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¹⁾。

しかし Tatum 等²⁾ 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. Rer. Biochem. **13**, 667 (1944).

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

各々が PNBA をどの程度 PABA として用い生育するかを比較検討した。又 PABA がスルホンアミド剤による菌の生育阻害に拮抗することは知られているが、この場合 PABA の代りに PNBA を添加したならばどの程度の拮抗性を示すかを知るために *L. arabinosus* をスルファチアゾールで阻害した場合の PNBA による拮抗比をも同時に研究した。

実験の部 *L. arabinosus*, *Leuconostoc mesenteroides* の保存培地調製法: ブドウ糖 1.0 g, イーストエキス 0.5 g, ペプトン 1.0 g, 寒天 2.0 g を 100 cc の蒸留水に溶解し pH 6.8 に修正, 乾熱滅菌した綿栓試験管に分注し, 15 ボンド, 15 分間滅菌した高層寒天培地を用いる。

E. coli の保存培地調製法: ブドウ糖 1.0 g, 肉エキス 1.0 g, ペプトン 1.0 g, 寒天 2.0 g を 100 cc の蒸留水に溶解し pH 7.0 に修正, 乾熱滅菌した綿栓試験管に分注し, 15 ボンド, 15 分間滅菌し斜面寒天を用いる。

接種菌液調整法: Table I の合成培地に PABA を 10 γ /100 cc の割合に添加し蒸留水で 2 倍に希釈し, 乾熱滅菌した綿栓試験管に 10 cc ずつ分注し, 15 ボンド, 10 分間滅菌した培養基に上記菌を 1 白金刺(耳)とり 24 時間, 30° (*E. coli* の場合 37°) で培養した後菌体を遠心分離し, 生理食塩水で元の培養液の約 20 倍に希釈した菌懸濁液を用いる。

PNBA を PABA の代りに用いた場合の生育試験: Table I の合成培地を試験管に 2.5 cc ずつ分注し, PABA, PNBA を各々 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.15, 0.20 γ の割合に添加して全量を 5.0 cc にし, 15 ボンド, 10 分間加圧滅菌し, これに予め Table I の合成培地に PABA を 10 γ /100 cc の割合に加え *L. arabinosus*, *Leuconostoc mesenteroides* 及び *E. coli* を 24 時間前培養して得た菌体を接種し, 24 時間ないし 48 時間培養した後菌量を光電比色計で測定する。

L. arabinosus の場合その結果は Table II の通りで Fig. 1 で表わされる。PNBA は PABA としての作用を示し, 凡そその 80% の作用を持つ。

Leuconostoc mesenteroides は Table III 並びに Fig. 2 に示される。0.1 γ /5 cc の濃度で PNBA は PABA の約 90% の作用を持つているが, それ以上の濃度ならば 95~98% の作用を示すことが分る。

E. coli では Table I の合成培地のほか Table I のアスパラギン培地を使用した。Table IV, Fig. 3 のようにそのいずれに於ても PNBA は PABA と全く同じ作用を示す。

Fig. 1. *Lactobacillus arabinosus* Fig. 2. *Leuconostoc mesenteroides* Fig. 3. *Escherichia coli*

□ PABA } 48 時間培養 } 30°C
 ■ PNBA }
 ○ PABA } 24 時間培養
 △ PNBA }

□ PABA } 48 時間培養 } 37°C
 ■ PNBA }
 ○ PABA } 24 時間培養
 △ PNBA }
 ● PABA } 48 時間培養 } (アスパラギン培地)
 ▲ PNBA }

以上の結果を考察すると各菌が PABA の代りに PNBA を用いて生育する強さは大腸菌, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. arabinosus* の順序であつて PABA の必須性と丁度度であることが分る。

PNBA のスルホンアミド剤に対する拮抗比: *L. arabinosus* を用い Table VI のようにスルファチアゾールを 50 γ /cc の割合に添加した拮抗培地に PABA 及び PNBA を各管 0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 8.0, 10.0, 20.0, 30.0 γ ずつ加え 48 時間培養後生育した菌量をスルファチアゾールを加えない対照培地について同一の試験を行つた成績を比較するため, 各々を光電比色計を用いその菌量を測定した。これを図示すると Fig. 4 の通りである。PNBA も PABA も同様にスルホンアミドに対して拮抗性を示すことを知る。PNBA は PABA の 1/10 程度の作用を示し, Landy, Dicken³⁾ 等の酢酸菌によるスルホンアミドに対する PABA, PNBA の拮

□ PABA } 対 照
 ■ PNBA }
 ○ PABA } Sulfathiazole 50 γ /cc.
 △ PNBA }

Fig. 4. スルホンアミド剤に対する PABA, PNBA 拮抗図

抗比と大体似た値を示している。

Table I 合 成 培 地

ア ラ ニ ン	80 mg	ア ス バ ラ ギ ン 酸	160 mg
ア ル ギ ニ ン	20	L-シ ス チ ン	40
グ ル タ ミ ン 酸	200	ア デ ニ ン	4
グ リ チ ン	40	グ ア ニ ン	4
ヒ ス チ ジ ン	20	ウ ラ シ ー ル	4
オ キ シ プ ロ リ ン	40	サ イ ア ミ ン (B ₁)	100 γ
イ ソ ロ イ シ ン	80	リ ボ フ ラ ビ ン (B ₂)	160
ロ イ シ ン	80	ビ リ ド キ シ ン (B ₆)	200
リ ジ ン	80	ニ コ チ ン 酸	250
メ チ オ ニ ン	40	P A B A	100
ハ レ ロ イ ジ ン	40	パ ン ト テ ン 酸	100
プ ロ リ ン	40	葉 酸	0.8
フ ェ ニ ル ア ラ ニ ン	80	ビ オ チ ン	0.8
ゼ リ ン	20	無 機 塩	
ス レ オ ニ ン	80	A液 K ₂ HPO ₄ 25 g } 250 cc, 2 cc	
ト リ プ ト フ ア ン	40	KH ₂ PO ₄ 25 g }	
チ ロ ジ ン	10	MgSO ₄ ·7 H ₂ O 1.0 g }	
バ リ ン	80	B液 MnSO ₄ 0.5 g } 250 cc, 2 cc	
ブ ド ウ 糖	5	FeSO ₄ ·7 H ₂ O 0.5 g }	
酢 酸 ナ ト リ ウ ム	2.5	NaCl 0.5 g }	
		蒸留水で 200 cc pH 7.0~6.8	

アスバラギン培地：アスバラギン 4.0 g, シスチン 80 mg, ブドウ糖 2.0 g, A 液 1.0 cc, B 液 1.0 cc, 蒸留水 100 cc に溶解し, pH 7.0 に修正する。

Table II *L. arabinosus* の場合 (Fig. 1 参照)

PABA, PNBA 添加量 γ/tube	培養時間 24 時間 培養温度 30°C		培養時間 48 時間 培養温度 30°C	
	(吸光係数) ε		(吸光係数) ε	
	PABA	PNBA	PABA	PNBA
0.00	0.02		0.09	
0.025	0.13	0.10	0.22	0.18
0.050	0.18	0.14	0.24	0.20
0.075	0.19	0.15	0.25	0.20
0.10	0.20	0.15	0.26	0.21
0.15	0.21	0.16	0.26	0.22
0.25	0.21	0.17	0.26	0.20

Table III *Leuconostoc mesenteroides* の場合 (Fig. 2 参照)

PABA, PNBA 添加量 γ/tube	培養時間 24 時間 培養温度 30°C		培養時間 48 時間 培養温度 30°C	
	(吸光係数) ε		(吸光係数) ε	
	PABA	PNBA	PABA	PNBA
0.00	0.11		0.13	
0.025	0.13	0.12	0.14	0.135
0.050	0.14	0.13	0.16	0.15
0.075	0.15	0.14	0.18	0.16
0.10	0.16	0.15	0.21	0.18

Table IV *Escherichia coli* の場合 (その1) (Fig. 3 参照)

PABA, PNBA 添加量 γ /tube	培養時間 24 時間 培養温度 37°C		培養時間 48 時間 培養温度 37°C	
	(吸光係数) ϵ		(吸光係数) ϵ	
	PABA	PNBA	PABA	PNBA
0.00	0.11		0.13	
0.025	0.13	0.12	0.14	0.135
0.050	0.14	0.13	0.16	0.15
0.075	0.15	0.14	0.18	0.16
0.10	0.16	0.15	0.21	0.18
0.15	0.16	0.15	0.21	0.21
0.20	0.16	0.16	0.21	0.21

Table V *E. coli* の場合 (その2) (アスパラギン-シスチンの培地使用)

PABA, PNBA 添加量 γ /tube	培養時間 24 時間 培養温度 37°C		培養時間 48 時間 培養温度 37°C	
	(吸光係数) ϵ		(吸光係数) ϵ	
	PABA	PNBA	PABA	PNBA
0.00	0.10		0.12	
0.025	0.10	0.095	0.12	0.12
0.050	0.10	0.095	0.13	0.125
0.075	0.095	0.095	0.13	0.13
0.10	0.095	0.098	0.13	0.13
0.15	0.098	0.098	0.13	0.13
0.20	0.10	0.10	0.13	0.13

Table VI パラニトロ安息香酸のスルホンアミド剤 (スルファチアゾール) に対する拮抗性

PABA, PNBA 添加量 γ /tube	対 照 培 地		拮抗培地 (スルファチアゾール) (50 γ /cc 添加)	
	(吸光係数) ϵ		(吸光係数) ϵ	
	PABA	PNBA	PABA	PNBA
0.00	0.10			
0.05	0.17	0.13	0.075	0.075
0.10	0.25	0.20	0.080	0.080
0.50	0.27	0.25	0.095	0.085
1.00	0.27	0.26	0.175	0.080
2.00	0.27	0.27	0.255	0.085
5.00	0.27	0.27	0.26	0.090
8.00	0.27	0.27	0.265	0.100
10.00	0.28	0.27	0.27	0.25
20.00	0.28	0.27	0.27	0.26
30.00	0.28	0.28	0.27	0.27

使用菌種: *L. arabinosus*. 使用培地: Table I の培地の中でアミノ酸混合物の代りに培地 100 cc 中カゼイン酸分解物窒素量 200 mg PL, トリアτροφアン, シスチン各 20 mg を使用した. 培養時間 48 時間, 培養温度 30°C.

結 論 パラニトロ安息香酸をパラアミノ安息香酸の代りに用いた場合の作用力を *L. arabinosus*,

Leuconostoc mesenteroides, *E. coli* の3種の菌について比較した。

パラニトロ安息香酸は *L. arabinosus* に対し PABA のほぼ 80% の作用を示す。 *Leuconostoc mesenteroides* では 0.1 γ /5 cc の濃度で PNBA は PABA の 90% 程度、それ以上の濃度では 95~98% の作用を示す。

E. coli では PABA, PNBA 共に合成培地並びにアスパラギン培地いずれにも全く差異を示さなかつた。

L. arabinosus を用いた場合 PNBA のスルホンアミド剤 (スルファチアゾール) に対する拮抗性は PABA の 1/10 程度である。

PNBA は以上の菌では大体 PABA の作用を示す事が明らかである。

本研究は名大江上研究室の亜硝酸還元酵素に関する研究の一環として行つた。終りに御指導を賜つた名大江上不二夫教授、又絶えず激励し御便宜をお計り下さつた武田研究所長桑田 智博士に感謝する。

Summary

Growth of *Lactobacillus arabinosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Escherichia coli* was tested by substituting *p*-nitrobenzoic acid for *p*-aminobenzoic acid (PABA). With *L. arabinosus*, it showed approximately 80% the activity of PABA, 90~98% of PABA with *Leuc. mesenteroides*, but no difference was found to have been shown with *E. coli*. The antagonism of *p*-nitrobenzoic acid against sulfathiazole was found to be about 1/10 that of PABA with *L. arabinosus*. It was assumed that the above bacteria utilized *p*-nitrobenzoic acid by reducing it to PABA.

(Received April 18, 1953)

310. 武田健一, 濱元 要: 芳香異項環 N-オキシドの研究 (第2報*) キノリン N-オキシドと α -ブロムピリジン及び α -ブロムキノリンとの反応

Ken'ichi Takeda and Kaname Hamamoto: Studies on N-oxides of Aromatic Heterocyclic Compounds. II. Reaction of Quinoline N-oxide with α -Bromopyridine and α -Bromoquinoline.

(Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.**)

著者等は第1報* で pyridine N-oxide と α -bromopyridine 及び α -bromoquinoline とを反応せしめて夫々 N-(α' -pyridyl)- α -pyridone (I) 及び N-(α' -pyridyl)-carbostyryl (II) を得たことを報告したが, quinoline N-oxide の場合も全く同様に反応して N-(α' -quinolyl)- α -pyridone (III) 及び N-(α' -quinolyl)-carbostyryl (IV) を得た。

即ち quinoline N-oxide と α -bromopyridine とは既に一部第1報に述べたように水浴上加温すると反応して固まり、之を熱湯及びメタノールで精製して mp 147.5°, ハロゲン陰性の針状晶 (III) と少量の mp 217°, ハロゲン陽性の針状晶とを得た。(III) は分析値 $C_{14}H_{10}ON_2 \cdot 1/2 H_2O$ に相当し、モノピクラート mp 167.5°, $C_{14}H_{10}ON_2 \cdot C_6H_5O_7N_3$ をつくる。此の物質は又富田等の方法¹⁾で α -pyridone の Na 塩と α -bromoquinoline とを銅粉と共に 200°, 4 時間加熱して合成出来た。

mp 217° の結晶は分析値 $C_{14}H_9ON_2Br$ に相当し (III) のモノブロム置換体と思われるがブロムの位置は確認していない。なお上記の quinoline N-oxide の反応は水浴温でなく、油浴中浴温 130~135° で行つた処、mp 217° の結晶のみを得て mp 147.5° の結晶 (III) は得られなかつた。

* 第1報: 本誌 72, 1427 (1952).

** Imafuku, Amagasaki, Hyogo-ken.

1) 富田, 藤田, 吉田, 徳山: 本誌 69, 701 (1949); 富田, 藤田: 本誌 71, 452 (1951).