

ダイズ加工食品における鉄成分
—その形態と食品加工への影響に関する研究—

増田太郎*

京都大学大学院農学研究科農学専攻品質科学講座

**Iron in the Soy-Derived Foods
-Study on the Transition of Iron and Ferritin During the
Food Processing of Soybean Seed-**

Taro MASUDA*

Laboratory of Food Quality Design and Development, Division of Agronomy and Horticultural Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011

ABSTRACT

Iron is an essential transition metal for virtually all the living kingdoms. Soybean seed, which is one of the most major staple crops, contains a large amount of iron. Thus, it is expected as a candidate for sustainable food-derived iron source. It is suggested that the iron storage protein ferritin largely contributes to the net iron content in the seed of soybean. Previously, the author showed that ferritin is composed of two types of subunits, SFER1 and SFER2, in soybean dry seeds. In the present study, the author investigated the contribution of ferritin to the iron content of soy-derived processed foods, such as tofu. Ferritin was detected in many kinds of soy-derived foods except the fermented soy foods. Furthermore, ferritin purified from the tofu extract was folded properly and formed oligomer, similar to the structure of native soybean ferritin, indicating that soybean ferritin was stable during the heat treatment of food processing. Judging from the ferritin and iron recovery in the purification process, most of the soluble iron was contained in ferritin oligomer. However, the iron contents of ferritin from tofu was approximately 1150 Fe atoms per molecule, while native ferritin oligomer, which was purified from dry seeds, contained 2590 atoms. These results suggested that ferritin oligomer was maintained stably and still contained large portion of iron in tofu, although partial denaturation induced iron release from ferritin shell during heat treatment. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 58-63, 2015.

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

Key words : ferritin, iron content, tofu, subunit, elementary analysis

鉄は全ての生物種にとって必須な遷移金属元素である。鉄欠乏は最も対策が遅れている栄養素欠乏で、全世界で約30億人が貧血をはじめとした鉄欠乏の状態にある¹⁾。鉄欠乏を主因とする貧血の罹患者数は、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²⁾、日常の食事由来の効率的な鉄の摂取が求められている。一般に、食品由来の鉄成分は、ヘム鉄と非ヘム鉄に大別される。ヘム鉄は、動物由来の食品に多く含まれ消化吸収性に優れた良好な鉄給源とされている。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、人体における利用率が低いと考えられている。しかし、一群の非ヘム鉄の中で、鉄貯蔵たん白質フェリチンに内包される鉄（以下、フェリチン鉄）が、第三の鉄栄養形態として注目されている³⁾。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⁴⁾。近年、フェリチン鉄が、腸管においてヘム鉄、無機鉄とは別経路で高効率に吸収されることが報告された⁵⁾。

ダイズ種子は、本邦において貴重な食材であり、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 (<http://fooddb.mext.go.jp/>)）。ダイズ種子における鉄分の多くはフェリチン鉄であるが⁶⁾、ダイズ種子を加工する際のフェリチンの動態と構造変化、鉄含有量の推移についてはほとんど知られていない。本研究では、食品加工時の加熱などがフェリチンたん白質の構造に与える影響と鉄含有量の関係に着目し、検討を行った。

方 法

1. ダイズ試料と豆腐の作製

ダイズ加工食品は、京都府宇治市内の商店で購入した。豆腐の作製には、2013年に収穫された品種トヨマサリ乾燥種子を用いた。250 gのダイズ乾燥種子を、1 Lの蒸留水に約20時間室温で浸漬し、吸水した種子を水とともに電動ミキサーで破碎した。そこに2 Lの蒸留水を加え、10分間沸騰させたものを絞り、豆乳を得た。豆乳を80℃に再加熱後、硫酸カルシウム（5 g/L）を添加し、室温にて静置した。ゲル化した部分を型枠に収め豆腐とし、清澄な上澄み液と豆腐成形過程に浸み出した水分を豆腐浸み出し液とした。

2. ダイズフェリチンの精製と検出

ダイズ乾燥種子からのフェリチンの精製は、既報の手法に従った⁷⁾。豆腐（平均重量367 g、水分含量86.5%）に、抽出用緩衝液（20 mM TrisHCl pH 7.8）を加え、電動ミキサーで豆腐ゲルを懸濁後、10,000 g、15分の遠心分離により得られた上清を豆腐抽出液とした。豆腐抽出液と染み出し液中のフェリチンは、塩析、Super Q Toyopearl（東ソー）による陰イオン交換、Superdex 200pg（GE Healthcare）によるサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により単一に精製した。精製過程におけるたん白質の定量はウシ血清アルブミン（BSA）を標準試料としたProtein Assay（Bio-Rad）により行った。ダイズ乾燥種子、および豆腐作製過程におけるフェリチンの検出は、組換え型ダイズフェリチン抗体⁷⁾を用いたイムノブロットにより行った。また、各精製段階におけるフェリチンの回収率は、各試料を適宜希釈した上、上記の抗体を用いたドットブロットにより算出した。

3. 鉄含有量測定

ダイズ乾燥種子および種々のダイズ食品の鉄含有量は、乾燥試料を濃硝酸と過酸化水素により湿式灰化した後、適宜希釈し、原子吸光分光光度計（AAS-6800、島津製作所）を用いて測定した。精製過程のフェリチンなどの可溶性試料は、適宜希釈の上、同様に原子吸光法により鉄濃度を決定した。

4. 円二色性（CD）スペクトル

精製フェリチンのCDスペクトルは、温度管理ユニットを装備したJ-720分光偏光計（日本分光）にて測定した。二次構造の推定には波長190-250 nmにおけるCDスペクトル、熱安定性評価には25-90℃での波長222 nmにおけるモル楕円率の変化を測定した。

結果と考察

1. ダイズ加工食品の鉄含有量とフェリチンの分布

本研究で試料とした市販ダイズ食品の鉄含有量を、Fig. 1 (a) に示した。味噌を除くダイズ加工食品の鉄含有量は、乾燥重量100 gあたり6-10 mgであり、他の植物由来の食品と比較して高い値となっている。次に、ダイズ加工食品中のたん白質成分と鉄貯蔵たん白質フェリチンの分布を、SDS-PAGE後のCBB染色、およびイムノブロットにより解析した。イムノブロット

の結果、フェリチンは、豆乳、おから、豆腐、薄揚げにおいて検出され、納豆、味噌などの発酵食品では未検出であった (Fig. 1c)。CBB染色の結果から (Fig. 1b)、発酵過程においてフェリチンも他のたん白質と同様に分解を受けたと考えられる。一方、豆腐、薄揚げなど加熱を伴うダイズ加工食品にはフェリチンが存在し、鉄成分の保持に寄与している可能性が示された。

2. 食品中のフェリチンとその構造

ダイズ加工食品のモデルとして豆腐を選択し、鉄成分とフェリチンの挙動を追跡した。豆腐抽出液、および豆腐染出し液から単一に精製したフェリチンは、乾燥種子由来の物と同様、二種類の構成サブユニットから成っていた (Fig. 2a)。精製の最終段階として行ったSECのチャート (Fig. 2b) より、豆腐抽出液および

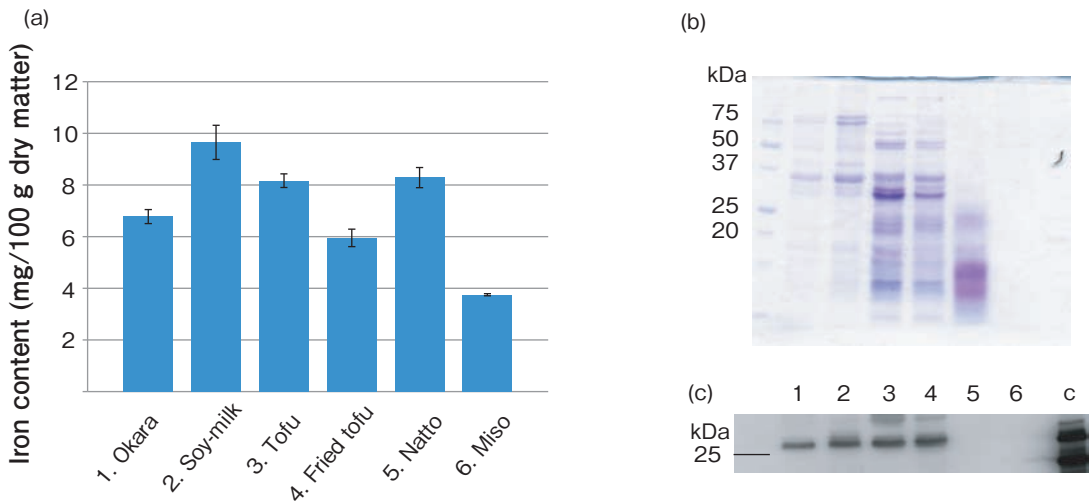


Fig. 1. Iron contents and ferritin distribution in various soy-derived foods.

(a) Iron contents of soy-derived foods. Error bars indicate S.E. of three independent analyses. (b) Reduced SDS-PAGE analysis of soy-derived food extracts. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1; Okara, lane 2; Soy-milk, lane 3; Tofu, lane 4; Fried tofu, lane 5; Natto, and lane 6; Miso. (c) Immuno blot analysis of soy-derived food extracts. Lane numbers indicate the same samples as the panel (b). Lane C indicates the control load of purified soybean ferritin.

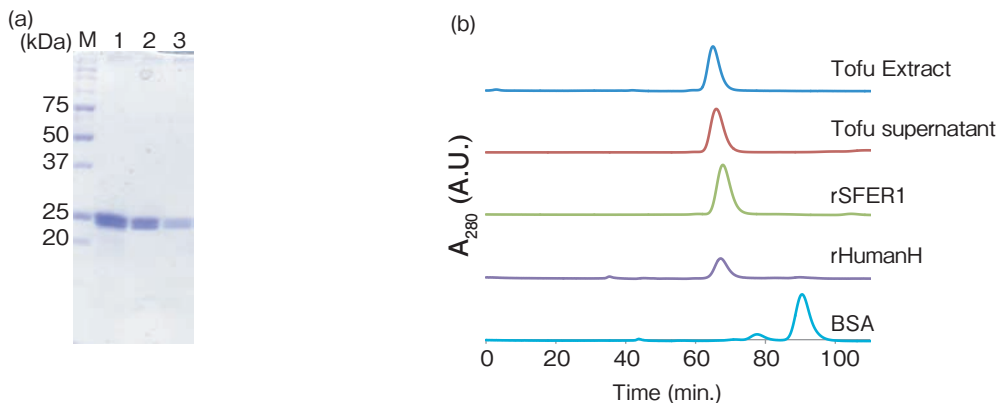


Fig. 2. Purification of ferritin from tofu.

(a) Purified ferritin from dry soybean seeds (lane 1), tofu extract (lane 2), and tofu supernatant (lane 3). (b) The elution chart of the size exclusion chromatography. From upper one, the chart indicates tofu ferritin from extract, from supernatant, recombinant soybean ferritin, recombinant human H chain ferritin, and bovine serum albumin.

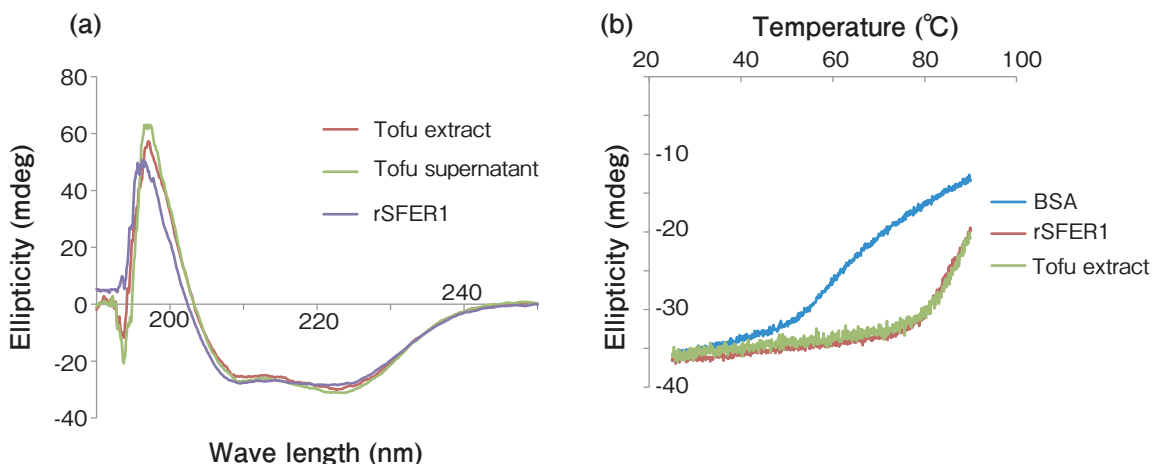


Fig. 3. CD spectra of purified ferritin from tofu. (a) CD spectra of tofu ferritin purified from extract and supernatant, and recombinant soybean ferritin. Molar ellipticity in far UV region was recorded by scanning the wave-length from 250 to 190 nm. (b) The molar ellipticity at a wavelength of 222 nm was taken in the range of 20–90 °C (DT = 0.5 °C) with an acquisition time of 0.2 s after an equilibration time of 30 s at each temperature step.

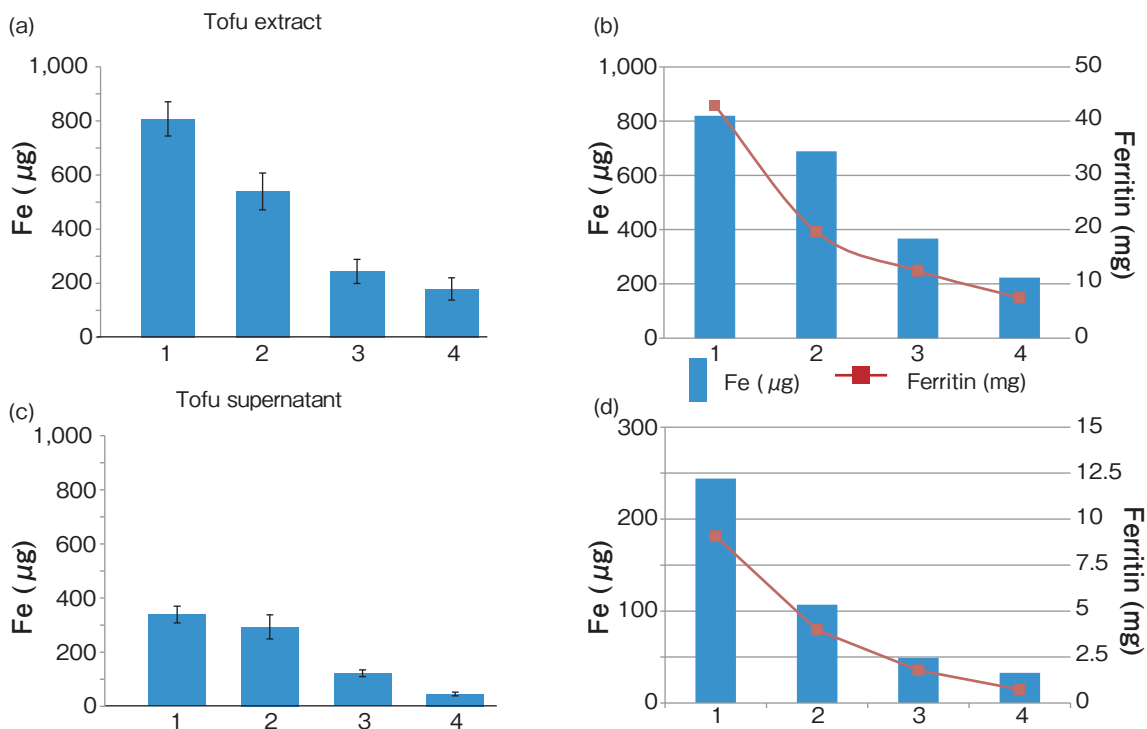


Fig. 4. Iron and ferritin recovery during the purification steps. (a) and (c) indicate the average iron recovery during the ferritin purification step from tofu extract and supernatant, respectively. Error bars indicate S.E. of three to five independent analyses. (b) and (d) indicate the iron and ferritin recovery, which was determined by dot blot analyses. In these figures, number 1, 2, 3, and 4 mean the following purification steps. 1; Crude sample, 2; after salting out and dialysis, 3; after anion exchange chromatography, 4; after size exclusion chromatography (the final purification step).

Table 1. Iron contents of purified ferritin oligomer

Molecular type (Ferritin from)	No. of iron atom per ferritin oligomer
Dry seed	2,590 ± 143*
Tofu extract	1,148 ± 130
Tofu supernatant	1,000 ± 62.6

Iron contents of purified ferritin oligomer.

The iron contents of purified ferritin from dry seed, tofu extract, and tofu supernatant were calculated from the protein and iron concentration of each sample. Values indicate means ± SE, and asterisk shows significant difference at $p < 0.05$.

豆腐染出し液より精製されたフェリチンは、未変性ダイズフェリチン⁸⁾、およびヒトH鎖フェリチンと同様の24量体構造を形成していることが示された。

豆腐抽出液および染出し液より精製したフェリチンのCDスペクトルは、組換え型のダイズフェリチン、ヒトH鎖フェリチンと同様、196 nm付近に正のピークと、207と222 nm付近に二つの負の極大を持つ α -ヘリックス構造特有のスペクトルを示した (Fig. 3a)。従って、煮沸による加熱過程を経た豆腐においても、フェリチンは、その立体構造を保持していると考えられた。

3. フェリチンと鉄の回収率

豆腐抽出液と豆腐作製過程の染出し液に含まれる鉄量は、各々平均807 μg 、339 μg となった。Fig. 4は豆腐抽出液および染出し液からのフェリチン精製過程における、フェリチンと鉄の回収率を示す。豆腐抽出液に含まれる鉄のうち179 μg (回収率24.5%)、染出し液の鉄は45.5 μg (同13.4%)が純粋なフェリチンと共に回収された (Fig. 4a, c)。また、ドットプロットでの定量では、精製フェリチンたん白質の回収率はそれぞれ17.3%、8.05%となった (Fig. 4b, d)。

24量体の平均分子量を554,000として計算した精製フェリチンの鉄含有量は、乾燥種子、豆腐抽出液、染出し液由来について、各々平均2,590、1,148、1,000 atom/24 merとなった。Table 1に示したように、乾燥種子由来の精製フェリチンの鉄含有量は、豆腐フェリチンより有意に高い値となったが、豆腐抽出液由来と染出し液由来のフェリチン間では多量体あたりの鉄含有量に有意な差は認められなかった。

4. フェリチンの熱変性

豆腐抽出液から精製したフェリチンの25℃から90℃までの温度上昇に伴う波長222 nmにおけるモル楕円率の変化をFig. 3bに示した。対照として測定したウシ血清アルブミンの変性温度は、プロットの変曲点を求めることで66.5 ± 0.159と算出した。一方、組換え型ダイズフェリチンおよび精製豆腐フェリチンでは、90℃までの温度変化で α -ヘリックスの減少は見られるものの、完全な変性には至らないことが示唆された。

ダイズフェリチンが90℃においても完全変性しないという本研究の結果は、筆者らによる示差走査熱量計を用いた植物型フェリチンの熱安定性に関する研究結果と一致する⁹⁾。しかし、精製豆腐フェリチンの多量体あたりの鉄含有量が、加熱処理を受けていない天然型フェリチンと比して有意に減少していることから、加熱過程において部分的な構造変化と内部に蓄えられた鉄の放出が起こっていると考えられる。Fig. 3bに示す、加温に伴うCDスペクトルの変化も、部分的な構造変化の可能性を支持している。

近年、フェリチンが腸管において、ヘム鉄とも無機鉄とも異なる独自の受容体を介した経路より取り込まれることが報告された⁵⁾。また、フェリチン鉄はたん白質の外殻に覆われていることから、フィチン酸、ポリフェノールなど鉄吸収に負の影響を与える物質からも隔離されることが期待できる。こうした背景から、食品の製造、調理過程、更には、人体における消化条件でのフェリチンの安定性と鉄含有量の推移に関する研究が不可欠である。また、様々な食品におけるフェリチン鉄の分布とバイオアベイラビリティに関する更なる研究が期待される。

要 約

本研究では、ダイズ種子とその加工食品の鉄成分に着目し、豆腐をモデルとして食品加工過程における鉄貯蔵たん白質フェリチンの構造変化と鉄含有量の推移を追跡した。豆腐におけるフェリチンは、未変性のダイズ種子フェリチンと同様、二種類の異なる構成サブユニットから成る多量体を形成しており、両者の間に二次構造と高次構造に明確な差は認められなかった。フェリチン24量体を一分子とした場合の鉄含有量は、乾燥種子フェリチンが2,590、豆腐フェリチンが1,148 atom/moleculeとなり、豆腐の加工過程で鉄含有量の減少が認められた。25から90℃までの温度変化に伴うCDスペクトルの推移より、80℃前後からダイズフェリチンの立体構造に部分的な二次構造の揺らぎが生じ、この部分的な変性から内部に蓄えられた鉄の一部が放出される可能性が示された。本研究により、加熱を伴う豆腐製造過程においてもフェリチンたん白質が残存し、可溶性の鉄の大半を保持していることが明らかとなった。

文 献

- 1) Zimmermann, MB and Hurrell RF (2007) : Nutritional iron deficiency. *Lancet*, **370**, 511-520.
- 2) 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.
- 3) Theil, EC (2011) : Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. *J Nutr*, **141**, 724S-728S.
- 4) Harrison PM and Arosio P (1996) : The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 161-203.
- 5) Theil EC, Chen H, Miranda C, Janser H, Elsenhans B, Nunez MT, Pizarro F and Schumann K (2012) : Absorption of iron from ferritin is independent of heme iron and ferrous salts in women and rat intestinal segments. *J Nutr*, **142**, 478-483.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Masuda T, Morimoto S, Mikami B and Toyohara H (2012) : The extension peptide of plant ferritin from sea lettuce contributes to shell stability and surface hydrophobicity. *Protein Sci*, **21**, 786-796.