



Title	シロネズミにおけるO-Benzoylthiamineの代謝ならびにThiamine-thiazolone体の生成について
Author(s)	垣江, 喜明
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/30045">https://hdl.handle.net/11094/30045</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	かき 垣	え 江	よし 喜	あき 明
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	2014	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	シロネズミにおける O-Benzoylthiamine の代謝ならびに Thiamine-thiazolone 体の生成について			
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

### 緒 論

哺乳動物における Thiamine 誘導体の代謝については、側鎖部分の挙動にかんする研究が多く Thiamine 骨格の変化とその酵素系に言及した報告はほとんどみられない。

著者はシロネズミに O-Benzoylthiamine を非経口投与したときの尿中 Thiamine 排泄率が、Thiamine 投与時に比べ著しく低いことを認め、本誘導体が Thiamine とは別個の代謝を受ける可能性を想定した。

まず in vitro でのシロネズミ各組織磨砕液による O-Benzoylthiamine の代謝を検討し、肝臓中に本化合物を Thiochrome 反応陰性物質に代謝する酵素が存在することを認め、さらに代謝産物として Thiamine-thiazolone すなわち 3-[2'-Methyl-4'-aminopyrimidyl (5')]-methyl-4-methyl-5 $\beta$ -hydroxyethylthiazole-(2)-one を分離、同定した。つぎに部分精製酵素の Thiazolium 型 Thiamine 類にたいする作用を検討し、本酵素が O-Acylthiamine 類を特異的に代謝することを明らかにするとともに Thiazolone 体の生成機序についても考察を加えた。さらに O-Benzoylthiamine を腹腔内投与して、その尿中に Thiazolone 体の排泄を確認し、in vivo において本酵素反応が O-Benzoylthiamine の重要な代謝経路のひとつであると推定した。

### 第1章 シロネズミ肝臓中の酵素による O-Benzoylthiamine から Thiamine-thiazolone の生成

シロネズミに Thiamine ならびに O-Benzoylthiamine を腹腔内投与したときの24時間尿中 Thiamine 排泄率は、それぞれ62%および19%で O-Benzoylthiamine には Thiamine とは別個の代謝系が存在するのではないかと予想された。そこで、シロネズミ各組織磨砕液の O-Ben-

zoylthiamine にたいする代謝活性を観察した結果、肝細胞上清画分に本化合物を Thiochrome 反応陰性の化合物に代謝する酵素が存在することを見出した。

つぎに、肝臓より調製した部分精製酵素標品に O-Benzoylthiamine を添加して 37°C で反応せしめ、Sephadex G-75 によるゲルろ過により反応成績体を分離し、エタノールから再結晶して融点 231~232°C の無色針状結晶を得た。本化合物はその赤外ならびに紫外吸収スペクトル、質量スペクトル、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、混融試験および元素分析により Thiazole 核 2 C 位に酸素が付加した新代謝産物、Thiamine-thiazolone と同定された。

このさい、O-Benzoylthiamine-thiazolone が得られず遊離の Thiazolone 体を得られたのは、用いた酵素標品中に混在するエステラーゼの作用により脱 Benzoyl 化が起こるためであることを明らかにした。すなわちエステラーゼ阻害剤 Diisopropylfluorophosphate の共存下では、反応成績体として O-Benzoylthiamine-thiazolone が得られることを薄層クロマトグラフィーにより確認した。

## 第2章 O-Acylthiamine ならびに Thiazolium 型 Thiamine 関連化合物にたいする“O-Benzoylthiamine 酸化酵素”の作用

O-Benzoylthiamine を Thiamine-thiazolone 体に酸化する酵素を以後“O-Benzoylthiamine 酸化酵素”と仮称することとし、12種の O-Acylthiamine および14種の Thiazolium 型 Thiamine 関連化合物にたいする本酵素の作用を検討した。

本酵素は O-Acylthiamine を特異的に代謝し、それ以外の化合物では4種のみがわずかに作用を受けることを認めた。O-Acylthiamine 類では O-Benzoylthiamine が最も代謝されやすく、ついで O-Furoyl > O-iso-Varelyl > O-Caproyl > O-Varelyl > O-Butyryl > O-Propionyl > O-Acetylthiamine の順であった。さらに、Thiamine や Thiamine diphosphate などが基質となり得ないこと、および O-Benzoylthiamine の Phenyl 基における Nitro あるいは Methoxy 置換体がきわめて代謝されにくいことなどより、Acyl 残基の大きさと親油性が本酵素の作用を受けるうえで重要な役割をもつものと推論されるが、O-Acylthiamine を特異的に代謝する酵素といえる。

## 第3章 O-Benzoylthiamine から Thiamine-thiazolone 体の生成機構

“O-Benzoylthiamine 酸化酵素”による Thiamine-thiazolone 体生成反応の経過 pH は 8.5 ~ 9.0 付近の弱アルカリ域に存在した。本酵素反応は嫌氣的条件下ではほとんど進行しなかったが、嫌氣的条件下でも 2,6-Dichlorophenolindophenol を添加することにより反応が進行することを見出した。また本酵素反応において添加 Cytochrome C が還元されることを認めた。これらより O-Benzoylthiamine の酸化的代謝反応において分子状酸素は直接 Thiazole 核に付加するのではなく水素受容体として働くものと推定された。なお、本酵素反応は KCN, Diethyldithiocarbamate, o-Phenanthroline のごとき金属キレート剤、p-Chloromercuribenzoate, N-Ethylmaleimide のごとき SH 試薬あるいは Quinacrine などにより阻害され、フラビン酵素として

の一般的性質をもつことが示唆された。これらの知見から、O-Benzoylthiamine から Thiazolone 体の生成にかんし、Pseudobase 型 O-Benzoylthiamine の脱水素反応による機構を推定した。

#### 第4章 シロネズミに Thiamine, O-Benzoylthiamine ならびに Thiamine-thiazolone 腹腔内投与時の尿中 Thiamine-thiazolone の検索

第1章および第2章でのべた O-Benzoylthiamine の酸化的代謝反応が in vivo でも実際に認められるかどうかを検討した。Thiamine-thiazolone の定量法として Sacch. cerevisiae を用いる生物学的微量定量法を考案し、数  $\mu\text{g}$  レベルの定量が可能であることを認めた。本定量法と薄層クロマトグラフィーとを組合わせた Bioautography により、シロネズミに Thiamine, O-Benzoylthiamine ならびに Thiamine-thiazolone をそれぞれ Thiamine 塩酸塩 20mg 当量/四腹腔内投与したときの尿中 Thiamine-thiazolone 量を測定した。

Thiamine-thiazolone 自体を投与したときの24時間尿中排泄率はわずか20%以下であり、本化合物は体内できわめて代謝されやすいことを認めた。O-Benzoylthiamine 投与尿中には約 0.7 mg の Thiamine-thiazolone が検出されたが、Thiamine-thiazolone の体内分解率を考慮すれば投与量の少なくとも20%が Thiamine-thiazolone に代謝されたことになり、本反応は O-Benzoylthiamine の重要な代謝経路のひとつではないかと推定された。なお in vitro の結果から予想されたように、Thiamine の投与では尿中に Thiamine-thiazolone は検出されなかった。

#### 総括ならびに結論

O-Benzoylthiamine をシロネズミに非経口投与したときの尿中 Thiamine 排泄率が Thiamine 投与時に比べ著しく低い原因を追求し、以下の知見を得た。

(1) O-Benzoylthiamine の Thiazole 核を酸化的に代謝する酵素がシロネズミ肝臓中に存在することを見出すとともに、Thiamine 関連化合物の新代謝産物として Thiamine-thiazolone を分離、同定した。

(2) 26種の Thiazolium 型 Thiamine 関連化合物にたいする本酵素の作用を検討し、O-Acylthiamine 類が特異的に代謝されることを認めた。しかし遊離の Thiamine はまったく代謝されなかった。

本酵素反応において、添加した Cytochrome C が還元されること、および嫌氣的条件下でも 2,6-Dichlorophenolindophenol を添加すると反応が進行することから、Pseudobase 型 O-Benzoylthiamine からの脱水素反応による Thiamine-thiazolone 体の生成機序を推定した。

(3) Thiamine-thiazolone の生物学的微量定量法を考案し、O-Benzoylthiamine 投与時の尿中に Thiamine-thiazolone が排泄されることを認めた。

以上より、シロネズミ肝臓中に存在する酵素により、O-Acylthiamine 類が Thiamine 関連化合物の新代謝産物、Thiamine-thiazolone 体に代謝されることを明らかとした。

## 論文の審査結果の要旨

O-Benzoylthiamine を酸化し Thiamine-thiazolone に代謝する酵素がシロネズミ肝に存在すること見出し、本反応の特異性と反応条件とを明確にした。また反応成績体の同定ならびに定量法の確立を行ない、O-Acylthiamine とくに O-Benzoylthiamine に特異的な代謝経路を解明した。

よって本論文は薬学博士の学位を授与するに値するものと認める。