

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05488

研究課題名(和文)食品に含まれる脱アミド型ビタミンB12化合物の精密分析と生体に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)Precise analysis of deamidated vitamin B12 compounds in foods and their physiological effects on mammalian cells

研究代表者

渡辺 文雄 (Watanabe, Fumio)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30210941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が日常的に摂取しているエビなどの甲殻類とその加工食品に多種類の脱アミド型ビタミンB12が多量に含まれていることを世界で初めて見出した。そこで、種々の食品に含まれる脱アミド型ビタミンB12を質量分析により精密に分析した。我々が日常的に摂取しているエビなどの甲殻類とその加工食品に多種類の脱アミド型ビタミンB12が多量に含まれていたが、我が国のビタミンB12の供給源であるその他の魚介類製品や牛レバーなどの動物性食品には微量にしか存在しなかった。脱アミド型ビタミンB12は、腸管吸収され難いためヒトの細胞内でビタミンB12の代謝系を阻害する恐れは少ないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が日常的に摂取しているエビや他の甲殻類及びその加工品に含まれるビタミンB12とは構造が異なる脱アミド型ビタミンB12の存在を世界で初めて明らかにした。この発見は学術的に非常に意義深い。また、本研究により脱アミド型ビタミンB12は甲殻類とその加工品以外の動物性食品にはほんの微量しか存在しないことが判明した。この研究結果から、バランスの取れた食生活を送っていれば、ビタミンB12欠乏による神経障害の発症リスクは低いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Crustaceans such as shrimp, which we commonly consume, and their processed food products were found to contain high levels of various types of deamidated vitamin B12. However, other seafood products and animal foods, such as beef liver, which are sources of vitamin B12 in Japan, contained only trace amounts. It has been suggested that deamidated vitamin B12 is less likely to inhibit the vitamin B12 metabolic system in human cells due to its poor intestinal absorption.

研究分野：食品科学

キーワード：ビタミンB12 脱アミド化ビタミンB12 牛レバー 魚卵製品 魚醤油 魚発酵食品 シュードビタミンB12 ビタミンB12カルボン酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B12 (B12) は、深紅の水溶性ビタミンであり、我が国の成人男女の食事摂取基準では推奨量 2.4 μg /日と極めて微量で有効である。B12 は特定の細菌や古細菌でのみ生合成され、自然界の食物連鎖などにより、動物組織へと蓄積されるため、動物性食品が B12 の良い供給源となっている ()。これまで、我が国の主要な B12 供給源である魚介類製品などに含まれる B12 化合物を超高速度液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) で精密に分析した結果、細菌が生産した B12 構造類似体 (B12 の塩基がアデニンに置換したシュード B12) が食品に多量に含まれていることを明らかにし、シュード B12 の生体に及ぼす影響を解明した ()。この研究過程で一部の加工食品には、天然に存在しない質量を有する B12 化合物が含まれていることを見いだした ()。最近の研究において、甲殻類のエビなどに多種類の脱アミド型 B12 が多量に含まれていることを発見した ()。しかし、B12 の供給源となる食品における脱アミド型 B12 の存在分布や含有量は不明である。日常的に食品からこれらヒトで生理的に不活性な B12 化合物を摂取することが、B12 の細胞内への取り込みを妨げ、B12 の代謝系を阻害することになれば、加齢に伴う体内 B12 量の減少に拍車をかけ、今後、我が国の高齢者において B12 欠乏性神経障害の発症が深刻な社会問題となることが予測される。

2. 研究の目的

我々が日常的に摂取している甲殻類のエビとその加工品に多種類の脱アミド型 B12 が多量に含まれていることを LC/MS-MS を用いて世界で初めて報告した () (図 1)。脱アミド型 B12 とは、B12 のコリン環の *b*, *d*, *e* プロピオンアミド側鎖が脱アミド化されて、B12 モノカルボン酸や B12 ジカルボン酸となり、生理的に不活性となった B12 化合物のことである。しかし、我が国の B12 の主要な供給源である魚介類や畜肉などの動物性食品における脱アミド型 B12 の存在分布は不明である。本研究では、LC-MS/MS を駆使して食品中に含まれる脱アミド型 B12 の分布と含有量を明らかにすることを目的とした。

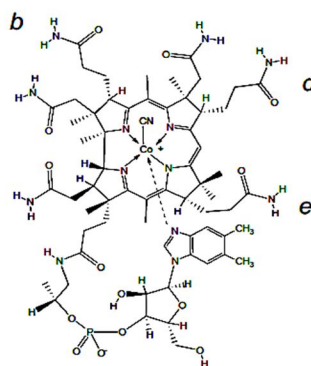


図 1 ビタミン B12 の構造
b, *d*, *e* はプロピオンアミド側鎖

3. 研究の方法

(1) 脱アミド化 B12 (B12-モノカルボン酸および-ジカルボン酸) の調製。

Koseki らの方法 () に準じて脱アミド化 B12 (B12-*b*-、*-d*-、*-e*-モノカルボン酸および B12-*bd*-、*-be*-、*-de*-ジカルボン酸) を調製し、核磁気共鳴分析により同定した。

(2) B12 の微生物学的定量法

各分析試料 (2 g) を正確に秤量し、乳鉢と乳棒を用いてホモジナイズした。このホモジネートに蒸留水 40 mL と 0.05% (w/v) KCN を含む 0.57 mol/L 酢酸緩衝液 (pH4.5) 10 mL を加えて暗所で 30 分間煮沸することで、試料中に存在する B12 化合物を化学的に安定なシアノコバラミン (CN-B12) に変換・抽出した。抽出液中の B12 は、*Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830 を用いた微生物学的方法で測定した。本定量菌はヌクレオチドやデオキシリボヌクレオチド (アルカリ耐性因子) にも B12 活性を示すため、正確な B12 含量は全 B12 量からアルカリ耐性因子量を差し引くことによって算出した。各食品試料に既知量の標準 CN-B12 を添加して B12 の回収率を求めた結果、105% となった。

(3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた B12 と各種 B12 カルボン酸の定量。

上述したように試料から B12 化合物を KCN ボイル法で抽出後、B12 イムノアフィニティーカラム [EASI-EXTRACT B12 immunoaffinity column (P80; 8.0 \times 60mm, R-Biopharm, Darmstadt, Germany)] を用いて精製した。精製した B12 化合物を 80 μL の Milli-Q 水に溶解し、メンブランフィルターでろ過した後、HPLC 装置 (SPD-10AV 紫外線可視検出器, SCL-10A VP システムコントローラー, DGU-20A3 脱気装置, LC-10Ai 液体クロマトグラフ, CTO-20A カラムオープン) を用いて試料 35 μL を分析した。1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液で平衡化した逆相 HPLC カラム (Wakosil-II 5C18RS, 4.6 \times 150 mm; 富士フイルム和光純薬 (株), 大阪, 日本) を用いて、流速 1.0 mL/min, カラム温度 40 $^{\circ}\text{C}$ で分析し、B12 化合物は同溶液でイソクラティックに溶出し、361 nm の吸光度で測定した。B12, B12-*d*-モノカルボン酸, B12-*e*-モノカルボン酸, B12-*bd*-ジカルボン酸, B12-*be*-ジカルボン酸, B12-*de*-ジカルボン酸の各標品を同じ条件で分析した結果、それぞれの標品の保持時間は 10.2 分, 13.6 分, 16.2 分, 19.5 分, 24.7 分, 26.0 分, 33.1 分であった。

(4) 超高速度液体クロマトグラフ-エレクトロスプレーイオン化質量分析 (LC/ESI-MS/MS)。

LC/ESI-MS/MS 分析は ACQUITY UPLC H-Class XevoG2-QToF 装置 (Waters Corp.) を用いて行なった。上述の B12 イムノアフィニティーカラムで精製した各試料の一部 (5 μ L) を流速 0.2 mL/分、カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 1% (v/v) 酢酸を含む 20% (v/v) メタノール溶液で平衡化された InertSustain C18 カラム (3 μ m, 2.1 \times 100mm; GL サイエンス, 東京, 日本) に注入した。B12 化合物は, 同じ溶液でイソクラティックに溶出した。B12 (m/z 678.29), B12-*b*-, -*d*-, 及び -*e*-モノカルボン酸 (m/z 678.78), B12-*be*-, -*bd*-, 及び -*de*-ジカルボン酸 (m/z 679.27) の同定は, 観測された分子イオンの質量 [$M + 2H$] $^{2+}$ と保持時間を比較することで同定した。B12, B12-*b*-モノカルボン酸, B12-*d*-モノカルボン酸, B12-*e*-モノカルボン酸, B12-*be*-ジカルボン酸, B12-*bd*-ジカルボン酸, B12-*de*-カルボン酸の保持時間は 6.2 分, 8.3 分, 10.2 分, 12.7 分, 15.6 分, 16.7 分および 21.4 分であった。B12 イムノアフィニティーカラムからの B12 および B12-モノ-および-ジカルボン酸の回収率は 92-96% であった。

4. 研究成果

(1) 多種類の食用甲殻類の内臓可食部に含まれる B12 化合物の同定

先行研究で小型のエビの内臓可食部に脱アミド型 B12 (B12 モノ-及び-ジカルボン酸) が含まれていたことから (), 大型のエビを含めた食用甲殻類の内臓可食部に含まれる B12 化合物について検討した。ロブスター, ザリガニ, カニ, 大型エビの内臓可食部には, 高い B12 含量 (7.2-118.6 μ g/100g) を示した。これら内臓抽出物から B12 イムノアフィニティーカラムを用いて B12 化合物を精製後, LC/ESI-MS/MS 分析で B12 モノ-及び-ジカルボン酸の存在の有無を検討した。その結果, これら甲殻類の内臓可食部においても B12-*b*-, -*d*-, -*e*-モノカルボン酸と B12-*be*-ジカルボン酸が多量に含有されていることが明らかとなった ()。

(2) 市販魚醤油製品に含まれる B12 化合物の同定

先行研究において未同定の B12 化合物が魚醤油製品に含まれていることが報告されている ()。そこで, LC/ESI-MS/MS 分析により未同定の B12 化合物の解析を試みた。市販 12 種類の魚醤油製品の B12 含量は 100g あたり 0.1~1.7 μ g であった。B12-*d*-モノカルボン酸は, B12 総量の約 4~38% 含まれ, B12-*e*-モノカルボン酸は約 1~9% であった。しかし, B12-*b*-モノカルボン酸とシュード B12 は, 検出されることはまれであった。また, B12-*b*-, -*d*-, -*e*-モノカルボン酸以外の未同定の B12 モノカルボン酸が約 2-16% 検出された ()。以上の結果から, これらの B12 モノカルボン酸は, 魚醤油製造の材料 (魚) に混在した小エビなどに由来する可能性が示唆された。

(3) 魚卵及び魚卵加工品に含まれる B12 化合物の同定

魚卵 (または卵巣) は栄養価の高い食品であり, B12 をはじめとするビタミン類が豊富に含まれている。実際に, サケ卵巣製品 (スジコ), イクラ製品 (イクラ), 乾燥カラスミ製品 (ポツルガ) およびシロチョウザメ卵巣製品 (キャビア) は, 高い B12 含量 (湿重量で約 15 μ g/100g 以上) を示した。LC/ESI-MS/MS 分析の結果, これら魚卵加工品に含まれる主要なコリノイド化合物は B12 であり, シュード B12 や B12 カルボン酸は検出されなかった ()。この結果は, 市販されている魚卵製品が B12 の重要な供給源であることを示唆している。

(4) 水産発酵食品に含まれる B12 化合物の同定

HPLC や LC/ESI-MS/MS 分析を用いて, 日本の伝統的な水産発酵食品 (へしこ, くさや, イカ塩辛, 鮓ずし) に含まれる B12 化合物を同定した。これらの水産発酵食品の B12 含量は約 4~13 μ g/100g であり, すべての製品において B12 が主要なコリノイドであった。しかし, くさやには, ヒトにとって生理的に不活性な 2-メチルアデニルコバミド (ファクター-A) や 2-メチルメルカプトアデニルコバミド (ファクター-S) が約 8% 含まれていたが B12 カルボン酸は検出されなかった ()。

(5) 牛, 豚, 鶏のレバーに含まれる B12 化合物の同定

家畜 (牛, 豚, 鶏) の肝臓 (レバー) は B12 の良い供給源であるが, これらレバーにシュード B12 のような不活性型コリノイドが含まれているかどうかは不明である。そこで, HPLC と LC-MS/MS 分析を用いて, 牛, 豚, 鶏のレバー中の B12 化合物の特徴を明らかにした。食品として市販されているレバーから B12 化合物を精製した後, HPLC 分析した。その結果, すべてのレバーで B12 が主要な (約 90%) コリノイドであったが, コリノイド化合物に由来するマイナーなピークが複数検出された。LC-MS/MS 分析から, レバーには 5-ヒドロキシベンズイミダゾリルコバミド, ファクター-A, ファクター-S, シュード B12, 多種類の B12 モノカルボン酸など様々な不活性型コリノイド化合物が 10% 程度含まれていた。本研究により, 食品として流通している家畜のレバーにヒトで生理的に不活性な様々なコリノイド化合物が含まれていることを初めて明らかにした ()。

(6) まとめ

我が国における B12 の主要な供給源である魚介類及びその加工品などにおける脱アミド型 B12 (B12 カルボン酸) の存在分布や存在割合を LC-MS/MS を用いて検討した。その結果, エビやカニなどの食用甲殻類 (特に内臓可食部) には特異的に多種類の B12 モノ-及び-ジカルボン酸が多量に含まれていた。魚加工品である魚醤油の一部にも存在割合は低いものの未同定を含む多種類の B12 カルボン酸が検出された。しかし, ほとんどの魚肉や魚卵及びその加工品や水産発酵食品には, 脱アミド型 B12 は検出されなかった。B12 を高濃度に含有する家畜 (牛, 豚, 鶏) のレバーも B12 の良い供給源となり得るが, 含有される B12 量の 10% 程度が様々な塩基を有する不活性型コバミドと脱アミド型 B12 であった。腸管粘膜のバリア機能が正常であれば, 内因子を介した B12 の腸管吸収機構により, これらの不活性型 B12 化合物や脱アミド型 B12 は吸収される

可能性は低いですが、加齢やストレスなどにより腸管粘膜のバリア機能が破綻すると血流へ移行する可能性が考えられる。

引用文献

- F. Watanabe, T. Bito Vitamin B12 sources and microbial interaction. *Experimental Biology and Medicine*, 243,148-158 (2018)
- N. Okamoto, F. Nagao, Y. Umebayashi, T. Bito, P. Prangthip, F. Watanabe Pseudovitamin B₁₂ and factor S are the predominant corrinoid compounds in edible cricket products. *Food Chemistry*, 347,129048 (2021)
- T. Bito, M. Bito, T. Hirooka, N. Okamoto, N. Harada, R. Yamaji, Y. Nakano, H. Inui, F. Watanabe Biological activity of pseudovitamin B12 on cobalamin-dependent methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthase in mammalian cultured COS-7 cells. *Molecules*, 25, 3268 (2020)
- F. Teng, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, F. Watanabe Vitamin B12[*c*-lactone], a biologically inactive corrinoid compound, occurs in cultured and dried lion's mane mushroom (*Hericium erinaceus*) fruiting bodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1726-1732 (2014)
- N. Okamoto, N. Hamaguchi, Y. Umebayashi, S. Takenaka, T. Bito, F. Watanabe Determination and characterization of vitamin B12 in the muscles and head innards of edible shrimp, *Fisheries Science*, 86, 395-406 (2020)
- K. Koseki, N. Okamoto, Y. Ito, T. Bito, A. Ishihara, Y. Umebayashi, F. Watanabe Vitamin B₁₂ carboxylic acid characterization in the viscera edible portions of lobster, crayfish, crab, and shrimp. *ACS Food Science & Technology*, 1, 1523-1528 (2021)
- S. Takenaka, T. Enomoto, S. Tsuyama, F. Watanabe TLC analysis of corrinoid compounds in fish sauce. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 26, 2703-2707 (2003)
- T. Yamanaka, K. Katsuura, K. Koseki, T. Bito, P. Prangthip, Y. Umebayashi, F. Watanabe Characterization of vitamin B₁₂ compounds from commercially available fish sauce products. *ACS Food Science & Technology*, 3, 1196-1202 (2023)
- T. Yamanaka, M. Namura, K. Koseki, T. Bito, Y. Umebayashi, F. Watanabe Characterization of vitamin B₁₂ compounds from commercially available fish roe products. *Fisheries Science*, 88, 815-820 (2022)
- T. Yamanaka, C. Ishikura, K. Koseki, T. Bito, Y. Umebayashi, F. Watanabe Characterization of vitamin B₁₂ compounds from traditional fermented Japanese seafoods. *Fisheries Science*, in press.
- K. Koseki, M. Namura, T. Bito, Y. Umebayashi, F. Watanabe Characterization of vitamin B₁₂ compounds in commercially available livestock livers used as foods. *ACS Food Science & Technology*, 2, 1364-1370 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kyohei Koseki, Mika Namura, Tomochiro Bito, Yukihiro Umebayashi, Fumio Watanabe	4. 巻 2
2. 論文標題 Characterization of vitamin B12 compounds in commercially available livestock livers used as foods	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 1364-1370
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsfoodscitech.2c00172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamami Yamanaka, Mika Namura, Kyohei Koseki, Tomohiro Bito, Yukihiro Umebayashi, Fumio Watanabe	4. 巻 88
2. 論文標題 Characterization of vitamin B12 compounds from commercially available fish roe products	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 815-820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-022-01636-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoi Yamamoto, Mahiro Seki, Kyohei Koseki, Yukinori Yabuta, Katsuhiko Shimizu, Jiro Arima, Fumio Watanabe, Tomohiro Bito	4. 巻 103
2. 論文標題 Production and characterization of cyanocobalamin-enriched tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) fruits grown using hydroponics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Science of Food and Agriculture	6. 最初と最後の頁 3685-3690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jsfa.12297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kyohei Koseki, Naho Okamoto, Yui Ito, Tomohiro Bito, Atsushi Ishihara, Yukihiro Umebayashi, Fumio Watanabe	4. 巻 1
2. 論文標題 Vitamin B12 carboxylic acid characterization in the viscera edible portions of lobster, crayfish, crab, and shrimp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 1527-1528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsfoodscitech.1c00238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamami Yamanaka, Kiho Katsuura, Kyohei Koseki, Tomohiro Bito, Pattaneeya Prangthip, Yukihiro Umebayashi, Fumio Watanabe	4. 巻 3
2. 論文標題 Characterization of vitamin B12 compounds from commercially available fish sauce products	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 1196-1202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsfoodscitech.3c00128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kyohei Koseki, Fei Teng, Tomohiro Bito, Fumio Watanabe	4. 巻 3
2. 論文標題 Traditional Asian plant-based fermented foods as vitamin B12 sources: a mini-review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JSFA Reports	6. 最初と最後の頁 294-298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsf2.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山中珠美, 名村美香, 小関喬平, 美藤友博, 渡邊文雄
2. 発表標題 魚卵に含まれるB12化合物の特徴
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 小関喬平, 名村美香, 美藤友博, 渡邊文雄
2. 発表標題 鶏・牛・豚の肝臓に含まれるビタミンB12化合物の分子種の特定
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 山本珠美, 石倉千綾, 小関喬平, 美藤友博, 渡邊文雄
2. 発表標題 魚発酵食品に含まれるビタミンB12の特徴
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 小関喬平, 美藤友博, 渡邊文雄
2. 発表標題 植物由来の発酵食品に含まれるビタミンB12化合物の特徴
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度中四国支部大会第63回講演会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 小関喬平, 名村美香, 美藤友博, 渡邊文雄
2. 発表標題 鶏・牛・豚の肝臓に含まれるビタミンB12化合物の分子種の特定
3. 学会等名 日本ビタミン学会第74回大会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Kyohei Koseki, Tomohiro Bito, Fumio Watanabe	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 234
3. 書名 Advances in Health and Disease	

1. 著者名 F. Watanabe, T. Bito, K. Koseki	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 504
3. 書名 Vitamins and Hormones	

1. 著者名 T. Bito and F. Watanabe	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 650
3. 書名 Sustainable Global Resources of Seaweeds Volume 2	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------