

コイのビタミンB1の代謝

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	佐藤, 雅子 林, 征一 柿本, 大壱
巻/号	59巻6号
掲載ページ	p. 1085-1091
発行年月	1993年6月

コイのビタミン B₁ の代謝

佐藤雅子, 林 征一, 柿本大壱

(1993年2月12日受付)

Metabolism of Thiamin in Carp

Masako Sato,*¹ Seichi Hayashi,*² and Daiichi Kakimoto*³

Radioactive thiamin, C-2 of thiazole labeled with ¹⁴C, was parenterally administered to carp. After 24 h, thiamin, its phosphate esters and thiazole in the eleven kinds of tissues and in the water of the aquarium, were fractionated by SP-Sephadex C25, and their radioactivities were measured. The radioactive thiamin was used to synthesize thiamin phosphate esters, mostly thiamin diphosphate (TDP), retained as a free form of thiamin, or decomposed to thiazole. The ratios of ¹⁴C-TDP to the total incorporated radioactivity in the ordinary muscle, kidney, and red muscle were 47, 42, and 34%, respectively. The eye tissue contained ¹⁴C-thiamin corresponding to over 50% of total incorporated radioactivity, which was very different from the other tissues. The ratios of ¹⁴C-thiazole, a decomposed product of ¹⁴C-thiamin, was highest in the kidney, followed by the gill and the heart. Furthermore, the amount of ¹⁴C-thiazole excreted into the water of the aquarium was ten times more than that in these tissues. To ascertain whether thiazole was truly produced by tissue such as liver, ¹⁴C-thiamin was added to cultured carp hepatocytes, and the radioactivities were analyzed both in the cell and in the medium by the same method. After 24 h incubation, ¹⁴C-thiazole was mainly found in the medium, while no production of ¹⁴C-thiazole was observed in control experiments, in which ¹⁴C-thiamin was added to the cells treated with trichloroacetic acid or to the medium without hepatocytes. Furthermore, cultured hepatocytes produced ¹⁴C-TDP corresponding to 71% of total radioactivity incorporated in the cells. These results indicate that thiazole is produced by carp liver *in vivo*, and thiamin phosphate esters, especially TDP, are also synthesized from thiamin.

B₁ を塩基置換反応によってチアゾールとピリミジンに分解する酵素: チアミナーゼ I (EC 2.5.1.2) の一般的な性質や作用機構などについては *in vitro* ですでに詳細に研究されている。¹⁻⁴⁾ この酵素は、最初、コイやフナなどの淡水魚、貝類の臓器で強い活性を示すことが明らかにされたが、¹⁻⁴⁾ その後、カタクチイワシやサンマ、その他の海産魚にも分布することが明らかにされ、^{5,6)} かなり広範囲に分布することが知られている。チアミナーゼ活性が強い魚類や貝類を飼料として生のまま投与すると、動物は B₁ 欠乏症を起こすことが報告されているが、これらの B₁ 欠乏症は飼料のチアミナーゼが原因であると考えられている。⁷⁻⁹⁾ また、生の魚を常食するヒトは B₁ 欠乏症を起こしやすいという報告もみられる。¹⁰⁾ 反すう動物において神経症を伴う B₁ 欠乏症が問題になっているが、この潜在性 B₁ 欠乏症と腸内細菌のチアミナーゼ

には深い相関があると考えられている。^{11,12)} ところが、チアミナーゼ I の酵素活性が強いコイやウナギでは B₁ 欠乏症は発現しにくく、^{13,14)} また、コイの組織の B₁ は他の動物の組織の B₁^{15,18)} と比較してもむしろ高い。¹⁹⁾ 著者らは、先にコイに Halver のビタミン試験飼料を標準飼料とし、さらに B₁ を過剰添加した B₁ 過剰食、B₁ 無添加の B₁ 欠乏食を投与して3カ月飼育し、組織の B₁ を測定した。B₁ 過剰食群の筋肉や眼の組織において B₁ の増加が顕著であり、飼育3カ月で飼育前のおよそ40倍の B₁ が筋肉に蓄積された。¹⁹⁾ 一方、B₁ 欠乏食を投与したコイは、組織の B₁ は減少したが、3カ月間 B₁ 欠乏症はみられなかった。このように、コイにおいては、チアミナーゼ I の酵素活性が強いにもかかわらず、B₁ 欠乏症を起こしにくかったり、筋肉に多量の B₁ が蓄積されるなど興味を持たれる問題である。このような疑問を

*¹ 鹿児島大学教育学部 (Faculty of Education, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima, 890, Japan).

*² 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Shimoarata, Kagoshima, 890, Japan).

*³ 鹿児島純心女子短期大学 (Kagoshima Woman's Junior College, Kamoike, Kagoshima, 890, Japan).

解く手掛かりとして, コイの組織における ^{14}C -チアミンの代謝を検討した。すなわち, チアゾールの C-2 に標識したチアミン (^{14}C - B_1) をコイに過剰投与し, 24 時間飼育後, 各組織の B_1 の形態および飼育水に排泄された B_1 代謝産物を, SP-セファデックスで分画した後放射活性を測定して分析した。さらに, コイの培養肝細胞を調製し, 培養液に ^{14}C - B_1 を添加して培養するとともに, 同じ方法で肝細胞と培養液の B_1 の形態を分析してコイにおける B_1 の合成や B_1 分解について検討した。

実験方法

試薬および試料 [チアゾール-2- ^{14}C] チアミン (^{14}C - B_1) (851 mBq/mmol) およびシンチレーションカクテル (ACS II) はアマシャム社, SP-セファデックス C-25 はファルマシヤのものを使用した。チアミン三リン酸 (TTP) は和光純薬, チアミン二リン酸 (TDP) はナカライテスク, チアミン一リン酸 (TMP) および 4 メチル 5-ハイドロオキシエチルチアゾール (チアゾール) はシグマ社より購入した。ウシ胎児血清およびウイリアムス E 培地はフローラポラトリー, コラーゲナーゼ S-1 およびコラーゲンは新田ゼラチンの製品を使用した。コイ *Cyprinus carpio* は鹿児島県水産試験場から購入し, 市販のコイ用飼料を毎日投与して飼育した。飼育実験では体重 40-50 g, 肝細胞の調製用には 300 g 前後の一年魚のコイを使用した。

組織および飼育水中のチアミンとそのリン酸エステル, チアゾールの分析 最初に, 1 日絶食させた体重 40-50 g のコイに, リンゲルに溶解した ^{14}C - B_1 を体重 100 g 当り 0.80 mg の割合で経口投与, 腹腔内または筋肉内に注入し, 20°C で 24 時間飼育して投与方法による違いを検討した。MS 222 で麻酔し, コイの全魚体を 20% 食塩を含む水中で凍結した。凍結した組織を取り出し, トリクロル酢酸 (TCA) を終濃度が 5% になるように加え, ホモジナイザーで磨砕した。これを 20,000×g で 20 分遠心分離し, 得られた上清に水飽和のエーテルを同量加えて TCA を除去した。この操作を 2 回繰返し, 凍結乾燥した。飼育水についてはその一部にトルエンおよび 1 N HCl を加えて pH 3.5 にし, 凍結乾燥した。このようにして調製した試料に標準の TTP, TDP, TMP, チアミンおよびチアゾールを加え, Matsuda and Cooper の方法²⁰⁾に準じて SP-セファデックス C-25 により B_1 代謝産物を分画した。溶出条件は以下のようにした。(I) TTP は 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 3.5): 60 ml, (II) TDP は 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.5): 80 ml, (III) チアゾールおよび TMP は, 0.3 M-0.5 M NaCl/0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 3.5) のグラジエント: 130 ml, (IV) チアミンは, 0.5 M-1.0 M NaCl/0.1 M クエン酸緩衝液 (pH

3.5) のグラジエント: 80 ml で溶出した。溶出速度は 1.5 ml/min, 溶出液は 2.5 ml, または 5 ml ずつ分取し, 253 nm の吸光度を測定した。溶出液の一部に ACS-II を加え, Packard Tri-Carb 460C で放射活性を測定した。

培養肝細胞のチアミンとそのリン酸エステル, チアゾールの分析 コイの培養肝細胞を林らの方法^{21,22)}により以下のように調製した。肝臓にコラーゲナーゼを加えて振とうし, 分離肝細胞を調製した。これをあらかじめコラーゲンでコーティングし, 培養液 (ウイリアムス E-5% 牛胎児血清-0.16 μM インシュリン) を 7 ml 添加した 10 cm のデッシュュに 2×10^6 cell/cm² の密度になるように分散した。28°C, 5% CO₂-インキュベーター中に静置して 2-3 日間培養した。 B_1 を含まない合成のウイリアムス E-5% 牛胎児血清-0.16 μM インシュリン培養液と交換して 24 時間培養した後, 新しい同じ培養液と交換し ^{14}C - B_1 を添加して, 更に 24 時間培養した。培養液を分離し, 細胞をリンゲルで 2 回洗浄し, これらに TCA を終濃度 5% になるように添加した。細胞には 5% TCA を加えて剝離し, ホモジナイザーで磨砕した。以下, 前述と同様にして SP-セファデックス C-25 で分画し, 溶出液の 253 nm の吸光度と放射活性を測定した。コントロールは, 細胞なしの培養液のみに ^{14}C - B_1 を添加したもの, あるいは, 細胞および培養液を TCA で処理した後 ^{14}C - B_1 を添加したものを, 同様にインキュベーター内に 24 時間放置後分析した。

組織のホモジネートと ^{14}C - B_1 による反応生成物の分析 ^{14}C - B_1 を用いたチアミナーゼ活性の測定法²⁴⁾を基にして, コイの組織のホモジネートと ^{14}C - B_1 による反応生成物の分析を以下のように測定した。腎臓, 脾臓, 肝臓を摘出し, リン酸緩衝液 (pH 6.8) を加えホモジナイズし, 水で透析したものを粗酵素液とした。これに ^{14}C - B_1 およびピリジンを促進剤として添加し, pH 6.8, 30°C で 30 分反応させた後, TCA を加え反応を停止した。反応生成物は前述と同じ方法で分析した。コントロールは, これらの粗酵素液を TCA で処理したもの, または加熱処理したものに, ^{14}C - B_1 を添加し同じ方法で分析した。

組織の B_1 定量 組織に 10% TCA を加えて磨砕し, 前述のように処理した試料を pH 4.5 に調整し, タカジアスターゼ B を加えて加水分解した。これをバームチップで吸脱着した後, チオクローム法²³⁾により B_1 を測定した。

実験結果

投与方法による組織および飼育水中の B_1 の形態 筋肉内投与, 腹腔内投与, 経口投与の 3 方法による違いを比較するために, コイの魚体全体および飼育水中の B_1 代

謝産物について放射活性を分析し Table 1 に示している。魚体全体の各 B₁ 代謝産物の放射活性は、Table 2 に示すような 11 種の組織について、各々の B₁ 代謝産物の放射活性を算出しそれらを合計して求めた。筋肉内投与と腹腔内投与の結果は大体同じであったが、経口投与の結果は明らかに異なった。非経口投与では、いずれも投与 B₁ のおよそ 10% が体内に保留された。その B₁ の形態は、TDP がもっとも高く約 30%、TTP や TMP、チアミンも存在したが、いずれも 5% 以下であった。一方、B₁ 分解産物であるチアゾールが 10-15%、その他、未確認物質が 5 種類存在しそれらの合計は約 40% であった。経口投与においては、体内に保留された放射活性は非経口投与の約 3 倍であった。非経口投与の 10 倍以上のチアゾールやチアミンが腸や肝臓に存在し、その影響と考えられるが TDP はおよそ半分であった。

飼育水に排泄された B₁ の形態についても、筋肉内投

与と腹腔内投与の結果は大体同じであったが、経口投与においては著しく異なった。放射活性の分析から、非経口投与では投与した B₁ の約 80% が飼育水に排泄され、その 10-15% はチアゾールであった (Fig. 1)。これに対し、経口投与の飼育水には投与 B₁ の 60% が排泄され、そのおよそ半分はチアゾールであり、これは、非経口投与の約 3 倍、B₁ 投与量の約 30% に相当した。この B₁ 投与量 (体重 100 g 当り 0.80 mg) は投与量としては過剰であるので、経口投与により多量の B₁ がチアゾールに分解されたことになる。

組織の B₁ の形態および飼育水に排泄された B₁ 代謝産物の形態 3 日間絶食させたコイに、体重 100 g 当り 0.40 mg の ¹⁴C-B₁ を筋肉内に投与し、24 時間飼育した後の各々の組織の B₁ の形態を Table 2 に示している。放射活性は TDP で最も高く、普通肉や腎臓では取り込まれた全放射活性の 40-50%、血合肉で 34%、肝臓

Table 1. Effect of three methods of administration on the distribution of ¹⁴C-thiamin metabolites retained in the whole body and excreted into the water of the aquarium

Administration		Total	TTP	TDP	TMP	Thiamin	Thiazole	Unidentified
		Radioactivity (dpm × 10 ⁻⁶ /carp)						
Intramuscular	Retained in the whole body	5.14	0.07	1.63	0.18	0.26	0.76	2.23
	Excreted into the water	46.55	0.03	0.02	0.01	39.0	5.38	2.07
Intracelial	Retained in the whole body	4.88	0.08	1.74	0.17	0.19	0.51	2.15
	Excreted into the water	45.45	0.04	0.06	0.02	37.1	6.37	1.83
Oral	Retained in the whole body	13.70	0.03	1.01	0.04	5.37	3.65	3.55
	Excreted into the water	36.81	0.05	0.01	0.01	4.37	18.03	14.30

After carp (50g body weight) were starved for 24 h, 0.40 mg of ¹⁴C-thiamin (2.52 mBq/mg) was injected, and they were sacrificed after 24 h. ¹⁴C-Thiamin metabolites were extracted from the tissues and the water of the aquarium, and were analyzed as described in the Methods. Total radioactivity of each ¹⁴C-thiamin metabolite in eleven kinds of tissues as shown in Table 2 is indicated as radioactivity retained in the whole body.

Table 2. Distribution of radioactive metabolites in tissue after intramuscular injection of ¹⁴C-thiamin into carp

Tissue	Total radioactivity (dpm 10 × ⁻⁶ /g)	TTP	TDP	TMP	Thiamin	Thiazole	Unidentified
Hepatopancreas	0.438 ± 0.112	3.9 ± 1.1	24.2 ± 6.7	2.8 ± 1.2	1.8 ± 3.9	24.8 ± 5.1	37.7 ± 11.7
Kidney	1.401 ± 0.431	1.6 ± 0.5	41.2 ± 5.3	2.7 ± 0.6	0.4 ± 0.1	38.9 ± 9.4	4.7 ± 2.1
Spleen	0.100 ± 0.022	6.2 ± 2.2	29.7 ± 9.3	1.7 ± 0.7	0.2 ± N.D.	20.7 ± 4.7	37.9 ± 4.8
Heart	0.066 ± 0.009	5.2 ± 1.8	15.5 ± 6.1	7.4 ± 1.3	0.2 ± N.D.	28.8 ± 7.1	38.3 ± 8.5
Gill	0.065 ± 0.015	1.2 ± 0.2	22.4 ± 9.8	4.2 ± 1.8	1.9 ± 0.2	34.8 ± 10.5	36.5 ± 2.4
Ordinary muscle	0.087 ± 0.008	3.2 ± 0.7	46.8 ± 10.4	7.4 ± 1.6	2.7 ± 0.4	15.0 ± 5.2	16.3 ± 3.3
Red muscle	0.159 ± 0.024	5.7 ± 1.2	34.2 ± 6.0	1.7 ± 0.8	5.0 ± 2.1	18.7 ± 6.5	33.7 ± 0.4
Epidermis	0.030 ± 0.010	2.0 ± 0.4	21.3 ± 3.1	2.3 ± 0.4	3.4 ± 0.5	25.0 ± 9.8	41.4 ± 2.3
Eye	0.079 ± 0.004	0.7 ± 0.2	8.5 ± 1.3	3.7 ± 0.4	51.0 ± 0.9	23.5 ± 1.9	3.8 ± 1.1
Brain	0.083 ± 0.036	4.9 ± 1.3	10.9 ± 1.7	4.2 ± 1.9	2.9 ± 1.1	21.6 ± 8.3	52.5 ± 12.6
Intestine	0.278 ± 0.085	4.5 ± 2.8	4.2 ± 0.8	2.0 ± 0.4	2.3 ± 1.0	8.6 ± 1.6	75.5 ± 12.4

After carp (40 g body weight) were starved for 3 days, 0.16 mg of ¹⁴C-thiamin (2.85 mBq/mg) was injected intramuscularly and they were sacrificed after 24 h. ¹⁴C-Thiamin metabolites were extracted from each tissue, and were analyzed as described in the Methods. The value is shown as the average ± S.D. of 4 carps.

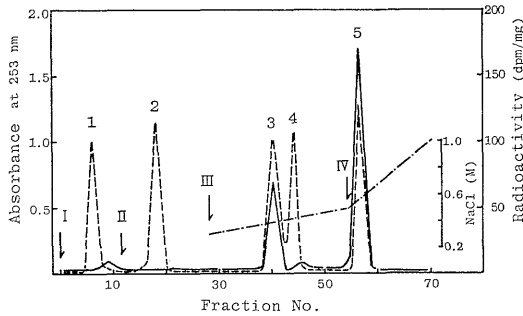


Fig. 1. Ion exchange chromatography of ^{14}C -thiamin metabolites in the water of the aquarium on SP-sephadex C 25.

The procedure for the elution of column is described in the Methods. Radioactivity (solid line), absorbance at 253 nm (broken line), NaCl concentration (dash-dotted line). TTP (1); TDP (2); Thiazole (3); TMP (4); Thiamin (5).

では 24% であった。チアミンの放射活性は眼の組織のみ 51% と高く、他の組織の B_1 形態のパターンと大きく異なった。TTP の放射活性は血合肉や脾臓、心臓で 5-6% でありやや高かったが、このピークの後に溶出する未確認物質との分離が不十分であったので、他の分画法で再度検討する必要がある。TMP は普通肉で 7% とやや高い程度であり、TDP に比べ TTP や TMP の比率は小さかった。

一方、 B_1 分解産物であるチアゾールがいずれの組織にも存在し、腎臓やエラで高く約 35%、心臓や肝臓では 25-30% であった。筋肉には約 15% 存在し、血合肉の方が普通肉より幾分高かった。

上述の B_1 代謝産物以外に 5 種類の未確認代謝産物が存在した。これらの合計は腸においては、その放射活性の約 70% に相当し、また、肝臓では約 40% であったが、後で述べるように培養肝細胞では 5% 以下であるので、大部分は腸に由来すると考えられる。

Table 3 に、飼育水に排泄された B_1 代謝産物の形態を示す。飼育 24 時間で、投与 B_1 の約 80% が飼育水に排泄され、その 22% はチアゾールであった。未確認代謝産物が 5 種類存在し、その他、TTP, TDP, TMP の存在も認められたが、いずれも低い比率であった。従って、飼育水に排泄される主要な B_1 代謝産物はチアゾールであると結論することができる。

培養肝細胞の B_1 代謝 コイに非経口的に B_1 を投与した結果、チアミンリン酸エステルが合成されたが、 B_1 分解産物であるチアゾールも生成された。この B_1 分解産物は体内で本当に生成されるのか、コイの培養肝細胞を調製し検討した。肝細胞は培養 2-3 日で接着し、3 日

Table 3. Metabolites of ^{14}C -thiamin excreted into the water of the aquarium during 24 h after intramuscular injection

Radioactivity	Total	TTP	TDP	TMP	Thiamin	Thiazole	Unidentified compound				
							A	B	C	D	E
dpm $\times 10^{-6}$ /carp	25.22	0.027	0.077	0.185	15.23	5.47	0.209	1.14	0.063	1.17	0.540
%	+0.73	± 0.010	± 0.045	± 0.041	± 2.32	± 1.01	± 0.082	± 0.0439	± 0.031	± 0.361	± 0.218
	100	0.1	0.3	1.6	60.4	21.7	0.8	4.5	0.2	4.6	2.1

Carp (40 g body weight) was injected intramuscularly with 0.16 mg of ^{14}C -thiamin (2.85 mBq/mg). Experimental conditions were the same as in Table 2. The value is shown as the average \pm S.D. of 4 carps.

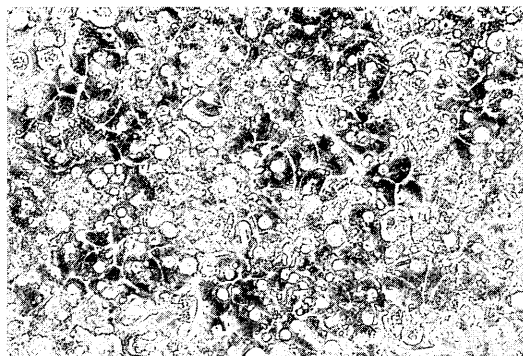


Fig. 2. Phase-contrast micrograph of carp hepatocytes cultured for 3 days in Williams' medium E containing 5% fetal bovine serum and 0.16 μM insulin.

Magnification is ×200.

目には細胞内の核が明確に観察された (Fig. 2)。Table 4 のように、コントロールは、いずれも 90% 以上の放射活性がチアミンの分画で回収された。これに対し、24 時間培養した肝細胞には、添加した放射活性の約 14% が存在し、その形態は ¹⁴C-TDP が約 70% と極めて高く、その他、TMP, TTP, チアミンやチアゾールの放射活性も認められた。一方、培養液には、その約 40% に相当する ¹⁴C-チアゾールが存在し、コイの肝細胞において B₁ 分解産物であるチアゾールが生成されることが明かにされた。培養液には ¹⁴C-TMP や ¹⁴C-TDP も存在した。肝細胞の培養においては、未確認代謝産物の放射活性は、細胞と培養液、いずれも 5% 以下であった。

以上の結果は、肝細胞はチアミンをチアゾールに分解し、これを細胞外に排泄すると同時に、細胞内においてチアミンが TDP に合成されることを示している。

組織ホモジネートと ¹⁴C-B₁ による反応生成物 *In vitro* において、組織のホモジネートと ¹⁴C-B₁ との反応による生成物を分析した。腎臓、脾臓、肝臓のホモジネートを TCA で処理したコントロールでは、いずれも、90% 以上の放射活性はチアミンの分画で回収された。これに対して、これらの組織のホモジネートと ¹⁴C-B₁ の反応では、ホモジネートの量の増加に伴って、チアミンの放射活性が減少し、それに対応してチアゾールの放射活性が増加した (Table 5)。この ¹⁴C-チアゾールの生成量は、腎臓で最も高く、脾臓、肝臓の順に減少した。この *in vitro* で生成されたチアゾールの溶出位置は、前述の飼育実験や培養肝細胞において生成されたチアゾールの溶出位置と同じであった。

考 察

In vitro においてチアミナーゼ活性が強いコイに ¹⁴C-

Table 4. Metabolism of ¹⁴C-thiamin in cultured hepatocytes of carp

¹⁴ C-thiamin (nmol)	Radioactivity (dpm × 10 ⁻³) / (4 × 10 ⁶ cells)							
	Total	TTP	TDP	TMP	Thiamin	Thiazole	Unidentified	
10.0	Cell	51.3 ± 1.7	4.1 ± 0.2	36.4 ± 3.4	5.4 ± 0.2	1.3 ± N.D.	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.5
	Medium	301.8 ± 23.1	4.6 ± 0.1	19.4 ± 1.2	16.3 ± 3.2	131.3 ± 17.6	121.4 ± 9.5	4.8 ± 1.1
10.0	Cell*	378.9 ± 18.5	3.0 ± N.D.	2.6 ± N.D.	3.4 ± N.D.	356.9 ± 13.0	1.1 ± N.D.	5.3 ± 0.2
	Medium*	369.7 ± 20.1	1.8 ± N.D.	1.1 ± N.D.	5.2 ± 0.1	359.7 ± 11.6	1.8 ± N.D.	4.1 ± 0.1

After one day culture in thiamin-free medium, the medium was changed to one containing ¹⁴C-thiamin (0.895 mBq/μmol) and the hepatocytes were incubated for a further 24 h. After incubation, ¹⁴C-thiamin metabolites were extracted from the cell and the medium, and were analyzed as described in the Methods. Cell* treated with 5% TCA before addition of ¹⁴C-thiamin and cell-free medium* were used as controls. The value is shown as the average ± S.D. of 3 experiments.

Table 5. The amount of ^{14}C -thiazole produced by the reaction of ^{14}C -thiamin and tissue homogenate of carp *in vitro*

Tissue	Tissue homogenate (ml)		
	0.05	0.10	0.20
	Radioactivity of thiazole (dpm 10^{-6})/Reaction mixture		
Kidney	210	267	392
Spleen	82.2	140	274
Hepatopancreas	19.3	33.4	71.3

To 0.5 ml of 60 mM phosphate buffer (pH 6.8), 0.01 ml of 0.1 M pyridine as activator, and 0.07 ml of 185 kBq ^{14}C -thiamin (2.85 mBq/mg) was added 0.5 ml of enzyme solution containing dialyzed 10% tissue homogenate of carp and water. After incubation at 30°C for 30 min, the reaction was stopped by adding 0.1 ml of 50%TCA. The radioactivity in the reaction mixture was analyzed as described in the Methods.

B_1 を非経口的に投与した。この実験に使用したコイの筋肉の B_1 は、 $0.385 \pm 0.081 \text{ mg}\%$ ($n=4$) であった。先に¹⁹⁾コイに Halver のビタミン試験飼料の 100 倍の B_1 を添加した B_1 過剰食, B_1 無添加の欠乏食で 3 カ月飼育した実験における筋肉の B_1 量はそれぞれ約 1.10 mg%, 0.01 mg% であったので、このトレーサー実験に使用したコイの B_1 は、ほぼ正常な範囲にあると考えられた。組織の B_1 の形態および飼育水に排泄された B_1 代謝産物を SP-セファデックス C-25 により分画したが、この分画法で得られた結果は、 C_{18} 逆相クロマトグラフィーによる結果と同じであることが確認された。分画の結果、コイの組織の B_1 形態のパターンは、Table 2 のように TDP の比率が高いなど、ラットやマウスの組織の B_1 形態のパターンと類似していたけれども、¹⁵⁻¹⁸⁾ 前述のようにチアミンリン酸エステルやチアミンの比率は相対的に低い値であった。しかし、コイの培養肝細胞においては (Table 4)、細胞内の全放射活性の約 70% は TDP であった。この値は、ラットやマウスの肝臓における TDP の比率¹⁵⁻¹⁸⁾と同じ程度であり、コイの肝臓においても TDP は高い比率で存在することが示された。 ^{14}C - B_1 の取り込み量は、組織の種類により大きく異なったが (Table 2)、取り込まれた B_1 の大部分は TDP に合成され、特に筋肉には多量の TDP が存在するなど、コイの体内にはチアミンの合成系が存在することが明らかにされた。

一方、 B_1 分解産物であるチアゾールの組織グラム当たりの放射活性は腎臓でもっとも高く、他の組織の7-10倍であり、次は肝臓、脾臓、心臓、エラ、血合肉でも高かった。また、これらの組織のおよそ 10 倍に相当するチアゾールが飼育水に排泄された。投与した B_1 は組織でチアゾールに分解されるが、組織には不必要であるため飼育水に排泄されると考えられる。排泄されたチアゾールは大別して、腸内において腸内細菌によって生成されるものと、組織中のチアミナーゼによって生成されるものに分けられる。しかし、組織自身がどの程度、チア

ゾールを生成するのかが測定法が困難で不明であるが、培養肝細胞を用いることにより、肝臓におけるチアゾール生成能を調べることが可能となった。Table 4 のように、コイの肝細胞の培養液中にはその約 40% に相当するチアゾールが検出された。このチアゾールは肝細胞でチアミンから生成され培地中に排泄されたものと考えられる。*In vivo* においてはチアゾールは血液中に排泄されると考えられるので、*in vivo* の組織におけるチアゾールは血液由来と考えられる。

本実験で、コイには B_1 合成系と B_1 分解系が存在することが明らかにされたが、ラットやマウスなど哺乳類においては、チアミナーゼの存在は現在のところまだ立証されていない。しかし、これらの動物の筋肉の B_1 量¹⁸⁾より、コイの筋肉の B_1 量の方が高かったことは事実であり、¹⁹⁾ チアミナーゼ活性が高いコイで B_1 量が多いことは興味を持たれる。コイにおいて B_1 の合成系と分解系は、細胞内のそれぞれ異なったオルガネラに分布し、 B_1 代謝に関与していると考えられる。 B_1 合成系については研究が進められているけれども、²⁵⁻²⁷⁾ B_1 分解系については不明な点が多く、今後に残された問題である。

文 献

- 1) A. Fujita: Thiaminase. in "Advance in Enzymology." (ed. by F. F. Nord), Vol. 15, Interscience Publishers, New York, 1954, pp. 389-421.
- 2) R. S. Haris: Thiaminase. in "The Enzymes." (ed. by J. B. Sumner and K. Myrback), Vol. 1, Academic Press, New York and London, 1951, pp. 1186-1206.
- 3) J. L. Wittliff and R. L. Airth: Thiaminase I. in "Methods in Enzymology", (ed. by D. B. McCormick and L. D. Wright), Vol. 18A, Academic Press, New York and London, 1970, pp. 229-234.
- 4) K. Murata: Actions of two types of thiaminase on thiamin and its analogues. in "Ann. N. Y. Acad. Sci.", (ed. by H. Z. Sable and C. J. Gubler), Vol. 378, 1982, pp. 146-156.
- 5) 石原 忠, 保田正人, 諸岡 等: カクチイワシのチアミナーゼについて, 日本誌, 38, 1281-1287 (1972).
- 6) 石原 忠, 紀成尚志, 保田正人: 海産物におけるチアミナーゼの分布—I, 日本誌, 39, 55-59 (1973).

- 7) W. C. Evans: Thiaminases and their effects on animals. in "Vitamins and Hormones", (ed. by P. S. Haris), Vol. 33, Academic Press, New York and London, 1975, pp. 467-504.
- 8) R. G. Green, W. K. Carlson, and C. A. Evans: A deficiency disease of foxes produced by feeding fish. *J. Nutr.*, **21**, 243-256 (1941).
- 9) 石原 忠, 保田正人, 柏木 哲, 秋山むつ子: カタクチイワシによるハマチの栄養性疾患と B₁ の添加効果. 日水誌, **40**, 775-781 (1974).
- 10) S. Vimokesant, S. Nakornchai, and K. Rungruangsak: Food habits causing thiamine deficiency in humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **22**, (Suppl) 1-2 (1976).
- 11) G. W. Roberts and J. W. Boyd: Cerebrocortical necrosis in ruminants. *J. Comp. Path.*, **84**, 365-374 (1974).
- 12) K. W. Thomas: The effect of thiaminase-induced subclinical thiamin deficiency on growth of weaner sheep. *Vet. Res. Commun.*, **10**, 125-141 (1986).
- 13) 佐藤雅子: ビタミン B₁ 無添加飼料投与による魚のビタミン B₁ 欠乏症と組織の B₁ 量について: 鹿児島大学教育学部研究紀要, **34**, 37-45 (1983).
- 14) Y. Hashimoto, S. Arai, and T. Nose: Thiamine deficiency symptoms experimentally induced in the eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **36**, 791-797 (1970).
- 15) C. Patrini and G. Rindi: An improved method for the electrophoretic separation and fluorometric determination of thiamine and its phosphates in animal tissues. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **50**, 10-18 (1980).
- 16) H. Iwata, T. Matsuda, and H. Tonomura: Improved high-performance liquid chromatographic determination of thiamine and its phosphate esters in animal tissues. *J. Chromatogr.*, **450**, 317-323 (1988).
- 17) Y. Egi, S. Koyama, H. Shikata, K. Yamada, and T. Kawasaki: Content of thiamin phosphate esters in mammalian tissues. *Biochem. Int.*, **12**, 385-390 (1986).
- 18) T. Matsuda, H. Tonomura, A. Baba, and H. Iwata: Tissue difference in cellular localization of thiamin phosphate esters. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**, 405-409 (1989).
- 19) 佐藤雅子: コイの組織のビタミン B₁ 含量に及ぼすビタミン試験飼料の影響. 鹿児島大学教育学部研究紀要, **27**, 9-17 (1976).
- 20) T. Matsuda and J. R. Cooper: The separation and determination of thiamin and its phosphate esters in brain. *Anal. Biochem.*, **117**, 203-207 (1981).
- 21) 林 征一: 魚類の組織培養—ウナギ・コイ肝細胞の培養. 「ラボマニュアル マリンバイオテクノロジー」(嵯峨直恒, 松永是編) 裳華房, 東京, 1991, pp. 44-57.
- 22) G. Bouche, N. Gas, and H. Paris: Isolation of carp hepatocytes by centrifugation on a discontinuous ficoll gradient. *Biol. Cellulaire.*, **35**, 17-24 (1979).
- 23) M. Fujiwara and K. Matsui: Determination of thiamine by the thiochrome reaction; application of cyanogen bromide in place of potassium ferricyanide., *Anal. Chem.*, **25**, 810-812 (1953).
- 24) E. E. Edwin: Determination of thiaminase activity using thiazole-labelled thiamine. in "Methods in Enzymology." Vol. 62, Academic Press, Inc. 1979, pp. 113-117.
- 25) M. Barile, S. Passarella, and E. Quagliariello: Thiamine pyrophosphate uptake into isolated rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 352-357 (1990).
- 26) T. Shioda, Y. Egi, K. Yamada, and T. Kawasaki: Properties of thiamin triphosphate-synthesizing activity of chicken cytosolic adenylate kinase and the effect of adenine nucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1115**, 30-35 (1991).
- 27) Y. Koike, Y. Urata, S. Matsuo, and M. Koike: Characterization and nucleotide sequence of the gene encoding the human pyruvate dehydrogenase α -subunit. *Gene*, **93**, 307-311 (1990).