

ハダカムギの発芽種子におけるリボフラビン からグルコシルリボフラビンの生成

鈴木 幸雄・内田 綱

さきに著者らは、イネ、トウモロコシ、キビの各完熟種子およびジャガイモの塊茎の各粉碎抽出液に固形硫酸アンモニウムを加えて得た塩析沈澱物には、マルトースとリボフラビン、セロビオースとリボフラビン、メリビオースとリボフラビン、ラクトースとリボフラビンから、それぞれ 5'-(α -グルコシル) リボフラビン、5'-(β -グルコシル) リボフラビン、5'-(α -ガラクトシル) リボフラビン、5'-(β -ガラクトシル) リボフラビンを生成する作用があることを見出し、ついでこれらの配糖体をいずれも結晶として単離し、同定した(鈴木・内田 1967b, Suzuki and Uchida 1969, 1971)。また、イネの乳熟期種子の粉碎抽出液から調製した硫酸アンモニウム塩析沈澱物には、リボフラビンと種々の二糖類、デキストリンおよび可溶性澱粉から、種々のリボフラビン配糖体を生成する作用があることを指摘した(鈴木 1968)。発芽種子におけるリボフラビン配糖体の生成については、立花(1959)がカボチャおよびサトウダイコンの各発芽6日目の子葉の磨砕水抽出液をマルトースとリボフラビンの混液に作用させたのち、ペーパークロマトグラフィーを行い、ペーパークロマトグラム上に 5'-(α -グルコシル) リボフラビンと同じ *R_f* 値を示す物質の生成を認めた報告があるに過ぎない。

本研究では、ハダカムギの発芽種子磨砕液にリボフラビンを加えて温置した時、2つのリボフラビン配糖体がリボフラビンの主要な代謝産物として生成されることを認め、そのうちの1つを単離、結晶化して化学構造を検討した。また、発芽種子内に取り込まれたリボフラビンの主要な代謝産物がリボフラビン配糖体であることを認めたので、ここに報告する。

本稿を草するに当たり、赤外線吸収スペクトルの測定に際して御便宜を賜った岡山大学農業生物研究所兼久勝夫教授に感謝する。

実 験 方 法

1. 実験材料

ハダカムギ (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook) の種子は、昭和52年岡山大学農業生物研究所実験圃場で収穫後、低温室(4°C)に保存したものである。

2. 酵素および試薬

Aspergillus niger の α -グルコニダーゼは既報(鈴木ら 1973)のディスク電気泳動的

昭和57年12月8日受理

に単一な精製標品である。アーモンドの β -グルコシダーゼは Boehringer Mannheim 社の製品 (3.2 M 硫酸アンモニウム溶液に懸濁した標品, 40 u/mg) である。リポフラビンは Merck 社の製品, その他の試薬は市販の特級あるいはそれに準ずる試薬である。

3. 分析方法

リポフラビン配糖体量の測定 既報 (Suzuki and Katagiri 1963) の方法によった。

濾紙電気泳動 リポフラビンおよびその配糖体の各 0.5% 水溶液 5 μ l を東洋濾紙 No. 53 (幅 12 cm \times 長さ 26 cm) の中央 (陽極側の端から 13 cm) 線上に点状につけ, 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を電解液として 400 V, 8 時間室温で通電を行った (電極槽: 5% 塩化カリウム; 5% 塩化カリウムを含む 2% 寒天橋を使用)。

酸による加水分解 既報 (鈴木・内田 1967a) の方法に準じて行った。

グルコシダーゼによる加水分解 既報 (鈴木・内田 1967a) の方法に準じて行った。

グルコースの同定 既報 (三宅・鈴木 1971) の方法によった。

過ヨウ素酸による酸化 既報 (鈴木・内田 1967a) の方法に準じて行った。

発芽種子中のリポフラビン配糖体量の測定 ハダカムギ種子 240g を 10g ずつ二重のガーゼ袋に入れ, あらかじめ 40°C に保温した 0.25% ホーマイ液 (チウラムチオファネートメチル水和剤, 日本曹達株式会社製の種子消毒剤) に 15 分間浸漬し, さらに室温で 6 時間浸漬したのち, 流水で洗浄した。この種子を, 滅菌したパーミキュライトを深さ約 4 cm に敷いたキャビネ版ポリバット 24 枚にまき, 対照区では滅菌水を, リポフラビン区では滅菌した 50 mg% リポフラビン水溶液を, それぞれ 50~100 ml ずつ隔日に撒布して 20°C, 暗所で発芽させた。発芽率は 90% 以上であった。隔日に各区から 2 バットずつの発芽種子を取り出し実験に使用した。発芽種子を流水で洗浄し, 蒸気釜中で 100°C, 20 分間加熱した。ついで乳鉢中で磨砕し, 発芽種子の生鮮重量と等量の純水を加えて再度 100°C, 15 分間加熱した。氷冷後等量のエタノールを加えて遠心分離し, 上澄液を減圧濃縮した。濃縮液中のリポフラビン化合物を常法に従ってフェノール層に濃縮し, 水に転溶した。得られた水層についてペーパークロマトグラフィー [展開溶媒: n-ブタノール・ピリジン・水 (6:4:3, v/v) (溶媒 A), 上昇法で 2 回繰り返し展開] を行った。リポフラビンおよびその主代謝産物であるリポフラビン配糖体に相当する各蛍光部位を切り取り, 50°C, 1 時間温水抽出した。抽出液の一部に等量の 0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を加え, 525 nm における蛍光強度を日立自記分光光度計 EPS-3T 形の蛍光付属装置で測定して両化合物量を求めた。検量線は各種濃度のリポフラビン水溶液について, 同様にペーパークロマトグラフィーを行い, 抽出液の蛍光強度を測定して作成した。

4. 発芽種子磨砕液の調製

ハダカムギ種子 9 kg を 1 kg ずつ二重のサラン網袋に入れ, あらかじめ 40°C に保温した 0.25% ホーマイ液に 15 分間浸漬し, さらに室温で 6 時間浸漬したのち流水で洗浄した。これをポリバケツに渡したガラス棒にくくりつけ, 20°C の暗所で発芽させた。発芽期間中 4 時間毎に滅菌水を撒布した。吸水 5 日後, 発芽種子に 1.5 倍量の冷却水を加え, ミキサーで 3 分間氷冷しながら磨砕した。この磨砕液を実験に使用した。

実験結果および考察

1. リボフラビン配糖体の単離

ハダカムギの吸水後5日目の発芽種子磨砕液5ℓに、リボフラビンを60 mg% 含んだ0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 5ℓ, および少量のトルエンを加えた混液9個を、ときどき攪拌して30°C, 2日間暗所に保持した。2日間温置後、混液を晒布袋に入れ、脱水機で脱水して濾液を得た。濾液中のリボフラビンおよびリボフラビン誘導体を常法に従ってフェノール層に濃縮した。このフェノール層の一部についてペーパークロマトグラフィー (展開溶媒Aを用いて上昇法で2回展開) を行ったところ、クロマトグラム上にリボフラビン、グルコシルリボフラビン類似物質 (以下GRと呼ぶ), および僅少量のリボフラビン少糖類と思われる物質のスポットを認めた。GRに相当する部位を切り取り、温水で抽出後、抽出液の吸光度 (OD₄₅₀) から求めたGR量はリボフラビンとして2111 mgであった。上記のフェノール層にエチルエーテル・水 (10:1, v/v) の混液を加え、激しく攪拌して水層を集めることを数回繰り返した。得られた水層をエーテルで洗って、混在するフェノールを除去したのち、減圧濃縮した。濃縮中に析出したリボフラビンの結晶を遠心分離して除去後、得られた上澄液 (約500 ml) を東洋濾紙 No. 2 (30×60 cm) に1枚につき1 ml の割で、濾紙の下端から5 cmの高さに帯状 (54 cm幅) にスポットした。この濾紙を溶媒Aを用いて上昇法で2回展開した。展開後クロマトグラム上のGRに相当する分別帯を切り取り、水で抽出した。水抽出液を減圧濃縮後、濃縮液を東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) 上にイソアミルアルコール飽和水 (溶媒B) で1回展開した。クロマトグラム上のGR分別帯を切り取り、水で抽出して濃縮した。濃縮液を再度東洋濾紙 No. 53 (40×40 cm) 上にn-ブタノール・蟻酸・水 (4:1:1, v/v) (溶媒C) を用いて上昇法で3回繰り返して展開し、混在した蛍光物質からGRを分離した。GR分別帯を水抽出、濃縮後、濃縮液 (約10 ml) をSephadex G-15 カラム (56φ×750 mm) にのせ、純水を流してゲルクロマトグラフィーを行い、GRを含む溶出区分を集めて減圧濃縮した。濃縮液の一部に *Asp. niger* のα-グルコシダーゼ、アーモンドのβ-グルコシダーゼ、あるいは両グルコシダーゼをそれぞれ作用したところ、α-グルコシダーゼによりGRの89%が、β-グルコシダーゼによりGRの6%が、両グルコシダーゼによりGRの95%がそれぞれ分解され、GRからのリボフラビンの遊離が認められた。したがって、GRはα-グルコシルリボフラビン類似物質89%とβ-グルコシルリボフラビン類似物質6%および他の蛍光物質5%の混合物であることを知った。そこでβ-グルコシルリボフラビン類似物質を分解するために、濃縮液に0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 7.5 ml, 市販のアーモンドのβ-グルコシダーゼ0.15 ml, および純水を加えて (全量15 ml) 37°Cで24時間保持した。反応後反応液を沸騰水浴中に15分間浸漬して反応を停止した。水冷後反応液を再びペーパークロマトグラフィー (溶媒Bを用いて上昇法で展開) にかけて精製した。α-GRの分別帯を水で抽出した液を濃縮後、濃縮液を濾紙上に溶媒Cを用いて3回展開した。α-GR分別帯を水抽出、濃縮後、濃縮液をSephadex G-15カラム (56φ×750 mm) にのせ、純水を流してゲルクロマトグラフィーを行った。α-GRを含む溶出区分を集めて濃縮、乾固し、エタノールで再結晶を繰り返して淡黄色針状結晶 (CGR) [リボフラビンとして182 mg, mp 247~249°C (分解)] を得た。

2. 標品 CGR の性質

ここに得た標品 (以下 CGR と呼ぶ) の諸性質を, 著者らがさきに *Leuconostoc mesenteroides* を用いて調製した 5'-(α -グルコシル) リボフラビンの結晶標品のそれらと比較した (Table 1).

Table 1. Properties of crystalline 5'-(α -glucosyl) riboflavin (CGR) isolated from the incubation mixture containing homogenates of 5-day-old barley seedlings and riboflavin

Source of enzyme	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Barley
<i>Rf</i> values		
B. A. W.	0.20	0.20
P. W.	0.40	0.40
W. isoA.	0.50	0.50
B. F. W.	0.05	0.05
Melting point ($^{\circ}$ C, decomposed)	247-249	247-249
Ratios of optical density		
260 nm/450 nm	2.25	2.26
275 nm/450 nm	2.03	2.03
375 nm/450 nm	0.85	0.85
Position of maxima in absorption spectrum(nm)	266, 373, 445	266, 373, 445
Paper chromatogram of acid hydrolysate	glucose, riboflavin	glucose, riboflavin
Molar ratio of riboflavin to glucose	1/0.95	1/0.97
Periodate uptake (mole/mole of crystalline glucosylriboflavin)	4.04/1	3.94/1
Hydrolysis by		
α -glucosidase	+	+
β -glucosidase	-	-
Presence of phosphate	-	-

Rf values were observed on Toyo No. 50 filter paper, using the following solvent systems.

B. A. W.: n-butanol-acetic acid-water (4 : 1 : 5, v/v).

P. W.: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -water (5 : 100, w/v).

W. isoA.: water, saturated with isoamyl alcohol.

B. F. W.: n-butanol-formic acid (80%)-water (77 : 10 : 13, v/v).

a) **ペーパークロマトグラフィー** 種々の溶媒を用いたペーパークロマトグラフィーにおける CGR の *Rf* 値は, 5'-(α -グルコシル) リボフラビンのそれとよく一致した。また, CGR と 5'-(α -グルコシル) リボフラビンを濾紙に混合スポットし, 前述した 3 種類の溶媒 A, B, C および Table 1 に記載した各種の溶媒で数回展開を行っても, 単一のスポットを示した。

b) **濾紙電気泳動** CGR および 5'-(α -グルコシル) リボフラビンの濾紙電気泳動を行った結果, 両者はいずれも陰極方向に移動し, 原点からの移動距離においてもよく一致した。

c) **スペクトル** CGR および 5'-(α -グルコシル) リボフラビンの紫外外部吸収スペクトルを日立分光光度計 139 形を用いて水を溶媒として求めたところ、両者の吸収極大および極小の波長位置がよく一致した。CGR 溶液にヒドロサルファイトナトリウムを加えて還元すると、445 nm の吸収が消失した。また、両化合物の赤外線吸収スペクトルはよく一致した (Fig. 1)。また、両化合物の核磁気共鳴スペクトルを重水を溶媒として求めた。Fig. 2 に示すように、両者のスペクトルはよく一致し、イソアロキサジン環の 6 位および 7 位の CH_3 基、ならびに 5 位および 8 位のプロトンのいずれもが存在することを示した。また、日立自記分光光度計 EPS-3T 形の蛍光付属装置を用いて、450 nm で励起した場合、両化合物の水溶液の蛍光スペクトルには、いずれも 530 nm 付近に吸収極大があった。

d) **酸による加水分解** CGR はそのままでは濾紙上におけるアニリン水素フタル酸による呈色が陰性であったが、N塩酸に溶解して 100°C、2.5 時間加熱することにより分解され、グルコースとリボフラビンをモル比 1:1 で生成した。また、加水分解液中にリン酸 [アレン法 (中村 1950) により検討] は検出されなかった。

e) **グルコシダーゼによる加水分解** CGR に *Asp. niger* の α -グルコシダーゼを作用させると、グルコースとリボフラビンに分解された。遊離されたグルコースは、グルコースオキシダーゼにより容易に酸化され、ペーパークロマトグラム上グルコン酸標品に一致した。他方アーモンドの β -グルコシダーゼによっては分解されなかった。

f) **過ヨウ素酸による酸化** CGR を過ヨウ素酸 ナトリウムを用いて低温で酸化し、過ヨウ素酸消費量を求めた。同時に対照として、リボフラビン および メチル α -グルコシドを酸化した。その結果、メチル α -グルコシド、リボフラビンおよび CGR はそれぞれ 1 モル当たり過ヨウ素酸 2 モル、2 モルおよび 4 モルを消費した。

以上の諸性質 a)~f) から、CGR は 5'-(α -グルコシル) リボフラビンの構造を有すると推定した。

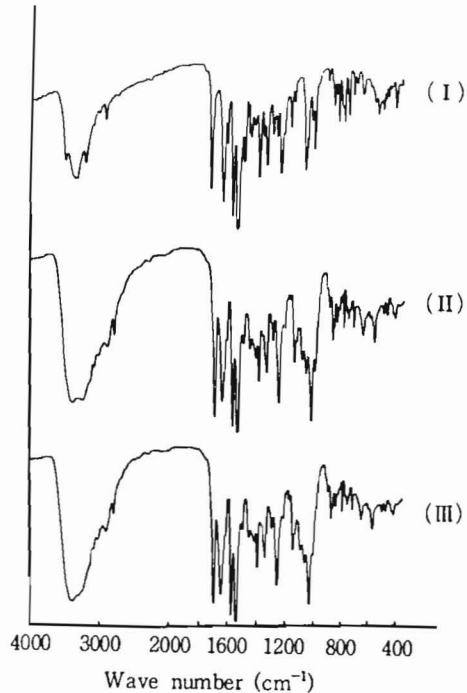


Fig. 1. Infra-red spectra of riboflavin, 5'-(α -glucosyl) riboflavin, and the isolated compound (CGR) from the incubation mixture containing homogenates of barley seedlings and riboflavin.

- (I): Riboflavin.
- (II): Crystalline 5'-(α -glucosyl) riboflavin produced by *Leuconostoc mesenteroides*.
- (III): Isolated compound (CGR).

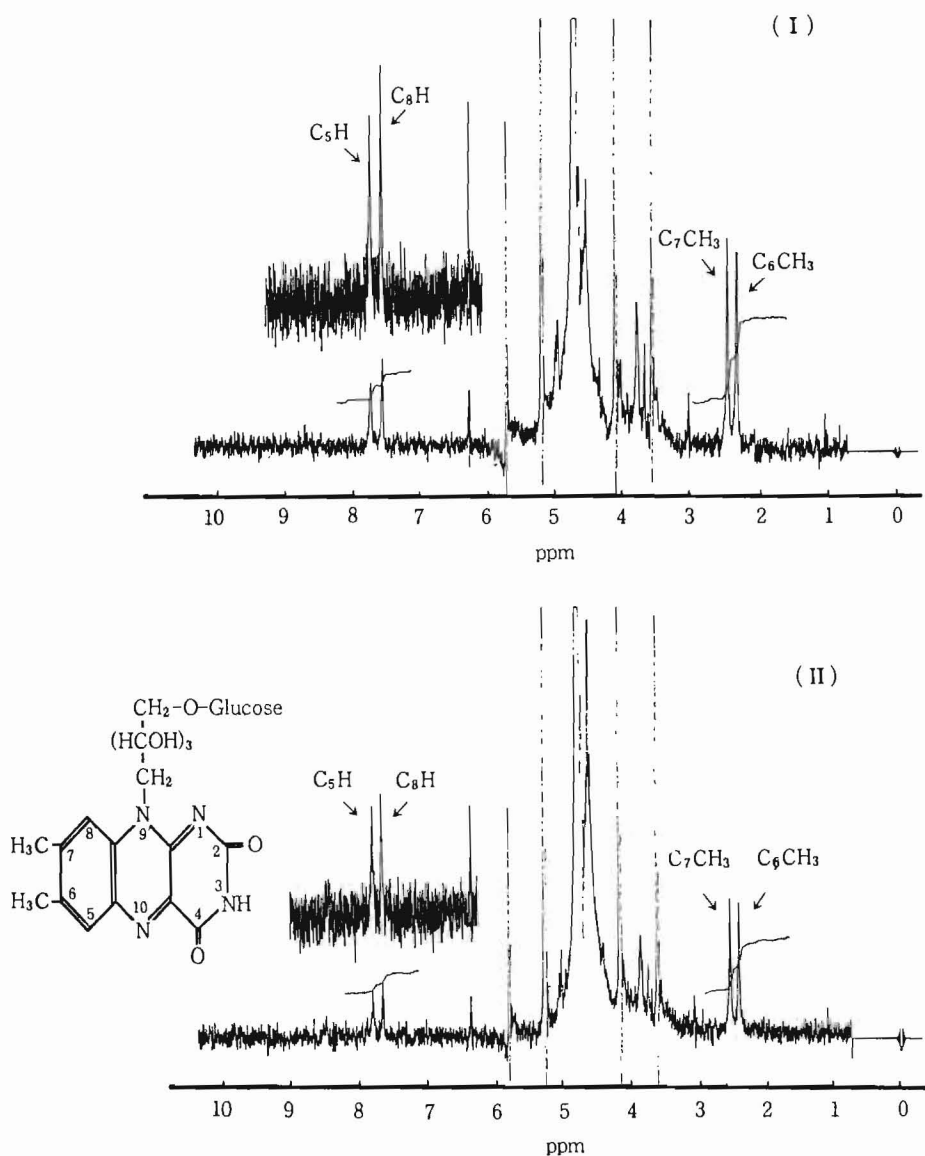


Fig. 2. NMR spectra of 5'-(α -glucosyl) riboflavin and the isolated compound (CGR).

NMR spectra were recorded on a Varian model EM 390 spectrometer at 90 MHz in D₂O.

(I): Crystalline 5'-(α -glucosyl) riboflavin produced by *Leuconostoc mesenteroides*.

(II): Isolated compound (CGR).

3. 発芽種子中におけるリボフラビン配糖体の生成

ハダカムギ種子を種子消毒剤で殺菌後、パーミキュライトにまき、水(対照区)およびリボフラビン水溶液を撒布して、20°C、11日間暗所で芽発させた。発芽期間中、発芽種子

の熱水抽出液についてペーパークロマトグラフィーを行い、リボフラビン誘導体の生成を調べた。リボフラビン以外に認められた主な黄色蛍光スポットは、その蛍光強度がリボフラビンに比べて著しく弱かったが、その R_f 値はグルコシルリボフラビンに類似していた。発芽種子中のリボフラビンおよびグルコシルリボフラビン類似物質（以下 GR' と呼ぶ）の経日変化を Fig. 3 に示した。吸水初期から、種子中に取り込まれたリボフラビンのスポットが認められ、吸水後3日目には GR' の生成が認められた。その後7日目まで、リボフラビンの取り込みの著しい増加とともに GR' の生成量も増加した。対照区では、吸水後3日目からリボフラビンの蛍光スポットがペーパークロマトグラム上に極く微量検出されたが、グルコシルリボフラビンのスポットは見受けられなかった。また、バーミキュライト中のリボフラビンをペーパークロマトグラフィーで検討したところ、他物質への転換は認められなかった。

ついで、発芽種子中に認められた GR' の性質について検討した。すなわち、吸水後5, 7, 9および11日目の各ペーパークロマトグラム上の GR' 区分を抽出した液（蛍光強度測定後の残液）を混合して濃縮後、GR' を展開

溶媒BおよびCを用いたペーパークロマトグラフィーにより精製して真空凍結乾燥した。(1) GR' 精製標品の、水を溶媒とした紫外外部吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルは、5'-(α -グルコシル)リボフラビンのそれらとよく一致した。(2) GR' 精製標品を、展開溶媒A, C, および n-ブタノール・酢酸・水 (4:1:5, v/v) を用いて濾紙上に3回展開した場合、ペーパークロマトグラム上に2つのスポットが認められ、それぞれが5'-(α -グルコシル)リボフラビンおよび5'-(β -グルコシル)リボフラビンの R_f 値とよく一致した。(3) GR' 精製標品を0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) に溶解したのち、*Asp. niger* の α -グルコシダーゼ、アーモンドの β -グルコシダーゼ、あるいは両酵素を作用したとこ

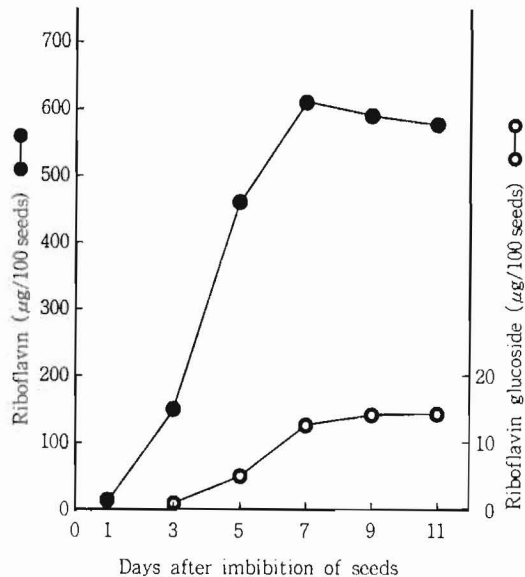


Fig. 3. Changes of riboflavin and glucosylriboflavin in barley seedlings during the cultivation on riboflavin solution.

Barley seeds were sown on vermiculite placed in plastic plates. The germinated seeds were cultured on 50 mg % riboflavin solution. Seedlings were harvested every other day, washed, and extracted with water for 20 min on a boiling water bath. Riboflavin and its derivatives in the boiled extract, after Cramer's treatment, were examined by paper chromatography using a solvent system of n-butanol-pyridine-water (6:4:3, v/v). The fluorescent spots of riboflavin compounds, detected under an ultraviolet lamp, were cut and extracted at 50°C for 1 hr. The intensity of the fluorescence of the extracts was measured by a spectrofluorometer attached to a Hitachi model EPS-3T recording spectrophotometer.

ろ、 α -グルコシダーゼにより GR' の約 30% が分解され、 β -グルコシダーゼにより GR' の 70% が分解された。この際遊離したリボフラビンの同定は、ペーパークロマトグラフィー（展開溶媒：溶媒 A および 溶媒 C）における Rf 値が市販のリボフラビンのそれとよく一致することによった。

上記の実験結果より、ハダカムギの発芽種子ではリボフラビンが種子内に取り込まれ、その一部がリボフラビン配糖体（主として β -グルコシルリボフラビン）に転換されることが明らかになった。

摘 要

1) ハダカムギの発芽種子磨砕液にリボフラビンを加えて温置した時、グルコシルリボフラビン類似物質がリボフラビンの主要な代謝産物として生成されることを認め、本物質をペーパークロマトグラフィーおよび Sephadex G-15 カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製標品は α -グルコシルリボフラビン類似物質 (89%) と β -グルコシルリボフラビン類似物質 (6%) の混合物であった。

2) 精製標品に β -グルコシダーゼを作用させて β -グルコシルリボフラビン類似物質を分解後、ペーパークロマトグラフィーおよび Sephadex G-15 カラムクロマトグラフィーにより、残存する α -グルコシルリボフラビン類似物質を精製し結晶として単離した。結晶標品は、さきに *Leuconostoc mesenteroides* を用いて調製した 5'-(α -グルコシル) リボフラビンの結晶標品と Rf 値、紫外吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、酸および酵素による分解産物、過ヨウ素酸消費量などがよく一致したことにより、5'-(α -グルコシル) リボフラビンであると同定した。

3) ハダカムギ種子にリボフラビン水溶液を撒布して発芽をさせた時、発芽種子中には β -グルコシルリボフラビンがリボフラビンの主要な代謝産物として認められた。

文 献

- 三宅俊雄, 鈴木幸雄. 1971. アスコルビン 酸糖化合物の 酵素的生成 (予報). ビタミン 43: 205-209.
- 中村道徳. 1950. 磷酸の比色定量法. 農化. 24: 1-5.
- 鈴木幸雄. 1968. ビタミン B₂ の糖化合物に関する研究. 昭和 43 年度三島海雲記念財団研究奨励金報告書. 139-145 頁.
- Suzuki, Y. and Katagiri, H. 1963. Studies on dextransucrase. 1. Formation of riboflavinylglucoside in dextranproducing cultures of *Leuconostoc mesenteroides*. J. Vitaminol. 9: 285-292.
- 鈴木幸雄, 内田 綱. 1967a. Dextransucrase に関する研究 (第 6 報). *Leuconostoc mesenteroides* による結晶性 5'-D-riboflavin- α -D-glucopyranoside の調製. 農化. 41: 125-129.
- 鈴木幸雄, 内田 綱. 1967b. 植物の種実によるビタミン B₂ グリコシド類似物質の生成. 農化. 41: 686-690.
- Suzuki, Y. and Uchida, K. 1969. Biosynthesis of riboflavin- α -glucoside by plant grains. Arch. Biochem. Biophys. 130: 683-684.
- Suzuki, Y. and Uchida, K. 1971. Biosynthesis of riboflavin glycosides by plant grains. Agric. Biol. Chem. 35: 682-685.

- 鈴木幸雄, 三宅俊雄, 内田 綱, 味野愛子. 1973. アスコルビン酸グルコシドの生合成. ビタミン 47: 259-267.
- 立花 精. 1959. ビタミン B₂の糖化合物 XI. カボチャとサトウダイコン発芽のさいのリボフラビニルグルコシドの生成. ビタミン 16: 459-460.

Formation of Glucosylriboflavin from Riboflavin in Germinating Barley Seeds

Yukio SUZUKI and Kei UCHIDA

Summary

α -Glucosylriboflavin-like and β -glucosylriboflavin-like compounds were found to be formed at a ratio of 89 to 6, when the homogenates of 5-day-old barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook) seedlings were incubated with riboflavin. The minor product, a β -glucosylriboflavin-like compound, was hydrolyzed by almond β -glucosidase, and the remaining α -glucosylriboflavin-like compound was purified by paper chromatography and Sephadex G-15 column chromatography. The compound thus obtained in its crystalline form, was identified as 5'-(α -glucosyl) riboflavin on the basis of *R_f* values, UV, IR and NMR spectra, electrophoretic mobilities on paper, liberation of glucose and riboflavin (molar ratio 1:1) by acid hydrolysis, hydrolysis by glucosidases, and oxidation with sodium metaperiodate.

When barley seeds were germinated and cultured on an aqueous riboflavin solution, the exogenously applied riboflavin was proved by paper chromatography to be incorporated and transformed into glucosyl compounds of riboflavin (β -glucosylriboflavin as major product and α -glucosylriboflavin as minor product).