

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：42650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700856

研究課題名(和文) 日常食品に含まれるビタミンB12類縁体の解明とそれが生体に及ぼす影響について

研究課題名(英文) Characterization of vitamin B12 compounds from various daily foods

研究代表者

谷岡 由梨(Tanioka, Yuri)

東京農業大学短期大学部・その他部局等・助教

研究者番号：30553250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円、(間接経費) 480,000円

研究成果の概要(和文)：貝類や発酵食品中のビタミンB12類縁体を明らかにし、培養細胞系を用いた生体への影響を検討することを目的とした。二枚貝およびヨーグルトにはB12のみが検出された。一方で、トコブシ、タニシおよびブルーチーズにB12とともにB12類縁体が検出されたが、いずれも微量であり、ヒト消化管B12結合タンパク質との結合親和性が弱いため、摂取しても問題ないと考えられる。培地中にB12類縁体を添加し、ヒト肝臓実質細胞由来株のB12依存性メチオニン合成酵素(MS)活性を検討したが、B12無添加条件下で非常に高いMS活性が検出され、生体への影響を検討するためにはさらに条件等精査する必要がある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate corrinoid compounds from edible shellfish and fermented food (i.e., yogurt and cheese), these corrinoid compounds were analyzed. The corrinoid compounds purified from all bivalves were identified as B12. In certain edible snails and blue-cheese, however, both vitamin B12 and pseudovitamin B12 were observed to be the major and minor corrinoid compound, respectively. The trace pseudovitamin B12 may not be absorbed because of their poor binding and uptake through the intrinsic factor involved in the gastrointestinal absorption of B12.

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：ビタミンB12 シュードビタミンB12 食用貝類 発酵食品

1. 研究開始当初の背景

ビタミン B₁₂ (B₁₂) は、分子量 1355.4 の赤色をしたビタミンであり、その構造は上方配位子と下方配位子に分けられる。上方配位子にはヒドロキソ B₁₂ (OH-B₁₂)、アデノシル B₁₂ (AdoB₁₂)、メチル B₁₂ (CH₃-B₁₂) およびシアノ B₁₂ (CN-B₁₂) などが存在する。これらのうち、AdoB₁₂ と CH₃-B₁₂ は補酵素型と呼ばれ光に不安定であるが、CN-B₁₂ は、安定型であるためサプリメントに使用されている。生体内ではシアノ型から補酵素型への変換が必要である。一方、B₁₂ の下方配位子は 5, 6-ジメチルベンズイミダゾールであるが、下方配位子がアデニンに置換したシュード B₁₂ なども存在する。シュード B₁₂ などの B₁₂ 類縁体は、微生物で合成され、ヒトにおいてビタミンとして機能しない。近年、貝類や微生物が関与する発酵食品には、ヒトにおいてビタミンとして機能しない B₁₂ 類縁体 (B₁₂ 関連化合物) の存在が示唆されており、食品学・栄養学の観点から B₁₂ 関連化合物を解明し、生体への影響を検討することは非常に重要である。

通常、我が国のビタミン B₁₂ 供給源は、主に動物性食品である。B₁₂ は微生物で合成され、食物連鎖を経て、高等動物に蓄積される。ヒトにおいて B₁₂ は、消化管に存在する B₁₂ 結合タンパク質と結合して生体内に吸収され、その大半は肝臓に蓄積され B₁₂ 依存性酵素の補酵素として機能している。

食品中の B₁₂ 量は、日本食品標準成分表 (食品成分表) に掲載されているが、食品成分表で採用されている方法は、B₁₂ を生育必須因子として要求する *Lactobacillus delbrueckii* ATCC7830 の増殖度から定量される。本菌はヌクレオチドやデオキシリボシドに反応するため、これらをアルカリ耐性因子として差し引き補正しているが、B₁₂ 類縁体にも B₁₂ 同様に増殖作用を示すため、シュード B₁₂ を含めた総 B₁₂ 関連化合物量となり真の B₁₂ かどうかの判別はできないのが現状である。

また、日常的によく食される鶏卵は、B₁₂ の良い供給源であるが、他の動物性食品が約 50-60% であるのと比較し、B₁₂ 吸収率が約 5-10% と低いことが報告されており、B₁₂ 類縁体および他の食品との補酵素型の差異の可能性が推測される。

2. 研究の目的

上記の課題を明らかにするために本研究は、以下を目的とした。(1) 日常食品、特に食用貝類可食部、発酵食品 (市販ヨーグルト、熟成型チーズ、後発酵茶) および鶏卵における総 B₁₂ 関連化合物量および B₁₂ 類縁体の解明、(2) 卵黄中の B₁₂ 補酵素型の解明、(3) B₁₂ 添加・無添加におけるヒト肝臓由来培養細胞における B₁₂ 依存性酵素活性の変化

3. 研究の方法

(1) 食品中からの B₁₂ 関連化合物の抽出と定量は日本食品成分表分析マニュアルに準

じて行い、B₁₂ 類縁体の解明は B₁₂ 依存性大腸菌を用いたバイオオートグラフィーおよび LC-ESI/MS/MS を用いた。LC-ESI/MS/MS に供する試料は、B₁₂ イムノアフィニティーカラムにより精製した。(2) 卵黄からの B₁₂ 補酵素型の抽出は、試料を暗黒下で超音波破碎後、80% エタノールで還流することで抽出した。その後、固相抽出カラムにより夾雑物を除去し、B₁₂ 依存性大腸菌を用いたバイオオートグラフィーにより分析した。(3) B₁₂ は、生体内でメチオニンの生合成や分岐鎖アミノ酸および奇数鎖脂肪酸の異化代謝に関与している。本研究では、特に DNA 合成に重要なメチオニン合成酵素活性について、培地中への B₁₂ 添加・無添加における B₁₂ 依存性メチオニン合成酵素活性を高速液体クロマトグラフィーにより解析した。

4. 研究成果

B₁₂ 関連化合物含量を明らかにするために、食品成分表で採用されている B₁₂ 分析方法である微生物学的定量法により食用貝類の可食部、発酵食品および鶏卵に含まれる B₁₂ 関連化合物含量を測定した。

食用貝類において、内臓も含め可食部とする二枚貝に多量の B₁₂ 関連化合物含量が検出された一方、筋肉のみを可食部とする貝類の B₁₂ 関連化合物含量は低値である傾向がみられた。しかしながら、本研究で得られた値は、食品成分表と同程度であった (表 1)。これは、貝類に含まれる大部分の B₁₂ 関連化合物は内臓に蓄積されていることを示唆し、貝類の生体内で補酵素型に変換され、生理機能を発揮していると考えられる。また、表 2 に、後発酵茶およびチーズ類の B₁₂ 関連化合物含量を示した。後発酵茶およびチーズ類の B₁₂ 関連化合物含量は、100g あたり 0.2~1.6 μg いずれも低値であった。また、市販ヨーグルトにおける B₁₂ 関連化合物量は、食品成分表と同程度であり、使用菌株の違いによる B₁₂ 関連化合物量の差異は認められなかった。鶏卵中の B₁₂ 関連化合物含量も、食品成分表と同程度であり、有精卵は無精卵より約 2 倍 B₁₂ が多く含まれていた。また、B₁₂ は主に卵黄に局在していた。

食品中の B₁₂ 関連化合物を簡便に明らかにするために、B₁₂ 依存性大腸菌を用いたバイオオートグラフィーを行った。その結果、二枚貝では、B₁₂ と Rf 値が一致するスポットのみが検出されたが、巻き貝ではタニシに B₁₂ とともにシュード B₁₂ に Rf 値が一致するスポットが検出された (図 1)。

表1 食用貝類可食部における B₁₂ 関連化合物含量

	ビタミンB12含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$ 湿重量)	
	本研究	日本食品成分表
ほたて貝	1.1 \pm 0.2	2.0
いがい	30.5 \pm 13.7	10.3
ホッキ貝	41.7 \pm 5.8	47.5
赤貝	42.9 \pm 9.6	59.2
しじみ	53.3 \pm 15.8	62.4
とこぶし	0.3 \pm 0.1	3.2
ツブ貝	10.5 \pm 3.6	6.5
たにし	21.4 \pm 3.1	17.8

さらに、精密に食用貝類の B₁₂ 関連化合物を同定するために LC-ESI/MS/MS 解析を行ったところ、二枚貝とツブ貝には真の B₁₂ のみが検出され、巻き貝のトコブシとタニシには B₁₂ とともにシュード B₁₂ が微量に検出されたが、同じ巻き貝であるツブ貝にはシュード B₁₂ が検出されなかった(図2)。渡辺らは、貝類に含まれる B₁₂ 類縁体は外界環境中に起因することを示唆しており、本研究においてもおそらく季節間による外部環境の変化(微生物種)それに伴う腸内細菌叢の変化およびエサの違いに由来すると推測される。

表2 後発酵茶および熟成型チーズ類における B₁₂ 関連化合物含量

	ビタミンB12含量 ($\mu\text{g}/100\text{g}$ 湿重量)	
	本研究	日本食品成分表
後発酵茶	プーアル茶	0.4
	阿波晩茶	1.1
	バタバタ茶	1.6
	碁石茶	0.5
チーズ	ウォッシュチーズ	1.6
	エダムチーズ	0.3
	シェーブルチーズ	0.2
	エメンタルチーズ	0.4
	チェダーチーズ	1.0
	ブルーチーズ	0.3
	カマンベールチーズ	1.0
	ゴーダチーズ	1.3

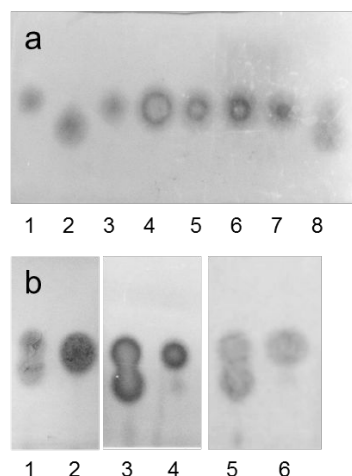


図1 食用貝類可食部の B₁₂ 依存性大腸菌を用いたバイオオートグラフィー (a、二枚貝; 1:CN-B₁₂、2:CN-シュード B₁₂、3:しじみ、4:赤貝、5:ほたて、6:ホッキ貝、7:いがい、8:CN-B₁₂+CN-シュード B₁₂、b、巻き貝; 1、3、5:CN-B₁₂+CN-シュード B₁₂、2:トコブシ、4:ツブ貝、6:タニシ)

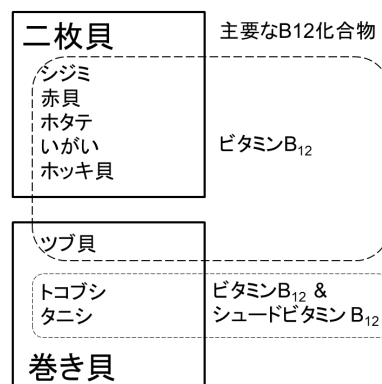


図2 食用貝類に含まれる B₁₂ 関連化合物

食用貝類と同様に、後発酵茶、熟成型チーズ類および卵黄の B₁₂ 関連化合物を明らかにした。その結果、後発酵茶および鶏卵の B₁₂ 関連化合物は全て真の B₁₂ であったが、熟成型チーズ類のエメンタルチーズおよびブルーチーズにのみシュード B₁₂ が検出されその他の熟成型チーズは全て真の B₁₂ であった。シュード B₁₂ が検出されたチーズの熟成には、エメンタルチーズは乳酸菌、プロピオン酸菌が関与し、ブルーチーズにはペニシリウム属菌が関与している。ペニシリウム属菌が B₁₂ 関連化合物を生合成するかどうかは明らかにされていないが、プロピオン酸菌は、B₁₂ 関連化合物を生合成することが報告されている。しかしながら、今回、検出されたシュード B₁₂ 量は、ごく微量であり、またシュード B₁₂ は消化管に存在する B₁₂ 結合タンパク質との結合親和性が低いため、日常摂取量も踏まえると栄養価に問題ないと考えられた。

鶏卵の B₁₂ 消化吸収率は、他の動物性食品 (50~60%) の 5~10% と非常に低いことが報告されている。そこで、卵黄中の補酵素型 B₁₂ の存在が消化吸収率に起因しているか調べた。その結果、卵黄の補酵素型 B₁₂ の Rf 値は、標準アデノシル B₁₂ およびメチル B₁₂ のスポットと一致した (図 3)。このことより、卵黄において補酵素型 B₁₂ は B₁₂ 依存性酵素の補酵素として作用していると考えられるが、Rf 値が CN-B₁₂ と近いこと、LCMSMS で精密に解析する必要がある。以上のことより、本研究では卵黄に、鶏卵の B₁₂ 消化吸収の低い原因を特定するには至らなかった。

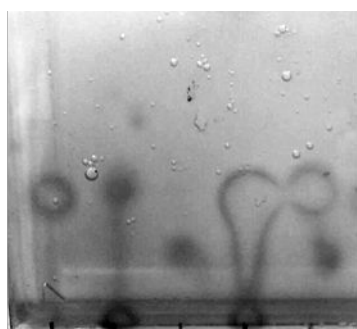


図 3 卵黄の補酵素型 B₁₂ の B₁₂ 依存性大腸菌を用いたバイオオートグラフィー

B₁₂ 類縁体が細胞に与える影響を見るための基礎的検討として、培地中への B₁₂ 添加・無添加におけるヒト肝臓実質細胞由来培養細胞における B₁₂ 依存性酵素活性の変化を調べた。その結果、培地中に B₁₂ を添加していない 0mM のときに 1mg タンパクあたり 4 nmol の酵素活性を示し、0.5mM のとき最大となった。その後 2mM のとき 0mM の活性値と同等となる傾向であった (図 4)。本酵素活性は、ラットやブタのメチオニン合成酵素活性の 15~20 倍と非常に高い活性を示したと共に、培地由来の B₁₂ 濃度で十分な酵素活性を示し、さらに条件等を精査する必要がある。

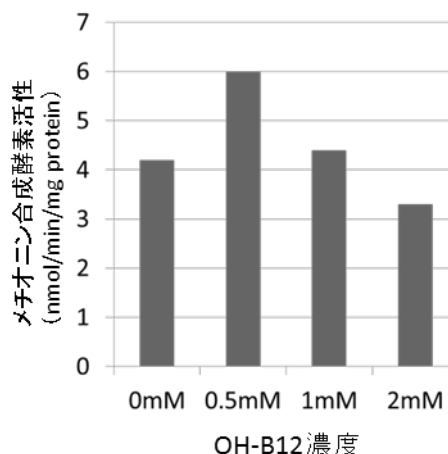


図 4 培地中への B₁₂ 添加・無添加におけるヒト肝臓実質細胞由来培養細胞における B₁₂ 依存性酵素活性の変化

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)

[学会発表](計 3 件)

谷岡由梨 (代表)

熟成型チーズ類に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の特性、日本ビタミン学会、平成 26 年 6 月 13-14 日、姫路商工会議所、兵庫

谷岡由梨 (代表)

食用貝類に含まれるコリノイド化合物の特性、日本食品科学工学会、平成 25 年 3 月 8 日、東京農業大学、東京

谷岡由梨 (代表)

食用貝類に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の同定と真の B₁₂ 量の補正、日本ビタミン学会、平成 24 年 6 月 22 日、長良川国際会議場、岐阜

[図書](計 1 件)

Fumio Watanabe, Yuri Tanioka (2014) Characterization of corrinoid compounds in edible shellfish, NOVA publishers Inc, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷岡 由梨 (TANIOKA YURI)

東京農業大学短期大学部・その他部局等・助教

研究者番号：30553250