不含培地では、代替力価は小であるが Pa-A に代替する微生物増殖促進作用を示した。また Pa-A 含有培地では、*Lactobacillus arabinosus* では顕著でなかったが、ほかの2種の乳酸菌に対して弱い拮抗作用を示した。これらは前述の既知 Pa-A 構造類似化合物の通性とよく一致している。

なお著者等の合成した Mv-β-A はラセミ型であるから、分割して天産 Pa-A と同様の立体配置を有する光学活性化合物を得れば、さらに強い微生物活性を示すことが予想される。

結 語

著者等の実験結果を要約すると、つぎようになる。

(1) 著者等の合成した Mv-β-A は、Pa-A を必須とする3種の乳酸菌 *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti* に対し、Pa-A 不含培地で代替力価は小であるが Pa-A に代替する微生物増殖促進作用を示した。

(2) Mv-β-A は Pa-A 含有培地で、*Lactobacillus arabinosus* では顕著でないが、*Lactobacillus casei* および *Lactobacillus fermenti* に対して Pa-A との拮抗作用による弱い微生物増殖抑制作用を示した。

(3) Mv-β-A の微生物活性は、その水解により生成する可能性のあるメバロン酸あるいは β-アラニンの微生物活性によるものではないことを証明した。

本研究の一部は昭和37年度文部省各個研究費により施行した。ここに記して謝意を表す。

名古屋大学医学部付属病院薬局, 岐阜薬科大学

薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
85 (12) 1074 ~ 1078 (1965)

UDC 547.466.3-474.2.09 : 576.851.48.095.18

160. 高取吉太郎,*¹ 北村二郎, 今井一夫*²: N-メバロノイル-β-アラニンの合成とその生物学的活性に関する研究 (第3報*³) N-メバロノイル-β-アラニンの大腸菌変異株に対する生物学的活性

Kichitaro Takatori, Jiro Kitamura, and Kazuo Imai: Studies on the Synthesis of N-Mevalonoyl-β-alanine and Its Biological Activities. III. Effects of N-Mevalonoyl-β-alanine on the Growth of *Escherichia coli* Mutants.

(Pharmacy of Nagoya University Hospital*¹ and Gifu College of Pharmacy*²)

The growth of *Escherichia coli* mutant No. 229, which requires *d*-pantothenic acid, was found to be promoted by a high concentration of synthesized N-*dl*-mevalonoyl-β-alanine in a medium not containing pantothenic acid. In *E. coli* mutant No. 3020, requiring *d*-pantothenic lactone, its growth was strongly promoted by pantothenic acid than by its lactone, which could both be replaced by synthesized N-*dl*-mevalonoyl-β-alanine or *dl*-mevalonic lactone. *E. coli* mutant No. 229, cultured in a medium containing a high concentration of mevalonoyl-β-alanine, and *E. coli* mutant No. 3020, cultured in a medium containing a high concentration of mevalonic lactone or mevalonoyl-β-alanine, did not revert to their original strain, *E. coli* o-20. In the *E. coli* mutant No. 229, antagonism of mevalonoyl-β-alanine against pantothenic acid in the medium containing the latter was not observed. Similarly, in *E. coli* mutant No. 3020, antagonism of mevalonoyl-β-alanine against pantothenic lactone was not observed in a medium containing the latter lactone.

(Received September 11, 1965)

前報*³ ではパントテン酸を必須とする3種の乳酸菌 *Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus casei*, および

*¹ Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya.

*² Mitahora-sakanoshita, Gifu.

*³ 第2報: 本誌, 85, 1070 (1965).

Lactobacillus fermenti について, 著者等の合成した N-dl-メバロニル-β-アラニンが高濃度でパントテン酸に代替する増殖促進作用を有することを報告した. 今回はパントテン酸を必須とする大腸菌変異株 #229,¹⁾ およびパントテン酸を構成するオキシン酸であるパントイン酸 (pantoic acid) を必須とする大腸菌変異株 #3020²⁾ を使用し, これらの大腸菌変異株に対する N-dl-メバロニル-β-アラニンの微生物学的活性について検討した. その際得られた知見について此所に報告する.

実験の部

実験方法

菌 株 つぎの2種の大腸菌変異株を使用した. これらの変異株は山口県立医科大学微生物学教室の保存株で, 原株 *Escherichia coli* o-20 に由来するものである.

Escherichia coli #229 (パントテン酸要求株)

Escherichia coli #3020 (パントイン酸要求株)

保 存 Davis-Mingioli 合成培地,²⁾ すなわち 1 L. 中に グルコース 2.0 g., クエン酸ナトリウム 0.5 g., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g., K_2HPO_4 7.0 g., KH_2PO_4 3.0 g. を含む基礎培地 (培地成分のうちグルコース・緩衝液・塩類溶液を, それぞれ別に 10 ボンド・10 min. 滅菌し, 冷後この3成分を無菌的に混和し, pH 7.0 に調整したもの) に, 1.5% の割合に粉末寒天と, #229 には d-パントテン酸カルシウム (Pa-Ca と略称) を 1 γ/ml. の割合に, #3020 には dl-パントラクトン (Pa-Lac と略称) を 20 γ/ml. の割合に, それぞれ添加し, この処方の保存培地を綿栓した試験管に分注して 15 ボンド・10 min. 高圧滅菌した後, 前記大腸菌変異株の1種を穿刺培養 (37°・24 hr.) し, 2週間ごとに移植を行ない氷室中に貯えた.

接種菌液 前記保存用培地から粉末寒天だけを除いた処方の液体培地 5 ml. を試験管中に分注し, 10 ボンド・10 min. 高圧滅菌したものに菌を接種し, 37°・24 hr. 培養後その 1 ml. を採り遠沈して集菌し, 滅菌生理食塩水 1 ml. で2回洗浄後, 滅菌生理食塩水 1 ml. に懸濁する. この懸濁液 0.5 ml. を滅菌生理食塩水 5 ml. に加えよく振りまぜて接種菌液とした (10 倍希釈菌液).

試験用培地 前記の Davis-Mingioli 培地を2倍濃度に調整し, 接種すべき試験用の基礎培地となし, これに同容の検体希釈液を添加して培養実験を行なった.

検体の調製 N-dl-メバロニル-β-アラニン (Mv-β-A と略称) の調製法は前報と同様で, 濃度 4000 γ/ml. の原液を調製した. d-パントテン酸 (Pa-A と略称) は Pa-Ca を使用し, d-パントテン酸としての濃度が 200 γ/ml. の原液を調製した. dl-メバロン酸は dl-mevalolactone (Mv-Lac と略称) を使用し, 濃度 200 γ/ml. の原液を調製した. 最後に dl-パントイン酸は dl-pantolactone (Pa-Lac と略称) を使用し, 濃度が 4000 γ/ml. の原液を調製した. 各検体の原液は氷室中に保存し, 必要時に蒸留水で希釈して使用し, 2週間ごとに更新した.

濁度法による増殖度測定 試験用の基礎培地 5 ml. を分注した試験管群に種々の濃度比の希釈列となるように各種の検体を添加, 蒸留水を加え全量 10 ml. となしてから, 15 ボンド・10 min. 滅菌, 前記のように調整した接種菌液を 1/2 皮下注用注射針で1滴ずつ接種し, 37° の孵卵器中で 24 hr. 培養後, 常法のように光電比色計 (エレクトロニクス 20 型) を用い, 波長 575 mμ で未接種液の透過率を 100% とした場合の各微生物培養液の透過率を測定する方法により, 各微生物の増殖度を定量的に比較した.

実験結果

1. N-dl-メバロニル-β-アラニンの *Escherichia coli* #229 に対する発育促進作用 (Mv-β-A の Pa-A 代替作用)

まず大腸菌変異株 #229 の必須因子である d-パントテン酸に対する #229 の標準発育曲線を求め, つぎに d-パントテン酸をまったく含まない前記の試験用培地に Mv-β-A の希釈列を添加して #229 を接種 24 hr. 培養し, 培養液の濁度を光電比色計で比較する方法により, Mv-β-A の Pa-A 代替能を示す #229 の発育曲線を求めた. これらの結果を Fig. 1 に示した. さらに同様の方法で #229 に対する Mv-Lac および β-アラニンの Pa-A 代替能を検討し, その結果を

Fig. 1. Test of Stimulatory Growth Effects on *E. coli* #229

(A) d-pantothenic acid
(B) N-dl-mevalonoyl-β-alanine

1) 林, 真野: ビタミン, 12, 115 (1957); 林, 真野, 中山: ビタミン, 12, 353, 569 (1957); 日本細菌, 13, 183 (1958).

2) B. D. Davis: Proc. Nat. Acad. Sci. 35, 1 (1949); B. D. Davis, E. S. Mingioli: J. Bact., 60, 17 (1950).

TABLE I. Test of Stimulatory Growth Effects on *E. coli* #229

Test compound	Amount added, γ /ml.	Transmission percentage*	Test compound	Amount added, γ /ml.	Transmission percentage*
Blank	0	100		0.008	60
				0.020	43
N- <i>dl</i> -Mevalonoyl- β -alanine	16	100		0.030	37
	32	99			
	96	55	<i>dl</i> -Mevalonic acid	400	100
	160	50		800	100
	320	45		1600	100
	960	37		2000	100
	1600	36	β -Alanine	500	100
<i>d</i> -Pantothenic acid	0.001	93		1500	100
	0.004	94		2000	100
	0.006	66		2500	100

* This value is inversely proportional to the cell-reproduction.

Table I に示した。

これらの結果をみるとわかるように、#229 に対し Mv- β -A は高濃度でよく Pa-A 代替能を示し、Mv-Lac および β -アラニンが高濃度でも Pa-A 代替能を全然示さなかった。

2. N-*dl*-メバロノイル- β -アラニンの *Escherichia coli* #3020 に対する発育促進作用 (Mv- β -A の Pa-Lac, Pa-A 代替作用) まず大腸菌変異株 #3020 の必須因子である Pa-Lac あるいは *d*-パントテン酸に対する #3020 の標準発育曲線を求めた。つぎに Pa-Lac あるいは *d*-パントテン酸をまったく含まない試験用培地に、Mv-Lac あるいは Mv- β -A の希釈列を添加して #3020 を接種・24 hr. 培養し、培養液の濁度を光電比色計で比較する方法により、Mv-Lac あるいは Mv- β -A の必須因子代替能を示す #3020 の発育曲線を求めた。さらに #3020 の Mv- β -A 合成能の有無を調べるために、試験用培地に各種濃度の Mv-Lac および 100 γ /ml. の β -アラニンを同時に添加した場合の #3020 の発育曲線を求めた。これらの結果をまとめて Fig. 2 に示した。

Fig. 2. Test of Stimulatory Growth Effects on *E. coli* #3020

- (A) *d*-pantothenic acid
- (B) *dl*-pantolactone
- (C) N-*dl*-mevalonoyl- β -alanine
- (D) *dl*-mevalolactone
- (E) *dl*-mevalolactone + β -alanine (100 γ /ml.)

3. 拮抗試験 大腸菌変異株 #229 について、異なった濃度比で Pa-A と Mv- β -A とが培地内に共存する場合の微生物増殖試験の結果を Table II に示した。また同様に #3020 について、Pa-Lac と Mv-Lac とが培地内に共存する場合の微生物増殖試験の結果を Table III に示した。これらの結果をみるとわかるように、両者の場合とも拮抗現象を認めることはできなかった。

考 察

パントテン酸を必須とする大腸菌変異株 #229 では、高濃度の Mv- β -A は Pa-A 不含の培地でよく Pa-A に代替すること、またその代替能は前報で報告した 3 種の乳酸菌の場合に比べ遙かに大であることがわかった。し

比較する方法により、Mv-Lac あるいは Mv- β -A の必須因子代替能を示す #3020 の発育曲線を求めた。さらに #3020 の Mv- β -A 合成能の有無を調べるために、試験用培地に各種濃度の Mv-Lac および 100 γ /ml. の β -アラニンを同時に添加した場合の #3020 の発育曲線を求めた。これらの結果をまとめて Fig. 2 に示した。

Fig. 2 をみるとわかるように、Pa-A は Pa-Lac にくらべ低濃度で非常に大なる増殖促進作用が認められた。また Mv- β -A は Pa-Lac にくらべれば劣るが、Mv-Lac とくらべると低濃度ではるかに大なる増殖促進作用を示した。しかし Mv-Lac と β -A とを同時に培地に加えた場合は、Mv-Lac 単独添加の場合と大差がなかった。これは大腸菌変異株 #3020 では菌体内で Mv- β -A を合成する能力を欠くためと考えられる。

TABLE II. Test of Antagonistic Growth Effects (I)

<i>d</i> -Pantothenic acid γ /ml.	N- <i>dl</i> -Mevalonoyl- β -alanine γ /ml.	Transmission percentage (<i>E. coli</i> #229)
0.2	0	36
"	32	35
"	108	34
"	192	33
"	320	32
"	480	30
"	640	31
"	960	30

TABLE III. Test of Antagonistic Growth Effects (II)

<i>dl</i> -Pantolactone γ /ml.	<i>dl</i> -Mevalolactone γ /ml.	Transmission percentage (<i>E. coli</i> #3020)
100	0	30
"	10	31
"	40	30
"	100	30
"	200	33
"	400	32
"	800	33
"	1600	34

しかしこの代替能は Mv-Lac および β -A の培地内同時投与では認められなかったゆえ, #229 は Mv- β -A の生体内合成能を有しないと考えられる。

パントラクトンを必須とする大腸菌変異株 #3020 では, Pa-Lac より Pa-A の方が遙かに強大な微生物増殖促進の活性を示した. Pa-Lac の異性体である Mv-Lac は Pa-Lac の約 100 倍の高濃度で Pa-A あるいは Pa-Lac 不含の培地における代替能を Pa-Lac とほぼ同程度の微生物増殖活性として示した. そしてこの場合, Mv- β -A の代替能は Mv-Lac よりさらに強力で, Pa-Lac の約 10 倍の高濃度ではほぼ同程度の代替能を示した. Pa-Lac より Pa-A の方が活性, Mv-Lac より Mv- β -A の方が活性という結果は, 両者よく平行した. しかしこの場合も Mv-Lac および β -A の同時投与では, Mv-Lac の単独投与の場合とほとんど同様の代替能しか示さなかった。

前報で報告した 3 種の乳酸菌でも認められた必須因子不含の培地における必須因子と構造近似した化合物の示す代替作用の機構は不明であるが, 培養中に微生物が変異を起こす可能性も考えられる. 今回著者等が使用した大腸菌変異株 #229 および #3020 では, 原株 o-20 が Pa-A も Pa-Lac もともに必須としていないから, この原株への復帰の可能性もある. それで前記の試験用培地から必須因子を除去した斜面培地を作り, 高濃度 (1000~2000 γ /ml.) の Mv- β -A を含有する培地で増殖した #229, 高濃度 (1000~2000 γ /ml.) の Mv-Lac あるいは Mv- β -A を含有する培地で増殖した #3020 を, それぞれこの培地に移植した. しかしこの培地で原株 o-20 は顕著な増殖を示したのに, #229, #3020 ではともに全然菌の増殖は認められず, この条件での原株復帰の可能性は否定された。

Pa-A 含有培地で #229 は実験した濃度範囲では, Mv- β -A に対する拮抗現象を示さなかった. また Pa-Lac 含有培地で #3020 は実験した濃度範囲では, Mv-Lac に対する拮抗現象を示さなかった. これは大腸菌変異株 #229 および #3020 が必須因子に対し鋭敏に反応し, 微生物増殖に必要な必須因子の最小有効濃度に速やかに達して急激な増殖をするためと考えられる。

結 語

著者等の実験結果を要約すると, つぎのようになる。

- (1) Pa-A を必須とする大腸菌変異株 #229 では, 高濃度の Mv- β -A は Pa-A 不含培地で, よく Pa-A に対する代替作用を示した. その代替能力は前報で報告した 3 種の乳酸菌の場合よりも, 顕著にあらわれた。
- (2) Pa-Lac を必須とする大腸菌変異株 #3020 では, Pa-Lac より Pa-A の方が遙かに強大な微生物増殖促進活性を示した. そして Pa-Lac あるいは Pa-A 不含培地で, Mv-Lac は Pa-Lac の約 100 倍の高濃度で, Mv- β -A は Pa-Lac の約 10 倍の高濃度で, それぞれよく代替作用を示した. Mv- β -A が Mv-Lac より代替能が大であることは, Pa-A が Pa-Lac より代替能が大であることと平行する。
- (3) 高濃度の Mv- β -A を含有する培地で培養した大腸菌変異株 #229, 高濃度の Mv- β -A あるいは Mv-Lac を含有する培地で培養した大腸菌変異株 #3020 は, とともにこれらの由来する大腸菌原株 o-20 への復帰を認めなかった。

(4) 大腸菌変異株 #229 では, Pa-A 含有培地で, Pa-A の Mv- β -A による拮抗現象を認め得なかった. また大腸菌変異株 #3020 では, Pa-Lac 含有培地で, Pa-Lac の Mv-Lac による拮抗現象を認め得なかった.

本研究に使用した大腸菌変異株 #229 および #3020 は, 山口県立医科大学 細菌学教室 林 良二教授の御厚意により, その分譲を受けた. ここに記して厚く謝意を表する.

名古屋大学医学部付属病院薬局, 岐阜薬科大学

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
85 (12) 1078 ~ 1080 (1965)

UDC 547.466.3-474.2.09 : 576.851.48.095.18

161. 高取吉太郎,^{*1} 北村二郎, 今井一夫^{*2}: N-メバロノイル- β -アラニンの合成と
その生物学的活性に関する研究 (第4報^{*3}) N-メバロノイル-
 β -アラニンの真性火落菌に対する微生物学的活性

Kichitaro Takatori, Jiro Kitamura, and Kazuo Imai: Studies on the
Synthesis of N-Mevalonoyl- β -alanine and Its Biological
Activities. IV. Effects of N-Mevalonoyl- β -alanine
on the Growth of *Lactobacillus heterohiochii*.

(Pharmacy of Nagoya University Hospital^{*1} and Gifu College of Pharmacy^{*2})

Synthesized N-*dl*-mevalonoyl- β -alanine of larger molecular weight showed stronger growth-promoting action against *Lactobacillus heterohiochii*, which requires *d*-mevalonic acid, than the synthesized *dl*-mevalonic lactone of smaller molecular weight. Microbiological activity of mevalonoyl- β -alanine against *L. heterohiochii* resembles to its activity against *Escherichia coli* mutant No. 3020 and is assumed to be characteristic to its molecule rather than to *dl*-mevalonic acid produced by its hydrolysis.

(Received September 11, 1965)

第2報¹⁾ および第3報^{*3} では N-*dl*-メバロノイル- β -アラニンがパントテン酸の異性体で, 両者の構造が類似している点に興味を持ち, パントテン酸を必須とする3種の乳酸菌およびパントテン酸あるいはパントイン酸を必須とする大腸菌変異株について, 両者の微生物学的活性の関係を検討した. その結果, 一般に必須因子パントテン酸を含まない培地で, 高濃度の N-*dl*-メバロノイル- β -アラニンが顕著なパントテン酸代替作用を有することを報告した.

今回は N-*dl*-メバロノイル- β -アラニンとその構成因子オキシ酸であるメバロン酸との関係に関心を持ち, メバロン酸を必須とする真性火落菌 *Lactobacillus heterohiochii* を使用して両者の微生物学的活性の関係を検討した. その際得られた知見についてここに報告する.

実 験 の 部

実験方法

菌 株 *Lactobacillus heterohiochii* H-1²⁾ を使用した. 本菌株は東京大学農学部 田村研究室の保存株である.

保 存 清酒 70%, ウシ肝臓パンクレアチン消化液 28%, 粉末寒天 2% を含む固形培地を保存培地として使用した. 本培地を綿栓のできる試験管に約 6 cm. の高さになるように分注し, 15 ポンド・10 min. 滅菌し, この高層培地に前記の菌を穿刺して移植し, 30° で1週間培養し, 良好な生育を示したものを氷室中に保存した.

^{*1} Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya.

^{*2} Mitahora-sakanoshita, Gifu.

^{*3} 第3報: 本誌, 85, 1074 (1965).

1) 高取, 北村, 今井: 本誌, 85, 1070 (1965).

2) 田村, 名倉: 農化, 32, 701 (1958).