

チアミンアナログの生物活性

持田 和男*・中村 利家*・尾添 嘉久*
宮崎 久子*・横内 孝行*・斎藤 修*

The Bioactivities of Thiamine Analogues to Some Organisms

Kazuo MOCHIDA, Toshiie NAKAMURA, Yoshihisa OZOE,
Hisako MIYAZAKI, Takayuki YOKOUCHI and Osamu SAITO

The bioactive properties of ten kinds of (2-methyl-4-amino-5-pyrimidinyl) methyl derivatives (Pm derivatives) prepared by the base-exchange reaction of immobilized or free thiaminase I were examined.

The insecticidal and sterilizing activities to housefly and the growth regulating activity to common cutworm were not found. However, the herbicidal activity of Pm-*o*-aminothiophenol to barnyard grass, the antibacterial activity of Pm-nicotinamide to *L. fermentum*, and the growth inhibitory activity of Pm-aniline, Pm-quinoline and Pm-piperidine to phytoplankton were found. Particularly, the antialgal activity was excellent and selective: Pm-aniline and Pm-quinoline were effective only to diatoms and Pm-piperidine was effective only to blue algae.

緒 言

転移酵素のうち受容基の特異性が広いものは、簡便な類縁化合物合成用触媒としての利用性に富んでいる。チアミナーゼ I は、芳香族アミン、N-複素環化合物、SH 化合物など広範な塩基を受容基とし多種の転移化合物を形成するので、(2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル)^{1)~3)}メチル誘導体 (Pm 誘導体) の合成用触媒として利用できる。著者らは先にこのチアミナーゼ I の固定化および非固定化標品を用いて10種類の Pm 誘導体を合成した。これらの Pm 誘導体は、主要な生体内化学反応に対する必須の補酵素成分であるチアミンのアナログとして、有用な生物活性を発現する可能性がある。

本研究では、これら Pm 誘導体の有用性を検索する

ための基礎資料として種々の生物活性、すなわち昆虫に対する殺虫、不妊化および蛹重増大活性、植物に対する殺草活性、細菌に対する抗菌活性ならびに藻類に対する殺藻活性について検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 試薬および供試生物

使用した10種類の Pm 誘導体 (第1図) は、既報の⁴⁾酵素法に従って合成した。その他の試薬は市販最上級品をそのまま用いた。

イエバエ (*Musca domestica* L.) は WHO 標準感受性系統で、住友化学工業⁵⁾より譲り受け累代飼育したものを^{6),7)}用いた。ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) は農水省中国試験場より譲り受け、累代飼育した1齢幼虫を用いた。

* 生物汚染化学研究室

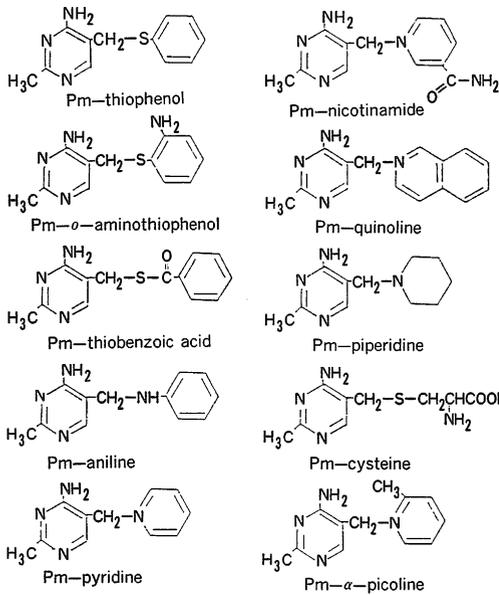


Fig. 1. The structure of thiamine analogues used

イネ (*Oryza sativa* L.) は日本晴で、島根大学農学部附属農場より、またノビエ (*Echinochloa crus-galli*) は大塚化学(株)生物科学研究所より譲り受けた種子を用い、ハイポネックス® 溶液を用いた水耕法で栽培した。

細菌類 (*Lactobacillus fermentum* IFO 3071, *Lactobacillus casei* IFO 3425, *Lactobacillus* sp. IFO 3914 および *Bacillus subtilis* IFO 3134) は勸発酵研究所より分譲されたものである。L. sp. を除く細菌類は市販チアミンアッセイ用培地で、L. sp. は *Lactobacillus* 用培地 (ペプトン0.5%, 酵母エキス 0.5%, グルコース 1.0% および Tween 80® 0.1%) で培養 (37℃) した。

藻類 (*Scenedesmus dimorphus*, *Selenastrum capricornutum*, *Cyclotella nana*, *Cymbella* sp. および *Navicula* sp.) は、島根大学農学部農芸化学工学研究室により中海の汽水から単離されたものを譲り受け、*Scenedesmus* および *Selenastrum* は BBM 培地で、*Cyclotella*, *Cymbella* および *Navicula* は須藤培地で継代培養 (2,000 lux, 20℃) したものをを用いた。

2. 各種生物活性の試験法

1) 殺虫活性

所定濃度のチアミンアナログ水溶液を、羽化後3~5日目の雌イエバエ (約30頭) の体腔内にマイクロシリンジで注入 (1μl/頭) し、24時間後の死亡虫数を計測した。

2) 不妊化活性

羽化後24時間以内のイエバエの成虫 (雄 100頭 および

雌50頭) を、それぞれケージ内で飼育した。3日後チアミンアナログ水溶液 (10mg/ml) の1μl を胸部背面に塗布した後、同一ケージ内に入れて交尾させた。薬剤投与後4日目 (羽化後7日目) に産卵用培基に入れて採卵し、24時間後の未孵化卵数を計測した。

3) 蛹重増大活性

チアミンアナログ (0.20mg/g diet) を添加した人工飼料でハスモンヨトウを飼育し、毎日所定時刻に採取した蛹化個体の重量を測定した。

4) 殺草活性

チアミンアナログ (100ppm) を添加したハイポネックス® 水溶液で8~9日間栽培したイネあるいはノビエをデシケーター (乾燥剤: シリカゲル) 中で3日間乾燥後、その重量を測定した。

5) 抗菌活性

チアミンを必須栄養素とする *L. fermentum* の場合には一定量のチアミン (1.5×10^{-8} M) を添加した培養基にチアミンアナログ (6.0×10^{-4} M) を加えて試験を行い、他の細菌類の場合にはチアミンアナログ (1.5×10^{-4} M) のみを添加した培養基で試験を行った。いずれの場合も、細菌の増殖量は37℃、24時間培養後の610nmにおける吸光度で求めた。

6) 殺藻活性

一定量 (2×10^{-4} M) のチアミンアナログあるいはその対応塩基を添加した培養基に対数増殖期の藻体を加え、25℃、4,000 lux の常時照明下で培養した。藻類の増殖量はターナー社製蛍光強度計 (M110) でクロロフィル a の蛍光強度 (励起光: 430 nm, 蛍光: 650 nm) を測定することによって求め、相対増殖度 (対照区の純増殖量に対する処理区のその割合) として示した。したがって、相対増殖度が100%を超えるものは増殖促進を、逆の場合は増殖抑制を示す。また相対増殖度が0%以下の場合には、最初に添加した藻体さえも消失したことを示している。

Table 1. Insecticidal and sterilizing effects of thiamine analogues on houseflies.

Thiamine analogue	Mortality ^a (%)	Sterility ^a (%)
Pm-aniline	10.7	29.8
Pm-nicotinamide	6.6	33.1
Pm-pyridine	10.0	23.2
Pm-quinoline	10.0	21.8
Pm-thiophenol	6.5 ^b	—
Control	13.3	23.4

a: 10 μg/fly, b: 5 μg/fly

実験結果および考察

イエバエに対する殺虫および不妊化活性(第1表)は、対照区に対するチアミンアナログ処理区の活性にほとんど差が認められず、作用性は見出せなかった。

ハスモンヨトウに対する蛹増大活性(第2表)も、雌雄いずれについても認められず、逆に一部のチアミンアナログの場合にはわずかながら蛹重低下をもたらした。チアミンアナログの処理齢期を変えてもハスモンヨトウの蛹重に著しい変化は認められず、ハスモンヨトウに対する生理作用はないと判断した。

以上の実験結果から、昆虫に対するチアミンアナログの有用な生物活性は期待できないと思われた。

イネおよびノビエに対する生長阻害(第3表)については、いくつかのチアミンアナログで若干の活性が認められた。しかし選択性を示したものは、Pm-*o*-アミノチオフェノールだけであり、それすらノビエに対し100 ppmで30%の生長阻害を示したにすぎず、10 ppmのそれは認められなかった。したがって実用性は考え難いが、異なった作用機構を示唆すると思われる現象として、イネに対するPm-アニリンおよびPm-チオフェノールの生長阻害様式の相異(写真1のAおよびB)に興味もたれた。すなわち前者ではイネ全体の褐変化が見られたのに対し、後者では顕著な根の伸長阻害が認められたが、これ以上の検討は行っていない。

細菌類に対する抗菌活性(第4表)は、*L. fermentum*

Table 2. Growth regulating effect of thiamine analogues on common cutworms.

Thiamine analogue ^a	Pupal weight ^b ($\times 10^{-1}$ g)	
	Male	Female
Pm-thiophenol	4.13 \pm 0.31	4.46 \pm 0.11
Pm-thiobenzoic acid	3.92 \pm 0.10	4.54 \pm 0.14
Pm-aniline	4.07 \pm 0.11	4.35 \pm 0.13*
Pm-nicotinamide	4.09 \pm 0.11	4.40 \pm 0.09**
Pm-pyridine	4.06 \pm 0.09	4.64 \pm 0.11
Pm-cysteine	4.08 \pm 0.11	4.49 \pm 0.10*
Pm-quinoline	4.00 \pm 0.10	4.46 \pm 0.12*
Pm- α -picoline	4.00 \pm 0.16	4.45 \pm 0.16
Pm-piperidine	3.94 \pm 0.10	4.75 \pm 0.14
Control	4.03 \pm 0.10	4.88 \pm 0.14

a : 0.2 mg/g diet

b : Mean \pm S. E.

* : Significant difference at P<0.05

** : Significant difference at P<0.01

に対するPm-ニコチンアミドで顕著に認められ、その50%増殖阻害濃度は 2.3×10^{-5} Mであった。この増殖阻害効果は、その構成々分であるニコチンアミド(6.0×10^{-4} M)および2-メチル-4-アミノ-5-ヒドロキシメチルピリミジン(Pm-OH) (6.0×10^{-4} M)では認められなかったため、Pm-ニコチンアミドとして活性を発現しているものと考えられた。

藻類の増殖をかなり強く阻害するチアミンアナログは

Table 3. Growth inhibitory effect of thiamine analogues on rice and barnyardgrass.

Thiamine analogue ^a	Relative growth ^b (%)	
	Rice	Barnyardgrass
Pm-thiophenol	46.9 \pm 0.3***	83.5 \pm 4.3*
Pm- <i>o</i> -aminothiophenol	111.0 \pm 5.5	67.0 \pm 7.7**
Pm-thiobenzoic acid	85.6 \pm 4.1	—
Pm-aniline	65.2 \pm 0.9***	—
Pm-nicotinamide	101.8 \pm 1.4	121.2 \pm 13.4*
Pm-pyridine	110.3 \pm 3.6**	102.4 \pm 5.4
Pm-cysteine	93.6 \pm 5.1*	88.3 \pm 7.3
Pm-quinoline	102.9 \pm 3.2	100.0 \pm 6.4
Pm- α -picoline	114.7 \pm 7.5	119.6 \pm 11.3*
Pm-piperidine	102.1 \pm 4.6	89.0 \pm 3.0

a : 100 ppm

b : Mean \pm S. E.

* : Significant difference at P<0.05

** : Significant difference at P<0.01

*** : Significant difference at P<0.001

Table 4. Effect of thiamine analogues on the growth of bacteria.

Thiamine analogue	Relative growth (%)			
	<i>L. fermentum</i> IFO 3071 ^a	<i>L. casei</i> IFO 3425 ^b	<i>L. sp.</i> IFO 3914 ^b	<i>B. subtilis</i> IFO3134 ^b
Pm-thiophenol	109	97	103	95
Pm- <i>o</i> -aminothiophenol	100	91	120	103
Pm-thiobenzoic acid	111	99	103	100
Pm-anilline	106	80	115	90
Pm-nicotinamide	0	45	96	97
Pm-pyridine	107	67	116	94
Pm-cysteine	106	96	102	105
Pm-quinoline	105	41	100	105
Pm- α -picoline	107	65	109	104
Pm-piperidine	106	61	90	104

a : Thiamine (1.5×10^{-8} M) and its analogue (6.0×10^{-4} M) were added.

b : Thiamine analogue (1.5×10^{-4} M) alone was added.

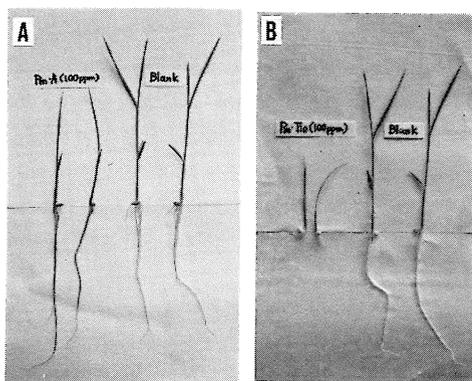


Photo. 1. Growth inhibitory effects of Pm-aniline (A) and Pm-thiophenol (B) on rice.

いくつか見出された (第5表)。しかしそれらの塩基にも活性を示すものがあり、対応する塩基より増殖阻害活性の強いチアミンアナログは、Pm-アニリン、Pm-キノリンおよび Pm-ピペリジンの3種のみであった。なお、Pm-OH (2×10^{-4} M) は、*Navicula* sp. に対する64%の増殖阻害を除いて、他のいずれの藻類に対しても増殖阻害を示さなかった。したがって、これら3種のチアミンアナログの阻害効果は、アナログ固有のものと考えてよい。3種のチアミンアナログおよびそれらの対応塩基の各藻類に対する50%増殖阻害濃度 (IC₅₀) を第6表に示した。これらチアミンアナログの阻害様式には特徴がある。Pm-アニリンおよび Pm-キノリンは珪藻類 (*Cyclotella nana*, *Cymbella* sp. および *Navicula* sp.) に対して、他方 Pm-ピペリジンは緑藻類 (*Scenedesmus dimorphus* および *Selenastrum capricornutum*) に対

してのみ対応する塩基より強い増殖阻害効果を示す。この活性差は *Navicula* sp. における Pm-キノリン およびキノリンの系で観察された120倍が最大であった。藻類種間で阻害性が極端に異なるというこの特徴が、チアミンアナログの構造や藻類の生理的機能とどのように関連しているか興味のあるところである。

以上酵素法によって合成した10種のチアミンアナログの、数種の生物に対する種々の生物活性を測定し、いくつか興味ある現象を見出した。今回はそれらの活性発現の機構論的な検討は行わなかったが、より生物活性の強いチアミンアナログの検索と共に、今後の研究課題である。特に殺藻活性については、検討した生物活性の中では最も強く、特異な選択性を有する点で、最も興味深いものである。

謝辞 実験材料を提供して戴いた本文中記載の各研究機関並びに実験に協力した専攻生藤田啓二君に感謝の意を表する。

要 約

固定化および非固定化チアミナーゼ I の塩基交換反応によって合成した10種類の (2-メチル-4-アミノ-5-ピリミジニル) メチル誘導体 (Pm 誘導体) の生物活性について検討した。

イエバエに対する殺虫および不妊化活性並びにハスモンヨトウに対する生育阻害活性は見出せなかった。しかし、ノビエに対する Pm-*o*-アミノチオフェノールの殺草活性、*L. fermentum* に対する Pm-ニコチンアミド

Table 5. Effect of thiamine analogues and their bases on the growth of algae.

Additive ^a	Relative growth (%)				
	Chlorophyceae		Bacillariophyceae		
	<i>S. d.</i> ^b	<i>S. c.</i> ^c	<i>C. n.</i> ^d	<i>C. sp.</i> ^e	<i>N. sp.</i> ^f
Pm-thiophenol	27	22	-20	-2	-1
Thiophenol	0	0	-28	-13	-1
Pm-aniline	194	89	19	-2	9
Aniline	91	80	110	96	109
Pm-nicotinamide	106	86	80	98	48
Nicotinamide	420	321	69	88	109
Pm-pyridine	121	94	107	108	97
Pyridine	94	122	106	99	114
Pm-cysteine	107	103	143	104	86
Cysteine	130	168	0	46	-9
Pm-quinoline	100	100	0	0	0
Quinoline	108	110	96	99	95
Pm- α -picoline	100	82	114	100	61
α -Picoline	73	123	105	104	104
Pm-piperidine	25	35	47	104	53
Piperidine	107	139	-5	51	32

a : 2×10^{-4} M.b : *Scenedesmus dimorphus*c : *Selenastrum capricornutum*d : *Cyclotella nana*e : *Cymbella* sp.f : *Navicula* sp.Table 6. IC₅₀ values of thiamine analogues and their bases for the growth of algae.

Additive	IC ₅₀ (μ M)				
	Chlorophyceae		Bacillariophyceae		
	<i>S. d.</i> ^a	<i>S. c.</i> ^b	<i>C. n.</i> ^c	<i>C. sp.</i> ^d	<i>N. sp.</i> ^e
Pm-aniline	-f	-f	25	75	10
Aniline	-g	1200	1000	600	350
Pm-quinoline	-f	-f	10	8.7	3.7
Quinoline	1350<	840	500	630	450
Pm-piperidine	160	130	350	-g	280
Piperidine	-g	-f	38	200	79

a : *Scenedesmus dimorphus*b : *Selenastrum capricornutum*c : *Cyclotella nana*d : *Cymbella* sp.e : *Navicula* sp.

f : Growth stimulation

g : Not effective

の抗菌活性および植物プランクトンに対する Pm-アニリン、Pm-キノリンおよび Pm-ピペリジンの増殖阻害活性を見出した。特に殺藻活性はかなり強力でかつ選択的であった。すなわち、Pm-アニリンおよび Pm-キノリンは珪藻類に対してのみ、他方 Pm-ピペリジンは緑藻類に対してのみ有効であった。

引用文献

1. A. FUJITA : *Adv. Enzymol.*, **15**, 389-421 (1954).
2. K. MURATA : *Review of Japanese Literature on Beriberi and Thiamine*, ed. by N. SHIMAZONO and E. KATSURA, Igaku Shoin, Tokyo (1965) pp. 220.
3. G. E. LIENHARD : *Biochemistry*, **9**, 3011-3020 (1970).

4. 持田和男・中村利家・藤田啓二：島根大農研報，**18**，188-192 (1984).
5. 中村利家・持田和男・村松晶子：島根大農研報，**17**，160-163 (1983).
6. 岡田斉夫：農薬，**22**，46-49 (1975).
7. 岡田斉夫：中国農試報，**E12**，1-66 (1977).
8. 長澤純夫・近藤雅彦・糟谷真宏：島根大農研報，**15**，101-108 (1981).
9. 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法，養賢堂，東京 (1977) p.436.
10. 田宮 博・渡辺篤編：藻類実験法，南江堂，東京 (1980) p.96.