

緑色野菜中ビオチン含量の季節変動について

曾 根 英 行, 神 山 伸, 守 木 葵
(新潟県立大・健康栄養*)

Seasonal differences of biotin contents in green vegetables between summer and winter

Hideyuki SONE, Shin KAMIYAMA and Aoi MORIKI
Department of Health and Nutrition, University of Niigata Prefecture

Summary

Previously, we reported that there are no differences in biotin contents and expression levels of *bio2* gene, which is a key enzyme in biotin biosynthesis pathway, in pea sprouts among various cultivation conditions. We also found that biotin required for the growth of pea sprout is sufficiently supplied from the seed. In this study, we investigated whether biotin biosynthesis is affected by cultivation conditions (temperature and insolation) using pea sprouts hydroponically cultivated without seeds.

Seeds were removed after their germinations, and then pea sprouts were grown with culture fluid without biotin under 5 conditions: Control (C), 25°C/12-h light; Small amount of insolation (SI), 25°C/4-h light; No insolation (NI), 25°C/0-h light; Moderate low temperature (MLT), 12°C/12-h light; Low temperature (LT), 4°C/12-h light.

Biotin contents in SI and NI were approximately 67% and 43% of C, and decreased in proportion to the amount of insolation ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). Biotin content in LT was also lower than C ($p < 0.05$).

Secondly, to clarify the seasonal differences of biotin contents in green vegetables, we measured biotin contents in garland chrysanthemum (shungiku), spinach, and potherb mustard (mizuna) harvested in summer and winter in Niigata, Japan.

Biotin contents in shungiku and spinach in winter decreased to about 56% and 47% of those in summer. ($p < 0.001$, respectively)

These results strongly suggest that biotin biosynthesis in plants fluctuates responding to the cultivation conditions, especially the amount of insolation. This may lead to seasonal differences of biotin contents in green vegetables.

水溶性ビタミンの一種であるビオチンは、4種のカルボキシラーゼの補酵素として生体内代謝において重要な役割を果たしている。食品中のビオチン含量は、平成17年度の「五訂増補日本食品標準成分表」にはビタミンで唯一記載されておらず、ビオチン摂取基準においても「日本人の食事摂取基準（2010年版：厚生労働省）」で成人の目安量が50 µg/日と公表されているものの、科学的データの不足から推奨量を設定できずにいる。しかし、渡邊らの精力的な研究により、次々と食品中のビオチン含量が測定され^{1,2)}、漸く平成22年度の「日本食品標準成分表（2010年度版）」で主要食品のみではあるが、ビオチンが掲載されることとなった。

これまでに我々は、日本と欧米諸国との食品中ビオチン含量を比較し、野菜類でビオチン含量の地域差を示唆する

結果を報告している³⁾。つまり、野菜類におけるビオチンの成分表を策定するには、栽培環境の違いによるビオチン含量の変動についても検討することが必要と考えられる。植物におけるビオチンの生合成は、5段階の酵素反応によって行われており、3段階目の酵素反応ではATPを必要とする^{4,5)}。植物でのATP産生には葉緑体での光合成が不可欠となる。そのため、ビオチンの生合成は日照時間や光の強度、栽培温度に依存すると考えられる。本研究室の守木は、蒸留水のみで栽培が可能であり比較的栽培期間の短い豆苗を用いて、日照量と栽培温度が植物のビオチン含量に及ぼす影響について検討を行なった^{6,7)}。しかし、豆苗の種子は葉中よりも数倍のビオチンを含有しており、生育に必要な十分量のビオチンを供給するため、日照量と栽培温度の影響を明確にすることができなかった (Fig. 1a)。

*所在地：新潟市東区海老ヶ瀬471 (〒950-8680)

同試料を用いて、ビオチン生合成経路の律速酵素である biotin synthase (*bio2* 遺伝子) の発現についても検討したが、*bio2* 遺伝子の発現量は日照量のみならずビオチン含量によっても調節されるため⁸⁾、栽培環境による影響を見出すことはできなかった (Fig. 1b)。

本研究では、種子由来のビオチンを排除した豆苗の栽培系を確立し、ビオチン生合成に及ぼす日照量および栽培温度の影響について再検討を行なった。また、夏期と冬期に収穫される緑色野菜のビオチン含量を測定し、その季節変動についても併せて検討した。

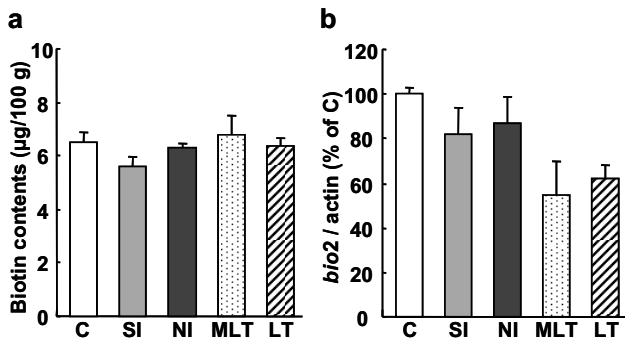


Fig. 1 Effects of cultivation conditions of temperature and isolation on biotin contents (A) and *bio2* mRNA expression (B) in pea sprouts. Data are expressed as means ± SEM (n = 4).

実験方法

1. 試料の調製

1) 豆苗の栽培

豆苗の種子は24時間浸水させた後、蒸留水で発芽させた。茎および根を3-4 cmまで伸長させた後、種子を除去した。これらを個別の容器に移し、植物栽培用培養液（アイリスオーヤマ株式会社）を用いて、以下の生育条件で14日間栽培した。日照は、水草・植物・無脊椎動物専門光合成促進ランプRB37（東芝ライテック株式会社）を用いて行なった。弱低温群・低温群の栽培温度は、恒温高湿機BR-63SB（ホシザキ電気株式会社）を用いて調整した。1群あたり5連で栽培した。植物栽培用培養液のビオチン含量は、本研究室で測定したところ検出限界以下（<50 pg/ml）であった。

対 照 群 (C)：栽培温度 25℃，日照時間 12 時間 / 日，

弱緑化群 (SI)：栽培温度 25℃，日照時間 4 時間 / 日，

非緑化群 (NI)：栽培温度 25℃，日照時間 0 時間 / 日，

弱低温群 (MLT)：栽培温度 12℃，日照時間 12 時間 / 日，

低 温 群 (LT)：栽培温度 4℃，日照時間 12 時間 / 日

2) 野菜の収集

野菜は、新潟市内の直売所から夏期（2009年7月下旬）と冬期（2011年1月下旬）の2度に分けて購入した。緑色野菜には周年供給され入手が可能であった春菊とほうれ

ん草を、対照となる淡色野菜には水菜を、各品目とも3個体ずつ購入した。購入した野菜は、夏期は露地栽培、冬期はビニールハウスで栽培されたものである。寒冷時は暖房機器を使用して10℃前後に加温するが、照明器具などによる日照管理は行っていない。なお、気象庁による気象観測データでは、新潟市の2009年7月の気候は、平均気温21.4℃・日照時間100 h/日・全天日射量14.3 MJ/m²、2011年1月は、平均気温1.3℃・日照時間49 h/日・全天日射量5.9 MJ/m²であった (<http://www.jma.go.jp>)。

2. ビオチン測定と統計解析

試料は、1個体あたり0.5 gずつ採取した。これらの試料を5 mlの0.1 Mリン酸緩衝液中で粉砕し、同量の2.5 M H₂SO₄を加えて加熱酸加水分解（121℃，60 min）した。同量の5 M NaOHで中和した後、ビオチン測定試料として用いた。ビオチン含量は、先に報告したマイクロプレートを用いた微生物学的定量法⁹⁾で測定した。

統計解析は、Stat View 5.0を用いて、対応のないt検定あるいは一元配置分散分析（Post-hoc: Bonferroni）により行なった。

結果と考察

豆苗試料中のビオチン含量は、対照群 (C) で14.7 ± 0.35 µg/100 g、弱緑化群 (SI) で9.9 ± 0.16 µg/100 g、非緑化群 (NI) で6.3 ± 0.37 µg/100g、弱低温群 (MLT) で11.5 ± 0.73 µg/100g、低温群 (LT) で9.6 ± 0.33 µg/100 gであった (Fig. 2)。対照群 (C) に対し、弱緑化群 (SI)、非緑化群 (NI) のビオチン含量は、それぞれ67%、43%と光合成促進ランプの照射時間に従い低下した (p < 0.05 と p < 0.001)。緑化の指標となる植物中のクロロフィル濃度は、光の強度と日照時間に比例する。事実、豆苗中のクロロフィル濃度は、光合成促進ランプの照射時間に比例して低下しており⁷⁾、本実験においても本葉や茎の色付き等に同様の傾向が観察された。以上の結果から、豆苗におけるビオチンの生合成は、緑化の程度に従い低下し日照量に強く影響されることが示唆された。また、低温群 (LT) のビオチン含量は、対照群 (C) の66%まで低下しており、両群間に有意差が認められた (p < 0.05)。しかし、弱低温群 (MLT) では、ビオチン含量は対照群 (C) の78%と比較的高い値を維持しており、栽培温度の影響は観察されなかった。植物は、低温下におかれると弱い光の照射であっても低温との複合ストレスを受け、光合成活性が低下する。低温下では、こうした光合成活性の低下が原因となり、過剰な光エネルギーを処理できず活性酸素へと変換され、細胞内器官を破壊するといった光障害（葉焼け）が引き起こされる^{10, 11)}。本実験では、低温群において葉焼けの形跡は認められなかった。しかし、少なからず光障害による光合成活性の低下を受け、低温下でのビオチン合成酵素の活性低下との複合作用により、ビオチン含量が低下し

たものと推察される。しかし、弱低温群ではビオチン含量は大きな変化を示さなかったことから、ビオチン生合成には、栽培温度よりも日照量が強く影響するものと考えられる。

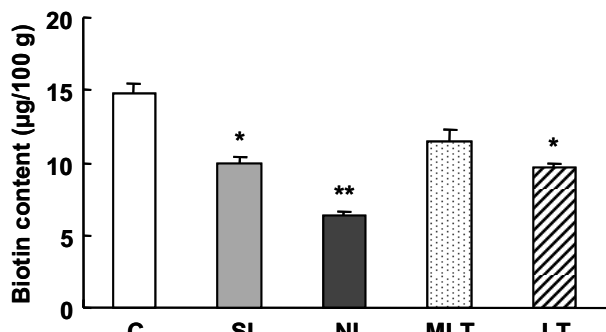


Fig. 2 Effects of cultivation conditions of temperature and insolation on biotin contents in pea sprouts hydroponically cultivated without seeds. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 5). *p < 0.05, **p < 0.001 as compared with C.

野菜中のビオチン含量を Fig. 3 に示した。夏期に収穫された野菜中のビオチン含量は、春菊 8.4 \pm 0.34 μ g/100 g、ほうれん草 5.3 \pm 0.06 μ g/100 g、水菜 2.5 \pm 0.24 μ g/100 g であった。一方、冬期では、春菊 4.7 \pm 0.33 μ g/100 g、ほうれん草 2.5 \pm 0.14 μ g/100 g、水菜 2.3 \pm 0.24 μ g/100 g であった。春菊とほうれん草では、夏期に対し冬期で、それぞれ 56%、47% と有意な低下を示し (p < 0.001)、緑色野菜での季節変動が認められた。淡色野菜である水菜では、こうした傾向は観察されなかった。

一般的に植物は、ビタミン B₁ や B₂、B₆、葉酸といった B 群ビタミンを生合成している⁷⁾。食品成分の季節変動は、日本食品標準成分表が五訂に改訂される際、詳細に検討されている。しかし、多くの食品では成分値の変動に一定の傾向が認められず、科学的根拠による裏付けがなされなかったことから、ほうれん草のビタミン C とかつおの脂質のみの記載にとどまっている。一方、ビオチンの生合成経路は詳細に解明されている。前述したように、植物にお

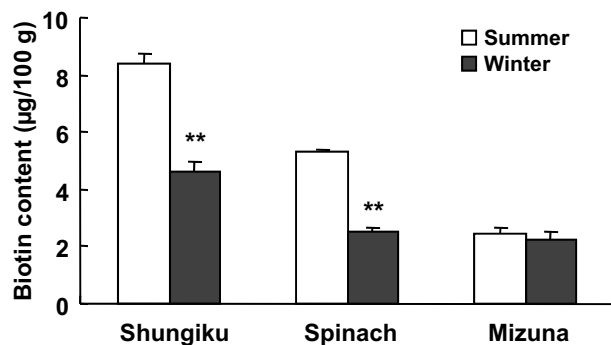


Fig. 3 The seasonal differences of biotin contents in green vegetables between summer and winter. Data are expressed as mean \pm SEM (n = 3). *p < 0.05, **p < 0.001 as compared with Summer.

けるビオチンの生合成には ATP を必要とする。また、最終段階の酵素反応は biotin synthase により進行し、その活性は、グルコースやグルコース生合成系の中間体であるフルクトース-1,6-二リン酸、グルコース由来の電子伝達体である NADH や NADPH によって亢進される¹²⁾。植物での ATP 産生やグルコース合成は葉緑体での光合成に依存するため、ビオチン生合成経路の活性化には日照時間や光の強度、栽培温度が強く影響すると推測される。事実、ビオチンは淡色野菜よりも緑色野菜に多く含有される (日本食品標準成分表 2010)⁶⁾。こうした傾向は葉緑体の含量に左右される。淡色野菜では日照量の影響を受け難くなるため、水菜では季節変動が観察されなかったと推察される。

以上の結果から、緑色野菜中ビオチン含量には季節変動が存在し、その要因として栽培環境因子、特に日照量が強く影響することが示唆された。冬期、日本海沿岸地方では日照量が極端に低下するため、緑色野菜でビオチン含量の低下が懸念される。正確な食品成分表を策定するためには、冬期低日照地方における季節別の緑色野菜中ビオチン含量を詳細に検討することが必要と考える。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (課題番号 21700776) を受けて行われたものである。

文 献

- 1) 谷口歩美, 大串美沙, 武智隆祐, 渡邊敏明 (2005) わが国の食品に含まれるビオチン量の分析. 日本栄養・食糧学会誌 58: 185-198
- 2) 谷口歩美, 武智隆祐, 福嶋厚, 渡邊敏明 (2008) わが国の食品中ビオチン含量の分析. 日本栄養・食糧学会誌 61: 27-36
- 3) 曾根英行, 安部恵, 樋口陸, 守木葵, 小山田絵美, 渡邊敏明, 宮西邦夫 (2008) 食品中ビオチン含量の地域差と栽培環境因子による変動. 微量栄養素研究 28: 54-58
- 4) Patton DA, Schetter AL, Franzmann LH, Nelson K, Ward ER, Meinke DW (1998) An embryo-defective mutant of arabisopsis disrupted in the final step of biotin synthesis. Plant Physiol. 116: 935-946
- 5) Picciocchi A, Douce R, Alban C (2001) Biochemical characterization of the arabisopsis biotin synthase reaction. The importance of mitochondria in biotin synthesis. Plant Physiol. 127: 1224-1233
- 6) 曾根英行, 守木葵, 神山伸 (2011) 野菜中ビオチン含量の地域差および季節変動について. 人間生活学研究 2: 87-92
- 7) 曾根英行, 守木葵, 神山伸 (2011) 栽培環境因子の違

いがビオチン生合成に及ぼす影響について. 人間生活学研究 2 : 93-100

- 8) Patton DA, Johnson M, Ward ER (1996) Biotin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 112: 371-378
- 9) 小山田恵美, 曾根英行, 平岡真美, 宮西邦夫, 谷口敏明, 安田和人 (2007) マイクロバイオアッセイによるビオチン定量法の確立とビオチンの栄養状態について. *微量栄養素研究* 24 : 157-162
- 10) Ifuku O, Kishimoto J, Haze S, Yanagi M, Fukushima S (1992) Conversion of dethiobiotin to biotin in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56(11): 1780-1785
- 11) Sonoike, K (1996) Photoinhibition of Photosystem I: Its Physiological Significance in the Chilling Sensitivity of Plants. *Plant Cell Physiol.* 37: 239-247
- 12) Sonoike, K (1998) Various Aspects of Inhibition of Photosynthesis under Light/Chilling Stress: "Photoinhibition at Chilling Temperatures" versus "Chilling Damage in the Light". *J. Plant Res.* 111: 121-129