The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	大阪大学, 1964, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27724
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

入　谷　信　子

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

入　谷　信　子

目　　次

第1章　序　　論 …… 1

第2章　Thiothiamineおよびその誘導体の代謝 …… 4

第1節　Thiothiamine の代謝に関する従来の研究 …… 4

第2節　Thiothiamine投与尿よりThiazole体の分離 …… 5

第3節　Thiothiamine投与尿よりPyrimidine体の分離 …… 10

第4節　Thiothiamine 投与尿中 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidineならびに無機硫酸塩の排泄量 …… 15

第5節　Thiothiamine 誘導体投与時の尿中排泄量と無機硫酸塩の排泄量 …… 18

第3章　2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine の代謝 …… 23

第1節　Saccharomyces cerevisiae を用いる 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine およびその類似体の定量法 …… 23

第2節　2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine 投与尿より代謝産物の分離 …… 27

第3節　2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidineの肝臓磨砕液による分解産物 …… 30

第4章　Pyrimidine 誘導体の検索ならびにThiamine生合成への利用 …… 33

第1節　Thiamine 生合成に関する従来の研究 …… 33

第2節　Pyrimidine誘導体の検索 …… 33

第3節　Pyrimidine 誘導体のダイコンおよびイネでのThiamine 生合成への利用 …… 38

第5章　考　　察 …… 45

第6章　総括および結論 …… 52

第7章　実験の部 …… 61

本文には以下の略語を使用した。

OMPm = 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidine

AMPm = 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine

CAPm = 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid

FPm = 2-Methyl-4-amino-5-formylpyrimidine

MHT = 4-Methyl-5β-hydroxyethylthiazole

2-Mercapto-MHT = 2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazole

Thiothiazolidine 体 = 3-[2'-Methyl-4'-aminopyrimidyl (5')]-methyl-4-methyl-4-hydroxy-5β-hydroxyethylthiazolidine-2-thione

D = Dragendorff

PPC = Paper chromatography

第1章　序　　論

Thiothiamine すなわち3-〔2′-Methyl-4′-aminopyrimidyl (5′)〕-methyl-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazole-2-thione(I)は化学構造上Thiamine (II)にきわめて類似した物質であるのみでなく，Thiothiamine を空気中に放置したり希薄水溶液にするとThiamine に酸化されやすく，その酸化処理により簡単にThiamine に変化する。[1~7]しかしThiothiamine をシロネズミに経口投与してもThiamine 効力がなく生体内ではThiamine に変化せずにそのまま排泄される[8~11]。

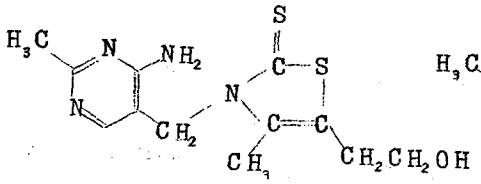
Thiamine またはThiothiamine をシロネズミに大量投与してそれらの尿への排泄状態をしらべた[12]ところ，Thiothiamine を経口投与するとThiamine にくらべ尿中排泄量が大であつて5時間尿中に多く排泄された。Thiothiamine の経口投与量を多くすると尿中Thiothiamine 排泄量は増加するが排泄率は投与量の上昇とともに低下する。Thiamine の場合，経口投与では腸管吸収に限界があり限界量以上に投与したとき尿中排泄量の上昇は小であつて排泄率が低下するのにくらべ，吸収されずに糞中に残存する量が多くなる。Thiamine を大量注射した場合，Thiamine の大部分が分解されずにそのまま尿中に排泄される。Thiothiamine の注射時には尿への排泄率はThiamine の場合にくらべてはるかに少なかつた。これらのことから(1)Thiothiamine はThiamine にくらべて腸管吸収がよいが，(2) 吸収されたThiothiamine はThiamine にくらべて動物体内ではるかに分解されやすい，ということができる。

一方マウスに対して体重10gにつきThiamine 塩酸塩ではLD_{50} 5.0mg[13]，Thiothiamine ではLD_{50} 10.0 mg[14]と報告されているよ

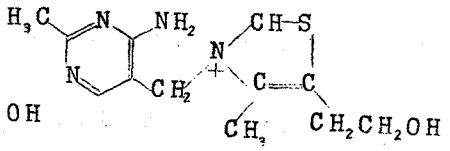
うにThiothiamineはThiamineにくらべて毒性がはるかに低く，Thiothiamineが動物体内で分解されやすいのと関連があるように思われる。Thiamineの動物体内での代謝産物として2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (OMPm) (III)が知られているが[15]，OMPmはLD_{50} 0.73mg[16]で毒性がThiamineにくらべて高い。Thiamineの毒性はThiamineが体内で安定で分解されずに排泄されるからThiamineそのものの毒性であろうが，同時に代謝産物としてOMPmを生成するのでOMPmの生成量は少いがThiamineより毒性が強いからThiamineの毒性に関与することも考えられる。Thio-thiamineは体内で多量に分解されるがもしThiamineと同じように体内でOMPmを生成すると考えるとThiothiamineがThiamineより毒性の低い点が説明できない。

これらのことからThiothiamineはThiamineと異つた代謝をうけることが予想されたので著者はThiothiamineの代謝産物を追求した。

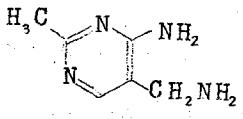
その結果Thiazole部の代謝産物として2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazole (2-Mercapto-MHT) が比較的容易に分離証明された。またPyrimidine部の代謝産物として2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (AMPm) を分離証明したが，AMPmの分離が困難であつたことについてはさらに代謝されるためと考えられたのでSaccharomyces cerevisiaeを利用する検出法を考案し，動植物についてのAMPmの代謝や検索についても研究したので以下論述する。



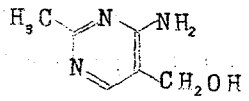
(I)



(II)



(IV)



(III)

第2章　Thiothiamineおよびその誘導体の代謝

第1節　Thiothiamineの代謝に関する従来の研究

さきに須原・入谷はThiothiamine のシロネズミに対するThiamine欠乏症治癒試験ならびに予防試験を行い，Thiothiamine は1日10μgの投与でThiamine としての効力を有せず，50～100μgの投与でも成長促進性がきわめて弱いものであることを発表した[8]。そしてそれらのシロネズミの肝蔵中のThiamine 量はThiothiamine 投与群とThiamine 投与群との間に明らかな差がみられた[9]。またThiothiamine 1日10mgを1週間連続投与したものの肝蔵についてThiothiamine の検出を行つたが全く検出されなかつた。すなわちThiothiamine は動物体内でThiamine に変化することなく，またThiothiamine として肝臓に蓄積されることもない。

またシロネズミにThiothiamine 5～50mgを腹腔内注射したときの24時間尿中Thiothiamine 排泄量は注射量の30～40%であり，Thiamine について同様に行つた場合，80%以上のThiamine が排泄されるのにくらべて体内での分解量ははるかに大きい[12]。

著者はThiothiamine の代謝機構を明らかにするためにThiothiamine の分解により生成する尿中代謝産物の検索を行つたので第2～4節においてのべる。

第２節　Thiothiamine 投与尿よりThiazole体の分離

まず予試験としてシロネズミにThiothiamine 30mg を腹腔内注射し１８時間の排泄尿を集め，そのまま東洋濾紙№５０につけ酢酸・ブタノール・水＝１・４・５（以下特記しない場合はこの溶媒によるＲｆを示す）および水飽和ブタノールを展開溶媒として上昇法 Paperchromatography（PPC）を行つた。Dragendorff試薬（Ｄ試薬）により検出された斑点は図１に示したように両溶媒においてThiothiamineに一致するものより高いＲｆ 0.9附近の斑点はThiazole化合物によるものと考えられた。またＲｆ 0.3附近にも斑点があり，そのほかＲｆ０～0.1，0.1～0.2，0.3～0.4 にも弱い斑点がみられた。

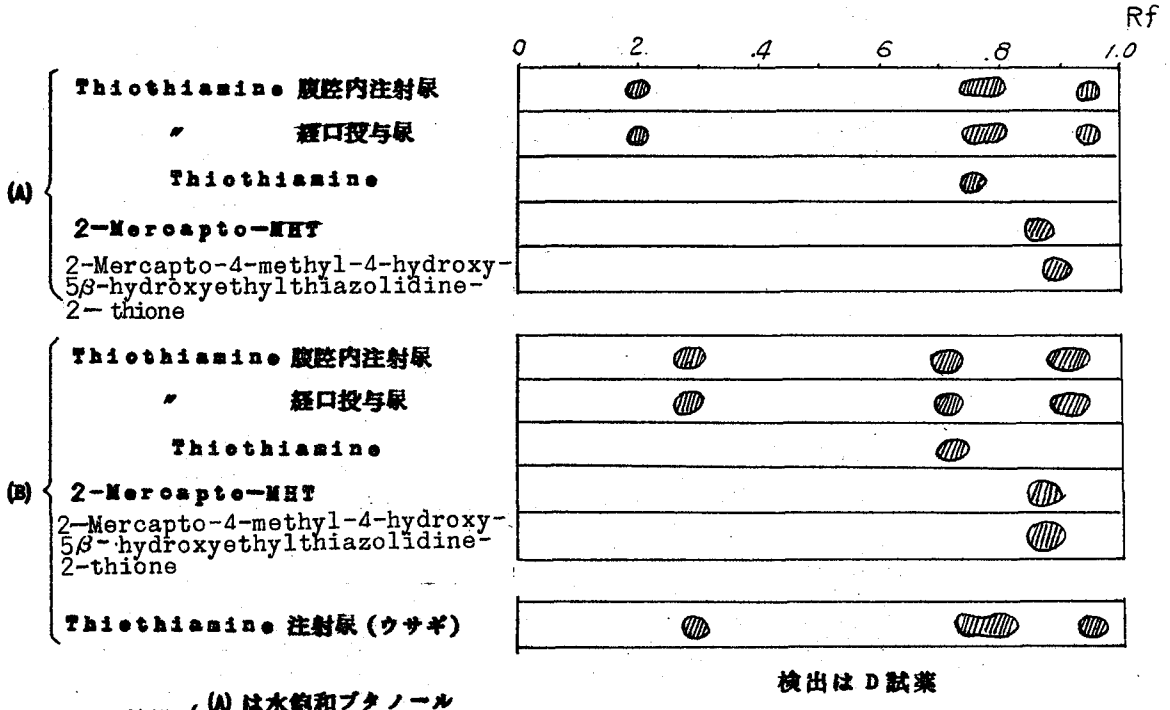
Thiothiamine を投与しない時の普通尿からはＤ試薬陽性物質は検出されなかつた。

またウサギにThiothiamine を注射した時にもシロネズミの場合とほぼ同様な斑点が検出された。

Rf0.9附近のThiazole化合物と考えられるものの確認をするために，シロネズミ１０匹にThiothiamine １日１匹あたり３０mg ずつ腹腔内注射して尿 1.2ℓ（総Thiothiamine 投与量６ｇ）を集めて試料とした。なおこの尿中にはThiothiamine 1.3ｇが検出されたが，残りの4.7gが分解されたことになる。

図２に示したように操作したが，尿をＮ NaOH アルカリ性としてNaCl 飽和でエーテル抽出を行いThiothiamine をできるだけエーテル層に移行せしめてのぞいた。水層部分をイソブタノールで抽出し，濃縮後さらに無水エタノールにて抽出する。再びエタノールを留去してその残渣に水を加え水溶性部分（画分３）をのぞき，ブタノール溶液としてセルローズ 粉末によるカラムクロマトグラフイーを行い，吸着後水飽和

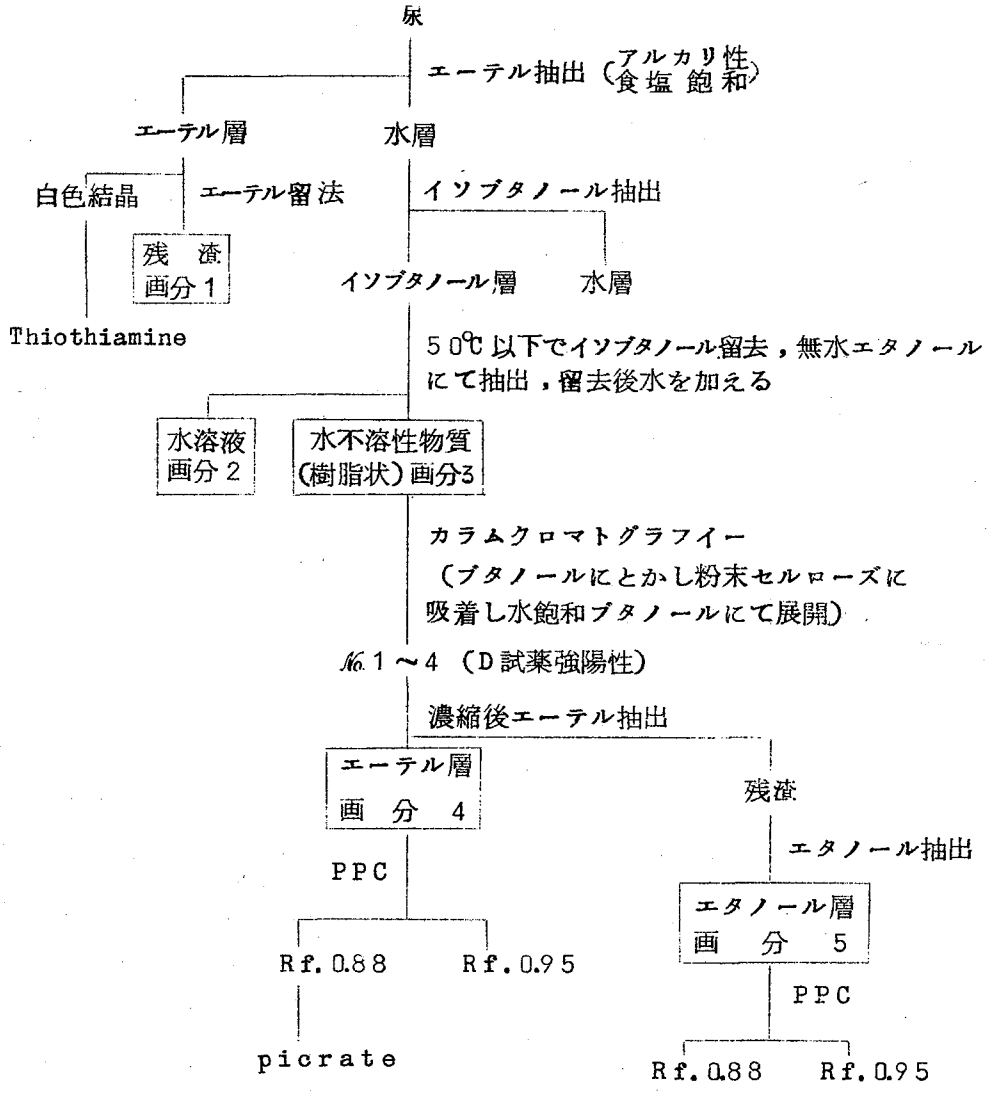
図1。 Thiethiamineの腹腔内注射尿および経口投与尿のＰＰＣ



検出はＤ試薬

溶媒 { (A) は水飽和ブタノール
(B) は酢酸・ブタノール・水（1・4・5）

図2　Thiothiamine 腹腔内注射尿より Thiazole 体の分離



ブタノールにて展開し１０ｍℓずつ流下液を取つた。

その№１～４はＤ試薬陽性でＰＰＣを行うとＤ試薬にてＲｆ0.88とＲｆ0.95の斑点が検出されＲｆ 0.88の方が強く表れた。これら２つの物質をPPCにより分離し別々にＰＰＣすると両者とも再び２斑点に分れる。№１～４の濃縮物をエーテル抽出すると主にＲｆ 0.88部が移行し（画分４），エーテル抽出した残渣についてエタノール抽出すると比較的Ｒｆ 0.95部の多い画分５が得られた。しかし画分４，５ともＲｆ 0.88部とＲｆ 0.95部の混在はさけられなかつた。

著者は2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazole（2-mercapto-MHT）の標品３種類についてＰＰＣを行つたが，そのうち２種類からはＲｆ 0.88しかみられなかつたが（図１），他のものからはＲｆ 0.88とＲｆ 0.95の２斑点が検出された。それらは図３に示したように画分４，５のＲｆ 0.88部，0.95部に一致した。また2-Mercapto-MHTがPPCにより２つの部分に分れることは池畑[17]も報告しておりＲｆ 0.88部がＤ試薬で強く呈色するという。

図3．Rf088部，095部と2-Mercapto-MHT（標品1）とのＰＰＣにおけるＲｆ値の比較

酢酸・ブタノール・水＝１・４・５

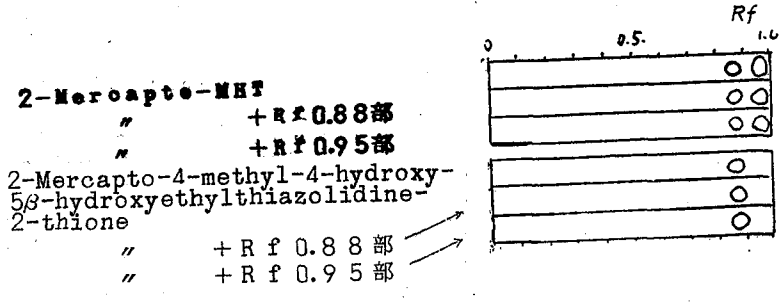
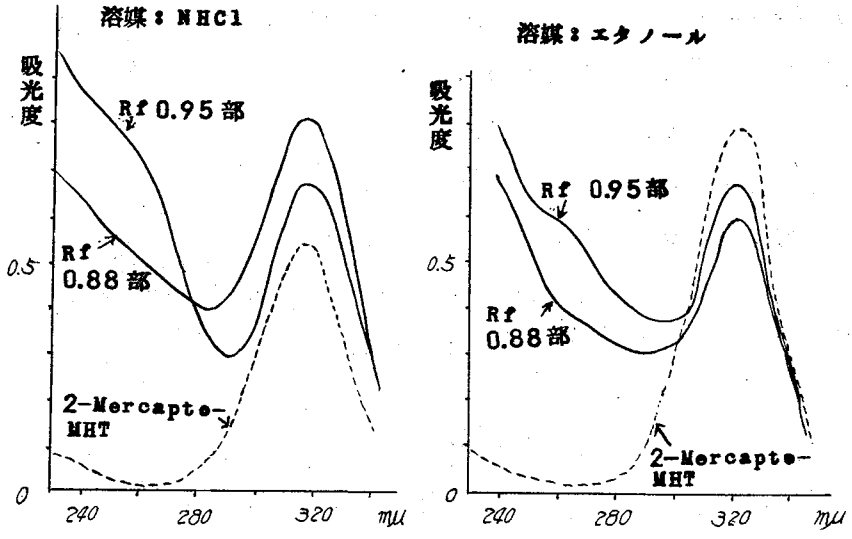


図4。 2-Mercapto-MHTとRf0.88部，0.95部の紫外部吸収スペクトル



また画分４，５についてＳＨ基の検出を行うとI_2・NaN_3反応，ニトロプルシッド反応ともに陽性であつた。

画分４，５よりＰＰＣによりＲｆ 0.８８部とＲｆ 0.９５部を分離し紫外部吸収スペクトルを測定すると図４に示したようにλmaxの附近において2-Mercapto-MHTそのものとよく一致した。

さらにＲｆ 0.８８部を分離しpicrateにするとｍｐ１１７°で2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazoleのpicrate（ｍｐ１１７°）との混融で融点降下を示さずＮの分析値も標品のpicrateの理論値に一致した。

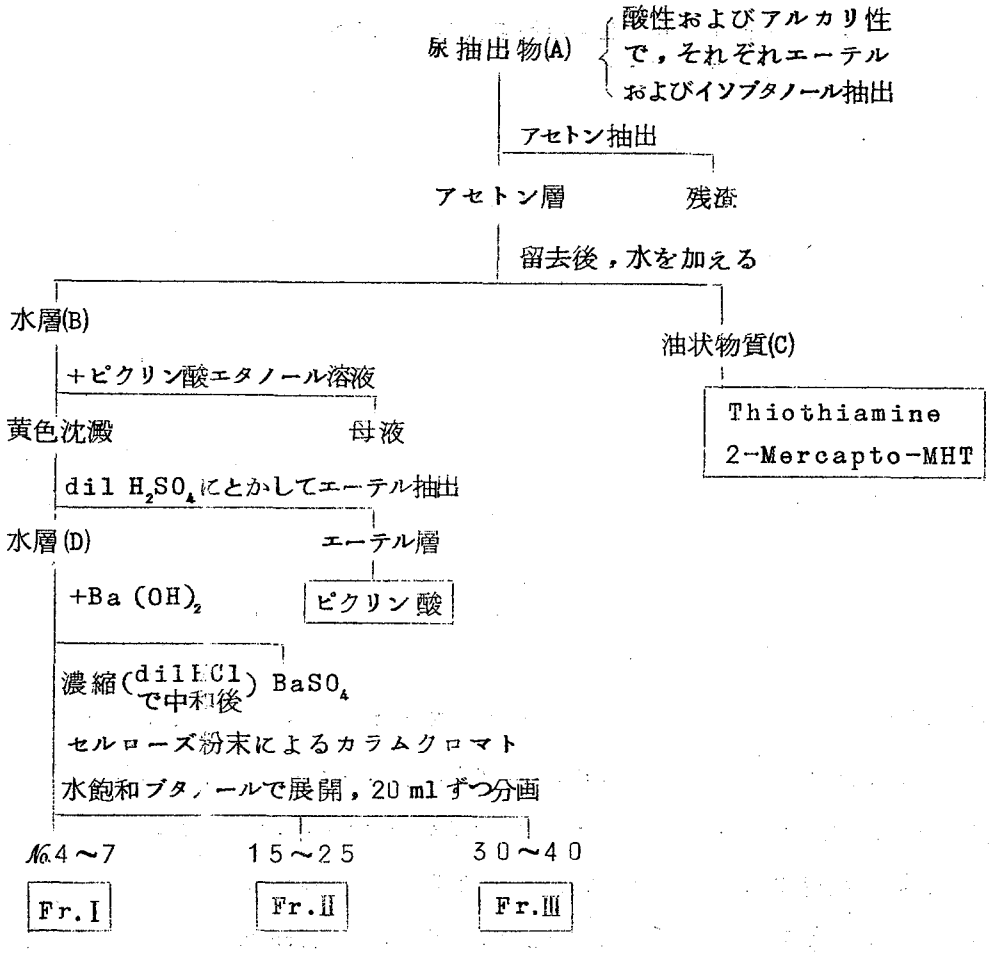
第3節　Thiothiamine 投与尿よりPyrimidine体の分離

Thiamineおよびその類似化合物のPyrimidine　核は化学的処理に対して容易には分解されないが，Thiothiamine の尿中代謝産物としてのPyrimidine体の分離証明はThiazole 体の分離にくらべてきわめて困難であつた。

すなわちシロネズミ10匹にThiothiamine を1日1匹あたり30mgずつ腹腔内注射して尿1.5ℓ（総Thiothiamine 6g）を得て試料としたがその中にThiothiamine 1.8g 含有していた。尿中のD試薬陽性物質を無機物その他より分離するために尿をNHCl　酸性としてエーテルで振とうしエーテルを分離したのち，イソブタノールで振とうしイソブタノール層を分離した。つぎに尿を中和後N NaOH　アルカリ性として酸性におけるのと同様，エーテルおよびイソブタノールにて振とう抽出した。このようにして4種類の抽出物を得，それぞれ溶媒を留去したのちPPCするとD試薬陽性物質が混在していることを知つたので全部を合して図5に示した尿抽出物(A)とした。(A)をアセトンで抽出し，アセトン留去後，少量の水を加えると水層(B)と油状物質(C)に分れた。(C)には未反応のThiothiamine および2-Mercapt-MHT　の大部分が存在することをPPCにより知つた。

水層(B)よりはPPCによりRf 0，0.06，0.3～0.4，0.65～0.7 の斑点が検出されPyrimidine体および少量のThiothiamine　の存在が予想された。それらを picrate の粗結晶として分離し，再びピクリン酸をはずし遊離の状態に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つた。水飽和ブタノール1ℓで展開し流出液を20mℓずつ分取し紫外部245mμの吸光度の高い部分を集めて№4～7（Fr.I），№15～25（Fr.II），№30～40（Fr.III）の3画分を得た。

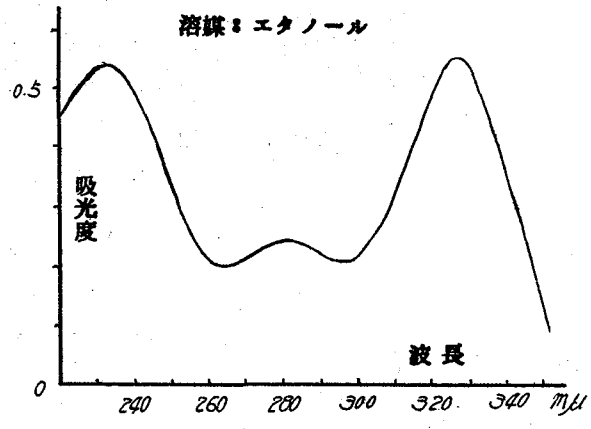
図5　Thiothiamine 腹腔内注射尿よりPyrimidine体の分離



Fr.Iよりはmp 197°の白色粉末状結晶が得られた。本品はD試薬陽性，Rf 0.73で過酸化ベンゾイルで酸化するとThiothiamine と同様Thiochrome を生成した。また紫外部吸収スペクトルを測定すると図6に示したようにλmax 230 mμ，280 mμ，320 mμ を有し，λmax

230 mμ と 320mμはThiothiamine のものに一致するが，Thiothiamine (mp 241°)に比べて融点が低く混融するとmp 236° を示した。本品は不純なThiothiamine またはその類似物質と考えられる。

図6 Fr.Iより得た白色粉末状結晶の紫外部吸収スペクトル



Fr.IIからはD試薬により多少重なつてRf 0.34とRf 0.31の斑点が検出された。これらはOMPm(Rf 0.37)，AMPm (Rf 0.34) または2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (CAPm) (Rf0.31)のいずれかと考えられる。しかしFr IIを希塩酸にとかしてPPCするとRf 0.34部はRf 0.08に移行してAMPm塩酸塩のRfと一致する。一方Rf 0.31部を抽出して紫外部吸収スペクトルを測定すると図8に示したようにCAPmのものと一致しOMPmとは区別できる。

Fr.IIIの濃縮液からはAMPm塩酸塩に一致するRf 0.08の斑点を検出した。Fr.IIに希塩酸を加えてPPCした時のRf 0.08物質はFr.III

図7．Fr．I，II，IIIのPPC

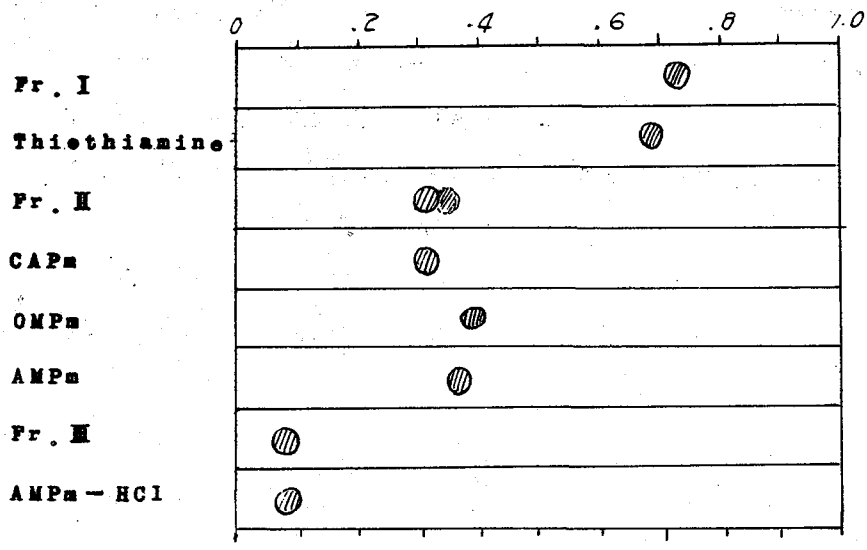
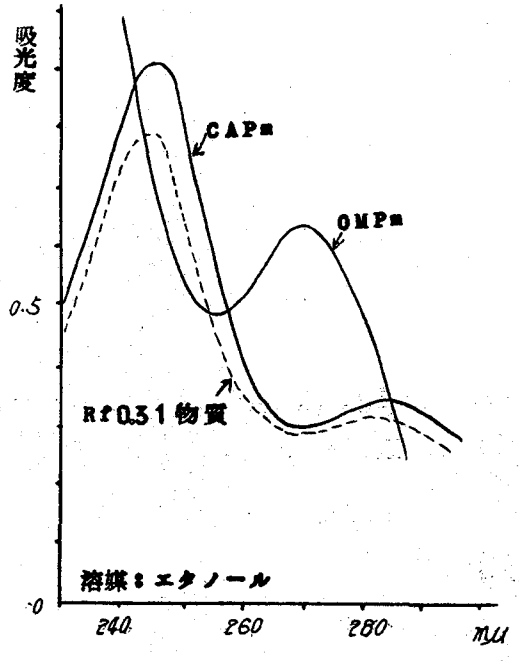
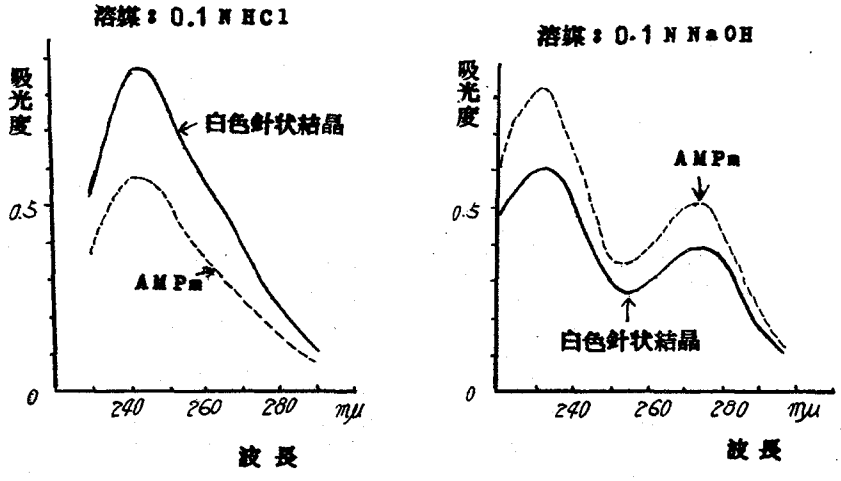


図8．Fr．IIIのRf 0.31 物質の
紫外部吸収スペクトル



と同一物質と思われたのでFr. Ⅲに合して濃縮し少量の塩酸を加えたのちエタノールを加えると半透明白色針状の結晶がえられた。本品はmp260°(分解)で2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (AMPm)塩酸塩(mp 260°, 分解)の標品との混融で融点降下を示さない。紫外部吸収スペクトルもまた図9に示したように0.1 N HCl および0.1 N NaOH の溶媒でAMPmに一致した。さらにpicrate にするとmp227°(分解)でAMPmのpicrate(mp227°~228°, 分解)との混融で融点降下を示さず，またNの分析値も標品のものとほぼ一致した。

図9. mp 260°の白色針状結晶の紫外部吸収スペクトル



以上の成績よりThiothiamine 代謝産物のPyrimidine 体として2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine が分離証明され，また2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid の存在が予想された。

第4節　Thiothiamine投与尿中2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidineならびに無機硫酸塩の排泄量

Thiothiamineの尿中代謝産物としてAMPmを分離証明したが，その尿中排泄量は少量であることが予想されたので，シロネズミにThiothiamineを腹腔内注射しまず尿中のAMPm排泄量の測定を行つた。第3章で詳述するPyrimidine　体の測定法を用いたが，この方法はThiamineのPyrimidine部とThiazole　部とを用い酵母のThiamine合成能を利用しているのでAMPmのみに特異的ではない。しかし酵母によりThiamineを合成するのはAMPm，OMPmおよび2-Methyl-4-amino-5-formylpyrimidine（FPm）などに限られており，Thiothiamineの代謝産物としてOMPm，FPmは検出されていないので，この測定法により尿中より検出されたものはAMPmとみなしてほぼ正確な値がえられているであろう。

Thiothiamine注射尿中のAMPm量を測定するにあたり次に問題になるのはThiothiamineの存在でこれがThiamineに酸化されることがあればAMPmの検出値が過大に出る。そこでThiothiamineは酸性でBrCN処理するとThiamineに影響なくThiochrome　になることが報告[18]されているのでこれを利用してThiothiamine→Thiochrome　とした。つぎにThiochrome　とAMPmを分離するために検尿をアンバーライトIRC-50にとおし，0.01N HClで脱着するとAMPmのみ脱着されてThiochrome　は残る。0.01N HCl脱着液を検液として4-Methyl-5β-hydroxyethylthiazole(MHT)添加の酵母液によりThiamineを合成せしめて測定する。別に普通尿を添加したAMPmの検量曲線を作り，これによりThiamine量をAMPm

量に換算した（第３章，第１節参照）。

このようにしてThiothiamine 注射尿中のＡＭＰｍ量を求めると表１に示したようにThiothiamine 5mg 注射尿からはＡＭＰｍは検出されず，２５ｍｇ注射尿からは２４時間尿中に0.0５ｍｇまたは0.1ｍｇのＡＭＰｍが，また５０ｍｇ注射尿からは0.1９ｍｇ～0.3６ｍｇのＡＭＰｍが検出された。この時Thiothiamine 投与量から生成される

表１　シロネズミ（１５０～２００g）にThiothiamineを腹腔内注射した時のＡＭＰｍの２４時間尿中排泄量

投与量	Thiothiamine		AMPm	
mg	mg	%	mg	%
5	2.6	(52.0)	0	0
	2.3	(46.0)	0	0
25	8.9	(34.0)	0.05	(0.3)
	10.0	(40.0)	0.1	(0.6)
50	15.4	(30.8)	0.31	(0.9)
	20.6	(41.2)	0.36	(1.0)
	20.2	(40.4)	0.22	(0.6)
	20.3	(40.6)	0.19	(0.5)
	20.0	(40.0)	0.31	(0.9)

％は投与量に対するもの

ＡＭＰｍ量を計算し，それに対するＡＭＰｍの排泄率を求めると１％またはそれ以下で非常に低い。このことからＡＭＰｍは体内でさらに代謝されることが予想される。

つぎにＡＭＰｍの生成と同時にThiazole 部の分解による$SO_4^{=}$の生成

が考えられるのでThiothiamine 50mg をシロネズミに腹腔内注射した時の尿中$SO_4^{=}$排泄量をBenzidine硫酸法により測定した。結果は表2に示したようにThiothiamine投与時の$SO_4^{=}$排泄量は非投与時より明かに増加し，48時間以後には投与前とほぼ同じ$SO_4^{=}$排泄量にもどる。各動物についてThiothiamine投与後48時間尿中$SO_4^{=}$排泄量より投与前48時間の尿中$SO_4^{=}$排泄量を差引くと，投与されたThiothiamine量の32～45%が$SO_4^{=}$にまで分解され，また分解されたThiothiamineに含まれていたSの半分以上が$SO_4^{=}$として尿中に排泄されたことになる。

表2　シロネズミ（150～200g）にThiothiamineを腹腔内注射した時の$SO_4^{=}$の尿中排泄量

シロネズミ		1		2		3	
		Thiothiamine	$SO_4^{=}$	Thiothiamine	$SO_4^{=}$	Thiothiamine	$SO_4^{=}$
普通尿中排泄量*		mg	13.6 mg	mg	16.8 mg	mg	17.0 mg
50mg投与	0～24	13.1	18.2(+4.6)	13.1	28.9(+12.1)	13.2	24.6(+7.6)
	24～48	1.8	21.8(+8.2)	2.3	15.7(－)	2.0	24.2(+7.2)
	48～72	－	12.8(－)	－	15.4(－)	－	16.8(－)
	0～48時間の排泄率**	29.8%	39.0%	30.8%	36.7%	30.4%	44.9%
50mg投与	0～24	15.1	19.7(+6.1)	16.5	26.3(+11.5)	14.9	18.5(+2.5)
	24～48	2.0	18.1(+4.5)	1.2	17.8(+1.0)	1.3	25.1(+9.1)
	48～72	－	16.2(+2.6)	－	13.1(－)	－	18.0(+1.0)
	0～48時間の排泄率**	34.2%	32.1%	35.4%	37.9%	32.4%	35.1%

* 48時間分を合して測定し24時間分として出した。

** 排泄率は投与量に対するもの

（ ）内は試料投与による$SO_4^{=}$排泄量の増加

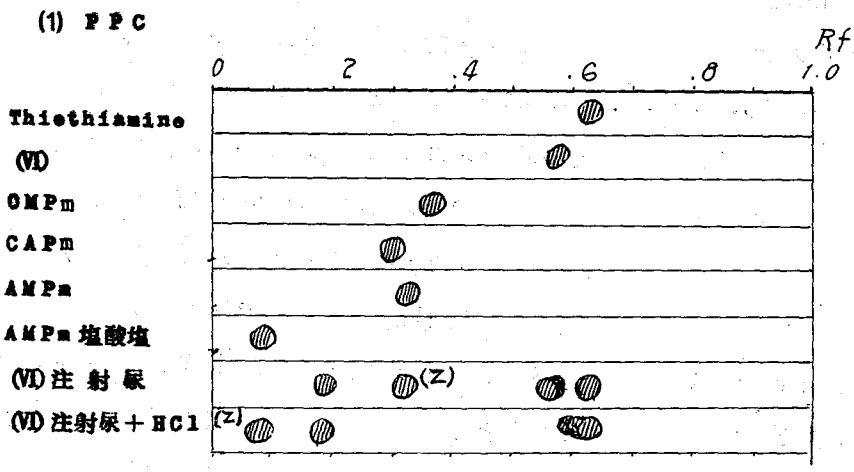
以上の成績からThiothiamineの大量投与で尿中AMPmの検出された量は少なかつたが，$SO_4^{=}$として排泄される量はThiamine投与尿（次節参照）または普通尿に比べて著しく高くThiothiamineがシロネズミ体内で速かに，かつ大量に分解されることが明らかになつた。

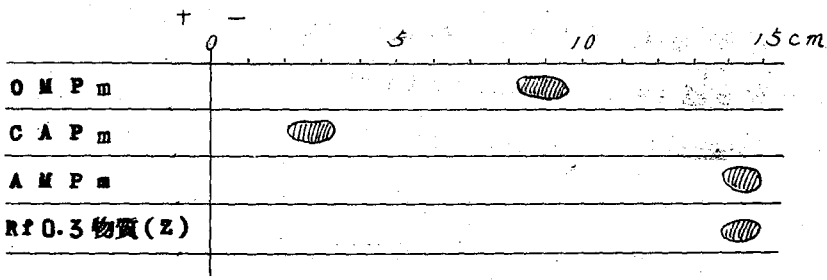
第5節　Thiothiamine誘導体投与時の尿中排泄量と無機硫酸塩の排泄量

Thiothiamineをシロネズミに投与した時Thiamineに比べ，より容易に分解されて，前節において述べたように一部は$SO_4^{=}$にまで代謝されることが判つた。Thiothiamineの分解により2-Mercapto-MHTおよびAMPmの得られる経路は単なるThiothiamineの加水分解を仮定しては説明できない。Thiothiamine→AMPmの分解としてはThiazole核の開環が予想されるので第5章で述べるようにその前階梯としてThiothiazolidine体(VI)すなわち3-〔2′-Methyl-4′-aminopyrimidiyl (5′)〕-methyl-4-methyl-4-hydroxy-5β-hydroxyethylthiazolidine-2-thioneが推定される。本物質は塩酸処理で定量的にThiothiamineに変化するのでThiothiamineに準じて定量[10]することができ，その代謝をThiothiamineのそれと比較してみた。

Thiothiazolidine体の尿中代謝産物をしらべるためにThiothiazolidine体50mgをシロネズミに腹腔内注射しその尿を60°以下で濃縮してPPCを行つた。結果は図10に示したようにD試薬によりRf 0.63（Thiothiamineに一致する），0.56（Thiothiazolidine体に一致する），0.30(Z)および0.18が検出された。Rf 0.3(Z)はOMPm，CAPm，AMPmのRfに近くそのいずれかと思われたが尿濃縮液に希塩酸を加えてPPCすると(Z)はRf 0.1に変わり

図10．Thiethiazolidine体(VI)注射尿のＰＰＣと
濾紙電気泳動





ＡＭＰｍ塩酸塩に一致するので(Z)はＡＭＰｍでありＯＭＰｍ，ＣＡＰｍではないと思われた。さらに濾紙電気泳動（６％酢酸水，５００Ｖ，２時間）すると陰極側へ１４～１５cm移動してＡＭＰｍに一致し図１０に示したようにＣＡＰｍ，ＯＭＰｍとは明らかに区別されＡＭＰｍであることが確実となつた。

Thiothiazolidine 体をシロネズミ（体重１５０～２００ g）に腹腔内注射して２４時間尿中のＡＭＰｍ排泄量をThiothiamine の場合と同じ方法で測定すると２５ｍｇ投与時でそれぞれ0.09，0.12，0.13，0.13，0.10，0.09，0.12，0.12 ｍｇとなり８例の平均値は0.11ｍｇであつた。また５０ｍｇ投与時のＡＭＰｍ排泄量は0.14，0.36，0.37 mgで３例の平均値は0.29ｍｇであつた。したがつてThiothiazolidine体投与量の１％弱がＡＭＰｍとして尿中に排泄されたことになりThiothiamine 投与時のＡＭＰｍ排泄率とほぼ同じであつた。

つぎにThiothiazolidine 体がThiothiamine と同じように代謝されてＡＭＰｍを生成するとすれば当然尿中$SO_4^{=}$ 排泄量の増加が考えられるので，Thiothiazolidine 体をシロネズミに腹腔内注射した時の２４時間尿中（毎日連続して投与しているので前日の試料よりの排泄量も加算されていると思われる）Thiothiazolidine 体排泄量と$SO_4^{=}$ 排泄量の測定をThiamine，Thiothiamine 投与時と比較しつつ行つた。結果は表３に示したようにThiothiazolidine 体はThiothiamine 以上に体内で分解されやすくその排泄率はわずか１３～２０％にすぎず，$SO_4^{=}$ 排泄量は非投与時より明らかに増加しThiothiamine 投与時より多い。Thiothiazolidine 体投与時の尿中$SO_4^{=}$排泄量より実験に用いた同じ動物（３匹）の非投与時の$SO_4^{=}$排泄量の平均値を差引き投与されたThiothiazolidine 体の$SO_4^{=}$ としての排泄率を求めると７０％余りとなりその排泄率はきわめて高い。またThiamine では体内で分解されにくく７３～８５％が未変化のまま尿中に排泄され，$SO_4^{=}$ 排泄量は非投与時と差がなかつた。さらに2-Mercapto-MHT 投与時にはその約４０％が$SO_4^{=}$ として尿中に排泄されることを知つた。

表3　シロネズミ（150～200g）にThiamine，Thiothiamine，Thiothiazolidine体および2-Mercapto-MHTを腹腔内注射した時の$SO_4^{=}$の24時間尿中排泄量*の比較

(a)　25mg投与

	試料	(平均値)	$SO_4^{=}$	(平均値)
	mg	mg　%	mg	mg
Thiamine	20.8，21.8	21.3 (85.2)	5.9，6.1	6.0
Thiothiamine	8.9，10.0，	9.5 (37.8)	15.6，14.0	14.8
Thiothiazolidine体	3.2，5.1，4.2，5.3，4.0，3.6，3.5，4.7	4.2 (16.8)	9.7，17.1，22.2 23.5，7.5，14.8，24.3，23.2	17.8

(b)　50mg投与

Thiamine	32.6，36.8，40.5	36.6 (73.2)	7.0，7.0，9.4	7.8
Thiothiamine	15.4，20.6，20.2	18.7 (37.4)	16.3，16.3，27.3	20.0
Thiothiazolidine体	10.1，9.4，8.5	9.3 (18.6)	26.0，36.6，30.9	31.2
2-Mercapto-MHT 25 mg			17.8，18.6	18.2

普通尿中$SO_4^{=}$排泄量（mg）は8.6，4.6，3.7，6.1，8.5，7.3，10.6……平均値 7.0

* 試料を連日投与したので前の投与による排泄量が加算されているかも知れない。

（　）内は投与量に対する排泄率

またThiothiazolidine 体注射尿をＰＰＣすると図１０に示したようにThiothiamineが検出されたのでThiothiamine の測定を行うと２５ｍｇ注射時で約0.0６ｍｇが検出され，５０ｍｇ注射時では約1.0ｍｇのThiothiamine が検出された（表９参照）。
逆にThiothiamine 注射尿についてもThiothiazolidine 体の検出を行うと２５ｍｇ注射では検出されなかつたが，５０ｍｇ注射時では約１ｍｇのThiothiazolidine 体が検出された。したがつて動物体内でThiothiamine と Thiothiazolidine体の互変が多少起りうるものと考えられる。

以上の成績によりThiothiazolidine 体(Ⅵ)の代謝はThiothiamineの代謝に重要な示唆を与えるものと考えられ，Thiothiazolidine体(Ⅵ)またはその開環によつて生成するDithiourethan 体(Ⅶ)をThiothiamine 代謝の中間体とするとＡＭＰｍの生成ならびに$SO_4^{=}$までの完全分解がよく説明されるので第５章考察においてThiothiamineの代謝経路を推定し論議した。

第 3 章　2—Methyl—4—amino—5—aminomethyl—pyrimidineの代謝

第1節　Saccharomyces cerevisiae を用いる 2—Methyl—4—amino—5—aminomethylpyrimidine およびその類似体の定量法

Thiothiamineの尿中代謝産物として2—Methyl—4—amino—5—aminomethylpyrimidine (AMPm)を分離証明したが，AMPm量はThiothiamine分解量にくらべてきわめて少く，AMPmがさらに代謝されることが予想されたのでAMPmの代謝を研究する必要があり，まずAMPmの定量法を検討した。

AMPmの定量法としては新谷のOMPmの定量法[20]を利用する方法と水上らの方法[21]などが考えられる。著者は尿中および肝磨液中のAMPmの測定法を目的としている。新谷の方法は245mμの吸光度によるもので尿のばあい盲検値のとり方により定量値にかなり変動があることが予想され肝磨砕液では盲螢光のため定量が不可能となる。また水上らの方法はニンヒドリン発色を利用するもので生体試料では呈色物質が多いためほとんど応用できないと考えられる。

一方宮川[22]はPyrimidine体とMHTをReader培地に添加し酵母によるThiamine合成試験を行い，約20種のPyrimidine誘導体のうち，AMPm, OMPm, FPmの3種がThiamine合成材料になりうることを報告している。著者はこれを利用してAMPmの測定法を検討した。

図１１　　ＡＭＰｍ定量のための酵母液の培養法

長時間法

培地４ｍℓ＋ＭＨＴ10^{-3}モル0.15ｍℓ＋ＡＭＰｍ10^{-3}モル0.12ｍℓ以下
（または検液）

↓

滅　菌

↓

２０時間前培養した酵母をうえる。

↓

２５°～３０°で４０時間培養

短時間法

ＭＨＴ添加の全培地に酵母をうえる（ＭＨＴは10^{-3}モル0.15ｍℓ/4ｍℓ）

↓

２５°～３０°で１夜培養

↓

４ｍℓずつ分注後，ＡＭＰｍ10^{-3}モル
0.12ｍℓ以下（または検液）添加

↓

３７°で３～５時間培養

すなわちSaccharomyces cerevisiaeを２倍濃度Reader培地で培養する時にPyrimidine体とＭＨＴを添加し，その時合成されたThiamine量より検液中のPyrimidine体量を算出した。培養法としてまず図１１に示した長時間法を行つたが，この方法では測定に３日を要するので，できるだけ所要時間を短縮するよう検討した。その結果案出されたのが図１１に示した短時間法である。本法では長時間法にくらべてThiamine合成量が多少低くなるが，両方法で培養して試料中のAMPm

量の測定を行うと表4に示したようにほぼ同一の測定値が得られた。長時間法にくらべて短時間法の長所は 1. 時間がはるかに短縮できる。2. そのため雑菌の繁殖による影響がみられず無菌操作が不必要である。3. 培養時間が短いため結合型Thiamine量が少く酵素処理を省略することができることなどがあげられ短時間法の方が簡便である。

生体試料中のAMPm量を測定する時には同一試料添加のAMPm検量曲線を用いることによりほぼ満足な結果が得られた。またThiamineを含有する試料についてはMHT添加時と無添加時のThiamine合成量の差をAMPmにより生成されたThiamine量として算出することができる（図12参照）。

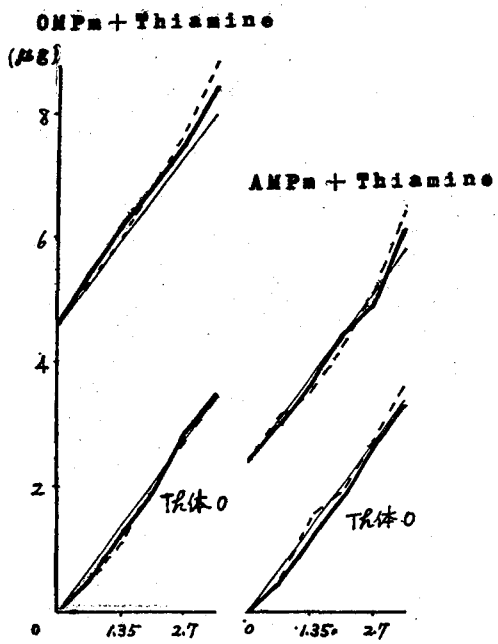
本法によりAMPmとOMPmの定量が可能であるが，それらの定量値の再現性を尿中排泄量についてしらべると表5のとおりで，かなり再現性があるので本法は定量法として利用できるものと思われる。

表4　培養条件とThiamine定量時の酵素処理のちがいによるAMPm定量値の比較

培養法	長時間	短時間			培養温度	培養時間
酵素処理	60℃,2時間	しない	60℃,1時間	60℃2時間		
試料1	10.07mg	10.06mg	9.91mg	9.91mg	25℃	5
2				1.01	〃	〃
2				1.05	〃	40
3	3.90	3.99			〃	5
4	7.41	7.88			〃	〃
5	10.02	10.51			〃	〃
6		1.92	2.03		37	3
6		1.92			〃	5
7		1.27	1.25		〃	3
8		1.19	1.13		〃	〃
9		1.32	1.46		〃	〃

試料，1，3，4，5はAMPm100mg／日を4日腹腔内注射した尿
2はAMPm100mg腹腔内注射後24～28時間の尿
6，7，8，9はAMPmを肝臓磨砕液に添加したもの

図１２　Thiamineが混在する場合



Thiamine添加量（μg）

——— １００％Thiamineを合成した場合

━━━ Pyrimidine体 10^{-3}モル 0.02mℓ+Thiamine

- - - - 同上に普通尿 0.03 mℓ添加

体重１５０～２００gの雄シロネズミにＡＭＰｍ１００mgを腹腔内注射した時の２４時間尿中ＡＭＰｍ排泄量は表５から分るように2.6～6.1ｍｇできわめて少く，ＡＭＰｍが体内でかなり分解されることが明らかになつた。

つぎにこの定量法を用いつつＡＭＰｍの尿中代謝産物の追求を行つた。

表５　ＡＭＰｍ，ＯＭＰｍの尿中排泄量測定値の再現性

長時間法

AMPm100mg腹腔内注射２４時間尿		OMPm4.7mg ４時間尿５mℓ
(1) １１mℓ	(2) １３mℓ	
2.20mg	4.50mg	0.84mg
3.24	6.80	1.26
4.05	3.63	1.12
3.93	6.56	1.68
3.00	5.47	0.73
5.08	5.07	0.64
	4.65	0.99
	5.46	1.13
3.58±0.99	5.27±1.05	1.05±0.33

短時間法

AMPm100mg腹腔内注射２４時間尿		
(3) １０mℓ	(4) ８mℓ	(5) １２mℓ
5.06mg	4.75mg	2.53mg
6.56	4.38	2.53
6.75	3.82	2.09
6.75	3.88	2.71
5.63	3.28	2.61
5.80	4.38	3.30
6.09±0.77	4.08±0.60	2.63±0.39

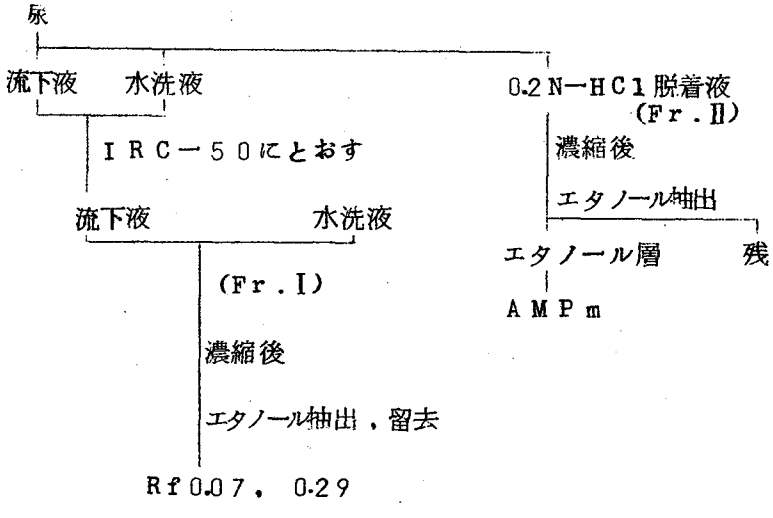
第２節　２－Methyl－4－amino－5－aminomethyl－pyrimidine投与尿より代謝産物の分離

Thiothiamineの代謝産物はＡＭＰｍでありThiamineの代謝産物はＯＭＰｍであるので，ＯＭＰｍと比較しつつＡＭＰｍの代謝物を研究した。

シロネズミ５匹に１日１匹あたりＡＭＰｍ１００ｍｇを腹腔内注射し，１５９ｍℓ（総ＡＭＰｍ投与量1.5ｇ)の尿を得て試料とし図１３の如く操作した。

まず尿をパームチットに通すとＡＭＰｍの大部分が吸着される。吸着時の流下液を水洗液に合してアンバーライトＩＲＣ－５０に通し，再びその流下液と水洗液を合して濃縮した。それをエタノールで抽出し，エタノール留去後希塩酸にとかしてＰＰＣするとＤ試薬にてRf 0.07 0.29 を検出した。

図１３　シロネズミにＡＭＰｍを腹腔内注射した時の尿中主要代謝産物の分離

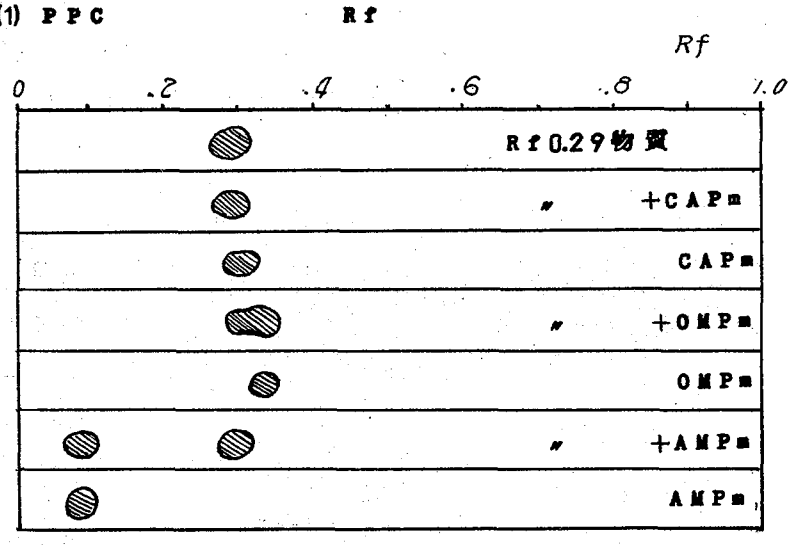


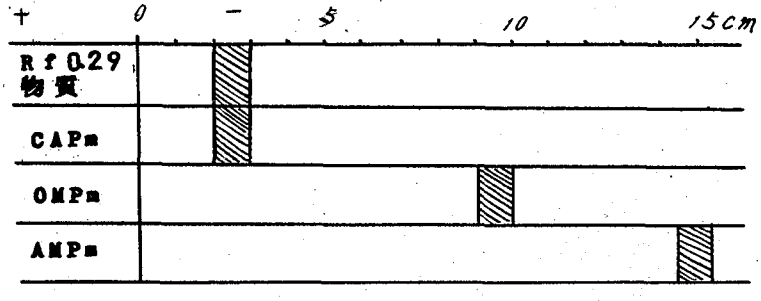
Ｒｆ 0.07 はＡＭＰｍ塩酸塩の斑点によく一致し，Ｒｆ 0.29 はＣＡＰｍやＯＭＰｍのもの

に近い。

しかし図１４に示したようにＲｆ0.２９物質はＯＭＰｍより2—Methyl—4—amino—5—pyrimidinecarboxylic acid（ＣＡＰｍ）によく一致し，濾紙電気泳動するとＯＭＰｍとは明らかに区別できてＣＡＰｍと一致した。また図１５に示したようにＲｆ0.２９物質の紫外部吸収スペクトルもＣＡＰｍのものに一致した。

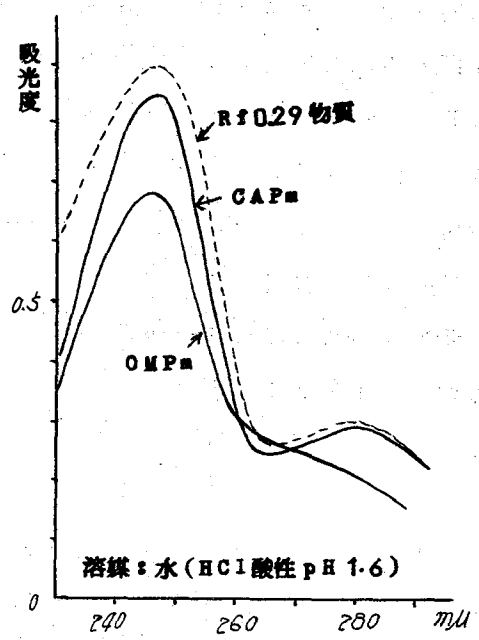
図１４．Ｒｆ0.２９物質のＰＰＣおよび濾紙電気泳動





ＡＭＰｍは塩酸塩

図15．Rf0.29物質の紫外部吸収スペクトル



さらにRf 0.29物質を確認するためにPPCによりRf 0.29部を分離して抽出し，その濃縮液よりpicrateを作つた。本品はmp 226°（分解）でCAPmのpicrateの標品（mp 226°，分解）との混融試験で融点降下を示さなかつた。分析値も理論値とよく一致した。

体重150～200gの雄シロネズミにAMPm 100mgを腹腔内注射した時の24時間尿中AMPm排泄量は2.6～6mgできわめて少いことを指摘したが，同時に代謝産物として分離証明されたCAPm量を測定（新谷の方法を利用して紫外部吸収245mμにおける吸光度より測定）すると約2.3mgでありCAPm排泄量も少かつた。

またシロネズミ（体重150～200g）にCAPm 50mgを腹腔内注射して24時間尿中CAPm排泄量を新谷の方法で同様に測定すると投与量の63.8％が検出されたのでCAPmは動物体内でかなり安定なものと思われる。したがつてAMPmの尿中代謝産物としてCAPmが分離証明されたが，CAPm排泄量が少いので体内ではAMPm→CAPm以外の代謝経路も考えられる。

一方ＯＭＰｍは毒性が強く多量に投与できないので，体重１５０～200ｇの雄シロネズミにＯＭＰ 4.7ｍｇ腹腔内注射すると４時間尿中に 1.0５ｍｇのＯＭＰｍが排泄され（第３章，第１節の方法で測定），これは投与量の約２２％に相当する（表５参照）。ＯＭＰｍの尿中排泄率とＡＭＰｍ，ＣＡＰｍのそれとは投与量も採尿時間もちがうので比較するのが困難であるが，AMPｍ投与量の約 $\frac{1}{30}$ （モル濃度での比較）の少量のＯＭＰｍの投与で４時間尿中に投与量の２２％が排泄されているのはＡＭＰｍにくらべてはるかに代謝されにくいことを意味するのであろう。新谷もまた[20]ＯＭＰｍ２００ｍｇをウサギに注射した場合，投与量の７６％がＣＡＰｍとして，１０％がＯＭＰｍとして尿中に排泄されることを認め，ＯＭＰｍではPyrimidine核の開裂はあまり考えられないという。

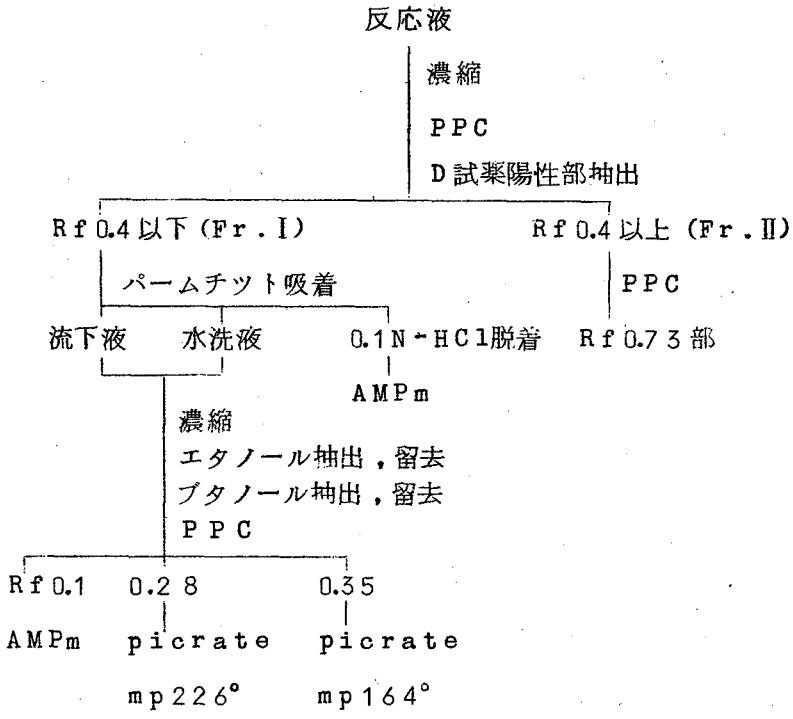
以上のことからＡＭＰｍはＯＭＰｍやＣＡＰｍなどの類似化合物にくらべて動物体内で分解されやすいことが明らかになつたが，このことはPyrimidine 化合物の代謝に関する問題で興味あることと思われる。

つぎにＡＭＰｍの代謝についてさらに知見を得るために肝磨砕液による分解産物を追求した。

第３節　2—Methyl—4—amino—5—aminomethyl pyrimidine の肝臓磨砕液による分解産物

シロネズミ肝臓磨砕液にＡＭＰｍを添加し，PH 7.2，３７°で３時間放置したのち，その反応液を図１６に示したように分離しＡＭＰｍの分解産物を追求した。まず反応液を濃縮して４０×４０cmの濾紙に帯状につけてPPCし，Ｄ試薬陽性物質をＲｆ 0.4以下（Ｆｒ．Ⅰ）とＲｆ 0.4以上（Ｆｒ．Ⅱ）に分けて５０％エタノールで抽出した。

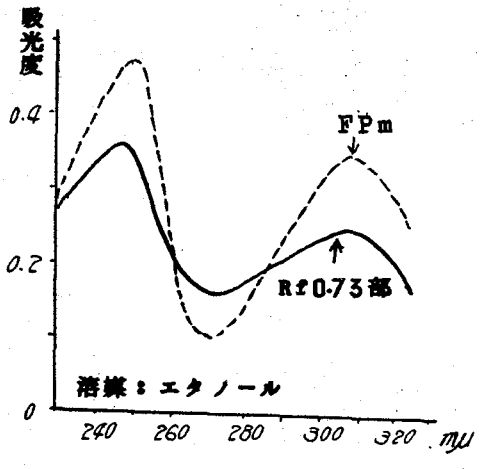
図 16　AMPm のシロネズミ肝臓磨砕液による分解産物の分離



Fr. I はパームチットに通してＡＭＰｍを吸着せしめて除き，吸着時の流下液と水洗液を合して濃縮した。それをエタノールその他の有機溶媒で抽出し無機物より分離した。溶媒を留去したのち希塩酸にとかしてＰＰＣするとＲｆ 0.1，0.28，0.35 がＤ試薬にて検出された。Ｒｆ 0.1 はＡＭＰｍ塩酸塩に一致する。Ｒｆ 0.28 部を集めて抽出し，その濃縮物より picrateを生成するとｍｐ２２６°の結晶が得られた。本品はＣＡＰｍの picrateの標品との混融で融点降下を示さず，分析値もＣＡＰｍ picrate の標品のものとよく一致した。Ｒｆ 0.35 部よりｍｐ１６４°の picrate を得たが確認するには至つていない。

Ｆｒ．Ⅱはさらに ＰＰＣするとＤ試薬にてＲｆ 0.7 3の斑点が検出された。これはＦＰｍのものに一致し抽出して紫外部吸収スペクトルの測定を行うと図１７に示す如くＦＰｍにほぼ一致した。

図１７．Rf 0.73 部の紫外部吸収スペクトル



以上の成績よりＡＭＰｍと肝臓磨砕液との反応生成物としてＣＡＰｍを分離証明し，これはＡＭＰｍ注射尿中の代謝産物と一致した。

またＦＰｍの存在も予想されるのでＡＭＰｍはアルデヒド体をへてＣＡＰｍに変化することが予想される。

第4章　Pyrimidine誘導体の検索とThiamine生合成への利用

第1節　Thiamine生合成に関する従来の研究

微生物や植物がThiamineを生合成することは古くから知られているが，その経路についてはまだ明らかにされていない。

酵母のThiamine合成経路はまず2—Methyl—4-amino—5—hydroxymethylpyrimidine (OMPm) がOMPm—pyrophosphateとなり，4—Methyl—5β—hydroxyethylthiazole (MHT) がMHT—monophosphateとなつて両者の縮合酵素によりThiamineのPhosphateとなることが報告されている。[26),27)]

植物界におけるThiamineの生合成については未だ明らかでないが，分離した根ではPyrimidine体とThiazole体との添加でThiamineが合成されている。[28~31)] また植物の発芽時や成長期にもPyrimidine体とThiazole体よりThiamineが生合成されることも発表されているが[32)]，この時Thiamineの合成経路の最終段階においてPyrimidine体とThiazole体の縮合が考えられる。

第2節　Pyrimidine誘導体の検索

(I)　植物体よりPyrimidine体の検出

第3章，第1節でのべたPyrimidine体の定量法により植物中のPyrimidine体の検出を行うと表6に示したようにイネの葉，ヌカ

発芽後１週間目のエンドウにPyrimidine体が検出された。Pyrimidine体としてはOMPmまたは２－Methyl－4－amino－5－aminomethyl pyrimidine (AMPm)が考えられるがＡＭＰｍとして算出した。

表６　MHT添加酵母による植物体より Pyrimidine体の検出

(100gあたりμg)

	Thiamine	Pyrimidine (AMPm)
イ　ネ　葉	27 30	20 10
ヌ　カ	1350	197
発芽エンドウ	85	35

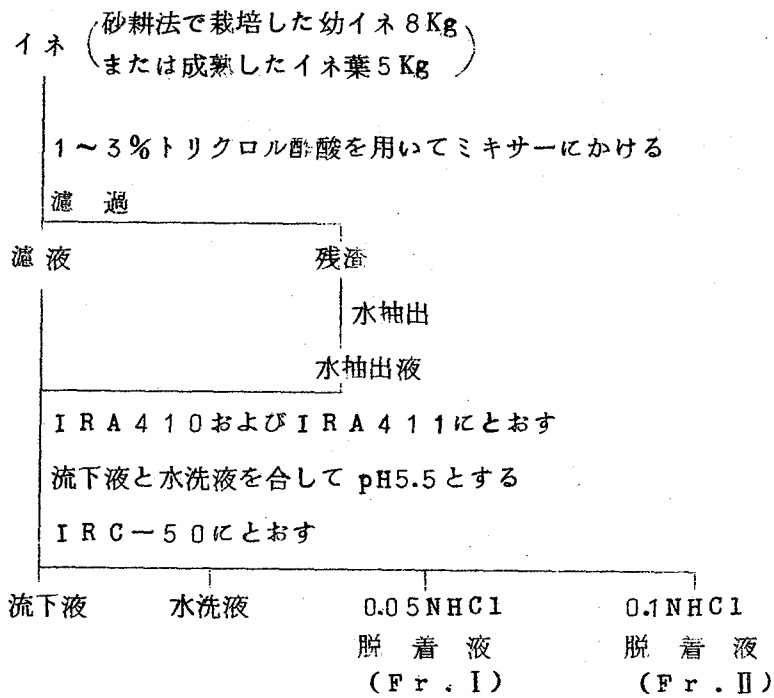
その他モヤシ（市販品），キヌサヤエンドウ，ジャガイモの葉，クローバー，ラッキヨウなどについても同様にPyrimidine体の検出を行つたが明らかな検出はできなかつた。

(II)　イネ葉より2－Methyl－4－amino－5－aminomethylpyrimidineの分離証明

(I)でしらべた結果，Thiamine含量に比べPyrimidine体の含有比の比較的高いイネ葉よりPyrimidine 体の分離を試みた。材料として収穫期前の１０月にイネ葉を採集して用いたが，それ以外の季節には実験室において２０～３０°でハイポネクス液を供給しつつ，砂耕法で育てたイネの発芽後２～４週間のものの葉，種，根全体を用いた。

それらの試料を図１８に示したように分離した。

図１８　イネよりＡＭＰｍの分離



すなわちトリクロル酢酸液を用いてイネをミキサーにかけて磨砕し，抽出液を陰イオン交換樹脂アンバーライトＩＲＡ-４１０，つづいてＩＲＡ－４１１柱に通して抽出液中のトリクロル酢酸や着色物質の多くを吸着せしめてのぞいた。その流下液と水洗液を合して pH 5.5として陽イオン交換樹脂ＩＲＣ－５０柱に通して水洗後，0.05ＮＨＣｌで脱着し（Ｆｒ．Ⅰ），つぎに0.1ＮＨＣｌで脱着した（Ｆｒ．Ⅱ）。Ｆｒ．Ⅰは６０°以下で濃縮し数回エタノール抽出をくりかえしたのち，エタノールを留去してＰＰＣまたは薄層クロマトグラフィー（溶媒は酢酸．ブタノール．水＝１．４．５）を行いＤ試薬陽性部分を分離して５０％エタノールで抽出し，抽出液を濃縮した（Ｆｒ．Ⅰ′）。

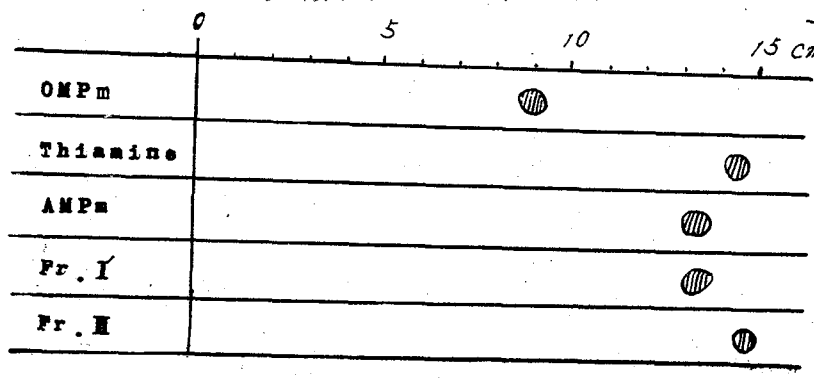
Ｆｒ．Ⅰ′とＦｒ．Ⅱの濃縮物について濾紙電気泳動を行うと図１９に示

したようにＦｒ．Ⅰ′はＡＭＰｍに，Ｆｒ．ⅡはThiamineに一致した。またＦｒ．ⅡはＢｒＣＮ酸化でThiochromeとなり，RfもThiamineに一致した。Ｆｒ．Ⅰ′のＲｆは0.2～0.32であつた。

つぎにＦｒ．Ⅰ′にピクリン酸飽和エタノール溶液を加えてpicrateを分離した。本品はｍｐ２２７°（分解）でＡＭＰｍ picrateの標品（ｍｐ２２８°）との混融で融点降下を示さず，また赤外線吸収スペクトルを測定すると図２０のようにＡＭＰｍ picrateのものに一致した。

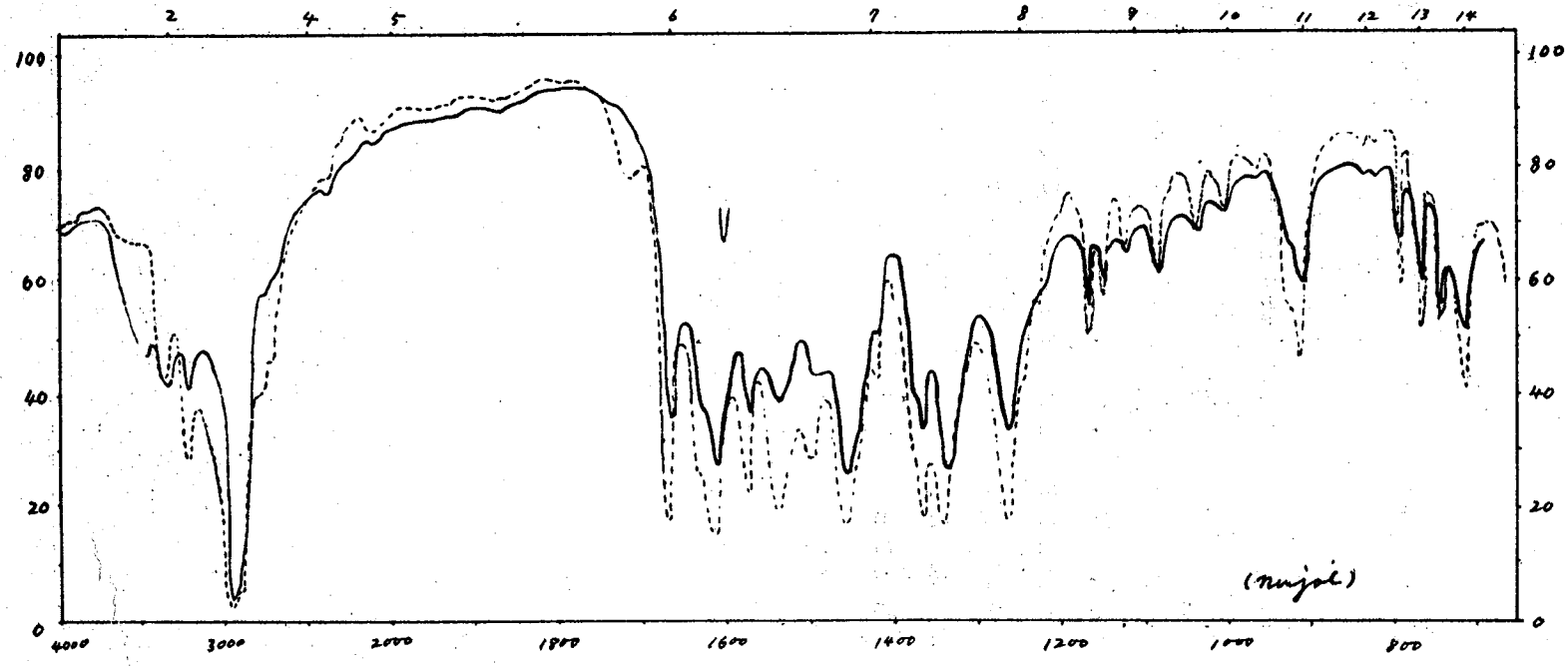
以上の成績によりイネにＡＭＰｍが存在することが証明されたので，つぎに植物体内にPyrimidine体が存在する場合Thiamineの生合成に利用されるかどうかについて検討した。

図１９　イネＦｒ．Ⅰ′の濾紙電気泳動
（６％酢酸水，５００Ｖ，２時間）



検出はＤ試薬

図20　mp 227°の picrate の赤外線吸収スペクトルⅣ



点線：AMPm picrate
実線：mp 227°の Picrate

第3節　Pyrimidine誘導体のダイコンおよびイネでのThiamine生合成への利用

(I)　植物の磨砕抽出液にPyrimidine体とThiazole体を添加した時のThiamineの生成

発芽エンドウ，発芽アズキ，クローバー，サンドマメ，モヤシ，ジヤガイモ，タマネギ，ニラ，発芽ダイコン，イネの葉の磨砕抽出液にOMPmまたはAMPmとMHTを添加して放置すると表7に示したような結果がえられた。なかでも発芽ダイコンとイネにおいて常にThiamine の生成がみられた。また参考までにシロネズミ肝磨砕液についても同様に行つたがAMPm ＋ MHT，OMPm ＋ MHT添加によるThiamineの生成はみられなかつた。

つぎに活動中の植物体内でのPyrimidine体とThiazole体のThiamine 合成への利用についてしらべた。

表7　植物の磨砕抽出液にＯＭＰｍまたはＡＭＰｍとＭＨＴを加えて放置（pH 5.4～5.8，37℃，3時間）した時のThiamine測定値
植物10g，磨砕抽出液10～50 mℓにつきOMPm，AMPm，MHTはそれぞれ10^{-7}モル添加

（Thiamine量 μg/10g）

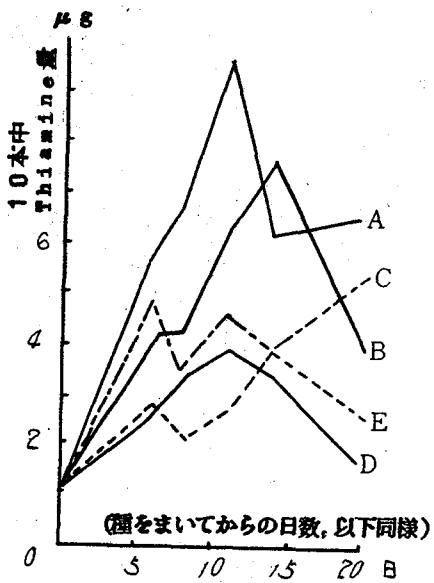
	無添加	OMPm+MHT		AMPm+MHT	
発芽ダイコン	2.4	4.0	(+1.6)	3.9	(+1.5)
〃	3.5	4.7	(+1.2)	3.8	(+0.3)
〃	6.1	7.7	(+1.6)	7.0	(+0.9)
〃	0.7	1.1	(+0.4)	0.7	(0)
イネ	2.7	5.4	(+2.7)	6.6	(+1.3)
〃	1.7	2.2	(+0.5)	1.6	
〃	7.2			9.9	(+2.7)
〃	5.0			6.2	(+1.2)
〃	5.9			6.5	(+0.6)
発芽エンドウ	8.4			12.8	(+4.4)
〃	4.7			4.0	
〃	9.1	8.5		11.3	(+2.2)
〃	3.9	3.5		2.8	
発芽アズキ	6.5			9.8	(+3.3)
〃	3.4			2.6	
サンドマメ	7.0			6.2	
クローバ	3.5			4.1	(+0.6)
〃	2.0			4.7	(+2.7)
〃	16.6			16.0	
もやし	8.9			5.1	
ジャガイモ	9.8	10.1	(+0.3)	9.9	(+0.1)
ニラ	7.9	1.0		6.1	
タマネギ	3.1	4.3	(+1.2)	3.8	(+0.7)
〃	3.7	3.4		3.2	
参照：シロネズミ肝	7.2	7.1		7.0	
	8.6	8.5		8.6	

（　）内はThiamine増加量

(II) 砂耕培養液中にPyrimidine誘導体と4－Methyl－5β－hydroxyethylthiazoleその他を加えたときの発芽ダイコン中Thiamine含有量

OMPm，AMPm，FPm，CAPmなどのPyrimidine誘導体とMHTを含む砂耕培養液にダイコンの種をまき0.05％のハイポネクス液を供給しつつ20～30°で育てた。種をまいてから2～3日で発芽し約10cm余りまで芽がのびるが20日目頃より衰弱しはじめる。発芽ダイコン全体のThiamine含有量の経日変化を測定すると図21に示したとおりである。

図21　砂耕培養液にPyrimidine誘導体とMHTを加えてダイコンを発芽せしめた時のThiamine含有量



A　OMPm＋MHT
B　FPm　＋MHT
C　AMPm＋MHT
D　CAPm＋MHT
E　無添加

すなわちOMPm添加において最もThiamine量が高く，つぎにFPm，AMPmの順であり，これら3群においてはThiamine量の増加がみられたが，CAPmはThiamine量を増加せしめなかつた。

つぎにThiazole部について検討するためにPyrimidine部は最もよくThiamine含有量を高めたOMPmにきめ，MHTとその前駆物質といわれているL－CysteimeまたはD，L－Methionineについて検討した。

結果は図22に示したようにL－CysteineまたはD，L－MethionineはMHT

ほどの効果はなく，ＭＨＴの代用にはなりにくいようである。

図22．砂耕培養液にOMPmとMHT，L-Cysteine，またはD,L-Methionineを加えてダイコンを発芽せしめた時のThiamine含有量

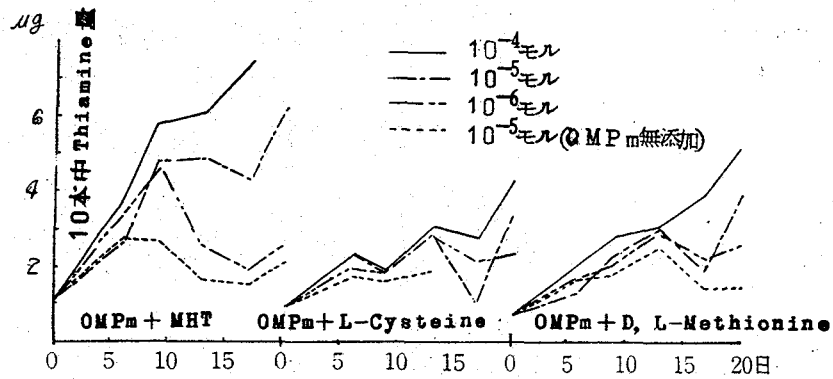


図23．砂耕培養液にOMPmとMHTを加えてダイコンを発芽せしめた時のThiamine含有量

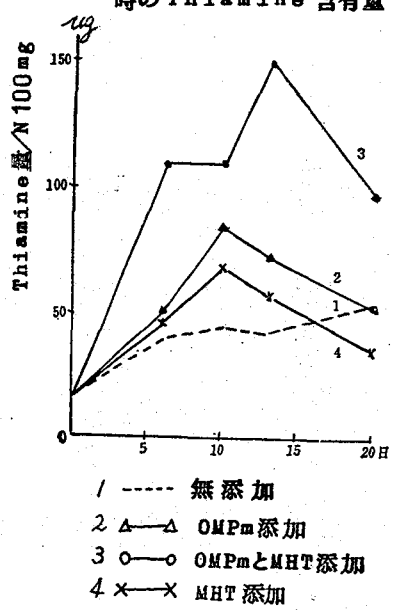
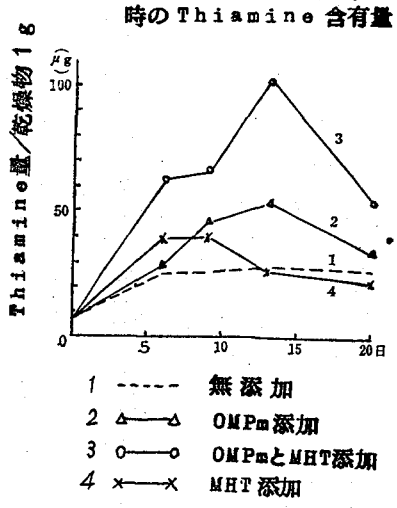


図24．砂耕培養液にOMPmとMHTを加えてダイコンを発芽せしめた時のThiamine含有量



さらにＯＭＰｍがThiamine合成量を高めることをたしかめるために1. 無添加　2. ＯＭＰｍのみ　3. ＯＭＰｍ＋ＭＨＴ　4. ＭＨＴのみの４群に分けそれぞれのダイコン中のThiamine含有量を測定した。結果は図２３，２４に示したようにＯＭＰｍ＋ＭＨＴ添加では無添加のものの約３倍のThiamineが含有されており，ＯＭＰｍのみでもThiamine含有量が多少高くなつている。

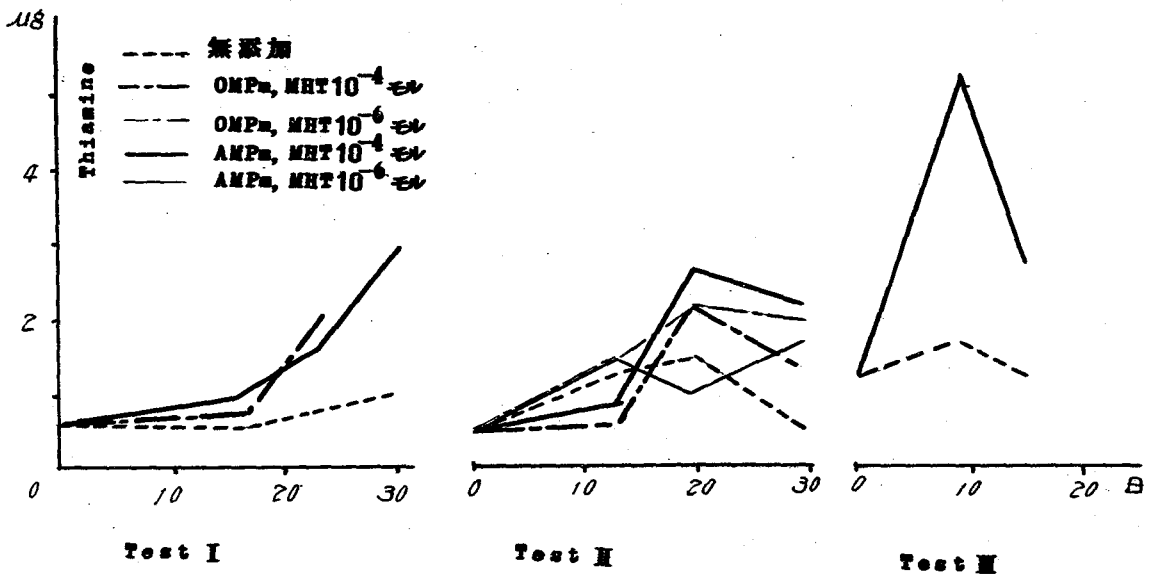
以上の成績によりＯＭＰｍとＭＨＴ添加でダイコンのThiamine量が著明に高められ，ＦＰｍやＡＭＰｍもまたＭＨＴの共存でThiamine生成量を高めることが分つた。またＬ－CysteineやＤ，Ｌ－MethionineはＯＭＰｍの共存でThiamine生成量を高めず，ＭＨＴの代用にはなりにくい。

(III) 砂耕培養液中にPyrimidine誘導体と４－Methyl－5β－hydroxyethylthiazoleを添加した時のイネの中のThiamine含有量

発芽ダイコンの場合と同じように砂耕培養液にＯＭＰｍまたはＡＭＰｍとＭＨＴを添加してモミ米をまき約１か月間イネの中のThiamine量を測定した。イネは種をまいてから２～３日後に発芽し，その後芽が約２０cm位までのびるが，１か月目頃から衰弱しはじめる。結果は図２５に示したようにTest ⅠとTestⅢではOMPm+MHT添加またはAMPm+MHT添加で無添加のものの約２倍のThiamineが生成されている。TestⅡでも添加群は無添加のものよりThiamine量増加の傾向がみられる。またTestⅢでは収穫後半年のモミ米を用い他の場合よりモミ米が新しいのでThiamine量の増加が明らかである。

以上ＯＭＰｍやＡＭＰｍとＭＨＴが存在するとダイコンやイネなどの植物体においてはThiamine生合成に利用されることが証明された。

図２５　砂耕培養液中にＯＭＰｍまたはＡＭＰｍとＭＨＴを添加した時のイネ１０本中のＴｈｉａｍｉｎｅ含有量



ＴｅｓｔⅠ，Ⅱは収穫後１１ケ月のもみ米，Ⅲは６ケ月のもみ米を用いた

第5章　考　　察

Thiothiamine は化学構造上Thiamine にきわめて類似しているが，動物および植物の酵素を用いた実験や生体内でのThiothiamineよりThiamine への移行はいまだ証明されていない。また動物に注射時，Thiamine が分解されにくく多くが未変化のまま排泄されるのに対し，Thiothiamineが Thiamine よりはるかに分解されやすいのはThiothiamine は動物に対して異物でありThiamine への移行が起りにくいから生体内では解毒作用として分解が容易に起ると考えられる。著者はシロネズミにThiothiamineを注射し尿中代謝産物としてまず2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazole（2-Mercapto-MHT）(V)を分離証明した。Thiothiamineが加水分解によつて2-Mercapto-MHTを生成すると仮定すると一方に2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine（OMPm）(III)の生成が予想されるが，OMPmでなく2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (AMPm) (IV)が証明された。AMPmの生成についてはThiazole 核の開裂を考えねばならない。

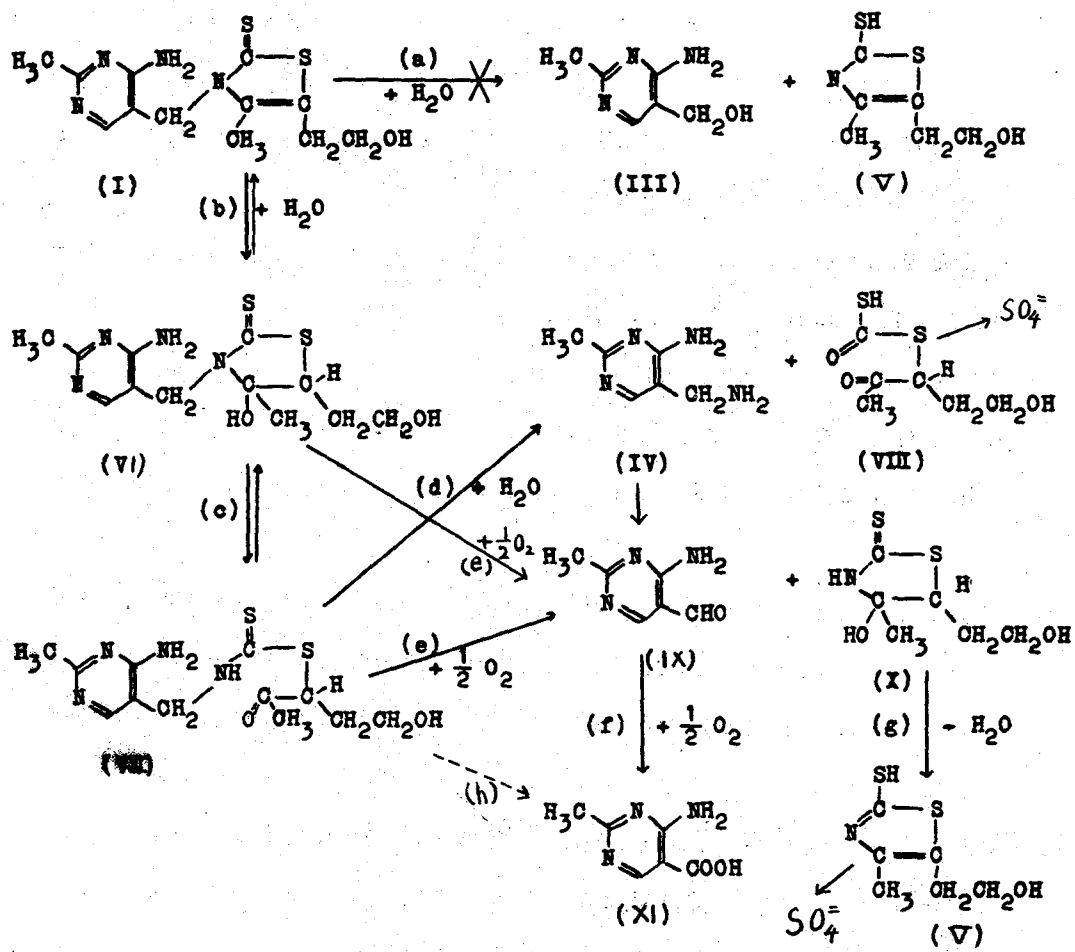
一方シロネズミにThiothiamineを大量注射すると体内での分解量が大になるとともに尿中$SO_4^{=}$排泄量が増加し，分解されたThiothiamineのThiazole部が$SO_4^{=}$にまで完全分解することが考えられる。Thiothiazolidine体(VI)注射尿についても同様の結果が観察され，AMPm(IV)が検出されて$SO_4^{=}$の排泄量はさらに大きい。Thiothiazolidine体(VI)がThiothiamineと同じように代謝されて(IV)を生成することが考えられるが，Thiothiamine → AMPm(IV)の変化にはThiazole核の開環を伴うであろう。Thiothiamine注射尿中よりThiothiazolidine体(VI)

の存在が推定されるので，Thiothiamineが Thiothiazolidine体(VI)またはそれが開環したDithiourethan体(VII)を経て分解すると考えればAMPmの生成とともに酸化産物として$SO_4^{=}$が生成されることやまた2-Mercapto-MHT の生成が次段でのべる代謝経路を仮定することによりよく説明される。Dithiourethan体(VII)はThiothiamineの化学的合成の中間体として仮定されたが[33]，本物質は分離されずThiothiazolidine体(VI)が中間体であるとされている。[34)~37)] Thiothiazolidine体(VI)がThiothiamine より分解されやすく，また同じ代謝産物が検出されたことのみをもつて(VI)をThiothiamine代謝の中間体と考えることはできないが，生体内では(VI)から(VII)のような不安定な中間体を経て分解することが予想される。

(VI)または(VII)をThiothiamine代謝の中間体と仮定すると加水分解反応によりAMPmの生成と(VIII)のようなThiazole部の開裂した化合物を中間体として$SO_4^{=}$にまで酸化分解される経路が説明できる。一方Thiothiamineの代謝産物として2-Mercapto-MHTが分離証明されたがその経路についてはThiothiazolidine体(VI)の酸化分解を考えると一方に2-Methyl-4-amino-5-formylpyrimidine(IX) が生成するか，(VI)または(VII)の酸化で直接に2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid (CAPm) (XI)を生成すると仮定すると2-Mercapto-MHT(V) の生成が説明できる。

以上を綜合してThiothiamineの代謝経路をつぎの図のごとく推定した。

Thiothiamine 代謝経路の推定



Thiamine の代謝についてはKraut[38]らはかつて人尿中のThiamine主要代謝産物がThiamine carboxylic acidであることを報告したがのちに否定された[39]。しかし今井ら[40]は4-Methyl-5β-hydroxyethyl-thiazole をシロネズミに投与して尿中より4-Methylthiazole-5-acetic acid を分離証明した。一方Thiothiamineをシロネズミに注射した時の尿中代謝産物のうちThiazole 部としては5β-hydroxyethylの部分が未変化の2-Mercapto-5β-hydroxyethylthiazole(V)が分離証明されると同時に$SO_4^{=}$としてかなり尿中に排泄されていた。$SO_4^{=}$は(V)の代謝によつても生成するがAMPmの生成とともにThiazole部が開裂して$SO_4^{=}$になる経路も充分に予想できる。

またThiothiamine と化学構造の酷似するDesoxymethylthio-thiamine の代謝産物としてDesoxymethylthiochromeが証明されているが[41]，Thiothiamine の代謝産物としてThiochromeは検出されず両者がかなり異つた代謝をうけることはThiamine およびその関連化合物の代謝に関する問題で興味あることと思われる。

つぎにシロネズミにAMPmを注射した時の尿中排泄量を測定するときわめて少く，AMPmは体内でかなり代謝されやすいものと考えられるが，Thio-thiamineのPyrimidine 部の尿中代謝産物としてAMPmが分離されにくかつたのは，Thiothiamine の 代謝産物としてのAMPmがさらに代謝されて尿への排泄が少量となるためであろう。AMPmの尿中代謝産物としてCAPmが分離されたがAMPm注射時の尿中CAPm量もまた少かつた。しかしCAPm注射時のCAPm排泄量はかなり多くCAPmは体内で比較的安定であると思われるので，AMPm→CAPmの変化が主なる代謝経路であるとすればCAPmの生成量も多くなければならない。AMPm→CAPm以外にAMPmが動物体内でPyrimidine核の開裂した化合物に代謝されることもあり得るで

あろう。

Pyrimidine化合物の代謝についてはFink[42]がThymineより3-Amino isobutylic acidを，Uracilよりβ-Alanineをシロネズミの尿中に証明し，これらのPyrimidine体は核の開裂が大量に起つていると考えられている。Cytosineもまたシロネズミ体内で容易に分解されて尿素とアンモニアとなり，核酸の合成には利用されないが[43]，Orotic acidはシロネズミに注射する時UracilやCytosineの生合成に利用されるといわれている[44]。また2,4-Diaminopyrimidineは尿素やアンモニアを生成せずシロネズミ尿中に未変化のまま排泄されると報告され[45]，OMPmではウサギに注射した場合86%までがPyrimidine体として尿中に排泄されPyrimidine核の開裂はあまり考えられないといわれている[20]。

このようにPyrimidine化合物は動物体内で分解されやすいものや安定なもの，また核酸の合成やその他に利用されるものなどあり様々に代謝されることは興味深い。AMPmの代謝についてはCAPm以外の分解産物を確認していないがAMPmおよびCAPmとして回収しうる量が少く，他にD試薬陽性物質が検出されにくいということは体内での分解または利用が急速に起ることを意味するのであろう。

AMPmをMHTとともに肝磨砕液に添加して一定条件で放置するとき，Thiamineへの生成は証明されなかつたが，酵母やある種の植物の磨砕液にAMPmまたはOMPmをMHTとともに添加して放置する時Thiamineへの生成がみられた。また活動中の植物においてもダイコンやイネの発芽時にそれらを添加すると無添加のものにくらべてThiamine含有量の増加がみとめられた。ダイコンにおいてはAMPm+MHT添加時よりもOMPm+MHT添加時の方がThiamine生成量が多かつたのでAMPmもOMPmに変化して利用されるのかも知れない。そして酵母におけるThiamine[26,27]生成と同じ

く最終段階においてはOMPmがOMPm-pyrophosphate となり，MHTがMHT-monophosphate となり両者の縮合酵素によりThiamineのPhosphate を生成することが考えられるが，ダイコンにおいてのThiamineの生合成経路がOMPm+MHT→Thiamine であるという最終的な証明はなされていない。植物界においてPyrimidine化合物またはThiazole化合物を検索しThiamine 生合成の前駆物質を追究することが望ましい。

大岳[46]はコメヌカより$C_3H_6N_2$-HClを分離しunknown base と称しているがこの分析値はAMPm塩酸塩の実験値$C_3H_5N_2$-HClに近似し，融点その他の性質がAMPmに一致する。もしコメヌカのようなThiamine の貯蔵部位からAMPmの存在が証明されたとしてもAMPmをThiamine生合成の前階梯と考えがたいであろう。しかし活動中のイネ葉その他よりAMPmが分離証明され，別にイネ葉の酵素液やイネ発芽時の培養液にAMPmをMHTと共に添加するときThiamine の生成またはその増加が認められたので，イネの生理的なThiamine 生成の一経路においてAMPmが前駆体として利用されることが予想され，イネにおけるAMPmの存在の意義が考えられる。

酵母においてOMPmとMHTの縮合酵素が証明され[26,27]，植物においてもダイコンやイネなどにその縮合酵素の存在が予想される。しかしながらThiamineの生合成がさかんに行われているであろうイネ葉からAMPmの存在が証明されたことはThiamine の生合成経路に重要な示唆を与える。Thiamineの加水分解ではOMPmを生成するがAMPmを生成しがたいのでイネ葉の抽出液からAMPmが分離証明されたのは抽出操作中にThiamine から生成したものとは考えられない。AMPmを前駆物質と考えAMPmからThiamineが合成されるとすれば5位の$-CH_2NH_2$のNがそのままThiazole環のNになつて合成される経路が考えられ MHT のようなでき上つたThiazole部分でなくAMPmと結合してThiazole 環を合成する生合成経路も存在す

るであろうと予想される。例えばHaringtonら[47]はThiazole部の前駆体としてα-Amino-β-(4-methylthiazole-5)-propionic acidを仮定しMethionine,Acetaldehyde,NH_3から生成する経路を考えているが，NH_3の代りにAMPmを加えてThiamineの生合成を仮定することができるであろう。AMPmのイネ葉においての存在の意義の解明は今後の問題であるが，植物体内におけるThiamineの生合成についての手がかりになることが期待される。

第6章　総括および結論

I　Thiathiamine およびその誘導体の代謝

(1)　Thiothiamine の尿中代謝産物の分離（第2章，第2，3節の総括）

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-5β-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イーを行い最初に流出されたDragendorf試薬陽性物質を集めて，さらに濾紙クロマトグラフイ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-5β-hydroxyethylthiazole(V)（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つたが，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イーを行つて分離精製した。(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つた。さらにpicrate(mp228°,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部吸収を測定すると(XI)に一致し，(XI)の存在が予想された。

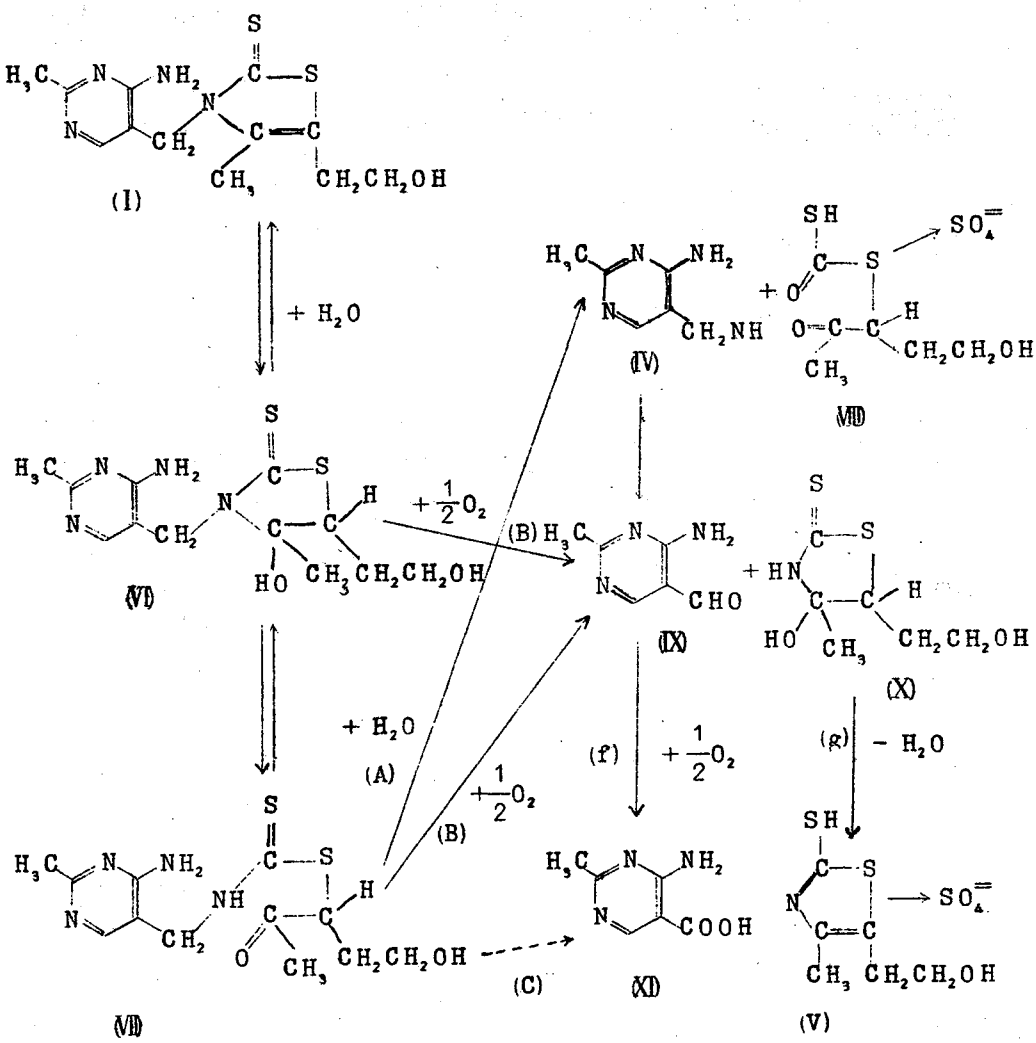
(2) Thiothiamine投与尿とThiothiazolidine体投与尿の比較（第2章，第4．5節の総括）

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が加算されているかもしれない）の2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine(V)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(V)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$SO_4^{=}$の排泄量は非投与時の尿中$SO_4^{=}$排泄量よりはるかに高くThiothiamineの約32〜45%が$SO_4^{=}$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-aminomethylprimidine(V)が検出された。II(1)の方法による(V)の測定値はThiothiamineの場合とほぼ同じで投与量の約1%であつたが，$SO_4^{=}$排泄量はThiothiamine投与時以上に多く(VI)の70%あまりが$SO_4^{=}$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%であつた。またThiamine注射時には73〜85%が未変化のまま排泄されるので$SO_4^{=}$排泄量は非投与時と差がなかつた。

以上Thiothiamineは Thiamineは比べて体内で容易に分解され，代謝産物として 2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethyl-thiazole(V)，2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine(IV)および 2-Methyl-4-amino-4-pyrimidinecarboxylic acid(XI)が証明されたが，排泄されるThiothiamine量，$SO_4^{=}$ 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)または(C)として推定した。

Thiothiamine 代謝経路の推定



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（第3章，第1節の総括）

4-Methyl-5β-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，4 mℓ ずつ分注し2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine (III)または2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine(IV)を 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討し生体試料中の(III)および(IV)の定量法を案出した。

(2)　2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine(IV)尿中代謝産物の分離（第3章，第2節の総括）

(1)の方法を用いつつ2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine(IV)の代謝を研究した。(IV) 100mg 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-pyrimidine-carboxylic 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（第3章，第3節の総括）

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イ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（第4章，第2節の総括）

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, 411にとおし，その流下液をpH5.5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，赤外線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（第4章，第3節の総括）

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-5β-hydroxyethylthiazole(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。したがつて(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 結　　論

以上の実験成績によつて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-5β-hydroxyethylthiazole(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き Thiamine
の生成量が増加することが証明された。

本研究にあたり終始親切なご指導と本文のご校閲を賜りました恩師阪大薬学部川崎近太郎教授に厚くお礼申し上げます。

研究途上，ご助言やご助力をいただきました阪大薬学部平岡栄一先生ならびに衛生化学教室の皆様や帝塚山学院短大須原喬先生ならびに食物栄養教室の皆様に心から感謝いたします。

また各種試料をご分与下さいました武田研究所，松川泰三，平野弘両博士，三共株式会社，吉田茂博士，試料の元素分析を行つていただいた阪大薬学部福田博士ならびに茂幾氏また赤外線吸収スペクトルの測定を行つていただいた鈴木技官に感謝いたします。

第7章　実　験　の　部

〔I〕　Thiothiamineおよびその誘導体の代謝

(1)　Thiothiamine投与尿よりThiazole体の分離

i)　Thiothiamine 注射尿の採集

体重150～200gの均一系雄シロネズミ10匹をThiamine欠乏飼料（表8参照，以下この飼料を用いた）で飼育し，Thiothiamine を塩酸性水溶液にして30mg（3mℓ中）を毎日腹腔内注射し，あらかじめ希塩酸とトルエンを入れた採尿ビンでとつた。

表8　　Thiamine欠乏飼料

Thiamine除去ジヤガイモ澱粉	60
カゼイン	25
大豆油	15
Mc Co11um 塩 №185	5
水	110
ほかに1日1匹あたり	
肝油	0.1 g
ビタミン B_2	40 μg
ビタミン B_6	40 μg
パントテン酸カルシウム	150 μg
ニコチン酸アミド	150 μg

ii)　Thiothiamine 投与尿のペーパークロマトグラフイー

前述のようにして得られた新鮮尿をそのまま何回もくり返して東洋濾紙№50につけ2種の展開溶媒で一次元上昇法PPCを行つた。

Thiothiamine 30mg 経口投与時の8時間尿や普通尿(Thiamine欠乏飼料で飼育した同じ動物のThiothiamineを投与しない時の尿）についても同様にPPCした。検出試薬にはD試薬を用い

た。普通尿からはD試薬陽性物質は検出されなかつた。PPCの溶媒は以下特記しない場合は酢酸．ブタノール．水（1.4.5）を用いた。

また体重1.5KgのウサギにThiothiamine 500mg を皮下注射した時の尿についても同様にPPCした。

図1参照

iii) Thiothiamine 注射尿中よりThiazole体の分離

尿をN NaOH アルカリ性としNaClで飽和してエーテル抽出を行いエーテル層を分離してNa_2SO_4で脱水後氷室に放置すると白色粉末がでてきた。それを分離して60%エタノールで2回再結晶するとmp 238° となりThiothiamine の標品との混融で融点降下を示さなかつた。この操作により尿中より未変化のThiothiamine を分離することができる。

エーテル抽出を行つたのちの水層はそのままのアルカリ性でイソブタノールを加えて振とう後，イソブタノール層を分離した。それにNa_2SO_4を加えて脱水して50°以下で留去しさらに蒸発乾固した。それを無水エタノールで抽出しエタノールを40°で留去したのち水を加えると水溶性画分2と水不溶性画分3に分れた。尿は3日目毎にここまで分離して保存しつつ20日間の尿を集めた。

画分3はD試薬にてThiothiamineより高いRfのものが検出されThiazole 化合物の存在が予想されたのでセルローズ粉末（東洋濾紙）によるカラムクロマトを行つた。画分3を100 mℓのブタノールにとかして吸着後水飽和ブタノールで展開し10 mℓ ずつ流下液を取つた。No.1～4はD試薬陽性であつたので合して減圧濃縮し，PPCするとRf 0.88，0.95のD試薬陽性物質が検出された。

図2参照

iv) Rf 0.88部とRf 0.95部の分離とペーパークロマトグラフィー

第2章，第2節および図3参照

v) 2-Mercapto-4-methyl-5β-hydroxyethylthiazoleの確認

PPCにより精製したRf 0.88部のエタノール抽出液にピクリン酸飽和エタノール溶液を加えてpicrateを作つた。本品はmp 117°の淡黄色針状晶で2-Mercapto-MHTの標品より作つたpicrate (mp 117°)との混融で融点降下をみとめなかつた。分析は$C_{12}H_{12}N_4O_8S$として計算値N＝13.86

実験値N＝13.73

(2) Thiothiamine投与尿よりPyrimidine体の分離

i) Thiothiamine注射尿中よりPyrimidine体の分離

尿をN HCl酸性としてエーテル1.5ℓで振とうしエーテル層を分離したのち，イソブタノール1.5ℓで振とうしイソブタノール層を分離した。つぎに尿を中和後，N NaOHアルカリ性とし酸性におけるのと同様エーテル1.5ℓ，ついでイソブタノール1.5ℓにて振とう抽出した。つぎに各画分の溶媒を50°以下で留去し各々についてPPCするとD試薬陽性物質のRfは酸性エーテル抽出物0.67，0.9，酸性イソブタノール抽出物0.25～0.3，0.67，0.9，アルカリ性エーテル抽出物0.25～0.3，0.67，0.9，アルカリ性イソブタノール抽出物0.25～0.3，0.67であつた。これにより代謝産物が各画分中に混在することを知つたので全部を合して尿抽出物(A)とした。尿抽出物(A)よりAMPm塩酸塩を分離する方法は第2章，第3節および図5参照。

ii) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidineの確認

尿抽出物(A)より分離したmp 260° の物質はAMPm塩酸塩(mp 260°)の標品との混融で融点降下しない。紫外部吸収スペクトルも0.1N HCl, 0.1N NaOHの溶媒でそれぞれ AMPm 塩酸塩に一致した。 図9参照。

常法によりpicrateとするとmp 227° で標品（mp 228°,分解）との混融で融点降下しない。

AMPm picrate $C_{18}H_{16}N_{10}O_{14}$として

計算値N＝23.49

標品の分析値N＝23.57

実験値N＝23.95

(3) Thiothiamineおよび Thiothiazolidine 体その他投与時の尿中排泄量と無機硫酸塩の排泄量

i）試料の投与と尿の採集

Thiamine は水溶液，Thiothiamine は 塩酸酸性水溶液，Thiothiazolidine体は塩酸酸性にするとThiothiamineに変化するおそれがあるので水けん濁液とし，また2-Mercapto-MHTは熱湯にとかして，それぞれ25 mg または50 mg を含む溶液2～3 mℓ をシロネズミに腹腔内注射しつづいて水3～5 mℓ を経口投与して尿を集めた。尿量は1日8～15 mℓ であつた。

ii）尿中無機硫酸塩の定量

濾過した尿に2％Benzidine塩酸溶液100 mℓ を加えて10分以上放置したのち沈澱を集めた。沈澱をBenzidine 硫酸飽和水溶液で洗つたのち熱湯に浮遊せしめて $\frac{N}{10}$ NaOH にて滴定した[25]。

iii）尿中Thiothiazolidine体の定量

尿を煮沸蒸留水（煮沸により体積を半減せしめて溶存酸素や残留塩素を追いだした蒸留水）によりThiothiazolidine体1μg/mℓ

前後となるように希釈したのちN HCl 2mℓ加えて沸とう水浴中で5分間加熱してThiothiamineに変化せしめて過酸化ベンゾイル[19]法により定量。別に塩酸処理せずに過酸化ベンゾイル法によりThiothiamineを定量しその差を求めることによりThiothiazolidine体とThiothiamineとの分離定量が可能である。この方法によるThiothiazolidine体の検出率は95～105%であつた。Thiothiamine,Thiothiazolidine体をシロネズミに投与した時のそれぞれの尿中排泄量をこの方法で測定して表9に示した。

(4) ThiothiamineおよびThiothiazolidine体投与尿中より2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidineの定量

ThiothiamineおよびThiothiazolidine体をシロネズミに腹腔内注射すると尿中にAMPmが検出れるので，(III)(1)に詳述するSaccharomyces cerevisiaeによりThiamineを合成せしめる方法によりAMPmを定量した。

それに先きだち尿中Thiothiamine,Thiothiazolidine体を除去しなければならない。そのために尿2mℓ（Thiothiazolidine体はThiothiamineに変化せしめたのち）に飽和BrCN水溶液6mℓを加えpH3.0，37°で30分放置してそれらをThiochromeに変化せしめたのち空気導入によりBrCNを追い出した。つぎにThiochromeとAMPmを分離するためにアンバーライトIRC-50を直径0.8cmのカラムに12cmの高さにつめN NaOH→水→N HCl→水を2回くりかえして通したのちpH 4.7に調整し尿のBrCN処理液2mℓを吸着せしめた。蒸留水50mℓを通して水洗後，0.01 N HCl 30mℓでAMPmを脱着し，pH5.0としてAMPmの定量に供した。

表1および第1章，第5節参照。

表9　Thiothiamineおよび Thiothiazolidine体をシロネズミに腹腔内注射した時の24時間尿中排泄量

投与量		Thiothiamine		Thiothiazolidine体	
	mg	mg	%	mg	%
Thiothiamine	25	* 6.5	(26.0)	0	(0)
		* 5.0	(20.0)	0	(0)
〃	50	* 9.6	(19.2)	1.1	(2.0)
		*10.1	(20.2)	0.9	(1.7)
		13.1	(26.2)	1.4	(2.7)
		11.6	(23.2)	1.0	(1.9)
		13.2	(26.4)	1.2	(2.3)
		15.1	(30.4)	0	(0)
Thiothiazolidine体	25	0.09	(1.9)	3.2	(12.8)
		0.1	(2.1)	5.1	(20.4)
		0.06	(1.2)	4.2	(16.8)
		0	(0)	5.3	(20.6)
		0	(0)	4.0	(16.0)
		0.1	(2.1)	3.6	(14.4)
		0.1	(2.1)	3.5	(14.0)
		0.05	(1.1)	4.7	(18.8)
〃	50	0.9	(1.9)	10.1	(20.2)
		1.2	(2.5)	9.4	(18.8)
		1.0	(2.1)	8.5	(17.0)

*は体重300～400gのシロネズミ，他は150～200gのもの

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

(1) Saccharomyces cerevisiaeを用いるPyrimidine体の定量法

i）使用菌種および培地

Saccharomyces cerevisiae Hansen №0305を用い表10に示したReader 培地を2倍濃度にして用いた。

表10　Reader液（pH5）

ブドウ糖	10g	K_2HPO_4	0.32g
$(NH_4)_2SO_4$	6	NaCl	1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.4	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.8
KH_2PO_4	2	水	1 ℓ

ii）培養条件

(a) 長時間法

培地4 mℓにMHT 10^{-3}モル0.15 mℓを添加しPyrimidine体10^{-3}モルを0〜0.12 mℓ（0.1 mℓ以下は希釈して0.1 mℓ以上をとるようにする。以下同様）または検液を加えて，液量を補正したのち115°で10分間滅菌する。これにあらかじめ25°で20時間または40時間静置して前培養した酵母液を注射針により一滴ずつ添加して25°で20時間または40時間培養する。前培養と分注後の培養時間について検討した結果を図26に示した。

この結果により前培養は20時間，分注後の培養は40時間がよい。

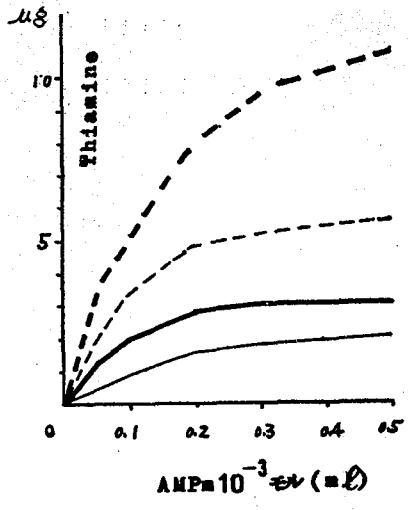


図26　前培養時間と分注後の培養時間のちがいとThiamine合成量

培養時間	20	40
前培養 20	実線(太)	点線(太)
時間　40	〃 (細)	〃 (細)

(b)　短　時　間　法

培地400 mℓにつきMHT10^{-3}モル15 mℓの割合で添加したものを200 mℓずつ分注し115°，10分間滅菌して保存する。使用する時，1週間以内にうえついだ酵母を接種し25°で1夜おき，試験管に4 mℓずつ分注し試料を長時間法と同量添加し（MHT以外）37°で3～5時間培養する。

長時間法では試験管やピペットを180°で30分，試料を115°で10分滅菌し無菌操作を行つたが短時間法ではその必要がない。

iii）Thiamineの定量によるPyrimidine体の算出

(a)　Thiamineの定量

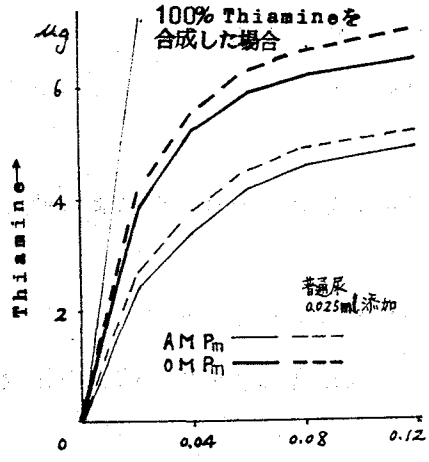
培養後100°で5分煮沸したのち60°で1時間または2時間タカジアスターゼ処理するかあるいはそのままで0.5 mℓをとり赤血塩，チオクロム法でThiamineを定量した。

(b)　検量曲線の求め方

尿のばあい（短時間法で培養したのち60°で2時間酵素処理した

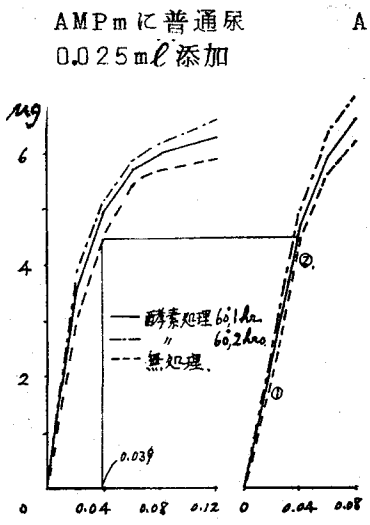
もの）について図２７，２８に例を示した。尿量とThiamine 合成量の関係を求めその曲線の急な範囲を計算に用いるがAMPm100mgまたはOMPm 4.7mg腹腔内注射尿では原尿にして0.05mℓ以下で定量できる。このさいその半量の0.025mℓの普通尿（試験前の同じ動物の尿）をAMPmまたはOMPmの10^{-3}モル，0〜0.12mℓに添加したものを検量曲線に用いる。尿のばあいはAMPmまたはOMPmのみの標準曲線より多少高くでるが肝臓砕液のばあいはやや低くでる。AMPm，OMPmのみではThiamine の合成量はOMPmの方が高くでるがその割合は一定しない。

図27　AMPm，OMPmの検量曲線



Pyrimidine10^{-3}モル（mℓ）

図28　Thiamine量よりAMPm量への換算（短時間法）



AMPm10^{-3}モル(mℓ)　AMPm尿(mℓ)

AMPm尿は100mg/dayを４日間注射して57mℓの尿をえたもの

(c) Thiamine量よりPyrimidine量への換算

図28についてThiamine量よりAMPm量への換算法を説明する。図28の①のAMPm尿0.02mℓはAMPm10^{-3}モル(211μg/mℓ)0.018 mℓに相当するから全尿57 mℓ中のAMPm量は10.8 mgとなり，同様にしてAMPm尿0.04 mℓの②では11.7 mgとなる。尿量とThiamine合成量が比例している範囲の①と②の平均値をとり尿中AMPm量11.25 mgとする。なおAMPm量はAMPm塩酸塩として計算した。

iv) Thiamine定量時のタカジアスターゼ処理の検討

短時間法で培養した場合にはタカジアスターゼ処理(60°，1時間または2時間)すればThiamine量は多少高くなるが(図28参照)AMPm量に換算すればタカジアスターゼ処理しない場合とほぼ同じ値になるので(表4参照)この処理を省略することが出来る。

長時間法の場合は大半のThiamineが結合型となつているのでタカジアスターゼ処理を行わねばならない。

v) 本法によるPyrimidine量と紫外部245mμの吸光度による値との比較

AMPm 100mgをシロネズミに注射した時の24時間尿中AMPm排泄量を本法による値と紫外部245mμの吸光度より求めた値とを比較して表11に示した。

吸光度より求める前に尿中よりAMPmの分離を濾紙電気泳動またはPPCにより行つた。濾紙電気泳動ではAMPm尿0.05 mℓを東洋濾紙No.51(10×40cm)に0.05 mℓのミクロピペットでつけ6%酢酸水を用い350V，3時間泳動した。乾燥後陰極側へ11〜13cm(AMPmに相当)の部分を切りとり50%エタノールにて30分加温

抽出した。この抽出液について245 mμにおける吸光度を測定し，べつに同じ動物のAMPm注射以前の尿0.05 mℓを同様に泳動し，陰極側へ11～13cmの部分を抽出したものの吸光度を盲検値として差引き，同様な操作により作つた標準液の検量曲線よりAMPm量を求めた。

またPPCによりAMPmを分離する場合はAMPm尿0.2 mℓを東洋濾紙№50につけ酢酸，ブタノール，水（＝1.4.5）で展開しRf 0.05～0.15の部分を切りとり50％エタノールで加温抽出した。245 mμにおける吸光度を求め，盲検値として普通尿0.2 mℓにつき同様にして求めた吸光度を差引き濾紙電気泳動の場合と同様にして標準曲線よりAMPm量を求めた。

表11　AMPm 100mg注射24時間尿中AMPm排泄量の本法による値と紫外部245 mμの吸光度より算出した値の比較

（mg）

245 mμの吸光度より				本法
分離法	盲検値引かぬ	注射前日尿を盲検値	注射前々日尿を盲検値	
PEP	7.40	2.80	3.84	4.50
PPC	8.80	3.82	4.12	

PEP＝濾紙電気泳動

vi) Pyrimidine体にThiamineが混在する場合の分離定量

AMPmまたはOMPm 10^{-3} モル標準液0.02 mℓにつきThiamine 0.7～3.4 μgを添加し長時間法により培養し60°，2時間タカジアスターゼ処理してThiamine量を測定した。結果は図12に示したようにPyrimidine体より合成されたThiamine量と添加されたThiamine量の和からMHTを入れないばあいのThiamine

量を差し引くとAMPmより合成された一定のThiamine量が出てくる。したがつてAMPmまたはOMPmに同程度のThiamineが混在する場合は分離定量が可能である。

(2) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine投与尿より代謝産物の分離

i) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine注射時の尿への排泄

体重150～200gの雄シロネズミにAMPm 100mg を腹腔内注射し24時間尿中のAMPm排泄量を〔II〕(1)の方法で測定した。

表4，5参照

ii) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine注射尿中より代謝産物の分離

(a) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine注射尿の採集

Thiamine 欠乏飼料で飼育した体重150～200gの雄シロネズミ5匹に毎日1匹あたりAMPm 100 mgずつ3日間腹腔内注射して尿159 mℓ（総AMPm投与量1.5 g）をえて試料とした。〔II〕(1)の方法により尿中AMPm量を測定すると28.9mgであつた。

(b) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine注射尿中より主要代謝産物の分離証明

直径3.8cmのクロマト管に精製パームチットを9cmの高さにつめ3%沸騰酢酸水を500 mℓ 通して活性化せしめたのち尿(pH5.5)を通してAMPmを吸着せしめてのぞいた。吸着時の濾液と水洗液（1ℓ）の中にはD試薬陽性物質が含まれていたので合してFr.I

とした。0.2N HCl脱着液はFr.IIとしたがRf0.07のD試薬陽性物質が含まれRfがAMPm塩酸塩に一致した。

Fr.IをpH 4.7とし，0.1モル酢酸緩衝液でpH 4.7に調整したIRC-50（100～200mesh，3.8×8cm）に通し，蒸留水1ℓで洗つた。再び吸着時の流下液と水洗液を合して濃縮し（50°以下）蒸発乾固せしめたのちエタノールで抽出して，エタノール留去後希塩酸にとかしてPPCするとCAPmに一致するRf 0.29の斑点をD試薬にて検出した。全量を角濾紙に帯状につけてPPCし7枚分のRf 0.29部をエタノールにて加温抽出した。それを東洋濾紙№51につけて6%酢酸水で350V，3時間濾紙電気泳動すると陰極側へ2～3cmのところにD試薬陽性物質が検出されCAPmと一致した。図14参照。また紫外部吸収を測定すると図15のとおりであつた。

Rf 0.29物質を常法によりpicrateとするとmp226°(分解)でCAPmの標品より生成したpicrate（mp226°）との混融で融点降下しない。

分析値 N＝21.56

$C_{12}H_{10}N_6O_9$として計算値 N＝21.99

標品の分析値 N＝21.66

またCAPmのpierateを濾別した母液を濃縮すとさらにmp181°のpicrateが得られた。本品はD試薬陽性で元素分析値C＝34.95，H＝3.04，N＝26.42であつたが物質の確認には至つていない。

iii）2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine注射尿中2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid排泄量

ii）(a)で集めた尿を角濾紙（20×40cm）でPPCしRf0.29

部を５０％エタノールで加温抽出し〔Ⅱ〕(1)(v)と同じ方法でCAPm量を求めると総AMPm投与量1.5 g，尿量159 mℓ中30.5 mgであつた。

iv) 2-Methyl-4-amino-5-pyrimidinecarboxylic acid 注射時の尿への排泄

CAPm 50mgをシロネズミに腹腔内注射しその２４時間尿を集め〔Ⅱ〕(1)(v)と同じ方法で濾紙電気泳動してCAPm排泄量を求めると２例平均３1.9 mg であつた。この方法によるとCAPmの検出率は８1.8％であつた。

(3) 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylprimidine の肝臓磨砕液による分解産物

i）反　応　条　件

シロネズミ肝５０ gをガラス製のホモゼナイザーにして冷時磨砕しAMPm 500mg を少量の水に溶かして添加し0.1モル燐酸緩衝液(pH 7.2)にて100 mℓとして37°で３時間放置した。反応後〔Ⅱ〕(1)の方法で残存AMPm量を測定すると310 mgであつた。

ii）反応液より反応生成物の分離

反応液を煮沸後，抽出操作を容易にするために55°で２時間タカジアスターゼ処理を行つた。濾液をとり残渣をさらに水洗して，濾液に水洗液を合し沸とう水浴上で扇風機をかけつつ濃縮し図１８に示したように分離した。すなわち濃縮物を角濾紙（４０×４０cm）に帯状につけてＰＰＣするとtailingしていたのでＤ試薬陽性物質をRf0.4以下（Fr.Ⅰ）とRf0.4（Fr.Ⅱ）以上に分けて，５０％エタノールにて加温抽出した。

Fr.Ⅰについてはエタノールを留去し水溶液として，３％熱酢酸水

を通して活性化せしめたパームチット柱（3.5×25cm）に通した。吸着時の流下液と水洗液を合して50°以下で減圧濃縮し残渣をエタノール抽出した。エタノール留去後ブタノール抽出しブタノール留去後希塩酸にとかしてＰＰＣするとＤ試薬にてRf 0.1，0.28，0.35を検出した。Rf 0.28部をＰＰＣにより分離し，50％エタノールにて抽出して濃縮したのちピクリン酸飽和エタノール溶液を加えるとmp226°のpicrateを得た。本品はCAPm picrate (mp 226°) との混融で融点降下しない。

分析値 N＝22.00

$C_{12}H_{10}N_6O_9$として計算値 N＝21.99

Rf 0.1部は AMPm 塩酸塩に一致し未反応のAMPmと思われる。またRf 0.35部よりはmp 164° のpicrateを得たが精査していない。

Fr.IIよりはＰＰＣによりRf 0.73が検出され FPm に一致するので，Rf 0.73部を50％エタノールにて抽出し，さらにＰＰＣを2回くりかえして精製し紫外部吸収を測定すると図17に示したとおりであつた。

〔Ⅲ〕 Pyrimidine誘導体の検索とThiamine生合成への利用

(1) Pyrimidine誘導体の検索

i) 植物の磨砕抽出液よりPyrimidine体の検出

検体を5分間蒸したのちミキサー，ガラス製ホモゼナイザーまたは乳鉢にて磨砕し，水抽出液を得，それを試料として〔Ⅱ〕(1)のSaccharomyces cerevisiaeを用いるPyrimidine体の定量法により測定した。表6参照。

ii) イネより2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidineの分離

試料の幼イネ8㎏と成熟したイネ葉5㎏の分離操作は別に行い，数回にわたつて行つたが以下に示した液量は合計したものである。まず1～3%トリクロル酢酸液約20ℓを用いてイネをミキサーにかけて磨砕した。その濾液と残渣の水抽出液（残渣を再び水を用いてミキサーにかけ磨砕抽出液を得た）を合したもの約50ℓをアンバーライトIRA 410つづいてIRA 411柱（それぞれ直径4㎝，高さ50㎝，40～60 mesh，N NaOHを通して活性化せしめたのち水洗したものを用いた。また流下液が酸性を呈した時には再生して用いた）に通した。その流下液と水洗液を合してpH 5.5としてアンバーライトIRC 50柱（直径4㎝，高さ50㎝，100～200 mesh，N HClを通して活性化せしめたのち水洗したもの）に通したのち流出液が着色しなくなるまで水を通した。つぎに0.05 N HCl で脱着し（Fr.Ⅰ）さらに0.1 N HClで脱着した（Fr.Ⅱ）。Fr.Ⅰ,Ⅱはそれぞれ紫外部245mμの吸光度が0.2以上の部分を集めた。以下第4章，第2節，(Ⅲ)参照。なお幼イネと成熟したイネ葉よりPPCと濾紙電気泳動により同一とみなされるFr.ⅠとFr.Ⅱが得られたが赤外線吸収スペクト

ルの測定に用いた試料は幼イネより得られたものである。

(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

i) Pyrimidine体とThiazole体を植物磨砕抽出液に添加した時のThiamine 生合成への利用

新鮮な植物をガラス製ホモゼナイザーまたは磨砕しがたいものはワーリンブレンダーにて冷時磨砕液とし，その濾液を酵素液として用いた。植物10gより10～50mℓの酵素液を作りOMPm，AMPm，MHTをそれぞれ10^{-7}モル添加してpHの調整を行わずに(pH5.4～5.8) 37°で3時間放置したのち煮沸し，タカジアスターゼ処理してBrCN酸化によりThiamine量を測定した。OMPm，AMPm，MHTなど無添加のものの Thiamine量との差からThiamine生成量を検討した。表7参照。

ii) Pyrimidine体とThiazole 体のダイコン発芽時における Thiamine 生合成への利用

(a) 砂耕培養液中にPyrimidine誘導体と4-Methyl-5β-hydroxyethylthiazole を加えた時の発芽ダイコン中のThiamine量

直径8－9cmのPetri皿に篩でふるい，よく水洗して乾燥した砂を約0.8cmの厚さにしき160°で30分乾熱滅菌を行ない，冷後試料（それぞれ10^{-4}モル）を0.05%のハイポネクス液にとかして砂にまきダイコンの種1gをまいた。試料は(A) OMPm+MHT，(B) FPm+MHT，(C) AMPm+MHT，(D) CAPm+MHTを添加した。ハイポネクスの成分（%）は窒素全量6.5（そのうちアンモニア性窒素1.0，硝酸性窒素5.5），可溶性燐酸6.0（そのうち水溶性燐酸4.5)

水溶性カリ19.0である。暗所で22～25°に保ち0.05%ハイポネクス液を供給しつつ育てた。

5～7日おきにThiamine量を測定し，その時には芽の大きさを平均して10本とり全体を酵素処理，パームチット処理を行つてBrCN酸化してThiamineを定量した。 図21参照。

(b) 砂耕培養液中に2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidineと4-Methyl-5β-hydroxyethylthiazole，L-CysteineまたはD,L-Methionineを加えた時の発芽ダイコン中のThiamine量

(a)と同様にしてダイコンを発芽させて育ててThiamine量を測定した。(A) OMPm+MHT，(B) OMPm+L-Cysteine，(C) OMPm+D,L-Methionine 添加としそれぞれにつき 10^{-6} モル，10^{-5} モル，10^{-4} モル濃度とOMPm 無添加でMHT，L-Cysteine，D,L-Methionineのみの4群に分けた。 図22参照。

またOMPm 10^{-6}，10^{-5} モル添加では(A)，(B)，(C)各群とも20日後のOMPm残存量は0であり，10^{-4} モル添加では (A) 0.47mg，(B) 0.14mg (C) 0.15mgであつた。これは〔II〕(1)の方法より定量した。

(c) 発芽ダイコン中Thiamine量におよぼす2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidineと4-Methyl-5β-hydroxyethylthiazoleの影響

(I) 無添加，(II) OMPm，(III) OMPm+MHT，(IV) MHT を添加した4群に分け各群 Petri皿4枚ずつとした。試料の添加量は Petri皿1枚（種1g）につきそれぞれ 10^{-4} モルとし実験方法は(a)と同じである。長さ，重量，乾燥量，Thiamine量，窒素量を測定し4枚のPetri皿のものの平均値を表12に示した。

乾燥物量は105°～110°で2時間乾燥し1夜デシケーター中に放置して重量を測定した。窒素は乾燥物量の測定に用いた試料をセミミクロKjeldahl法により定量した。 図23，24参照。

表12　ダイコン発芽時にOMPm，MHTを与えたときの影響

10本あたり（各4例の平均値）

経日	添加試料	重量 (g)	乾燥量 (g)	水分 (%)	長さ (cm)	Thiamine (μg)	N量 (mg)	N/乾燥量 ×100 (%)
0(種)		0.1474	0.1357	9.2	0	1.1	6.47	4.8
6		1.0345	0.1084	89.5	3.5	2.7	6.86	6.2
	OMPm	0.9809	0.1189	87.9	3	3.4	6.86	6.0
	OMPm+MHT	1.2071	0.1228	89.8	7.5	7.6	6.93	5.4
	MHT	1.1116	0.0965	91.3	4	3.0	6.62	5.7
9		1.3350	0.1100	91.8	8	2.8	6.90	6.1
	OMPm	1.3521	0.1064	92.1	8.3	5.2	6.28	6.2
	OMPm+MHT	1.5134	0.1072	92.9	9	7.3	6.66	6.4
	MHT	1.3516	0.1062	92.1	8.8	4.2	6.20	5.8
13		1.2823	0.1007	92.2	8.5	2.8	6.86	6.7
	OMPm	1.4510	0.0975	93.3	10	5.3	6.63	6.7
	OMPm+MHT	1.3068	0.0954	92.7	9.5	9.8	6.59	6.9
	MHT	1.3231	0.0988	92.5	9	3.1	5.39	6.3
20		1.3075	0.0911	93.0	8.3	1.5	4.43	4.9
	OMPm	1.4965	0.1033	93.1	10	2.6	5.94	5.1
	OMPm+MHT	1.1320	0.0969	91.4	8	3.7	4.70	4.7
	MHT	0.9867	0.0985	90.0	6.8	1.2	5.48	5.1

iii) Pyrimidine 体とThiazole体のイネ発芽時における

Thiamine生合成への利用

実験方法は発芽ダイコンの場合と同じで〔Ⅲ〕(2)ii)(a)参照。ただしたねをまいてから1週間は暗所で，その後は日光のあたる場所で育てた。AMPm+MHTまたはOMPm+MHT添加でそれぞれ10^{-4}モルまたは10^{-6}モル添加して行つた。3回にわたつて行つた結果を図25に示した。

参　考　文　献

1）川崎，堀尾；ビタミン7，597，788（1954）

2）川崎，堀尾；ビタミン11，143（1957）

3）川崎，堀尾；ビタミン12，356（1957）

4）川崎，堀尾；薬誌　78，65，69（1958）

5）松川，岩津；薬誌　71，1215（1951）

6）吉田，鵜木；薬誌　72，966（1952）

7）松川，平野；薬誌　73，379（1953）

8）須原，入谷；ビタミン13，514（1957）

9）須原，入谷；ビタミン14，327（1958）

10）須原，入谷；ビタミン18，63（1959）

11）須原，入谷；ビタミン18，67（1959）

12）須原，入谷；ビタミン18，72（1959）

13）岡田；ビタミン19，253（1960）

14）二宮；ビタミン1，386（1948）

15）川崎，岡田；ビタミン13，255（1957）

16）井尻：ビタミン11，288，425（1956）

17）池畑；ビタミン14，419（1958）

18）堀尾：ビタミン28，159（1963）

19）川崎，堀尾；ビタミン12，228，233（1957）

20）新谷；薬誌　77，781（1957）

21）水上，天野，坂元；薬誌　76，1082（1956）

22）宮川；ビタミン18，680（1959）

23）日本化学会編；実験化学講座（丸善）24，17（1958）

24) 日本化学会編；実験化学講座（丸善）24，26　(1958)

25) 藤井；生化学実験法定量編（南山堂）p74

26) 岩島，森，佐藤，川崎；ビタミン21，34（1960）

27) Caminer,G.W.,Brown,G.M.; J.Biol.Chem. 235,2411 (1960)

28) Robbins,W.J.; Science 85，246（1937）

29) Brown,J.; Science 85，183（1937）

30) Brown,J.; Am.J.Bot. 27，692（1940）

31) Brown,J.; Proc.Natl.Acad.Sci. 24,431(1938)

32) 満田，橋谷，藤井，河合；ビタミン26，54（1962）

33) 松川，岩津；薬誌 71，455，667（1951）

34) 吉田，石塚；薬誌 74，331，335（1954）

35) 吉田；薬誌 75，767（1955）

36) 石塚；薬誌 75，1392（1955）

37) 平野；薬誌 75，244,249,252,1184（1955）

38) Kraut,H.,Wildemann,L.; Biochem.Z. 321,363 (1951)

39) Krant,H.,Wildemann,L.; Inter.Z.Vitaminforsh. 27, 122 (1956)

40) 今井，鈴置，木幡；J.Biochem. 48，341　(1960)

41) 川崎，堀尾，麻野；ビタミン18，651（1959）

42) Fink,K.; J.Biol.Chem. 218，1，9（1956）

43) Bendich,A.,Getler,H.,Brown,G.B.;J.Biol.Chem.177, 565 (1949)

44) Arvidson,H.,Hammarsten ,E.,Eliasson,N.A., Reichard,P.,Ubisch,H.V.;J.Biol,Chem 177,495 (1949)

45) Bendich, A., Geren, W.D., Brown, G.B.; J.Biol.Chem, 185, 435 (1950)

46) 大岳；日農化，7，775 (1931)

47) Harington, C.R., Moggridge, R.C.G.,; J.C.S. 1939, 443, Biochem.J. 34, 685 (1940)