

ビタミン B₁ とメラニンの結合機構

佐藤 雅子

(1991年10月15日 受理)

Mechanism in Binding of Thiamin to Melanin

Masako SATO

Abstract

The binding of thiamin was investigated in eye melanin of carp and pigeon. The release of thiamin from eye melanin was not affected by protease such as pronase, trypsin and chymotrypsin. Thiamin was strongly released from eye melanin by divalent metal ion to compare with monovalent metal ion, though there were differences among these metal ions. The release of thiamin from eye melanin was smallest at pH 4.5. These results suggest that the binding of thiamin is electrostatic in property.

ビタミン B₁ は動物の眼に高濃度に存在しているが眼の脈絡膜や網膜の色素上皮層のメラニンに結合して存在することを報告した¹⁾。ビタミン B₂ も眼メラニンと結合して動物の眼に高濃度に存在している²⁾。一方ストレプトマイシン, カナマイシン, クロロキンなどの薬物もメラニンとの親和力が強く眼, 内耳, 脳に存在するメラニンに結合し, これらの薬物を長期間服用すると薬物が蓄積して組織が変性し, 失明, 難聴, 運動障害, パーキンソン病を引き起こすことが報告されている³⁻⁷⁾。これらビタミン B₁ や B₂, 薬物などメラニンと強い親和力をもつ化合物が相互にどのような機構でメラニンに結合しているか B₁ についてメラニンとの結合機構を検討した。

B₁ とメラニンとの結合におよぼす蛋白質の影響を眼メラニンにトリプシン, ペプシン, プロナーゼ, ナガーゼなどの蛋白質分解酵素を作用させたり, 加熱処理して比較検討したが蛋白質の影響はみられなかった。金属イオンの影響は大きく金属イオン相互の間で幾分相違がみられ, 2 価の金属イオンは 1 価の金属イオンに比べ眼メラニンからの B₁ 遊離は大きく, また B₁ とメラニンとの結合に pH の影響が大きいなど, B₁ とメラニンとの結合は静電気的なものであることが明らかにされた。

実験方法

試料の調整

眼メラニン_{B₁}量は高く、新鮮で多量の眼メラニンの入手が可能なコイの眼を使用した。コイの眼の脈絡膜や網膜の色素上皮層を死後直ちに剝離し凍結して貯蔵し要時乳鉢で充分磨砕後水に懸濁した。3～4回遠心分離して水洗した眼メラニンに蛋白質分解酵素、各種 pH の緩衝液、金属塩を加え一定時間振盪した後40,000g×15分遠心分離し上清の B₁ を測定した。沈渣の B₁ は 0.05N 硫酸で加熱抽出した後チオクローム法⁸⁾で B₁ を定量した。上清の B₁ は眼メラニンから遊離した B₁ であり、沈渣の B₁ は眼メラニンから遊離せず眼メラニンに結合して残存した B₁ に相当する。ハトの眼のメラニン層も比較のため使用し同様に測定した。

蛋白質分解酵素

トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、プロナーゼ、ナガーゼ、サーモライシンは Sigma 社の製品を使用した。眼メラニンを 80℃ で 3 分間熱処理を行った後、蛋白質分解酵素を加えそれぞれ酵素の最適条件で作用させ遠心分離して上清をとり遊離された B₁ を定量した。この反応を 3 回繰返し同様に上清の B₁ を定量し、沈渣に残存した B₁ も測定した。

結果及び考察

B₁ とメラニン結合に及ぼす加熱の影響

コイの眼メラニンは 100℃ 30 分までの加熱で眼メラニンに存在していた B₁ の約 15% は遊離したが 85% 以上は眼メラニンから遊離することなく沈渣に結合して残存した。これに対し筋肉の B₁ は 10-30 分加熱で約 85% は上清に遊離し沈渣に残存した B₁ は約 15% であり眼メラニンと著しく異なっていた (Table 1)。

Table 1 Effect of heating on the release of thiamin from eye melanin and muscle.

Tissue		100°C (min)				
		0	5	10	20	30
		μmol/g tissue				
Eye	Released	0.055	0.079	0.085	0.085	0.089
	Bound	0.549	0.534	0.524	0.505	0.490
	Total	0.604	0.613	0.608	0.592	0.580
Muscle	Released	0.004	0.009	0.009	0.010	0.008
	Bound	0.004	0.001	0.001	0.002	0.001
	Total	0.008	0.010	0.010	0.012	0.009

B₁ とメラニン結合に及ぼす蛋白質の影響

コイの眼メラニンに蛋白質分解酵素を Table 2 のように作用させ眼メラニンからの B₁ 遊離を検討した。80℃で3分の熱処理で約5%の B₁ が遊離した。トリプシン, キモトリプシンなどの蛋白質分解酵素では酵素添加群は酵素無添加の対象群と同じように B₁ の遊離は小さかった (Fig. 1)。これに対しペプシン, プロナーゼ, ナガーゼ, サーモライシンなどは酵素添加群で高い値を示したが, これらの値は酵素を加熱処理した対象群と比較するとほとんど同じ値であり異なった減少であった。ハトの眼メラニンについても同様の実験を試みたがコイの眼メラニンの結果と同様の結果であり蛋白質分解酵素添加群は対象群と同じような値を示した (Fig. 2)。いずれの蛋白質分解酵素を眼メラニンに作用させても蛋白質分解酵素の影響は見られなかった。

プロナーゼをコイの筋肉や肝臓など B₁ 含量の高い組織に作用させ眼メラニンと比較した (Table 3)。筋肉や肝臓などの B₁ は80℃で3分の熱処理で約90%の B₁ は遊離し眼メラニンに見られた現象とは異なっていた。眼メラニンに蛋白質分解酵素を作用させても B₁ 遊離は酵素添加群は対象群とほとんど同じ値であること, 眼メラニンを加熱処理しても B₁ はほとんど遊離しないことなどから B₁ とメラニンの結合には蛋白質の影響は余りないものと考えられる。松井²⁾らは, B₂ と眼メラニンの結合に蛋白質の影響は余りないと報告しているが B₁ とメラニンの結合についても同じ結果であった。岩島^{9,10)}はコメヌカにビタミン B₁ 結合蛋白質が存在することを報

Table 2 Release of thiamin from eye melanin of carp by protease.

Protease	Release from carp eye tissue			Remaining in residue	Total	
	Pretreatment	Incubation				
		1st	2nd			3rd
		thiamin $\mu\text{mol/g tissue}$				
Trypsin	0.024	0.056	0.044	0.039	0.676	0.840
Control (none)	0.026	0.048	0.042	0.021	0.668	0.804
α -Chymotrypsin	0.012	0.042	0.026	0.021	0.596	0.697
Control (none)	0.011	0.034	0.028	0.020	0.571	0.663
Pepsin	0.035	0.300	0.171	0.091	0.166	0.763
Control (boiled)	0.034	0.277	0.140	0.090	0.182	0.721
Pronase	0.032	0.199	0.094	0.076	0.254	0.653
Control (boiled)	0.032	0.195	0.110	0.090	0.229	0.656
Nagase	0.020	0.180	0.109	0.073	0.332	0.714
Control (boiled)	0.018	0.168	0.123	0.089	0.315	0.713
Thermolysin	0.026	0.232	0.140	0.102	0.118	0.614
Control (boiled)	0.026	0.224	0.152	0.102	0.091	0.595

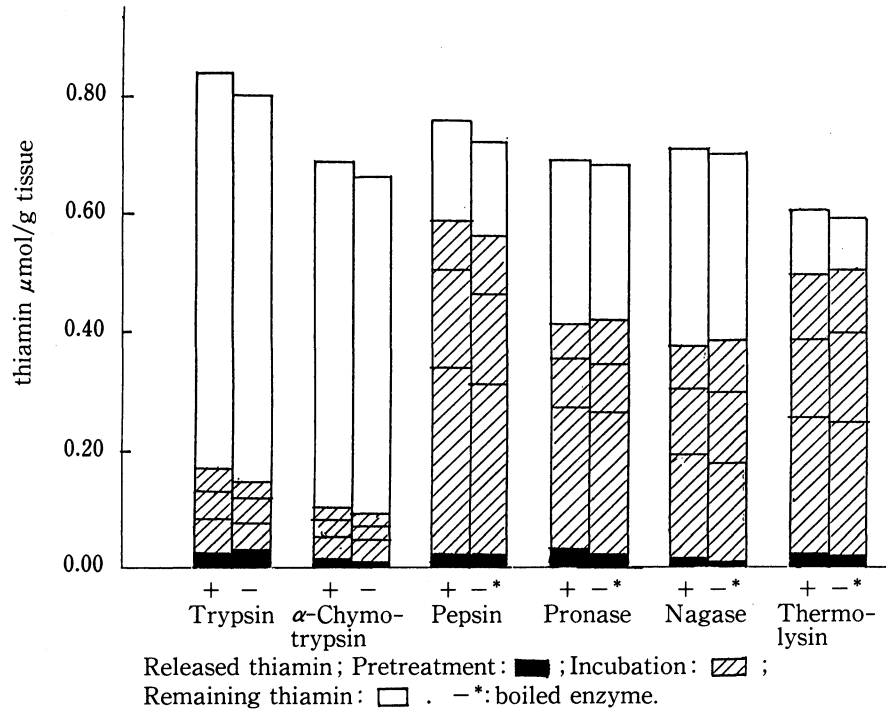


Fig. 1 Release of thiamin from eye melanin of carp by protease.

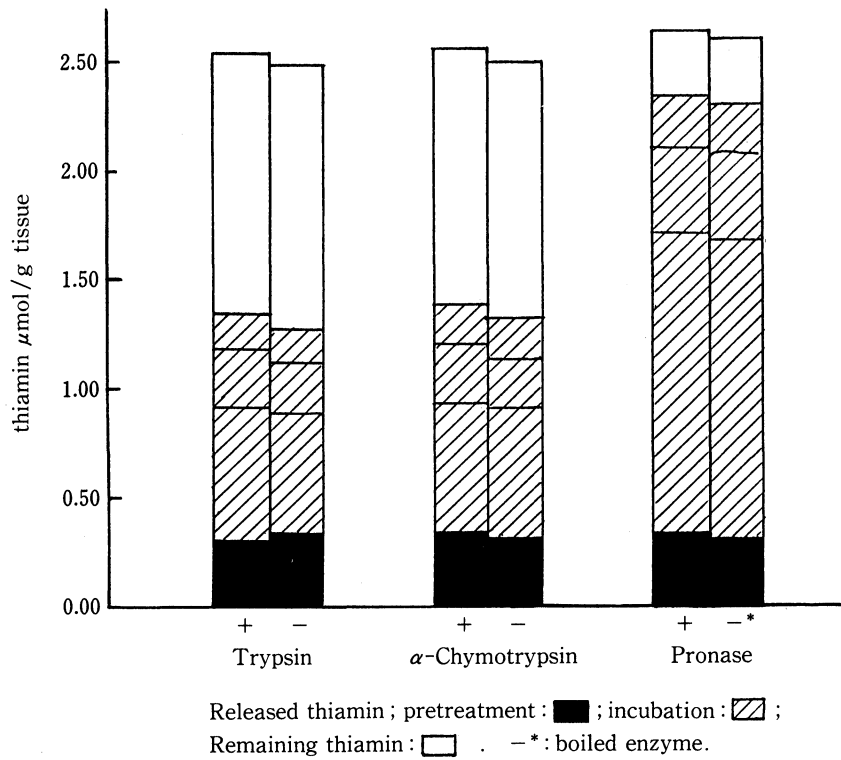


Fig. 2 Release of thiamin from eye melanin of pigeon by protease.

佐藤：ビタミン B₁ とメラニンの結合機構

Table 3 Release of thiamin from eye melanin, muscle and hepato-pancreas by pronase.

Tissue	Enzyme	Release from carp tissue				Remaining in residue	Total
		Pretreatment	Incubation				
			1st	2nd	3rd		
thiamin $\mu\text{mol/g tissue}$							
Eye	Pronase	0.047	0.226	0.086	0.057	0.280	0.695
	Control*	0.049	0.219	0.090	0.061	0.270	0.689
Muscle	Pronase	0.033	0.003	0.001	0.000	0.001	0.037
	Control*	0.032	0.003	0.001	0.001	0.001	0.038
Hepato- pancreas	Pronase	0.010	0.001	0.000	0.000	0.000	0.011
	Control*	0.009	0.001	0.000	0.000	0.001	0.011

Control* was treated at 100°C for 10 min.

告しており、西野は¹¹⁾ラットの脳や肝臓に B₁ リン酸エステルと特異的に結合する蛋白質が存在することを報告している。この実験では B₁ は蛋白質の存在に直接影響をうけずメラニンに結合することが明らかにされた。

B₁ とメラニン結合に及ぼす金属イオンの影響

眼メラニンを Table 4 のように各種溶液に懸濁し60分振盪後遠心分離し上清と沈渣の B₁ を測定した。蒸留水, 0.22M ショ糖液, 0.05M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) では約10%の B₁ が上清に遊離され大部分は沈渣にメラニンと結合して残存したがリンゲルでは半分以上の B₁ が上清に遊離さ

Table 4 Effect of suspending media on release of thiamin from eye melanin.

Suspending medium	Distilled water	0.22M sucrose	Ringer's solution	0.05M acetate buffer, pH 4.5
$\mu\text{mol/g tissue}$ (%)				
Released thiamin	0.062 (6.7)	0.106 (11.0)	0.748 (63.8)	0.095 (8.3)
Bound-thiamin	0.861 (93.3)	0.858 (89.0)	0.424 (36.2)	1.053 (91.9)
Total thiamin	0.923 (100)	0.964 (100)	1.172 (100)	1.145 (100)

Table 5 Effect of suspending media on release of thiamin from eye melanin.

Suspending media	0.22 M sucrose	Ringer's solution
thiamin $\mu\text{mol/g tissue}$		
Release from eye melanin		
Suspending 1st	0.119 (9.7%)	0.619 (52.1%)
Suspending 2nd	0.077 (6.3%)	0.201 (16.9%)
Suspending 3rd	0.042 (3.4%)	0.117 (9.9%)
Remaining in rediue	0.982 (80.5%)	0.252 (21.2%)
Total	1.219 (100%)	1.188 (100%)

れた。

0.22M ショ糖液とリンゲルについて更に懸濁を繰返して比較すると Table 5 のように 0.22M ショ糖液では3回の懸濁でも上清に遊離される B_1 は20%であるが、リンゲルでは1回の懸濁で約半分の B_1 が上清に遊離され2回、3回の懸濁で B_1 は更に遊離され沈渣にメラニンと結合して残存する B_1 は20%に過ぎなかった。

緩衝液の影響

Table 6 に示すような pH の緩衝液を終濃度 0.05M になるように眼メラニンに添加し同様に B_1 遊離現象を検討した。pH 4.5 では眼メラニンからの B_1 遊離は10%であるがこれより酸性側でもアルカリ性側でも B_1 遊離は高くなり pH 7.0では約70%の B_1 が遊離した。

pH 4.5の酢酸緩衝液の終濃度を Table 7 に示すように眼メラニンに添加し眼メラニンからの B_1 遊離現象をみた。緩衝液の濃度が低いと B_1 遊離は10%以下で小さいが濃度が高いと B_1 遊離は大きくなり 1M の濃度ではおよそ半分の B_1 が遊離し、イオン強度の影響が顕著に見られた。

Table 6 Relationship between pH and release of thiamin from eye melanin.

pH	1.0	3.0	4.5	6.0	7.0
	$\mu\text{mol/g tissue}$				
Released thiamin (%)	0.662 (91.3)	0.245 (34.4)	0.072 (10.3)	0.267 (38.1)	0.395 (57.2)
Bound-thiamin (%)	0.063 (8.7)	0.466 (65.5)	0.629 (89.7)	0.433 (61.8)	0.297 (43.0)
Total thiamin	0.725	0.711	0.701	0.700	0.691

Table 7 Effect of buffer concentration on release of thiamin from eye melanin.

Buffer concentration (M)	1.00	0.50	0.10	0.05	0.01	0.005	0.001
	$\mu\text{mol/g tissue}$						
Released thiamin (%)	0.259 (58.6)	0.101 (24.4)	0.048 (11.5)	0.027 (6.6)	0.019 (4.7)	0.013 (3.2)	0.014 (3.4)
Bound-thiamin (%)	0.182 (41.2)	0.313 (75.6)	0.371 (88.7)	0.379 (93.4)	0.384 (94.6)	0.395 (97.1)	0.395 (96.6)
Total thiamin	0.442	0.414	0.418	0.406	0.403	0.407	0.409

金属イオンの影響

金属イオンの濃度を変え眼メラニンの B_1 遊離現象を検討した。金属塩は硫酸塩、リン酸塩なども比較したがほとんど相違は見られなかったため金属イオンは塩化物を使用した。Fig. 3 に示すようにいずれの金属イオンでも金属イオン濃度を高くすると B_1 遊離は大きくなった。 B_1 遊離の

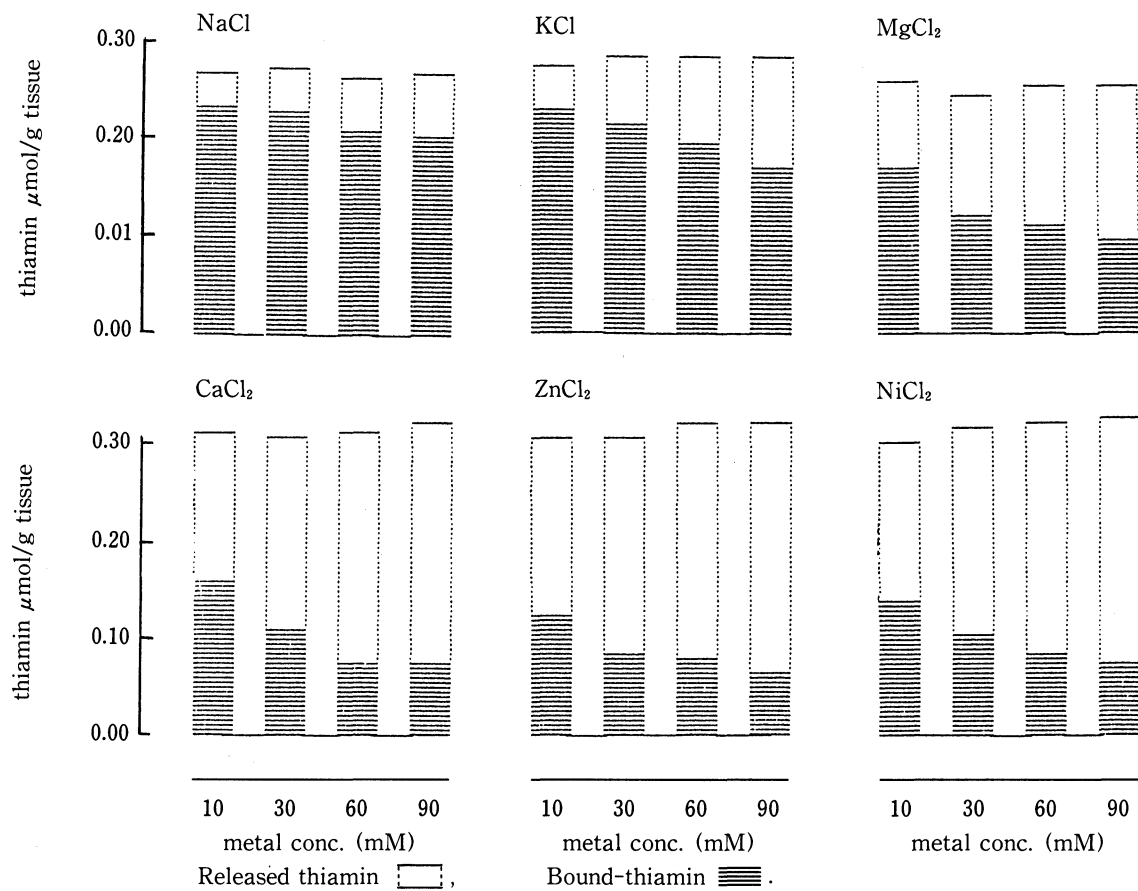
佐藤：ビタミン B₁ とメラニンの結合機構

Fig. 3 Release of thiamin from eye melanin at various metal ions.

大きさは金属イオンの種類によって異なり、2価の金属イオンは1価の金属イオンより B₁ 遊離は大きく、同じ2価の金属イオンの中では Zn⁺², Ni⁺² は大体同じで Ca⁺² より幾分大きく、Mg⁺² は2価の金属イオンの中では B₁ 遊離は小さかった。1価の金属イオンについては Na⁺¹ の方が K⁺¹ より幾分小さいなど同じ電価の金属イオン相互の間で幾分相違が見られた。金属イオンもまたメラニンと親和力が強いことが報告されており^{12,13)}、生体内ではメラニンとの親和力が強い物質とメラニンとの間に複雑な要因が関係していることが予想される。

ビタミン B₁ や B₂, 金属イオン, 薬物などメラニンとの親和力が強い物質が多いことからこれらの物質が相互に拮抗的に作用していることが考えられるのでメラニンと親和力が強いビタミン B₁ についてメラニン結合の機構を検討した。眼メラニンの B₁ は100℃30分の熱処理ではほとんど遊離することなくメラニンに結合して存在し、またトリプシン, プロナーゼなどの蛋白質分解酵素を作用させても対象群と同じような結果を示すなど B₁ とメラニンとの結合に蛋白質の直接の影響はみられなかった。

これに対し pH の影響は顕著であり pH 4.5で B₁ 遊離は最も小さいがこれより酸性側でアルカリ側でも B₁ 遊離は大きく、イオン強度が高いほど B₁ 遊離は大きく、金属イオン添加では2価の金属イオンは1価の金属イオンより B₁ 遊離は大きかった。ペプシン、プロナーゼ、ナガーゼ、サーモライシンなどの蛋白質分解酵素を作用させると B₁ 遊離がかなり高い値を示したのはこれらの酵素標品に酵素安定化のため金属イオンが添加されていたためと思われる。またリングル懸濁で B₁ 遊離がかなり高い値を示したのは pH や金属イオンの影響であると思われる。以上の結果から B₁ とメラニンの結合は静電的のものであることが明らかにされた。同じ2価の金属イオン相互の間で B₁ 遊離に幾分相違が見られたことから B₁ とメラニンの結合には静電結合以外の結合も幾分関係していることが考えられた。生体内ではコイに B₁ を過剰投与すると眼に B₁ が高濃度に蓄積することがチオクローム法による B₁ 定量から明らかであり¹⁴⁾、³⁵S-B₁ およびその誘導体をサルに投与したオートラジオグラフィは眼に B₁ が蓄積することを示している¹⁵⁾。一方ビタミン B₂ やストレプトマイシン、カナマイシン、クロロキンなどの薬物も眼メラニンに蓄積し、金属イオンもメラニンとの親和力が強いことが報告されていること^{12,13)}などから生体内でのビタミン B₁ とメラニンの結合にはかなり複雑な要因が関係していることが考えられる。

参 考 文 献

- 1) Sato, M.; Bull Facul Education, **36**, 79-86, (1984).
- 2) Matdui, K., and Yanagiya, K.; J. Nutr. Sci. Vitaminol., **19**, 193-204, (1973).
- 3) Lindquist, N. G.; Acta Radiol., Suppl., **325**, 5-92, (1973).
- 4) Ings, R. M. J.; Drug Metab Rev., **15**, 1183-1212, (1984).
- 5) Larsson, B., Tjalve, H.; Biochem. Pharmac., **28**, 1181-1187, (1979).
- 6) Brittebo, E., Tjalve, H.; J. Cancer Res. Clin. Oncol., **98**, 233-424, (1980).
- 7) Tjalve, H., Nilsson, M., Larsson, B.; Acta. Physiol. Scand., **112**, 209-214, (1981).
- 8) Fujiwara, M., Matsui, K.; Anal. Chem., **25**, 810-815, (1953).
- 9) Nishino, A., Nishino, H., Iwashima, A.; J. Nutr. Sci. Vitaminol., **26**, 217-220, (1980).
- 10) Nishimura, H., Uehara, Y., Sempuku, K., Iwashima, A.; J. Nutr. Sci. Vitaminol., **30**, 1-10, (1984).
- 11) Nishino, K., Itokawa, Y., Nishino, N., Piros, K., Cooper, J. R.; J. Biol. Chem., **258**, 11871-11878, (1983).
- 12) Drager, U., Proc. Natl. Acad. Sci., **82**, 6716-6720, (1985).
- 13) Potts, A. M., Au, P. C., Exp. Eye Res., **22**, 487-491, (1976).
- 14) Sato, M.; Bull Facul Education (in Japan), **34**, 47-57, (1983).
- 15) Takahashi, T., Kimura, T., Sato, Y.; Vitamins., **39**, 236-243, (1969).