U. D. C. 547.295.4' 299 : 542.98

中野 勇, 長崎泉吉: α -Lipoic Acid 及びその類縁化合物の研究 (第 5 報)DL-Dimethyldihydro- α -lipoic Acid の焦性葡萄糖酸化能についてIsamu Nakano and Senkichi Nagasaki: Studies on α -Lipoic Acid and its Related Compounds. V.Pyruvate Oxidation Activity of DL-Dimethyldihydro- α -lipoic Acid.

(Yanagishima Research Laboratory, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.)

Manometric assay of Gunsalus and others was carried out with *Streptococcus faecalis* (strain 10 Cl) and it was found that the ability of DL-dimethyldihydro- α -lipoic acid⁹⁾ to oxidize pyruvic acid is much weaker than that of DL- α -lipoic acid.¹⁾

(Received November 12, 1956)

α -lipoic acid は *Lactobacillus casei* の acetate-replacing factor として, また *Streptococcus faecalis* の休止菌に於ける酸化的脱炭酸因子として知られており, 著者等は第 1 報¹⁾, 第 2 報²⁾ で報告した通り α -lipoic acid 及びその誘導体を合成したのでそれ等の生物学的活性を調べた. 先ず acetate-replacing activity^{3,4)} をみるべく Reed を始め各処から分与された *Lact. casei* の acetate 要求を調べると共に, これ等の菌に紫外線を照射して変異菌を作つたが, いずれも acetate を要求しなかつたり, 要求しても acetate の量と菌の生長との間に比例的な関係が見出だせなかつた.

次に *St. faecalis* を用いて焦性葡萄糖の酸化能を調べた. α -lipoic acid の焦性葡萄糖酸化能の測定法は Gunsalus 等によつて確立され⁵⁾, Bullock⁶⁾ や Hornberger 等⁷⁾ により DL 体の生物学的活性は天然物の半分であることが見出だされている. また DL-dimethyldihydro- α -lipoic acid の活性については詳しい報告に接していないが, 焦性葡萄糖酸化能は全くないという⁸⁾. 著者等は *St. faecalis* (Strain 10 Cl)⁹⁾ を用いて Gunsalus 等の manometric assay を行い DL- α -lipoic acid の焦性葡萄糖酸化能が DL-dimethyldihydro- α -lipoic acid よりは著しく強く DL-dimethyldihydro- α -lipoic acid にも若干酸化能を認めた.

本研究に当り終始御指導, 御鞭撻を賜つた東大秋谷教授並びに第一製薬株式会社社長藤田博士に深謝する. また菌体をお願ち下さつた Prof. I. C. Gunsalus 及び Prof. L. J. Reed に感謝すると共に種々御援助をいただいた東大農学部坂口研究室の方々, 第一製薬の研究課の諸君に感謝する.

実 験 の 部

1) 菌液の調製 assay に使用した菌液は次のように調製した. 即ち Reed から分与された *St. faecalis* (Strain 10 Cl) を保存培地からとり, Ac-broth [Bact. trypton 1 g, yeast extract (武田薬品の粉末酵母エキス) 1 g, KH_2PO_4 0.5 g, glucose 1 g, 蒸留水 100 cc] で 2~3 度培養した後, 下記の合成培地に移し, 30°, 16 時間振盪培養した. 培養方法は静置培養より振盪培養した方が assay のときの酸素吸収が大であつたので振盪培養を行った. 菌体は遠心分離で集菌し, 磷酸緩衝液で洗浄後, 0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 6.5) で 1 cc あたり 10 mg (乾量) の菌体を含むように調製した. 菌体は互いに凝集し易く, 洗浄や菌液の調製に不便であつた.

合成培地組成 (1 L 中)

カゼイン酸分解物 ¹⁰⁾	100 cc Nicotinic acid	5 mg
Casein hydrolysate ¹¹⁾	7.5 g Riboflavin	1 mg

1) 中野, 佐野: 本誌 75, 1296(1955). 2) 中野, 佐野: 本誌 76, 946(1956).

3) L. J. Reed, et al.: J. Biol. Chem. 192, 851(1952).

4) 小池: ビタミン 6, 729(1953).

5) I. C. Gunsalus, M. I. Dolin, Lena Struglia: J. Biol. Chem. 194, 849(1952).

6) M. W. Bullock, et al.: J. Am. Chem. Soc. 74, 1868(1952).

7) C. S. Hornberger, Jr., et al.: Ibid 75, 1273(1953).

8) A. F. Wagner, et al.: Ibid 77, 5140(1955).

9) Prof. I. C. Gunsalus 及び Prof. L. J. Reed から分与されたもの.

10) 生物理化学研究所製, vitamin free のもの 11) G. B. I. 製 Enzymatic Hydrolysate.

Glucose	3.0 g	Pyridoxine·HCl	1 mg
K ₂ HPO ₄	5.0 g	Thiamine·HCl	1 mg
Na-thioglycolate	100 mg	Ca-pantothenate	1 mg
DL-Tryptophan	200 mg	Folic acid	10 γ
L-Cystine	200 mg	Biotin	1 γ
Adenine, guanine, uracil	25 mg	Salts ¹²⁾	5 cc

pH 7.0~7.3 autoclaved 15 mins. at 15 lbs.

2) 試料の調製 既に報告した合成法で合成した DL-lipoic acid¹⁾ 及び DL-dimethyldihydro- α -lipoic acid²⁾ を極く少量の重炭酸ソーダ水で溶かした後、蒸留水で希釈して 1 cc 中試料 1 γ を含む溶液とした。

3) 実験方法及び結果 assay は Gunsalus 等の manometric assay に基づいて行つた。検圧計の容器の側室には 0.2 M 焦性葡萄糖加里 0.3 cc を、中央副室には 20%苛性ソーダ 0.15 cc を入れた。実験温度は 37°で行つたが、酸素吸収は基質の焦性葡萄糖加里液を加えてから大体 10 分後から始まり、1 時間半乃至 2 時間比例的な酸素吸収がみられるので、吸収量の測定は基質添加後 30 分から 1 時間行つた。DL- α -lipoic acid は乾燥菌体 1 mg に付き 1 時間平均 15 μ l, DL-dimethyldihydro- α -lipoic acid は平均 1.5 μ l の酸素吸収がみられた、なお焦性葡萄糖を添加しないときは試料の有無による酸素吸収の差は特にみられなかつたので α -lipoic acid が主室中のグルタミン酸の燃焼に役立つとは考えられない。

Dimethyldihydro- α -lipoic acid の生物学的活性

	検体の 有 無	酸素吸収量* (1 時間) (μ l)	乾燥菌体 (mg)	菌体 1 mg の酸素吸収量 (1 時間) (μ l)
DL- α -Lipoic acid	+	255.6	8.7	16.0
	-	116.1		
	+	331.7	6.0	14.0
	-	248.9		
DL-Dimethyldihydro- α -lipoic acid	+	134.2	7.2	1.8
	-	127.9		
	+	388.4	7.3	1.2
	-	379.8		

* 菌体の酸素吸収活性は培養毎に変動する。

検圧計容器の内容

主室	菌液	0.2 cc
	試料	0.1 cc
	0.2M 磷酸緩衝液 (pH 6.5)	0.5 cc
	MgSO ₄ (25 mg/cc)	0.1 cc
	Riboflavin (20mg/cc)	0.2 cc
	Thiamine·HCl (200 γ/100 cc)	0.1 cc
	Adenosine (40 mg/10 cc)	0.1 cc
	Glutamic acid (200 mg/2cc)	0.1 cc
	最終液量	2.7 cc
側室	0.2M K-pyruvate	0.3 cc
副室	2% 苛性ソーダ液	0.15 cc

第一製薬株式会社柳島工場

12) Salts B 250 cc は MgSO₄·7H₂O 10 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.5 g, MnSO₄·4H₂O 0.5 g, Ascorbic acid 0.5 g を含有する。