(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 heterohioghii*.

(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 heterohioghii*, which requires *d*-mevalonic acid, than the synthesized *dl*-mevalonic lactone of smaller molecular weight. Microbiological activity of mevalonoyl- β -alanine against *L. heterohioghii* 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 heterohioghii* 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 heterohioghii* 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).

植継は1ヵ月ごとに行なった。

この培地に使用するウン肝臓パンクレアチン消化液は、新鮮なウン生肝臓の細片に同量の水を加え、トルエン重畳下にパンクレアチンを用いて 37° で1晩消化後、煮沸・濾過したものを使用した。

接種菌液 前記の保存培地から粉末寒天を除いた液体培地 5 ml. を試験管に分注し、15 ポンド・10 min. 滅菌した後に菌を接種、30° で7日間培養し、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. に懸濁したものの 0.5 ml. を滅菌生理食塩水 10 ml. に加えよく振りまぜて接種菌液とした (20 倍希釈菌液)。

試験用培地 試験用培地は田村等の報告³⁾を参考としてビタミン類のみ必須ビタミンに制限し、前報の場合と同様に2倍濃度に調製した。その組成を Table I に示した。

TABLE I. Medium for *Lact. heterohiophilus* (Double strength)

glucose	20 g.	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg.
NaOAc·3H ₂ O	20 g.	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg.
Tween 80	1 ml.	NaCl	10 mg.
hydrolysate of casein (by hydrochloric acid)	5.0 g.	V. B ₁	1.0 mg.
hydrolysate of casein (by pancreatin)	25 ml.	V. B ₂	1.0 mg.
dl-tryptophan	100 mg.	nicotinic acid	1.0 mg.
l-cystine	100 mg.	Ca pantothenate	1.0 mg.
NH ₄ Cl	500 mg.	folic acid	10 γ
KH ₂ PO ₄	500 mg.	adenine	10 mg.
K ₂ HPO ₄	500 mg.	guanine	10 mg.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg.	xanthine	10 mg.
		uracil	10 mg.
		aqua dist.	ad. 500 ml.
			(pH 4.8~5.0)

検体の調製 dl-mevalolactone (Mv-Lac) および N-dl-mevalonoyl-β-alanine (Mv-β-A) は前報の検体原液を希釈して、Mv-Lac は 20 γ/ml., Mv-β-A も 20 γ/ml. の、それぞれ検体原液を調製して本実験に使用した。

培養および増殖度測定 田村等³⁾は真性火落菌の培養適温は 30°, 培地の至適 pH は 5.0 であり、その生育速度は非常に遅く定常期に達するのに 7~10 日を要することを報告している。著者等はこの報告を参考として、⁴⁾

Fig. 1. Test of Stimulatory Growth Effects by Transmission Percentage Method

— Mv-Lac ---- Mv-β-A

Fig. 2. Test of Stimulatory Growth Effects by Titration Method

— Mv-Lac ---- Mv-β-A

*4 著者等は予試験で、記載した条件で max. growth に達するのにほぼ 10 日間を要することを確認し、その時点での発育曲線を比較した。

3) 田村, 名倉: 農化, 32, 702 (1958).

つぎのように増殖度の定量試験を行なった。

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の希釈列となるように Mv-Lac あるいは Mv- β -A を添加, 蒸留水を加え全量 10 ml. となし pH 5.0 に調整後, 15 ボンド・10 min. 滅菌, 接種菌液を $\frac{1}{2}$ 皮下注射用注射針で 1 滴ずつ接種した。これを 30° の孵卵器中で 10 日間培養し, 常法のように光電比色計の波長 575 m μ で未接種液の透過率を 100% とした場合の透過率を測定して, 増殖度を比較定量した。また同時に培養後の培地中の生成酸量を 0.05N NaOH で滴定する方法でも増殖度を比較定量した。

実験結果

Mv-Lac および Mv- β -A に対する *Lactobacillus heterohiochii* H-1 の 10 日間培養後における濁度測定法による増殖度定量試験の結果を Fig. 1 に, 酸度滴定法による増殖度定量試験の結果を Fig. 2 に, それぞれ示した。これをみるとわかるように両者の結果はよく平行し, 同一濃度では分子量の大なる Mv- β -A のほうが Mv-Lac よりむしろ少し強い発育促進作用を示した。

考 察

1957 年 Shunk 等⁴⁾ はメバロン酸のカルボキシル基に対し δ 位炭素に存在する第一級アルコール基がアルデヒド基に酸化されたメバルジン酸 (mevaldic acid) を合成し, メバロン酸を必須とする *Lactobacillus acidophilus* に対する微生物活性を検討した。その結果, メバルジン酸はメバロン酸の約 1/200 の活性しか示さないことを報告している。また 1958 年田村等⁵⁾ は真性火落菌 *Lactobacillus heterohiochii* の当時未知であった必須因子を追求めてメバロン酸を発見したのであるが, その際パントイン酸, β -アラニンをはじめ, 酢酸, オレイン酸, フマル酸, α -ケトグルタル酸, クエン酸, コハク酸, 酒石酸, リンゴ酸, アコニット酸, 乳酸, ピルビン酸, プロピオン酸, グルコン酸, コウジ酸, キニン酸, シキミ酸, ピメリン酸, ジメチルアクリル酸, ジハイドロキシンパリンなどを, 単独あるいは組み合わせて培地中に加えても, 微生物増殖促進活性を示さないことを報告している。

これらの報告の示すように *Lactobacillus acidophilus* あるいは *Lactobacillus heterohiochii* に対し, 必須因子メバロン酸の微生物増殖促進活性は構造特異性が顕著であるのに, 著者等の合成した Mv- β -A が Mv-Lac にむしろまさる微生物活性を示したことは注目値する。

同一濃度で分子量の大なる Mv- β -A の方が Mv-Lac より強い微生物学的活性を示したことは, 程度の差はあるが, 前報で報告したように, 大腸菌変異株 #3020 に対し Mv- β -A が Mv-Lac より遙かに強い微生物学的活性を示した現象とよく平行する。そしてこの現象は, 両者の場合とも, Mv- β -A の水解により生じたメバロン酸の微生物学的活性によるものでなく, Mv- β -A 分子の特異的な微生物学的活性に基づくものと推定される。

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) メバロン酸を必須とする真性火落菌 *Lactobacillus heterohiochii* に対し, 同一濃度で分子量の大きい N-dl-メバロノイル- β -アラニンの方がメバロン酸より強い微生物増殖促進作用を示した。

(2) *Lactobacillus heterohiochii* に対する N-dl-メバロノイル- β -アラニンの微生物学的活性は *Escherichia coli* #3020 に対する N-dl-メバロノイル- β -アラニンの微生物学的活性と同様に, 水解によって生成するメバロン酸にはなよるものく, N-dl-メバロノイル- β -アラニン分子の特異的な微生物学的活性に基づくものと推定される。

本研究に使用した真性火落菌 *Lactobacillus heterohiochii* H-1 は, 東京大学農学部 田村学造教授の御厚意により分譲を受けた。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

4) C. H. Shunk, B. O. Linn, J. W. Huff, J. L. Gilfillan, H. R. Skeggs, K. Folkers: J. Am. Chem. Soc., 79, 3294 (1957).

5) 田村, 名倉: 農化, 32, 701 (1958).