

# ダイズ種子登熟期におけるフェリチン遺伝子の発現挙動と鉄含有量の関係

増田太郎<sup>\*1</sup>・後藤文之<sup>2</sup>・吉原利一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野 <sup>2</sup>財団法人電力中央研究所環境科学研究所

## Relationship between the Expression of the Ferritin Gene and Iron Contents During Seed Maturation

Taro MASUDA<sup>\*1</sup>, Fumiyuki GOTO<sup>2</sup> and Toshihiro YOSHIHARA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Food Quality Design and Development, Division of Agronomy and Horticultural Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 611-0011

<sup>2</sup>Biotechnology Sector, Environmental Science Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry, Chiba 270-1194

### ABSTRACT

Soybean seed contains a large amount of iron. It is suggested that the iron storage protein ferritin contributes to the net iron content in the seed of soybean. We identified four cDNAs encoding ferritin subunits of soybean (*Glycine max* Merrill cv. Kita-no-shiki). The gene expression analysis demonstrated that two of them (sfer1 and sfer2) were transcribed actively in the seed, especially at an initial stage of seed maturation, while the expression of sfer3 gene was not detected. In accordance with the gene expression analysis, accumulation of the ferritin protein was observed mainly at the initial stage of seed formation. The purified ferritin protein from the dry seed was composed of two types of subunits, SFER1 and SFER2, which contained approximately 2,500 Fe atoms per ferritin oligomer. The elementary analysis using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry demonstrated that the iron content was also increased at an initial stage of seed maturation. These results suggested that ferritin was synthesized and iron was synchronously accumulated in ferritin at an early stage of the seed maturation. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 140-144, 2012.

Key words : ferritin, iron content, seed maturation, subunit, elementary analysis

---

\*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

鉄は全ての生物種にとって必須な遷移金属元素であり、ヒトにおいては成人一日当たり10 mg (男性)、12 mg (女性)の摂取が推奨されている(日本人の栄養所要量, 第6次改定)。鉄の摂取不足が引き起こす疾病として、鉄欠乏性貧血が挙げられる。鉄欠乏性貧血の罹患者数は、食糧事情の比較的安定した本邦においても、女性を中心に多く存在しており<sup>1)</sup>、日常の食餌由来の効率的な鉄の摂取が求められている。一般的に、動物由来の食品は、人体における消化吸収性に優れたヘム鉄を多く含むことから、良好な鉄供給源とされている。他方、植物由来の食品に含まれる鉄分は非ヘム鉄が大半であり、フィチン酸、シュウ酸など鉄キレート物質との共存から、人体における利用率が低いと考えられている。ダイズは、脂質、たん白質など基本栄養素を豊富に含むことから、本邦において貴重な食材となっているが、鉄含有量についても他の植物由来の食品と比較して上位に位置する(食品成分データベース)。ダイズ種子における鉄分について、鉄貯蔵たん白質であるフェリチンの寄与が示唆されている<sup>2)</sup>。フェリチンは相同な24個のサブユニットからなる球状の多量体たん白質であり、細胞内における鉄の貯蔵と無毒化に寄与する<sup>3)</sup>。高等植物、哺乳類、微生物など、ほぼ全ての生物種においてフェリチンの存在が確認されているが、その鉄貯蔵に対する寄与は生物種により大きく異なる。我々は、先行研究において、ダイズ種子に含まれるフェリチンが機能的に異なる二種類のサブユニットからなるヘテロ24量体を形成すること<sup>4)</sup>、また、ダイズフェリチンが他にはない特有の構造的特徴を有していることを明らかにしてきた<sup>5)</sup>。本研究では、複数存在すると考えられるダイズフェリチン遺伝子を単離し、種子形成期、登熟期における各遺伝子の発現と成熟フェリチンたん白質の蓄積を時系列的に解析し、種子における鉄含有量の推移との関連について検討した。

## 方 法

### ダイズフェリチンの精製

ダイズ乾燥種子(供試品種:北の四季)100 gを電動ミルで破碎後、500 mLの抽出緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.5)に懸濁した。遠心分離後の上清を30%飽和硫酸アンモニウムにより塩析し、ブチル

トヨパール(東ソー)による疎水性クロマトグラフィー、Q-sepharose(GEヘルスケア)およびコスモゲルtype-Q(ナカライ)による陰イオン交換クロマトグラフィー、Superdex 200pg(GEヘルスケア)によるゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製フェリチンたん白質に含まれる鉄は、10 mMアスコルビン酸による還元後、二価鉄とBathophenanthrolinedisulphonic acidとの錯体形成により生じる吸光度(550 nm)により測定した<sup>6)</sup>。ダイズ乾燥種子由来フェリチンのたん白質濃度は、組換え型ダイズフェリチンを標準たん白質とし、Protein Assay (Bio-Rad)により測定した。

### ダイズフェリチン遺伝子の発現解析とたん白質の検出

ダイズ実生より単離した4種のダイズフェリチン遺伝子の発現解析は、ジゴギシゲニン標識プローブを用いたノザンプロットにより行った。プローブの合成に用いたプライマーは、以下の通りである。

|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| sfer1 | 5'-atggctcttgctccatccaag-3'   |
|       | 5'-agaggcaccgttgaggcacaaa-3'  |
| sfer2 | 5'-caaatggccctttctgtctcaa-3'  |
|       | 5'-aatatgacccagcgagtgggtg-3'  |
| sfer3 | 5'-catgcttctcagaacagcttca-3'  |
|       | 5'-ttcaaaaacgacgcgggttaagg-3' |
| sfer4 | 5'-atgcttctccgaaccgtgtgt-3'   |
|       | 5'-tggttcgtggtatccttctgct-3'  |

登熟期種子からのmRNA抽出は、Sepasol試薬(ナカライ)を用いた。

種子、子葉におけるフェリチンたん白質の検出は、組換え型ダイズフェリチンSFER1サブユニットに対する抗血清<sup>4)</sup>を用いたウェスタンプロットにより行った。たん白質抽出は、前述の精製時と同様の抽出緩衝液を用い、ケミルミワン(ナカライ)による化学発光をイメージアナライザLAS4000(GEヘルスケア)により検出した。

### 種子鉄含有量の測定

京都府宇治市の京都大学大学院農学研究科園場にて栽培したキタノシキ登熟期種子を供試した。登熟期種子を採取、径ごとに分類したのち秤量し、2 mL濃硝酸と0.5 mL過酸化水素存在下で、200℃終夜の湿式灰化を行った。乾固した試料を1 N塩酸または硝酸に溶解し、誘導結合プラズマ発光分光装置(ICP-AES)により測定した。

## 結果と考察

### ダイズ種子フェリチンの精製と鉄含有量

硫酸アンモニウムによる塩析、疎水性および二段階の陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーにより、ダイズ乾燥種子からフェリチンをほぼ単一に精製した。精製フェリチンは褐色を呈しており (Fig. 1a), Fig.1bに示すように、SDS-PAGE上で三種類バンド (250 kDa超, 26 kDa, 25 kDa) から構成されていた。ペプチドシーケンスの結果、26 kDaと25 kDaのバンドのN-末端配列は、各々ASNAPAおよびASTVPLとなっており、ダイズフェリチンSFER2およびSFER1サブユニットのアミノ酸配列に一致していた。また、250 kDaを超える分子量を示すバンドは、鉄結合たん白質を染色する手法であるPrussian Blue染色により明瞭なバンドとして検出されたことから (Fig. 1c), SDS-PAGE試料処理後も多量体構造が維持されたフェリチン分子由来のバンドであると考えられる。

ここで得られた精製フェリチンの鉄含有量を可能な限り正確に算出するため、単一に精製した組換え型ダイズフェリチン (SFER1サブユニット) を濃度調整後標準たん白質として、比色法により精製フェリチンの濃度を決定し、この精製試料に含まれる鉄を定量した。その結果、精製フェリチンたん白質濃度は、0.238 mg/mL, そこに含まれる鉄濃度は、 $58.8 \pm 3.38$  ppmとなった。両者をモル濃度に換算し、ダイズ種子フェリチンの鉄含有量を求めると、フェリチン24量体 ( $M_r=563,000$ ) あたり、 $2,490 \pm 143$ 個の鉄原子を含むことが明らかとなった (Table 1)。脊椎動物由来のフェリチンの場合、24量体当たり最大数千の鉄原子を内包することができるとの報告があることから<sup>3)</sup>、本研究で算出された数値は妥当であると考えられる。

### 種子形成期におけるダイズフェリチン遺伝子の発現とフェリチンたん白質の蓄積

種子形成期における4種類のダイズフェリチン遺伝子の発現をノザンプロット法により解析した。その結果、sfer1遺伝子は、種子形成期全般に強い発現が見られ、sfer2は種子形成期の初期 (種子径5 mmまで) に限定して強く発現していた (Fig. 2)。この、sfer1とsfer2の両者は、ダイズ種子に存在するフェリチンたん白質を構成するサブユニットである (Fig. 1b)。一方、sfer3は種子形成期全体を通じて、遺伝子の発現

が認められなかった。sfer4は、種子より精製されたフェリチンたん白質の構成成分ではなかったが、種子形成期全般を通じて強い発現が認められた (Fig. 2)。sfer4も、他のダイズフェリチンサブユニットと同様、24量体形成能を有するが<sup>5)</sup>、他のサブユニット (sfer1, 2, 3) とヘテロな24量体の形成が困難であることも報告している<sup>7)</sup>。従って、ダイズ種子においてフェリチン sfer4サブユニットは、1. 本研究において分離精製した SFER1/SFER2 から成る24量体とは別の多量体 (sfer4 ホモ多量体) として存在している、或いは、2. 転写後、翻訳段階での調節を受けており、成熟サブユニットとしては種子中に存在しない、といった二通りの可能性が考えられる。

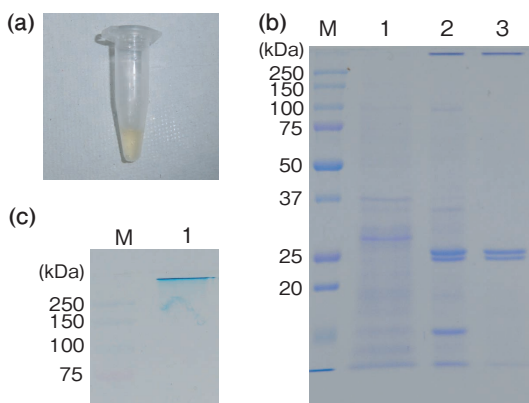


Fig. 1. Purification of ferritin from soybean dry seed. (a) An aliquot of purified ferritin. (b) Reduced SDS-PAGE analysis of purification of soybean ferritin. Lane 1; after hydrophobic chromatography, lane 2; after the second anion exchange chromatography, and lane 3; the finally purified soybean seed ferritin. (c) Non-reduced SDS-PAGE analysis of purified soybean ferritin (lane 1). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue (b), or Prussian Blue stain.

Table 1. Concentrations of purified soybean seed ferritin and iron in the solution

|                                        | Concentration       |                          |
|----------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Purified ferritin                      | 0.238 mg/mL         | 0.423 $\mu$ M            |
| Iron                                   | $58.8 \pm 3.38$ ppm | $1,050 \pm 60.5$ $\mu$ M |
| No. of iron atom per ferritin oligomer | $2,490 \pm 143$     |                          |

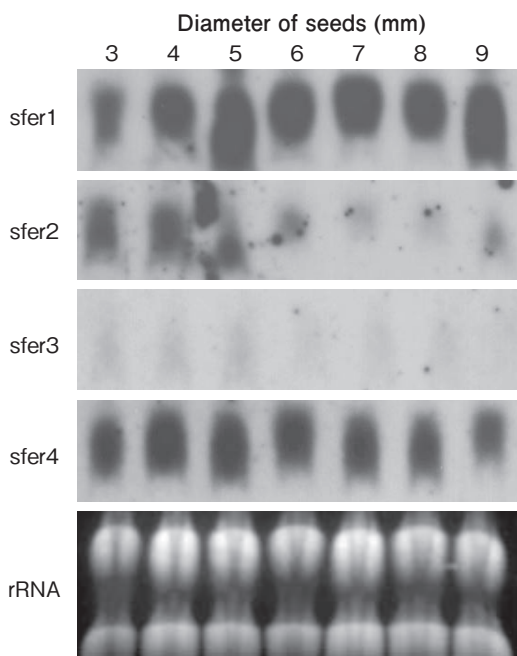


Fig. 2. Ferritin gene expression during the seed development. RNA was extracted from various-sized immature soybean seeds and 15  $\mu$ g RNA of each sample was analyzed by Northern blot hybridization. The specific probe used each experiments is indicated on the left side of the panel. The ethidium bromide-stained rRNA bands are shown as a loading control.

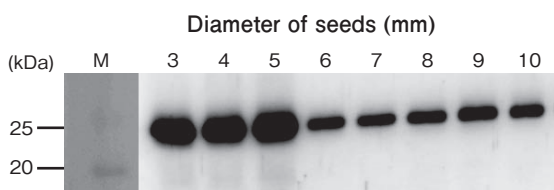


Fig. 3. Accumulation of ferritin protein during seed development. Soluble protein was extracted from the indicated sized seeds, and 30  $\mu$ g of protein was loaded on 12.5% polyacrilamide gel. Ferritin protein was detected by Western blot using antiserum raised against recombinant soybean ferritin SFER1.

組換え型ダイズフェリチンSFER1サブユニットに対する抗血清を用いたウェスタンブロット解析から、フェリチンたん白質は、種子形成初期段階で既に多量に蓄積していることが示され、その後、種子中の全たん白質におけるフェリチンの割合は漸減するものの、極端な分解は確認されなかった (Fig. 3). なお、本研究に用いた抗体は、SFER1サブユニットを最も強く反応し、他のサブユニットの認識も可能である。

#### 登熟段階種子の鉄含有量

未熟種子をその外径ごとに仕分け、有機成分を分解したのち、ICP発光分光装置により鉄濃度を測定し、生鮮重量1 gに含まれる鉄含有量を求めた (Fig. 4). その結果、単位生鮮重量あたりの鉄含有量は、種子形成初期初期には既に高くなっており、その後、更なる増加は認められなかった。以上の結果から、フェリチン遺伝子の発現、たん白質の蓄積、種子における鉄の蓄積は、全て主に種子形成期の初期段階に同期して起こることが明らかとなり、豊富な鉄含有量を持つダイズ種子において、フェリチンが鉄の蓄積に関して重要な寄与をしていることが示唆された。今後は、種子形成のより初期段階でのフェリチン遺伝子、たん白質の挙動と鉄含有量の相関について、詳細な解析が求められる。

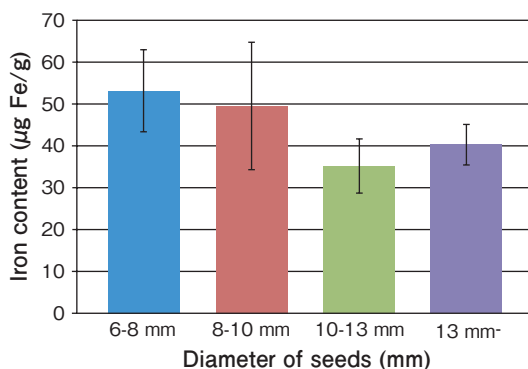


Fig. 4. Iron contents of immature soybean seed. Immature soybean seed were classified by their diameter. Each class of seeds was wet-ashed and its iron content was measured by ICP-AES. Three independent experiments were performed for determination of iron concentration of each group. Values are mean  $\pm$  SD.

## 要 約

本研究では、豊富な鉄分を含むダイズ種子の形成期における、鉄貯蔵たん白質フェリチンの遺伝子発現、たん白質の蓄積、種子における鉄含有量の変化に着目した。完熟ダイズ種子において、フェリチンはSFER1およびSFER2サブユニットから成るヘテロ24量体として存在し、一つの24量体に約2,500の鉄原子が含まれていた。フェリチン遺伝子の発現、たん白質の蓄積、種子における鉄含有量の増加は、主として種子形成期の初期段階で起こることが明らかとなり、ダイズ種子における豊富な鉄分に対し、鉄貯蔵たん白質フェリチンが大きく寄与している可能性が示された。現在、ダイズ種子における全鉄分に対するフェリチン内包鉄の寄与率の正確な算出を試みている。また、フェリチン鉄は消化吸収性に優れているとの報告がなされていることから、本邦における伝統的ダイズ食品に含まれるフェリチン鉄にも注目し、検討を行う。

## 文 献

- 1) 内田立身 (2010): 鉄欠乏 日本の現状と病態. 日本内科学会誌, **99**, 24-30.
- 2) Hoppler M, Zeder C and Walczyk T (2009): Quantification of ferritin-bound iron in plant samples by isotope tagging and species-specific isotope dilution mass spectrometry. *Anal Chem*, **81**, 7368-7372.
- 3) Harrison PM and Arosio P (1996): The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 161-203.
- 4) Masuda T, Goto F and Yoshihara T (2001): A novel ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release. *J Biol Chem*, **276**, 19575-19579.
- 5) Masuda T, Goto F, Yoshihara T and Mikami B (2010): Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin. *J Biol Chem*, **285**, 4049-4059.
- 6) Rad AM, Janic B, Iskander ASM, Soltanian-Zadeh H. and Arbab AS (2007): Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *Bio Techniques*, **43**, 627-636.
- 7) Masuda T, Goto F, Yoshihara T, Ezure T, Suzuki T, Kobayashi S, Shikata M and Utsumi S (2007): Construction of homo- and heteropolymers of plant ferritin subunits using an *in vitro* protein expression system. *Protein Expr Purify*, **56**, 237-246.