

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：23102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700776

研究課題名（和文）緑黄色野菜中ビオチン含量の栽培環境因子による変動とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Effect of cultivation conditions on biotin contents in green and yellow vegetables

研究代表者

曾根 英行（SONE HIDEYUKI）

新潟県立大学・人間生活学部・講師

研究者番号：90398511

研究成果の概要（和文）：本研究は、緑黄色野菜中ビオチン含量の栽培環境差とその作用機序の解明を目的として実施された。その結果、緑色野菜中ビオチン含量には季節変動（冬期減少）が存在し、その要因として栽培環境因子、特に日照量が強く影響することが示唆された。冬期、日本海沿岸では日照量が極端に低下する。そのため、緑色野菜におけるビオチン含量の低下が懸念される。ビオチンの栄養状態を正確に把握するためには、冬期低日照地方における緑色野菜のビオチン含量を詳細に検討することが必要と考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of cultivation conditions on biotin contents in green and yellow vegetables. Our study strongly suggest that biotin biosynthesis in plants fluctuates responding to the cultivation conditions, especially the amount of insolation. This will lead to the seasonal differences of biotin contents in green vegetables. It will be needed to clarify the seasonal differences of biotin contents in green vegetables at regions of low amount of insolation in winter.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ビオチン・緑色野菜・季節変動

1. 研究開始当初の背景

食品中のビオチン含量は、平成17年に改訂された「五訂増補日本食品標準成分表」には記載されておらず、「日本人の食事摂取基準[2005年版]」についても、データの不足から目安量の掲載にとどまり、栄養・食事管理、教育や研究面で活用し難いのが現状である。

これまでに申請者は、健康な女子大生（18～22歳）84人を対象として3食事調査を行

い、ビオチンの栄養状態について検討してきた。しかし、ビオチン摂取量と血清ビオチン濃度との間に相関性を見出すことができず、明確な結論を得ることができなかった。その原因として、ビオチン摂取量の算出に他国の食品成分表を用いたことがあげられる。

そこで申請者は、谷口らによってビオチン含量が測定されている330品目の食品について、日本と諸外国で比較・検討し、野菜類や

果実類などの植物性食品のビオチン含量が栽培環境の違いに影響を受けることを推察する結果を得た。

食品成分の栽培環境差は、日本食品標準成分表が五訂に改訂される際、季節変動が重点課題として詳細に検討されている。しかし、多くの食品では成分値の変動に一定の傾向が認められず、科学的根拠による裏付けがなされなかったことから、ほうれん草のビタミンCとかつおの脂質のみの記載にとどまっている。一方、ビオチンの生合成経路は詳細に解明されており、その過程でATPを必要とすることから、季節変動や栽培地域差の要因について解明しやすいものと考えられる。つまり、植物でのATP産生には葉緑体での光合成が不可欠であり、ビオチンの合成量は日照時間、光の強度、栽培温度に依存することが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、ビオチンに関する食品成分表策定のための基礎データの構築を目指し、野菜類を中心とした植物性食品（約40品目）と一般的な食事での利用頻度の高い食品（約30品目）および優良ビオチン供給源となる食品（約30品目）のビオチン含量を測定し、基礎データの収集を行なう。さらに、周年供給される緑黄色野菜の季節別（夏期と冬期）、地域別（冬期日照量の少ない新潟地方や太平洋温暖地域など）のビオチン含量を詳細に検討し、栽培環境差の現状を把握する。また、豆苗の水耕栽培で栽培環境を実験的に再現し、ビオチン含量に影響を与える環境因子（日照量と栽培温度）とその作用機序について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

A) ビオチン優良供給源・高摂取頻度食品中ビオチン含量について

これまでの報告をもとにビオチンの優良供給源とされる一般的な食品の上位25品目と平成16年国民健康・栄養調査報告をもとに日本人の高頻度摂取食品上位22品目を収集し、ビオチン要求株である乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) を用いた微生物学的定量法でそのビオチン含量を測定した。

B) 野菜中ビオチン量の地域差・季節変動の検討

植物中のビオチン合成量は日照量や気温などの気候条件で左右される可能性がある。そこで、気候条件の変化を受けやすいと考えられる葉菜を中心とした緑黄色野菜を試料として用い、ビオチン含量の地域差と季節変動について検討した。試料の産地には、気候条件が異なる3つの地域として、日本海側である新潟地方（冬期寒冷低日照地域）、太平洋側である関東地方（冬期高日照地域）、九

州・四国地方（冬期温暖高日照地域）を選択し、夏期・冬期の2期に分けて、2009年7月下旬、2010年2月下旬及び2011年1月下旬に13地方から18品目、計116点を収集し、ビオチン含量を測定した。

C) 栽培環境因子の違いによるビオチン含量の変動について

実験的に栽培環境を再現して育成した豆苗を用い、環境因子の違いによるビオチン含量の変動について検討した。実験群には、①対照群（室温、日照12時間/日）②ネガティブ対照群（室温、日照12時間/日、アシドマイシン400 μ M添加）③非緑化群（室温、日照0時間/日）④非緑化+ATP添加群（室温、日照0時間/日、ATP1mM添加）⑤弱緑化群（室温、日照4時間/日）⑥低温群（日照時に6 $^{\circ}$ C、消灯後に室温、日照12時間/日）⑦弱低温群（日照時に12 $^{\circ}$ C、消灯後に室温、日照時間12時間/日）の7群を設け、ビオチン含量を測定した。また、緑化の程度の指標として、それぞれの試料中のクロロフィル含量についても測定した。

D) 栽培環境因子の違いによる豆苗中ATP含量とビオチン合成酵素の発現量の変動について

豆苗（葉）におけるビオチン合成能の変化を確認するため、ビオチン生合成経路の最終酵素であるビオチン合成酵素に注目し、その発現量を検討した。すなわち、上述した条件下で栽培した豆苗中におけるビオチン合成酵素遺伝子 (*bio2* 遺伝子) の発現状態を半定量PCR法で測定した。エンドウ *bio2* 遺伝子増幅のためのプライマーには、上流：5'-CTCGGAGAAGCTGAGGAAGA-3'、下流：5'-AACCTCACCATGCTTTTGG-3'、内部コントロール遺伝子である *actin* 遺伝子増幅のためのプライマーには、上流：5'-GTTTGGATCTTGCTGGTCGT-3'、下流：5'-GAACCTCTCAGCTCCGATTG-3' を用いた。

E) 豆苗種子の影響を排除した栽培条件での豆苗中ビオチン含量、ATP含量及びビオチン合成酵素発現量の変動について

種子からのビオチン供給の影響を排除するために、発芽後、種子を除去した豆苗の栽培系を確立し、上記の実験群のうち①対照群 ②非緑化群 ③弱緑化群 ④低温群 ⑤弱低温群の5群で同様の検討を行なった。

4. 研究成果

A) ビオチン優良供給源・高摂取頻度食品中ビオチン含量について

ビオチンの優良供給源である食品25品目では、ビオチン含量はこれまでの報告と比較して半分以上の食品で若干の増加傾向

(117-165%)が見られたものの概ね近似した結果が得られた。また、鶏肉肝臓・酵母・とうがらし・まいたけ・米みそではやや少ない傾向を示したが、大きな差はみられなかった。しかし、バターピーナツ・抹茶・味のり・さくらえび・煮干・凍り豆腐などの加工品では、2倍以上の値を示した(抹茶のみ199.7%)。これらの原因として加工方法の違いが考えられる。今後、測定例数を増やすなどの検討が必要と考える。

日本人の高頻度摂取食品 22 品目では、肉類は比較的他の食品よりもビオチン含量が多く、また、パンやチーズ、ほしいもなど水分含量の少ない食品で多い傾向がみられた。しかし、その他の食品ではビオチン含量に大きな差異は認められなかった。高頻度摂取食品上位 22 品目での結果を用いてビオチン摂取状況を算定したところ、約 46.5 μg /日との結果が得られた。これは、日本人の食事摂取基準(2010 年度版)のビオチン摂取目安量 50 μg /日と同等の値である。本測定結果は、ビオチンの摂取状況を把握する上で、全ての食品を網羅していないものの十分に活用できるものと考えられる。

B) 野菜中ビオチン量の地域差・季節変動の検討

野菜中ビオチン含量の地域差では、夏期のモロヘイヤ、にら、つるむらさき、水菜が、新潟産と比べて、九州産で高い値を示した。しかし、夏期の春菊では、新潟産や関東産と比べて九州産で有意に低い値を示した。冬期では、水菜のビオチン含量は九州産で多く、新潟、関東地方産に対し有意差が認められた。

一方、季節変動では、全ての地域において夏期と冬期の間でビオチン含量差は認められなかった。

本研究における検討では、いくつかの野菜においてビオチン含量に地域差が認められたが、日照量や気温等の栽培環境とビオチン含量との関連性を明確にすることはできなかった。気象庁のデータによると、試料を購入した 2010 年 2 月下旬は日本海側において最高気温が更新されるなど温暖な気候が観察され、日照量においても平年の 2 倍強の数値が観測された。そのため、本研究で設定した新潟地方(冬期寒冷低日照地域)の気候条件を反映し難かったと推察される。

そこで、2011 年 1 月下旬に新潟地方において収穫された緑色野菜と淡色野菜について、2009 年度 7 月下旬とのビオチン含量の比較を行なった。なお、気象庁による気象観測データでは、新潟市の 2009 年 7 月の気候は、平均気温 21.4 $^{\circ}\text{C}$ ・日照時間 100h/日・全天日射量 14.3MJ/m 2 、2011 年 1 月は、平均気温 1.3 $^{\circ}\text{C}$ ・日照時間 49h/日・全天日射量 5.9MJ/m 2 であった。

野菜中のビオチン含量を Fig. 1 に示した。

夏期に収穫された野菜中のビオチン含量は、春菊 8.4 \pm 0.34 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、ほうれん草 5.3 \pm 0.06 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、水菜 2.5 \pm 0.24 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった。一方、冬期では、春菊 4.7 \pm 0.33 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、ほうれん草 2.5 \pm 0.14 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 、水菜 2.3 \pm 0.24 $\mu\text{g}/100\text{g}$ であった。春菊とほうれん草では、夏期に対し冬期で、それぞれ 56%、47%と有意な低下を示し ($p < 0.001$)、緑色野菜での季節変動が認められた。淡色野菜である水菜では、こうした傾向は観察されなかった。

前述したように、植物におけるビオチンの生合成には ATP を必要とする。また、最終段階の酵素反応はビオチン合成酵素により進行し、その活性は、グルコースやその代謝産物によって亢進される。植物での ATP 産生やグルコース合成は葉緑体での光合成に依存するため、ビオチン生合成経路の活性化には日照時間や光の強度、栽培温度が強く影響すると推測される。

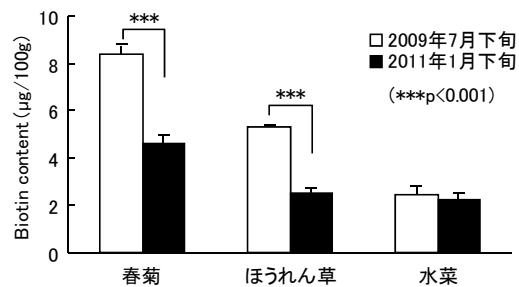


Fig. 1 The seasonal differences of biotin contents in green vegetables between summer and winter.

以上の結果から、緑色野菜中ビオチン含量には季節変動が存在し、その要因として栽培環境因子、特に日照量が強く影響することが示唆された。冬期、日本海沿岸地方では日照量が極端に低下するため、緑色野菜でビオチン含量の低下が懸念される。正確な食品成分表を策定するためには、冬期低日照地方における季節別の緑色野菜中ビオチン含量を詳細に検討することが必要と考える。

C) 栽培環境因子の違いによるビオチン含量の変動について

クロロフィル総量は、①対照群に対し、③非緑化群、④非緑化+ATP 添加群では大幅に減少しており、非日照による緑化状態の低下が確認された。また、⑤弱緑化群では、日照時間は対照群の 1/3 であったが、クロロフィル量は約 50%まで低下していた。一方、⑥弱低温群と⑦低温群では、日照時間は対照群と同量であったが、クロロフィル量は弱低温群で 50%以下、低温群では約 15%まで減少しており、低温栽培による緑化の抑制が示された。

しかし、各群の豆苗試料中のビオチン含量は、予想に反し、各群におけるビオチン含量

は、①対照群 $6.5 \pm 0.8 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、②ネガティブ対照群 $7.1 \pm 1.3 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、③非緑化群 $6.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、④非緑化+ATP 添加群 $5.9 \pm 0.8 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、⑤弱緑化群 $5.6 \pm 0.8 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、⑥弱低温群 $6.8 \pm 1.6 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、⑦低温群 $6.3 \pm 0.9 \mu\text{g}/100\text{g}$ であり、群間で有意な差は観察されなかった。ビオチン合成酵素阻害剤であるアジドマイシンの添加や日照量の低下、低温状態でもビオチン含量への影響は観察されなかった。一方、豆苗の種子のビオチン含量は $15.8 \mu\text{g}/100\text{g}$ と非常に高い値を示した。これは、葉中のビオチン含量の3倍強にあたる。これらから判断すると、豆苗のようなスプラウトの場合、種子から十分量のビオチンが供給されるため、葉中のビオチン含量に顕著な差が表れなかったと考えられる。

D) 栽培環境因子の違いによるビオチン合成酵素の発現量の変動について

bio2 遺伝子の発現状態は、①対照群に比べてその他の群で低い値を示したが、③非緑化群及び⑤弱緑化群では対照群の8割程度であり、日照条件による影響はそれほど大きくはなかった。①対照群と⑥弱低温群、①対照群と⑦低温群については有意差が認められ (順に $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)、③非緑化群と⑥弱低温群との間でも有意差が認められた ($p < 0.05$)。⑥弱低温群及び⑦低温群では対照群の半分近くまで低下していたが、これは豆苗の代謝全体が低下していた可能性が推察される。ただし、半定量 PCR 法では、わずかな発現量の差を検出することはできないため、今後、リアルタイム PCR 等を用いた詳細な検討が必要と考えられる。

また、*bio2* 遺伝子の発現はビオチン量によっても制御されている。上述した実験で示したように、今回の豆苗では群間でビオチン含量に差がみられなかったことから、種子からのビオチン供給が *bio2* 遺伝子の発現量にも影響した可能性が考えられる。

E) 豆苗種子の影響を排除した栽培条件での豆苗中ビオチン含量、ATP 含量及びビオチン合成酵素発現量の変動について

豆苗試料中のビオチン含量を Fig. 2 に示した。ビオチン含量は、対照群で $14.7 \pm 0.35 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、弱緑化群で $9.9 \pm 0.16 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、非緑化群で $6.3 \pm 0.37 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、弱低温群で $11.5 \pm 0.73 \mu\text{g}/100\text{g}$ 、低温群で $9.6 \pm 0.33 \mu\text{g}/100\text{g}$ であった。対照群に対し、弱緑化群、非緑化群のビオチン含量は、それぞれ 67%、43%と光合成促進ランプの照射時間に従って低下した ($p < 0.05$ と $p < 0.001$)。緑化の指標となる植物中のクロロフィル濃度は、光の強度と日照時間に比例する。事実、豆苗中のクロロフィル濃度は、光合成促進ランプの照射時間に比例して低下しており、本実験にお

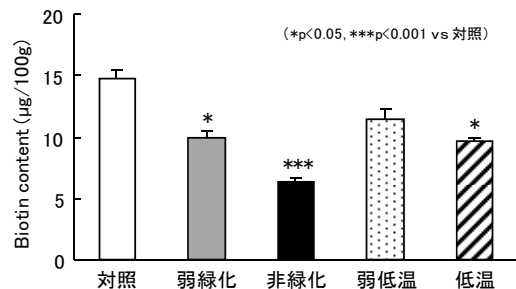


Fig. 2 Effects of cultivation conditions of temperature and insolation on biotin contents in pea sprouts hydroponically cultivated without seeds.

いても本葉や茎の色付き等に同様の傾向が観察された。以上の結果から、豆苗におけるビオチンの生合成は、緑化の程度に従って低下し日照量に強く影響されることが示唆された。また、低温群のビオチン含量は、対照群の66%まで低下しており、両群間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。しかし、弱低温群では、ビオチン含量は対照群の78%と比較的高い値を維持しており、栽培温度の影響は観察されなかった。植物は、低温下におかれると弱い光の照射であっても低温との複合ストレスを受け、光合成活性が低下する。低温下では、こうした光合成活性の低下が原因となり、過剰な光エネルギーを処理できず活性酸素へと変換され、細胞内器官を破壊するといった光障害 (葉焼け) が引き起こされる。本実験では、低温群において葉焼けの形跡は認められなかった。しかし、少なからず光障害による光合成活性の低下を受け、低温下でのビオチン合成酵素の活性低下との複合的作用により、ビオチン含量が低下したものと推察される。しかし、弱低温群ではビオチン含量は大きな変化を示さなかったことから、ビオチン生合成には、栽培温度よりも日照量が強く影響するものと考えられる。

次に、ビオチン含量に変動を与える細胞内因子を同定するため、豆苗中のATP含量を測定した。ATP含量は、対照群で $100.7 \pm 27.6 \text{ pmol}/\text{g}$ 、弱緑化群で $109.1 \pm 13.9 \text{ pmol}/\text{g}$ 、非緑化群で $215.5 \pm 35.3 \text{ pmol}/\text{g}$ 、弱低温群で $130.4 \pm 17.7 \text{ pmol}/\text{g}$ 、低温群で $116.3 \pm 4.6 \text{ pmol}/\text{g}$ であった。各群におけるATP含量は、非緑化群で対照群の2倍強の高値を示したが、その他の群間には全く変化が認められなかった。また、予想に反し、非緑化群でATP含量が最も高かったことから、ATP含量は日照量に影響されないものと考えられる。つまり、ビオチン生合成に影響を与える栽培環境因子の作用機序として、細胞内ATP含量は全く変動せず、一切寄与しないことが確認された。おそらく、ビオチン生合成に影響を与える細胞内分子としては、種子有の実験でも差のある傾向が観察されたビオチン合成酵素と推察される。現在、本酵素である *bio2* 遺

伝子の発現を qRT-PCR で検討しているところである。

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4件)

- ① 曾根英行, 神山伸, 守木葵, 緑色野菜中ビオチン含量の季節変動について Trace Nutrients Research, 査読有, vol. 28, 2011, 70-74
- ② 曾根英行, 守木葵, 神山伸, 野菜中ビオチン含量の地域差および季節変動について, 人間生活学研究, 査読有, 第2号, 2011, 87-92
- ③ 曾根英行, 守木葵, 神山伸, 栽培環境因子の違いがビオチン生合成に及ぼす影響について, 人間生活学研究, 査読有, 第2号, 2011, 93-100
- ④ 曾根英行, 安部恵, 樋口睦, 守木葵, 小山田絵美, 渡邊敏明, 宮西邦夫, 食品中ビオチン含量の地域差と栽培環境因子による変動, Trace Nutrients Research, 査読有, vol. 26, 2009, 54-58

[学会発表] (計4件)

- ① 曾根英行, 神山伸, 守木葵, 緑色野菜中ビオチン含量の季節変動について 第28回微量栄養素学会学術集会, 平成23年5月, 京都市
- ② 曾根英行, 平岡真美, 香川靖雄(他4名) Improvement of the microbiological assay for biotin measurement and assessment of biotin status in healthy young Japanese women. 第19回国際栄養会議, 平成21年10月, バンコク
- ③ 曾根英行, 安部恵, 樋口睦, 守木葵, 小山田絵美, 渡邊敏明, 宮西邦夫, 食品中ビオチン含量の地域差と栽培環境因子による変動, 第26回微量栄養素学会学術集会, 平成21年6月, 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 英行 (SONE HIDEYUKI)

新潟県立大学・人間生活学部・講師

研究者番号: 90398511