3) Biosynthesis of folic acid is inhibited by the presence of sulfanilamides. Addition of the foregoing folic acid intermediates, in order to find the inhibition point, showed that the inhibition was the smallest when *p*-aminobenzoylglutamic acid was added, from which it was assumed that the sulfanilamides damaged the bonding of PABA and glutamic acid.

4) Inhibition of the growth of *Lactobacillus arabinosus* by sulfathiazole, when cultured in a synthetic medium used for the quantitative determination of folic acid, is antagonized by folic acid, *p*-aminobenzoylglutamic acid, and *p*-aminobenzoic acid, the strength being in that order. *p*-Aminobenzoylglutamic acid antagonizes sulfanilamides in 4~5 times the strength of PABA.

5) Folic acid is the essential nutrient of *Lactobacillus casei* and is not inhibited by sulfanilamides.

(Received April 8, 1953)

308. 大村榮之助, 桂城順三, 森田 桂, 土岐夏子: 微生物の代謝拮抗に関する研究 (第2報) プテリジン誘導体の乳酸菌に対する葉酸類似作用とその拮抗性

Einosuke Ohmura, Junzo Katsuragi, Katsura Morita, and Natsuko Toki:

Studies on the Antimetabolites of Bacteria. II. Folic Acid-like Substances and Antagonistic Action of Pteridine Derivatives against Lactic Bacteria.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

乳酸菌に対する葉酸の拮抗物質に関する研究は Stockstad¹⁾, Hitchings²⁾, Woolley³⁾ 等によつて行われており、今までに知られた葉酸拮抗現象はいずれも thymine 等の核酸誘導体を与えると同回復される。即ち葉酸の thymine 等の核酸誘導体に対する代謝障害についての研究は、高等動物の代謝拮抗と比較されることによつて重要性を加えてきた。即ち乳酸菌と高等動物との必須栄養素に非常な類似性が見られるからである。

著者は乳酸菌の中で葉酸の利用度の違つている *L. casei*, *S. faecalis* を使用して葉酸との類似性とその拮抗性とを研究しようと考え、16 種類のプテリジン誘導体を化学構造の類似から次の4群に分類した。

- 第1群 2,4,7-trihydroxypteridine 化合物
- 第2群 pteridine 環に -CH₃ 基の導入された化合物
- 第3群 leucopterin, xanthopterin 及びその誘導体
- 第4群 pteroylglutamic acid と同じ pteridine 核を持つた化合物

実験方法 菌株: *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* をペプトン 1%, ブドウ糖 1%, 酵母エキス 0.5%, 寒天 2% の高層寒天培地に 20 日毎に植えつぎして保存した菌を使用する。基礎培地: 葉酸定量のために著者等が改良使用したものと同一 Table I の培地を用いた。接種菌液の調製: 0.5 my/cc の葉酸を添加した前記基礎培地に菌を接種し 24 時間培養後菌体を遠心分離し生理食塩水で数回洗滌し、遠心分離した菌体を生理食塩水で 5 倍に希釈したものを接種菌液とする。

プテリジン誘導体の葉酸類似作用の実験法: 前記定量用培地を滅菌した綿栓試験管に 2 cc ずつ分注し、各管にプテリジン化合物を 0.5, 5, 50 my, 0.5, 5, 50 γ の割に添加し、全量を蒸留水で 4 cc とし、15 ボンドで 10 分間加圧滅菌した後前記接種菌液を 0.03 cc ずつ接種し、*S. faecalis* の場合には 30°, 20 時間培養し、生育した菌量を光電比色計で測定した。*L. casei* の場合には 37°, 48 時間培養した後生成した乳酸量を 0.1 N 水酸化ナトリウム液でフェノールフタレインを指示薬として滴定した。

葉酸拮抗作用の実験法: 基礎培地に 0.5 my/cc の割に葉酸を予め添加しておき、各管におのおのプテリジン誘導体を添加して、菌の発育とその拮抗性を前記同様光電比色計による濁度又は乳酸の生成量から測定した。

- 1) A. L. Franklin, E. L. R. Stockstad, M. Belt, T. H. Jukes: J. Biol. Chem. **169**, 427 (1947); *ibid.* **177**, 621 (1949).
- 2) B. L. Hitchings, C. W. Mowat, R. B. Angier: *Ibid.* **170**, 323 (1947).
- 3) D. W. Woolley, A. Privile: *Ibid.* **174**, 327 (1948).

Table I

	<i>S. faecalis</i> を用いて葉酸 (PGA) を定量するときの培地	<i>L. casei</i> を用いて葉酸 (DGA) を定量するときの培地
精製カゼイン酸加水分解物	N = 220 mg	N = 220 mg
ブドウ糖	2.0 g	4.0 g
酢酸ナトリウム	2.0	1.6
L-シスチン	40.0 mg	40.0 mg
L-トリプトファン	40.0	40.0
硫酸アデニン	2.0	2.0
塩酸グアニン	2.0	2.0
ウラシル	2.0	2.0
塩酸サイアミン (B ₁)	50 γ	100.0 γ
リボフラビン (B ₂)	50	100.0
塩酸ピリドキシン (B ₆)	—	200.0
ニコチン酸	50 γ	100.0
パントテン酸カルシウム	50	100.0
パラアミノ安息香酸	20	20.0
ビオチン	0.4	0.4
A 液*	1.0 cc	1.0 cc
B 液**	1.0	1.0

pH 6.8, 蒸留水で全量を 100 cc にする.

(註) * A液 第一燐酸カルシウム 10 g } 100 cc
 第二燐酸カルシウム 10 g }
 **B液 塩化ナトリウム 0.3 g }
 硫酸鉄 0.5 g } 250 cc
 硫酸マグネシウム 10.0 g }
 硫酸マンガン 0.5 g }

結果と考察 第1群: 2,4,7-Trihydroxypteridine 化合物

(I) R = —COOH

(II) R = —CHCOOH
|
CH₃(III) R = —CHCOOH
|
C₂H₅

菌の生育度は (III), (II), (I) の順序であつた. 拮抗作用については (I) だけが明らかに目立つ. R の側鎖の分子量の多いものほど葉酸類似性を示し, 反対に環に直接 —COOH 基のあるものは拮抗作用を示した. *L. casei* についても同様の実験を行つたが著明な作用を認めなかつた.

Response of *S. faecalis* to Pteridine Derivatives

Compound	ε					
	Concentration of pteridine derivative (γ)					
	0.0005	0.005	0.05	0.5	5.0	50
(I)	0.55	0.56	0.57	0.56	0.52	0.50
(II)	0.65	0.64	0.62	0.60	0.60	0.60
(III)	0.50	0.58	0.58	0.60	0.79	0.65

Antagonist of *S. faecalis* to Pteridine Derivatives

Folic Acid	1.15	1.20	1.20	1.22	1.30	1.25
(I)	1.10	1.10	1.10	1.05	0.35	0.38
(II)	1.25	1.20	1.15	1.10	1.15	1.15
(III)	1.15	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20

第2群：Pteridine 環に $-\text{CH}_3$ 基の導入された化合物

1-N-メチル化合物は葉酸類似作用を示すが、2-メチル化合物は拮抗性を示した。 *L. casei* に対してはいずれも殆んど影響を認めなかつた。

Response of *S. faecalis* to Pteridine Derivatives

Compound	ε					
	Concentration of pteridine compound (γ)					
	0.0005	0.005	0.05	0.5	5	50
1-N-Methyl	0.88	0.76	0.68	0.60	0.68	0.68
2-Methyl	0.50	0.55	0.57	0.60	0.61	0.64
Antagonist of <i>S. faecalis</i>						
Folic acid	1.20	1.25	1.22	1.30	1.30	1.30
1-N-Methyl	1.30	1.20	1.20	1.25	1.30	1.30
2-Methyl	1.30	1.30	1.30	1.25	0.80	0.70

第3群：

leucopterin

xanthopterin

leucopterin, xanthopterin は *S. faecalis* に対し 30,000 ないし 40,000 分の1の葉酸類似作用を示すが、他の化合物は殆んど作用を示さない。6位の側鎖が $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ の場合 CH_2COOH のときより幾分強い葉酸類似作用を示し拮抗性は殆んどみられない。

Response of *S. faecalis*Response of *L. casei*

Compound	ε						cc.*					
	Concn. of pteridine compound (γ)						Concn. of pteridine compound (γ)					
	0.0005	0.005	0.05	0.5	5	50	0.0005	0.005	0.05	0.5	5	50
6	0.52	0.54	0.55	0.55	0.53	0.58	3.0	3.2	3.5	3.5	3.5	3.5
7	0.58	0.58		0.60	0.60	0.65	3.5	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5
8	0.50	0.50	0.54	0.50	0.53	0.50	2.8	3.0	3.1	2.9	2.8	3.5
9	0.45	0.45	0.45	0.50	0.53	1.10	3.5	3.5	3.7	3.8	4.8	6.6
10	0.45	0.45	0.45	0.45	0.50	0.98	3.5	3.5	3.5	3.5	4.5	5.6
Antagonist of <i>S. faecalis</i>							Antagonist of <i>L. casei</i>					
6	1.20	1.25	1.30	1.30	1.30	1.30	7.1	7.1	7.5	7.1	7.8	7.8
7	1.15	1.10	0.90	1.20	1.25	1.30		7.5	7.5	7.5	7.1	7.5
8	1.30	1.70	1.30	1.25	1.20	1.20	7.0	6.3	7.5	7.5	7.5	7.5
9	1.10	1.10	1.10	1.20	1.25		7.1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.2
10	1.10	1.10	1.20	1.29	1.27	1.30	7.2	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

* 0.1 N NaOH の cc 数。

L. caseii に対しては leucopterin, xanthopterin が僅かに葉酸類似作用を示すが, 他は全く作用なく, 拮抗性も認められない.

第4群:

(XI) 6-COOH

(XII) 7-COOH

(XIII) R=CH₂COOH

(XIV) R = CH₂NH——COOCH₂CH₂N$\begin{smallmatrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{smallmatrix}$

(XV) R = CH₂N⁽⁺⁾CH₂I⁽⁻⁾

(XVI) Aminopterine

Response of *S. faecalis*

Response of *L. caseii*

Compound	ε						cc.					
	Concn. of pteridine compound (γ)						Concn. of pteridine compound (γ)					
	0.0005	0.005	0.05	0.5	5	50	0.0005	0.005	0.05	0.5	5	50
XI	0.50	0.50	0.50	0.53	0.55	0.58	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
XII	0.55	0.54	0.50	0.50	0.50	0.50	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
XIII	0.50	0.48	0.45	0.50	0.50	0.50	3.5	3.5	3.5	3.5	3.6	4.0
XIV	0.45	0.50	0.75	1.10	1.12	1.20	3.5	3.5	3.5	4.1	5.2	5.8
XV	0.45	0.47	0.45	0.62	0.70	1.20	3.5	3.5	4.0	5.2	5.6	6.5

Antagonist of <i>S. faecalis</i>							Antagonist of <i>L. caseii</i>					
XI	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	6.5	6.5	6.7	6.8	6.8	7.1
XII	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	6.5	6.5	6.5	6.6	6.5	7.2
XIII	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	6.8	6.5	6.7	6.8	6.8	7.1
XIV	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	6.6	6.5	6.6	6.7	6.6	7.2
XV	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	6.7	6.7	6.8	6.8	6.7	7.4

上記の化合物中 (XIV) は大体葉酸 (PGA) の 200 分の 1 の作用を持つ. (XV) は 1,600 分の 1 の葉酸類似作用を示した. (XIV), (XV) 並びに僅かながら (II) は *L. caseii* に葉酸類似作用を示した. (XVI) は文献にあるように葉酸 (PGA) に対して 3:1 の拮抗比を示した. 以上の結果を考察すると第1群では6位の側鎖が -COOH, -CH(CH₃)-COOH, -CH(C₂H₅)-COOH と炭素数が増加するにつれて葉酸類似作用が増加する. 第3群では 2-methyl は拮抗性を示すが, 1-N-methyl は全く作用を示さない. 第3群では leucopterine, xanthopterin 以外に殆んど作用を示さない. 第4群では6位の -COOH 基以外の化合物はいずれも *L. caseii*, *S. faecalis* 両菌に葉酸類似作用を示した. 第1群及び第4群でも考えられることは6位に -COOH 基, -CH₂COOH 基があると葉酸への転移性が弱く, ここに大きい分子が結合している場合はこれが容易にパラアミノ安息香酸又はパラアミノグルタミン安息香酸と交換して葉酸転移できるのではないかと推察できる.

要 約 プテリジン環を持った化合物 16 種類について *S. faecalis*, *L. caseii* について葉酸類似作用ならびに拮抗性をしらべた.

1) 2-methyl-4,6,7-trihydroxypteridine, 2,4,7-trihydroxy-6-carboxy-4-aminopteroylglutamic acid は葉酸に拮抗性を示す.

2) methylleucopterine, 2,4,7-trihydroxy-6-pteridine isobutyric acid, leucopterine, xanthopterin は弱いながら *S. faecalis* 菌に葉酸類似作用を示す.

3) pteric acid, pteric acid diethylaminoethyl ester, 6-piperidiniummethyl pteridine iodide 等は *L. caseii*, *S. faecalis* 両菌に 200 分の 1 から 1/600 分の 1 の葉酸類似作用を示す.

4) 以上の結果から pteridine の 6 位の置換体について見るに葉酸, pteric acid 以外を見ると carboxyl 基, acetic acid 基以外の大きい分子の結合している方が葉酸類似作用の物質に転移し易いことが推察される.

5) leucopterine の 2 位に methyl 基を導入した場合, 6 位の置換基が -COOH 基のときよりも -CH₂COOH 基の場合に拮抗を示す.

終りに臨み貴重な化合物を多数戴き種々御教示を賜った名大理学部江上不二夫教授、絶えず御鞭撻を賜った武田研究所長桑田 智博士に厚くお礼申し上げます。

Summary

Folic acid-like actions and antagonism were examined in 16 kinds of compounds possessing pteridine ring, using *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus casei*, and following results were obtained:

1) 2-Methyl-4,6,7-trihydroxypteridine and 2,4,7-trihydroxy-6-carboxy-4-aminopteroyl-glutamic acid antagonize folic acid.

2) Methylleucopterin, 2,4,7-trihydroxy-6-isobutyric acid pteridine, leucopterin, and xanthopterin show folic acid-like action, though weak, on *S. faecalis*.

3) Pteric acid, pteric acid-6-diethylaminoethyl ester, and 6-piperidiniummethyl pteridine iodide all show folic acid-like action on *L. casei* and *S. faecalis* in 200th to 1,600th of that of folic acid.

From these experimental results, it was assumed that, outside of folic and pteric acids that possess substituent in 6-position of pteridine, compounds bonded to large molecules other than carboxyl and acetic acid groups are more easily able to change to substances with folic acid actions. When a methyl group is introduced into 2-position of leucopterin, the antagonism is more stronger when the substituent at 6-position is $-\text{CH}_2\text{COOH}$ than $-\text{COOH}$.

(Received April 20, 1953)

309. 大村榮之助, 川島 實: 微生物の代謝拮抗に関する研究 (第3報) 細菌発育要素としてのパラアミノ安息香酸とパラニトロ安息香酸との相関関係

Einosuke Ohmura and Minoru Kawashima: Studies on the Antimetabolites of Bacteria. III. Relationship between *p*-Aminobenzoic Acid and *p*-Nitrobenzoic Acid as Growth Factors of Bacteria.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

微生物はその代謝過程にパラアミノ安息香酸 (以下 PABA と略称) を必要とするが、菌の中には大腸菌のように他の有機化合物或いは無機化合物からこれを自身で生成出来る菌種と、*Lactobacillus arabinosus* のように PABA を他から培養液中に供給しなければ生育出来ない菌種とがある。それ等の菌が PABA を生合成する経路及び代謝過程については全然判っていない。考えられる一つの可能性は、パラニトロ安息香酸 (以下 PNBA と略称) を経由して PABA が出来るのではないかという想像である。

しかし Tatum 等¹⁾は PABA を必須栄養素とする *Neurospora* の変種を培地に PABA の代りに PNBA を加えて培養してみたが全く生育しなかつたと報告している。

著者等は PABA を必須栄養素とする *L. arabinosus*, その完全発育に本品を必要とする *Leuconostoc mesenteroides* 等の乳酸菌並びに PABA を培地に加えなくても完全発育する大腸菌 (*E. coli*) の3種の菌を使用して、

1) 江上不二夫, 江幡光雄, 佐藤 了: Nature **167**, 168 (1951).

2) E. L. Tatum: Ann. Rev. Biochem. **13**, 667 (1944).

3) Landy, Dichen: J. Biol. Chem. **146**, 109 (1942).