カツオ幽門垂のビタミン B 群に関する研究—Ⅱ. パラアミノ安息香酸 (PABA) 及びリボフラビン

柿 本 大 壺
(鹿児島大学水産学部)

Studies on B-Vitamins in Pyloric Coeca of Skipjack—Ⅱ. P-Aminobenzoic acid (PABA) and Riboflavin

Daiichi KAKIMOTO

The microbiological method of LEWIS for estimation of PABA was improved on the composition of basal medium and on the treatment of test sample. That is, a considerable amount of L-tyrosine was added to the basal medium and the tyrosine present in sample was removed by adsorbing on charcoal at pH 1 (Table 2). By estimating PABA with the modified method the content in the pyloric coeca of skipjack showed the value of 1.25 γ per one gram of dry matter (Table 3).

In the estimation of riboflavin by BARTON-WRIGHT's method, the elimination of riboflavin from peptone and yeast-extract, which was used in the preparation of basal medium, was made by irradiation of ultraviolet ray for 30 minutes. And the concentration of both glucose and yeast-extract in the basal medium was duplicated in quantity (Table 4).

By estimating riboflavin with the modified method the content in the pyloric coeca was proved to be 38 γ per one gram of dry matter (Table 5).

著者は既にカツオ幽門垂中のチアミン、ニコチン酸、葉酸、ビオチン、パントテン酸を何れも Bioassay 法によつて定量したが¹⁾、これらのビタミン類は既に発表されている方法をそのまま用いて何等支障なく定量することが出来た。然るに表記の 2 者は既知の定量方法に若干の欠陥のあることを知つたので、まずそれ等の点を研究し、改良法を考案して定量を行つた。その改良によつて上記ビタミンの定量が一層正確を期し得られるようになったと考えるので、その概要を報告する。

実 験 の 部

パラアミノ安息香酸 (以下 PABA と略記する)

PABA の定量には TATUM²⁾ の *Neurospora crassa* の X-ray mutant (mutant 1633) を用いる方法が推奨されているが、別に *Lactobacillus arabinosus* を用いる LEWIS³⁾ の方法、*Acetobacter suboxydans*, *Clostridium butylicum* による定量も報告されている。*L. arabinosus* は *Acetobacter* と共に構造類似の物質の影響を受けることが少く、比較的正確な定量ができると言われているので、この菌を用いる LEWIS の方法によることにしたが、原法のまゝでは標準曲線が sigmoid 型になる欠点もあり、定量法の改良について研究した。

1) 菌株及び保存培地

共に既報ビオチン及びパントテン酸の場合と異ならないが、定量の約 2 週間前から肝臓エキスを及び PABA 強化培地に毎日移植し、PABA に対する活性度を最高にする必要がある。特に後述するように、この菌は PABA に対しては保存培地の条件や培地のチロジン含量に影響されて活性度に不同を来すため、充分順養した菌を使用することが大切である。

2) 基礎培地及び接種菌

基礎培地は LEWIS の原法に記載のもの及び比較のため SKEGGS⁴⁾ のパントテン酸培地を用いた。基礎培地用カゼイン酸水解物の処理に用いるノーリッドは、使用に先立ち坩堝中で2～3時間還元焙で焼き、活性化したものを用いた。接種菌は基礎培地 2 cc に PABA 10 r とチロジン 100 r を加えて全容を 5 cc とし、菌を接種して 37°C に 18 時間培養し、常法の如く処理し 100 倍希釈としてその 1 滴を使用した。

3) 定量法の吟味

i. 基礎培地の組成

同一菌種例えば *L. arabinosus* を用いる Bioassay に於て定量しようとする物質が異なるに応じて、基礎培地の組成が異なることは PABA, ニコチン酸, パントテン酸などにその例がみられる。このうち著者の用いた LEWIS の培地と SKEGGS のパントテン酸定量用培地は培地組成が類似しているが、後者はカゼイン水解物が前者の約 2 倍となっている。よつて、先ず此の両培地を用い *L. arabinosus* の PABA に対する response を比較してみた。その結果は Fig. 1 に見られる様に、SKEGGS の培地を用いる方が response がやゝ高くなるが、PABA に対する response は両培地で著しい差はない。次に LEWIS の培地にアミノ酸及びビタミンを補強し、SKEGGS の培地と比較すると共に、基礎培地の適否をみるため 2 r の PABA に対する *L. arabinosus* の生酸量を測定した結果は Table 1 の如くであり、L-チロジンの補強により菌の繁殖が極端に促進されることを知った。

ii. 保存培地

L. arabinosus の保存に酵母, グルコース寒天培地に 1 ケ月毎に移植したものを定量実験前に継代培養しても盲検値が高く、PABA に response しないことが屢々あるが、PABA とチロジンを充分加えた培地で約 2 週間継代培養を行えば、このようなことの防がれることを知った。

Fig. 1. Response of *L. arabinosus* to PABA in different media.

-△- SKEGGS' pantothenic and medium.
-○- LEWIS' medium.

iii. チロジンと PABA の関係

前記の様に、培地に L-チロジンを添加すると菌の発育が著しく旺盛になることを知った。Fig. 2 は L-チロジンを 5～400 r/tube 添加した場合 *L. arabinosus* の PABA に対する response を示したものである。図に見られるように、SKEGGS, LEWIS の両培地ともその関係は同様で、チロジンを添加しない培地を用いた場合、PABA に対する response がやゝ sigmoid 型になるが、若干のチロジンを添加することによって防がれるようである。チロジンの量が過度に多くなると、PABA に対する response は低下の傾向がある。又此の実験から PABA が *L. arabinosus* に対する必須栄養素でないことも推測出来るが、これは極めて重要な知見であると思う。

iv. 定量可能域

Table 1. The response of *L. arabinosus* to supplemented amino acids and vitamins

Amino acids and vitamins supplemented into LEWIS medium r/tube (2 cc assay)	Response of <i>L. arabinosus</i> to 2r of PABA N/10 NaOH cc.	Amino acids and vitamins supplemented into LEWIS medium r/tube (2 cc assay)	Response of <i>L. arabinosus</i> to 2r of PABA N/10 NaOH cc.
Not supplemented	0.84	DL-phenylalanine	200 0.83
DL-alanine	200 0.82	DL-serine	200 0.82
L-arginine	100 0.83	DL-threonine	200 0.84
DL-aspartic acid	200 0.80	DL-valine	200 0.85
L-glutamic acid	200 0.83	L-tyrosine	100 1.84
L-histidine	100 0.85	Thiamine	100 0.86
DL-isoleucine	200 0.82	Riboflavin	200 0.83
DL-leucine	200 0.85	Pyridoxine	200 0.84
DL-methionine	100 0.85	Nicotinic acid	100 0.83
L-proline	100 0.84	SKEGGS' medium	0.89

Fig. 2 の実験から PABA 定量可能な範囲を考察すると、チロジン無添加培地では PABA 0.2~1.0 r/tube の間で直線に近い response を示す。LEWIS は 0.15~0.5 r の範囲でやゝ sigmoid 型を示す標準曲線を用いて定量し、その誤差を 5~15% としている。併しチロジンを添加した培地では、その添加量と菌の response は比例的で、換言すれば盲検値が高くなる不利があるが、適當のチロジン添加によつて sigmoid 型が矯正されるので、定量範囲が広がる。著者はこのために LEWIS の培地にチロジン 10r/tube を添加した培地を用いた。

v. 試料調製法の改良

上記の様に *L. arabinosus* は PABA に対し response を示すが、更に PABA の存在しない培地にも発育し、この場合チロジンに対して response を示すので、PABA を定量するためにはあらかじめ試料からチロジンを除かなければ、結果の正確を期し難い。よつて活性炭を用い、PABA を吸着せずチロジンのみを完全に吸着する条件を検索した。その結果は Table 2 に示したように pH 1.0 に於て活性炭 (白サギ印特選) 処理を行えば、ほど完全に上の条件が満足せられ、即ちチロジンは完全に吸着除去されるが、PABA は全く吸着されないことが明らかにされた。即ち pH 1.0 において活性炭処理を行った後、pH を 6.8 に調整した試料を用うれば PABA のみを定量することが出来る。pH 4.0 においては PABA はノーリットによつて完全に吸着されるが、以上の実験によつて PABA assay の LEWIS 法に対する一応の吟味を終つたので、その結果に基いて幽門垂中の PABA を定量した。

4). カツオ幽門垂の PABA 含量

カツオ幽門垂 10 g に水 10 cc を加えて 1 時間煮沸抽出したもの及び N/10 苛性ソーダを加え 15 ポンドに 1 時間加圧加熱した二つの試料を pH 1.0 に於て活性炭 5 g を用いて処理した後 pH を 6.8 に調整したものを試料とした。assay は常法により 37°C 72 時間培養による生酸量により測定した。Fig. 3 は標準曲線で、定量の結果は Table 3 に示した。試料の調製法によつて定量値がやゝ異なり、幽門垂無水物に対し熱水抽出物では 0.9 r、アルカリ加圧処理では 1.25 r であった。尙両処理による assay 値の相違の原因については引続き研究を進める予定である。

リボフラビン

SNELL, STRONG⁵⁾ らが *L. Casei* を用いて定量して以来、幾多の追試と改良の報告があり、使用菌としても *L. Casei* の外 *Leuc. mesenteroides*⁶⁾ もしばしば用いられている。著者は上記 2 氏の方法の改良法である BARTON, WRIGHT⁷⁾ の法を更に改良して幽門垂中のリボフラビンを定量した。改良の主な点は、培地中のペプトン及びイーストからリボフラビンを除く方法として、原法では 100 W 電球で少くとも 12 時

Fig. 2. Change of standard curve for PABA estimation in a presence of different amount of tyrosine.

—○— LEWIS' medium.
—●— SKEGGS' medium.

Table 2. Adsorption of PABA on Norit at pH 4

Before treating with Norit (1 r PABA) N/20 NaOH titrated cc.	After treating with Norit N/20 NaOH titrated cc.	PABA in Norit treated medium r	Adsorption per cent
1.2	0.21	0	100

Before treating with Norit (2 r PABA) N/20 NaOH titrated cc.	After treating with Norit N/20 NaOH titrated cc.	PABA in Norit treated medium r	Adsorption per cent
1.68	0.21	0	100

Adsorption of PABA on charcoal at pH 1

Before treating with charcoal (1 r PABA) N/20 NaOH titrated cc.	After treating with charcoal N/20 NaOH titrated cc.	PABA in charcoal treated medium r	Adsorption per cent
1.2	1.19	1.0	0

Before treating with charcoal (2 r PABA) N/20 NaOH titrated cc.	After treating with charcoal N/20 NaOH titrated cc.	PABA in charcoal treated medium r	Adsorption per cent
1.68	1.65	1.94	3

Adsorption of Tyrosine on charcoal at pH 1

Before treating with charcoal (10 r tyrosine) N/20 NaOH cc.	After treating with charcoal N/20 NaOH titrated cc.	Tyrosine in charcoal treated medium r	Adsorption per cent
0.84	0.2	0	100

Before treating with charcoal (20 r tyrosine) N/20 NaOH cc.	After treating with charcoal N/20 NaOH titrated cc.	Tyrosine in charcoal treated medium r	Absorption per cent
1.0	0.2	0	100

Fig. 3. Standard curve for PABA assay using *L. arabinosus*.

L. Casei は東大農学部応用微生物研究所より分譲を受けたもので、保存培地としては酵母寒天を用いた。

2) 基礎培地

L. Casei は Table 4 に示した組成のものを基礎培地にした。(著者改良)

Table 3. PABA content in pyloric coeca of skipjack

Sample	PABA content in one gram of the fresh matter r	PABA content in one gram of the dry mater r	Recovery
Boiling water extract	0.18	0.9	96.7
After being added N/10 NaOH, the sample was heated at 15 lbs for 60 mins	0.25	1.25	96.5

間照射している所を紫外線照射に代え時間を短縮したこと、基礎培地中のグルコースとイースト補足成分の添加量を倍加して定量を一層容易にしたことである。

実験操作を詳述することは省き、その要点のみを略述する。

1) 菌株及び保存培地

Table 4. Basal medium for riboflavin assay

Constituent	Contents in 100 cc.
Peptone After being dissolved in NaOH irradiated by ultraviolet ray	1 g
Cystine	20 mg
Yeast After being treated with basic Pb-acetate irradiated by ultraviolet ray at pH 10.0	0.4 g
Glucose	4 g
Salt A and B*	each 1 cc.
pH	6.6~6.8

* Salt A : KH_2PO_4 50 mg, K_2HPO_4 50 mg, per 1 cc.

Salt B : MgSO_4 20 mg, FeSO_4 1 mg, MnSO_4 1 mg, NaCl 1 mg, per 1 cc.

紫外線照射を行う。約 16 時間の後再び濾過し、酢酸を加えて酸性とし、硫化水素を通じて鉛を除き、減圧濃縮して 50 mg/cc の濃度として使用した。なお Fig. 4 に見られるように、SNELL 等の基礎培地を用いた 37°C 72 時間培養による生酸量はかなり低いが、グルコース量を 2 倍としたもの、更にグルコースと酵母エキスを原法の 2 倍とした著者改良の培地を用いれば、遙かに勝れた標準曲線が得られる。

3) 接種菌

250 mr のリボフラビンを加えた保存培地に 3 回馴養した後、同量のリボフラビンを含む基礎培地 5 cc に菌を植え、37°C に 24 時間培養した後常法の如く処理し、5 cc の生理食塩水に懸濁したものを 1 滴使用した。

4) 試料の調製

幽門垂 1 g に N/10 塩酸 10 cc を加え、20 ボンドに 20 分間加圧加熱し、冷後 pH を 6.8 に調整してエーテル抽出によって脂肪を除去して試料とした。

Table 5. Riboflavin content in pyloric coeca of skipjack

Dilution of sample	N/10 NaOH titrated cc.	Riboflavin contents in one gram of fresh matter r/g	Riboflavin contents in one gram of dry matter r/g	Recovery %
1/50	1.98	7.5	37.5	102
1/100	1.38	7.6	38.0	98
1/200	0.81	7.6	38.0	95

5) 定量結果

Table 5 は定量の結果であるが、リボフラビン含量は幽門垂無水物に対し約 38 r/g であった。

摘 要

1. *L. arabinosus* を用い、LEWIS の方法によつて PABA を定量する場合、基礎培地にチロジンの適量を加えることにより、盲検値はやゝ高くなるが、標準曲線が sigmoid 型となることが防がれる。

2. LEWIS の原法による基礎培地では供試料中に L-チロジンが存在すれば *L. arabinosus* は PABA と共にこのチロジンにも response するので、試料中のチロジンを除去する必要があるが、PABA に影響なくチロジンのみを完全に吸着除去する処理条件を決定した。

表中ペプトンはポリペプトン 1 g を 2.5 % の苛性ソーダに溶解し、径約 8 cm のベトリ皿に入れて液層を約 2mm とし、5 cm の距離から 20 W 紫外線ランプを 30 分間照射し、フラビンを破壊する。次に氷酢酸約 0.6 cc を加えて中和し、更に醋酸ナトリウム 175 g を加えた後、濾過した濾液を使用した。イーストは第五栄養化学製粉末酵母エキス 1 g を水 10 cc に溶解し、これに 30 % 塩基性醋酸鉛溶液を徐々に加えて、生じた沈澱を遠心除去した後、濃アンモニアを加えて pH を 10.0 とし、生じた沈澱を除いた後、前と同様

Fig. 4. Response of *L. Casei* to riboflavin in different medium.

I. SNELL's medium.

II. Modified medium (enriched with glucose).

III. " (enriched with yeast and glucose).

3. この改良法により定量した結果、幽門垂中の PABA 量は無水物 1g 中 1.25 r であった。
4. SNELL 等のリボフラビン定量法において基礎培地に使用するペプトン及び酵母エキス中のリボフラビンを破壊するのに、紫外線を利用して時間の短縮を図り、又酵母エキス及びグルコースの量を 2 倍に増強し定量を一層容易且正確ならしめた。
5. 著者のこの改良法により、幽門垂のリボフラビンを定量した結果無水物中約 3.8 mg % であった。

本研究に要した経費の一部は、昭和 30 年度科学研究費より支出した。使用した乳酸菌は、東大農学部応用微生物研究所の飯塚氏の好意により分譲を受けた。文献の一部は、東大農学部大学院学生貴島静正氏の御尽力による。又、直接御指導を賜った柏田教授、実験に助力された原田陽一氏、以上の諸氏に深謝の意を表す。

文 献

- (1) 柿本大壺・金沢昭夫：本誌. **22**, 574 (1956).
- (2) E.L. TATUM, M.G. RITCHIE, F.V. COWDRY and L.F. WICKS : J. Biol. Chem., **163**, 675 (1946).
- (3) J.C. LEWIS : J. Biol. Chem., **146**, 441 (1942).
- (4) H.R. SKEGGS and L.D. WRIGHT : J. Biol. Chem., **156**, 21 (1944).
- (5) E.E. SNELL and F.M. STRONG : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **11**, 346 (1939).
- (6) H.A. KORNBERG, R.S. LANGDON and V.H. CHELDELIN : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., **20**, 81 (1948).
- (7) E.C. BARTON-WRIGHT and R.G. BOOTH : Biochem. J., **37**, 25 (1943).