

ダイズ種子における鉄成分とその蓄積過程に関する研究

増田太郎*・藤田浩介

京都大学大学院農学研究科農学専攻品質科学講座

Iron in Soybean Seeds -Studies of the Biosynthesis and Iron Accumulation Process of Soybean Ferritin-

Taro MASUDA* and Kosuke FUJITA

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

ABSTRACT

Iron deficiency is one of the most serious nutritional problems in the world. Because soybean seeds contain a large amount of iron, it is a likely candidate as a sustainable food-derived iron source. It has been suggested that the iron storage protein ferritin may largely contribute to the net iron content in the seed of soybean. Ferritin is a ubiquitous iron storage protein that forms a spherical oligomer composed of 24 subunits. Previously, we have identified four cDNA sequences of soybean ferritin, *sfer1-4*. In this study, we investigated the whole life of each member of soybean ferritin. The ferritin genes, especially *sfer1* and *sfer2*, were actively expressed during seed maturation, whereas the quantities of *sfer3* and *sfer4* mRNA were one-tenth less than those of the *sfer1* and *sfer2*. However, all four members were detected as components of soybean ferritin oligomers, although the main components of ferritin were SFER1 and SFER2. The expressions of *sfer1*, 2 and 3 were induced by the iron overload, while *sfer4* showed constitutive expression. The contribution of ferritin iron to a soluble form of iron was 38.7% and 16.4% in seeds and leaves, respectively. Thus, our results quantitatively showed the large contribution of ferritin to the iron content in soybean seeds rather than leaves. In processed foods made from soybean seeds, the oligomeric state of ferritin was variable. However, they also maintained iron, even after severely adverse conditions during food processing. *Soy Protein Research, Japan* **21**, 37-43, 2018.

*〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄

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

鉄は全ての生物種にとって生育に必須な遷移金属元素である。鉄欠乏は世界で最も深刻な栄養素欠乏で、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⁾。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鉄欠乏は深刻な問題であり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。ダイズ種子は、本邦において伝統的に用いられてきた貴重な食材で、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成分の形態として、鉄貯蔵たん白質フェリチンに内包された鉄(以下フェリチン鉄)が一定の割合を占めると考えられているが、その寄与率については10%程度から90%との報告もあり^{3,4)}、未だ定見は得られていない。従来、食品中の鉄分はヘム鉄と非ヘム鉄に大別されてきた。フェリチン鉄は非ヘム鉄に属するが、安定なたん白質殻に覆われたその形態は他の非ヘム鉄と大きく異なり、優れた消化吸収性を示す可能性が示されている。したがって、近年フェリチン鉄は、食品中の鉄分における第三の鉄栄養形態として注目されている^{5,6)}。

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、細胞内における鉄の貯蔵と無毒化に寄与する⁷⁾。筆者らは、これまでにダイズフェリチンcDNAとして4種類を同定してきたが^{8,9)}、各遺伝子の発現、或いは成熟サブユニットの種子中での存在量と鉄貯蔵への寄与は不明である。本研究では、ダイズフェリチンの遺伝子発現から、鉄貯蔵たん白質としての機能、種子などにおける鉄成分への寄与に着目し、ダイズフェリチンの一生を明らかにすることを目的として検討を行った。

方 法

1. ダイズ種子、成葉とRNA抽出

ダイズ種子(品種 サチユタカ)(*Glycine max* (L.) Merr. cv. Sachiyutaka)は、京都大学大学院農学研究科農学専攻の田中佑博士より供与いただいた。京都大学大学院農学研究科付属京都農場において育成した当該品種の未熟種子を長径別に採取し、RNA抽出に用いた(種子長径 2, 3, 6, 8, 10, 13 mm)。また、ダイズ成葉は、乾燥種子を一晩室温において蒸留水に浸漬後、パーライトに移植し一週間育成した植物体から採取した。鉄過剰、鉄欠乏条件は、パーライト移植後一週間

を経た植物体を、MS液体培地に移植し3日間馴化後、鉄を含まないMS無機塩、鉄濃度を10倍としたMS無機塩、通常のMS無機塩液体培地に移植し48時間後成葉を採取、RNA抽出に供した。

2. 4種のダイズフェリチンcDNAのクローニングとリアルタイムPCRによるフェリチン遺伝子群の発現解析

上記の試料から調製したTotal RNAより合成したcDNAを鋳型とし、定量的リアルタイムPCRによる各フェリチンmRNAの定量を行った。フェリチンmRNA濃度とコピー数は、各ダイズフェリチンcDNA(GeneBank No. *sfer1*: M64337, *sfer2*: AB062754, *sfer3*: AB062755, *sfer4*: AB062756)をクローニングしたプラスミドを用いて検量線を作成し、算定した。本実験において、各フェリチンcDNAの増幅に用いたプライマーセットは、*sfer1*: (5'- ATGGCTCTTGCTCCATCC AAAG-3')および(5'- AGAGGCACCGTTGAGGCAC AAA-3')、*sfer2*: (5'- CAAATGGCCCTTTCTTGCT CCAA -3')および(5'- CATTTGAAGCAGCACACAC C -3')、*sfer3*: (5'- CGTGTGTGTTCTTTGCAACC -3')および(5'- GGTTATTGGAGTTCTTGTTAGCG -3')、*sfer4*: (5'- ATGCTTCTCCGAACCGCTGCT-3')および(5'- TGGTTCGTGGATCCTTTTCGCT-3')、である。リアルタイムPCR反応には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)を用い、反応条件は添付のプロトコールに依った。

3. 特異的抗体を用いたダイズフェリチンの免疫沈降と元素分析

組換たん白質として調製したSFER1とSFER4に対するウサギ抗血清を作製し、実験に用いた。抗SFER1抗血清より抗SFER1 IgGを精製し、ProteinA固定化磁性ビーズ(SureBeads Protein A, BioRad)に吸着させることにより、抗SFER1抗体ビーズを作製した。同時に、免疫前ウサギIgGを吸着させた対照抗体ビーズを作製した。この抗体ビーズを用いて、ダイズ種子抽出液、およびダイズ成葉抽出液よりダイズフェリチンを精製し、液体クロマトグラフ質量分析計によるたん白質同定(京都大学医学研究支援センター質量分析室)と原子吸光分光光度計(AAS-6800, 島津製作所)による元素分析に供した。ダイズ種子抽出液、および成葉抽出液中の可溶性鉄分に対するフェリチン鉄の寄与は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{Ferritin 鉄の寄与率 (\%)} = \frac{\text{Ferritin IP 画分の鉄量 (\mu g)} - \text{control IP 画分の鉄量 (\mu g)}}{\text{抽出液中の鉄量 (\mu g)}} \times 100$$

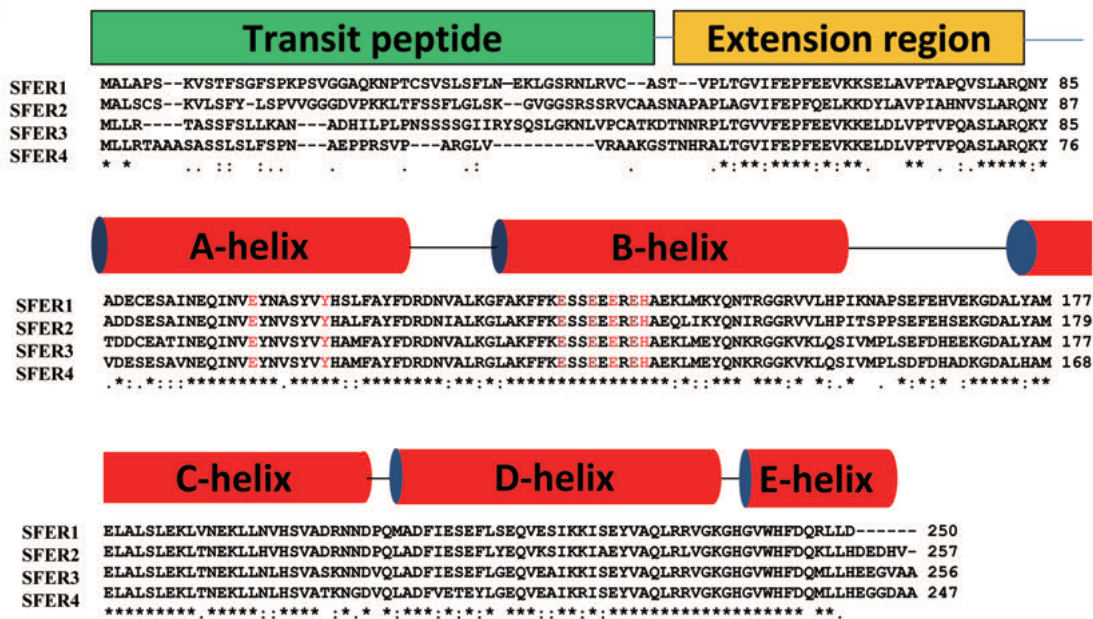
免疫沈降の各段階におけるフェリチンたん白質は、上記の抗SFER1および抗SFER4抗血清を用いたイムノブロットにより検出した。

結果と考察

1. 4種のダイズフェリチンの遺伝子発現とダイズフェリチンのサブユニット構成

本研究で用いた4種のダイズフェリチンサブユニットのアミノ酸配列をFig. 1aに示す。4種とも鉄の酸化の取込みに関するFerroxidase siteを有しており、トランジットペプチドを除いた成熟領域では、アミノ酸配列の同一性は63%となった。各サブユニットについて大腸菌発現系を用いて調製したところ、SFER1が約26.5 kDa、他のサブユニットは全て約28 kDaと

(a)



(b)

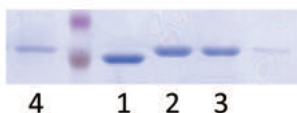


Fig. 1. (a) Primary sequences of soybean ferritin subunits. The amino acid residues forming the ferroxidase site are shown in red, while those of the nucleation site are shown in brown letters. 'Transit peptide' is responsible for the targeting for plastid, whereas 'Extension peptide' is the N-terminal region of the mature subunits. The conserved 4-helix bundle and the fifth short helix are indicated as A-, B-, C-, D- and E-Helix. Amino acid residues that strictly conserved among four members are indicated by *. (b) Reduced SDS-PAGE analysis of recombinant soybean ferritin SFER1, 2, 3 and 4 subunits. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1: rSFER1, lane 2: rSFER2, lane 3: rSFER3, lane 4, rSFER4.

なった (Fig. 1b). 筆者らは, 乾燥種子より精製したダイズフェリチンが主として二種類のサブユニット SFER1とSFER2から成ることを示したが⁸⁾, SFER3とSFER4の存在については明らかになっていない. 植物フェリチン遺伝子発現は, 主として転写レベルで調節されていることが知られている. 定量的リアルタイムPCRによる各遺伝子発現の絶対定量的結果, ダイズ種子登熟期を通じて, *sfer1*と*sfer2*が活発に発現しており, *sfer4*の発現レベルはその10分の1程度, *sfer3*は更に少なく20分の1程度であった (Fig. 2a). しかし, 免

疫沈降により精製したダイズ種子フェリチンの質量分析の結果では, 4種のフェリチンサブユニット全ての配列が検出された. また, 抗SFER1抗体カラムによる免疫沈降後の試料には抗SFER1抗体および抗SFER4抗体に反応するフェリチンが残存していなかったため (Fig. 3), 種子中のフェリチンはSFER1とSFER2を主体として4種のサブユニット全てから成るヘテロ24量体を形成している可能性が高いと考えられる.

ダイズ実生を通常のMS無機塩にて生育した場合, 成葉における各フェリチン遺伝子の発現について,

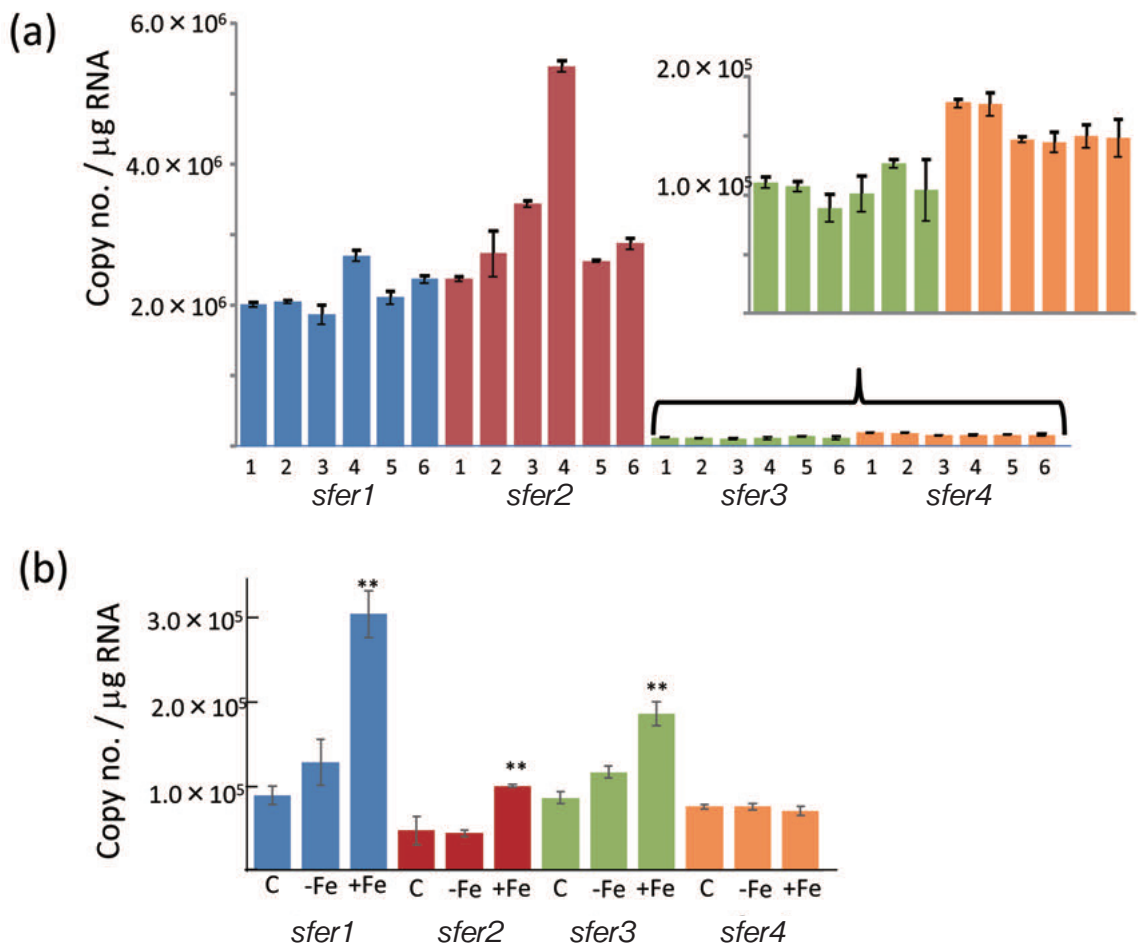


Fig. 2. Quantitative real-time PCR analyses of expression of four soybean ferritin genes. (a) Quantification of mRNA copy numbers of four soybean ferritin members during seed maturation. The gene expressions of four ferritin genes (*sfer1*, 2, 3 and 4) were monitored at six different stages of seed maturation. The diameters of seeds were 1: 2 mm, 2: 3 mm, 3: 6 mm, 4: 8 mm, 5: 10 mm and 6: 13 mm. Data are means \pm SD of three to five experiments. (b) Quantification of mRNA copy numbers of four soybean ferritin members in mature leaves in response to iron overload and iron deficient conditions. Mature leaves were obtained from plantlets grown in normal (ctrl), iron deficiency (-Fe) and iron overload (+Fe) conditions for 48 hours, each of which had normal, none and ten times higher concentration of iron in the media. Asterisk shows significant difference at $p < 0.01$ when compared with the ctrl.

*sfer1, 2*は種子における発現量の5%程度となった (Fig. 2b)。一方、葉での*sfer3, 4*の発現レベルは、種子の場合と比較して大きな変化はなく、葉における成熟フェリチンたん白質に占めるSFER3サブユニットの割合は種子と比較して高くなったと考えられる。過剰の鉄、或いは鉄欠乏時の栄養組織における各フェリチン遺伝子の発現パターンをFig. 2bに示す。鉄過剰条件において、*sfer1, 2, 3*について遺伝子発現の上昇が認められたが、*sfer4*の発現量に大きな変化は認められなかった。以上の結果から、4種のフェリチン遺伝子のうち、*sfer1, 2*が種子フェリチンの主体をなしていること、*sfer1, 2, 3*は、従来から知られるように鉄過剰応答性を示し、*sfer4*は発現レベルが低いものの外的な鉄濃度の上昇に反応せず恒常的な発現を示すフェリチン分子種であることが示唆された。

2. ダイズ種子および成葉の鉄分に対するフェリチンの寄与

フェリチンは人を含むほぼ全ての生物において過剰な鉄の解毒と貯蔵に寄与するが、鉄成分に対するフェリチンの寄与は細胞・組織によって大きく異なる⁷⁾。植物においては、モデル植物として広く用いられるシロイヌナズナ、イネにおけるフェリチンの鉄分に対する寄与は数%未満と報告されている¹⁰⁾。一方、植物のフェリチン研究はダイズなどマメ科植物の種子から始

まったと云っても過言ではなく、ダイズ種子の鉄分に対しフェリチンが一定の寄与をしていることが古くから知られている^{3,4)}。本研究では、抽出可能な可溶性画分の全鉄分に対するフェリチンの寄与を明らかにするため、種子および成葉の抽出液から免疫沈降 (IP) により一段階で全フェリチンを精製し、鉄含有量の測定とフェリチンの寄与率を算出した (Fig. 4)。その結果、種子の可溶性鉄成分におけるフェリチンの寄与率は平均38.7%となり、成葉における平均寄与率16.4%よりも有意に高かった (Fig. 4)。以上の結果から、ダイズ種子においてフェリチンは可溶性鉄成分の主体をなしていることが確認された。筆者らはこれまでに、代表的なダイズ加工食品である豆腐においてもフェリチンがその24量体構造を維持しており、鉄分保持に寄与していることを明らかにした¹¹⁾。また、市販の豆乳飲料ではフェリチン24量体が部分的に崩壊し二量体となっている可能性があるが、二量体状態でも一定の鉄を保持しているとのデータを得ている。近年、フェリチン鉄は一般的なヘム鉄、非ヘム鉄とは別の経路で小腸から高効率に吸収・利用される可能性が示されている¹²⁾。本研究のデータが示すように、ダイズ種子の鉄分の主体がフェリチン鉄であることから、フェリチン鉄の消化吸収性を明らかにすることにより、食事由来の持続可能な鉄給源としてのダイズ種子の価値を確立することが出来ると考えられる。

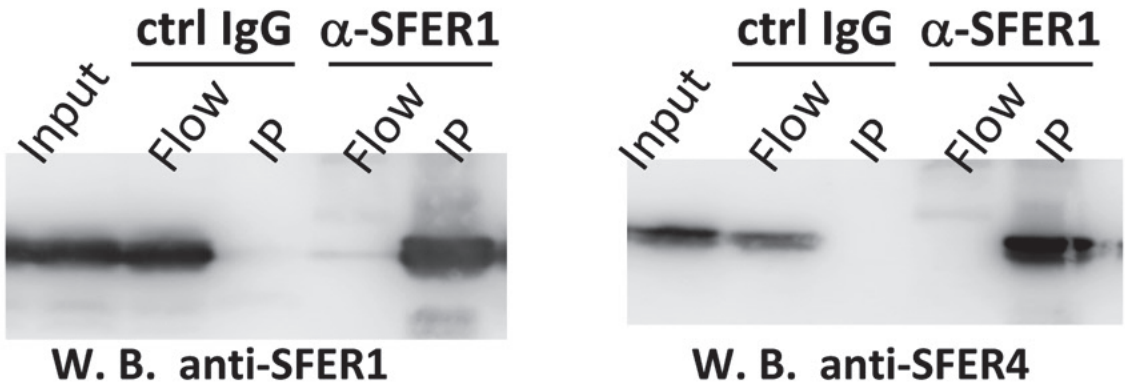


Fig. 3. Immuno blot analysis of anti-SFER1 immunoprecipitants. Immuno-precipitation based on the anti-SFER1 IgG immobilized magnetic beads was performed against the lysate from soybean seed and detected by anti-SFER1 antiserum (Left panel) and anti-SFER4 antiserum.

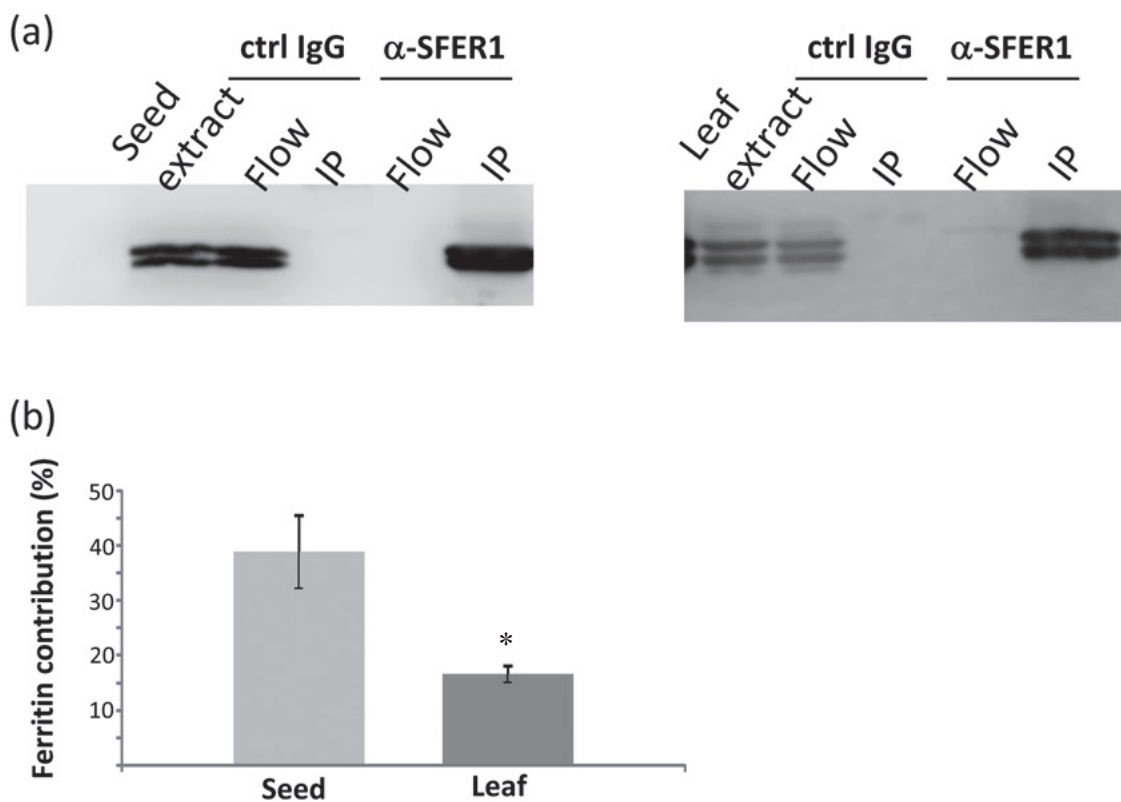


Fig. 4. Immuno-precipitation and iron quantification of ferritin from soybean seeds and leaves. (a) Immuno-precipitation based on the anti-SFER1 IgG immobilized magnetic beads was performed against the lysate from soybean seeds and leaves. Proteins were detected by immune-blotting using anti SFER1 antiserum. (b) Contribution of ferritin iron to the soluble total iron in the extracts from seeds and leaves. The iron concentrations of the extracts and IP fraction of control and anti-SFER1 were measured using atomic absorption spectrophotometer. Data are means \pm SE of five experiments. Asterisk shows significant difference at $p < 0.05$.

要 約

本研究では、ダイズフェリチン遺伝子種の発現と、植物体におけるダイズフェリチンサブユニットの構成、鉄貯蔵への寄与に着目して研究を行った。4種のダイズフェリチン遺伝子のうち、種子登熟期の全期を通じて *sfer1*, 2が 高い発現レベルを示し、*sfer3*, 4の発現量は各々 *sfer1*の5%, 10%程度であった。成葉においては相対的に *sfer3*の発現がやや高くなり、種子で活発な発現が見られた *sfer2*の発現レベルが低下した。過剰の鉄に対する誘導性は、*sfer1*, 2, 3において認められ、*sfer4*は外的な鉄過剰などに反応せず恒常的な発現を示した。ダイズ種子中における成熟フェリチンたん白質は、主として SFER1, 2から構成されるが、3, 4も含むヘテロ多量体として存在しており、可溶性鉄成分に対するフェリチン鉄の寄与率は、種子において平均38.7%、成葉において平均16.4%であった。本研究により、フェリチン鉄が、特にダイズ種子において鉄成分の主体となっ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) 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.
- 4) Ambe S, Ambe F, and Nozaki T (1987): Mossbauer study of iron in soybean seeds. *J Agric Food Chem*, **35**, 292-296.
- 5) Theil, EC (2011): Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. *J Nutr*, **141**, 724S-728S.
- 6) 増田太郎, 川端浩 (2017): 鉄代謝のキープレーヤー・フェリチンの鉄給源としての可能性について 化学と生物, **55**, 514-517.
- 7) Harrison PM and Arosio P (1996): The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1275**, 161-203.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Lukac RJ, Aluru MR and Reddy MB (2009): Quantification of ferritin from staple food crops. *J Agric Food Chem*, **57**, 2155-2161.
- 11) Masuda T (2015): Soybean ferritin forms an iron-containing oligomer in tofu even after heat treatment. *J Agric Food Chem*, **63**, 8890-8895.
- 12) 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.