

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 Thiiothiamine およびその誘導体の代謝	4
第1節 Thiiothiamine の代謝に関する従来の研究	4
第2節 Thiiothiamine 投与尿よりThiazole体の分離	5
第3節 Thiiothiamine 投与尿よりPyrimidine 体の分離	10
第4節 Thiiothiamine 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 Thiiothiamine 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 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 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 の肝臓磨碎液による分解産物	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-5 β -hydroxyethylthiazole

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

Thiothiazolidine 体 = 3-[2'-Methyl-4'-aminopyrimi-
dyl (5')] -methyl-4-methyl-4-hydroxy-5 β -
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-5 β -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 を空气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⁾。

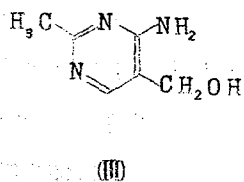
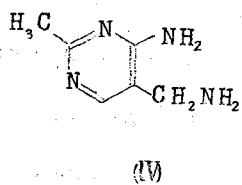
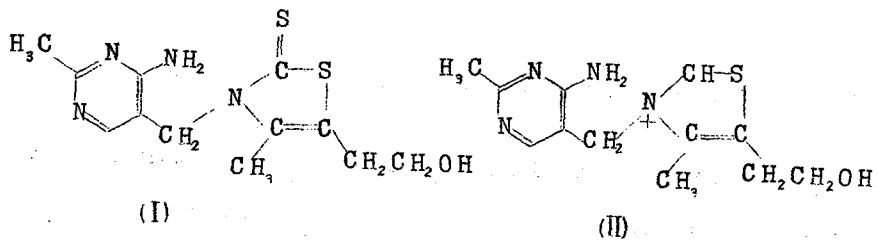
Thiamine または Thiothiamine をシロネズミに大量投与してこれらの尿への排泄状態をしらべた¹²⁾ところ、Thiothiamine を経口投与すると Thiamine にくらべ尿中排泄量が大であつて5時間尿中に多く排泄された。Thiothiamine の経口投与量を多くすると尿中 Thiothiamine 排泄量は増加するが排泄率は投与量の上昇とともに低下する。Thiamine の場合、経口投与では腸管吸収に限界があり限界量以上に投与したとき尿中排泄量の上昇は小であつて排泄率が低下するのにくらべ、吸収されずに糞中に残存する量が多くなる。Thiamine を大量注射した場合、Thiamine 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、ということが出来る。

一方マウスに対して体重 10g につき Thiamine 塩酸塩では LD₅₀ 5.0mg¹³⁾、Thiothiamine では LD₅₀ 10.0mg¹⁴⁾と報告されているよ

うに Thiothiamine は Thiamine にくらべて毒性はるかに低く、Thiothiamine が動物体内で分解されやすいのに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 LD₅₀ 0.73mg¹⁶⁾ 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。Thiothiamine 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-5 β -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。



第2章 Thiiothiamine およびその誘導体の代謝

第1節 Thiiothiamine の代謝に関する従来の研究

さきに須原・入谷はThiiothiamine 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、Thiiothiamine は1日10 μ g の投与でThiamine としての効力を有せず、50~100 μ g 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臓中のThiamine 量はThiiothiamine 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Thiiothiamine 1日10 mg を1週間連続投与したものの肝臓についてThiiothiamine の検出を行つたが全く検出されなかつた。すなわちThiiothiamine は動物体内でThiamine に変化することなく、またThiiothiamine として肝臓に蓄積されることもない。

またシロネズミにThiiothiamine 5~50 mg を腹腔内注射したときの24時間尿中Thiiothiamine 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Thiiothiamine の代謝機構を明らかにするためにThiiothiamine 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 Thiiothiamine 投与尿より Thiazole 体の分離

まず予試験としてシロネズミに Thiiothiamine 30 mg 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 No. 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 Thiiothiamine 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 Rf 0~0.1, 0.1~0.2, 0.3~0.4 にも弱い斑点がみられた。

Thiiothiamine 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 Thiiothiamine 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。

Rf 0.9 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 Thiiothiamine 1 日 1 匹あたり 30 mg ずつ腹腔内注射して尿 1.2 l (総 Thiiothiamine 投与量 6 g) を集めて試料とした。なおこの尿中には Thiiothiamine 1.3 g が検出されたが、残りの 4.7 g 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 Thiiothiamine 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ィーを行い、吸着後水飽和

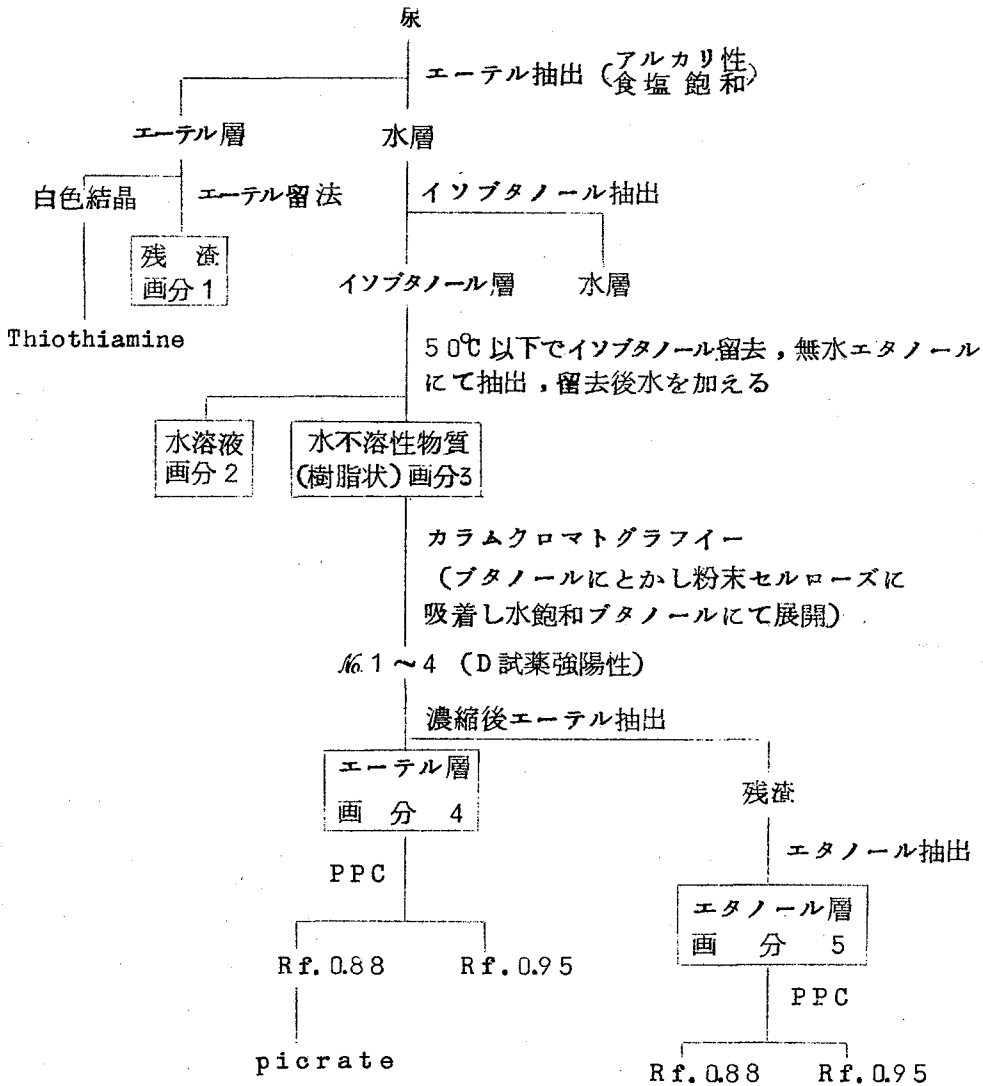
図1. Thiethiamine の腹腔内注射尿および経口投与尿の PFC



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ずつ流下液を取った。

そのNo.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Rf0.88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。No.1~4の濃縮物をエーテル抽出すると主にRf0.88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Rf0.95部の多い画分5が得られた。しかし画分4,5ともRf0.88部とRf0.95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Rf0.88しかみられなかつたが(図1),他のものからはRf0.88とRf0.95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Rf0.88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Rf0.88部がD試薬で強く呈色するという。

図3. Rf0.88部,0.95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

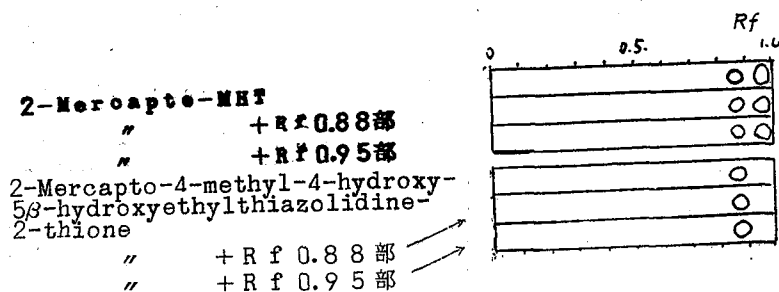
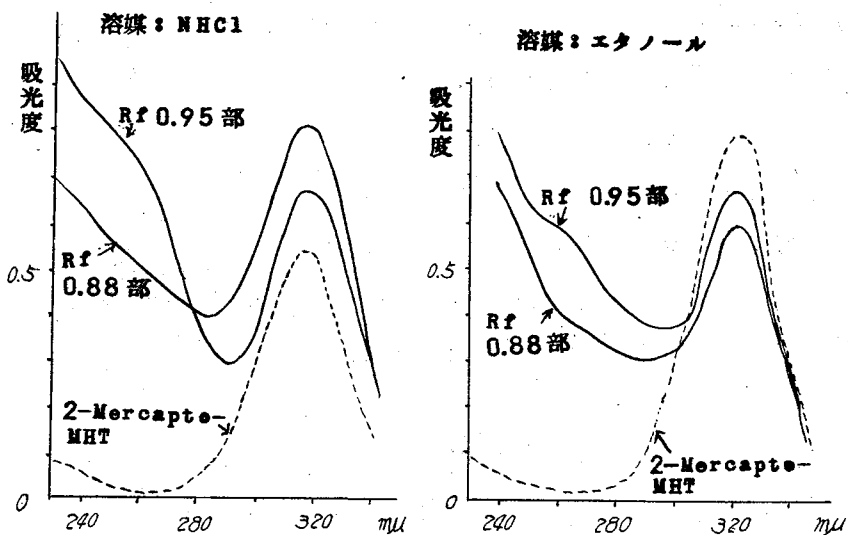


図4. 2-Mercapto-MHTと Rf0.88部, 0.95部の紫外部吸収スペクトル



また画分4, 5についてSH基の検出を行うと $I_2 \cdot NaN_3$ 反応, ニトロプルシツ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 λ_{max} 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mp 117°で2-Mercapto-4-methyl-5 β -hydroxyethylthiazoleのpicrate (mp 117°)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。

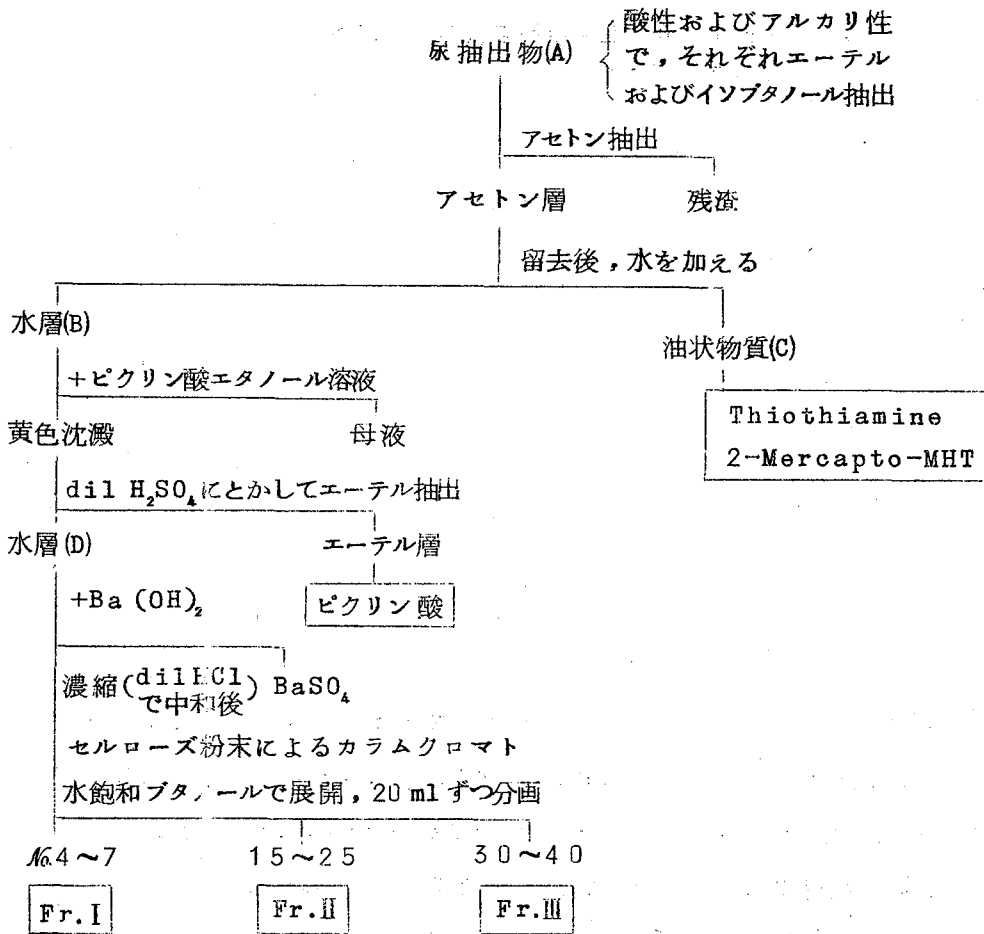
第3節 Thiothiamine 投与尿より Pyrimidine 体の分離

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 30 mg ずつ腹腔内注射して尿 1.5 l (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 1 l で展開し流出液を 20 ml ずつ分取し紫外部 245 m μ 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。

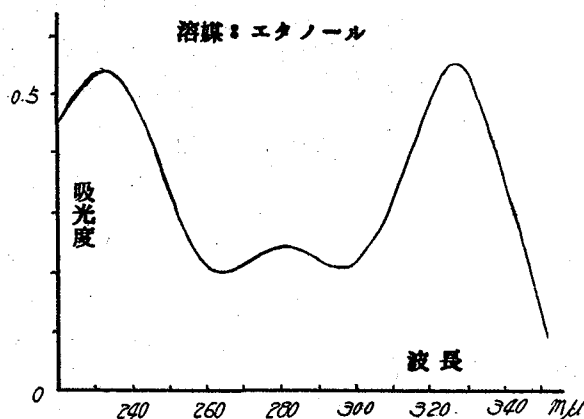
図5 Thiothiamine 腹腔内注射尿よりPyrimidine体の分離



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。また紫外吸収スペクトルを測定すると図6に示したようにλ_{max} 230 mμ, 280 mμ, 320 mμ を有し, λ_{max}

230 m μ と320m μ は Thiothiamine のものに一致するが, Thio-
thiamine (mp 241 $^{\circ}$)に比べて融点が低く混融すると mp 236 $^{\circ}$ 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) (Rf 0.31)のいずれかと考えられる。しかしFr IIを希塩酸に
とがして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, H, HのPPC

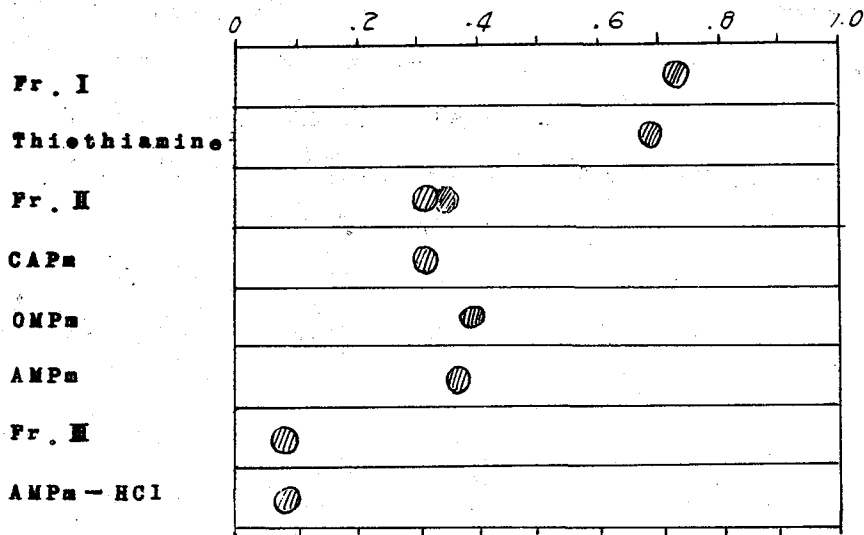
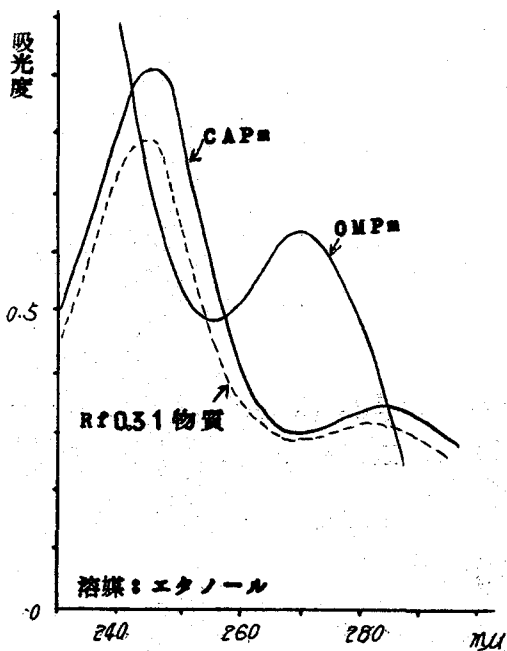
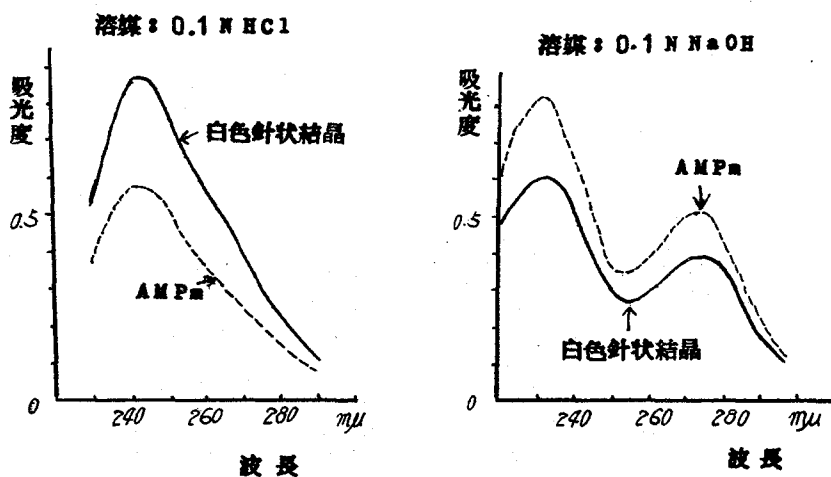


図8. Fr. HのRf0.31物質の紫外吸収スペクトル



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mp 260°(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mp 227°(分解)でAMPmのpicrate (mp 227°~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 Thiiothiamine 投与尿中 2-Methyl-4-amino-
5-aminomethylpyrimidine ならびに無機硫酸塩
の排泄量

Thiiothiamine 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Thiiothiamineを腹腔内注射し尿中の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、Thiiothiamine 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。

Thiiothiamine 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Thiiothiamine 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Thiiothiamine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Thiiothiamine → 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、0.01NHClで脱着するとAMPmのみ脱着されてThiochrome は残る。0.01NHCl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，25 mg 注射尿からは24時間尿中に0.05 mg または0.1 mg のAMPmが，また50 mg 注射尿からは0.19 mg ~ 0.36 mg 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	%
5	2.6	(5 2.0)	0	0
	2.3	(4 6.0)	0	0
25	8.9	(3 4.0)	0.05	(0.3)
	10.0	(4 0.0)	0.1	(0.6)
50	15.4	(3 0.8)	0.31	(0.9)
	20.6	(4 1.2)	0.36	(1.0)
	20.2	(4 0.4)	0.22	(0.6)
	20.3	(4 0.6)	0.19	(0.5)
	20.0	(4 0.0)	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 $\text{SO}_4^{=}$ 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 $\text{SO}_4^{=}$ 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 $\text{SO}_4^{=}$ 排泄量にもどる。各動物についてThiothiamine投与後48時間尿中 $\text{SO}_4^{=}$ 排泄量より投与前48時間の尿中 $\text{SO}_4^{=}$ 排泄量を差引くと、投与されたThiothiamine量の32~45%が $\text{SO}_4^{=}$ 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 $\text{SO}_4^{=}$ 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 $\text{SO}_4^{=}$ の尿中排泄量

シロネズミ		1		2		3	
		Thiothiamine	$\text{SO}_4^{=}$	Thiothiamine	$\text{SO}_4^{=}$	Thiothiamine	$\text{SO}_4^{=}$
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(+10)	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 $\text{SO}_4^{=}$ 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。

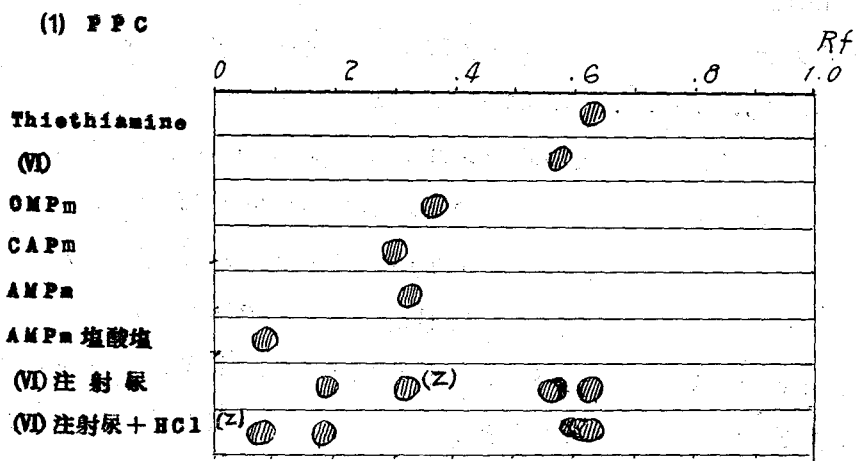
第5節 Thiothiamine 誘導体投与時の尿中排泄量と

無機硫酸塩の排泄量

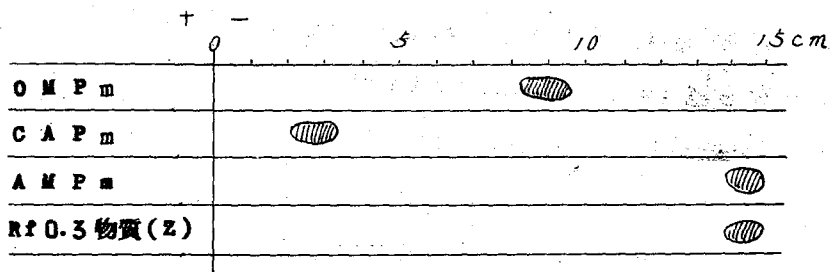
Thiothiamine をシロネズミに投与した時 Thiamine に比べ、より容易に分解されて、前節において述べたように一部は $SO_4^{=}$ にまで代謝されることが判つた。Thiothiamine の分解により 2-Mercapto-MHT および AMPm の得られる経路は単なる Thiothiamine の加水分解を仮定しては説明できない。Thiothiamine \rightarrow AMPm の分解としては Thiazole 核の開環が予想されるので第5章で述べるようにその前段階として Thiothiazolidine 体(VI)すなわち 3-[2'-Methyl-4'-aminopyrimidiyl (5')] - methyl-4-methyl-4-hydroxy-5 β -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¹⁹⁾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 50 mg 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 0.30 (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PFCと
濾紙電気泳動



(2) 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った。

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 25 mg 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 0.11 mg であつた。また 50 mg 投与時の AMPm 排泄量は 0.14, 0.36, 0.37 mg で 3 例の平均値は 0.29 mg 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 $SO_2^{=}$ 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, Thiiothiamine, Thiiothiazolidine 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)
Thiamine	20.8, 21.8 mg 21.3 (85.2) mg %	5.9, 6.1 mg 6.0 mg
Thiiothiamine	8.9, 10.0, 9.5 (37.8)	15.6, 14.0 14.8
Thiiothiazolidine 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
Thiiothiamine	15.4, 20.6, 20.2 18.7 (37.4)	16.3, 16.3, 27.3 20.0
Thiiothiazolidine 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。したがって動物体内で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SO₂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 245 m μ 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碎液では盲蛍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 1 1 A M P m 定量のための酵母液の培養法

長時間法

培地 4 ml + MHT 10^{-3} モル 0.15 ml + AMPm 10^{-3} モル 0.12 ml 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 0.15 ml / 4 ml)

25° ~ 30° で 1 夜培養

4 ml ずつ分注後, AMPm 10^{-3} モル
0.12 ml 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 1 1 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 1 1 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)。

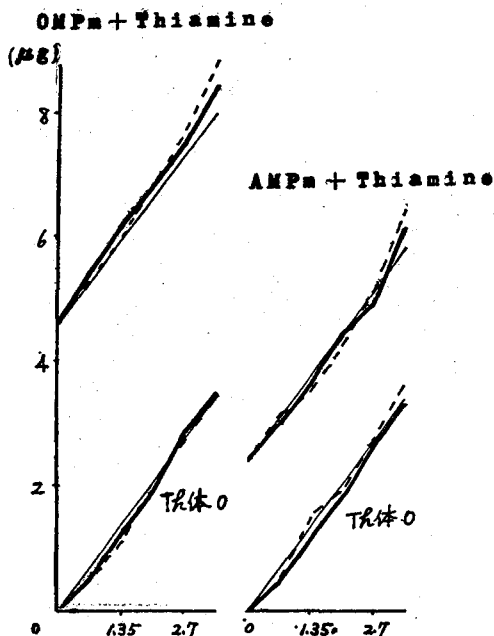
本法によりAMPmとOMPmの定量が可能であるが、それらの定量値の再現性を尿中排泄量についてしらべると表5のとおりで、かなり再現性があるので本法は定量法として利用できるものと思われる。

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
		しない	60°C,1時間	60°C2時間		
酵素処理	60°C,2時間					
試料 1	10.07mg	10.06mg	9.91mg	9.91mg	25°C	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AMPm 100mg/日を4日腹腔内注射した尿
 2はAMPm 100mg 腹腔内注射後24~28時間の尿
 6, 7, 8, 9はAMPmを肝臓磨碎液に添加したもの

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 0.02 ml + Thiamine
- 同上に普通尿 0.03 ml 添加

表5 AMPm, OMPm の尿中排泄量測定値の再現性

長時間法

AMPm 100mg 腹腔内注射 24時間尿		OMPm 4.7 mg 4時間尿 5 ml
(1) 11 ml	(2) 13 ml	
2.20 mg	4.50 mg	0.84 mg
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

AMPm 100mg 腹腔内注射 24時間尿		
(3) 10 ml	(4) 8 ml	(5) 12 ml
5.06 mg	4.75 mg	2.53 mg
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

体重 150 ~ 200g の雄シロネズミに AMPm 100 mg 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 ~ 6.1 mg 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った。

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った。

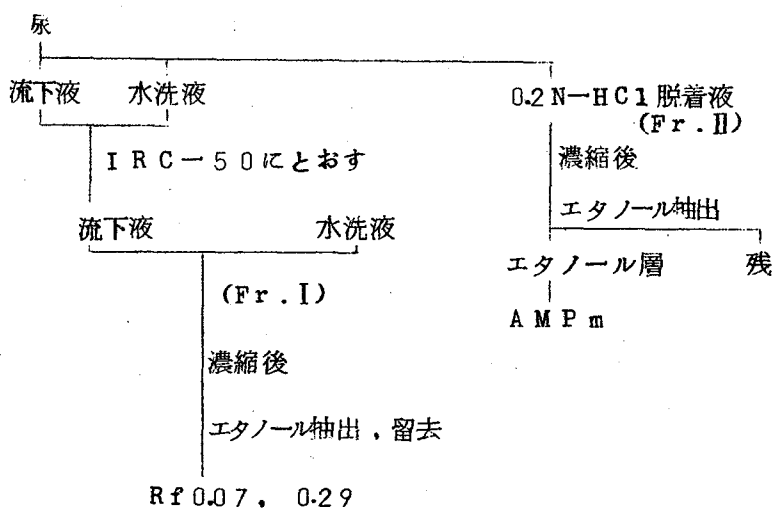
第2節 2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine 投与尿より代謝産物の分離

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AMPm 100mg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

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



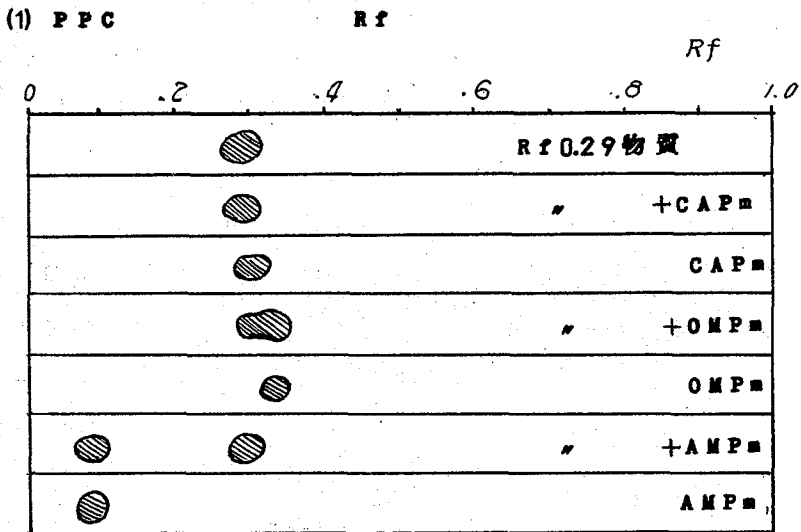
液と水洗液を合して濃縮した。それをエタノールで抽出し、エタノール留去後希塩酸にとかしてPPCするとD試薬にてRf0.07 0.29を検出した。

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

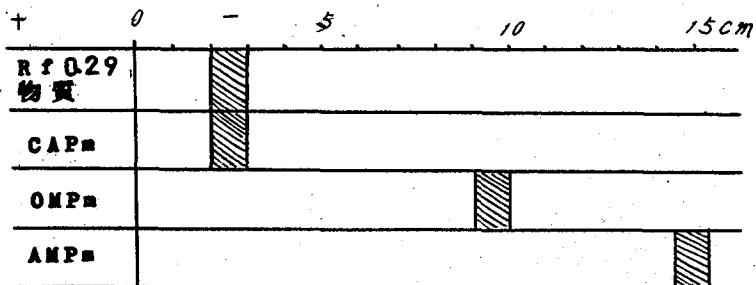
に近い。

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

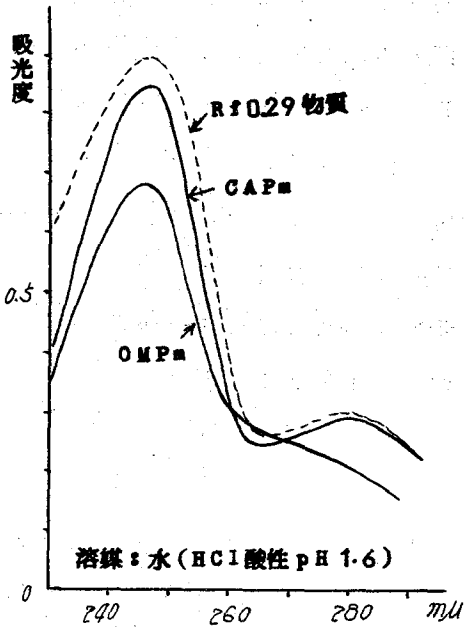


(2) 濾紙電気泳動 (6%酢酸水, 350V, 3時間)



AMPmは塩酸塩

図15. Rf0.29物質の紫外吸収スペクトル



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 を作った。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 ~ 200 g の雄シロネズミに AMPm 100 mg を腹腔内注射した時の 24 時間尿中 AMPm 排泄量は 2.6 ~ 6 mg 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吸収 245 mμ における吸光度より測定) すると約 2.3 mg であり CAPm 排泄量も少かつた。

またシロネズミ (体重 150 ~ 200 g) に CAPm 50 mg 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。したがって 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。

またシロネズミ (体重 150 ~ 200 g) に CAPm 50 mg 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。したがって 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 4.7 mg 腹腔内注射すると4時間尿中に1.05 mg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⁾OMPm 200 mg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。

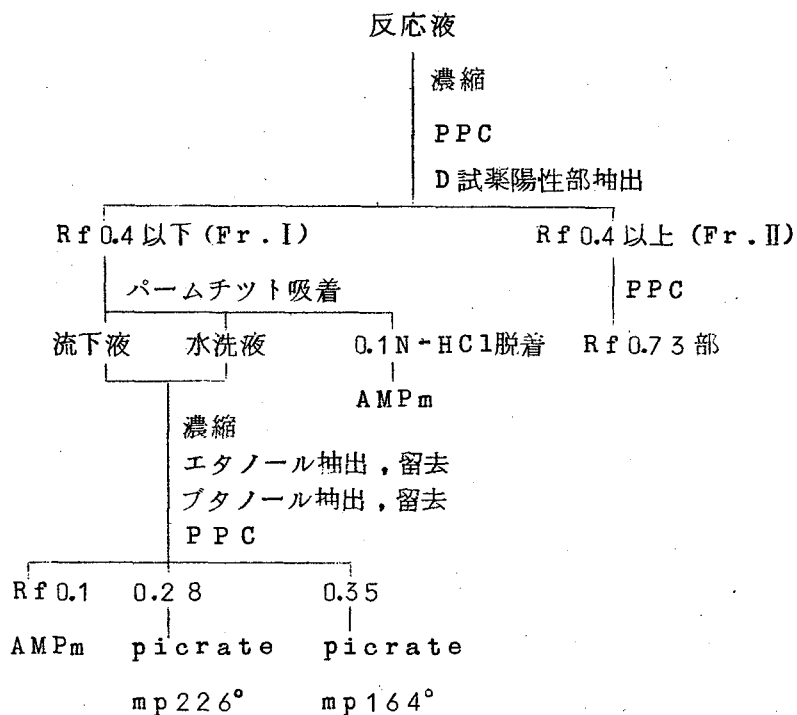
以上のことからAMPmはOMPmやCAPmなどの類似化合物にくらべて動物体内で分解されやすいことが明らかになったが, このことはPyrimidine化合物の代謝に関する問題で興味あることと思われる。

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40×40 cm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。

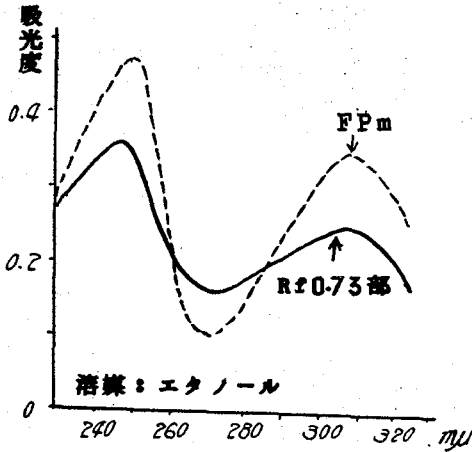
図 16 AMPm のシロネズミ肝臓磨砕液
による分解産物の分離



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 mp 226° 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 mp 164° の picrate を得たが確認するには至っていない。

Fr. IIはさらにPPCするとD試薬にてRf 0.73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にはほぼ一致した。

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と肝臓磨碎液との反応生成物としてCAPmを分離証明し、これはAMPm注射液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はアルデヒド体を経て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-5 β -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、ラツキヨウなどについても同様に Pyrimidine 体の検出を行ったが、明らかな検出はできなかつた。

(III) 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 $20 \sim 30^\circ$ 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。

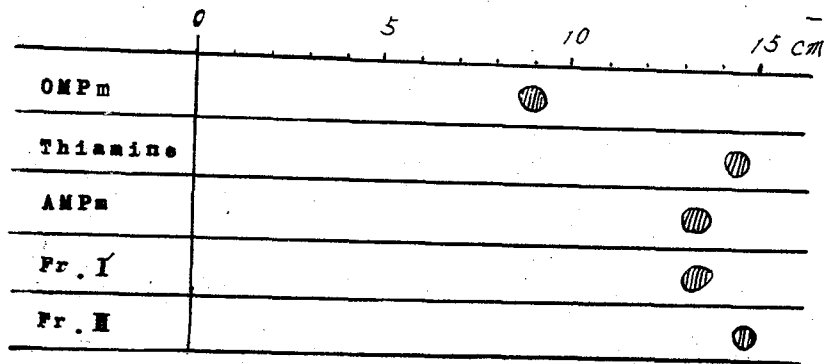
それらの試料を図18に示したように分離した。

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 mp 227° (分解) で AMPm picrate の標品 (mp
 228°) 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。

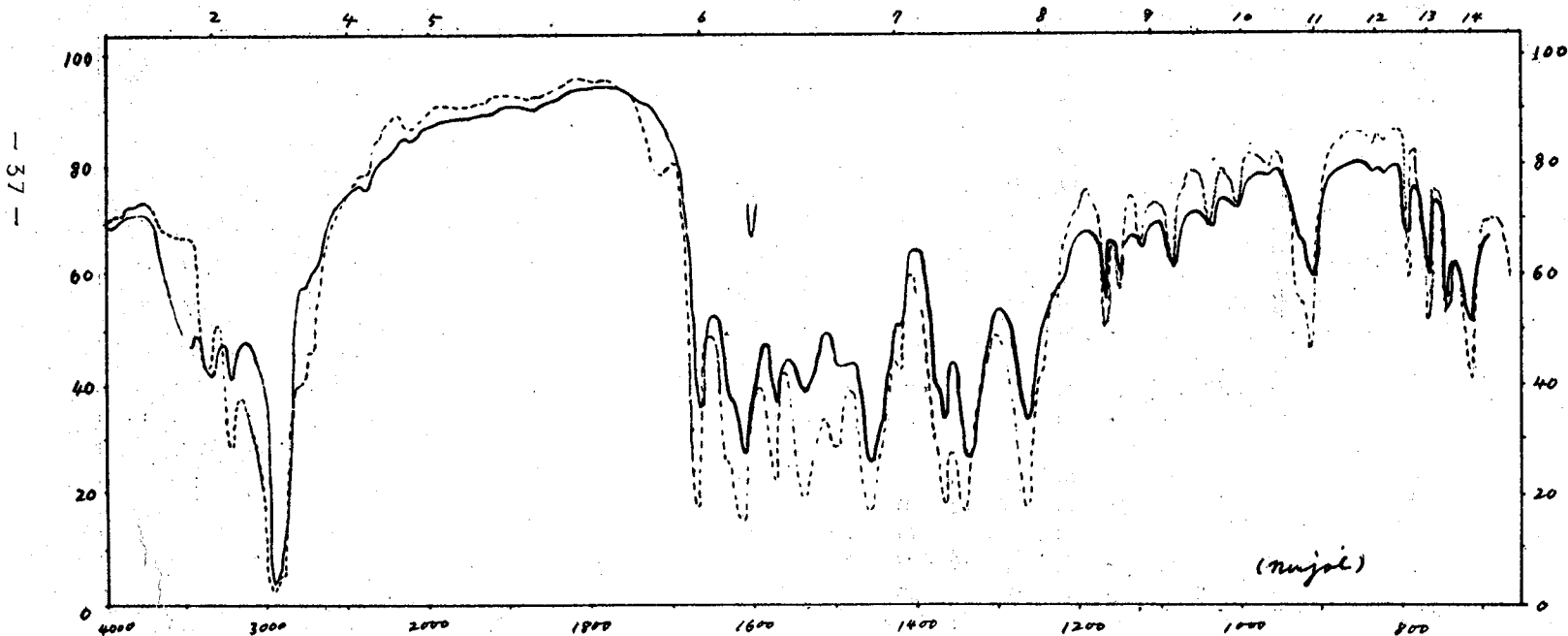
以上の成績によりイネに AMPm が存在することが証明されたので , つ
 ぎに植物体内に Pyrimidine 体が存在する場合 Thiamine の生合成に
 利用されるかどうかについて検討した。

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



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) 植物の磨碎抽出液に 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、ジャガイモ、タマネギ、ニラ、発芽ダイコン、イネの葉の磨碎抽出液に O M P m または A M P m と M H T 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碎液についても同様に行つたが A M P m + M H T , O M P m + M H T 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°C, 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 $\mu\text{g}/10\text{g}$)

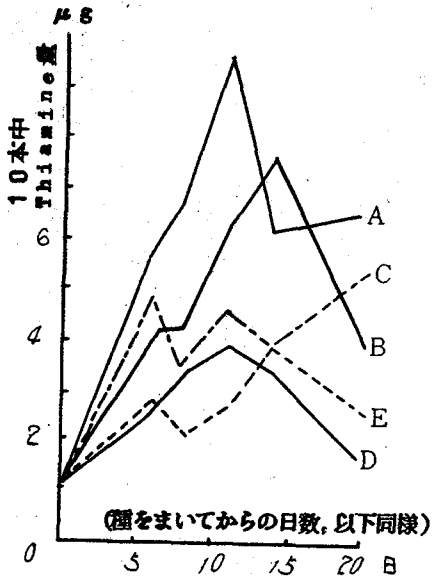
	無添加	OMPm+MHT	AMPm+MHT
発芽ダイコン	2.4	4.0 (+1.6)	3.9 (+1.5)
"	3.5	4.7 (+1.2)	3.8 (+0.3)
"	6.1	7.7 (+1.6)	7.0 (+0.9)
"	0.7	1.1 (+0.4)	0.7 (0)
イネ	2.7	5.4 (+2.7)	6.6 (+1.3)
"	1.7	2.2 (+0.5)	1.6
"	7.2		9.9 (+2.7)
"	5.0		6.2 (+1.2)
"	5.9		6.5 (+0.6)
発芽エンドウ	8.4		12.8 (+4.4)
"	4.7		4.0
"	9.1	8.5	11.3 (+2.2)
"	3.9	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

(III) 砂耕培養液中に Pyrimidine 誘導体と 4-Methyl-5 β -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 $^{\circ}$ で育てた。種をまいてから 2~3 日で発芽し約 10 cm 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-Cysteine 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

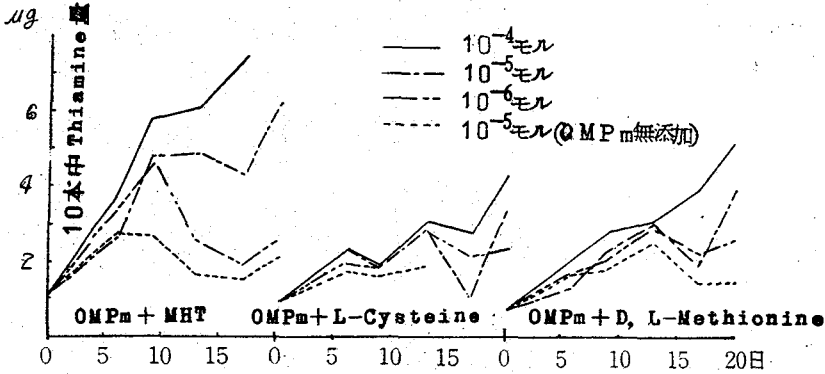
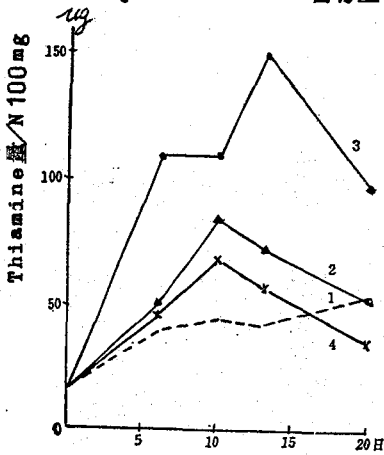
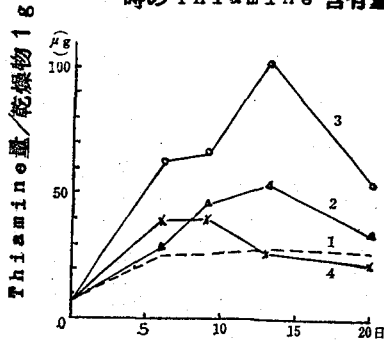


図 23. 砂耕培養液に OMPm と MHT を加えてダイコンを発芽せしめた時の Thiamine 含有量



- 1 - - - 無添加
- 2 △-△ OMPm添加
- 3 ○-○ OMPmとMHT添加
- 4 ×-× MHT添加

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



- 1 - - - 無添加
- 2 △-△ OMPm添加
- 3 ○-○ OMPmとMHT添加
- 4 ×-× MHT添加

さらに O M P m 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. O M P m のみ 3. O M P m + M H T 4. M H T 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 O M P m + M H T 添加では無添加のもの
の約 3 倍の Thiamine が含有されており, O M P m のみでも Thiamine
含有量が多少高くなっている。

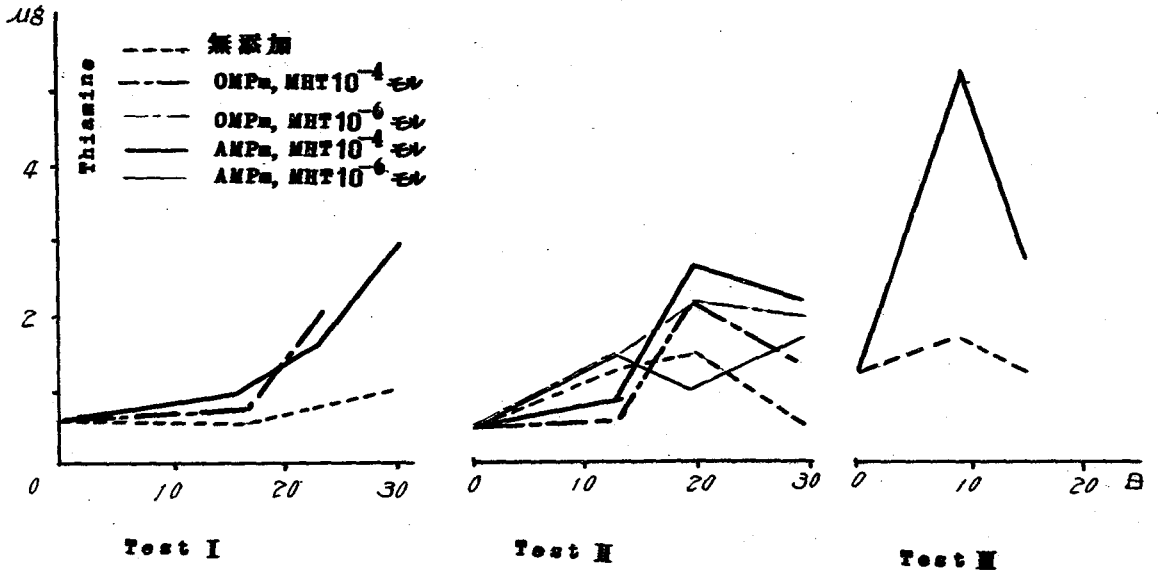
以上の成績により O M P m と M H T 添加でダイコンの Thiamine 量が
著明に高められ, F P m や A M P m もまた M H T の共存で Thiamine 生
成量を高めることが分つた。また L-Cysteine や D, L-Methionine
は O M P m の共存で Thiamine 生成量を高めず, M H T の代用にはなり
にくい。

(Ⅳ) 砂耕培養液中に Pyrimidine 誘導体と 4-Methyl-5 β -hydroxy-
ethylthiazole 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 O M P m または A M P m
と M H T 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 20
cm 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 Test III では O M P m + M H T 添加または A M P m + M H T 添加
で無添加のもの約 2 倍の Thiamine が生成されている。Test II 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
Test III 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 O M P m や A M P m と M H T 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



Test I, IIは収穫後11ヶ月のもみ米, IIIは6ヶ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-5 β -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。

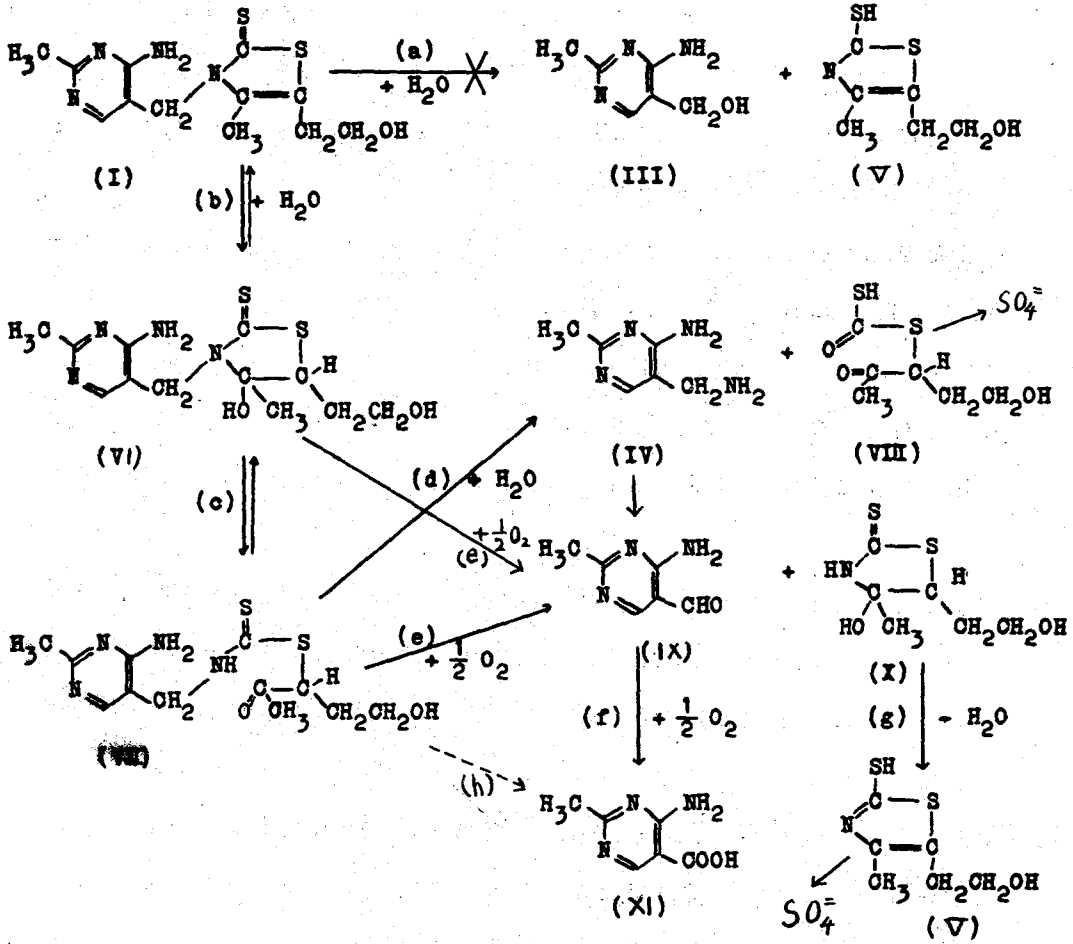
一方シロネズミに Thiothiamine を大量注射すると体内での分解量が大きくなるとともに尿中 SO_4^{2-} 排泄量が増加し、分解された Thiothiamine の Thiazole 部が SO_4^{2-} にまで完全分解することが考えられる。Thiothiazolidine 体 (VI) 注射尿についても同様の結果が観察され、AMPm (IV) が検出されて SO_4^{2-} の排泄量はさらに大きい。Thiothiazolidine 体 (VI) が Thiothiamine と同じように代謝されて (IV) を生成することが考えられるが、Thiothiamine \rightarrow 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^{2-} 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^{2-} 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) (X) を生成すると仮定すると 2-Mercapto-MHT (V) の生成が説明できる。

以上を総合して 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 Kraut³⁸⁾ 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-5 β -hydroxyethylthiazole 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 5 β -hydroxyethyl の部分が未変化の 2-Mercapto-5 β -hydroxyethylthiazole (V) が分離証明されると同時に SO_4^{2-} としてかなり尿中に排泄されていた。 SO_4^{2-} 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^{2-} になる経路も十分に予想できる。

また Thiothiamine と化学構造の酷似する Desoxymethylthiothiamine 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、Thiothiamine 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 \rightarrow CAPm の変化が主なる代謝経路であるとするれば CAPm の生成量も多くなければならない。AMPm \rightarrow 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 Fink⁴²⁾ 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 $OMPm + MHT \rightarrow Thiamine$ 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 $C_3H_5N_2-HCl$ 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 Harington⁴⁷⁾ 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 の代わりに 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 のイネ葉における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-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) (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ィ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 (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 (X) 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 (X) に一致し、(X) 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 (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 SO_4^{2-} の排泄量は非投与時の尿中 SO_4^{2-} 排泄量よりはるかに高く Thiothiamine の約 32~45% が SO_4^{2-} 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% であつたが、 SO_4^{2-} 排泄量は Thiothiamine 投与時以上に多く (VI) の 70% あまりが SO_4^{2-} 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^{2-} 排泄量は非投与時と差がなかつた。

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 (VI) および 2-Methyl-4-amino-4-pyrimidinecarboxylic acid (VII) 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 (VIII) の投与时と比較して 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。

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-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, 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 の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-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-pyrimidine-carboxylic acid (X) 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 (X) 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 (X) 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吸収を測定すると (IX) のものにはほぼ一致し, (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-5 β -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 (X) 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 (I) 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-5 β -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 (X) 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っ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っ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 除去ジャガイモ澱粉	60
カゼイン	25
大豆油	15
Mc Colium 塩 No. 185	5
水	110
ほかに1日1匹あたり	
肝油	0.1g
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ィー

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 No. 50 につけ2種の展開溶媒で次元上昇法 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。P P C 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 1.5 Kg 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 P P C 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、P P C 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-5 β -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 を作った。本品は mp 117° の淡黄色針状晶で 2-Mercapto-MHT の標品より作った 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 15ℓ 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つ水 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 $1\mu\text{g}/\text{ml}$

前後となるように希釈したのち NHCl 2 ml 加えて沸とう水浴中で5分間加熱して Thiiothiamine 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 Thiiothiamine を定量しその差を求めることにより Thiiothiazolidine 体と Thiiothiamine との分離定量が可能である。この方法による Thiiothiazolidine 体の検出率は 95 ~ 105 % であつた。Thiiothiamine, Thiiothiazolidine 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) Thiiothiamine および Thiiothiazolidine 体投与尿中より 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の定量
Thiiothiamine および Thiiothiazolidine 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 Thiiothiamine, Thiiothiazolidine 体を除去しなければならない。そのために尿 2 ml (Thiiothiazolidine 体は Thiiothiamine に変化せしめたのち) に飽和 BrCN 水溶液 6 ml を加え pH 3.0, 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 0.8 cm のカラムに 12 cm の高さにつめ $\text{N NaOH} \rightarrow \text{水} \rightarrow \text{N HCl} \rightarrow \text{水}$ 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 2 ml を吸着せしめた。蒸留水 50 ml を通して水洗後, 0.01 N HCl 30 ml で AMPm を脱着し, pH 5.0 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 Thiiothiamine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	Thiiothiamine		Thiothiazolidine体	
	mg	%	mg	%
Thiiothiamine 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。

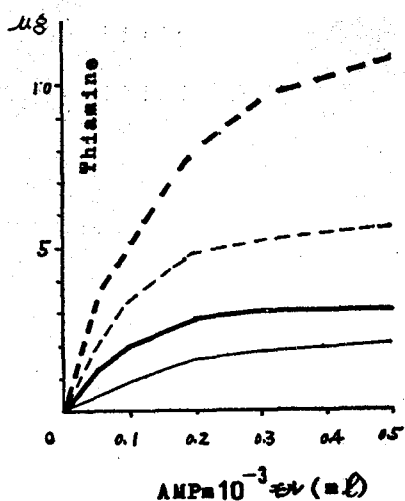


図 26 前培養時間と分注後の培養時間のちがいと Thiamine 合成量

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

(b) 短時間法

培地 400 ml につき MHT 10^{-3} モル 1.5 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 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。尿管と 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 AMPm 100mg 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腎碎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

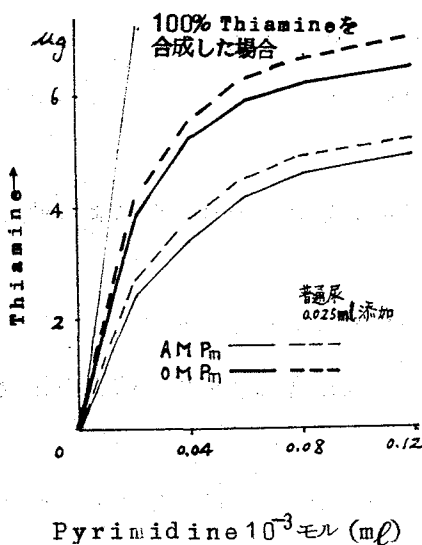
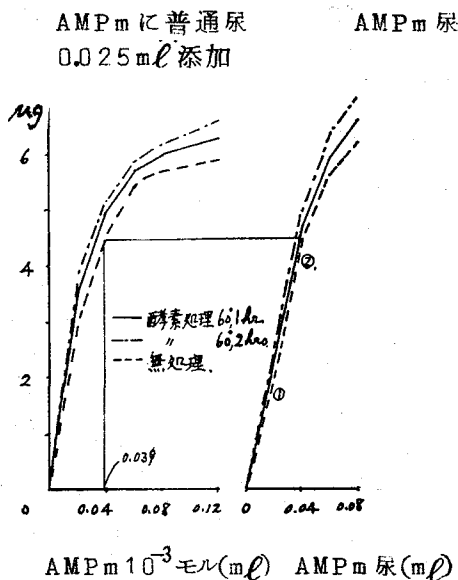


図 28 Thiamine 量より AMPm 量への換算 (短時間法)



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 0.02 ml は AMPm 10^{-3} モル ($211 \mu\text{g}/\text{ml}$) 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 245m μ 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 245m μ 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 × 40 cm) に 0.05 ml のマイ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 11~13 cm (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 m μ 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 1.1 ~ 1.3 cm 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った標準液の検量曲線より AMPm 量を
求めた。

また P P C により AMPm を分離する場合は AMPm 尿 0.2 ml を東
洋濾紙 No. 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 m μ 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 m μ の吸光度より
算出した値の比較

245 m μ 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	
P E P	7.4 0	2.8 0	3.8 4	4.5 0
P P C	8.8 0	3.8 2	4.1 2	

P E P = 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 μ g 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 1.2 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 M H T 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。したがって 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 ~ 200 g の雌シロネズミに AMPm 100 mg 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 ~ 200 g の雌シロネズミ 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 28.9 mg 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 3.8 cm のクロマト管に精製パームチットを 9 cm 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 (pH 5.5) 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て合して 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で洗った。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。全量を角濾紙に带状につけて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No 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 = 2 1.5 6

$C_{12}H_{10}N_6O_9$ として計算値 N = 2 1.9 9

標品の分析値 N = 2 1.6 6

またCAPmのpicrate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っていない。

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1.5g、尿量159ml中30.5mg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31.9mg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

碎液による分解産物

i) 反応条件

シロネズミ肝50gをガラス製のホモゼナイザーにして冷時磨碎しAMPm 500mgを少量の水に溶かして添加し0.1モル磷酸緩衝液(pH 7.2)にて100ml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310mg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 × 2.5 cm) 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 P P C すると D 試薬にて Rf 0.1, 0.28, 0.35 を抽出した。Rf 0.28 部を P P C 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 mp 226° 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 = 2.200

$C_{12}H_{10}N_6O_9$ として計算値 N = 2.199

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 P P C により Rf 0.73 が検出され F P m 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 P P C 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8kgと成熟したイネ葉5kgの分離操作は別に行い、数回にわたっ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。その濾液と残滓の水抽出液(残滓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4cm,高さ50cm,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4cm,高さ50cm,100~200 mesh, NHCl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 NHClで脱着し(Fr. I)さらに0.1 NHClで脱着した(Fr. II)。Fr. I, IIはそれぞれ紫外部245m μ 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 10 g より 10 ~ 50 ml 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 (pH 5.4 ~ 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 - 9 cm の Petri 皿に綿でふるい、よく水洗して乾燥した砂を約 0.8 cm 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をまきダイコンの種 1 g 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), 可溶性リン酸 6.0 (そのうち水溶性リン酸 4.5)

水溶性カリ 19.0 である。暗所で $22 \sim 25^\circ$ 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-hydroxymethyl-pyrimidine と 4-Methyl-5 β -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-5 β -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
 ミマイクロ 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)	Thia- mine (μ g)	N 量 (mg)	N/乾燥量 $\times 100$ (%)
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)(i)(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) p 74
- 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)

... ..