

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：16401  
 研究種目：挑戦的萌芽  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23650483  
 研究課題名（和文） 食品中全ビタミンB6化合物と貯蔵型B6の新酵素-HPLC法による解析  
 研究課題名（英文） Analysis of all forms of vitamin B6 contents in foods by new enzyme-HPLC method  
 研究代表者  
 八木 年晴（YAGI TOSHIHARU）  
 高知大学・教育研究部自然科学系・教授  
 研究者番号：90110759

研究成果の概要（和文）：6種類のビタミンB6化合物と貯蔵型ビタミンB6の全てを超高感度で定量できる分析法（新酵素-HPLC法）で食品中のこれらの含有量を解析した。初めに分析試料の処理法を確立した。そして代表的な動物性食品と植物性食品数種を分析した。次いで寿司ネタとして用いられる各種刺身（魚肉等）と大豆発酵食品中のB6含有量を明らかにした。さらに、日本人母乳中の含有量を分析した。

研究成果の概要（英文）：Contents of six forms and a storage form of vitamin B6 in foods were determined by the highly sensitive method (new enzyme-HPLC method). The conditions for preparation of analytical samples of foods were firstly developed. The contents in several animal and plant foods were determined. Then, some sashimi used for sushi toppings, fermented soy bean foods, and Japanese women's milk were analyzed.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：応用生物化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ビタミンB6, 食品, 母乳, 味噌, 寿司ネタ, 刺身, 糖尿病合併症, 食品成分表

## 1. 研究開始当初の背景

ビタミンB6の発見から約80年となる現在に至るまで、食品中に含まれる6種類全てのビタミンB6化合物とその貯蔵型の個別分析は不可能であった。すなわち今までHPLC法を含む各種の方法が開発されたが、いずれも食品の分析に適用できないため、現在でも食品中のビタミンB6は、60年以上前に開発された微生物学的方法で、総量としてしか分析できない。しかし、天然に存在するビタミンB6は各々が特異的な生理機能（抗糖尿病合併症機能等）を有することが明らかとなってきたため、食品中に含まれるこれらの化合物の全てを個別定量することが強く望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、5種類の酵素処理とHPLCを組み合わせた革新的な方法（新酵素HPLC法）で食品中の6種類全てのビタミンB6化合物とその貯蔵型の個別分析を目的とした。

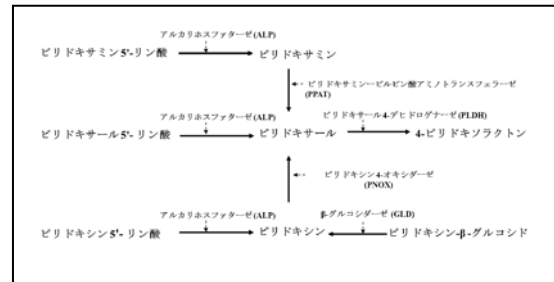
## 3. 研究の方法

新酵素-HPLC法は、6種類のビタミンB6化合物とPNGを個々に特異的に超高蛍光性化合物4-ピリドキソラクトン(4-PLA)に転換させ、これをHPLCで測定するのが原理である。ピリドキサル(PL)は1種類の酵素で、ピリドキサミン(PM)とピリドキシン(PN)は2種類の酵素の組み合わせで4-PLAに変えられる。3種類のリン酸型ビタミンB6化合物はアルカリホスファターゼにより、遊離型に変えた後、同様に4-PLAに転換し定量する。PNGはグルコナーゼにより遊離型に変え同様に測定

する。生成した 4-PLA は個々に HPLC で定量する。この原理に従い、個々の食品について高圧塩酸処理をしないで、食品中のビタミン B6 化合物の含有量を新酵素-HPLC 法で分析できるように食品の処理方法を確立した。ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) は食品中のタンパク質とシッフ塩基を形成して存在しているものが大半であると思われるので、食品は希塩酸で短時間に加熱し、遊離させた。また、食品中に含まれるタンパク質その他の高分子化合物を除去するために TCA 処理をした。また、食品ごとに含有量は異なるので、原材料を用いる量についても検討した。設定できた標準の処理条件は次のようである。1 g の食品 (可食部) に 10 ml の 0.1N の塩酸を添加し、ポリトロンで十分にホモゲナイズする。このホモジネートを 100°C 30 分間加熱し、PLP を遊離させる。冷却した後 1% (終濃度) の TCA を添加し、よく混和し、再度 100°C で 5 分間加熱処理をおこなう。この酸性試料液を遠心分離し、タンパク質を除去した上澄を得る。これを少量の緩衝液と NaOH で中和し、分析試料とする。食品によっては TCA 以外の除タンパク質試薬を用いる必要があるかもしれないが、過塩素酸は新酵素-HPLC 法で使用する酵素を阻害することがわかっているので、用いることはできなかった。また、全ての食品について内部標準法による収率を測定する必要があるので、ホモジネートにその中に含有される量に近い量の標準ビタミン B6 化合物を添加した試料を別途調整した。この分析値と標準試料無添加の分析値を用いて収率を求める。次いで、食品中のリン酸型ビタミン B6 を遊離型に変えるための条件を設定した。大腸菌由来の His タグ付きアルカリホスファターゼをクローン化し大量発現株を作成し、容易に本酵素を大量に精製できるようにした。本酵素を用いてリン酸エステル型ビタミン B6 を遊離型に変換させた。幸い、新酵素-HPLC 法の反応 pH とアルカリホスファターゼの最適 pH は共通するから、この反応はワンチューブでおこなうことができた。食品中にリン酸塩等のアルカリホスファターゼの反応を阻害する化合物が含まれており、さらにその含有量や阻害剤の種類は食品毎に異なるので、アルカリホスファターゼの量は新酵素-HPLC 法で用いるその他の酵素量よりもかなり多くする必要があった。次のように標準条件を設定できた。大腸菌由来の His タグ付きアルカリホスファターゼを 10 mU 使用し、2 時間の反応で PLP を PL に転換し、ピリドキサル 4-デヒドロゲナーゼ (PLDH) と NAD を同じ反応チューブに添加し、生成した PL を 4-PLA に変える。この反応液を 100  $\mu$ l HPLC にかける。この条件で、もともと存在していた PL が加算されて定量されるので、この反応で得られた値から PL を求

めた値を減ずることで PLP の含有量が求まる。PMP と PNP を定量する時は PLDH に加えて、各々、ピリドキサミン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ (PPAT) とピリドキシンオキシダーゼ (PNOX) を添加する。

貯蔵型ビタミン B6 であるピリドキシン  $\beta$ -グルコシド (PNG) を市販のアーモンド由来の  $\beta$ -グルコシダーゼで PN に変え、新酵素-HPLC 法で定量する条件をきめた。新酵素 HPLC 法の原理を以下に示した。



新酵素 HPLC 法の測定原理

すべての化合物を定量するために、7 種類の反応液を用いる。ここでは PL と PLP の測定時の反応液と条件を示した。

ピリドキサル (反応 1)	
250 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 $\mu$ L	
1 U/mL PLDH, 1 $\mu$ L	
100 mM NAD <sup>+</sup> , 2 $\mu$ L	
試料, 5 $\mu$ L	
水, 332 $\mu$ L	
↓	380 $\mu$ L
30°C, 1 h	
↓ ← 1.1 M HCl, 20 $\mu$ L	
ろ過	
↓	
HPLC (100 $\mu$ L)	

ピリドキサル5'-リン酸 (反応 4)	
250 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 $\mu$ L	
5 mM MgCl <sub>2</sub> , 40 $\mu$ L	
1.7 U/mL ALP, 6 $\mu$ L	
試料, 5 $\mu$ L	
水, 286 $\mu$ L	
↓	377 $\mu$ L
30°C, 2 h	
↓ ← 1 U/mL PLDH, 1 $\mu$ L	
↓ ← 100 mM NAD <sup>+</sup> , 2 $\mu$ L	
30°C, 1 h	
↓ ← 1.1 M HCl, 20 $\mu$ L	
ろ過	
↓	
HPLC (100 $\mu$ L)	



表5. 母乳中のリン酸型 B6 含量

Sample No.	Height (cm)	Weight (kg)	PLP (μmol/L) recovery (%)	PMP (μmol/L) recovery (%)	PNP (μmol/L) recovery (%)	PNG (μmol/L) recovery (%)			
1	163.5	50.0	0.03 ± 0.01 89.6 ± 2.1	ND	83.1 ± 2.0 0.05 ± 0.00 73.5 ± 1.5	ND	85.0 ± 9.2		
2	164.0	54.0	0.20 ± 0.01 95.6 ± 3.0 0.19 ± 0.03 90.0 ± 4.0	ND	101.3 ± 8.4	ND	98.5 ± 3.4		
3	162.0	53.0	0.20 ± 0.01 102.6 ± 9.8	ND	107.6 ± 2.0 0.11 ± 0.00 75.7 ± 1.1	ND	95.2 ± 0.1		
4	155.0	63.0	0.23 ± 0.02 71.1 ± 4.3	ND	81.5 ± 5.3	ND	71.8 ± 4.7	ND	89.6 ± 3.6
5	146.0	43.0	0.08 ± 0.04 93.0 ± 3.1 0.03 ± 0.00 88.6 ± 6.2	ND	78.3 ± 0.3	ND	60.3 ± 1.4		
6	157.0	46.8	0.28 ± 0.00 76.7 ± 3.0	ND	94.0 ± 5.2	ND	75.3 ± 3.2	ND	98.1 ± 2.5
7	152.0	45.0	0.12 ± 0.06 86.2 ± 9.3 0.05 ± 0.06 90.8 ± 3.1	ND	90.7 ± 0.3 0.06 ± 0.01 89.8 ± 5.7				
8	159.0	49.5	0.25 ± 0.01 72.2 ± 3.9 0.10 ± 0.05 81.0 ± 4.7	ND	85.4 ± 7.1	ND	98.5 ± 0.8		
9	161.0	47.0	0.26 ± 0.02 79.9 ± 0.6	ND	98.2 ± 3.4	ND	92.1 ± 3.7	ND	88.6 ± 2.6
10	155.0	53.0	0.15 ± 0.00 83.8 ± 3.8	ND	93.5 ± 5.4 0.02 ± 0.03 100.2 ± 0.8	ND	107.0 ± 6.6		
11	151.0	54.0	0.12 ± 0.03 93.5 ± 3.8 0.08 ± 0.03 87.7 ± 7.1	ND	80.6 ± 6.0	ND	98.6 ± 4.9		
12	170.0	57.0	0.23 ± 0.02 79.8 ± 7.0 0.01 ± 0.02 82.3 ± 6.5	ND	96.0 ± 5.7	ND	97.3 ± 6.9		
13	165.0	67.9	0.23 ± 0.01 68.8 ± 8.0	ND	96.2 ± 0.5 0.04 ± 0.02 105.9 ± 3.0 0.23 ± 0.02 109.4 ± 5.7				
14	158.0	54.0	0.17 ± 0.00 81.2 ± 4.6 0.03 ± 0.01 91.8 ± 1.3 0.15 ± 0.01 88.2 ± 4.8 0.14 ± 0.03 100.0 ± 6.3						
15	160.0	49.5	0.14 ± 0.01 84.6 ± 2.5 0.02 ± 0.05 99.0 ± 1.1 0.19 ± 0.07 83.2 ± 2.9 0.27 ± 0.02 88.4 ± 5.6						
16	148.0	44.0	0.12 ± 0.04 78.1 ± 2.0 0.01 ± 0.03 82.6 ± 3.6	ND	82.0 ± 5.8	ND	94.2 ± 4.5		
17	160.0	51.4	0.08 ± 0.01 85.9 ± 2.8 0.02 ± 0.03 90.3 ± 3.0 0.01 ± 0.01 87.8 ± 0.1 0.06 ± 0.03 106.4 ± 2.4						
18	160.0	66.0	0.11 ± 0.02 80.3 ± 0.5 0.08 ± 0.01 82.2 ± 2.1 0.05 ± 0.02 87.9 ± 1.3 0.01 ± 0.00 95.6 ± 1.5						
19	168.0	55.5	0.11 ± 0.01 81.4 ± 5.5 0.02 ± 0.02 79.0 ± 7.6	ND	90.1 ± 6.7	ND	106.8 ± 1.1		
20	163.0	50.0	0.08 ± 0.02 92.9 ± 1.8	ND	107.2 ± 1.7	ND	86.1 ± 2.9	ND	100.9 ± 6.8

母乳中の全ての B6 の回収率は非常に良好であり、これら B6 が正確に定量できた。母乳中に主として存在しているのは PLP であり、ついで PL であった。これらは 20 種の日本人母乳の全てで検出できた。その他の B6 は全ての試料に含まれているわけではなかった。日本人母乳と米国人母乳中の含有量に大きな差はなかった。人乳と比べて、牛乳中には多量の PNG が含まれていることがわかった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Yagi T., Iwamoto S., Mizuseki R., Furuya M., Nakayama K., Contents of all forms of vitamin B6, pyridoxine-β-glucoside and 4-pyridoxic acid in mature milk of Japanese women by 4-pyridoxolactone-conversion high performance chromatography, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有、Vol. 59, No.1, 2013, pp. 9-15,

② Mugo A.N., Kobayashi J., Yamasaki T., Mikami B., Ohnishi K., Yoshikane Y., Yagi T. Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*. *Biochim. Biophys. Acta -Proteins and Protomics* 査読有、Vol. 1834, 2013, pp. 953-963,

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.004>

③ Do H. T. V., Ide Y., Mugo A.N., Yagi T. All-enzymatic HPLC method for determination of individual and total contents of vitamin B6 in foods. *Food & Nutr. Res.* 査読有、Vol. 56, 2012, pp. 5409-5417, DOI:10.3402/fnr.v56i0.5409

④ Do H. T. V., Yagi, T. Individual vitamin B6 contents in selected Japanese sushi toppings. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 査読有、Vol. 63, No.2, 2012, pp246-249, DOI:10.3109/09637486.2011.639350

⑤ Do, H. T. V., Toda, K., Saibara, T., Yagi, T. Abnormality in expression levels of gluconeogenesis-related genes by high-dose supplementation with pyridoxamine in mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 査読有、Vol. 82, No. 1, 2012, pp. 34-40, DOI: 10.1024/0300-9831/a000092

⑥ Nagase T., Mugo A.N., Chu H.N., Yoshikane Y., Ohnishi K., Yagi T. The ml16786 gene encodes a repressor protein controlling the degradation pathway for vitamin B6 in *Mesorhizobium loti*. 査読有、Vol. 329, No.2, 2012, pp. 116-122, DOI:10.1111/j.1574-6968.2012.02510.x

[学会発表] (計 5 件)

① Mugo Andrew Njagi, Crystal structure of pyridoxine 4-oxidase from *Mesorhizobium loti*, 日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会)、2013 年 01 月 26 日、高知大学  
 ② 渡邊江里子, ピリドキシン 4-オキシダーゼの活性中心残基とその変異、日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会)、2013 年 01 月 26 日、高知大学

③ 水関梨江, 4-ピリドキシニン酸転換 HPLC 法によるヒト赤血球・血漿中のピリドキサール・ピリドキサール 5'-リン酸定量条件の検討と乳中 4-ピリドキシニン酸定量法、日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会)、2013 年 01 月 26 日、高知大学

④ 大下浩子, 大豆発酵食品中の全ビタミン B6 化合物含有量、日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会)、2013 年 01 月 26 日、高知大学

⑤ 八木年晴, ビタミン B6 酵素の基礎と応用、日本農芸化学会中四国支部第 35 回講演会(例会)(招待講演)、2013 年 01 月 26 日、高知大学

[図書] (計 1 件)

① Yagi T. The Royal Society of Chemistry, Enzymatic HPLC assay for all six vitamin B6 forms. In *Food and Nutritional Components in Focus No. 4 B Vitamins and Folate: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, 2013, pp. 335-352

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 年晴 (YAGI TOSHIHARU)

高知大学・教育研究部自然科学系・教授

研究者番号：90110759