77. 荒井岩夫：チフス菌の発育素に関する研究（第3報）

インドールの発育素としての作用機序

Iwao Arai: Growth Factor for *B. Typhosus*. III.

Mechanism of Growth Promoting Action of Indole.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo)

チフス菌の増殖に際しインドールが左旋性トリプトファン（以下トリプトファンと略記す）と略々同等程度の発育促進性を示し、且トリプトファンを発育素として必要とする一群のチフス菌株は、その抗原性の如何に関せず、インドールに対しても同様の感受性を示すことは前報に於て既に指摘したる所なり。インドールの発育促進性に関し、Fildes¹⁾ (1940) は、細菌によるトリプトファン合成の爲の母質たるの意義を指摘せるも、トリプトファン生成の積極的證明に就きては何等の記載なし。又 Woolley, Sebrell²⁾ (1945) は、チフス菌 T-63 株に対するインドールの発育促進性はトリプトファンより強力なる実験結果を報告せり。この事実は Fildes³⁾ 或は著者の認めたる知見と稍々相違しあるも、若しこの事実が肯定せらるものとせば所謂インドール陰性細菌たるチフス菌が増殖の途上トリプトファンの一部を分解しインドールを生成し、これが爾後の増殖に対し発育促進的に作用するに非るやとの疑念も生じ、Fildes の説と對蹠的な問題を提供するものなり。

著者はチフス菌四方株に就き、上述の観点よりインドールの発育素としての作用機序を吟味したる結果 Fildes の説を肯定すべき結論に到達し、更に又、インドールが発育素として作用する爲に (-SH) 基が重要な協力作用を演ずる事実を認めたるを以てここに報告するものなり。

トリプトファンよりインドール生成の有無に関する吟味 チフス菌を培養せるペプトン水はインドール反應陰性なることは周知の事実にして、従てトリプトファンよりインドールの生成せられざることは当然予想せらるる処なり。然れ共、前述の如く Woolley²⁾ 等が T-63 株につき認めたるインドールの発育促進効果及び著者が前報に於て報告したる如く T-58, T-287 等の諸株に対しインドール及びトリプトファンの発育促進効果が殆ど同等なる事実は、如上の予想を更に嚴密なる條件の下に於て再吟味すべき價值を提供するものなり。

依て著者は四方株を多量の Saunders 合成培地に培養し、その培養濾液につき水蒸氣蒸溜、エーテル抽出の手法により濃縮したる分屑につき、Böhme 試薬³⁾ によりインドールの存否を検したるも反應全く陰性なる事実を確認せり。ここに用いたる Böhme 試薬のインドールに対する感度は Woolley²⁾ 等によれば 0.01 γ /cc にて陽性なりとしある点より考察し、Saunders 合成培地に於ては四方株に対する発育効果はトリプトファンより生成を予想するインドールの二次的効果に非る事明かなり。

インドールよりトリプトファン生成の有無に關する吟味 四方株の増殖に際しトリプトファンの存在を必須とすることは前報に於て屢々指摘したる処なるも、四方株菌体蛋白中にてこのトリプトファンが如何様に分布しあるやを吟味する為、トリプトファン反應陽性なるペプトンを用いて調製せる普通寒天培地上に培養して得たる四方株菌体を加熱殺菌後充分に水洗したるもの3白金耳量につき、*p*-Dimethylaminobenzaldehyd 溶液及び濃塩酸による結合トリプトファン反應を試みたる処、紫色を呈し明かにトリプトファンの存在を認むることを得たり。一方この四方株を上記同様の普通寒天培地上に継代培養して得たる菌体につき同様方法を用いトリプトファン反應を試みたる処、毎回同一の結果を得ることより、培地中のトリプトファンは菌体蛋白の構成因子として攝取せらるること明かとなれり。若し Fildes の説くが如くインドールよりトリプトファンが合成せらるるものとせば、上述の結果より考え、一度合成せられたるトリプトファンは菌体蛋白構成因子として菌体内に攝取せらるべきことは当然予想せらるる処なり。

1) Fildes: Brit. J. Exp. Path. 21, 3:5 [1940].

2) Woolley, Sebrell: J. Biol. Chem. 157, 141 [1945].

3) Topley, Wilson: The principles of bacteriology and immunology. 2nd. Ed. p. 258 [1936].

依て著者は次の処方による無蛋白固形培地上に四方株を培養し、インドールよりトリプトファン合成の有無を吟味せり。

（無蛋白固形培地処方）

Na₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.1, Asparagin 3.0, *l*-Cystin 0.1, Glucose 2.0, Indol 0.005, Agar 30.0, H₂O 1000.0 (pH 7.2).

即ち、供試菌株を一度上記処方の斜面培地に移植することにより本来菌体蛋白構成因子として含有せられたるトリプトファンの影響を除去したる後、この菌体を更に大量の上記処方の培地上に培養して得たる菌体につき、機械的に附着したるインドールを反覆洗滌後、*p*-Dimethylaminobenzaldehyd 溶液及び濃塩酸を以て結合トリプトファンの呈色反應を行いたるに紫色を呈し、明かにトリプトファンが菌体蛋白構成因子として存在しある事実を認めたり。

かくの如くして四方株につきてはインドールよりトリプトファンの合成せらるること明かにして Fildes の所説に對し實驗的裏付けを與うことを得たり。

発育素インドールに對する (-SH) 化合物の協力作用に就て チスチンがトリプトファンのチフス菌に對する発育促進作用に顯著なる協力的影響を與うる事實は既に Fildes, Gradston, Knight⁽⁴⁾ (1933), 秋葉, 長林⁽⁷⁾ (1946) 等の指摘せる処にして、四方株につきては著者も同様の結論を得たことは既に前報⁽⁶⁾ に於て報告せり。

今回著者はインドールにつきチスチンの発育協力作用を吟味したる所、第 1 表の如くインドールがチフス菌に

第 1 表

発 育 素	<i>l</i> -Cystin 添加量	培養 時間	発 育 素 添 加 量 (Mol/l)					
			10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0
<i>l</i> -Tryptophan	11.9 mg/dl (5×10 ⁻⁴ Mol/l)	24	+++	+++	+++	++	+	-
		48	+++	+++	+++	++	+	-
		72	+++	+++	+++	+++	+	-
		96	+++	+++	+++	+++	±↓	-
		120	+++	+++	+++	+++	±↓	-
	0	24	+	-	-	-	-	-
		48	+	±	-	-	-	-
		72	++	+	±	-	-	-
		96	+++	++	+	-	-	-
		120	+++	++	+	-	-	-
Indol	11.9 mg/dl (5×10 ⁻⁴ Mol/l)	24	+++	+++	++	-	-	-
		48	+++	+++	+++	+	-	-
		72	+++	+++	+++	+	-	-
		96	+++	+++	+++	+	-	-
		120	+++	+++	+++	±↓	-	-
	0	24	-	-	-	-	-	-
		48	-	-	-	-	-	-
		72	-	-	-	-	-	-
		96	-	-	-	-	-	-
		120	-	-	-	-	-	-

(基礎培地処方) Na₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.1, Asparagin 3.0, Glucose 2.0, H₂O 1000.0.

(菌 株) 四方株

第 2 表

発 育 素	(-SH) 化 合 物		培養 時間	発 育 素 添 加 量 (Mol/l)						
	検 体	添 加 量		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0	10 ⁻³
L-Tryptophan	L-Cystin	11.9 mg/dl ($\frac{1}{2} \times 10^{-3}$ Mol/l)	24	+++	+++	+++	++	+	-	
			48	+++	+++	+++	++	+	-	
			120	+++	+++	+++	+++	± ↓	-	
	Thioglycolsäures-Na	11.4 mg/dl (10 ⁻³ Mol/l)	24	+++	+++	++	±	-	-	
			48	+++	+++	++	±	-	-	
			120	+++	+++	++	±	-	-	
	4-Methyl-2-thiouracil	14.2 mg/dl (10 ⁻³ Mol/l)	24	+++	+++	++	+	-	-	
			48	+++	+++	++	+	-	-	
			120	+++	+++	++	+	-	-	
	2-Mercapto-benzthiazol	16.7 mg/dl (10 ⁻³ Mol/l)	24	-	-	-	-	-	-	+
			48	-	-	-	-	-	-	++
			120	-	-	-	-	-	-	++
Indol	L-Cystin	11.9 mg/dl	24	+++	+++	++	-	-	-	
			48	+++	+++	+++	+	-	-	
			120	+++	+++	+++	± ↓	-	-	
	Thioglycol-säures-Na	11.4 mg/dl	24	+++	+++	+++	++	++	-	
			48	+++	+++	+++	++	++		
			120	+++	+++	+++	+++	++		
	4-Methyl-2-thiouracil	14.2 mg/dl	24	+++	+++	++	-	-	-	
			48	+++	+++	+++	±	-		
			120	+++	+++	+++	±	-		
	2-Mercapto-benzthiazol	16.7 mg/dl	24	-	-	-	-	-	-	-
			48	-	-	-	-	-	-	±
			120	-	-	-	-	-	-	+
	L-Methionin	14.9 mg/dl	24	+++	+++	+	±	-	-	
			48	+++	+++	++	±	-	-	
			120	+++	+++	+++	±	-	-	

(基礎培地処方) Na_2HPO_4 1.4, KH_2PO_4 1.0, NaCl 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, Asparagin 3.0, Glucose 2.0, H_2O 1000.0.

(菌 株) 四方株

対し発育促進効果を具現する為には必ずチスチンの存在を必要とし、この点トリプトファンの場合と少々趣を異にする事実を認めたり。

4) Fildes, Gradston, Knight: Brit. J. Exp. Path. 14, 189 [1933].

5) 秋葉, 長林: 医学と生物学, 9, 6, 336 [昭 21]. 6) 荒井: 本編 第1報.

チスチンが生体内に於てチステインに可逆的変化を行うことは周知の事実にして、上述の如きトリプトファン或はインドールの発育促進作用に対するチスチンの顯著なる協力効果はチステインの有する (-SH) 基の影響によるに非るやとの考えの下に、任意の硫黄化合物数種につき四方株に対する協力的発育促進効果を吟味したる處、第2表に示す如き結果を得たり。

これ等の内、メチオニンは Thioäther 型なるにも拘らず、他の (-SH) 化合物と大差なき協力的発育効果を示すことは注目すべき事実なるも、Du Vigneaud⁷⁾ (1939) 等の提唱する所謂 Transmethylation が生じたるか或は三橋⁸⁾ (1949) が大腸菌、破傷風菌、デフテリー菌、チフス菌等の細菌に就き認めたる Methylmercaptan の生成によるものなるか不明なるも次述の、諸事実より考察し恐らくメチオニンより生成したる (-SH) 化合物による二次的影響なるべきことが予想せらる。

Uracil, Thimin 等のピリミジン誘導体が諸種の細菌の発育素たることは枚挙にいとまなきも⁹⁾ 第2表に挙げたる Methylthiouracil の示す協力的発育促進効果が (-SH) 基の影響によるものなりや、或は Pyrimidin 母核より生ずる効果なりやを吟味する為、次の如き4種の Pyrimidin 誘導体

につき、四方株に対するインドールとの協力的発育促進効果を檢したるも、ただ 4-Methylthiouracil (IV) のみ顯著なる効果を示し他はすべて陰性なる事実を認めた。上記檢体中 (III) は (IV) の Thioäther にして然も協力的効果陰性なる点より考察し (-SH) 基の重要性を示唆しあるものと考えらる。

又 2-Mercaptobenzthiazol は (-SH) 基を有するに拘らず協力的発育促進効果顯著ならざるは、Benzthiazol 核自身よりの影響によるものなりや、或は (-SH) 基の活性によるものなりや今後の吟味を要する問題なり。

第 3 表

発育素	(-SH) 化 合 物		培養 時間	発 育 素 添 加 量 (Mol/l)					
	檢 体	添 加 量		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0
Indol	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	19.8 mg/dl (10 ⁻³ Mol/l)	24	++	+	±	-	-	-
			48	+++	++	++	-	-	-
			72	+++	+++	++	-	-	-
			96	+++	+++	++	±	-	-
			120	+++	+++	++	+	-	-
	Na ₂ S·9H ₂ O	24 mg/dl (10 ⁻³ Mol/l)	24	+	+++	++	-	-	-
			48	+++	+++	++	-	-	-
			72	+++	+++	++	-	-	-
			96	+++	+++	++	±↓	-	-
			120	+++	+++	++↓	±↓	-	-

(基礎培地処方) Na₂HPO₄ 1.4, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.1, Asparagin 3.0, Glucose 2.0, H₂O 1000.0.

(菌 体) 四方株

7) Du Vigneaud, et al.: J. Biol. Chem. **131**, 57 [1939].

8) 昭 24. 2 月 傳研集談会にて発表.

9) Peterson, Peterson: Bact. Rev. **9**, 49 [1945].

次に (-SH) 基を有する無機化合物としてチオ硫酸ソーダ、硫化ソーダにつきインドールの発育促進作用に対する協力的効果を檢したるに第3表の如く何れも著明なる効果を有することを知れり。尙念の爲チオ硫酸ソーダにつき Jod-Azid 反應¹⁰⁾ を用い (-SH) 基の存否を檢したる処、明かに陽性なることを確認せり。

上述の如くインドールが四方株の増殖に対し発育促進効果を現す爲には必ず (-SH) 基の存在を必要とし、然も硫化ソーダの如き簡單なる無機化合物がチスチンに匹敵する効果を發揮し得ることは、向後のトリプトファンの発育素としての作用機序究明上一利点を提供するものなり。更に又 (-SH) 基の重要性はチフスの化学療法剤探究上一指針を示唆しあるものと考えらる。

本研究は落合教授及び秋葉教授の御指導によるものにして深甚なる謝意を表明すると共に、本研究遂行に際し有益なる助言を賜りたる秋谷教授に深謝するものなり。

實 験 の 部

細菌試験 試験液調製法、菌株及び接種法、発育効果判定：前報記載の如し。

四方株菌体蛋白中トリプトファンの證明

1) 普通寒天培地に培養せる場合：Roux のコルベン中に調製せる普通寒天培地上に四方株を培養し、48 時間後に菌体を掻取り湿菌のまま 100°, 30 分加熱滅菌したる後、大量の水を以て反覆洗滌して得たる菌体3白金耳量を試験管にとり *p*-Dimethylaminobenzaldehyd 溶液 (20% 塩酸中に5%の割合に溶解せるもの) 1 滴及び濃塩酸 2 cc を加え 85~90° に約 20 分間加熱したる処、紫色を呈し、明かにトリプトファンの存在しあるを知る。

2) インドール含有合成寒天培地に培養せる場合：中試験管及び Roux のコルベン中に次の処方の合成培地を調製す。

Na_2HPO_4 1.4, KH_2PO_4 1.0, NaCl 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, Asparagin 3.0, *L*-Cystin 0.1, Glucose 2.0, Indol 0.005, Agar 30.0, H_2O 1000.0 (pH 7.2).

先づ普通寒天培地上に発育せしめたる保存用四方菌株 1 白金耳量を上記処方の合成寒天培地斜面上に移植、48 時間培養したる後その菌体 1 白金耳量を Roux のコルベン中の合成寒天培地上に塗抹し 48 時間後菌体を掻取り (この際雑菌の有無を厳密に検査す) 100°, 30 分加熱滅菌したるものを (アルコール) + (エーテル) (2:1) の混合溶媒中に浮遊せしめ遠心分離する操作を 3 回反覆し、菌体表面に附着せるインドールを充分洗滌し去つたる菌体3白金耳量につき前記同様に *p*-Dimethylaminobenzaldehyd 溶液及び濃塩酸による呈色反應を行ひたる処、紫色を呈し明かにトリプトファンが菌体蛋白構成因子として存在しあることを確認せり。

Saunders 合成培地に四方株を増殖せしめたる場合インドール生成の有無に関する吟味 1 立の Saunders 合成培地 (Na_2HPO_4 1.4, KH_2PO_4 1.0, NaCl 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, Asparagin 3.0, *L*-Cystin 0.1, *L*-Tryptophan 0.2, Glucose 2.0, H_2O 1000.0, pH 7.2) に四方株を培養し、10 日後 100°, 30 分加熱滅菌したるものにつき菌体浮遊のまま水蒸氣蒸溜に附す。初溜 230 cc をエーテルにて抽出し、抽出液を乾燥後溶媒を溜去し少量の微褐色飴狀物質を得る。この物質を約 1 cc のアルコールに溶解し Böhme 試薬 A 液 (*p*-Dimethylaminobenzaldehyd 4 g, 96% Alkohol 380 g, conc. HCl 80 g) 1 cc を加へたるも呈色せざるを以て更に B 液 (過硫酸カリ飽和溶液) 1 cc を加うるも呈色反應陰性なり。

又上記の如く水蒸氣蒸溜に附したる母液をエーテルにて抽出したるに微量の無色針狀結晶 (融点 184°) を捕捉せるもインドールも反應陰性にして、本物質の本態につきては未だに究明するに至らず。

東京大学医学部薬学科 (昭和 24 年 10 月 10 日受理)

Summary

1) From the fact that indole possesses about an equal amount of growth promoting action as tryptophane against a certain group of typhoid bacilli that is susceptible to

10) Feigl: Quautitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktion, p. 398—401 (1938).

tryptophane, an observation was made regarding interrelationship between the two compounds inside the bacterial body. It was determined that a substance giving positive tryptophane-like coloration reaction was formed inside the body of bacteria cultivated in a medium containing indole.

2) Since the presence of cystine is necessary for the appearance of growth promoting effect in indole, experiments were conducted with various compounds possessing -SH and all were found effective. Sodium thiosulfate and sodium sulfide were found to possess especial cooperative effect against growth promoting action of indole, they being able to substitute for cystine. By the use of these salts, composition of the medium for typhoid bacillus growth can be simplified and it became possible to obtain facilities for the analyses of metabolic mechanism of this bacillus. (Received October 10, 1949)

78. 松川泰三, 万木庄次郎: Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の研究*

(第 11 報) Thiazolium 化合物の新合成法について (其の 2).

Taizo Matsukawa and Shojiro Yurugi: Studies on Vitamin B₁ and Its Related Compounds. XI. A New Synthesis of Thiazolium Compounds. (2)

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

先に¹⁾ 2-methyl-4-amino-5-formaminomethyl-pyrimidine-HCl [I] と γ -aceto- γ -chloro-propyl acetate [II] 及び硫化水素との縮合による vitamin B₁ の合成法を発表したが, 更に其後この方法を應用して数種の thiazolium 化合物を合成したので此処に報告する.

2-ethyl-4-amino-5-formaminomethyl-pyrimidine-HCl [III] を脱水義酸に溶解し, 之に [II] を混和し, 接触剤として活性炭を加え, 110~120° に加熱しながら乾燥硫化水素を導入すると漸次着色し, 赤血塩による

thiochromine の螢光反應が陽性を示すに至る. この反應が最高となつた時, 加熱並に硫化水素の導入を止め, 以後前報と同様に処理すると, 目的の 4-methyl-5- β -hydroxyethyl-N-(2'-ethyl-4'-amino-pyrimidyl-5')-methyl-thiazolium chloride-HCl が得られる. 本品は mp 233° (decomp) の無色針狀結晶で先に得たもの²⁾ とよく一致する. 又 [III] の代りに 2-benzyl-4-amino-5-formaminomethyl-pyrimidine-HCl [IV] を用いると全く同様にして mp 222° (decomp) の 4-methyl-5- β -hydroxyethyl-N-(2'-benzyl-4'-amino-pyrimidyl-5')-methyl-thiazolium chloride-HCl (無色針狀結晶) が生成する. 尚 [III] 及び [IV] は夫々相等する 5-amino-methyl 化合物の塩酸塩を義酸と 1 モルの義酸ソーダを用いフオルミール化して得られる mp 103~104° の無色針狀結晶及び mp 175° (decomp) の無色稜柱狀結晶で, その picrate は夫々 mp 176~176.5° を示し, 前者は第 1 報²⁾ で得たものとよく一致する. 次に [II] 以外の α -chloro-ketone 化合物として methyl- α -chloro-

* 「Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の合成研究」並に「Vitamin B₁ の作用機構の研究」を以後表記の標題に一括する.

1) 松川, 万木: 本誌 69, 508 [昭 24].

2) 松川: 本誌 62, 417 [昭 17].