

Title	ThiamineによるSaccharomyces carlsbergensis 4228の増殖阻害機作に関する研究
Author(s)	紀氏, 健雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/29950">http://hdl.handle.net/11094/29950</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名・(本籍)	き	し	たけ	お
	紀	氏	健	雄
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	2016	号	
学位授与の日付	昭和45年3月30日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	<b>Thiamine による <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> 4228 の増殖阻害機作に関する研究</b>			
論文審査委員	(主査) 教授 川崎近太郎			
	(副査) 教授 上原喜八郎 教授 青沼 繁 教授 岩田平太郎			

### 論 文 内 容 の 要 旨

*Saccharomyces carlsbergensis* 4228 はビタミン B<sub>6</sub> の微生物定量に汎用されている酵母であるが、そのビタミン B<sub>6</sub> 要求は絶対的なものではなく、Thiamine の添加でおこる増殖阻害回復のためのものである。著者は本酵母の Thiamine による増殖阻害とそれに付随しておこるビタミン B<sub>6</sub> 要求の機作について検討し以下の知見をえた。

#### (1) Thiamine 関連化合物の構造と増殖阻害作用の関係

*Saccharomyces carlsbergensis* およびそれより作成した Thiamine で阻害されない Thiamine 適応菌にたいする Thiamine 関連化合物の作用を比較検討した。その結果ビタミン B<sub>6</sub> で回復可能な増殖阻害作用は Thiamine もしくは Thiamine に生理的に戻りうることの知られている化合物にのみ認められるもので、Thiamine のチアゾール部5位の OH 基を除くなど Thiamine の構造をわずかに変化させても消失し、Thiamine のきわめて特異的な作用であることを明らかにした。また Thiamine と構造類似の Pyrithiamine, Imidazolothiamine および Oxythiamine も本酵母にたいして増殖阻害作用を有したが、これらはビタミン B<sub>6</sub> で回復されず、Thiamine のみで回復され抗 Thiamine 作用のためであることを明らかにし、同時に本酵母でも Thiamine は生理上重要な因子であることを示した。

#### (2) Thiamine およびビタミン B<sub>6</sub> の燐酸化合物の作用

Thiamine およびビタミン B<sub>6</sub> はいずれもその燐酸化合物が生理活性型であるが、本酵母では Thiamine diphosphate が Thiamine と同等の阻害作用を有するのにたいしビタミン B<sub>6</sub> の燐酸化合物には回復作用がないのでその理由を調べた。その結果 Thiamine の燐酸化合物は Thiamine 同様容易に菌体に取り込まれるが、その大部分が Phosphatase によって加水分解された遊離

型 Thiamine の状態で見い出され菌体内では Thiamine として作用していることが明らかになった。一方、Pyridoxal phosphate は Thiamine diphosphate を切る Phosphatase では加水分解されず、しかも Pyridoxal が取込まれる条件下でも菌体に取り込まれないため回復作用のないことが認められた。

### (3) Thiamine による増殖阻害作用と培地成分の関係

ビタミンB<sub>6</sub>がアミノ酸代謝の重要な因子であることを考慮して本酵母の増殖にたいする Thiamine およびビタミンB<sub>6</sub>の作用と共存アミノ酸の関係を調べると、基礎培地に欠けている Tryptophan にビタミンB<sub>6</sub>節約効果が認められたが、他のアミノ酸にはなかった。また単一アミノ酸を窒素源とするばあい本酵母は Aspartic acid, Glutamic acid, Arginine などで比較的良好に増殖し、Thiamine とビタミンB<sub>6</sub>の共存では *Saccharomyces cerevisiae* に近いアミノ酸利用傾向を示した。しかし無添加およびビタミンB<sub>6</sub>添加ではいずれのアミノ酸を用いるばあいも増殖が悪く、Thiamine 添加ではさらに劣り、特定のアミノ酸の使用により Thiamine とビタミンB<sub>6</sub>の作用関係が著明に変化することはなかった。また従来パントテン酸に Thiamine による増殖阻害の回復作用があるとの報告がみられるが、Thiamine の10,000倍の添加でも確認されず本酵母における Thiamine とビタミンB<sub>6</sub>の拮抗関係はきわめて特異性の高い現象であることが判明した。

### (4) 増殖ならびに菌体内ビタミンB<sub>6</sub>含量にたいする Thiamine およびビタミンB<sub>6</sub>の影響

接種菌量を約 20mg % (OD 0.25~0.3) と多くし、30°C, 80回/分 往復振とう培養するさいの増殖にたいする Thiamine およびビタミンB<sub>6</sub>の作用を調べると接種菌の Age によって変化した。対数増殖期末までの短時間培養菌は Thiamine で阻害されず Thiamine+ビタミンB<sub>6</sub>>ビタミンB<sub>6</sub>>Thiamine>無添加の順で増殖し、定常期の長時間培養菌を用いるばあいにはのみ、Thiamine+ビタミンB<sub>6</sub>>ビタミンB<sub>6</sub>>無添加>Thiamine 添加の順で Thiamine が増殖を阻害し微生物定量条件下とよく一致する結果を示すことがわかった。なおこの条件下での最も強い増殖阻害作用は Thiamine-HCl 500 μg % 以上の添加で認められ、その最も効果的な回復には Pyridoxine-HCl 2 μg % 以上の添加を必要とした。接種菌の Age により Thiamine の作用の変化する原因は Thiamine+ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>6</sub>および無添加培養時には余り変動しない増殖の Generation time が Thiamine 添加時には接種菌の前培養時間の長いものほど長くなるため、この現象は接種菌のビタミンB<sub>6</sub>含量ならびにビタミンB<sub>6</sub>生合成力の変動と関連していることが推定された。そこで無添加および Thiamine-HCl 500 μg % 添加で培養し、増殖と菌体ビタミンB<sub>6</sub>含量の関係を調べると、無添加時には増殖に先行して始まるビタミンB<sub>6</sub>の生成が Thiamine 添加時には阻害され菌体あたりビタミンB<sub>6</sub>含量も増殖が進むにつれて低下することが認められた。Thiamine によるビタミンB<sub>6</sub>生成の阻害は Thiamine による増殖阻害の有無に関係なく認められ、また Thiamine で増殖を阻害されない *Saccharomyces cerevisiae* 2種でも認められた。しかし *Saccharomyces carlsbergensis* の Thiamine で増殖を阻害される条件のときに特に著明であった。増殖速度と接種菌のビタミンB<sub>6</sub>含量および増殖にともなうビタミン

ン B<sub>6</sub> 生成速度の関係を調べると、Thiamine 添加時の増殖速度はその両者に支配されており菌体のビタミン B<sub>6</sub> 濃度が増殖の律速因子であることがわかった。Thiamine とビタミン B<sub>6</sub> の共存では増殖が促進されるが、Thiamine 500  $\mu\text{g} \%$  と Pyridoxine-HCl 2  $\mu\text{g} \%$  の添加で培養すると増殖に十分なビタミン B<sub>6</sub> 菌体に取り込まれ高い菌体 ビタミン B<sub>6</sub> 含量を示した。したがって Thiamine による増殖阻害の原因は ビタミン B<sub>6</sub> 生合成阻害による ビタミン B<sub>6</sub> 欠乏のためであると推定された。

#### (5) ビタミン B<sub>6</sub> 関与代謝系としてのニコチン酸生合成系にたいする Thiamine の影響

Thiamine 添加培養時のビタミン B<sub>6</sub> 欠乏の有無を調べるため、Thiamine による増殖阻害の認められる条件下でビタミン B<sub>6</sub> 関与代謝系の1つであるニコチン酸生合成系にたいする Thiamine の作用を検討した。その結果 Thiamine 添加培養時にはニコチン酸の生成が阻害されており、しかもこの阻害はビタミン B<sub>6</sub> の添加で回復されることから Thiamine 添加時には菌体 ビタミン B<sub>6</sub> の欠乏していることが判明した。さらにニコチン酸前駆体を使用して本酵母のニコチン酸が Tryptophan から Kynurenine, 3-Hydroxyanthranilic acid, Quinolinic acid を経て生成することを示唆するとともに、Thiamine 添加時には Tryptophan 以前および Kynurenine から 3-Hydroxyanthranilic acid の間の両過程でニコチン酸の生成が妨げられており、この間に介在するビタミン B<sub>6</sub> 酵素 Tryptophan synthetase および Kynureninase の活性低下の可能性を示した。

## 結 論

*Saccharomyces carlsbergensis* 4228 のビタミン B<sub>6</sub> 要求の原因である Thiamine による増殖阻害作用は、Thiamine にきわめて特異的な作用であることを一連の Thiamine 関連化合物を用いて明らかにした。また Thiamine による増殖阻害とビタミン B<sub>6</sub> によるその回復の相互作用はアミノ酸やビタミンなどの共存因子によってほとんど影響されないことを明らかにした。さらに増殖と菌体 ビタミン B<sub>6</sub> 含量ならびにニコチン酸含量の関係を調べ、Thiamine による本酵母の増殖阻害作用は Thiamine のビタミン B<sub>6</sub> 生合成阻害作用により ビタミン B<sub>6</sub> が欠乏し、その結果ニコチン酸生合成など ビタミン B<sub>6</sub> 関与代謝系が阻害されるためであることを証明し、本酵母を用いる ビタミン B<sub>6</sub> 定量法がきわめて特異性の高い方法であることを確認した。

## 論文の審査結果の要旨

*Saccharomyces carlsbergensis* はチアミンにより増殖阻害され ビタミン B<sub>6</sub> により特異的に回復されるが、その機作に関しチアミン関連化合物および培地成分について検討し、増殖時の菌体内 B<sub>6</sub> 含量およびニコチン酸含量の測定からチアミンの添加により菌体内 B<sub>6</sub> の増加が抑制されることを明かにした。本酵母はチアミンを必須とするが、チアミンの過剰により B<sub>6</sub> 生合成が抑制され B<sub>6</sub> 欠乏によりニコチン酸生合成も低下することを証明した。よって本論文は薬学博士の学位を授与するに値するとみとめる。