血漿蛋白質の鉄結合能の検討

斎藤昌義*・新藤哲也**・門間美千子*・千國幸一*

Iron Binding Capacity of Plasma Proteins

Masayoshi SAITO*, Tetsuya SHINDOH**, Michiko MONMA*
and Koichi CHIKUNI** National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry
and Fisheries, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305** Tokyo Metropolitan Food Technology Research Center,
1-9 Kandasakuma-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101

Iron binding capacity of plasma proteins from slaughtered pig were investigated with a view to using them as iron binding materials in food processing. Iron content of samples (SI) and unsaturated iron binding capacity (UIBC) were measured according to Nitroso-PSAP method. Total iron binding capacity (TIBC) and saturation percentage (S%) were calculated from following equations; $TIBC (\mu g \cdot Fe/g) = UIBC + SI$, $S\% = (SI/TIBC) \times 100$. TIBC of plasma proteins was higher than that of whey powder, but lower than that of egg white powder. Iron saturation percentage of plasma proteins was about 50%, which was higher than that of whey or egg white powder. It was possible to obtain a fraction having high iron binding capacity from plasma proteins by ion-exchange chromatography. Iron binding capacity was stable in neutral or alkaline pH region during storage of plasma protein solution at 4°C. On the other hand, iron binding capacity was stable in acidic pH region during heat treatment of plasma protein solution at 80°C. Iron binding capacity decreased remarkably with peptic hydrolysis of plasma proteins. We concluded that it is possible to develop food materials having iron binding capacity from plasma proteins.

(Received Dec. 8, 1992)

屠殺した牛、豚から採血し、これを食品素材として利用するための研究が進められている。血漿蛋白質の利用を進めるに当たっては、血漿蛋白質の持つ優れた特性、または血漿蛋白質にしか認められない特性を食品素材として活用することによって、付加価値を高めることが可能である。そこで我々は、血漿蛋白質の乳化特性¹⁾、プロテアーゼ阻害活性²⁾などを解明し、特性を活用した食品素材への利用方法について検討してきた。

血漿中にはトランスフェリンが存在して、これが鉄を結合し、運搬している³⁾。乳清に含まれるラクトフェリン⁴⁾、卵白に含まれるオボトランスフェリン⁵⁾などと共

に、トランスフェリンの持つ鉄結合能は、生化学的な見地から解明が進められている。しかし、乳清、卵白については、食品として利用する見地からも鉄結合能の解明が進められているのに対し、血漿蛋白質に関しては、食品素材として鉄結合能を利用するための研究はほとんどなされていない。

鉄の供給源となる食品や飲料が、貧血を防止する観点などから注目されている現在、血漿蛋白質の持つ鉄結合能の利用も進められるべきであろう。本研究では、血漿蛋白質を鉄の供給源となる食品素材として利用することを目的として、血漿蛋白質の鉄結合能を検討した。

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

** 東京都立食品技術センター (〒101 東京都千代田区神田佐久間町 1-9)

実験方法

1. 材料

(1) 血漿蛋白質の調製

血漿蛋白質は、前報¹⁾と同様に豚血液から調製し、凍結乾燥したものを試料とした。

(2) その他の蛋白質

アポトランスフェリン (Sigma 社, T-5761), 牛血漿粉 (American Protein 社), ホエー粉 (サンラク N, 太陽化学) および卵白粉 (太陽化学) を使用した。

2. 鉄結合能の測定

試料中の鉄 (SI) は、Fe C-テストワコー (和光純薬) を使用して、Nitroso-PSAP 直接法で測定した。試料に界面活性剤および還元剤 (チオグリコール酸) を含む緩衝液を加え、蛋白質と結合している鉄を遊離させた。遊離した鉄のうち、 Fe^{3+} を還元剤で Fe^{2+} に還元し、これに、2-ニトロソ-5-(N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ) フェノール (Nitroso-PSAP) を結合させて 750 nm に吸収極大を持つキレート化合物を生成させた。この吸光度を測定して試料中の鉄濃度を求めた。

不飽和鉄結合能 (UIBC) は、UIBC-テストワコー (和光純薬) を使用して測定した。試料に還元剤 (メタ重亜硫酸ナトリウム) と既知過剰量の鉄 ($105 \mu\text{g} \cdot \text{Fe}^{2+}/\text{dl}$) を含む緩衝液を加え、遊離の鉄を結合する働きのある蛋白質と緩衝液中の鉄を結合させた。その後、Nitroso-PSAP を添加し、蛋白質と結合せずに緩衝液中に残っている鉄 (残余鉄) とキレート化合物を生成させ、この 750 nm の吸光度から残余鉄濃度を求めた。初めの緩衝液に含まれていた既知過剰量の鉄から、残余鉄を差し引くことにより、試料中の蛋白質と結合した鉄の量 (不飽和鉄結合能) を算出した。

いずれの測定においても、試料は、1% または 0.1% (w/v) 水溶液とし、1 ml を測定に使用した。SI および UIBC は試料 1 g 当たりの鉄の μg 数 ($\mu\text{g} \cdot \text{Fe}/\text{g}$) として算出した。

鉄結合能 (TIBC) および飽和度 (S%) は、以下の式より算出した⁶⁾。

$$\text{TIBC} (\mu\text{g} \cdot \text{Fe}/\text{g}) = \text{UIBC} + \text{SI}$$

$$\text{S}\% = \left(\frac{\text{SI}}{\text{TIBC}} \right) \times 100$$

3. 血漿蛋白質の分画

血漿蛋白質のイオン交換クロマトグラフィーによる分画を前報⁷⁾同様に行った。5つの画分 (A1 から A5) に分画し、凍結乾燥したものを鉄結合能の測定に用いた。

4. 蛋白質溶液の貯蔵

蒸留水に、血漿蛋白質は1% (w/v) となるように、トランスフェリンは0.1% (w/v) となるように溶解させ、これらの溶液の pH を 3, 7 または 9 に、1 N HCl または 1 N NaOH で調節した。これらを 4°C で 1 から 7 日間貯蔵し、その後、鉄結合能の測定に用いた。

5. 蛋白質の加熱による変性

血漿蛋白質およびトランスフェリン溶液を前項、蛋白質溶液の貯蔵の場合と同様に調製した。これを 80°C で 5 から 30 分間加熱処理し、その後氷浴中で直ちに室温へ戻し、鉄結合能の測定に用いた。

6. 血漿蛋白質のペプシンによる分解

血漿蛋白質のペプシンによる分解を前報⁸⁾同様に行った。酵素/基質 = 1/1000 (w/w), pH 3.7, 40°C で 20 から 120 分間反応させた。2 M トリスで試料の pH を 8.2 に調節して反応を停止させ、透析、凍結乾燥したものを鉄結合能の測定に用いた。

実験結果及び考察

1. 血漿蛋白質の鉄結合能

Table 1 に蛋白質の鉄結合能 (TIBC) と飽和度 (S%) を示した。血漿蛋白質の鉄結合能は $65.7 \mu\text{g} \cdot \text{Fe}/\text{g}$ で、50.1% が飽和されていた。市販の牛血漿粉の鉄結合能は今回調製した試料よりも低く、飽和度は 100% で、遊離の鉄を結合する能力は全くなかった。トランスフェリンの鉄結合能は血漿蛋白質の約 15 倍であり、アポ型 (鉄を結合していないタイプ) であったため、飽和

Table 1 Total iron binding capacity and saturation percentage of various proteins

	TIBC ($\mu\text{g} \cdot \text{Fe}/\text{g}$)	S (%)
Plasma proteins*	65.7	50.1
Plasma powder (bovine)**	48.5	100
Egg white powder**	91.2	0.0
Whey powder**	21.7	20.7
Transferrin***	971	7.2

TIBC: total iron binding capacity, S: saturation percentage. These are calculated from following equations, $\text{TIBC} = \text{UIBC} + \text{SI}$, $\text{S} (\%) = (\text{SI}/\text{TIBC}) \times 100$ where UIBC is unsaturated iron binding capacity and SI is iron content of samples.

*: prepared in a laboratory, **: food additive on the market, ***: powder for laboratory use.

度は7.2%と低い値を示した。ホエー粉の鉄結合能は血漿蛋白質よりも低く、卵白粉の鉄結合能は血漿蛋白質よりも高かった。いずれの場合も飽和度は低く、卵白粉の飽和度は0%であった。

トランスフェリンは、分子量約81 000の糖蛋白質で、1分子当たり2原子の Fe^{3+} イオンと結合することが知られている³⁾。ラクトフェリン、オボトランスフェリンと共通な1次構造部があり、鉄イオンとキレートするアミノ酸残基として、チロシン、ヒスチジンが関与していると考えられている。さらに、これらの蛋白質は、鉄と結合すると470 nm付近に吸収を持つ淡紅色を呈することでも共通の性質を有する⁴⁾。この様に、鉄結合能に関しては、一般に検討されている乳清蛋白質などのかわりに、類似した性質を持つ、血漿蛋白質を使用することが可能と考えられる。

鉄結合能が高ければ、あらかじめ鉄を飽和させて、鉄の供給源となる食品素材としての利用が可能である。市販されている鉄を含む飲料は $8 \mu\text{g} \cdot \text{Fe}/\text{ml}$ 程度であり、この鉄濃度にするには、トランスフェリンで0.83%、血漿蛋白質で12%の溶液が必要となる。しかし、血漿蛋白質の場合、実際にこの様な高濃度での利用は困難であるので、鉄結合能が高い画分を調製して利用するなどの検討が必要であろう。

乳清、卵白のように、鉄の飽和度が低い場合、遊離の鉄を結合して微生物に利用できない状態にするため、静菌作用が期待できる⁴⁾⁵⁾。血漿蛋白質の飽和度は約50%であることから、血漿蛋白質を静菌作用を持った食品素材として利用することも可能であると考えられ、今後この点の検討も必要であろう。

2. 血漿蛋白質分画物の鉄結合能

Table 2 に血漿蛋白質の分画物の鉄結合能および飽和度を示した。A1, A3, A4 画分の鉄結合能は低く、A2 画分に鉄結合能があることが示された。飽和度も、A1, A3, A4 画分では100%であり遊離の鉄を結合する能力は全くないが、A2 画分では37.5%と比較的低い値であった。なお、A5 画分は、溶解性が低いため、鉄結合能の測定は行わなかった。

血漿中の鉄の95%以上は、トランスフェリンに結合したものであることが知られている³⁾。A2 画分は、トランスフェリンが主な成分であり⁷⁾。A2 画分の鉄結合能が高いことは、トランスフェリンの働きによるものと考えられる。

このように、イオン交換クロマトグラフィーによる分画によって、鉄結合能の高い素材を調製することが可能

Table 2 Total iron binding capacity and saturation percentage of fractionated plasma proteins

	TIBC ($\mu\text{g} \cdot \text{Fe}/\text{g}$)	S (%)
Whole plasma	65.7	50.1
Fraction A 1	6.1	100
Fraction A 2	305.9	37.5
Fraction A 3	23.3	100
Fraction A 4	17.3	100
Fraction A 5	—	—

TIBC and S (%) are the same as in Table 1.

Fractionated by ion-exchange chromatography.

—: not measured because of the precipitation.

であった。他の画分のうち、A1 は γ -グロブリン、A3 はプロテアーゼ阻害蛋白質、A4 は血清アルブミンに富むことが示されている²⁾⁷⁾。A2 画分に対しては鉄結合能を活用した利用方法を検討し、A2 以外の画分はそれぞれの蛋白質の特性を活用した利用方法を考えることで、血漿蛋白質全体としての利用性の向上が計られるであろう。

4. 鉄結合能の安定性

Fig. 1 に1% 血漿蛋白質溶液を4°C, pH 3, 7 または9において貯蔵したときの鉄結合能および飽和度の変化を示した。血漿蛋白質溶液をpH 3で貯蔵した場合では、鉄結合能は経過日数と共に低下し、7日後は初めの約40%となった。このとき飽和度は上昇し、4日目から100%となった。pH 7, 9で保存した場合、鉄結合能、飽和度共に変化はわずかであった。

Fig. 2 に0.1% トランスフェリン溶液を4°C, pH 3, 7 または9において貯蔵したときの鉄結合能および飽和度の変化を示した。トランスフェリンの場合は、pH 3, 7, 9ともに、鉄結合能、飽和度の変化はわずかであった。

今回の結果からは、血漿蛋白質はトランスフェリンと比較して、酸性領域において貯蔵した場合に鉄結合能が低下しやすいことが示された。また、いずれの場合も、pH 3では初めから他のpHより鉄結合能が低い値となっていた。

Fig. 3 に1% 血漿蛋白質溶液の加熱処理による鉄結合能と飽和度の変化を示した。pH 3において80°Cで加熱しても鉄結合能、飽和度ともに変化はわずかであったが、pH 7, 9における加熱で、30分後に鉄結合能は

Fig. 1 Changes in total iron binding capacity (TIBC) and saturation percentage (S%) of plasma proteins during storage at 4°C under various pH conditions

—: total iron binding capacity,
 ---: saturation percentage
 ○: pH 3, ●: pH 7, ■: pH 9.

Fig. 2 Changes in total iron binding capacity (TIBC) and saturation percentage (S%) of transferrin during storage at 4°C under various pH conditions

Symbols are the same as in Fig. 1

Fig. 3 Changes in total iron binding capacity (TIBC) and saturation percentage (S%) of plasma proteins during heat treatment at 80°C under various pH conditions

Symbols are the same as in Fig. 1

加熱前の 30% 以下まで低下した。飽和度も 10 分後には 100% となった。

Fig. 4 に 0.1% トランスフェリン溶液の加熱処理による鉄結合能と飽和度の変化を示した。pH 9 において鉄結合能の低下が著しく、30 分後には加熱前の 10% 以下となり、飽和度も 100% となった。pH 3 においては加熱前は鉄結合能が pH 7, 9 より 25% 程度低かったが、加熱による低下は他の pH と比較してわずかであった。

食品加工においては、殺菌の目的等で血漿蛋白質を加熱処理することが多い。今回の結果からは、80°C 30 分間の加熱処理を行う場合、中性またはアルカリ性領域では血漿蛋白質の鉄結合能が著しく低下するのに対し、酸性領域では血漿蛋白質の鉄結合能があまり低下しないことが示された。

また、血漿蛋白質とトランスフェリンには、酸性溶液で貯蔵した場合や中性溶液で加熱した場合の鉄結合能の変化に異なった傾向がみられた。これは、血漿蛋白質は多くの種類の蛋白質の混合物であるため、異種の蛋白質の相互作用が変性に影響を及ぼしていることが原因と考えられる。また、血漿蛋白質とトランスフェリンでは処理前の飽和度に差があったが、この影響も考えられる。今後は、同一試料で飽和度が異なる場合の鉄結合能の安

Fig. 4 Changes in total iron binding capacity (TIBC) and saturation percentage (S%) of transferrin during heat treatment at 80°C under various pH conditions

Symbols are the same as in Fig. 1

定性も検討する必要があると思われる。

血漿蛋白質溶液を低温で貯蔵する場合、中性、またはアルカリ性領域の方が鉄結合能が安定であるのに対し、血漿蛋白質溶液を加熱処理する場合には、酸性領域で行った方が安定であった。このように、鉄結合能の安定な条件は、溶液を貯蔵するのか、加熱するのかで全く異なっていることが示された。

4. 血漿蛋白質のペプシン分解物の鉄結合能

Fig. 5 に血漿蛋白質のペプシン分解による鉄結合能と飽和度の変化を示した。血漿蛋白質の 20 分間分解物は、分解前の鉄結合能の 15% 程度まで低下しており、40 分間以上分解した場合は、ほとんど鉄結合能が失われた。飽和度も 20 分間の分解で 100% となった。

前報⁹⁾において示されたように、血漿蛋白質をペプシンで 20 分間加水分解した場合、蛋白質のほとんどが分子量 25 000 以下に分解されていた。このような分解物では鉄結合能はほとんど残っておらず、鉄を結合するためには分解されていない蛋白質の構造が必要であることが示された。

一方、血漿蛋白質分解物のトリプシンに対する阻害活性を測定した結果は、120 分分解物でも 50% 以上の活性が残っていた²⁾。血漿蛋白質の分解で、鉄結合能のように容易に失われる性質と、トリプシン阻害活性のよう

Fig. 5 Changes in total iron binding capacity (TIBC) and saturation percentage (S%) of plasma proteins during peptic hydrolysis

—: total iron binding capacity,
----: saturation percentage

に比較的失われにくい性質があることが明かとなった。

以上のことを通して、血漿蛋白質の鉄結合能を利用して、これを鉄の供給源となる食品素材として利用することが可能であり、この時 pH 等の条件設定が重要であることが示された。また、飽和度の低い場合は、静菌作用を持った食品素材としての利用が可能であり、この点については今後さらに検討する必要があると考えている。

要 約

1. 血漿蛋白質の鉄結合能はホエー粉より高く、卵白粉より低い値を示した。血漿蛋白質の鉄結合能を食品素材として利用することが可能と考えられた。また、市販の血漿粉は実験室規模で調製した血漿蛋白質より鉄結合能が低い値であった。

2. 血漿蛋白質をイオン交換クロマトグラフィーで分離すると、トランスフェリンを含む画分の鉄結合能が高く、飽和度は低い値を示した。この画分が鉄結合能を活用した利用に適していることが示された。

3. 血漿蛋白質溶液を貯蔵した場合、鉄結合能は中性、アルカリ性領域で安定であった。一方、血漿蛋白質溶液を加熱処理した場合、鉄結合能は酸性領域の方が安定であった。

4. 血漿蛋白質をペプシンで加水分解すると、鉄結合

能は容易に低下した.

豚血液の採取に当たってお世話頂いた, 農林水産省畜産試験場 中井博康室長に感謝いたします.

文 献

- 1) 斎藤昌義・石橋恵美子・平 春枝: 日食工誌, **37**, 805 (1990).
- 2) 斎藤昌義・門間美千子・千國幸一: 日食工誌, **39**, 901 (1992).
- 3) 吉野芳夫・折茂英生・久安早苗・神成節子・平井

幸彦: 続生化学実験講座 8 血液 (上), 日本生化学会編 (東京化学同人, 東京), p. 461 (1987).

- 4) 山内邦男: 農化, **53**, R 37 (1979).
- 5) 佐藤 泰: 食卵の科学と利用, (地球社, 東京), p. 55 (1980).
- 6) 村井哲夫: 臨床化学検査 (II), 石井 暢編, (医学書院, 東京), p. 296 (1975).
- 7) SAITO, M. ICHIKAWA, N. and TAIRA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2831 (1988).
- 8) 斎藤昌義・平 春枝・清水 誠・山内邦男: 日食工誌, **38**, 920 (1991).

(平成 4 年 12 月 8 日受理)