

(様式第 1 3 号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 岡本 奈穂

題目: Occurrence and Characterization of Naturally Occurring and Unnatural Inactive Corrinoid Compounds in Food
(食品に含まれる天然型および非天然型不活性コリノイド化合物の存在と特徴)

コリノイド化合物であるビタミン B₁₂(B₁₂)は一部の細菌や古細菌のみで生合成され、これら細菌との相互作用や食物連鎖を通して高等動物の体内に蓄積される。よって、ヒトにとって、動物性食品(畜肉、牛乳、鶏卵、魚介類)が B₁₂ の良い供給源となっている。しかし、一部の食用貝類などでは、B₁₂ の下方配位子の塩基 5,6-ジメチルベンズイミダゾルがアデニンに置換され、ヒトで生理的に不活性なシュード B₁₂ が含まれていることが報告されている。そこで、本研究では日本人にとって主要な B₁₂ 供給源である魚介類の中で特に情報が乏しい甲殻類のエビに含有される B₁₂ 化合物について検討した。

日本食品標準成分表に準じて *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830 を用いた微生物学的定量法により B₁₂ 含量を測定した結果、アマエビなど 4 種の食用エビ筋肉部の B₁₂ 含量は湿重量 100 g あたり約 2.4–4.3 μg となり、日本食品標準成分表に記載されている B₁₂ 含量とほぼ同程度であった。一方、一般にミソと呼ばれる頭部内臓部(肝臓部)には湿重量 100 g あたり約 12.5–33.2 μg の B₁₂ が検出され、頭部内臓部に高濃度の B₁₂ が蓄積していることが明らかとなった。そこで、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析(LC/ESI-MS/MS)を用いて食用エビに含まれる B₁₂ 化合物を精密分析した結果、筋肉部に含まれるコリノイドは B₁₂ のみであったが、頭部内臓部では B₁₂ と未同定の 2 種類の B₁₂ 化合物が検出された。質量分析のデータから 2 種類の未同定化合物は、B₁₂ のコリン環の質量が 1 (化合物 A) 及び 2 (化合物 B) 大きい化合物であることが推察された。化合物 A を B₁₂-*d*-モノカルボン酸と同定したが、化合物 B は同定することができなかった。コリン環の質量から B₁₂ ジカルボン酸であると推定した。以上の結果から、食用エビの頭部内臓部に含まれる B₁₂ 化合物の約 18–65% がヒトで生理活性を有しない B₁₂-*d*-モノカルボン酸と B₁₂ ジカルボン酸(非天然型不活性コリノイド)であることが明らかとなった。

次に、世界の食料安全保障に寄与する可能性を持つことで近年注目されている食用昆虫に

着目した。食用昆虫はタンパク質や脂質などのマクロ栄養素を豊富に含むことが知られているが、ビタミンなどの微量栄養素に関する情報は乏しく、特に食用昆虫に含まれる B₁₂ 化合物についての情報は無い。そこで、食用昆虫の中で世界的に流通しているコオロギ製品に含まれる B₁₂ 化合物を LC/ESI-MS/MS を用いて精密に分析した。市販のコオロギ製品に含まれる B₁₂ 化合物は、シュード B₁₂ が約 74%、塩基が 2-メチルメルカプトアデニンに置換された factor S が約 21%、B₁₂ は約 5% となり、シュード B₁₂ と factor S はヒトにおいて生理的に不活性なコバミド（天然型不活性コリノイド）である。コオロギの飼育実験から、これら天然型不活性コリノイドはコオロギの腸内細菌により合成された可能性が示唆された。

次に、過去に我が国で食品添加物として使用されていた塩素系抗菌剤と B₁₂ が反応することで、非天然型不活性コリノイドの B₁₂[ϵ -ラクトン]が生成し、一部の乾燥キノコから B₁₂[ϵ -ラクトン]が検出されたことから、食品添加物が B₁₂ の化学構造や生物活性に及ぼす影響について検討した。予備実験から次亜塩素酸水、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムを B₁₂ の紫外可視吸収スペクトルに影響を及ぼす食品添加物として選別した。次亜塩素酸水(有効塩素濃度 30 ppm)処理によって、B₁₂ に特有な 361 nm と 551 nm の最大吸収が反応時間 1 時間で完全に消失した。また、次亜塩素酸水と B₁₂ との反応によって生成する複数の化合物を単離し、¹H NMR を用いて構造解析した結果、反応生成物はコリン環の側鎖が修飾された構造を有しており、B₁₂ 化合物類に広い生育スペクトルを示す B₁₂ 定量用大腸菌においても B₁₂ 活性を示さなかった。一方、ピロ亜硫酸ナトリウムと亜硫酸ナトリウム処理は、B₁₂ に特異的な吸収スペクトルを著しく変化させなかったが、B₁₂ の一部をスルフィト B₁₂ に変化させた。また、これら食品添加物が、実際の食品中の B₁₂ 含量に及ぼす影響を検討した。各食品添加物で赤エビと牛ミンチ肉を処理した結果、いずれの食品添加物処理においても食品中の B₁₂ 含量の減少は認められなかった。これは食品中の B₁₂ のほとんどがタンパク質に結合して存在しているため、食品中の B₁₂ と食品添加物の反応が緩和されたために、B₁₂ 含量が減少しなかったと推察した。

以上、本研究結果から、食品中には細菌が産生するシュード B₁₂ や factor S などの天然型不活性コリノイドと食品添加物や生体内での反応により B₁₂ の修飾・分解により生成する B₁₂- d -モノカルボン酸や B₁₂ ジカルボン酸などのような非天然型不活性コリノイドの 2 種類が存在することを明らかにした。