UDC 547. 569. 1-292 : 582. 282. 12*

229. 山岸三郎：チオールエステルに関する研究（第7報）
 抗黴性チオールエステルの作用様式に関する考察について¹⁾その2

Saburo Yamagishi : Studies on Thiol Esters. ⁴VII.
 Approach to the Elucidation of the Mode of Action of
 Antifungal Thiol Esters. (2).

(Pharmaceutical Faculty, University of Chiba)

It was found that antifungal thiol esters had a marked specificity in inhibiting the production of spores in *Aspergillus niger* in much lower concentration than that required in its inhibition against growth of mycelium and swelling of spores of this fungus (Fig. 1). The effect of phenyl acetothiolate, phenyl benzothiolate, and phenyl 3-pyridinecarbothiolate against respiration of spores, cultured for 0, 3 and 6 hours, with glucose as a substrate, was examined and results shown in Fig. 2 were obtained. At the same time, sensitivity of various spores cultivated for the specified time was examined by contacting the spores for 20 minutes with phenyl acetothiolate and phenyl 3-pyridinecarbothiolate and the results are shown in Fig. 3. The foregoing facts have shown that thiol esters have marked inhibiting activities against *Aspergillus niger*, especially to its swollen spores, and a correlationship was found to exist between sporocidal activity and inhibition of respiration enzyme. Considerations were made on the mode of action of antifungal thiol esters from the present and earlier series of experimental observations.

(Received March 25, 1958)

Aspergillus niger 孢子発芽に及ぼす影響について (Fig. 1) 第4報¹⁾においてはチオールエステルの *Aspergillus niger* の菌子の発育および胞子の膨潤に対する阻害作用を詳細にかつ定量的に知ることができたが、

Fig. 1. Sporostatic Action of Thiol Ester

1) 第4報：本誌 78, 263 (1958).

本報においては胞子の発芽に対して phenyl acetothiolate 等の4種のエステルについてその阻害の状態を検討した。

他の条件は第4報の膨潤胞子に対する阻害の場合と同様にして約8時間培養後の発芽率を調べた結果、Fig. 1の如き阻害曲線を描くことができる。この図は phenyl acetothiolate, phenyl 3-pyridinecarbothiolate について得られたものであるがいずれも抗胞子（膨潤）性、抗菌殺性に比してさらに低濃度で発芽を特異的に阻害するものであることが明らかとなった。この他 phenyl benzothiolate, phenyl 2-furothiolate も同様に低濃度でよく胞子発芽阻害がみられる。これらの事実は次に得られた実験の結果と対比して興味がある。

***Aspergillus niger* 胞子の呼吸に対する影響 (Fig. 2)** *Aspergillus niger* 胞子を 30° にペプトン・酵母エキス・葡萄糖培地中に振盪培養すると胞子は膨潤して行き、6時間培養すると発育の早いものは既に発芽が始まっている状態が観察される。このような膨潤過程における 0 (resting spore), 3, 6 時間培養胞子を用いて葡萄糖を基質として酸素消費の状態を検討した。

Fig. 2. Influence of Thiol Esters on Respiration of *Aspergillus niger* Spore

この場合その阻害剤として使用した3つのチオールエステルは phenyl acetothiolate, phenyl 3-pyridinecarbothiolate, phenyl benzothiolate で、いずれも $10^{-3} M$ となるように加えてある。Fig. 2の結果から比較的水溶性の前2者はいずれも3時間培養胞子に対してはかなりはつきりした抑制を示し、特に phenyl acetothiolate において顕著である。さらに6時間培養胞子に対しては両者とも強い呼吸阻害を示していることが明らかである。これに対し phenyl benzothiolate はかなり難溶なため suspension のまま加えてあるのでそのために急速に呼吸の阻害が起らないのか、または作用機作に違いがあるのか結論できないがこの場合には呼吸の阻害がみられなかつた。一般に *A. niger* 胞子は培養開始後2時間を経て生理的、生化学的に活動が盛んになって行くことが柳田²⁾により明らかにされているが、この場合も休息型胞子に比べて或程度膨潤した胞子に対して呼吸酵素系への阻害が増大し、さらに6時間培養後の発芽期の胞子に対して特にその阻害が顕著になるということは上記チオールエステルによる発芽抑制率の大きいことと対比して興味深い点である。

***Aspergillus niger* 胞子の発芽過程におけるチオールエステルへの感受性 (Fig. 3)** 上記のように胞子の膨潤→発芽の過程においてその呼吸酵素系が phenyl acetothiolate, phenyl 3-pyridinecarbothiolate により阻害されることが明らかとなったので、同様に 0, 3, 6 時間培養胞子を取り出し phenyl acetothiolate, phenyl 3-pyridinecarbothiolate を夫々 $10^{-3} M$ に20分間接触せしめた後薬物を去り、胞子を一定濃度に希釈して寒天平板上に塗抹接種し、24時間培養後生育してきた菌子コロニー数を数え、対照と比較して阻害度を算出した。そのような殺胞子作用に対する各時間培養胞子を阻害度により比較した結果が Fig. 3 である。なおこの場合の阻

2) T. Yanagita: Arch. für Mikrobiol. **26**, 329 (1957).

Fig. 3. Thiol Ester Sensitivity of Spores during Course of Germination

害度は殺孢子阻害度の場合と同様に求めた。このように膨潤孢子が抗微生物性チオールエステルにより殺胞子的にも感受性を増して行くことが明らかとなったが、この事実と前記呼吸阻害との間に並行関係が存在することによりチオールエステルの発育阻害作用の一つの要因が呼吸酵素系の阻害にあることが結論できる。

結 論 以上のような実験結果を総合して考えてみると、まずチオフェノール類のエステルである抗微生物性チオールエステルはアミノ基に対して有機化学的、生理的条件下にアシル基転移反応性を有することが立証された。このような生体内の模型実験は Wieland 等の行った例えば phenyl acetothiolate の glutathione の S-acetyl 化³⁾, cysteamine のアセチル化⁴⁾ のような一連のチオール基へのアシル基転移反応の報告等と組合せて、生体内での必須チオール基やアミノ基へのその反応と阻害作用との間に何らかの関係があるのではないかという想像の下にいくつかの実験を行った。その結果抗微生物力の強さを定性的に、或いは *A. niger* の菌糸および孢子を用いて定量的に検討した結果、或程度アシル基転移反応性との間に相関関係が認められた。同時に種々の酸化還元剤を添加してその影響を調べてみたがほとんど顕著な影響がみられず、チオールエステルが水解されてカルボン酸とチオフェノールに分れて作用するという考え方、およびそれに関連してチオールエステルが酸化還元系に影響を及ぼして阻害効果を発現するという抗菌機作は第1報³⁾、第4報¹⁾の資料と共に考えて一応考慮の外におくことができよう。これに対して数種のアミノ酸類を添加した実験ではチオールアミノ酸以外は抗微生物スペクトラムに大きな変化を与え得なかつた。このことはアシル基転移反応による阻害作用点への指向性が非特異的でないことを示している。これに反して cysteine, glutathione 等は phenyl acetothiolate においてはやや小さい（これは恐らくその大きな反応速度等によるものであろう）が、phenyl 3-pyridinecarbothiolate, phenyl benzothiolate において明らかに拮抗が認められた。なお methionine にこの効果が認められないことから、この拮抗の原因がチオールアミノ酸類のチオール基によるものと結論できる。このような現象と共に *A. niger* の特に膨潤孢子に対して呼吸の著しい阻害およびその関連実験が明らかに認められた。

このような結果から考えて抗微生物性チオールエステルの抗菌作用様式は酸化還元に影響されにくいチオールアミノ酸類との交渉にあるらしいこと、それがチオールエステルのアシル基転移反応性に関係のあるらしいことが推定された。またこの機作を仮定した場合に、そのアシル基転移反応が enzymatic かまたは non-enzymatic に進行するかという問題が残されている。最近 Stadtman⁴⁾ に次のような反応系

が進行することを立証した。また同様に容易に希薄水溶液 (pH 8) で、例えばこのような acetyl 基転移反応が進行することを立証した。

かかる事実および Wieland らのチオール基との反応の研究等から考えて、このような energy rich な型の抗

3) 第1報: 本誌 **76**, 436 (1956).

4) E.R. Stadtman: J. Cellular Comp. Physiol. **41** (1953); J. Biol. Chem. **196**, 535 (1952).

微生物チオールエステルの non-enzymatic なアシル基転移反応性は充分考え得られると思われるが、なお今後の研究によつて解明するべきところである。

この研究により従来知られなかつた抗菌、抗微生物チオールエステルが新たに発見され、その抗菌力および抗菌機作が推定されるに至つた次第である。

終りに臨み終始御懇篤な御指導を頂いた宮木教授に深甚なる感謝の意を表する。また御教示を頂いた東京大学柴田教授に深甚なる感謝の意を表する。また本研究に当り種々御援助して下さいた腐敗研究所林助教授に篤く感謝する。

研究費の一部を文部省科学研究費に仰いだことを附記する。

実 験 の 部

Aspergillus niger 胞子発芽阻害の実験 (Fig. 1) 第4報¹⁾における胞子膨潤に対する阻害曲線を得た場合と同様な方法で行い、約8時間培養により発芽率を調べた。阻害度の算出は膨潤胞子の場合に準じた。

Aspergillus niger 胞子の呼吸阻害実験 (Fig. 2) *A. niger* 胞子 (第4報参照) 10 mg をペプトン・酵母エキス・葡萄糖培地 100 cc 中に 30° で振盪培養し、0 時間、3 時間の各時間毎にとり出して遠心沈澱後2回生理食塩水で水洗した胞子を用い、Warburg 検圧計により主室に phosphate buffer 1.4 cc, 2 mg spore/0.2 cc, 側室に glucose ($2 \times 10^{-2} M$) 0.2 cc, チオールエステル ($10^{-2} M$) 0.2 cc を入れ KOH 存在下に酸素消費量を追跡した。

発芽過程胞子のチオールエステルに対する感受性 (Fig. 3) 上記の spore 10 mg/medium 100 cc の割合で胞子を 30° に振盪培養しその中 7 cc をとり出し (0.7 mg 胞子含有) 遠沈して上清を去りこれにエステルの培地溶液 ($10^{-3} M$) 7.4 cc を加え 30° の水槽中に 15 分振盪培養し、遠沈して上清を去り 5 cc の培地を加えて (薬物を接触させてからこの操作まで 20 分間) 洗浄し薬物の影響をなくする。その残渣に 0.2 cc の培地を加えその 0.1 cc をとり (10^8 箇 spore/cc) 滅菌蒸留水で希釈し 10^3 箇/cc となるようにしその 0.1 cc をとり平板上に塗抹接種して 30° に培養し 24 時間後に生育してきた菌糸のコロニー数を数えた。結果は次の通り。

Thiol Esters	Spore Incubation Time (hr)		
	0	3	6
Control	90	102	90
$\text{CH}_3\text{COSC}_6\text{H}_5$ ($10^{-3} M$)	87	22	16
- COSC_6H_5 ($10^{-3} M$)	83	88	2

数字はコロニー数

千葉大学薬学部