

Title	Thiothiamineおよび2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidineの代謝ならびにPyrimidine誘導体の検索に関する研究
Author(s)	入谷, 信子
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/27724
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 6 】

氏名・(本籍)	入谷信子
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 5 5 3 号
学位授与の日付	昭和 39 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Thiothiamine および 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine の代謝ならびに Pyrimidine 誘導体の検索に関する研究
	(主査) (副査)
論文審査委員	教授 川崎近太郎 教授 羽野 寿 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁

論 文 内 容 の 要 旨

Thiothiamine は化学構造上 Thiamine にきわめて類似しているのみでなく、酸化処理により容易に Thiamine に変化するが、動植物の酵素を用いた実験や動物実験では Thiothiamine より Thiamine への変化は未だ証明されていない。一方動物体内で Thiothiamine は Thiamine よりはるかに分解されやすく毒性の低い点などより両者がかなりちがった代謝をうけることが予想され、Thiamine の場合と比較しながら Thiothiamine の尿中代謝産物を追求した。またその結果分離証明された 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の代謝についても研究し、さらにその際に検討した Pyrimidine 体の定量法を用いつつ植物中にその検索を行ないつぎのような実験成績を得た。

I Thiothiamine およびその誘導体の代謝

(1) Thiothiamine の尿中代謝産物の分離

Thiothiamine をシロネズミに腹腔内注射した時の尿中代謝産物を追求し Thiazole 体として 2-Mercapto-4-methyl-5 β -hydroxyethylthiazole (V) を分離証明した。すなわち尿をエーテル抽出して未反応の Thiothiamine を移行せしめてのぞいたのち、イソブタノールと振とうして (V) を水層より分離抽出した。イソブタノール層を濃縮したのち、セルローズ粉末によるカラムクロマトグラフィーを行ない最初に流出された Dragendorff 試薬陽性物質を集めて、さらに濾紙クロマトグラフィーにより分離精製した。本物質を picrate (mp. 117°) として精製すると 2-Mercapto-4-methyl-5 β -hydroxyethylthiazole (V) の picrate (mp. 117°) とよく一致し混融試験、分析値により確認した。

Thiothiamine 代謝産物の Pyrimidine 部の追求は Thiazole 体にくらべて少量のため困難であったが、2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (IV) が分離証明された。すなわち尿をブタノールその他の有機溶媒で抽出し有機溶媒を留去したのち少量の水を加えると (IV) は水に溶け、Thiothiamine や (V) を含む油状物質と分離された。水層にピクリン酸を加えて目的物を picrate

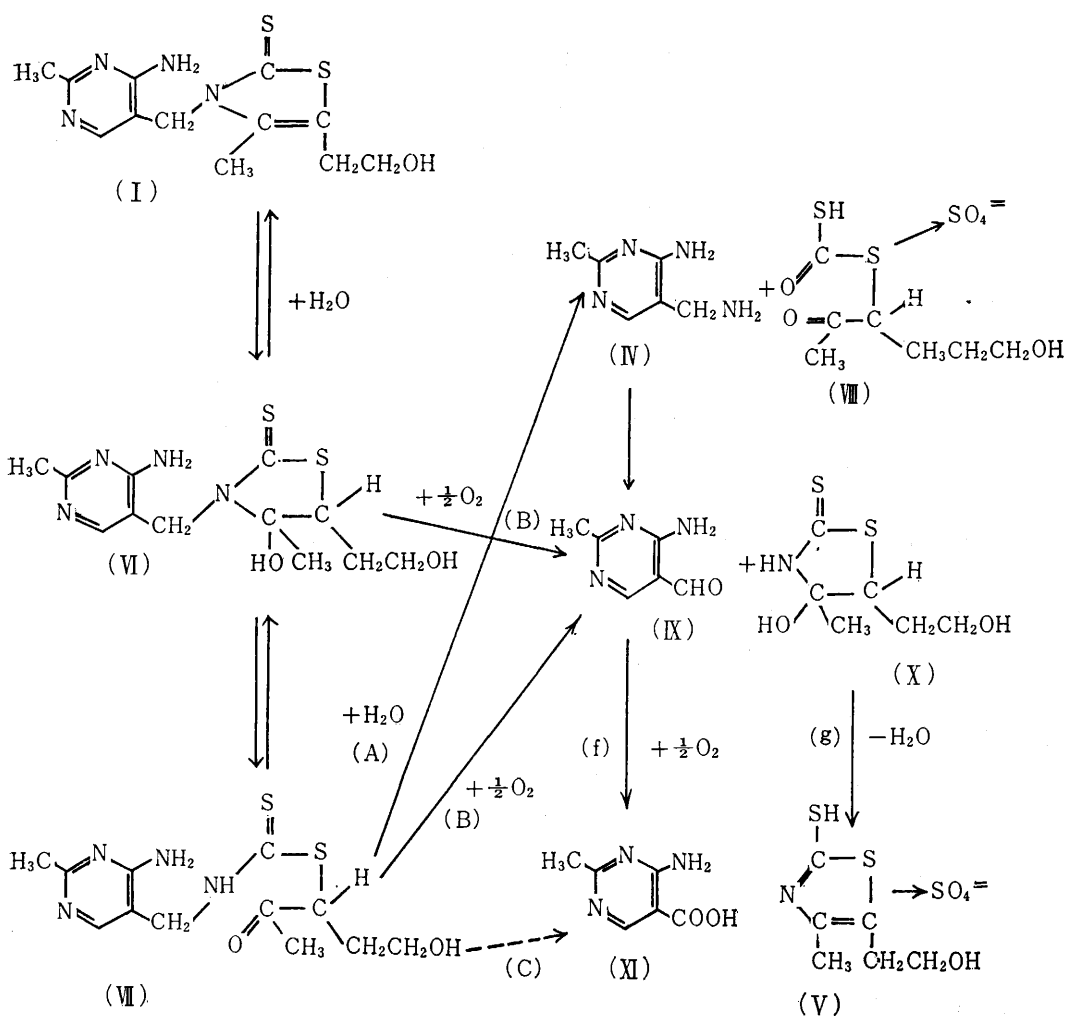
として分離したのち再び遊離型としてセルローズ粉末によるカラムクロマトグラフィーを行なって分離精製した。(IV)を含む濃縮液に少量の塩酸を加えたのちエタノールを加えると mp. 260°(分解)の針状結晶が得られ、本品は 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine 塩酸塩との混融で融点降下を示さなかった。さらに picrate(mp. 228°, 分解)を生成して混融試験, 分析値により確認した。このほかペーパークロマトグラフィーにより 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (XI) に一致する物質を検出したので, その部分を抽出して紫外吸収を測定すると (XI) に一致し, (XI) の存在が予想された。

(2) Thiothiamine 投与尿 と Thiothiazolidine 体投与尿の比較

Thiothiamine をシロネズミに腹腔内注射して 24 時間尿中 (連日投与しているので前の投与による排泄量を加算されているかもしれない) の 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (IV) を II (1)の方法で測定すると, 50mg または 25mg の投与で 1% あるいはそれ以下で (IV) がさらに代謝されることが予想された。同時に測定した Thiothiamine 排泄率は 30~40% であり, また $\text{SO}_4^{=}$ の排泄量は非投与時の尿中 $\text{SO}_4^{=}$ 排泄量よりはるかに高く Thiothiamine の 34~47% が $\text{SO}_4^{=}$ にまで分解されたことになる。

一方 Thiothiamine 代謝の中間体として Thiothiazolidine 体 (VI) を考え, この物質をシロネズミに注射すると尿中より 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (IV) が検出された。II (1)の方法による (IV) の測定値は Thiothiamine の場合とほぼ同じで投与量の約 1% であったが, $\text{SO}_4^{=}$ 排泄量は Thiothiamine 投与時以上に多く (VI) の 70% あまりが $\text{SO}_4^{=}$ にまで分解されたことになり, 尿中 (VI) の排泄率はわずかに 13~20% であった。また Thiamine 注射時には 73~85% が未変化のまま排泄されるので $\text{SO}_4^{=}$ 排泄量は非投与時と差がなかった。

以上 Thiothiamine は Thiamine に比べて体内で容易に分解され代謝産物として 2-Mercapto-4-methyl-5 β -hydroxyethyl-thiazole (V), 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (IV) および 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (XI) が証明されたが, 排泄される Thiothiamine 量, $\text{SO}_4^{=}$ 量 および 代謝産物を Thiamine または Thiothiazolidine 体 (VI) の投与時と比較して Thiothiamine の代謝経路をつぎのような加水分解反応 (A) と酸化反応 (B) および (C) として推定した。



II 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の代謝

(1) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine およびその類似体の定量法

4-Methyl-5 β -hydroxyethylthiazole を添加した Reader 培地に *Saccharomyces cerevisiae* を接種し 25~30° で 1 夜前培養したのち、4ml ずつ分注し 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (III) または 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (IV) の 10⁻⁷ モル以下を加えて 37° で 3~5 時間放置すると前記酵母は (III) または (IV) の量に対応して Thiamine を合成する。この値から検量曲線を作り別に試料について同様に実験し合成された Thiamine 量を測定すれば Pyrimidine 体量に換算することができる。本法の培養条件その他を検査し生体試料中の (III) および (IV) の定量法を案出した。

(2) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の尿中代謝産物の分離

(1)の方法を用いつつ 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅳ)の代謝を研究した。(Ⅳ) 100 mg をシロネズミに注射すると 24時間尿中排泄量はわずかに 2.6~6 mg で(Ⅳ)は代謝されやすく尿中代謝産物として 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (Ⅺ)が証明された。すなわち尿をパームチットに通して未反応の(Ⅳ)を吸着せしめてのぞき、吸着時の流下液と水洗液を合してアンバーライト IRC-50に通し、再びその吸着時の流下液と水洗液を合して濃縮した。そのエタノール抽出液をペーパークロマトグラフィーにより分離精製し、さらに picrate (mp.226°, 分解)として(Ⅺ)の picrate に一致することを混融試験、分析値により確認した。

(3) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の肝磨砕液による分解産物の分離

2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅳ)に肝磨砕液を添加してin vitro で反応せしめると反応生成物として尿中代謝産物と同じ 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (Ⅺ)を picrate にして証明した。ほかに 2-Methyl-4-amino-5-formylpyrimidine (Ⅸ)に一致する物質をペーパークロマトグラフィーにより検出したので、その部分を抽出して紫外部吸収を測定すると(Ⅸ)のものにほぼ一致し、(Ⅸ)の存在が予想された。

Ⅲ Pyrimidine 誘導体の検索ならびに Thiamine 生合成への利用

(1) Pyrimidine 誘導体の検索

数種の植物につきⅡ(1)の方法で Pyrimidine 体の検出を試みた結果、Thiamine 量に比べて含有比の高いイネ葉を選んで Pyrimidine 体の分離を試み成熟したイネ葉または幼イネより 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅳ)を分離証明した。すなわち試料を 1~3%トリクロル酢酸液にて磨砕し抽出液をアンバーライト IRA-410, つづいて IRA-411, にとおしその流下液を pH 5.5 で IRC-50 柱に吸着せしめ(Ⅳ)を含む脱着液を濃縮し picrate (mp.227°, 分解)として精製した。本品の標品との混融試験、赤外部吸収スペクトルの測定により(Ⅳ)の picrate であると同定した。

(2) Pyrimidine 誘導体のダイコンおよびイネでの Thiamine 生合成への利用

ダイコンおよびイネを砂耕培養し、培養液中に Pyrimidine 体と 4-Methyl-5 β -hydroxyethyl-thiazole(Ⅻ)を添加して植物中の Thiamine 量の増加をしらべた。ダイコンでは 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine(Ⅲ)と(Ⅻ)を添加すると Thiamine 量が無添加のもの約 3 倍に増加し、2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine(Ⅳ)や 2-Methyl-4-amino-5-formylpyrimidine (Ⅸ)もまた(Ⅻ)との共存において Thiamine 量を増加せしめた。

またイネにおいては(Ⅲ), (Ⅳ)ともに(Ⅻ)との共存において Thiamine 量を無添加時の約 2 倍に増加せしめた。したがって(1)においてイネ葉より発見された(Ⅳ)は Thiamine 生合成の前駆体として意義を有するであろう。

Ⅳ 総括ならびに結論

以上の実験成績によって Thiothiamine をシロネズミに投与した時の尿中代謝産物として 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅳ)と 2-Mercapto-4-methyl-5 β -hydroxyethyl-thiazole(Ⅴ)を分離し、Thiamine にくらべ Thiothiamineは体内で容易に分解され(Ⅳ), (Ⅴ)以外に無機硫酸塩として多量に証明されることを明らかにした。Thiothiamine の代謝経路としては

Thiothiazolidine 体 (Ⅵ) または Dithiourethan 体 (Ⅶ) を中間体と仮定するとその加水分解により (Ⅳ) を生成し Thiazole 部は無機硫酸塩にまで酸化され、また酸化分解により (Ⅴ) とともに 2-Methyl-4-amino-5-formylpyrimidine (Ⅸ) または 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (Ⅺ) を生成すると推定すれば (Ⅳ), (Ⅴ) の生成が説明できる。なお (Ⅺ) は Thiothiamine 投与尿から検出され、(Ⅳ) を動物に投与したときの尿からも分離されまた (Ⅳ) を肝磨砕液と反応せしめた時にも生成されることが実験的に証明された。

つぎに 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅳ) または 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (Ⅲ) その他の Pyrimidine 体の定量法を確立し植物体につき検出を行ないその存在が予想されたイネ葉の抽出液より (Ⅳ) の分離に成功した。また植物の発芽時 (Ⅳ) または (Ⅲ) を Thiazole 体とともに添加すると Thiamine の生成量が増加することが証明された。

論文の審査結果の要旨

本論文は Thiothiamine (Ⅰ) の代謝ならびに (Ⅰ) の代謝産物 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅱ) の自然界における存在ならびに変化を研究したものである。

(1) Thiothiamine をシロネズミに注射したときの尿中代謝産物として 2-Mercapto-4-methyl-5 β -hydroxyethylthiazole (Ⅲ) および 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅱ) を分離し、それぞれ同定した。(Ⅱ) の分離が困難であるのは (Ⅱ) が動物体内でさらに分解されるためであろうと考え、(Ⅱ) を動物に投与したときまたはネズミ肝磨砕液と処理したとき 2-Methyl-4-amino-pyrimidine-5-carboxylic acid が分離証明された。また (Ⅰ) の加水化合物である 3-[2'-Methyl-4-aminopyrimidyl (5')]-methyl-4-methyl-4-hydroxy-5 β -hydroxyethylthiazolidine-2-thione (Ⅳ) の代謝ならびに尿中硫酸塩の排泄量から Thiothiamine の代謝経路として (Ⅳ) またはその転移により生成する Dithiourethan 体を中間体として加水分解または酸化によって (Ⅱ), (Ⅲ) を生成したことを推定した。

(2) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (Ⅱ) の測定方法として *Saccharomyces cerevisiae* を用い (Ⅱ)+2-Methyl-4-amino-5-hydroxyethylthiazole (Ⅴ) \rightarrow Thiamine を生合成させる方法を利用し天然物中の (Ⅱ) の検出を行なった。その結果イネ葉について Thiamine の量に比べ (Ⅱ) の含量が高いことが判り、イネ葉から (Ⅱ) の分離に成功した。またダイコンまたはイネの砂耕栽培を行なうとき (Ⅱ) および (Ⅴ) を添加すると Thiamine の量が無添加の対照群に比べ高くなることより考え (Ⅱ) は植物界において Thiamine 生合成の前駆体となるであろうと結論した。

以上の実験成績から Thiothiamine およびその関連化合物の生体内代謝を解明した。よって本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。