植物性食品材料中のチアミン結合物質の存在について

光 永 俊 郎*, 菴 田 良 子*, 井 上 淳 子*
清 水 まゆみ*, 岩 島 昭 夫**

* 京都女子大学家政学部食物学科

** 京都府立医科大学学生化学研究室

Occurrence of Thiamine-binding Substances in Plant Foodstuffs

Toshio MITSUNAGA,* Yoshiko ANDA,* Atsuko INOUE,*
Mayumi SHIMIZU* and Akio IWASHIMA**

* Department of Food Science, Faculty of Home Economics, Kyoto Women's
University, Kyoto, 605

** Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of
Medicine, Kyoto, 602

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 37, 139~143 (1984)

Thiamine-binding substances were found in 23 plant foodstuffs such as wheat germ, corn, buckwheat, sesame, radish, green tea, etc. They appeared to be two kinds of substances; one is heat-labile and pronase-sensitive, and the other is heat-stable and pronase-resistant. It would be inferred that the former is protein and the latter is non-protein compound. The binding of thiamine to thiamine-binding proteins was hardly inhibited by thiamine pyrophosphate, oxythiamine and pyrithiamine suggesting that the binding is specific to thiamine.

Furthermore, the thiamine-binding activity in buckwheat seed gradually decreased during 5 days' germination and disappeared over 90 per cent of the initial activity on the 5th day. These metabolic changes in thiamine-binding protein may be involved in the germination of buckwheat seed.

(Received August 17, 1983)

近年、チアミンと特異的に結合し、チアミンの輸送や貯蔵に関与すると考えられるタンパク質が微生物^{1)~6)}や動物組織⁷⁾⁸⁾中に見いだされ、それらのタンパク質化学的性質についても検討されている。一方、最近、米ぬかからチアミン結合タンパク質が部分精製され⁹⁾、植物界にはじめてその存在が示された。そこでわれわれは種々の植物性食品材料を用いて、チアミン結合能を有する物質の存在とその分布について検索し、これらの食品中にタンパク性・非タンパク性のチアミン結合物質がかなり広く存在することが明らかとなったので報告する。

実験方法

1. 材料

試料として、穀類（小麦粉、小麦胚芽、小麦粳、そば、とうもろこし）、いも類（じゃがいも、さつまいも、さといも）、種実類（ごま、落花生、ひまわりの種、栗、

くるみ）、豆類（大豆、小豆、いんげん豆、えんどう、そら豆）、野菜類（大根、パセリ、キャベツ、にんじん、なす）、果実類（りんご、みかん、いちご）、きのこ類（しいたけ、えのきだけ）、藻類（昆布、わかめ）、嗜好品類（抹茶）の計 31 種類を選び、それぞれ市販品を購入して実験に供した。これらの試料のうち、小麦胚芽、ごま、落花生、くるみ、大豆は石油エーテルで脱脂後、粉碎して使用した。

2. 試料液の調製

穀類、種実類、豆類、藻類および抹茶は、それぞれの粉砕物に対して同重量の海砂と少量の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) を加え、乳鉢中で混合磨砕し、ペースト状にした。これに 10 倍量の同緩衝液を加え、十分混合した。またその他の試料は細断、もしくはおろし金でおろした後、少量の海砂を加え、乳鉢中で混合磨砕した。これに 5 倍量の上記緩衝液を加えて十分混合した。各混合液は 4℃ で 2 時間放置後、遠心分離 (10,000 g, 15 分間) し、得られた上清

* 〒605 京都市東山区今熊野北日吉町 35

** 〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465

を緩衝液に対して24時間透析した。透析後タンパク質濃度を測定し、4 mg/ml 以上の場合は適当に希釈し、4 mg/ml 以下のものはそのまま試料液として用いた。

3. タンパク質の定量

卵白アルブミン (Sigma Grade V No. A 5503) を標準タンパク質として Lowry らの方法¹⁰⁾で測定した。

4. チアミン結合能の測定

各試料液 3.0 ml を透析チューブに入れ、0.5 μ g/ml のチアミン塩酸塩を含む 0.05M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) 500 ml 中で 4°C, 48 時間透析した後、透析内・外液中のチアミン濃度をチオクロム蛍光法¹¹⁾により測定した。試料のチアミン結合量は透析内・外液のチアミン濃度の差より求め、タンパク質 1 mg 当たりチアミン 1 μ g の結合量を 1 unit として表わした。

実験結果

1. 植物性食品中のチアミン結合物質の分布

各試料液および 100°C で 10 分間加熱処理した後の試料液について、チアミン結合能の測定を行なった結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 (A) に示す 12 種類の試料はチアミン結合能が認められたが、熱処理すると結合性がほとんど失われた。これに対して Fig. 1 (B) に示す 11 種類の試料はそれぞれ結合能を有するが、熱処理による結合活性の損失はなく、多くは逆に増加が認められた。さらに供試した試料のうち、小麦粉、じゃがいも、落花生、大豆、小豆、いんげん豆、しいたけ、わかめの 8 種類の食品材料中には、用いた測定条件下ではチアミン結合能が認められなかった。これらの実験結果より、植物性食品材料にはチアミン結合物質を含むものと含まないものとがあり、チアミン結合物質には熱に対して安定なものと不安定なものの 2 種類が存在し、前者はタンパク質で、後者は非タンパク性物質であることが推定された。

2. チアミン結合物質のプロナーゼに対する挙動

チアミン結合物質がタンパク質と考えられる試料を中心にプロナーゼに対する挙動を調べた。検討試料として、小麦胚芽、そば、ひまわりの種、ごまを選び、比較試料として大根および抹茶を用いた。各抽出液 (タンパク質濃度 4 mg/ml) 4 ml に対して、プロナーゼ溶液 (4 mg/ml) 1 ml を加え、pH 7.0, 37°C で一定時間反応させた。反応後 4°C でチアミン結合能を測定した。同濃度に調製した各抽出液にプロナーゼを加えた混合液を対照として結合能を測定し、それぞれの試料について時間経過に伴う失活率を求めた。その結果は Fig. 2 のようになり、抹茶および大根では反応 2 時間までまったく変化が認められないのに対して、小麦胚芽、そばは 1 時間で約 50%、2 時間で 80~90% の失活が認められた。さらにごま、ひまわりの種は 1 時間で 90% もの失活を示した。

Fig. 1. Thiamine-binding activities of foodstuffs. The detailed conditions are described in the text. (A) Heat-labile substances, (B) heat-stable substances.

Slashed bar: thiamine-binding activity before heat-treatment, blank bar: thiamine-binding activity after heat-treatment.

したがって植物性食品中の易熱性チアミン結合物質は

Fig. 2. Changes of thiamine-binding activities by pronase digestion.

△ Raddish or green tea, ● wheat germ, ▲ buckwheat, ■ sesame, ○ sunflower seed.

チアミン結合タンパク質とみなしてよいと考えられた。

3. タンパク質濃度とチアミン結合量

各試料液のタンパク質濃度を変えることによって、チアミン結合量がどのように変化するかを調べ、結果を Fig. 3 に示した。さきに述べた 1, 2 の結果とあわせ、ひまわりの種、そば、小麦胚芽、ごまよりの試料とチアミンとの結合にはタンパク質濃度に対する依存性のあることが認められた。

4. タンパク性結合物質によるチアミン結合反応について

小麦胚芽、そば、ごま、ひまわりの種の 4 種類のタンパク性結合物質を含む各試料液について、チアミンとの結合の最適 pH を調べた結果、それぞれ、ほぼ pH 7.0, 6.6, 7.4, 6.6 に最大結合能が認められた。

またチアミン (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に対してモル比で 50 倍量のチアミンピロリン酸、オキシチアミン、ピリチアミンの共存する緩衝液中で、小麦胚芽とそばの試料液について平衡透析を行なった結果を Table 1 に示した。チアミン結合量には有意な変化が認められず、チアミン結合反

Fig. 3. Dependence of protein contents on thiamine binding.

Symbols are the same as in Fig. 2.

応のこれら誘導体による阻害は観察されなかった。このことは植物性食品中に含まれるチアミン結合タンパク質のチアミンに対する高い特異性を示唆するものと考えられる。

5. 植物の発芽に伴うチアミン結合能の変化

タンパク性チアミン結合物質が主として種子に存在するので、そば種子を選び、発芽によるチアミン結合能の変化について調べた。実験には 1981 年北海道産のそば種子を用いたが、この種子の発芽率は 75% であった。各 10.0 g のそば種子を蒸留水に 2 時間浸漬した後、ガーゼをしいたバット内で 24~28°C で適宜水を補給しながら発芽させ、5 日間の発芽過程におけるチアミン結合能の変化を測定した。対照として 10.0 g のそば種子をバット内で水に浸し、空気を遮断した状態で放置し、5 日間のチアミン結合能の変化を測定した。チアミン結合能の測定は、各段階の発芽種子全体に 10 g の海砂を加えて乳鉢中で磨砕し、次に少量の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) を加えてペースト状にし、さらに混合磨砕後、50 ml の同緩衝液を加えて混

Table 1. Effect of thiamine derivatives on binding of thiamine to wheat germ and buckwheat thiamine-binding proteins.

Each thiamine derivatives was added to the dialyzing buffer simultaneously with thiamine at molar ratio as indicated, the thiamine-binding activity then being assayed by equilibrium dialysis.

Addition	Molar ratio to thiamine	Thiamine-binding (%)	
		Wheat germ	Buckwheat
None	0	100.0	100.0
Thiamine pyrophosphate	50	102.5	98.2
Oxythiamine	50	98.7	95.6
Pyrithiamine	50	97.5	99.3

Fig. 4. Changes of thiamine-binding activity in buckwheat during germination.

The activity was measured using 10.0 g germinated seeds and the remaining activity was expressed with ratio against the binding capacity of ungerminated seeds.

▲ Control, ● germinated seeds.

合した。これを4℃で2時間放置した後、遠心分離し、得られた上清についてチアミン結合能を測定した。結果は、Fig. 4に示すように、対照はチアミン結合活性の変化を示さなかったが、発芽種子は発芽とともに活性が低下し、3日目では未発芽種子に比べ75%，5日目では90%も失活した。

考 察

31種類の植物性食品材料についてチアミン結合能を有する物質の存在と分布について調べた結果、23種類の食品材料中にチアミン結合能が認められた。このうち、そばなど12種類の食品中の結合物質は熱に対して不安定であり、プロナーゼ処理によりその結合能を失うことや、また試料液のもつ結合能がタンパク質濃度依存性のあることなどより、本物質がチアミン結合タンパク質であると推定した。すでに報告されている微生物¹³⁾⁴⁾⁶⁾や動物組織¹²⁾のチアミン結合タンパク質のチアミンとの結合がチアミンリン酸エステルやチアミン誘導体により強く阻害されるのに対し、植物性のチアミン結合タンパク質がこれらの影響を受けず、チアミンに対する特異性が高いことを示唆することは、種子を含め一般に植物組織中のチアミンは遊離型が多い¹³⁾ことに関連して興味深いと考えられる。また、これらの事実は本タンパク質がその生理機能として植物中におけるチアミンの貯蔵に関与していることを推察させるが、大豆、小豆、いんげん豆などの種子の一部にはチアミン結合能が認められなかったり、またチアミン結合能と比較して種子中のチアミン含量が多いことなどはこの推論を支持せず、これらの点についてはさらに検討が必要である。

植物のチアミン結合タンパク質が穀類、種実類、豆類およびいも類など植物体にとって種子的性質をもつ部分に含まれていることより、種子の発芽との関係をそば種子を選んで調べると、発芽に伴ってチアミン結合タンパク質の結合活性が減少し、発芽5日目では失活することがわかった。これに対して、種子を水浸し空気を遮断して発芽できない条件下では、結合能は変化が認められなかった。これらの結果より、チアミンの遊離を伴うチアミン結合タンパク質の動態が種子の発芽になんらかの関連をもつことが推測された。

一方、植物性食品の中には耐熱性のチアミン結合物質の存在も認められた。これらの結合物質はプロナーゼ処理により影響を受けないので非タンパク性物質と推察されたが、さらにこれらについて、抹茶、大根を選び予備的に結合物質の単離を試みた。その結果、抹茶においてはクロロフィルを含む画分に、大根では炭水化物を含む画分にチアミン結合活性が移行した。結合物質が色素もしくは炭水化物であることの予測ができるが、物質としての同定やその存在意義に関しては今後の検討に待たなければならない。

要 約

- 1) 31種類の植物性食品材料中、23種類に平衡透析法によりチアミン結合能が認められた。このうち、そばなど12種類の結合物質は熱に対して不安定であり、大根など11種類の結合物質は安定であった。
- 2) 熱に不安定な結合物質はプロナーゼ処理で失活し、チアミン結合能はタンパク質濃度依存性を示したことより、チアミン結合タンパク質と推定した。
- 3) チアミン結合タンパク質とチアミンとの結合はチアミン誘導体により影響を受けないことから、反応の特異性が高いことが推定された。
- 4) そば種子について発芽時におけるタンパク性チアミン結合能の変化を調べると、発芽に伴って失活することがわかった。
- 5) 植物性食品中に含まれる熱に安定なチアミン結合物質はプロナーゼ処理による活性の変化が認められないことより、非タンパク性の物質であると推定した。

文 献

- 1) Nishimune, T. and Hayashi, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 573 (1971)
- 2) Iwashima, A., Matsuura, A. and Nose, Y.: *J. Bacteriol.*, **108**, 1419 (1971)
- 3) Griffith, T. W. and Leach, F. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 658 (1973)
- 4) Henderson, G. B., Zevely, E. M., Kadner, R. J. and Huennekens, F. M.: *J. Supramol. Struct.*, **6**, 239 (1977)

- 5) Iwashima, A., Nishimura, H.: *Biochem. Biophys. Acta*, **577**, 217 (1979)
- 6) Iwashima, A., Nishimura, H. and Nose, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **577**, 460 (1979)
- 7) Muniyappa, K. and Agida, P. R.: *Biochem. J.*, **177**, 887 (1979)
- 8) Muniyappa, K., Murthy, U. S. and Agida, P. R.: *J. Steroid Biochem.*, **9**, 888 (1978)
- 9) Nishino, A., Nishino, H. and Iwashima, A.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 415 (1980)
- 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 11) Association of Vitamin Chemist(ed.): *Methods of Vitamin Assay*, 2nd Ed., 107 (1951), Wiley Interscience (New York)
- 12) Muniyappa, K. and Adiga, P. R.: *Biochem. J.*, **193**, 679 (1981)
- 13) 藤田秋治: ビタミン定量法, 273 (1955), 南江堂 (東京)

(昭和 58 年 8 月 17 日受理)