

## ビタミン B<sub>12</sub> 要求性大腸菌変異株を用いる B<sub>12</sub> 定量に 阻害を及ぼす酵母エキス成分について

野田 裕子, 大杉 匡弘

(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科食品微生物学研究室)

### Inhibitory Effect of Yeast Extract Components on the Determination of Vitamin B<sub>12</sub> with a Mutant of *Escherichia coli*

Hiroko Noda and Masahiro Ohsugi

Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Sciences and Nutrition,  
School of Human Life and Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

During the course of investigation of vitamin B<sub>12</sub> production by microorganisms, we found that yeast extract interfered the response of an *Escherichia coli* mutant to vitamin B<sub>12</sub>. The interfering components of yeast extract was investigated. The yeast extract components, glutamic acid and PQQ (pyrroloquinoline quinone) were the main interfering substances caused a 50% decrease in response. Besides yeast extract, meat extract, corn steep liquor, peptone etc, reduced while none of liver extract and malt extract interfered the apparent vitamin B<sub>12</sub>-activity.

### 緒 言

ビタミン B<sub>12</sub> の定量法として、B<sub>12</sub> の光学的特性を利用した比色定量法<sup>1)</sup>があるが、微量分析には適さないことが欠点である。また、総コバラミン量については、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 のグリセロールデヒドラーゼ<sup>2)</sup>、又特に、アデノシルコバラミンについてはジオールデヒドラーゼ<sup>3)</sup>を用いる酵素的定量法などがあるが、微生物学的定量法はほとんどサンプルの精製を必要とせず、微量分析にはすぐれている。しかし微生物学的定量法は、試料に抗生物質などの生育阻害物質や、逆に、生育促進物質が存在すると、実際の B<sub>12</sub> の量と異なった定量値となることが欠点である。

B<sub>12</sub> の定量菌としては、主に、*Euglena gracilis*<sup>4,5)</sup>、*Ochromonas malhamensis*<sup>6,7)</sup>、*Lactobacillus leichmannii*<sup>8,9)</sup>そして *Escherichia coli*<sup>10,11)</sup> が用いられる。*E. coli*による定量は、定量に長時間を要する *E. gracilis* や *O. malhamensis*、また培地組成の複雑な *L. leichmannii*

に比べ操作が簡単で短時間でできる。*E. coli* Davis 113-3 菌株は、Davis と Mingioli により分離された紫外線照射によるメチオニン要求性変異株である。

我々は、*E. coli* による微生物学的定量法において、微生物の培養にしばしば用いられる生育因子を含む栄養源、特に酵母エキス、肉エキスやペプトンなどが B<sub>12</sub> 測定値に阻害的な影響を及ぼすことを見い出した。本報においては、B<sub>12</sub> 定量に対する阻害物質について検討した結果を報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

B<sub>12</sub> の定量菌として、*E. coli* Davis 113-3 菌株を用いた。

#### 2. 培地

##### i) 接種用培地

1% グルコース、0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.05% Na<sub>3</sub>·citrate·2H<sub>2</sub>O から成る Davis と Mingioli の培地

(pH7.0)<sup>10)</sup>に0.05%メチオニンを添加した。

ii) 定量用培地

Medium 1: 上記 i) の Davis と Mingioli の培地 (但し、メチオニンを含まない) に 1.5% 寒天を添加した。

Medium 2: Burkholder の培地<sup>12)</sup>、すなわち Medium 1 に 0.4% Asn, 0.01% Arg, 0.01% Glu, 0.01% Gly, 0.01% His, 0.01% Typ, 0.01% Pro を加えた培地を用いた。

### 3. 培養及び接種用菌体懸濁液の調製

上記 2. i) の接種用培地中で、37℃で20時間振とう培養を行なった。培養後、遠心分離 (5,000×G, 10分) により菌体を集め、グルコースを除いた Davis と Mingioli の培地で2回洗浄した菌体懸濁液 (OD<sub>610</sub> = 0.15) を得た。

### 4. 微生物学的定量法

滅菌した定量用培地に 0.02% 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド (TTC)<sup>13)</sup> 及び、菌体懸濁液を 0.2ml 加えた。TTC は、微生物の生育中に赤色のホルマザンに還元され生育帯の測定を容易にする。これをバイオアッセイ用プレートに流し込み固化させた。標準の B<sub>12</sub> として 0.01~2.0µg/ml のシアノコバラミン溶液、及び試料それぞれ 20µl を寒天培地上に滴下、37℃で16時間培養した。培養後、それぞれの *E. coli* の生育帯を測定し、得られた標準曲線より試料中の B<sub>12</sub> 量を求めた。

### 5. ゲルろ過

酵母エキスの水飽和溶液 1ml を、Sephadex G-25 (1.0×120cm) のカラムによりゲルろ過を行なった。流速は、4sec/drop で 50 本のフラクション (各 3ml) を得た。

### 6. 分析方法

上記 5. のゲルろ過の試料についてのアミノ酸の定量は日立アミノ酸自動分析計 835 型で行なった。

### 7. 試薬

天然の生育因子を含む栄養源として肝臓エキス (極東)、麦芽エキス (ナカライテスク)、肉エキス (1: Oxoid, 2: 極東, 3: 理研ビタミン油)、酵母エキス (1: オリエンタル酵母, 2: Difco)、コーンステープリカー (ナカライテスク)、ペプトン (Difco)、プロテオースペプトン (大五)、カザミノ酸 (日本) を用いた。B<sub>12</sub> (シアノコバラミン) はナカライテスク社製、PQQ は三菱ガス化学製のものを得た。その他は、市販の特級品を用いた。

## 結果及び考察

### 1. B<sub>12</sub> 定量における天然の栄養源の影響

各種天然の生育因子を含む栄養源の B<sub>12</sub> 定量における測定値の影響をみた。その結果を Table 1 に示す。肝臓エキス、麦芽エキス、一部の肉エキスの B<sub>12</sub> 測定値に対する影響はほとんどみられなかったが、酵母エキスは、カザミノ酸、ペプトンによる B<sub>12</sub> 測定値に対する顕著な阻害がみられた。

### 2. 酵母エキスのゲルろ過画分の B<sub>12</sub> 測定阻害

Table 1 で最も B<sub>12</sub> 定量の測定阻害が大きかった酵母エキス 2 のゲルろ過を行なった。ゲルろ過の各フラクションについて、B<sub>12</sub> 定量の測定阻害を検討した。Fig. 1 に示したように、フラクション No. 23~31 が B<sub>12</sub> 定量の測定阻害を示した。さらにこれらの画分にはアミノ酸が含まれており、アミノ酸分析した結果を Table 2 に示す。

Table 1. Effect of growth nutrients on B<sub>12</sub> assay

Growth nutrients	Inhibition (%)	Growth nutrients	Inhibition (%)
None	0	Yeast extract 1	52
Liver extract	0	Yeast extract 2	62
Malt extract	1	Corn steep liquor	21
Meat extract 1	28	Peptone	49
Meat extract 2	5	Proteose peptone	34
Meat extract 3	11	Casamino acids	60

Composition and sort of medium were described as those in Experimental except for that 1.0µg/ml of B<sub>12</sub> was contained. Concentration of Liver extract, Malt extract, Meat extract, Yeast extract and Corn steep liquor were 0.2% and of Peptone, Proteose peptone and Casamino acids were 2%.

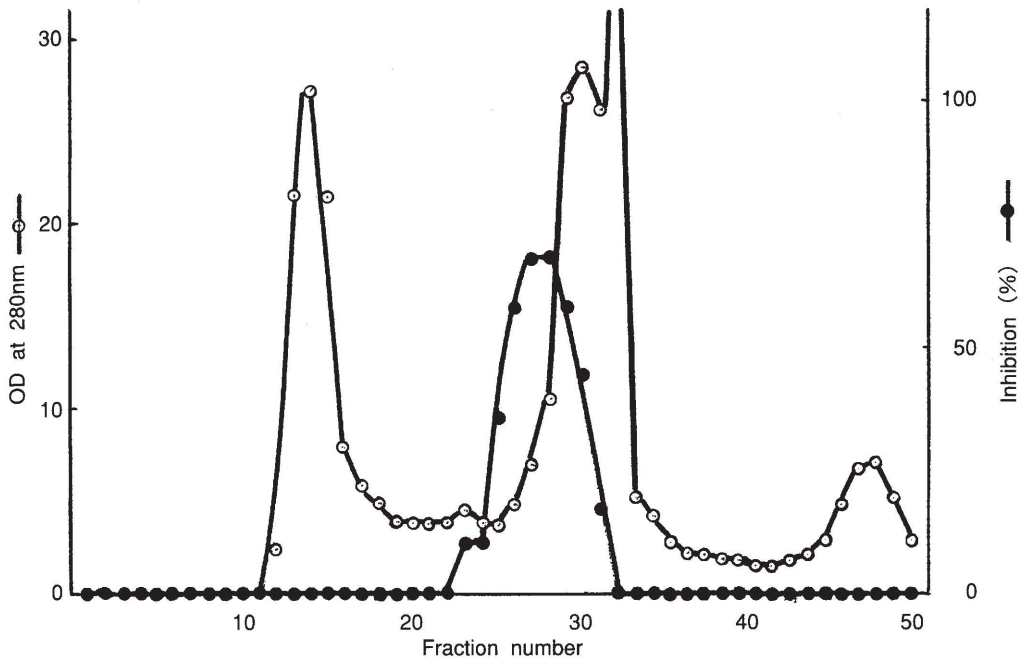


Fig. 1. Gel filtration of yeast extract on a Sephadex column

Table 2. Amino acid analysis of fraction No. 28

Amino acid	$\mu\text{mol/ml}$	Amino acid	$\mu\text{mol/ml}$
Hyp	0.12	Val	6.51
Asp	5.89	Met	2.24
Thr	5.42	Ile	5.58
Ser	7.07	Leu	9.44
Glu	16.09	Tyr	0.10
Pro	2.47	Phe	0.30
Gly	6.67	Lys	0.17
Ala	20.56	His	1.42
Cys	0.27	Arg	1.07

### 3. B<sub>12</sub> 定量におけるアミノ酸添加の影響

Table 2 の分析結果より、各種のアミノ酸添加下における B<sub>12</sub> 定量の影響を調べた。その結果を Table 3 に示す。Table 1 で示したように、酵母エキス 2 の 62% の測定阻害は、ゲルろ過画分フラクション No. 28 による測定阻害 (69%) と同程度であった。フラクション No. 28 (Table 2) の各種アミノ酸について B<sub>12</sub> 定量測定阻害について検討したところ、Asp, Glu, Val による測定阻害、その他約 10% 程度の Thr や Ala による阻害がみられた。Table 3 に示した実験における

アミノ酸濃度と Table 2 の分析で得られたフラクション No. 28 のアミノ酸濃度は、アミノ酸の種類において大きな差のあるものがあるので、Asp, Glu, Val の高濃度での測定阻害のデータが必要と考えられる。従って、Medium 1 の Davis と Mingioli の培地にはこれらアミノ酸は含まれていないので、測定阻害が起こることが明らかである。それに反して、Medium 2 の Burkholder の培地はこれら阻害を起こすアミノ酸が含まれているため、見かけ上の阻害がみられないことになるので、生育因子(アミノ酸など)を含む培養実験において B<sub>12</sub> を定量する場合は、Medium 2 の培地を用いることが適当といえる。

### 4. B<sub>12</sub> 定量における Glu と PQQ の影響

次に、定量用培地として Medium 1 と数種のアミノ酸を含む Medium 2 における Glu の測定阻害について比較検討した。また、酵母エキスの Sephadex G-25 カラムによるアミノ酸溶出画分には PQQ が含まれていることから<sup>14)</sup>、この PQQ についても同様に検討した。Table 4 に示した様に、Glu の阻害は Medium 1 で大きかったことは明らかである。しかしながら、Medium 1 および 2 で、PQQ による阻害が同程度にみられることがわかった。Glu と PQQ の共存下に B<sub>12</sub> の測定阻害がおこることが明らかになっ

Table 3. Effect of amino acids on B<sub>12</sub> assay

Amino acid	Concentration (μg/ml)	Inhibition (%)	Amino acid	Concentration (μg/ml)	Inhibition (%)
Asp	25	0	Val	25	0
"	50	13	"	50	1
"	75	19	"	75	3
"	100	25	"	100	8
"	125	19	"	125	12
"	150	22	"	150	18
Glu	25	5	Thr	125	10
"	50	16	Ser	125	0
"	75	22	Gly	125	0
"	100	24	Ala	125	9
"	125	24	Ile	125	0
"	150	24	Leu	125	0

Composition of Medium 1 was described in Experimental except for that each amino acid was added. Concentration of B<sub>12</sub> was 1.0 μg/ml.

Table 4. Effect of glutamic acid and PQQ on B<sub>12</sub> assay

B <sub>12</sub> (μg/ml)	additions	Inhibition (%)	
		Medium 1	Medium 2
0.02	None	0	0
	Glu	29.0	0
	PQQ*	27.5	15.0
	PQQ**	45.0	24.0
	Glu+PQQ*	46.5	15.0
	Glu+PQQ**	47.5	25.0
2.0	None	0	0
	Glu	17.5	7.0
	PQQ*	17.5	12.5
	PQQ**	21.0	26.5
	Glu+PQQ*	41.9	4.0
	Glu+PQQ**	23.0	5.0

Concentrations of Glu, PQQ\* and PQQ\*\* were 125 μg/ml, 0.25 ng/ml and 1.0 ng/ml, respectively. Compositions of Medium 1 and 2 were described in Experimental.

た。測定する B<sub>12</sub> が低濃度の場合の阻害は、Medium 1 の場合が大きかったことから、Medium 1 を用いる B<sub>12</sub> の定量の場合、B<sub>12</sub> の濃度、共存する生育因子 (アミノ酸や PQQ など) の濃度が阻害の影響因子となる。Medium 1 で B<sub>12</sub> の定量の場合、Glu と PQQ 共存下で 46.5% 阻害 (B<sub>12</sub>, 0.02 μg/ml)、41.9% 阻害 (B<sub>12</sub>, 2.00 μg/ml) を示した結果から、酵母エキス 2 の阻害 (Table 1, 62%) の主要なる因子は Glu をはじめとするアミノ酸と PQQ によるものであることがわかった。Table 1 に示した他の栄養源による阻害の差異は、阻害の要因となるアミノ酸や PQQ が存在するか、またはその濃度の影響の結果に依存するものと考えられる。

## 要 約

*E. coli* Davis 113-3 菌株を用いる Medium 1 での B<sub>12</sub> の微生物学的定量法 (プレート法) において、天然の栄養源の添加が B<sub>12</sub> 測定阻害することを見出した。特に酵母エキスは 62% の阻害を示した。この酵母エキスの水飽和溶液 1 ml について Sephadex G-25 (1×120 cm) カラムによるゲルろ過を行なった結果、アミノ酸溶出画分に B<sub>12</sub> の定量阻害が認められた。検討の結果、アミノ酸として Glu, Asp, Val や Thr, Ala による阻害がみられた。一方、PQQ による阻害もみられ、アミノ酸と PQQ の共存下に B<sub>12</sub> 定量



阻害を引き起こすことがわかった。Gluなど数種のアミノ酸を含むBurkholderのMedium 2では、Gluの阻害はわずかになり、PQQの阻害もMedium 1の62%に対し、Medium 2では33%であった。

## 文 献

- 1) Barker, H. A., Smyth, R. D., Weissbach, H., Munch-Petersen, A., Toohey, J. I., Ladd, J. N., Volcani, B. E., Wilson, R. M., *J. Biol. Chem.*, **235**, 181-190(1960)
- 2) Pawelkiewicz, J., *Method in Enzymology*, ed. by McCormick, D. B., Wright, L. D., Academic Press, New York, Vol. 18C, pp. 32-34(1971)
- 3) Abeles, R. H., Myers, C. Smith, T. A., *Anal Biochem.*, **15**, 192-194(1966)
- 4) Ross, G. I. M., *J. Clin. Pathol.*, **5**, 250-256(1952)
- 5) 佐藤裕, *ビタミン*, **6**, 200-211(1953)
- 6) Ford, J. E., *J. Nutr.*, **7**, 299-306(1953)
- 7) Hutner, S. H., Provasoli, L., and Filfus, J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**, 852-862(1953)
- 8) ビタミンB<sub>12</sub>定量小委員会, *ビタミン*, **19**, 438-445(1960)
- 9) 江口秀敏, 梨子本孝嗣, 武井希衣子, 浅岡健光, 岩佐曜, *ビタミン*, **66**, 301-307(1992)
- 10) Davis, B. D. and Mingioli, E. S., *J. Bacteriol.*, **60**, 17-28(1950)
- 11) 上久保正, *ビタミン*, **11**, 43-45(1956)
- 12) Burkholder, P. R., *Science*, **114**, 459-460(1951)
- 13) Rosenthal, H. L., *The Vitamins*, ed. by Sebrell, W. H., Jr. and Harris R. S., Academic Press, New York and London, 2nd ed., Vol. 2, pp. 164-165(1968)
- 14) Ohsugi, M., Noda, H., Muro, K., Ishiba, A., Kondo, Y., and Nakao, S., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **35**, 661-665(1989)