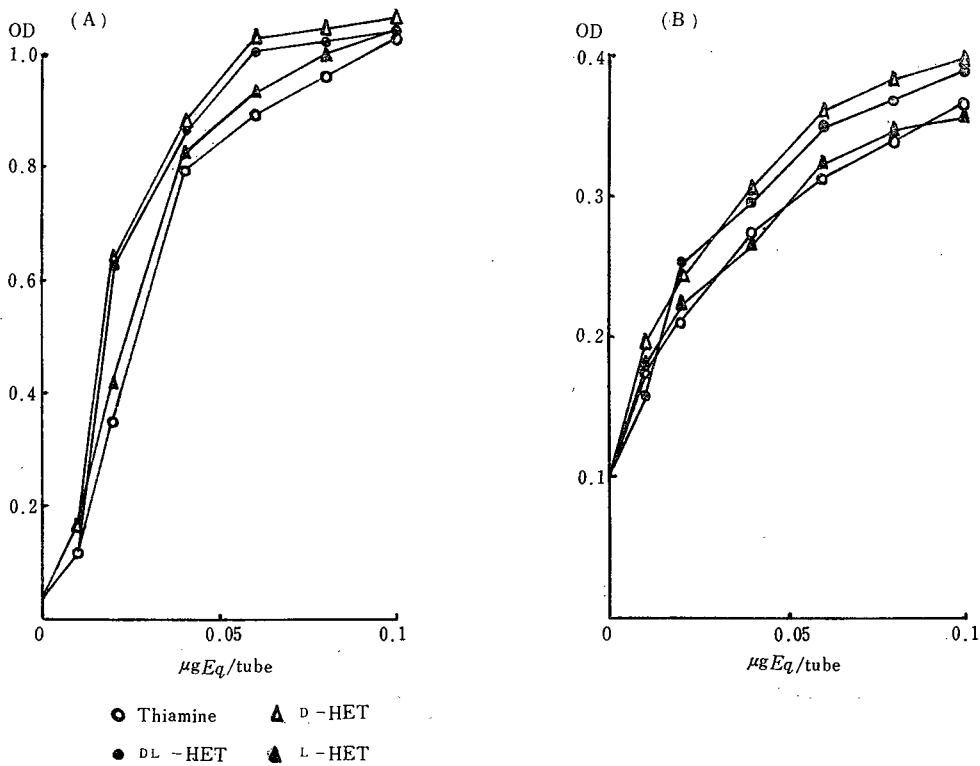
(4) D-およびL-HETの活性

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

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

HET または $B_1 1.5 \times 10^{-8} \sim 10^{-6}$ 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Bi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B液1mlを加えpH4.5, 50°Cで2時間保温後BrCN-Thc⁹⁾法またはフェリシアン-Thc法によりBiまたはHET量を測定した。HETはフェリシアン塩と反応してThcを生成するが、BrCNとの反応ではThcを生じないのでフェリシアン塩による測定値とBrCNによる測定値の差を求めればHET量を知ることができる^{3,7,8)}。しかしBiとフェリシアン塩の反応ではThcの生成率はBrCNのはあいにくらべ低く⁹⁾、HETからのThc生成率と一致しないことが多いのでHET、Bi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)。

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

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

Dose of sample (mμmole)	Growth (O.D.)	Accumulation (mμmole)		
		Thiamine	HET	Total
Thiamine	0.81	15	0	15
	0.80	148	0	148
	0.81	636	0	636
HET	0.81	11	3	14
	0.81	90	65	155
	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Bi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・エチレンギリコール・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BiおよびHETが検出された。

*9) Thc = Thiochrome

(6) *Sacch. carlsbergensis* による HET の集積ならびに Bi₁への変化

Bi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(Bi不含)に*Sacch. carlsbergensis*を接種し30°C、20時間振とう培養を行なつた。菌の増殖度を測定したのち遠沈して菌を集め、以下(5)の *Kl. apiculata* のばあいに準じて菌体および上清のBi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 (mμmole)	Growth (O.D.)	Accumulation (mμmole)		
		Thiamine	HET	Total
Thiamine 150	0.80	150	0	150
	1500	0.78	480	480
HET 150	0.79	75	75	150
	1500	0.81	103	285
None	1.42	8	0	8

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

考 察

HETおよびその関連化合物の微生物活性を総括すると表1のようになる。*L. fermenti*および*Sacch. carlsbergensis*にたいする作用には相関関係がみられ⁵の側鎖-C₂H₄OH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Bi₁とは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Biより低い作用しか示さなかつた。

*Kl. apiculata*にたいしてはHET、HPTおよびそれらのO-アシル体はBi₁に等しい効果を示したが、HIBTおよびそのO-アセチル体はBi₁より効果が低く*Kl. apiculata*にたいしてはOH基がエステル化されているか否かは活性に影響しなかつた。

これらの知見は他のBi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Bi誘導体はBi₁に復帰してBi効果を示し、かなりBi₁に復帰にくい誘導体でも20時間の培養を行なつたのちには菌体内に存在するものはすべてBi₁になつていたが、HETを添加して*Sacch. carlsbergensis*および*Kl. apiculata*を培養したとき、かなりの量のHETが両菌から検出された。

著者らは他の実験で人およびシロネズミにHETを投与したときかなりのHETが尿中に排泄されることを認めた¹¹。HETはBi欠乏のシロネズミおよびシウシマツにたいしてBi₁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Bi₁になりにくくにもかかわらずBi₁と同等の活性を示す事実はHETのままリシ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Bi₁をしかも遊離型のままで付着させることができ¹³。したがつて*Sacch. carlsbergensis*および*Kl. apiculata*の菌体から検出されたHETはBi₁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Bi₁の約80%の活性を示すことからいざれか一方の光学活性体がBi₁効果を示すのであると推論しているが、著者らの実験ではややD体の方が高い活性を示したがL体との差はあまりなかつた。同様な事実は村上らによつても報告されている³。D体のみがそのままの型で酵素系に組入れられると仮定することはこれらの結果から否定されるように思う。

結 論

HETおよびその関連化合物の微生物活性を調べたのが知見を得た。

(1) HET、HPTおよびHIBTはBi要求性乳酸菌*L. fermenti*にたいしてBi₁と同等の活性を示したが、それらのO-アシル体はいざれもBi₁より活性が低かつた。

(2) HET、HPTおよびそれらのO-アシル体はBi要求性酵母*Kl. apiculata*にたいしてBi₁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Bi₁よりも低かつた。

(3) HET、HPTおよびHIBTはBi₁により増殖阻害を受ける酵母*Sacch. carlsbergensis*にたいしてBi₁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Bi₁より少なかつた。HET、HPTおよびHIBTによる増殖阻害はBi₁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のほかにHET自身が検出された。

終りに試料を提供された武田薬品工業KKならびに山之内製薬KKに感謝します。なお本報告の要旨は第21回日本薬学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., Mufakaini, M. : J. Vitaminol. **11**, 302 (1965)
- 13) 高田・市川：ビタミン **7**, 535(1954)

