

タケ幼少体に含まれるビタミンB₁₂類似体の簡易同定と含有量の測定

田宮克義・中井朋則・山内大輔・久保田 康
(姫路工業大学)

Simple Identification and Measurement of Vitamin B₁₂ (cyanocobalamin)
Analogue Contained in a Bamboo Shoot (*Phyllostachys*)

Katsuyoshi Tamiya, Tomonori Nakai, Daisuke Yamauchi, Kou Kubota
*Himeji Insutitute of Technology, 2167, Shosha, Himeji, Hyogo, 671-2201

〒671-2201 兵庫県姫路市書写 2167

The vitamin B₁₂ analogue was detected by a simple column chromatography method from a bamboo shoot that was expected to contain the vitamin B₁₂ analogue.

The vitamin B₁₂ analogue was extracted in a Tris buffer containing 0.1% KCN from etiolated bamboo shoots, and the extract was applied to the HPLC for isolation using ion-exchange and reverse-phase columns. Both of the optimum densities of 278 and 361 nm were detected in the fraction that has the same retention time as the authentic cyanocobalamin in chromatography used as a standard. In the mass analysis of the fraction, one of the signals (1346.4) closely resembled the cyanocobalamin (1331.4) molecule, indicating that the fraction reasonably contained the vitamin B₁₂ analogue. Additionally, this column chromatography method was used in parallel to the fractionated crude extracts from rice seedlings and asparagus shoots which are both known not to contain cyanocobalamin. No fractions from the rice and the asparagus were detected by the examination of the specific spectrum of the optimum density of cyanocobalamin from absorbance in the range of 200 nm to 600 nm. The analysis method was consequently effective and conventional in the detection of the vitamin B₁₂ analogue in a nutrimental plant at the present time.

1. 緒 言

ビタミンB₁₂はテトラピロール環の中央にコバルトを含み、ビタミン類の中では分子量が最も大きく、非常に複雑な化合物として知られている¹⁾。これはシアノコバラミンやメチルコバラミンなど、同様の作用を持つ化合物の総称で、その生理作用はアミノ酸、奇数鎖脂肪酸、核酸などの代謝に関与する酵素の補酵素として重要である²⁾。ビタミンB₁₂は極微量で有効な生理作用を示すが、その欠乏は悪性貧血や神経障害などの発症が見られ、動

物の生育や繁殖が阻害される³⁾。以前、自然界ではビタミンB₁₂類似体が、動物、原虫、細菌に存在すると報告された¹⁾。現在までに酵母⁴⁾や藻類⁵⁾でもビタミンB₁₂類似体の存在が報告されているが、一般に高等植物には、ビタミンB₁₂は含まれていないとされている¹⁾。

タケの幼少体(タケノコ)は、タンパク質、カリウム、ビタミンB₁、ビタミンC、食物繊維などを含む比較的栄養の豊富な食材である²⁾。一般的に、高等植物であるタケ幼少体にはビタミンB₁₂は含まないとされている²⁾。それに対して、タケ幼少体にビタミンB₁₂類似体を含む

という報告もされているが、これは上田弘一郎著『竹と日本人』において引用されている松岡の実験結果のみであり⁶⁾、それらの詳細な研究は行われていない。

現在、一般的に行われているビタミンB₁₂類似体の精製方法には、微生物を対象とした溶剤精製法⁷⁾やアフィニティーカラム法⁸⁾が知られている。しかしながら、高等植物には微生物とは異なるタンパク質などの夾雑物があるため、溶剤精製法や、粗抽出液を直接アフィニティーカラムで精製することも困難である。そこで、著者らはタケ幼少体を用いてビタミンB₁₂類似体を、HPLCを用いた簡便な同定方法により検出できたので、これを報告する。

2. 実験方法

(1) 試料

モウソウチク (*Phyllostachys heterocycla* f. *pubescens*) 幼少体は4月中旬に姫路市太市において地上部分20cmから30cmのものを朝掘りし、実験に使用するまで凍結保存(-70℃)した。ハチク (*Phyllostachys nigra* f. *henonis*) 幼少体は市販の京都産の5から15cmのものを購入し、実験に使用するまで凍結保存(-70℃)した。イネ (*Oryza sativa* 品種名: キヌヒカリ) は全国農業協同組合佐用支店に保管されていた種子を入手し、実験に使用するまで乾燥状態で冷蔵保存した。イネ種子は水道水で洗浄した後、深さ3cm程度の水道水に浸し、人工気象器 (LPH-200-RD, 日本医科器械製作所, 28℃, 明/暗所 16/8時間, 2000Lux) 内で発芽させた。吸水後10日目の芽生えをイネ芽生えとしてビタミンB₁₂抽出試料とした。アスパラガス (*Asparagus officinalis*) 幼少体は市販のものを購入し、すぐに使用した。

(2) ビタミンB₁₂の抽出

皮を取り除いた800gのモウソウチク幼少体を細かく切断し、ミキサーにより800mlの純水または0.1%KCNを含む5mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 中で5分間破碎し、破碎液を15分間湯煎することにより加熱抽出した。イネ芽生え300g及びアスパラガス幼少体400gはそれぞれ800mlの5mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 中で破碎し、破碎液を15分間湯煎することにより加熱抽出した。抽出後、それぞれ遠心分離 (9,000rpm, 室温, 30分) により沈殿を取り除き、回収した上清を100mlまで濃縮したあと、遠心分離 (9,000rpm, 室温, 15分) し沈殿を取り除いた。得られた上清をさらに50mlまで濃縮した。この濃縮液をフィルター濾過 (孔径0.2µm) し、これをビタミンB₁₂粗抽出液とした。

(3) ビタミンB₁₂類似体の分離

ビタミンB₁₂粗抽出液はHPLCシステム (VISION アプライドバイオシステムズ) を用いて分離、精製を行った。まず、陰イオン交換カラムPOROS HQ/L (7.5mm×100mm, アプライドバイオシステムズ) を流速1ml/minにおいて30mlの20mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した後、ビタミンB₁₂粗抽出液をカラムに供し、5mlの平衡化緩衝液でカラムを洗浄し、陰イオン交換カラム非吸着画分を回収した。得られた非吸着画分 (計20ml) を1mlまで濃縮した後、この濃縮液を逆相カラムOLIGO R3 (4.6mm×100mm, アプライドバイオシステムズ) に供した。逆相カラムは30mlの0.3Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した後、得られた粗抽出液をカラムに通し、流速は1ml/minで5mlの平衡化緩衝液でカラムを洗浄した後、アセトニトリルの濃度勾配 (0から25%) により溶出させた。検出は278nmと361nmで行い、同条件で分離したシアノコバラミンの溶出時間と同じ画分を回収した。

(4) ビタミンB₁₂類似体の検出

逆相カラムによって分離した溶出液 (5ml) を1mlまで濃縮し、この試料1mlの200nmから600nmの範囲における吸収スペクトルを測定することで、ビタミンB₁₂類似体の検出を行った。ビタミンB₁₂類似体の定量値はシアノコバラミンの逆相カラムにおける溶出ピークの積分値を用いて、試料の逆相カラムにおける溶出ピークの積分値から換算して求めた。逆相カラムからの溶出液を乾固させ、MALDI-TOF/MS (Voyager-DE™ PRO, アプライドバイオシステムズ) により質量分析を行った。濃度が10mg/mlとなるように0.1% Trifluoroacetic acidを含む50%アセトニトリルに2,5-Dihydroxybenzoic acidを溶解しイオン化マトリックスとした。先程の乾固させた試料に200µlのマトリックスを加え質量分析を行った。測定はVoyager-DE™ PROのマニュアルに従い行った。TOF/MSは337nmのN₂レーザーを装備しており、レーザー強度3580で、Linearモードに設定して行った。

3. 結果および考察

(1) モウソウチク幼少体からのビタミンB₁₂類似体の分離

モウソウチク幼少体から、抽出緩衝液に0.1%KCNを加え、遊離したビタミンB₁₂類似体を比較的安定なシアノコバラミンに転換させ、HPLCにより分離を行った。シアノコバラミンは、278, 361, 550nmの吸収極

大波長を示すことが知られている (図 3 A). 278nm はタンパク質などの吸収波長でもあることから, 361nm を検出波長として用いた. 逆相カラムを第一カラムとして用いると, 検出波長として用いた361nm では多くの夾雑物まで検出し, シアノコバラミンの分離は困難であると思われた (結果は示さない). そこで, 第一カラムに陰イオン交換カラムを用いた. シアノコバラミンは今回の条件では非吸着画分として得られることから, 多くの夾雑物の除去が期待された. 陰イオン交換カラムを用いた結果, 検出波長361nm において, 非常に多くの夾雑物が吸着し, これらが除去されていることを確認した (図 1).

陰イオン交換カラムから得られた非吸着画分を濃縮し, 逆相カラムを用いて濃縮液からシアノコバラミンの分離を試みた. 逆相カラムによる分離において, 指標として用いたシアノコバラミンと同じ溶出時間に, 361nm と278nm の両方で吸光を持つ物質が検出された (図 2). そこで, この画分を濃縮し, 200nm から600nm の範囲における吸収スペクトルを測定した. 吸収極大波長は278nm 付近では観察できなかったが, 361nm と550nm で吸収極大波長が観察され, 特に361nm で非常に顕著に吸収スペクトルが観察された (図 3 B). 278nm 付近の吸収は核酸やオリゴペプチドにも存在するため, これら夾雑物の吸収がバックグラウンドとして検出されたと

考えられる. 逆相カラムにおける結果 (図 2) とこの吸収スペクトルパターンの結果 (図 3 B) から, 得られた最終画分にはシアノコバラミンに特徴的な278, 361, 550nm の吸収を持つと考えられる物質が存在し, このことからこの画分にシアノコバラミンが含まれていると考えられた. しかしながら, このスペクトルパターンは完全にシアノコバラミンのパターンと一致しなかったことから (図 3 AおよびB), 得られた最終画分にはシアノコバラミン以外の成分が含まれていることが予想された.

そこで, この画分にシアノコバラミンが含まれていることを確認するため, 質量分析を行った. その結果, シアノコバラミン (1331.42) と非常に近い分子量のシグナル (1346.38) が得られた (表 1). この分子量の違いは, ビタミン B₁₂ は複雑な化合物であることから, モウソウチク由来のビタミン B₁₂ 類似体はどこかで修飾を受けていると考えられた. 分子量的には, 生体内で存在するビタミン B₁₂ の類似体であるヒドロキシコバラミンと同じであるが, これは上方配位子がシアノ基から水酸基に置換されており, 今回抽出したタケノコ由来のビタミン B₁₂ 類似体は抽出段階で上方配位子をシアノ基に置換しているため, これらは同一ではないと思われる. 即ち, タケノコ由来のビタミン B₁₂ 類似体の分子量の違いは上方配位子以外の部分が修飾されていると考えられる. こ

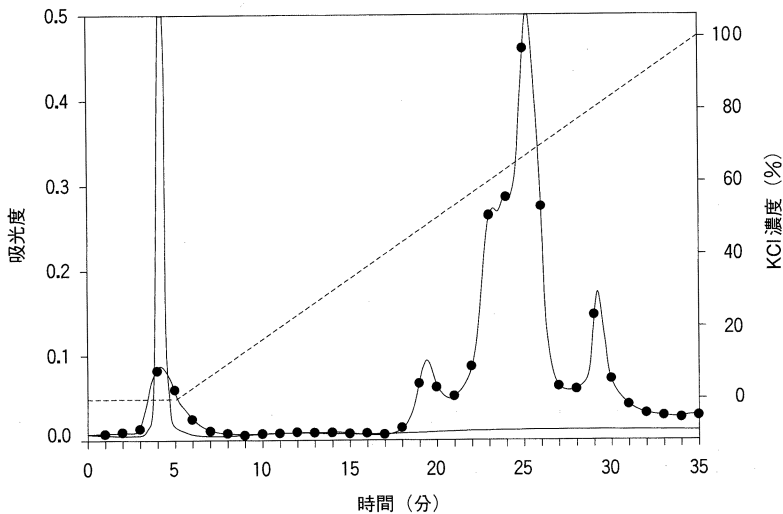


図 1 0.1% KCN を含む緩衝液によるモウソウチク由来の粗抽出液における陰イオン交換カラムの溶出パターン
 ビタミンB₁₂粗抽出液を濃縮したあと, 陰イオン交換カラムにおいて分離した.

●: 361nm におけるモウソウチク由来粗抽出液の溶出パターン. 実線: 361nm におけるシアノコバラミンの溶出パターン. 破線: KCl の濃度勾配.

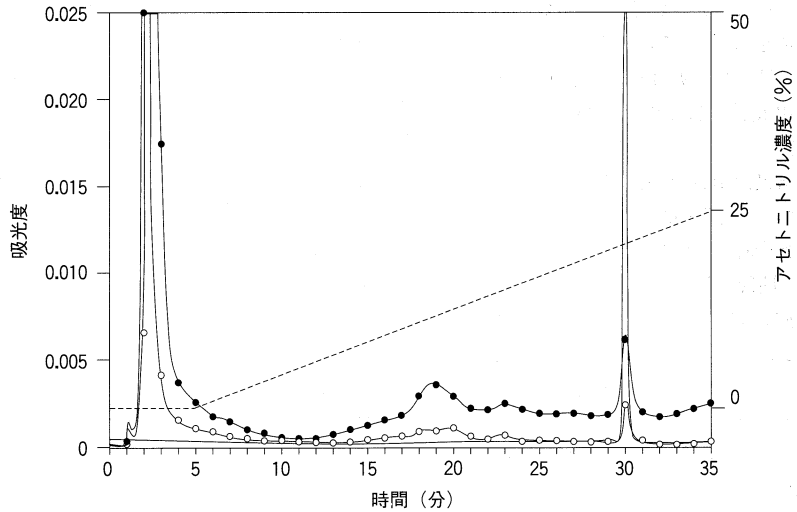


図2 0.1% KCNを含む緩衝液によるモウソウチク由来の粗抽出液における逆相カラムの溶出パターン
陰イオン交換カラムの非吸着画分を濃縮した後、逆相カラムにおいて分離した。
●：278nmにおけるモウソウチク由来粗抽出液の溶出パターン。○：361nmにおけるモウソウチク由来
粗抽出液の溶出パターン。実線：361nmにおけるシアノコバラミンの溶出パターン。破線：アセトニ
トリルの濃度勾配。

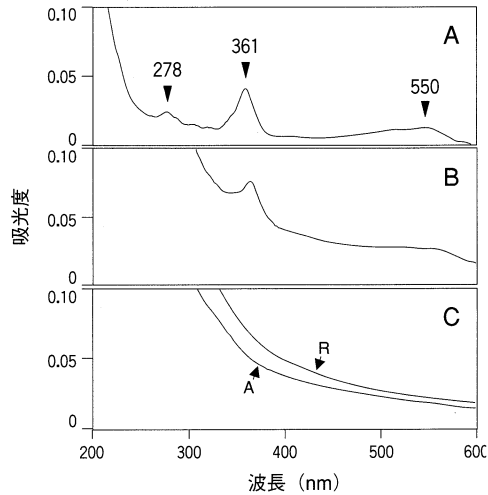


図3 最終画分における200~600nmにおける吸収波長

指標として用いたシアノコバラミンおよび、モウソウチク、イネ芽生え、アスパラガス幼少体における最終画分の200~600nmにおける吸収波長を示した。

A：シアノコバラミン。吸収極大波長278nm, 361nm, 550nmを矢頭で示した。B：0.1% KCNを加えて抽出したモウソウチク由来の最終画分の吸収波長。C：0.1% KCNを加えて抽出したイネ芽生え (R) およびアスパラガス幼少体 (A) 由来の最終画分の吸収波長。

表1 ビタミンB₁₂類似体の分子量

	分子量	上方配位子
タケノコ由来 ビタミンB ₁₂ 類似体	1346.38	-CN
シアノコバラミン	1331.42	-CN
ヒドロキシコバラミン	1346.4 ⁽¹⁰⁾	-OH
メチルコバラミン	1344.4 ⁽¹⁰⁾	-CH ₃
アデノシルコバラミン	1579.6 ⁽¹⁰⁾	-adenosine

れを明らかにするためには、今後、核磁気共鳴等による詳細な構造解析が必要と思われる。また、この質量分析の結果、ビタミンB₁₂類似体以外の低いシグナルも検出され（結果は示さない）、完全に精製できていないことが明らかとなった。

以上の結果から、モウソウチクにはビタミンB₁₂類似体が含まれていることが確認できた。この画分はKCN添加により検出できたことから、タケ幼少体内ではシアノコバラミンではなく、動物性食品に含まれるアデノシルコバラミンやヒドロキシコバラミンで存在していることが示唆された。しかしながら、タケノコに含まれるビタミンB₁₂類似体が補酵素型ビタミンB₁₂と同等のはたらしをするか否かは、今後糸状菌等を用いたバイオアッセイなどを行うことによって確認していく必要がある。また、今回のビタミンB₁₂類似体分離方法では、完全なシアノコバラミンの精製はできていないが、シアノコバラミンの検出には十分に利用可能であると考えられる。

(2) ビタミンB₁₂類似体の定量

モウソウチクおよび近縁種であるハチクを用いて、上述した方法に従ってビタミンB₁₂類似体の分離を行い、シアノコバラミン相当量として生重量当たりについて計測した。逆相カラムにおける361nmの溶出ピークは、278nmや550nmに比べ吸収スペクトルがスタンダードのシアノコバラミンに近く夾雑物の影響が少ないと考えられたため（図3B）、この溶出ピークの積分値をスタンダードに用いたシアノコバラミンの溶出ピークを基準として、生重量100gあたりに含まれるシアノコバラミン量の算出を試みた。また、植物試料はそれぞれ内部組織（可食部）及び皮組織（可食部以外）に分離し、それぞれ生重量400gから抽出、分離したビタミンB₁₂類似体の量を算出した。その結果（表2）、どの組織においてもハチクよりモウソウチクでシアノコバラミン量が若干多く、また、どちらのタケにおいても皮組織よりも内部組織に倍以上多く含まれていることが明らかとなった。上田によって引用されている松岡の結果⁶⁾と比較すると今回の定量値は若干低い値となった（表2）。松岡

表2 タケ種間におけるビタミンB₁₂量の比較

	シアノコバラミン量*	
	モウソウチク	ハチク
内部組織（可食部）	1.07	0.92
皮組織（可食部以外）	0.36	0.18
松岡の結果 ⁶⁾ （可食部上部）	3.01	3.69

*生重量100gあたりのシアノコバラミン量（ μg ）

の結果は可食部上部に限定しているため、今回の結果はそれより値が低くなったと考えられる。以上のことから、ここで確立した分離方法によって、逆相カラムにおける361nmの溶出ピークの面積から、ある程度のビタミンB₁₂類似体含有量が予想できると思われる。

さらに、このことを確認するため、マダケ属が含まれるイネ科植物であるイネの芽生えおよび、マダケ属と同じ単子葉植物であるアスパラガス幼少体についてもビタミンB₁₂の存在を調べた。これらの植物は、一般にビタミンB₁₂を含まないと考えられている^{1,2)}。イネ芽生え及びアスパラガス幼少体から最終的に得られた逆相カラム画分の200nmから600nmの範囲における吸収スペクトルを調べた。その結果、イネ芽生えおよびアスパラガス幼少体には、この範囲においてシアノコバラミンに特有な吸収極大波長は検出されなかった（図3C）。この結果から、これらの植物にはビタミンB₁₂は含まれていないことを再確認し、この分離方法はビタミンB₁₂類似体の存在を調べるために有効な手段であると思われた。

五訂日本食品標準成分表²⁾では、高等植物（穀類、豆類、野菜類、果実類など）におけるビタミンB₁₂類似体含有量は全て推定値で示されている。ここで提案したビタミンB₁₂類似体分離方法において、イネ芽生えやアスパラガス幼少体には確かにビタミンB₁₂類似体が含まれていないことを再確認したが、タケ幼少体には松岡が報告したようにビタミンB₁₂類似体が含まれていることが明らかになった⁶⁾（表2）。一般に、ビタミンB₁₂類似体の摂取量は成人で2.4 μg /日とされている⁹⁾。今回の結果と松岡の報告⁶⁾とを合わせて考えると、マダケ属幼少体中でビタミンB₁₂類似体は内部組織の先端部分に特異的に存在している可能性も考えられる。もしタケノコに含まれるビタミンB₁₂類似体が生体内において補酵素型ビタミンB₁₂と同様の活性を示すか、もしくは補酵素型ビタミンB₁₂へ転換することができるならば、一日の摂取量をタケノコのみでまかなうことができるかもしれない。

高等植物のビタミンB₁₂含有については、ビタミン

B₁₂が多く含まれる土壌などに生育した場合、根からある程度吸収するため、これを含む場合がある³⁾。今回の実験において、モウソウチクおよびハチクの幼少体からビタミン B₁₂ 類似体が検出されたが (表 2)、このモウソウチクおよびハチクはそれぞれ異なる産地で育成していたものを用いている (2. 実験方法参照)。これらのタケ幼少体が育成した、どちらの土壌にもビタミン B₁₂ が豊富に存在しているとは考えにくい。それゆえ、タケ幼少体は、ビタミン B₁₂ 類似体を合成するか、もしくはビタミン B₁₂ 類似体を吸収し、検出するために充分な量を蓄積することができると思われる。

また、松岡は、クワイにもビタミン B₁₂ が存在することを示唆している⁶⁾。このことから、いままでビタミン B₁₂ が含有しないと考えられていた食品野菜にもビタミン B₁₂ が存在すると考えられ、少なくとも食品に用いられている高等植物におけるビタミン B₁₂ 含有量を再測定する必要があるかもしれない。

今回の実験結果において、タケ幼少体からビタミン B₁₂ 類似体と考えられる物質を見出すことができた。今後の課題として、この物質が生体内で補酵素型ビタミン B₁₂ と同様にはたらくことを示したい。また、質量分析の結果から、シアノコバラミンと分子量に差が見られたことから、構造解析などによりどのように修飾を受けているのか調べていく必要があると考えられる。

4. 要 約

ビタミン B₁₂ 類似体が含まれると考えられている高等植物であるタケ幼少体を用いて、ビタミン B₁₂ 類似体を簡便な同定方法により検出できた。

抽出緩衝液に0.1% KCN を加え、陰イオン交換カラムおよび逆相カラムを用いてビタミン B₁₂ 類似体をタケ幼少体から分離した。指標として用いたシアノコバラミンと同じ溶出時間の画分中に、361nm と550nm で吸収極大波長が観察され、特に361nm で非常に顕著に吸収スペクトルが観察されたことから、この画分にシアノコバラミンが含まれていると考えられた。質量分析を行ったところ、シアノコバラミン (1331.42) と非常に近い

分子量のシグナル (1346.38) が得られ、ここで紹介した方法で、シアノコバラミンを検出できると考えられた。さらに、一般にビタミン B₁₂ 類似体を含まないと考えられているイネ芽生え及びアスパラガス幼少体の粗抽出液を同様の方法において分離後、最終的に得られた画分の200nm から600nm の範囲における吸収スペクトルを調べた結果、どちらの植物からもシアノコバラミンに特有な吸収極大波長は検出されなかった。このことから、これらの植物にはビタミン B₁₂ は含まれていないと考えられ、この分離方法はビタミン B₁₂ 類似体の検出に有効な手段であると思われる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、質量分析機の使用において便宜を図っていただいた姫路工業大学大学院理学研究科の若林貞夫助教授に厚くお礼申し上げます。また本原稿を作成するに当たり、様々なご助言を頂きました大阪市立大学大学院生活科学研究科の平井和子教授に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 福井三郎：8 ビタミンB₁₂, ビタミン学[Ⅱ], 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 477-549 (1980)
- 2) 科学技術庁資源調査会編：五訂日本食品標準成分表, 大蔵省印刷局, 東京 (2000)
- 3) 佐藤一精：哺乳動物中で機能しているビタミンB₁₂酵素, ビタミン, **69**, 191-198 (1995)
- 4) Poston J. M. and Hemmings B. A.: *J. Bacteriology*, **140**, 1013-1016 (1979)
- 5) Watanabe F., Takenaka, S., Katsura, H., Masumder, S. A. M. Z. H., Abe, K., Tamura, Y., and Nakano, Y.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2341-2343 (1999)
- 6) 上田弘一郎：竹と日本人, 日本放送出版協会, 東京, 43 (1983)
- 7) 福井三郎：日本生化学会編, ビタミンと補酵素 (下), 東京化学同人, 東京, 428 (1975)
- 8) 安部捷男：食品中のビタミンB₁₂, 日本放送出版協会, 東京 (1988)
- 9) 香川芳子：五訂食品成分表, 女子栄養大学出版部, 東京 (2001)
- 10) 日本生化学会編：生化学データブック I, 東京化学同人, 東京, 1249 (2000)