

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450168

研究課題名(和文)食品に含まれる疑似ビタミンB12群が生体に及ぼす影響の精密解析

研究課題名(英文)Precise analysis of pseudovitamin B12 compounds in food and effect of these compounds on vitamin B12 status of living 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：食品に含まれる疑似ビタミンB12 (B12) を精密に分析し、疑似B12の生体に及ぼす影響を検討した。B12の主要な供給源である魚介類や乳製品などに含まれる疑似B12を液体クロマトグラム質量分析機を用いて精密に分析した。ほとんどの食品には真のB12が主要なコリノイドであったが、食用藍藻や一部の巻貝は疑似B12の一種であるシュードB12が含まれていた。食品に含まれるシュードB12は、ヒトでB12の腸管吸収に関与する内因子との結合能が低いために腸管吸収され難く、体内に吸収された場合でも細胞内のB12依存性酵素に対して阻害作用を示さないことが明らかとなり、生体に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Foods derived from animals, namely fish, shellfish, and milk, are considered major dietary sources of vitamin B12 (B12). When food corrinoids were characterized using liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry, certain food items (edible cyanobacteria and snails) contained pseudo B12 inactive in humans. Intrinsic factor involved in the gastrointestinal absorption of B12 preferentially bind B12 in the presence of pseudoB12 under physiological conditions. PseudoB12 did not function as cofactors of B12-dependent enzymes of COS7 cultured cells. These results suggest that pseudoB12 does not have the ability to act as a B12 antagonist in mammals.

研究分野：食品栄養科学

キーワード：ビタミンB12 神経障害 欠乏症 疑似ビタミン 貝類 藻類 キノコ類 乳類

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、我国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 は微生物のみで生合成され、自然界の食物連鎖により、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。しかし、我々が日常的に摂取している食品に含まれる B₁₂ 化合物の詳細な分子種についてはこれまで不明であった。そこで、私は我国の主要な B₁₂ 供給源 (食品) に含まれる B₁₂ 化合物を分析した結果、多種多様な疑似 B₁₂ が多量に含まれていることを明らかにした (図1) (1)。これら疑似 B₁₂ の生体に及ぼす影響や細胞内代謝などについては不明であり、もし日常的に疑似 B₁₂ を摂取することが B₁₂ の吸収を妨げ、細胞内で 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)。このような状況から、食品に含まれる多種多様な疑似 B₁₂ が生体に及ぼす影響について詳細に検討することは、超高齢社会の我国において疾病予防の観点からも重要な研究課題である。

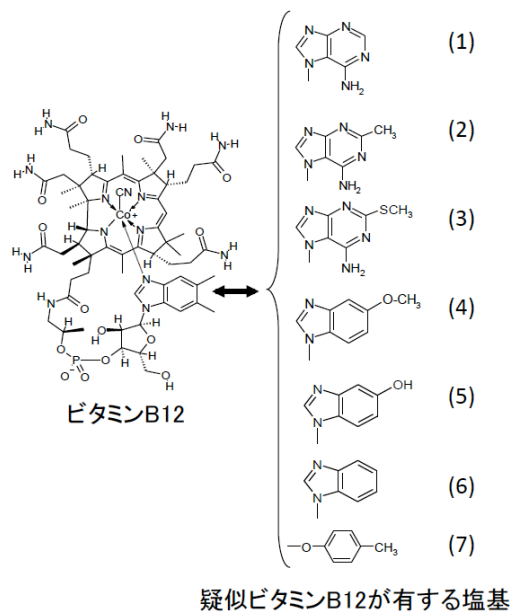


図1. 天然に存在する疑似ビタミンB₁₂の構造
 1) シュード B₁₂ あるいはアデニルコバミド、
 2) 2-メチルアデニルコバミド、3) 2-メチルメ
 ルカプトアデニルコバミドあるいは Factor S、
 4) 5-メトキシベンズイミダゾリルコバミド
 あるいは Factor III_m、5) 5-ヒドロキシベンズ
 イミダゾリルコバミド、6) ベンズイミダゾリ
 ルコバミド、7) *p*-クレゾリルコバミド

B₁₂ の腸管吸収や血中輸送は、複数の特異的な B₁₂ 結合タンパク質とその受容体を介して行われるが (3)、B₁₂ の構造が微細に変化した疑似 B₁₂ は、これら生体に存在する幾重もの選別機構をすり抜け、細胞内へと輸送・代謝され、B₁₂ 酵素の機能に重大な影響を及ぼす可能性が考えられる。

食品や生体成分中に微量に存在する多種多様な疑似 B₁₂ を液体クロマトグラム質量分析機 (LC/ESI-MS/MS) で精密に解析・定量する方法を開発した (4) ので、本分析ツールを駆使して本研究課題に取り組んだ。

2. 研究の目的

疑似 B₁₂ の生体に及ぼす影響や細胞内代謝については不明であり、日常的に疑似 B₁₂ を摂取することが B₁₂ の吸収を妨げ、細胞内で B₁₂ の代謝系を阻害することになれば、B₁₂ 欠乏症に基づく疾患 (神経障害) の発症が危惧される。そこで、食品に含まれる疑似 B₁₂ を網羅的に分析し、疑似 B₁₂ の生体に及ぼす影響を精密に解析した結果を正確な栄養情報として国民に提供することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 試料

主な試薬として、シアノコバラミン (Sigma 社製)、B₁₂ 定量用基礎培地 (日水製薬社製)、シリカゲル 60TLC アルミニウムシート (Merck 社製) を用いた。その他全ての試薬には、特級試薬を用いた。分析試料 (食品) は、我国や海外の市場で流通しているものを購入した。

(2) B₁₂ 化合物の抽出・定量法

B₁₂ 化合物の定量は、五訂増補日本食品標準成分表で採用されている分析マニュアルに準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 を用いた微生物的定量法で行った (5)。各種試料はミキサーや乳鉢で破碎・均質化した後、正確に 2 g 秤量し、0.2 mg シアン化カリウムを含む 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 50 mL 中で B₁₂ 化合物をドラフト内にて 30 分間 94°C で加熱抽出した。また、本定量菌は B₁₂ 以外にデオキシリボースやデオキシリボヌクレオチド (アルカリ耐性因子) にも反応するため、総 B₁₂ 量からアルカリ耐性因子量を差し引き、試料中の B₁₂ 化合物含量を算出した。

(3) B₁₂ 依存性大腸菌 *Escherichia coli* 215 を用いたバイオオートグラム分析

上述の抽出液を Sep-Pak Plus® C18 で 20 倍に濃縮し、標準 B₁₂ 並びにシュード B₁₂ 溶液とともにシリカゲル 60TLC アルミニウムシートに 1 μL を負荷し、展開溶媒 [2-プロパノール/アンモニア水/蒸留水 (7:2:1)] を用いて室温で展開させた。展開した TLC プレートは風

乾後、B₁₂依存性大腸菌 *E. coli* 215 によるバイオオートグラム分析を行った(6)。

(4) 液体クロマトグラム質量分析による B₁₂ 化合物の分析

上述の抽出液(50 mL)を Esai-Extract Vitamin B₁₂ イムノアフィニティーカラム(R-Biopharm 社製)に負荷し、製品のプロトコールに従ってコリノイド化合物を精製した。精製したコリノイド化合物、標準 B₁₂ ならびにシュード B₁₂ を 0.1% (v/v) 酢酸に溶解し、メンブレンフィルター(Nanosep MF, 0.4 μm)でろ過した後、2 μL を Ultra-Fast LC/LCMS-IT-TOF システム(島津社製)で分析した。HPLC カラムは InertSustain C18 column (3 μm, 2.0×100 mm, GL サイエンス社製)を用い、カラム温度 40℃、流速 0.2 mL/min で、B₁₂ 化合物を移動相 A [0.1% (v/v) 酢酸] と移動相 B (100% メタノール) のリニアグラジェント (0-5 min, 15% B; 5-11 min, 15-90% B; 11-15 min, 90-15% B) で溶出した。ESI-MS はポジティブイオンモードで、衝突ガスにはアルゴンを使用した。本実験で使用した LC/ESI-MS 条件下では B₁₂ 化合物は 2 価イオンを形成するため、B₁₂ 化合物の検出は各標準コリノイド化合物の分子イオン [M+2H]²⁺ [B₁₂, C₆₃H₈₇CoN₁₄O₁₄P, 精密質量 1354.5674 g/mol] (*m/z* 678.2943), シュード B₁₂ (アデニルシアノコバミド, C₅₉H₈₃CoN₁₇O₁₄P, 精密質量 1343.5374 g/mol) (*m/z* 672.7785)) で行った。

4. 研究成果

B₁₂ は主に動物性食品に含まれており、魚介類や乳製品などが主要な B₁₂ 供給源である。これら食品中の疑似 B₁₂ の分布を LC/ESI-MS/MS で精密に分析した。

(1) チーズ

チーズの熟成に關与する乳酸菌やプロピオン酸菌などの類縁種にはシュード B₁₂ の生合成能を有するものが存在する(7)。そこで、我国で市販されている 26 種類のナチュラルチーズの B₁₂ 含量を測定すると共に LC/ESI-MS/MS 分析により B₁₂ 化合物を同定した。ナチュラルチーズ湿重量 100 g あたりの B₁₂ 含量は、ハード・セミハードタイプとウオッシュタイプのチーズで 2 μg 程度と高く、山羊とフレッシュタイプのチーズで 1 μg 以下のものが多く低かった。また、乾燥重量 100 g あたりでもハード・セミハードタイプとウオッシュタイプのチーズの B₁₂ 含量が他のチーズと比較して高かった。LC/ESI-MS/MS 分析では、標準 B₁₂ に由来する *m/z* 678.2914 のイオンピークが保持時間 7.5 分に溶出され、MS/MS 解析から下方配位子 α-リバゾール-5'-リン酸 (C₁₄H₁₉N₂O₇P, 精密質量 358.0929 g/mol)

に由来するシグナルが *m/z* 359.0986 に検出された。ゴーダチーズの精製物では、保持時間 7.5 分の B₁₂ (*m/z* 678.2914) に由来するイオンピークが検出された。MS/MS 解析からそれぞれの下配位子に由来するシグナルが *m/z* 359.0986 に検出され、標準 B₁₂ と一致していた。今回分析したほとんどのナチュラルチーズで同様の結果となったが、一部のチーズでは B₁₂ 以外にシュード B₁₂ の保持時間や質量に一致する微弱なイオンシグナルが検出されたが、MS/MS 解析できずシュード B₁₂ として同定するには至らなかった。以上の結果から、ナチュラルチーズの主要なコリノイドは B₁₂ であることが明らかとなった。

(2) 卵

鶏卵(生および茹で)には、湿重量 100 g あたり 0.9 μg の B₁₂ が含まれているが、そのほとんどが卵黄に存在しており、スクランブルエッグなどの卵料理からの B₁₂ の生体利用は 10% 以下と他の動物性食品と比べて低いことが報告されている(9)。一方、卵加工品ピータンの卵黄と卵白には湿重量 100 g あたり、それぞれ 1.9 μg と 0.8 μg の B₁₂ が含まれていた。LC/ESI-MS/MS 分析の結果、卵黄と卵白ともに主要なコリノイド化合物は B₁₂ であった。卵黄と卵白に含まれる B₁₂ は、Sephadex G-50 のゲルろ過において両者ともに高分子画分に溶出された。卵黄と卵白を人工消化したところ、卵黄に含まれる B₁₂ の約 52% が遊離型 B₁₂ 画分に溶出されたが、卵白からは遊離型 B₁₂ が生成されなかった。以上の結果から、ピータンの卵黄には消化されやすい B₁₂ が含まれていることが明らかとなり、ピータンは吸収されやすい B₁₂ を含む卵加工品であることが判明した。

(3) 貝および加工品

我国において魚介類は主要な B₁₂ 供給源であり、摂取頻度の高いアサリやカキは B₁₂ 含量も高く、真の B₁₂ を含んでいることが報告されている(1)。本研究では、シジミなどの他の二枚貝や巻貝などの B₁₂ 含量を測定すると共に疑似 B₁₂ の分布を LC/ESI-MS/MS で分析した。ヤマトシジミは高い B₁₂ 含量を示し、真の B₁₂ が大半を占めていたが少量のシュード B₁₂ や未同定コリノイド化合物が含まれていた。その他の二枚貝としてムール貝、帆立貝、赤貝などは真の B₁₂ を多量に含んでいたが、巻貝のアワビやタニシの B₁₂ 含量は低く、シュード B₁₂ が 10% 程度含まれていた。摂取頻度が高い巻貝としてサザエとバイ貝を分析した結果、サザエの B₁₂ 含量は低く、シュード B₁₂ が主要なコリノイド化合物であった。一方、バイ貝は B₁₂ 含量が高く、シュード B₁₂ は検出されなかった。

また、エスカルゴは B12 含量が低く Factor S や Factor III_m が検出された。以上の結果から、プランクトンを摂食する二枚貝や肉食性巻貝のバイ貝は B12 含量も高く、シュード B12 は検出されなかったが、草食性の巻貝は B12 含量が少なく、シュード B12 をはじめ多様な擬似 B12 が含まれていることが明らかとなった。

(4) 藻類 (微細藻類を含む)

植物には B12 の生合成系も B12 補酵素を必要とする酵素も存在しないと考えられているが、一部の藻類 (特に紅藻) に多量の真 B12 が含まれることが報告されている (1)。そこで、中国産、台湾産、オーストラリア産、英国産の紅藻の B12 含量を測定すると共に B12 化合物を LC/ESI-MS/MS で同定した。その結果、いずれの紅藻においても主要なコリノイドは B12 であったが、中国産紅藻に微量のシュード B12 が検出された。また、栄養補助食品として流通している緑藻クロレラ錠剤 19 種類の B12 含量を測定した結果、100g あたりの B12 含量が 200 μg 以上の錠剤も多数存在していたが、B12 を含まない錠剤もあった。B12 を多量に含むサンプルのコリノイド化合物を LC/ESI-MS/MS で分析した結果、一部のクロレラに脱コバルトコリノイドや Factor III_m が検出された。クロレラは生育に B12 を要求しないが、培地中に B12 を添加すると細胞内に取り込み、補酵素型 B12 に変換した後、B12 酵素の補酵素として利用していることが明らかとなった。以上の結果から、B12 供給源として食用藻類を活用する場合は、真 B12 含量を精密に分析する必要があることが明らかとなった。

(5) キノコ

ヨーロッパのベジタリアンが日常的に摂取している野生キノコ (アンズタケと黒ラッパタケ) に真の B12 が含まれていたため (10)、

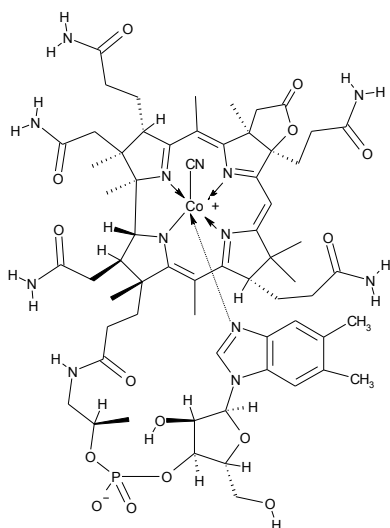


図 2. ビタミン B12 [c-lactone] の構造式

我国で食用とされる野生および人工栽培キノコの B12 含量とコリノイド化合物を LC/ESI-MS/MS 分析した。その結果、生および乾燥シイタケの B12 含量は他のキノコに比べて高かった。一部の乾燥シイタケやヤマブジタケには非天然型 B12 同族体である B12 [c-lactone] が検出され (図 2)、有機塩素系抗菌剤と B12 が反応して B12 [c-lactone] を生成することを明らかにした。以上の結果から、キノコの B12 含量は低く、また B12 [c-lactone] を含むものが存在することから、B12 の供給源にならないことが示唆された。

(6) シュード B12 の生体に及ぼす影響

シュード B12 の生体に及ぼす影響を検討とすのために、新規な B12 酵素阻害剤を開発した。B12 の下方配位子のリボース 5' - 水酸基にドデシルアミンを導入した B12 誘導体を合成した。本 B12 誘導体をサル腎臓由来 COS7 細胞に処理したところ、B12 依存性酵素活性が顕著に阻害された。一方、同様な実験系でシュード B12 を培養細胞に処理したが、B12 依存性酵素活性には全く影響を及ぼさなかった。また、本培養細胞より調製したアポ型 B12 依存性酵素においても補酵素型のシュード B12 は補酵素作用を示さなかった。

以上の結果から、食品に含まれるシュード B12 は、ヒトで B12 の腸管吸収に機能する内因子との結合能が低いために腸管吸収されることが推察された。また、万が一、体内に吸収された場合でも細胞内の B12 依存性酵素に対して阻害作用を示さないことから、生体に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

(引用文献)

- ① F. Watanabe (2007) Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, **232**, 1266-1274
- ② 渡辺文雄 (2009) ビタミン B₁₂ と高齢者。 *ビタミン*, **83**, 370-374
- ③ 渡辺文雄 (2007) ビタミン B₁₂ の基礎。 *Modern Physician*, **27**, 1213-1215
- ④ E. Hashimoto, Y. Yabuta, S. Takenaka, Y. Yamaguchi, H. Takenaka, and F. Watanabe (2012) Characterization of corrinoid compounds from edible cyanobacterium *Nostochopsis* sp. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **58**, 50-53
- ⑤ 安本教博, 竹内昌昭, 安井明美, 渡邊智子編集 (2006) 食品成分表の専門家わかりやすく解説する五訂増補日本食品成分表分析マニュアル, 建帛社, pp. 119-122

- ⑥ Y. Tanioka, Y. Yabuta, E. Miyamoto, H. Inui and F. Watanabe (2008) Analysis of vitamin B₁₂ in food by silica gel 60 TLC and bioautography with vitamin B₁₂-dependent *Escherichia coli* 215. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **31**, 1977-1985
- ⑦ R. Martin, M. Olivares, ML. Marin, J. Xaus, L. Fernandez and JM. Rodriguez (2005) Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* **104**, 267-277
- ⑧ E. Brouwer-Brolsma, RAM. Dhonukshe-Rutten, JP. van Wijngaarden, NL. van der Zwaluw, N. van der Velde and LCPGM. de Groot (2015) Dietary sources of vitamin B-12 and their association with vitamin B-12 status markers in healthy older adults in the B-PROOF study. *Nutrients* **7**, 7781-7797
- ⑨ A. Doscherholmen, J. McMahon and D. Ripley (1975) Vitamin B₁₂ absorption from eggs. *Proc Soc Exp Biol Med* **149**, 987-990
- ⑩ F. Watanabe, J. Schwarz, S. Takenaka, T. Miyamoto, N. Ohishi, E. Nelle, R. Hochstrasser and Y. Yabuta (2012) Characterization of vitamin B12 compounds in the wild edible mushrooms black trumpet (*Craterellus cornucopioides*) and golden chanterelle (*Cantharellus cibarius*). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **58**, 50-53.
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 14 件)
- ① 美藤友博, 田部泰智, 谷岡由梨, 竹中重雄, 薮田行哲, 渡邊文雄 (2015) 26 種類のナチュラルチーズのビタミン B₁₂ 含有量の測定とビタミン B₁₂ 化合物の同定. *ビタミン* 印刷中 (査読有り)
- ② 藤飛, 美藤友博, 竹中重雄, 薮田行哲, 渡邊文雄 (2015) 中国製干シカキ及びオイスターソースのビタミン B₁₂ 含有量の測定と同定. *ビタミン* 印刷中 (査読有り)
- ③ F. Teng, Y. Tanioka, N. Hamaguchi, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2015) Determination and characterization of vitamin B₁₂ compounds in edible sea snails, ivory shell *Babylonia japonica* and turban shell *Turdo Batillus cornutus*. *Fisheries Science*, **81**, 1105-1111 (査読有り)
- ④ F. Teng, Y. tanioka, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2015) Occurrence of biologically inactive corrinoid compounds in canned edible apple snail (escargots). *Food and Nutrition Science*, **6**, 1071-1077 (査読有り)
- ⑤ F. Teng, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, N. Shimomura, and F. Watanabe (2015) Determination and characterization of corrinoid compounds in truffle (*Tuber* spp.) and shoro (*Rhizopogon rubescens*) fruiting bodies. *Mushroom Science and Biotechnology*, **22**, 159-164 (査読有り)
- ⑥ F. Watanabe, Y. Yabuta, T. Bito, and F. Teng (2014) Vitamin B₁₂-containing plant food sources for vegetarians *Nutrients*, **6**, 1861-1873 (査読有り)
- ⑦ Y. Tanioka, S. Takenaka, T. Furusho, Y. Yabuta, Y. Nakano, and F. Watanabe (2014) Identification of vitamin B₁₂ and pseudovitamin B₁₂ from various edible shellfish using liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Fisheries Science*, **80**, 1065-1071 (査読有り)
- ⑧ T. Bito, F. Teng, N. Ohishi, S. Takenaka, E. Miyamoto, E. Sakuno, K. Terashima, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2014) Characterization of vitamin B₁₂ compounds in the fruiting bodies of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and bed logs after fruiting of the mushroom. *Mycoscience*, **55**, 464-468 (査読有り)
- ⑨ F. Teng, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2014) Determination of vitamin B₁₂ in Chinese black tea leaves *Food and Nutrition Sciences*, **5**, 1319-1325 (査読有り)
- ⑩ T. Bito, M. Yasui, T. Iwaki, Y. Yabuta, T. Ichiyangi, R. Yamaji, Y. Nakano, H. Inui and F. Watanabe (2014) Dodecylamine derivative of hydroxocobalamin acts as a potent inhibitor of cobalamin-dependent methionine synthase in mammalian cultured COS-7 cells *Food and Nutrition Sciences*, **5**, 1311-1318 (査読有り)
- ⑪ F. Teng, T. Bito, S. Takenaka, Y.

Yabuta, and F. Watanabe (2014) 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 (査読有り)

- ⑫ F. Teng, T. Bito, S. Takenaka, H. Takenaka, Y. Yamaguchi, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2014) Characterization of corrinoid compounds in the edible cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* the hair vegetable. Food and Nutrition Sciences, **5**, 334-340 (査読有り)
- ⑬ F. Watanabe, Y. Yabuta, Y. Tanioka, and T. Bito (2013) Biologically active vitamin B₁₂ compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **61**, 6769-7665 (査読有り)
- ⑭ Y. Ishihara, K. Ueta, T. Bito, S. Takenaka, Y. Yabuta, and F. Watanabe (2013) Characterization of vitamin B₁₂ compounds from the brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. Fisheries Science, **79**, 321-326 (査読有り)

[図書] (計2件)

- ① F. Watanabe, Y. Yabuta, and T. Bito (2014) Tetrapyrrole compounds of cyanobacteria. Studies in Natural Products Chemistry. Ed. Atta-Ur-Rahman, Vol. 42, 341-349, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, ISBN978-0-444-63281-4
- ② F. Watanabe and Y. Tanioka (2014) Characterization of corrinoid compounds in edible shellfish. Shellfish: Human consumptions, health implications and conservation concerns. Ed. R. M. Hay, 413-420, Nova Science Publishers, Inc., ISBN 978-1-63421-195-7

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 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