



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the ZnPP formation mechanism in two different optimum pH at 4.75 and 5.5 in pork [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	AKTER, MOFASSARA
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13588号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73977
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mofassara_Akter_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 Mofassara Akter

学 位 論 文 題 名

Study on the ZnPP formation mechanism in two different optimum pH
at 4.75 and 5.5 in pork

（異なる 2 つの至適 pH 4.75 と 5.5 における豚肉の ZnPP 形成機構に関する研究）

亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) は、亜硝酸塩や硝酸塩、いわゆる発色剤を添加しない伝統的な非加熱食肉製品中に形成される鮮赤色の色素である。ZnPP は発色剤無添加の食肉製品の色調に重要な役割を果たしていることから、食肉製品中における ZnPP 形成機構の解明のための研究がこれまで行われてきた。ZnPP はヘムの中心に配位している鉄が亜鉛に置き換わった構造をしていることから、食肉中の主要なヘムタンパク質であるミオグロビン、食肉中に豊富に含まれる亜鉛、ならびにミトコンドリア内に存在して 2 価金属をポルフィリン環に挿入する酵素であるフェロケラターゼ (FECH) の作用により ZnPP 形成に関与していると考えられているが、ZnPP の形成機構については諸説提唱されており、未だに解明されていない。我々の研究グループは、豚肉中の ZnPP 形成において pH 4.75 と 5.5 の 2 つの異なる至適 pH の機構が存在し、筋肉において構成する筋線維型の割合によって両機構の寄与の割合が異なることを明らかにした。至適 pH 5.5 の形成機構における ZnPP は、金属の配位していないプロトポルフィリン IX (PPIX) が前駆物質であるが示されたが、ヘムから形成されるものではないことが示された。しかし、FECH 以外の形成に寄与する成分についてはほとんど検討されていない。一方、近年見出された至適 pH 4.75 における形成機構については、前駆物質や寄与成分などについて明らかにされていない。そこで本研究では、至適 pH 4.75 および 5.5 における形成機構を明らかにすることを目的として、当研究室で構築した豚肉ホモジネートを用いた ZnPP/PPIX 形成モデル実験系を用いて、新規に発見された至適 pH 4.75 の ZnPP 形成に及ぼす各種要因を検討した。さらに、豚肉中の成分を分画・分離することにより両至適 pH の形成機構に及ぼす ZnPP の前駆物質や形成に寄与する成分について検討した。特に、ミオグロビンを含む筋漿画分における寄与成分の分離同定を試みた。

至適 pH 4.75 における ZnPP 形成は、これまで明らかにされた pH 5.5 における形成機構と同様に酸素によって抑制することが示された。また、FECH の阻害剤である N-MMP や亜硝酸ナトリウムの添加によっても ZnPP の形成は著しく抑制されたため、pH 4.75 における形成機構においても FECH の関与が示唆された。一方、pH 5.5 における形成機構よりも、至適温度は高いことが示された。さらに、経時的な測定においても、pH 5.5 における形成では、ある時点で増加しなくなるのに対して、pH 4.75 では ZnPP は増加し続け、形成する能力も著しく高いことが示された。このため、pH 4.75 と pH 5.5 での ZnPP 形成機構は似ているものの、異なる機構であることが示唆された。前駆物質と予想された PPIX の形成様相が、ZnPP の形成様相と同じであったことから、pH 4.75 の ZnPP の形成機構においても PPIX が前駆物質であることが示唆され、検討した各種要因は前駆物質である PPIX 形成で重要な要因であることが示された。

次に、豚肉ホモジネートを、筋漿を主体とする「水溶性画分」と、筋原線維タンパク質や結合組織、細胞小器官からなる「不溶性画分」に分画したところ、各々単独画分からは ZnPP や PPIX は形成されなかったが、両者を再び混合すると ZnPP や PPIX は形成された。水溶性画分をさらに限外濾過により「<10 kDa 水溶性画分」と「>10 kDa 水溶性画分」に分けて、不溶性画分との組み合わせから検証すると、いずれの画分が欠如しても ZnPP/PPIX の形成が有意に抑制されたことから、3 つ画分に含まれる複数の成分が ZnPP ならびに PPIX の形成に寄与することが示唆された。>10 kDa 水溶性画分中の成分については、熱安定性や限外ろ過による検証から、10-30 kDa のタンパク質であると推察された。一方、<10 kDa 水溶性画分を添加しないものでは、PPIX も形成されなかったことから、亜鉛の供給源ではないことが推察された。また、加熱した<10 kDa 水溶性画分の添加では ZnPP/PPIX の形成が抑制されなかったことから、この画分に含まれる寄与成分は熱安定性の高いことが示された。ミオグロビンの添加や、水溶性画分をゲルろ過により分離したものではミオグロビンの溶出画分に高い ZnPP/PPIX 形成活性が示されたことから、ミオグロビンの関与が強く示唆された。しかし、硫酸分画やイオン交換クロマトグラフィで分離したところ、ミオグロビン含有画分には ZnPP/PPIX 形成活性が認められなかった。このことから、ミオグロビンと分子量の近い別の水溶性タンパク質も ZnPP/PPIX の形成に関与しており、用いた分離手法では活性が失われる可能性が示された。本研究の結果とこれまでの知見から、豚肉における至適 pH 4.75 の形成機構は、ミオグロビン由来のヘムを前駆物質として、FECH やミオグロビンと分子量の別の近い水溶性タンパク質、熱安定性のある<10 kDa の水溶性低分子成分の作用によって嫌氣的条件下で形成された PPIX に、FECH もしくは非酵素的に亜鉛が配位して ZnPP を形成することが示唆された。

至適 pH 5.5 の形成においても、不溶性画分、>10 kDa 水溶性画分ならびに<10 kDa 水溶性画分の 3 つの画分が ZnPP/PPIX の形成に不可欠であることが示された。しかし、ミオグロビンの添加は ZnPP/PPIX の形成を有意には促進せず、ゲルろ過による水溶性画分の分離においても、ミオグロビンの溶出画分よりも分子量の大きい画分に ZnPP/PPIX 形成活性が認められた。これらの結果から、pH 5.5 の形成機構ではミオグロビンは関与しないことが示唆された。陽イオン交換クロマトグラフィにおいて、溶離液の pH を段階的に高める溶出法で分離したところ、pH 8.0 で溶出する画分においてのみ ZnPP の形成活性が認められた。そこで、寄与成分の分離を試みたところ、60 kDa ならびに 42 kDa の 2 成分に絞り込むことができた。本研究の結果とこれまでの知見から、豚肉における至適 pH 5.5 の形成機構は、ヘムの生合成経路などのヘム以外から PPIX が作られ、この過程において FECH や>10 kDa 水溶性タンパク質、熱安定性のある<10 kDa の低分子の水溶性成分が嫌氣的条件下で関与していることが示唆された。さらに、FECH や、本研究で明らかにした 60 kDa や 42 kDa 成分の作用により亜鉛が供給または挿入されて ZnPP が形成されることが示唆された。

本研究により、豚肉における至適 pH の異なる 2 つの ZnPP 形成機構においては前駆物質や寄与成分が異なっており、独立した機構であることを明らかにした。発色剤を使用しない伝統的な非加熱食肉製品において、これら 2 つの形成機構がどのように寄与しているのかについては明らかにできなかったが、赤色色素、ZnPP の形成機構の全貌解明の一助となるものと結論した。