Thiamine 誘導体の酵母および乳酸菌類の増殖におよぼす影響¹⁾

永納秀男, 戸田千登世

名城大学薬学部²⁾

Influence of Some Thiamine Antagonists on the Growth of *Kloeckera apiculata*, *Lactobacillus fermenti* and *Lactobacillus arabinosus*¹⁾

HIDEO NAGANO and CHITOSE TODA

Faculty of Pharmacy, Meijo University²⁾

(Received August 9, 1976)

2'-Butylthiothiamine (II), 2'-butylthiamine (III), 4-amino-2-butylthio-5-hydroxymethylpyrimidine (V), and 4-amino-2-butyl-5-hydroxymethylpyrimidine (VI) were synthesized and their inhibitory effect on the growth of thiamine-requiring *Kloeckera apiculata* and *Lactobacillus fermenti* was compared with thiamine antagonists such as 2'-methylthiothiamine (I) and 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (IV). Effectiveness of these compounds as an inhibitor for *Kl. apiculata* decreased in the order of I, III, II, IV, V, and VI, and that for *L. fermenti* in the order of II, I, IV, V, and VI. III did not show any inhibitory effect on the growth of *L. fermenti*. The inhibition of thiamine derivatives, but not of pyrimidine derivatives, was recovered by thiamine. Effect of these compounds were examined on the growth of *Lactobacillus arabinosus*, which does not require thiamine for its growth. I, III, and VI did not show any inhibitory effect, but II and V which have a butylthio group in their structure showed an inhibitory effect, suggesting that there are some differences between I and II in their inhibitory effect on the growth of microorganisms.

Keywords—butylthiothiamine; butylthiamine; butylthio-OMP; butyl-OMP; growth inhibition; thiamine recovery effect; thiamine antagonists; *Kl. apiculata*; *L. fermenti*; *L. arabinosus*

Pyrimidine 部 2 位置換ビタミン B₁ (以下 B₁) 誘導体のうち, alkylthiothiamine 体が B₁ 要求性微生物である *Kloeckera apiculata*, *Kloeckera brevis* および *Lactobacillus fermenti* などにたいして B₁ 拮抗阻害を示し, その効果は alkyl 基の小さいものが強く, 2'-methylthiothiamine (I) > 2'-ethylthiothiamine > 2'-n-propylthiothiamine であることが報告されている。³⁾

また pyrimidine 部 2 位の methyl 基をのぞいた 2'-northiamine (nor B₁) および ethyl 基に置換した 2'-ethylthiamine (Et B₁) では動物および *Kl. apiculata* にたいして B₁ 拮抗物質として働くよりも, ある程度 B₁ 活性を示すことが知られている。⁴⁾ しかし 2'-butylthiamine (III) では動物および糸状菌 *Phycomyces blakesleeanus* にたいして B₁ 拮抗を示すことが報告されている。⁵⁾

そこで *Kl. apiculata* および *L. fermenti* にたいして 2'-butylthiothiamine (II) および III, これらに関連ある pyrimidine 誘導体の 4-amino-2-butylthio-5-hydroxymethylpyrimidine (V) および 4-amino-2-butyl-5-hydroxymethylpyrimidine (VI) がどのような影響をおよぼすか, すてに B₁ 拮抗物質として知られている I および

1) 日本ビタミン学会第 27 回大会で発表, 1975 年 6 月.

2) Location: Yagotourayama, Tenpaku-cho, Tenpaku-ku, Nagoya.

3) a) T. Sakuragi, Arch. Biochem. Biophys., 74, 362 (1958); b) 平岡栄一, 島田汎恵, ビタミン, 23, 213 (1961).

4) 小沢樹夫, 富田 勲, 斎藤慎一, ビタミン, 40, 334 (1969).

5) G.A. Emerson, P.L. Southwick, J. Biol. Chem., 160, 169 (1945); H. Haenel, Vitamine u Hormone, 7, 113 (1956).

4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine (IV) を対照として比較検討した。また B_1 非要求性微生物 *Lactobacillus arabinosus* についての影響も調べた。

実 験 の 部

1. 使用菌種 *Kl. apiculata* IFO 0630, *L. fermenti* IFO 3071, *L. arabinosus* IFO 3070.

2. 保存, 接種菌液, 基礎培地および増殖度の測定 川崎, 平岡らの方法に準じて行った。⁶⁾

保存——*Kl. apiculata* については麦芽エキス含有の斜面寒天培地, 乳酸菌については酵母エキス含有の高層寒天培地にそれぞれ培養, 保存した。

接種菌液——*Kl. apiculata* および *L. fermenti* については B_1 含有培地, *L. arabinosus* についてはニコチン酸含有培地に, 酵母は 30° , 乳酸菌は 37° で 20 時間前培養後の 20 倍希釈菌液を接種菌液とし, 注射針 1 滴を接種した。

基礎培地——*Kl. apiculata* は Hoff-Jørgensen の改変培地⁷⁾ (酵母エキスを抜いたもの), *L. fermenti* は Macias R 培地,⁸⁾ *L. arabinosus* は平岡の培地^{6e)} を用いた。

増殖度の測定——2 倍濃度の基礎培地 2 ml に化合物溶液およびビタミン溶液を加え, 全量 4 ml としたものに菌液を接種し, 酵母については 30° , 乳酸菌については 37° で 20 時間培養後の増殖度を光電比色計を用い 610 nm で比濁した。

3. 化合物 実験に使用した 6 種の化合物を Table I に示す。これらはいずれも当教室において文献記載の方法で合成した精製品を使用した。なお II と V は文献未知化合物である。これらの合成法の詳細については別報に報告の予定である。化合物は水溶液として実験に用いた。

TABLE I. Chemical Structures of Test Compounds

I	2'-methylthiothiamine R = -SCH ₃	IV	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine R = -CH ₃
II	2'-butylthiothiamine R = -S(CH ₂) ₃ CH ₃	V	4-amino-2-butylthio-5-hydroxymethylpyrimidine R = -S(CH ₂) ₃ CH ₃
III	2'-butylthiamine R = -(CH ₂) ₃ CH ₃	VI	4-amino-2-butyl-5-hydroxymethylpyrimidine R = -(CH ₂) ₃ CH ₃

実 験 結 果

1. *Kl. apiculata* におよぼす影響

a) 増殖阻害の検討 B_1 要求性酵母 *Kl. apiculata* の増殖におよぼす影響を調べた。基礎培地に B_1 0.08 $\mu\text{g}/\text{tube}$ および化合物 10^{-9} — 10^{-4} mole/tube を添加し, 30° で 20 時間培養後の菌の増殖度を測定した。

Fig. 1 に示すように II が 10^{-7} mole/tube から, III が 10^{-8} mole/tube から阻害を示しはじめ, 10^{-6} mole/tube でほぼ完全に阻害した, これは I よりも弱く IV よりも強い。V および VI はさらに弱く 10^{-5} — 10^{-4} mole/tube で阻害を示した。

b) 各種ビタミン類による回復の検討 基礎培地の組成であるビタミン類の大過剰添加による, I, II, III, V および VI の増殖阻害の回復効果をみた。阻害濃度の化合物および B_1 0.08 μg を加えた培地に, さらに B_1 10, ビタミン B_6 (B_6) 10, pyridoxal (PAL) 10, nicotinic acid 10, Ca-pantothenate 10, biotin 0.1, inositol 200 および choline chloride 40 $\mu\text{g}/\text{tube}$ をそれぞれ添加, 阻害の回復を検討した。 B_1 の添加で I, II および III は回復を示したが, V および VI では回復は認められなかった (Table II)。また他のビタミン類は顕著な回復効果を示さなかった。なお IV については回復試験を省略した。

6) a) 川崎近太郎, 平岡栄一, 島本隆光, ビタミン, 22, 389 (1961); b) 川崎近太郎, 平岡栄一, 島本隆光, ビタミン, 22, 397 (1961); c) 平岡栄一, 薬誌, 77, 1324 (1957).

7) E. Hoff-Jørgensen, B. Hansen, *Acta. Chem. Scand.*, 9, 562 (1955).

8) F.M. MaciasR, *Appl. Microbiol.*, 5, 249 (1957).

Fig. 1. Inhibitory Effect of Thiamine Derivatives and Pyrimidine Derivatives on the Growth of *Kl. apiculata*

—○—: I, —△—: II, —□—: III,
—●—: IV, —▲—: V, —■—: VI

Fig. 2. Recovery Effect of B_1 on the Growth Inhibition of *Kl. apiculata* by I, II and III

—●—: none,
—○—: I 10^{-7} mole/tube,
—○—: I 10^{-6} mole/tube,
—△—: II 5×10^{-7} mole/tube,
—△—: II 10^{-6} mole/tube,
—□—: III 10^{-6} mole/tube,
—□—: III 5×10^{-6} mole/tube

TABLE II. Recovery Effect of B_1 on the Growth Inhibition of *Kl. apiculata* by Thiamine Derivatives and Pyrimidine Derivatives

Concentration of B_1 $\mu\text{g/tube}$	Concentration of compounds mole/tube					
	none	I 10^{-7}	II 10^{-6}	III 2.5×10^{-6}	V 2×10^{-5}	VI 8×10^{-5}
	OD (610 nm)					
0.08	0.57	0.09	0.15	0.04	0.04	0.02
10.08	0.59	0.63	0.58	0.57	0.02	0.03

c) B_1 による回復曲線 前項で B_1 による回復を認めたものについて、 B_1 添加量と増殖阻害の回復との関連について検討した。Fig. 2 に示すように II および III は I と同様 B_1 添加量の増加に応じて回復を示した。

2. *L. fermenti* におよぼす影響

a) 増殖阻害の検討 B_1 要求性乳酸菌 *L. fermenti* におよぼす影響を *Kl. apiculata* の場合と同様に検討した。ただし B_1 添加量は $0.04 \mu\text{g/tube}$ 、培養温度は 37° で行った。Fig. 3 に示すように、*Kl. apiculata* の場合とは異なり II が最も強い阻害を示し、次で I, IV, V であった。VI は高濃度で弱い阻害の傾向を示したが、*Kl. apiculata* にたいして比較的強い阻害を示した III では阻害は認められず、高濃度で増殖促進の傾向がみられた。

b) 各種ビタミン類による回復の検討 増殖阻害を示した I, II および V について、 B_1 $0.04 \mu\text{g/tube}$ 存在下、さらに B_1 10, ビタミン B_2 10, B_3 40, nicotinic acid 10, Ca-pantothenate 10, foric acid 10, biotin 0.2 および *p*-aminobenzoic acid $20 \mu\text{g/tube}$ おのおのの添加を試みた結果、 B_1 添加で I および II においては回復の傾向が認められたが、V では認められなかった (Table III)。その他のビタミン類での回復は認められなかった。

なお非常に弱い阻害の傾向にあった VI においても B_1 の回復効果は認められなかった。

c) B_1 による回復曲線 B_1 で回復を認めた II について B_1 添加量の影響を検討した。Fig. 4 に示すように II は I と同じく B_1 の増加とともに回復の傾向を示した。

Fig. 3. Inhibitory Effect of Thiamine Derivatives and Pyrimidine Derivatives on the Growth of *L. fermenti*

—○—: I, —△—: II, —□—: III,
—□—: III(B₁ O), —●—: IV,
—▲—: V, —■—: VI

Fig. 4. Recovery Effect of B₁ on the Growth Inhibition of *L. fermenti* by I and II

—●—: none,
—○—: I 2×10^{-7} mole/tube,
—○—: I 4×10^{-7} mole/tube,
—△—: II 4×10^{-8} mole/tube
—△—: II 5×10^{-8} mole/tube

TABLE III. Recovery Effect of B₁ on the Growth Inhibition of *L. fermenti* by Thiamine Derivatives and Pyrimidine Derivatives

Concentration of B ₁ μg/tube	Concentration of compounds mole/tube			
	none	I 10^{-7}	II 6×10^{-8}	V 2.5×10^{-5}
OD (610 nm)				
0.04	0.97	0	0.04	0
10.04	0.97	1.17	0.40	0

TABLE IV. Influence of Thiamine Derivatives and Pyrimidine Derivatives on the Growth of *L. arabinosus*

	Concentration of compounds mole/tube	Growth	OD (610 nm) PAL 4 μg/tube
	none	0.50	0.57
I	2×10^{-5}	0.60	—
II	5×10^{-6}	0.03	0.03
III	2×10^{-5}	0.54	—
V	5×10^{-5}	0.03	0.04
VI	10^{-4}	0.09	0.44

3. *L. arabinosus* にたいする影響 B₁ 非要求性微生物とされている *L. arabinosus* にたいする影響について検討した。

川崎らの方法⁹⁾ に準じ基礎培地に B₆ 4 μg/tube を添加して実験を行った, また B₆ 拮抗阻害を考慮してさら

9) 川崎近太郎, 岡田幸蔵, 藤田幸江, ビタミン, 30, 354 (1964).

に PAL 4 $\mu\text{g}/\text{tube}$ を添加した場合についても検討した. Table IV に示すように I および III は増殖阻害を示さず, II, V および VI は増殖を阻害した. これらのうち VI は PAL の添加でその阻害が解消される傾向にあったが, II および V は PAL を増加しても阻害を示した.

考 察

II は B_1 要求性微生物 *Kl. apiculata* および *L. fermenti* にたいして I と同様に増殖阻害を示し, これらの増殖阻害が B_6 をはじめとする各種ビタミン類では回復されず, B_1 によって回復することを認めたが, その効果は *Kl. apiculata* において, B_1 にたいする 50% 阻害比が 844 で, I の 29 と比べると約 1/30 を示し, Sakuragi の報告^{3a)} の *Kl. brevis* における alkylthiothiamine 類と比較すると II の阻害効果が最も弱いのではないかと思われる, すなわちこれらの B_1 拮抗の強さは alkylthio 基の alkyl 基と関係があり, 分子量の小さいものほど強い B_1 拮抗性を示すのではないかと思われた, しかし *L. fermenti* において II は I よりも強い阻害を示し, この考えは当てはまらなかった. この *Kl. apiculata* と *L. fermenti* にたいする B_1 拮抗性の差, および B_1 非要求性微生物 *L. arabinosus* にたいする影響のちがい等から, II の微生物にたいする作用が I と全く同じであるとは言えない. また II および V が *Kl. apiculata* および *L. fermenti* にたいして異なる影響を持つにもかかわらず, *L. arabinosus* にたいしてこれら butylthio 基を有する化合物のみが増殖阻害を示したことも微生物にたいして II が I とは異なる作用も有することを示唆している.

nor B_1 および Et B_1 が *Kl. apiculata* にたいし B_1 活性を示す⁴⁾ と知られているのにたいして III は比較的強い B_1 拮抗物質として働き, 糸状菌や動物試験の結果⁵⁾ と良く似ている. しかし *L. fermenti* にたいしては増殖阻害を示さず大量で増殖促進の傾向を示している, この酵母と乳酸菌にたいする作用のちがいについて今後の検討が必要である.

B_1 誘導体と pyrimidine 誘導体との間では, thiazole 部の結合が化合物の微生物におよぼす効果に影響を持つのではないかと考えられ, pyrimidine 誘導体の B_1 要求性微生物にたいする増殖阻害効果は B_1 誘導体よりも弱く, さらに toxopyrimidine の代表的なものである (B_1 , B_6 拮抗) IV よりも弱い, また川崎らの IV における実験結果⁹⁾ にみられるような B_1 による回復は認められず, B_6 をはじめ各種ビタミン類でも顕著な回復効果は認めていない. さらに *L. arabinosus* にたいしても増殖阻害を示すなど, これらの化合物の B_1 要求性微生物にたいする阻害作用機序が I や IV と異なることを示している. しかし PAL の添加で *L. arabinosus* の阻害が解消した VI については toxopyrimidine 様活性 (B_6 拮抗) の可能性を残しているし, IV が *L. arabinosus* にたいして増殖阻害を示す傾向にある⁹⁾ にもかかわらず B_1 , B_6 拮抗性を示すことを考えると, 他の化合物についても B_6 要求性微生物にたいする影響を検討しなければならない.

結 論

1. *Kl. apiculata* にたいする増殖阻害の強さは: I>III>II>IV>V>VI, である. II および III の増殖阻害は I と同様 B_1 で回復するが, V および VI は回復しない.
2. *L. fermenti* にたいする増殖阻害の強さは: II>I>IV>V>VI, である. III は *L. fermenti* の増殖を大量で促進している. II の増殖阻害は I と同様 B_1 で回復の傾向にあるが, V および VI は回復しない.
3. *L. arabinosus* にたいして I, III は増殖阻害を示さない. II, V および VI は増殖阻害を示す, しかし VI の阻害は PAL 添加により回復する.

謝辞 本実験に使用致しました菌種を分与下さいました発酵研究所に深謝致します.