ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 55, No. 6, pp. 499~501, 1981]

ビフィズス菌の生育に及ぼす
pantethine の効果

宇佐美昭次, 古谷野哲夫, 山野利幸*

(早稲田大学理工学部応用化学科,

*株式会社ロッテ中央研究所)

昭和 56 年 1 月 9 日 受理

Effects of Pantethine on the Growth
of *Bifidobacterium*

Shoji USAMI, Tetsuo KOYANO
and Toshiyuki YAMANO*

Department of Applied Chemistry,
Waseda University, Okubo 3-4-1
Shinjuku-ku, Tokyo 160

*Central Research Laboratory, Lotte
Co., Ltd., Urawa, Saitama 336

The effects of pantethine (PaSS) on the growth of *Bifidobacterium* were examined. *Lactobacillus acidophilus* grew on both media containing either Ca-pantothenate (PaA) or PaSS, whereas *Bifidobacterium* grew only on the latter medium. The essential requirement of PaSS for the growth of *Bifidobacterium* seems to be explained from the fact that PaSS itself is the precursor of CoA and ACP. Therefore the insufficiency of PaSS has a direct influence on the cell growth. Further research indicated that glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in PaSS-deficient cells was 26% of that in PaSS-rich cells. It was concluded that the insufficiency of PaSS was an initial factor for the decrease of the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, the key enzyme for biosynthesis, and it in turn also resulted in the decrease of the cell growth.

(Received January 9, 1981)

近年、乳酸菌、とくにビフィズス菌は健康面での有用性が注目され、食品等に広く添加されている。ビフィズス菌の腸内繁殖に関しては、特異的な増殖因子（ビフィズス因子）の存在が指摘され、その検索が行われてきた。黒宮⁽¹⁾はニンジン抽出液がビフィズス菌の生育を促進することを発見したが、田村らはニンジン中よりこの生育促進因子を coenzyme A 前駆体であると同定し⁽²⁾、さ

らに彼らの分離した多数の菌株において、これらの物質の生育促進効果を検討している⁽³⁾。本研究ではビフィズス菌の Type Culture を用いて、pantethine (PaSS) がビフィズス菌に対し生育促進効果を持っていること、および本菌株を用いて PaSS の bioassay が可能であることを認め、さらに PaSS の生育促進の機構について酵素的な知見を得たので報告する。

使用菌株 実験には次の 4 株の Type Culture を用いた。

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IFO-3831
<i>Bifidobacterium animalis</i>	IPCR-1001 (ATCC 25527)
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	IPCR-1002 (ATCC 25526)
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	IPCR-1003 (ATCC 25525)

培養方法および分析法 培養は改変 Thompson 培地⁽⁴⁾ 10ml 中で、気相をガス噴射法⁽⁵⁾により CO₂ で置換し密栓をして 37°C 48hr 行った。菌体量は 610nm での濁度で、UOD として表わした。無細胞抽出液は次の手順で得た。菌体を集菌、洗浄後 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し超音波破壊 (20kHz 30min) 後、18,000×g, 30min 遠心分離した上清を無細胞抽出液として酵素活性測定に用いた。グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は、グルコース-6-リン酸を基質とし、室温で NADP の還元を 340nm で測定することにより求めた⁽⁶⁾。反応液 3.5ml 中には NADP 0.15μモル、グルコース-6-リン酸 2μモル、MgCl₂ 20μモル、0.2M グリシルグリシン緩衝液 (pH 7.0) 0.5ml、無細胞抽出液 0.5ml を含む。1 unit は 1 分間に OD を 0.01 変化させる酵素量として定義した。また、タンパク量は Lowry ら⁽⁷⁾の方法によって定量した。

実験結果および考察 乳酸菌の生育に対する CoA 関連物質の効果をj知るために、種々の濃度の Ca-pantothenate (PaA), PaSS を培地に添加し菌生育を調べた (Table I)。この結果、*Lactobacillus acidophilus* IFO-3831 に対しては PaA, PaSS の両方が生育促進因子としての効果を持っていたが、*Bifidobacterium animalis* IPCR-1001, *B. pseudolongum* IPCR-1002, *B. thermophilum* IPCR-1003 はいずれも PaA 添加では生育できず、PaSS のみが生育促進効果を示した。生体内において CoA は Fig. 1 に示した経路により合成されるが、

Table I. Effects of Ca-Pantothenate and Pantethine on Cell Growth

Strain	Cell Growth (UOD ^a)				
	None	Added compounds ($\mu\text{g/ml}$) Ca-pantothenate		Pantethine	
		0.1	1.0	0.1	1.0
<i>L. acidophilus</i> IFO-3831	0	0.78	1.06	0.36	1.12
<i>B. animalis</i> IPCR-1001	0	0	0	0.51	0.58
<i>B. pseudolongum</i> IPCR-1002	0	0	0	0.71	0.74
<i>B. thermophilum</i> IPCR-1003	0	0	0	1.02	1.25

Cells were grown on Thompson's medium⁽⁴⁾ at 37°C for 48 hr.

^a Expressed as optical density at 610 nm.

Fig. 1. Biosynthetic Pathway of CoA and ACP

Bifidobacterium では明らかに PaA $\rightarrow$ 4'-phosphopantetheine へ至る酵素系を欠いているものと考えられる。また、最大菌体量を得るために必要な PaSS 量は 0.5 ($\mu\text{g/ml}$) で十分であることがわかった。さらに *Bifidobacterium* に対しては CoA による生育促進効果も検討したが、PaSS と同様の効果を有していることを認めている。

PaSS 低濃度下での生育状態を知るために、*B. thermophilum* を用いて、0~0.05($\mu\text{g/ml}$) の PaSS 添加時の生育を調べた (Fig. 2)。この結果、PaSS 0~0.05($\mu\text{g/ml}$) の範囲において菌体量 (UOD) は PaSS 濃度に比例した。したがってこれらの濃度範囲で *B. thermophilum* IPCR-1003 を用いた PaSS の bioassay が可能である。PaSS は紫外部に特徴的な吸収を示すが、これを利用した分光学的定量法では 10($\mu\text{g/ml}$) 程度が限界であるため、微量の PaSS 定量に関しては本法による bioassay が有効であると思われる。bioassay の応用として、*B. thermophilum* IPCR-1003 の PaSS 取り込み速度を求めた。その結果 10 時間までの平均値として、 2.4×10^{-3} ($\mu\text{g/hr} \cdot \text{mg-dry cell}$) を得た。

PaSS はその構造上、ACP (acyl carrier protein) や CoA の前駆体として機能するが、*Bifidobacterium* が PaA 添加では生育できず、生育のために PaSS またはその誘導体を必須に要求するのは、PaA $\rightarrow$ 4'-phosphopantetheine を導く酵素系に欠けているためである。ACP や CoA は細胞成分である脂質の合成や生体内アン

Fig. 2. Effect of PaSS Concentration on the Cell Growth of *Bifidobacterium thermophilum* IPCR-1003. Cells were grown on Thompson's medium at 37°C for 48 hr.

ル基転位などに関与する化合物であり、PaSS 不足によって起るこれらの物質の濃度低下は、直接、細胞増殖を抑える方向に働くものと考えられる。ここで生育促進機構の一つの証拠を得るために、*B. thermophilum* IPCR-1003 を用いて PaSS-rich cell (PaSS 1.0 $\mu\text{g/ml}$ で培養したもの) と PaSS-deficient cell (PaSS 0.01 $\mu\text{g/ml}$ で培養したもの) の無細胞抽出液を用意し、両抽出液中のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を測定した。この結果、PaSS-deficient cell 中のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性は PaSS-rich cell 中のものと比較して、26% の活性しか示さなかった (Table II)。本酵素活性の低下は、HMP 経路を経由して供給される

Table II. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity in PaSS-Rich Cells and PaSS-Deficient Cells

Pantethine ($\mu\text{g/ml}$)	Specific activity (unit/mg-protein)	Relative activity (%)
1.0	1.45	100
0.01	0.38	26

The harvested cells (*B. thermophilum* IPCR-1003) were washed twice with 0.05M phosphate buffer (pH 7.0) and disintegrated by a ultrasonic generator at 0°C for 30 min at 20 kHz. Cell homogenate was centrifuged at $18,000\times g$ for 30 min and the supernatant was used for enzyme assay. One unit of G6PDH was defined as the enzyme amount which catalyzes the increase in optical density (A_{340}) of 0.01 per minute.

核酸構成物質の ribose や生合成反応に共役する還元型 NADP の減少を招く。ここで認められた酵素活性低下はタンパク合成段階での抑制によるものと思われるが、これは直接生合成反応系の活性を低下させ菌体量の減少をもたらす原因になると考えられる。

本研究に用いた *Bifidobacterium* 3株のご分譲をいただいた、理化学研究所光岡知足博士、ならびに pantethine を供与くださった相互薬工株式会社に感謝いたします。

- (1) 黒宮瑞枝：お茶の水医学雑誌，8，88 (1960).
- (2) K. Samejima, M. Yoshioka and Z. Tamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 166 (1971).
- (3) H. Nakamura and Z. Tamura: *Jpn. J. Microbiol.*, **16**, 239 (1972).
- (4) E. E. Snell and L. D. Wright: *J. Biol. Chem.*, **139**, 675 (1941).
- (5) 柳田友道：“微生物学実験法”，微生物研究法懇談会編，講談社，東京，1975，p.71.
- (6) R. W. Stanier: “Methods in Enzymology,” Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1968, p. 323.
- (7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough and A. L. Farr: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).