

## 第2章 既往の研究

### 2-1 ビタミン B<sub>12</sub> について

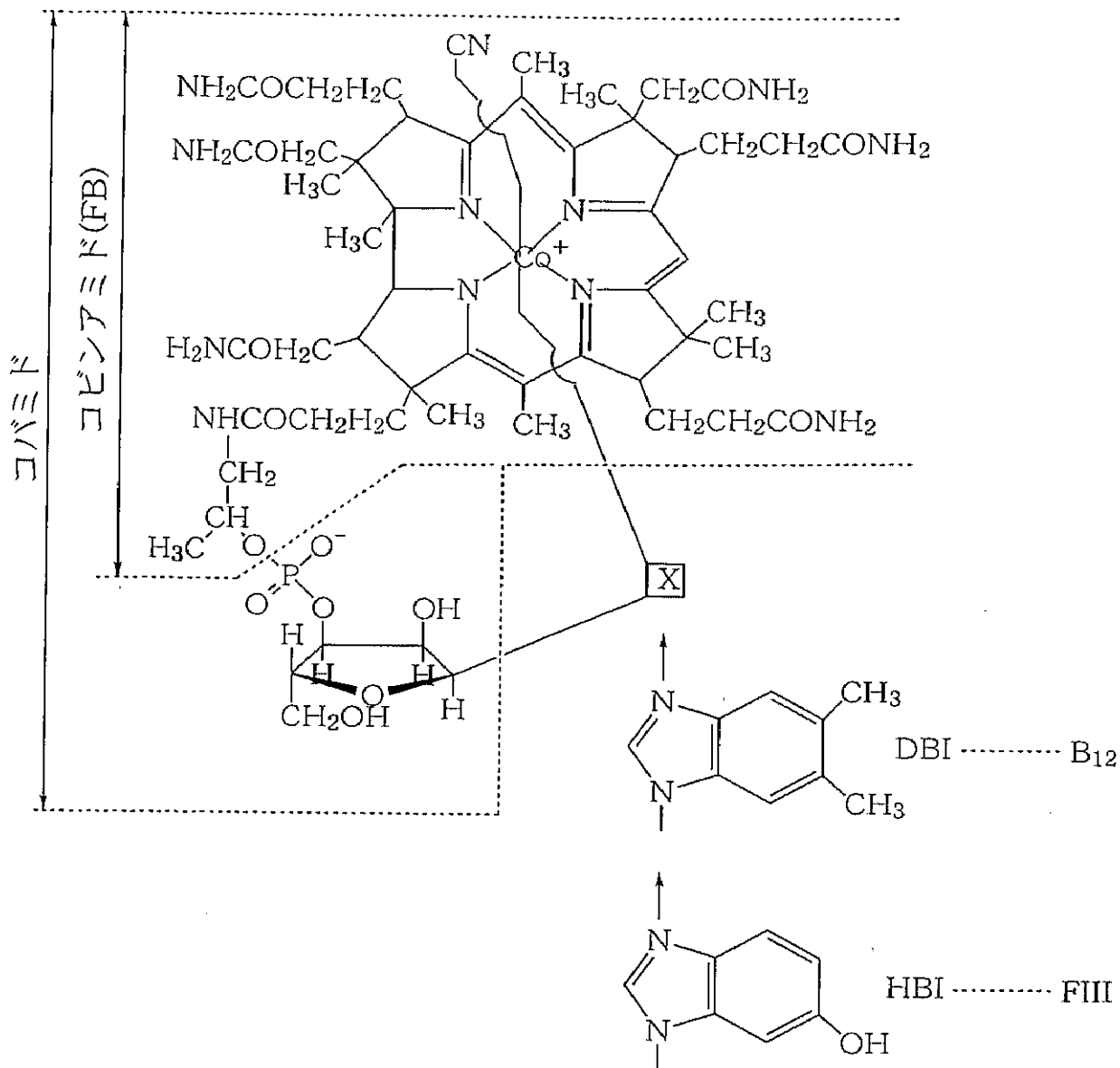
ビタミンは 20 世紀前半から医学、薬学、農学、化学、工学、栄養学等々の生命科学分野で最も注目され、多方面から多くの研究者によって研究が進められている分野である。1926 年に Minot, G. R. and Murphy, W. P. が悪性貧血患者に対する肝臓の治療効果を発見して以来 (Minot, G. R. and Murphy, W. P. 1983)、肝臓中から抗悪性貧血因子を抽出、単離することが多くの人々により企てられた。1948 年英国 Smith, E. L. が牛の肝臓 1 トンから微量の赤色針状結晶のビタミン B<sub>12</sub> を単離した。しかし 2 次代謝物の中でも最も複雑な化学構造のため、ビタミン発見史の中で最後まで化学構造決定が困難を極め、最終的に X 線結晶解析によって、分子量 1355 の赤色結晶 B<sub>12</sub> の化学構造が決定された。この B<sub>12</sub> の化学構造決定を行った Hodgkin らは、1964 年ノーベル化学賞を受賞した (奥田邦雄 1999)。このビタミン B<sub>12</sub> の複雑な構造のために、純化学合成的方法による全合成は困難を極めた。1972 年には Woodward グループを中心とする国際協力によってもたらされた成功は (Woodward, R. B. 1973) 合成化学史の金字塔の一つとなったばかりでなく、その研究途上に優れた理論や技術を生み出した。

ビタミン B<sub>12</sub> は悪性貧血などの治療薬、総合ビタミン剤、動物飼料添加物などに多用されている。さらに最新研究より、卵黄コリンとビタミン B<sub>12</sub> の組み合わせを補給することが記憶力の低下を防ぎ、痴呆予防の可能性があることが確認された。これは高齢化社会を迎える 21 世紀に健康維持のため欠かせないの栄養補助食品になるかもしれない。しかし、ビタミン類の中では最も複雑な構造であり化学合成は成功しているものの、工業的にはプロピオン酸菌による発酵法が唯一の生産法である。日本では B<sub>12</sub> の全量が輸入されており、その国産化が望まれている。

これに対して、細菌の多くはビタミン B<sub>12</sub> の生合成能を持っている。とくにプロピオン酸菌、メタン生成菌など適当な菌株は工業的規模での生産に用いられる。より高効率、高生産性のビタミン B<sub>12</sub> の生産が期待される。

## 2-2 コリノイド（ビタミン B<sub>12</sub>）の生産

ビタミン B<sub>12</sub> 関連化合物は図 2-1 に示すようにコリン核（Co 配位テトラピロール構造）を含む化合物、コリノイド(corrinoids)と呼ばれている。そのうちビタミン B<sub>12</sub>（シアノコバラミン、5, 6-ジメチルベンズイミダゾリルシアノコバミド）は悪性貧血などの治療薬及び動物の成長因子として重要なビタミンである。2-1 に述べたようにビタミンとしては最も複雑な構造であり、化学



X=DBI (5,6-ジメチルベンズイミダゾール)の場合, B<sub>12</sub> (シアノコバラミン;  
B<sub>12</sub>あるいはB<sub>12</sub>-DBIあるいはB<sub>12</sub>-DMBIと略称)

X=HBI (5-ヒドロキシベンズイミダゾール)の場合, FIII (ファクター-III; FIII  
あるいはB<sub>12</sub>-HBIあるいはB<sub>12</sub>-DMBIと略称)

FB (ファクター-B; FBあるいはコビンアミドと称し,ヌクレオチド部の欠除  
したコリノイド)

図 2-1.コリノイド類 (ビタミン B<sub>12</sub>化合物) の構造

表 2-1. 偏性嫌気性菌によるコリノイド生成とその形態

Microorganism		Substrate	Corrinoids		
			content (nmol/g dry mass)	major type	
Acetogenic bacteria (Eubacteria)		<i>Sporomusa ovata</i>	CH <sub>3</sub> OH	3100	9
		<i>Acetobacterium woodii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	650	3
		<i>Clostridium formicoaceticum</i>	CH <sub>3</sub> OH	950	10, 3
		<i>C. thermoaceticum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	1200	cby*, 8
Sulfate-reducing bacteria (Eubacteria)		<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	60~1200	6
		<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Propionate	150	6
		<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	<1	n.d.
Sulfate-reducing bacteria (Archaeobacteria)		<i>Archaeoglobus fulgidus</i>		100	6
Sulfur-metabolizing bacteria (Archaeobacteria)		<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Glucose	8	6
		<i>Desulfurolobus ambivalens</i>		15	3
		<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	<1	n.d.
		<i>Pyrodicticum occultum</i>		<1	n.d.
		<i>Staphylothermus marinus</i>		<1	n.d.
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	120	
		<i>Mb. wolfei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	325	
		<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	380	
		<i>Mbr. arboriphilus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	270	
Methanomicrobiales	Methanothermaceae	<i>Methanothermus fervidus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	145	4
	Methanosarcinaceae	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	Methanol	1400	4
Sulfur-metabolizing bacteria (Archaeobacteria)	Methanomicrobiaceae	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	305	4
		<i>Methanospirillum hungatii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	630	4
Methanococcales	Methanococaceae	<i>Methanoplanus limicola</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	100	4
		<i>Methanococcus voltae</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	145	4
		<i>Mc. thermolithotrophicus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	110	4
		<i>Mc. vannielii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	340	4
Methanomicrobiales	Methanosarcinaceae	<i>Mc. aeolicus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	620	4
		<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	CH <sub>3</sub> COOH	53	4
		<i>Methanosarcina barkeri</i>	CH <sub>3</sub> COOH	1600	4
		<i>Methanosarcina barkeri</i>	Methanol	4100	3,4,6
Methanococcales	Methanococaceae	<i>Methanosarcina barkeri</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	2500	
		<i>Methanosarcina barkeri</i>		4200	
		<i>Methanosarcina vacuolata</i>		3650	4
		<i>Methanococcus halophilus</i>		11930	4
		<i>Butyrivibacterium methylothrophicum</i>	Methanol	55205	4

\* cby: cbl(FB)の1-アミノ-2-プロパノール部が欠除したコリノイド  
n.d.: 検出されず

合成は成功しているものの、工業的には発酵法が唯一の生産法である。

現在ビタミン B<sub>12</sub> の生産は主として通性嫌気性細菌に属するプロピオン酸菌が用いられている。菌体より（含量 0.6 mg / g）のシアノコバラミンを得る。古くから消化汚泥（メタン発酵）中に見出されたコリノイド源として注目されていたが、その当時偏性嫌気性細菌の純粋培養は不可能であった。最近になってメタン生成細菌や酢酸生成細菌などの偏性嫌気性細菌が単離、培養できるようになった。表 2-1 は偏性嫌気性菌によるコリノイド生成とその形態を示した（大島ら 1991）。偏性嫌気性菌の生産するコリノイドは好気、通性嫌気性菌に比べ多様である。図 2-1 に示したようにメタノールの代謝の入り口でコリノイド（F III）が関係しているほか（Van der Meijden, P. et al 1983）、メタン生成の最終段階である methyl CoM methylreductase 系への関与（Ankel-Fuchs, D. and Thauer, R. K. 1986）、さらに、生合成経路の入り口であるアセチル CoA 生成系への重要性も報告されている（Holder, U. et al 1985）。これらの事実は、メタン生成細菌におけるコリノイドの重要性と高含量の必然性を示めしている。

表 2-1 より興味深い点は、古細菌（Archaeobacteria）に属するメタン生成細菌の生成するコリノイドの形態は科（Family）間で相関が見られ、化学的分類（Chemotaxonomy）に活用できそうである。メタン生成菌ではコリノイドの菌体内含量が高いものも多く、高濃度培養系が可能となれば、コリノイド生産

菌として有望である。

### 2-3 メタン生成細菌によるコリノイドの生産

メタン生成細菌によるコリノイド生産の利点は、① 高コリノイド含量、② 基質が安価である、③ プロピオン酸などビタミン B<sub>12</sub> 生産菌である *Propionibacterium shermanii*, *Butyribacterium* などでは増殖阻害の著しい有機酸（プロピオン酸、酪酸）を生成するに対し、メタン生成菌では阻害のないメタン生成物である。一方、欠点としては絶対嫌気条件下での培養の難しさ、並びに増殖速度、菌体収率が低いため、高濃度菌体の培養が困難であることである。その原因の一つとしてS源が考える。従来から用いられている H<sub>2</sub>S は、揮発性である、増殖阻害がある、または増殖に必須な金属と不溶性の塩を形成するなどの問題に対して、Mazumder ら(1986)の研究により、L-システインが利用できることが判明し、これらの問題を解決した。さらに、興味深い点としてコリノイドは大部分（70%）菌体外に蓄積した。さらに、多孔性無機担体を充填した固定床バイオリアクターを用い、高濃度培養系による生産性の向上が試みられた(Mazumder, T. K. et al 1987)。その結果、高菌体濃度（40 g 菌体/L）の菌体保持が可能となり。高コリノイド生産性（65 mg/L・日）が得られている。しかし、Toraya ら(1975)はメタノールを基質とする細菌によ

るビタミン B<sub>12</sub> 生産に関して、その結果はビタミン B<sub>12</sub> の最大限の収量は 2.6 mg /L である。なぜ同じメタノールを利用する細菌によるビタミン B<sub>12</sub> の含有濃度の差が大きかったが、菌種によって異なる原因の他、発酵における操作条件、または、発酵液からビタミン B<sub>12</sub> の抽出と定量分析方法によるものが考えられる。その点についての研究はまだ十分とはいえない。

#### 2-4 メタン発酵液からビタミン B<sub>12</sub> の抽出と精製

生体材料中のビタミン B<sub>12</sub> はタンパク質に結合している場合が多いので、ビタミン B<sub>12</sub> の定量に際しては結合型ビタミン B<sub>12</sub> を遊離型にして抽出する必要がある。その場合、定量のみを目的とするのか、それとも試料中に存在するビタミン B<sub>12</sub> の形態も合わせて検討するのかによって、抽出条件が大きく異なる。現在、様々の形態のビタミン B<sub>12</sub> に対して、すべてを有効に抽出する方法が完全に確立しているとはいえないので、それぞれの試験において定量的な抽出精製条件をあらかじめ検討する必要がある。上久保正(1975)と佐藤一精(1983)らは幾つかの抽出方法を工夫している。現在、一般的には KCN 抽出法が最も優れた方法として採用され、ビタミン B<sub>12</sub> の類似体を熱に安定なシアノ型に変換され抽出される。

## 2-5 メタン発酵液から抽出したビタミン B<sub>12</sub> の定量分析

ビタミン B<sub>12</sub> の定量法としては、微生物学的定量法以外に紫外・可視の吸収による分光学的方法（上久保正 1975）や、アデノシル-B<sub>12</sub> の(AdoB<sub>12</sub>) の補酵素作用を利用する酵素法（佐藤一精 1999）、さらにはコバルトを標識したビタミン B<sub>12</sub> による同位体希釈法(RIDA 法、放射性同位元素希釈定量法)（Reynoso, G. et al 1982）などが知られている。一般に微生物学定量法は、操作性及び精度は機器分析により劣っている場合が多い。しかし感度が高く妨害物質の影響を受けにくいことから、水溶性ビタミン類の定量では現在でも欠かせない方法である。分光学的方法は非常に正確であるが、感度が悪く数百 ng / ml 以上のビタミン B<sub>12</sub> の濃度を必要するため、微量分析に適さない。また酵素法は、感度はよいが(AdoB<sub>12</sub>) 以外の B<sub>12</sub> の定量に用いることができない。また放射性同位元素を取り扱う施設、設備要するなど、どこでも実施できると言うわけではないのが難点である。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）はコリノイドの分離・定量に非常に有効な方法で、分析、分取のどちらにも適している。操作が簡便で展開時間が短くてすむ上、分離能、精度、感度、いずれも優れている。カラムは逆相用のものが多用され、コリノイドは UV 検出器で検出される。HPLC 法は短時間に極めて良好な分離が可能で、非常に優れた方法として、現在盛んに用いられて



いる。ビタミン B<sub>12</sub> 化合物の形態を同定、定量するに欠かせない手段になりつつある(佐藤一精 1983)。しかし、最適カラムの選択、最大 UV 検出波長の確認、移動相の選び、クラジエント条件、流速などについて、さらに検討する必要がある。