

Title	イミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類の抗チアミン作用とその作用機構
Author(s)	宮原, 龍郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/29994">http://hdl.handle.net/11094/29994</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

氏名・(本籍)	みや 宮	はら 原	たつ 龍	ひう 郎
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	2020	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	イミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類の抗チアミン作用とその作用機構			
論文審査委員	(主査)			
	教授 川崎近太郎			
論文審査委員	(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

チアミンのチアゾール核をイミダゾールおよびトリアジン核におきかえた化合物すなわちイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類がチアミン要求性乳酸菌 *Lactobacillus fermenti* および同酵母 *Kloeckera apiculata* に対し抗チアミン作用を示すことが倉田らによって明らかにされている。

*L. fermenti* に対してはチアミンと構造類似性の大きいイミダゾロチアミン類の方がトリアジノチアミン類に比べかなり強い抗チアミン作用を示した(表1参照)。

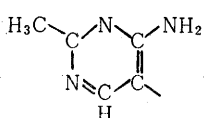
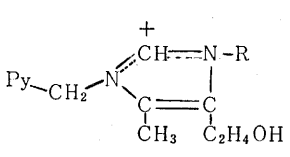
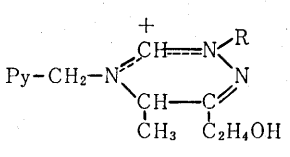
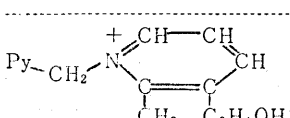
*Kl. apiculata* に対してもほぼ同様の傾向を示したが、次の2点において異なった。

- (1) *L. fermenti* に対しては3種のイミダゾロチアミン類はほぼ同程度の抗チアミン作用を示したが、*Kl. apiculata* に対するイミダゾロチアミンの抗チアミン作用は他の2化合物に比べかなり弱い。
- (2) フェニルトリアジノチアミンによる *L. fermenti* の増殖抑制はチアミンで回復するが、*Kl. apiculata* に対するフェニルトリアジノチアミンの増殖抑制作用はチアミンで回復しない。

このように *L. fermenti* と *Kl. apiculata* においてみられる化学構造と抗チアミン作用との関連性の差異はとりこみまたは酵素系におけるチアミンとの拮抗様式が両微生物間で異なることを示唆する。

著者はイミダゾロチアミン類その他の定量法を確立し、これら化合物の菌体のとりこみならびにチアミンとりこみ阻害作用との関連性から両微生物に対する抗チアミン作用の作用機構を解明することを中心として研究を行なった。

Table 1. The used compounds and their growth-inhibition indices on *Lactobacillus fermenti* and *Kloeckera apiculata*

Py = 	R	Compounds used	Growth-inhibition index*	
			<i>L. fermenti</i>	<i>Kl. apiculata</i>
 Imidazolothiamine compounds	H	Imidazolothiamine (Imidazo-B <sub>1</sub> )	460	3,500
	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Benzyl-imidazolothiamine (BzI-B <sub>1</sub> )	810	530
	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Butyl-imidazolothiamine (BuI-B <sub>1</sub> )	500	900
 Triazinothiamine compounds	H	Triazinothiamine (Triazino-B <sub>1</sub> )	14,700	52,000
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Phenyl-triazinothiamine (PT-B <sub>1</sub> )	55,000	**
 Pyri-thiamine (Pyri-B <sub>1</sub> )	—	Pyri-thiamine (Pyri-B <sub>1</sub> )	10	38

\* A molar ratio of antithiamine compound to thiamine required for 50% growth-inhibition.

\*\* Growth-inhibition by phenyltriazionthiamine (10<sup>-6</sup>mole/tube) was not recovered by the addition of thiamine.

### 第1章 イミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類の定量法の検討

チアミン要求菌に対するイミダゾロチアミン類その他の増殖抑制機構を解明するに当り、これら化合物の菌体へのとりこみを検索するため微量測定法が必要である。

これらの化合物の化学構造から考え、アルカリ性で BrCN またはフェリシアンカリウムと反応してチオクロームと類似物質の生成を検討するため、両試薬の添加によって蛍光を示すか調べた。

BrCN との反応ではベンジルイミダゾロチアミンが、フェリシアンカリウムとの反応ではベンジルイミダゾロチアミンおよびトリアジノチアミン類が蛍光を示すことがみとめられたが、蛍光の確認限度から考えベンジルイミダゾロチアミンの BrCN による蛍光生成反応のみが定量法に

利用できる。生成する螢光物質が結晶として分離され、その螢光度を基準として高感度で精度の高いベンジルイミダゾロチアミンの螢光定量法を確立した。

一方、イミダゾロチアミンを 4-Methyl-5-(2-hydroxyethyl)-thiazole とともに *Saccharomyces carlsbergensis* 菌体と保温するとチアミンが生成することが川崎らによってみとめられているので、その最適条件を検討してイミダゾロチアミンの定量法を確立した。この方法に従ってトリアジノチアミン類も定量することができた。

## 第2章 チアミン要求性乳酸菌 *Lactobacillus fermenti* に対するイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類の抗チアミン作用

*L. fermenti* に対して抗チアミン作用を示すイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミンについてチアミンまたはチアミンジフォスフェートのとりこみに対する阻害作用をしらべ増殖抑制作用との関連をしらべた。

イミダゾロチアミン類その他は本菌のチアミンとりこみを阻害し、その阻害度がピリチアミン > イミダゾロチアミン類 > トリアジノチアミンの順となり、各化合物の増殖抑制度の順位と一致することをみとめた。しかも各化合物共存時のチアミンとりこみ率と増殖抑制指数との間に良好な相関関係がみられたことから、イミダゾロチアミン類その他の本菌に対する増殖抑制作用は主としてそれらのチアミンとりこみ阻害作用に基因するとして説明できる。

イミダゾロチアミン類その他も本菌にとりこまれたが、そのとりこみ量が非常に少ないことおよび上述のようにチアミンとりこみ阻害度と増殖抑制度が一致することから、本菌においてイミダゾロチアミン類その他が菌体内チアミンと拮抗するとしても増殖に対する影響は少ないと考えられる。

一方、イミダゾロチアミン類その他はチアミンジフォスフェートのとりこみに対してチアミンとりこみに対してより強い阻害を示したが、このことは各化合物の増殖抑制がチアミン含有培地で強くあらわれたことと関連があり、とりこみの段階においてチアミンジフォスフェートとより強く拮抗するためにチアミンジフォスフェート含有培地で増殖抑制がより強くあらわれたものといえる。

## 第3章 チアミン要求性酵母 *Kloeckera apiculata* に対するイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類の抗チアミン作用

*L. fermenti* と *Kl. apiculata* とではチアミン誘導体の作用 および チアミンのとりこみ形式などにおいて異なることが川崎らによってみとめられており、また、冒頭で述べたように抗チアミン作用も化合物によって両微生物間で異なるのでこの相違点を次の(1)および(2)において究明した。

(1) *Kl. apiculata* におけるイミダゾロチアミン類その他のとりこみとチアミンとりこみ阻害本酵母のチアミンとりこみに対するベンジルイミダゾロチアミンおよびピリチアミンの阻害作用を菌体量および保温時間について検討したところ、菌体量が多いほど保温時間が長くなるにつ

れ各化合物の菌体へのとりこみが進み菌体外液濃度が減少してチアミンとりこみ阻害が弱くなることをみとめた。

短時間で菌体量を少なくしてイミダゾロチアミン類その他のチアミンとりこみ阻害作用をしらべると、各化合物は競合的にチアミンのとりこみを阻害することがわかった。

各化合物のチアミンとりこみに対する阻害度はベンジルイミダゾロチアミン≫ピリチアミン>イミダゾロチアミン>ブチルイミダゾロチアミン≫トリアズノチアミンの順となり、増殖抑制度の順位と必ずしも一致しなく、むしろ抗チアミン化合物のとりこみ量と抗チアミン化合物共存時のチアミンとりこみ量との比の方が増殖抑制指数と深い関連性を示した。

## (2) イミダゾロチアミンおよびベンジルイミダゾロチアミンによる *Kl. apiculata* の増殖抑制時の菌体チアミン含量の経時的变化

(1)において本酵母ではとりこみにおける阻害の他に菌体にとりこまれた抗チアミン化合物が増殖抑制に関連することがみとめられたので、抗チアミン化合物が増殖抑制時に菌体チアミン含量(とくに結合型チアミン含量)に与える影響をしらべた。

抗チアミン化合物として比較的菌体にとりこまれやすいイミダゾロチアミンととりこまれにくいベンジルイミダゾロチアミンとを用いて、(1)菌体(1 mg)にチアミンと抗チアミン化合物を同時添加して培養した場合、(2)チアミンをとりこませた菌体を抗チアミン化合物含有培地で培養した場合 および (3)抗チアミン化合物をとりこませた菌体をチアミン含有培地で培養した場合の3種の実験を行なった。

共存する抗チアミン化合物が菌体総チアミン含量に与える影響はとりこみにおける強い拮抗がみられた実験(1)の場合に観察されたが、結合型チアミンの生成は実験(1)~(3)を通じて抗チアミン化合物の共存によってほとんど影響をうけないことがみとめられた。

増殖初期の菌体チアミン含量がそれ以後の増殖度と関連性を有するかしらべるために、2時間後の菌体 mg 当りの総または結合型チアミン量と8時間後の増殖度との相関係数を求めると約0.5であった。さらに2時間後の菌体内総または結合型チアミンの抗チアミン化合物に対する集積比と増殖度との相関係数を求めると約0.8であった。

このような増殖度と菌体内チアミン量またはチアミン・抗チアミン化合物集積比との相関関係から推論すると増殖初期の菌体チアミン含量がある程度増殖に影響を与えるが、増殖初期の菌体内チアミンと抗チアミン化合物の比すなわち両者の拮抗が増殖を支配するものといえる。

以上によって、本酵母においてはイミダゾロチアミン類がとりこみ時にチアミンと拮抗するだけでなく菌体内でもチアミンと拮抗することが明らかになり、また、とりこみにおける拮抗が主であった *L. fermenti* の場合との差異が明確になった。

## (3) *Kl. apiculata* に対するフェニルトリアジノチアミンの増殖抑制作用

本酵母に対するフェニルトリアジノチアミンの増殖抑制がチアミンで回復しない原因を追求するために、本化合物の安定性をしらべた。本化合物が培地中30°C、20時間保温の培養条件で加水分解をうけ、フェニルヒドラジンを生成することを証明した。フェニルヒドラジンは乳酸菌に対して弱い増殖抑制作用しか示さないが、酵母に対しては非常に強い増殖抑制を示し、その抑制

度はフェニルトリアジノチアミンに比べはるかに大であった。

フェニルトリアジノチアミンによる増殖抑制がチアミン添加により乳酸菌では回復し、酵母では回復しないのは両微生物のフェニルヒドラジンに対する感受性に大きな差があるためと説明される。

したがってフェニルトリアジノチアミンの酵母に対する増殖抑制作用は本化合物から分解して生ずるフェニルヒドラジンに基因することが明らかになった。

#### 第4章 チアミン非要求性酵母に対するイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類の作用

チアミン非要求性でビタミン B<sub>6</sub> 不含培地においてチアミンの添加で増殖抑制をうける酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* とチアミンで抑制をうけない酵母 *Sacch. cerevisiae* に対するイミダゾロチアミン類の作用を検討した。また第3章で菌体内チアミンとイミダゾロチアミン類の拮抗が明らかにされたのでチアミン関与酵素系に対する作用を *Sacch. cerevisiae* から抽出した酵素を用いて検討した。

##### (1) *Saccharomyces carlsbergensis* および *Sacch. cerevisiae* に対するイミダゾロチアミン類その他の増殖抑制作用

ビタミン B<sub>6</sub> 不含培地ではイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミンが低濃度で *Sacch. carlsbergensis* の増殖を促進し高濃度で抑制してチアミンと相似の態度を示した。

ビタミン B<sub>6</sub> 含有培地ではチアミンと拮抗して増殖抑制を示し、その抑制はチアミンで回復した。ところがチアミンが多量存在する培地ではビタミン B<sub>6</sub> と拮抗して増殖抑制を示し、その抑制はチアミン量を増しても回復せず、ビタミン B<sub>6</sub> で回復することをみとめた。

ベンジルイミダゾロチアミンについて本酵母のチアミンまたはビタミン B<sub>6</sub> のとりこみに対する阻害作用を検討し、増殖におけるチアミンとビタミン B<sub>6</sub> との拮抗状態をほぼ明らかにした。

一方、*Sacch. cerevisiae* に対してもイミダゾロチアミン類がチアミンと拮抗して増殖抑制を示すことをみとめた。

##### (2) *Saccharomyces cerevisiae* から調製したチアミン関与酵素系に対するイミダゾロチアミン類その他の作用

本酵母から調製した Pyruvate decarboxylase および Thiamine pyrophosphokinase にするイミダゾロチアミン類の作用をしらべたところ、pyruvate decarboxylase に対してはイミダゾロチアミン類の各ジフォスフェートが Thiamine pyrophosphokinase に対してはベンジンまたはブチルイミダゾロチアミンが阻害を示すことを証明した。

## 結 論

イミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類のチアミン要求性微生物に対する増殖抑制機構を主として検討し、以下の成績をえた。

(1) *L. fermenti* においてはイミダゾロチアミン類その他のチアミンとりこみ阻害度と増殖抑制度が一致したことから、本菌に対するこれら化合物の増殖抑制作用はチアミンとりこみ阻害が

主要原因となっておこることを明らかにした。

- (2) *Kl. apiculata* においてはイミダゾロチアミン類その他のチアミンとりこみ阻害度と増殖抑制制度が必ずしも一致しなく、むしろこれら抗チアミン化合物のとりこみ量と抗チアミン化合物共存時におけるチアミンとりこみ量の比の方が増殖抑制指数と深い関連性を示した。また、増殖初期の菌体内チアミンと抗チアミン化合物との比すなわち両者の拮抗の方が菌体チアミン含量に比べそれ以後の増殖に対してより支配的であることをみとめた。

これらのことから、本酵母に対するイミダゾロチアミン類その他の増殖抑制作用はこれら抗チアミン化合物のとりこみ時におけるチアミンとの拮抗および菌体内におけるチアミンとの拮抗の関連によってひきおこされることが明らかになった。

- (3) フェニルトリアジノチアミンの酵母に対する増殖抑制作用について検討し、その増殖抑制が本化合物から加水分解して生成するフェニルヒドラジンに基因することを明らかにし、*L. fermenti* に対する作用との差異を明確にした。

- (4) チアミン非要求性酵母 *Sacch. carlsbergensis* に対してもイミダゾロチアミン類が抗チアミン作用とともに弱い抗ビタミンB<sub>6</sub>作用を示すことを明らかにし、また、*Sacch. cerevisiae* から調製したチアミン関与酵素系に対するイミダゾロチアミン類の作用を証明した。

以上の成績からイミダゾロチアミン類およびトリアジノチアミン類のチアミン要求性微生物に対する抗チアミン作用の作用機構を明らかにし、その作用機構が乳酸菌と酵母で異なる点を明確にした。

## 論文の審査結果の要旨

チアミンのチアゾール部をイミダゾール核またはトリアジン核に代えた化合物はチアミン要求性微生物 *L. fermenti* および *Kl. apiculata* に対し抗チアミン作用を示すが、菌体へのチアミンとりこみを競合し、*Kl. apiculata* においては菌体内においてチアミンと競合することを両種の菌体内へのとりこみならびに増殖抑制を測定し作用機構の解明を試みた。

各化合物の増殖抑制指数とチアミンとりこみ阻害との関連から両種の菌の増殖抑制機作を明確にした。

よって、本論文は薬学博士の学位を授与するに値するものと認める。