



Title	乾塩漬食肉製品における亜鉛プロトポルフィリンIX形成機構に関する研究：形成経路と水溶性ZnPP複合体の解明[論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	王, 鴻誠
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14294号
Issue Date	2020-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80182
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	wang_hung_cheng_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 ワン ホン チェン
 王 鴻 誠

学 位 論 文 題 名

乾塩漬食肉製品における亜鉛プロトポルフィリン IX 形成機構に関する研究
— 形成経路と水溶性 ZnPP 複合体の解明 —

近年、一部の消費者は発がん性の懸念から硝酸塩や亜硝酸塩などの発色剤を使用しない食肉製品を強く要望している。しかし、発色剤を使用しないと一般的な食肉製品と比べて暗い色調を呈し、消費者の購買意欲は低下する。このため、発色剤無添加の食肉製品のための新しい色調改善技術が望まれている。亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) はパルマハムなどの発色剤を使用しない乾塩漬食肉製品中に特異的に形成する赤色色素であり、発色剤無添加食肉製品の色調改善への応用が期待されている。食肉製品中の ZnPP はプロトポルフィリン IX (PPIX) に亜鉛が挿入されて形成される。しかし、PPIX の形成経路は未だ確定しておらず、ヘムがフェロケラターゼ (FECH) により脱鉄される経路 (ヘム脱鉄経路) と、生体内と同様のメカニズムで合成される経路 (生合成経路) の 2 経路が提唱されている。一方、*in vitro* の実験系で豚肉には ZnPP の形成が遅筋型筋線維に依存する機構 (遅筋型機構) と、筋線維型に依存しない機構 (非依存型機構) の 2 つの機構が報告されたが、パルマハムにおける形成機構の全貌は解明されていない。そこで本研究では、豚肉中の 2 種類の ZnPP 形成経路と 2 種類の ZnPP 形成機構の関連性を解明して、パルマハムにおける ZnPP 形成機構を明らかにすることを目的に、遅筋型機構と非依存型機構を再現した 2 つの豚肉を用いた *in vitro* モデル (IS と LTL モデル) を用いて、両経路で異なる挙動を示すと考えられる鉄、亜鉛関連物質とポルフィリン類の量的推移を分析し、ZnPP 形成機構と経路との関連性を検証した。また、パルマハムには水溶性 ZnPP 複合体が存在するが、両 *in vitro* モデルで形成される水溶性 ZnPP 複合体の形成様相が異なることから、パルマハム中の水溶性 ZnPP 複合体の結合タンパク質を同定することにより、パルマハムにおける ZnPP 形成機構の解明を試みた。

遅筋型機構を再現する IS モデルでは、ZnPP の形成に伴い、明瞭なヘム鉄の減少と非ヘム鉄の増加が観察され、ヘムの脱鉄反応が示唆された。また、IS モデルではミオグロビンやヘモグロビンなどのヘムタンパク質の著しい分解が報告されている。このため、IS モデルではヘムタンパク質の分解に伴うヘムの遊離が考えられたが、ヘム鉄含量が低下したことから、遊離したヘムが脱鉄によって PPIX になると考えられる。一方、形成した ZnPP に存在する亜鉛量は総亜鉛量と比べて僅かであったため、IS モデルでは ZnPP 形成のための亜鉛は十分量存在することと、PPIX は僅かしか存在しなかったことから、PPIX への亜鉛の挿入反応は速やかに起こることが示唆された。さらに、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-HPLC) を用いたパルマハム水抽出物の分析では、35 kDa と 5 kDa の蛍光物質が検出された。しかし、IS モデルでは 35 kDa の蛍光物質がみられなかったことと、5 kDa 蛍光物質は蛍光スペクトルから水溶性 ZnPP 複合体ではないことから、形成された ZnPP は全て不溶性の状態で存在することが示唆された。以上のことから、IS モデルでは、ヘムタンパク質の分解により遊離したヘムが、ヘム脱鉄経路を介して PPIX を形成し、直ちに亜鉛が挿入されて ZnPP を形成することが示唆され、その大部分は不溶性 ZnPP とし

て存在することが示された。

非依存型機構を再現する LTL モデルでは、ヘム鉄は測定法によって異なる推移の傾向が観察されただけでなく、非ヘム鉄は検出限界に近いと、鉄の量的推移の再現性がみられなかった。また、IS モデルと比べて明瞭なヘム鉄の減少がみられなかったが、ZnPP の形成量はヘム鉄や非ヘム鉄の測定誤差より小さく、ヘムが総ポルフィリン量のほとんどを占めていた。LTL モデル中の ZnPP 形成量が各種関連物質の検出限界近くであったため、ヘム脱鉄反応と生合成経路の関与を明らかにできなかった。また、ZnPP に結合する亜鉛量は総亜鉛量と比べて僅かであり、PPIX の形成が観察されなかったことから、LTL モデルでは ZnPP 形成のための亜鉛は十分量が存在し、PPIX が形成されると、直ちに亜鉛が挿入されて ZnPP に形成されると推察された。さらに、SEC-HPLC を用いた LTL モデルの分析では、パルマハムと同様の 35 kDa の ZnPP 由来の蛍光物質が主に形成されたため、IS モデルとは異なり、水溶性 ZnPP 複合体を形成することが示された。以上のことから、LTL モデルでは、ZnPP 形成量が少なかったため、PPIX までの形成経路を解明できなかったが、PPIX を形成して直ちに ZnPP が形成し、35 kDa の水溶性タンパク質に結合して水溶性 ZnPP 複合体を形成することが示唆された。

パルマハム中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質は疎水性相互作用クロマトグラフィー、尿素-PAGE、SDS-PAGE により純化され、N 末端アミノ酸配列分析によりピルビン酸キナーゼ、アルブミン、ヘモグロビン (Hb) 及びミオグロビン (Mb) が候補となったが、免疫沈降法とウェスタンブロッティング分析により、パルマハム中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質は Hb、Mb とそれらの部分分解産物であることが示された。尿素-PAGE を用いたパルマハム水抽出液中の各 ZnPP 複合体の観察では、Hb と Mb の部分分解していないものと主に結合していたため、タンパク質の部分分解は ZnPP 複合体の形成に必須ではないことが示唆された。また、Hb のグロビン部分 (apo-Hb) と結合した水溶性 ZnPP-Hb 複合体が全水溶性 ZnPP 複合体の 60-80% を占め、食肉中に多い Mb との ZnPP 複合体が少なかったこと、劣化した豚肉では ZnPP-Hb 複合体のみが観察されたことから、Hb は Mb より容易に ZnPP 複合体に形成することが示唆された。Hb は食肉中では主に二量体となることから、SEC-HPLC で分離された 35 kDa 成分は Hb の二量体と推察された。これらの結果から推察されるパルマハム中の水溶性 ZnPP 複合体の形成機構は、LTL モデルで見られたように、ヘムが遊離されやすい Hb から apo-Hb が多く形成され、ヘム脱鉄経路または生合成経路から形成された遊離 ZnPP と結合して、高い割合の ZnPP-Hb 複合体が形成されると考えられ、パルマハム中での非依存型機構があることが示唆された。一方、IS モデルにおける遅筋型機構については、ヘムタンパク質の著しい分解が起こるため、apo-Hb や apo-Mb が分解されて、本研究で明らかにした水溶性 ZnPP 複合体が形成されないことから、パルマハムでの挙動とは大きく異なっていた。しかし、乾塩漬食肉製品中の遅筋型機構で多量に形成される不溶性 ZnPP は筋漿ではなく、ミトコンドリア中に局在すると報告されている。ミトコンドリアにおける生合成経路から形成する PPIX から ZnPP を形成したことや、生体内に形成されたヘムがヘム脱鉄経路の前駆物質として使われて ZnPP を形成したのかもしれない。以上のことから、パルマハム中の遅筋型機構と非依存型機構ではヘム脱鉄経路または生合成経路から ZnPP を形成することを明らかにできなかったが、パルマハムにおいて、形成された ZnPP は主に溶血して二量体となった Hb の apo-Hb と結合して水溶性 ZnPP 複合体を形成する非依存型機構が存在することが明らかにされた。