



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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                                           |
| 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                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14294">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14294</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/80183">https://hdl.handle.net/2115/80183</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | wang_hung_cheng.pdf                                                                             |



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―

北海道大学大学院 農学院

共生基盤学専攻 博士後期課程

王 鴻誠

# 目次

|     |                                            |    |
|-----|--------------------------------------------|----|
| 第1章 | 序論                                         | 1  |
| 第2章 | ZnPP 形成モデルにおける鉄、亜鉛および各種ポルフィリン<br>量の推移      | 11 |
| 第1節 | 緒論                                         | 11 |
| 第2節 | 実験材料および方法                                  | 15 |
| 第1項 | 実験材料                                       | 15 |
| 第2項 | 試料の調製                                      | 15 |
|     | (1) 標準溶液                                   | 15 |
|     | (2) 亜鉛測定試薬                                 | 15 |
|     | (3) HPLC 溶離液                               | 15 |
| 第3項 | ZnPP 形成モデル試料の調製                            | 16 |
| 第4項 | 分析方法                                       | 16 |
|     | (1) 非ヘム鉄濃度の測定                              | 16 |
|     | (2) 比色法による総亜鉛濃度の測定                         | 17 |
|     | (3) 逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) によるポル<br>フィリンの定量 | 17 |
|     | (4) 分解法による総鉄・総亜鉛量の測定                       | 19 |
|     | (5) ヘム量の測定                                 | 19 |
|     | (a) 直接法                                    | 19 |
|     | (b) 分解法                                    | 20 |
| 第5項 | 統計処理                                       | 20 |

|     |                               |    |
|-----|-------------------------------|----|
| 第3節 | 結果                            | 21 |
| 第1項 | 標準品を用いた総鉄・総亜鉛測定法の検証           | 21 |
| 第2項 | ZnPP 形成モデル中の金属イオンおよびポルフィリンの推移 | 21 |
| 第4節 | 考察                            | 27 |
| 第1項 | IS モデルの ZnPP 形成機構             | 27 |
| 第2項 | LTL モデルの ZnPP 形成機構            | 28 |
| 第3章 | パルマハムにおける水溶性 ZnPP 結合タンパク質の同定  | 31 |
| 第1節 | 緒論                            | 31 |
| 第2節 | 実験材料および方法                     | 33 |
| 第1項 | 実験材料                          | 33 |
| 第2項 | 水溶性タンパク質の抽出                   | 33 |
| 第3項 | サイズ排除クロマトグラフィー (SEC-HPLC)     | 33 |
| 第4項 | 陽イオン交換クロマトグラフィー (CIEX)        | 35 |
| (1) | 試料の調製                         | 35 |
| (2) | CIEX 分離                       | 35 |
| 第5項 | 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)        | 35 |
| (1) | 試料の調製                         | 35 |
| (2) | HIC 分離                        | 36 |

|      |                                      |    |
|------|--------------------------------------|----|
| 第6項  | SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動                  |    |
|      | (SDS-PAGE)                           | 36 |
|      | (1) 電気泳動用試料の調製                       | 36 |
|      | (2) ゲルの調製                            | 36 |
|      | (3) 電気泳動                             | 37 |
|      | (4) ゲルの染色および脱色                       | 37 |
| 第7項  | 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動                   |    |
|      | (Native-PAGE)                        | 38 |
|      | (1) 試料の調製および電気泳動                     | 38 |
|      | (2) 蛍光像および明視野像の撮影                    | 38 |
| 第8項  | 尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動                    |    |
|      | (尿素-PAGE)                            | 40 |
|      | (1) 試料の調製                            | 40 |
|      | (2) ゲルの調製                            | 40 |
|      | (3) 電気泳動                             | 41 |
| 第9項  | ウェスタンブロッティング (WB) 分析                 | 41 |
|      | (1) PVDF 膜への転写                       | 41 |
|      | (2) 免疫染色および検出                        | 41 |
| 第10項 | N 末端アミノ酸配列分析                         | 42 |
| 第11項 | 免疫沈降                                 | 42 |
| 第3節  | 結果                                   | 44 |
| 第1項  | 各種クロマトグラフィーを用いた ZnPP 結合タンパク質候補の分離と同定 | 44 |
|      | (1) SEC-HPLC を用いた分離                  | 44 |
|      | (2) CIEX と SEC-HPLC を用いた分離           | 48 |

|     |                                                        |     |
|-----|--------------------------------------------------------|-----|
| (3) | HIC、CIEX および SEC-HPLC を用いた分離                           | 48  |
| (4) | ZnPP 結合タンパク質候補の同定                                      | 52  |
| (5) | 免疫沈降法による ZnPP 結合タンパク質の検証                               | 56  |
| 第2項 | クロマトグラフィーと各種ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた ZnPP 結合タンパク質の分離と<br>同定 | 56  |
| (1) | Native-PAGE を用いた分離                                     | 60  |
| (2) | 尿素-PAGE を用いた分離                                         | 60  |
| (3) | HIC と尿素-PAGE を用いた分離                                    | 64  |
| (4) | ZnPP 結合タンパク質候補の同定                                      | 68  |
| (5) | 免疫沈降法による ZnPP 結合タンパク質の検証                               | 68  |
| (6) | 尿素-PAGE で観察された蛍光バンドと Hb、Mb<br>の関連性                     | 71  |
| 第3項 | パルマハム中の Hb と Mb の分解状態                                  | 77  |
| 第4節 | 考察                                                     | 82  |
| 第4章 | 総合考察                                                   | 87  |
| 第1節 | IS モデルにおける ZnPP 形成の推定機構                                | 87  |
| 第2節 | LTL モデルにおける ZnPP 形成の推定機構                               | 89  |
| 第3節 | パルマハムにおける ZnPP 形成の推定機構                                 | 94  |
| 第5章 | 要約                                                     | 98  |
|     | 謝辞                                                     | 99  |
|     | 引用文献                                                   | 101 |

## 第 1 章 序論

硝酸塩や亜硝酸塩は、塩漬剤として伝統的な食肉加工に使用されており、その健康への危害は長年議論されている (Bedale *et al.*, 2016)。硝酸塩や亜硝酸塩の機能は、これらの代謝産物である一酸化窒素が肉中のミオグロビン (Mb) と反応してニトロシルミオグロビンを形成することで、安定した赤色を示す発色作用をはじめ、ボツリヌス菌の生育抑制、脂質に対する抗酸化、風味産生など多岐にわたる (Gassara *et al.*, 2016)。しかし、亜硝酸イオンが第二級アミンと反応すると発がん性のあるニトロソアミンを生成する (Andrée *et al.*, 2010)。このような発がん性物質が食肉製品中や摂食後に形成する可能性があるため、国際がん研究機関 (IARC) は食肉製品をグループ 1、つまり人間に対して発がん性がある根拠が強い、と分類している (Bouvard *et al.*, 2015)。一方、食肉製品中の亜硝酸塩の危害について多くの反論がある。高所得国では一日に摂取する亜硝酸塩のほとんどは唾液や野菜由来であり、塩漬食肉製品由来はわずか 5%程度しかない (Grasso *et al.*, 2014)。また、食肉に含まれる第二級アミンは極めて微量であるだけでなく、ニトロソアミンの形成には pH 5.5 以下、130°C 以上の厳しい環境が必要である (Andrée *et al.*, 2010)。加えて、食肉製品の製造において、適切製造基準 (GMP) の順守やアスコルビン酸の添加によりニトロソアミンの形成を抑制できる (Honikel, 2008; Andrée *et al.*, 2010)。以上のように、食肉製品に添加された亜硝酸塩の危害性については定論に至っていない。

近年、消費者が「クリーンラベル」を重視し始め、添加物の危害性に関わらず、添加物がより少なく、天然素材のみで製造される食品を好むようになったことから、硝酸塩や亜硝酸塩無添加の食肉製品の開発が商機になっている (Asioli *et al.*, 2017; Grasso *et al.*, 2014)。このため、食肉加工における亜硝

酸塩添加の代わりに、天然・有機塩漬食肉製品（*natural/organic cured meat product*）がいくつか開発された。この製品では硝酸塩を多く含む野菜のエキスを粉末と硝酸塩還元菌を組み合わせることで間接的に添加することにより、硝酸塩や亜硝酸塩を直接的に添加したものと同程度の発色、抗菌、抗酸化などの効果がみられたが、製品中の残存亜硝酸イオン濃度は亜硝酸塩を添加したものと変わらなかった（*Bedale et al., 2016*）。つまり、このことは添加物としての亜硝酸塩は添加されていないが、ニトロソアミンの形成リスクも変わっていないことを意味する。一方、亜硝酸塩の抗酸化や抗菌作用は、ハーブ、スパイス、有機酸などの天然物質により代替できるものの、発色作用を代替する技術が存在しないため、亜硝酸塩を使用しない食肉製品は従来の製品より暗い色調を呈する（*Alahakoon et al., 2015; Sebranek & Bacus, 2007*）。食肉の色調は消費者の購買意欲に大きく影響しているため（*Font-i-Furnols & Guerrero, 2014*）、消費者に魅力的な亜硝酸塩無添加の食肉製品を開発するには、新しい色調改善技術が必要である。

亜硝酸塩無添加の食肉製品の色調改善技術開発において、亜硝酸塩無添加の乾塩漬生ハム中で形成される赤色色素が注目されている。一般に、食肉の色調はヘムタンパク質に起因し、ヘモグロビンとシトクロムが部分的に関与しているものの、もっとも重要なのは Mb である（*Ramanathan et al., 2020*）。Mb の色調は、配位子の種類と鉄イオンの酸化還元状態によって異なる。新鮮な食肉の切断面で観察される紫赤色のデオキシミオグロビン、ブルーミングにより形成される鮮赤色のオキシミオグロビン、食肉が長時間放置されて形成される褐色のメトミオグロビンが生肉中の典型的なミオグロビン誘導体である（*西邑, 2011*）。一方、プロシュート・ディ・パルマ（パルマハム）をはじめとするいくつかの乾塩漬生ハムは、硝酸塩や亜硝酸塩を使用しないで、豚もも肉および塩のみが原料として使われる（*Adamsen et al., 2006a; Parolari, 1996*）。パルマハムの色調について、熟成初期は Mb 由来の赤色が減少し、その後の数か月

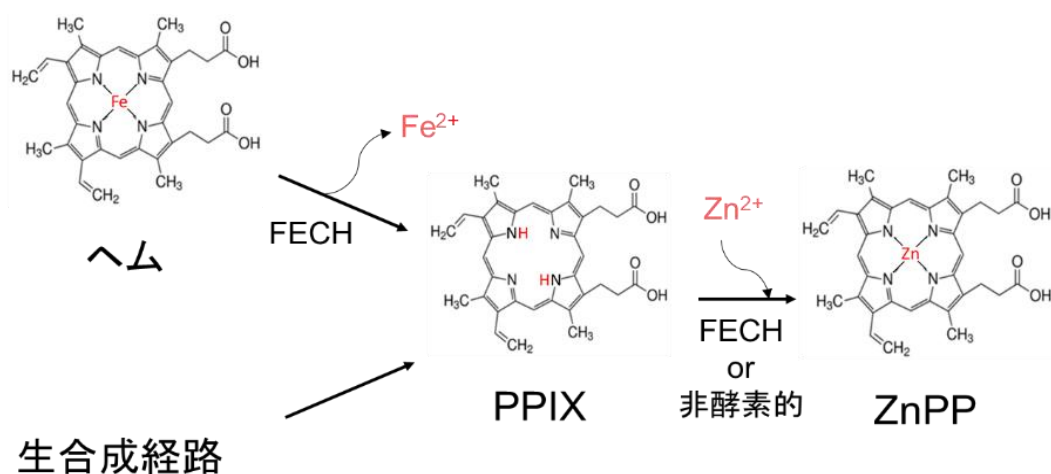
間の熟成期間を経て赤色色素が大量に形成される (Møller *et al.*, 2003)。この熟成中に形成される赤色色素は、塩漬肉色素であるニトロシルミオグロビンよりも光と熱に対して安定であり (Adamsen *et al.*, 2004)、吸光スペクトルと電子スピン共鳴スペクトル特性もニトロシルミオグロビンやオキシミオグロビン、メトミオグロビンとは異なっていた (Møller *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 1996)。その後、このパルマハム特有の赤色色素は亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) と同定された (Wakamatsu *et al.*, 2004a)。ZnPP の構造はヘムの構造と相似しており、ヘムはプロトポルフィリン IX (PPIX) の中心に鉄イオンが配位したものであるが、ZnPP は PPIX の中心に亜鉛イオンが配位したものである。パルマハム中のポルフィリン組成では、ZnPP がもっとも多く約 3 分の 2 を占めており、ヘムは約 3 分の 1、PPIX は微量に存在している (Taketani *et al.*, 2007; Wakamatsu *et al.*, 2009a)。乾塩漬生ハム中における ZnPP 形成量は、肉色の赤さの指標である  $a^*$  値と正の相関を示すことが複数の報告で示された (Adamsen *et al.*, 2006a; Bou *et al.*, 2018; Parolari *et al.*, 2016)。豚肉以外、七面鳥、羊、牛、馬、鶏肉などの異なる食肉にも ZnPP の形成能があり、食肉中の ZnPP 形成は畜種共通の特性であるようである (De Maere *et al.*, 2017)。一方、酸素を含まないガス充填包装や真空包装された生肉では ZnPP が数日間で形成されたことから、ZnPP 由来の蛍光は生肉の新鮮さの指標としても提唱されている (Courrol & Samad, 2018; Durek *et al.*, 2012; Pouzo *et al.*, 2016)。このため、ZnPP による発色は、豚に限らず、長期の熟成を行わない食肉製品にも応用できるかもしれない。加えて、ZnPP は光増感剤の 1 種としてよく知られている。*in vitro* 実験では ZnPP に光を照射すると、多量の活性酸素が形成され、グラム陽性菌の生育を抑制すること (Delcanale *et al.*, 2016)、ヘミンの存在下では活性酸素の形成を抑制して脂肪やタンパク質の酸化を防止すること (Becker *et al.*, 2011) などが報告された。これらの特性から、ZnPP が形成された食肉に光を照射することで肉塊外部のグラム陽性菌の

生育を抑制し、食肉内部の酸化を防ぐという亜硝酸塩の複数の機能を代替できる可能性もある。以上のことから、食肉中で形成される ZnPP には、亜硝酸塩無添加の食肉製品の色調改善に役立つだけでなく、多様な機能性が期待される。

食肉中の ZnPP 形成に関与する要因は豚肉ホモジネートを用いた ZnPP 形成モデルや肉塊で広く調べられている。パルマハムの製造において海塩が使われていることから、海塩中の微量成分がパルマハムの発色に関与することが推測されたが、乾塩漬生ハムにおいて塩の種類による ZnPP の形成量に違いはみられなかった (Wakamatsu *et al.*, 2009b)。また、塩の添加は肉塊では ZnPP の形成を促進することが報告されたが (Adamsen *et al.*, 2006a)、ZnPP 形成モデルでは低塩濃度で ZnPP の形成が促進され、過剰量の塩は ZnPP の形成を阻害した (Becker *et al.*, 2012; 本間, 2016; 奥井, 2006)。一方、亜硝酸塩の添加は肉塊と ZnPP 形成モデルともに ZnPP の形成を阻害し、その原因として亜硝酸塩から形成する NO が Mb と反応してニトロシルミオグロビンを形成し、Mb からのヘムの遊離を抑制した (Becker *et al.*, 2012)、あるいは ZnPP 形成に関与するとされる酵素であるフェロケラターゼ (FECH) の活性部位 [2Fe-2S] クラスターを破壊したことが推察された (Adamsen *et al.*, 2006a; Wakamatsu *et al.*, 2010)。好氣的条件下では、肉塊と ZnPP 形成モデル中の両者において ZnPP の形成が阻害された (Wakamatsu *et al.*, 2006; 2019) が、豚肝臓では好氣的および嫌氣的の両条件下で ZnPP が多量に形成された (Wakamatsu *et al.*, 2015)。しかし、酸素が骨格筋中の ZnPP 形成を阻害する機構はまだ明らかにされていない。また近年、特定の種類の細菌が ZnPP 形成モデルや発酵ソーセージ中の ZnPP 形成を促進することも報告されている (Asaduzzaman 2020; Khozroughi *et al.*, 2018; Wakamatsu *et al.*, 2020)。この機構として、細菌自身が ZnPP を形成するのではなく、食肉中の ZnPP 形成機構を促進することが示唆された (Asaduzzaman, 2020)。さらに、発酵ソーセージでは pH 4.9 以下では ZnPP が形成されなかった (De Maere *et al.*,

2017) が、ZnPP 形成モデル中の至適 pH は畜種によって異なり、pH 4.75–6.0 の範囲中に複数の至適 pH が存在する (青井, 2018; 本間, 2016)。ZnPP 形成の至適温度は、豚肉では 25–37°C であり (Akter, 2019; Wakamatsu *et al.*, 2007)、pH と温度特性は Chau ら (2010) が報告した FECH 活性の最適条件に近い。他にも脂肪酸、脂肪交雑度、タンパク質分解などが ZnPP の形成に関与していることが報告された (Bou *et al.*, 2018; 2020; Chau *et al.*, 2010; Grossi *et al.*, 2014)。以上のように、これまで多くの因子による ZnPP の形成量への影響が検討され、特に FECH の関与が示唆されているが、統合された研究がなく、他にも不明な部分が多いため、完全には明らかにされていない。

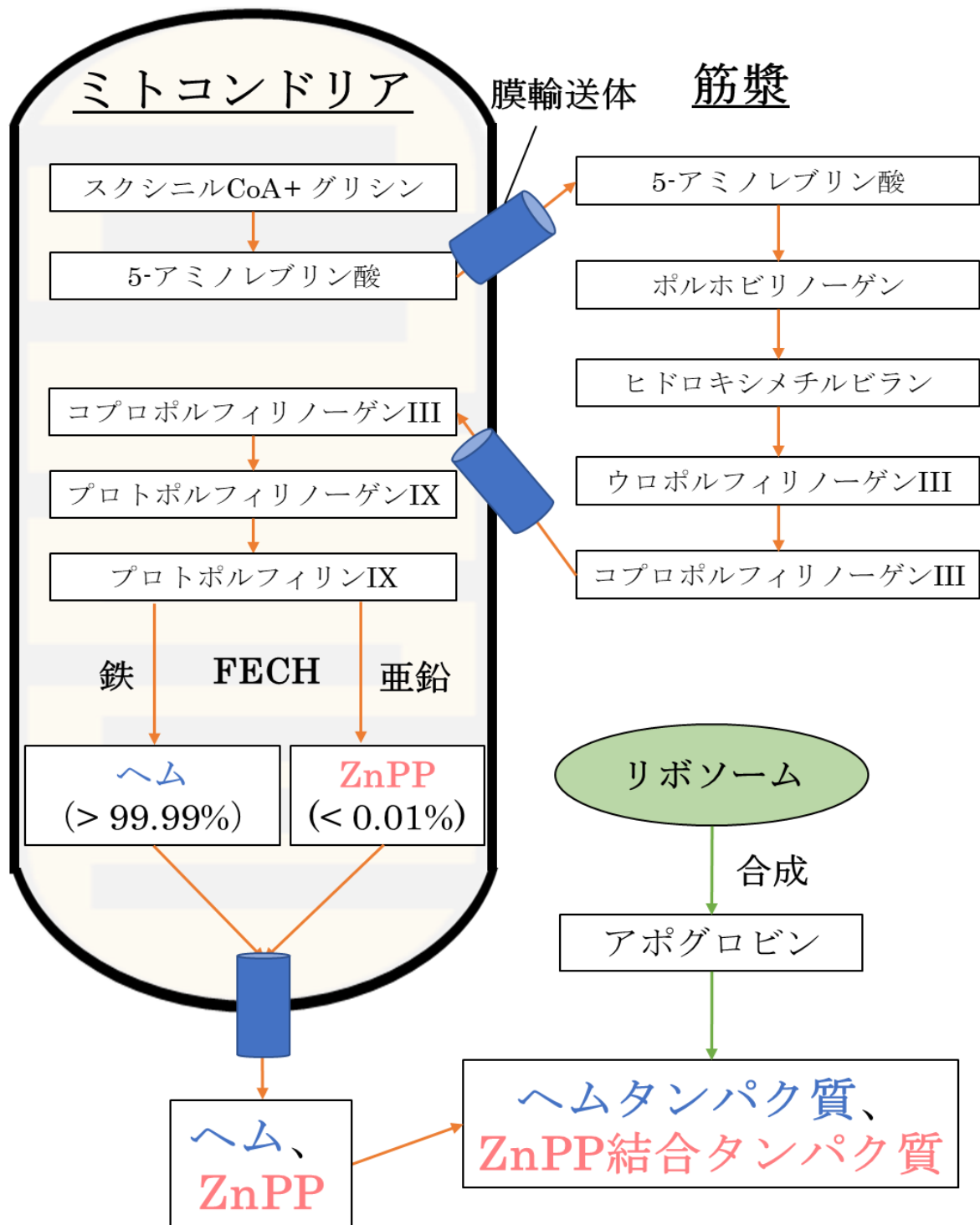
食肉中の ZnPP の形成については、現在 2 つの経路が提唱されている。この 2 つの経路の共通最終段階は、PPIX への亜鉛の挿入反応であり (Akter, 2019; Wakamatsu *et al.*, 2007)、FECH による酵素的だけでなく非酵素的にも起きる (Becker *et al.*, 2012)。しかし、PPIX の由来については異なっている。一つは、食肉中の内因性ヘムが FECH などにより脱鉄されて PPIX が形成される経路 (ヘム脱鉄経路) であり、もう 1 つはヘム生合成経路の中間産物である PPIX を由来とする経路 (生合成経路) である (Wakamatsu *et al.*, 2007) (第 1 図)。ヘム脱鉄経路を介した ZnPP の形成は、微生物によっても促進される (Asaduzzaman, 2020)。しかし、パルマハムなどの乾塩漬食肉製品中の ZnPP



形成において、ヘム脱鉄経路と生合成経路のいずれが主に関与しているかはまだ明らかにされておらず、これまで様々な研究が行われている。

前者のヘム脱鉄経路に関して、ヘムが脱鉄されて PPIX となり、亜鉛が挿入されて ZnPP が形成される反応は、ヘムタンパク質とヘムの標準品（ヘミン）を用いたモデルで観察され、この脱鉄反応は FECH が関与するという報告が多い（Chau *et al.*, 2011; Taketani *et al.*, 2007）。FECH によるヘムの脱鉄反応は ZnPP 形成の律速反応で、脱鉄反応の至適 pH は pH 5.5-6.0 と報告されている（Chau *et al.*, 2010）。一般に、と畜後の食肉の pH は速やかに pH 5.5-6.0 まで低下するにもかかわらず、パルマハム中の ZnPP は熟成前期ではなく、主に熟成後期に形成される（Adamsen *et al.*, 2006b; Grossi *et al.*, 2014）。この原因として、パルマハムの熟成期間中の Mb の分解に従って、ヘムと FECH との接触が徐々に増えて ZnPP 形成が促進されると提唱された（Grossi *et al.*, 2014; Paganelli *et al.*, 2016）。しかし、ZnPP 形成モデルにおいては、Mb の分解が観察されなかった（Khozroughi *et al.*, 2017）。さらに、ヘム脱鉄経路が食肉中で発生する場合、ZnPP の形成に伴うヘムの減少が観察されるはずであるが、これまでの報告では食肉中にこのようなポルフィリンの量的変化はみられなかった（Parolari *et al.*, 2016; Wakamatsu *et al.*, 2007）。以上のように、現在までのところ、食肉中におけるヘム脱鉄反応の発生は不明であり、FECH がどのようにヘムから脱鉄して PPIX を形成するのかは完全には解明されていない。

一方、後者の生合成経路については、食肉中の ZnPP はヘムからではなく、生体内の ZnPP 合成経路から形成されると提唱されている（Wakamatsu *et al.*, 2007）。生体内における ZnPP はヘムの合成の副産物であり、それらの合成経路を第 2 図に示す。Larsen ら（2012）により報告されたヘム生合成経路では、はじめにミトコンドリアにおいてスクシニル CoA とグリシンから 5-アミノレ



第2図 生体内のヘムと ZnPP 合成機構

ブリン酸が形成され、ミトコンドリア外膜に位置する輸送体を介して筋漿に移動する。そして、4つの反応を経てコプロポルフィリノーゲン III が形成され、再びミトコンドリア外膜の輸送体を介してミトコンドリア内部に移送される。コプロポルフィリノーゲン III はプロトポルフィリノーゲン IX を経て PPIX となる。その後、FECH により鉄が挿入されてヘムとなるが、亜鉛が挿入されれば ZnPP となる。正常個体ではこれらの割合は、ヘムが 99.99%以上を占め、ZnPP は 0.01%以下である (Labbé *et al.*, 1999)。形成されたヘムと ZnPP は、ミトコンドリア外膜の輸送体を介して筋漿に移送され、リボソームで合成されたグロビンと結合してヘムタンパク質と ZnPP 結合タンパク質を形成する (Larsen *et al.*, 2012)。生体内の鉄代謝異常な状態では、ヘムの形成量が減少し、ZnPP の形成量は大幅に増加する (Labbé *et al.*, 1999)。このため、死後筋肉である食肉では、生体とは大きく環境が異なり、生合成経路を介して形成される PPIX は FECH により亜鉛が挿入されて ZnPP が形成される可能性が考えられる。しかし、生合成経路におけるポルフィリン前駆物質および酵素類は極めて不安定であり、長期熟成したパルマハムにおいても働き続けるのか、パルマハム中に大量形成される ZnPP に相当する量の前駆物質含量が存在しているかは疑わしい。

近年、本研究室では豚肉中の ZnPP 形成機構を明らかにするために、乾塩漬生ハムの ZnPP 形成の形態学的な観察も行われてきた。総体的な観察では、パルマハムの外縁部には ZnPP の形成が観察されず、ZnPP は筋肉と脂肪の両方とも存在し、皮下脂肪と筋肉間脂肪の両方とも外縁部よりも中心部が多かった (Wakamatsu *et al.*, 2006)。この研究から、パルマハム内部の筋肉から ZnPP が形成された後、脂肪に転移することが示唆されたが、その後の顕微鏡観察により否定された。また、小型の乾塩漬生ハムにおいても同様に肉塊外縁部には ZnPP が観察されず、内部に一樣に ZnPP が観察され (下田, 2012)、いく

つかの筋肉では外縁と内部との間に特に強いリング状に ZnPP が観察された（尾崎, 2019）。酸素が ZnPP の形成を阻害すること（Wakamatsu *et al.*, 2007）から、乾塩漬生ハムの外部の ZnPP 形成は酸素の浸透により抑制され、内部は嫌気的な環境であるために ZnPP が形成されると示唆された。しかし、ZnPP リングの形成要因については未だ不明なままである。一方、顕微鏡下での観察では、乾塩漬生ハムにおいて ZnPP 形成能が強い筋線維と弱い筋線維の 2 種類が観察され、ZnPP 形成能が強い筋線維の局在は遅筋型筋線維の局在と一致した（下田, 2014; 尾崎, 2019）。また、乾塩漬生ハムの経時的な観察においては、ZnPP 形成能が強い筋線維と弱い筋線維ともに、熟成初期では筋線維内の顆粒状構造で ZnPP が形成され、熟成が進行すると、筋線維内部で一様に ZnPP が観察された。顆粒状に観察された蛍光がより強く、遅筋型筋線維により多く含まれ、水で抽出できなかった。一方で、筋線維内部に一様に観察された ZnPP の蛍光強度は弱く、筋線維間の違いはみられず、水で抽出可能であった（下田, 2012; 2014）。顆粒状に観察された ZnPP の局在は筋内膜に近づくほど多く、間接蛍光抗体法と透過型電子顕微鏡によりミトコンドリアであることが示唆され、FECH の局在とも一致した（下田, 2014）。しかし、尾崎（2019）は、ZnPP の自家蛍光の影響を受けており、ZnPP とミトコンドリアおよび FECH の明確な共局在を示すことができなかった。このため、筋線維中には遅筋型筋線維に多く含まれる顆粒状の不溶性 ZnPP と、筋線維型に依存せず筋線維中に一様に分布する水溶性 ZnPP の 2 種類の ZnPP 形態が存在していることが考えられるが、ZnPP の局在とミトコンドリア、FECH との関連性については未だに解明されていない。

一方、ZnPP 形成モデルでは、ZnPP の形成には異なる 2 種類の機構が存在していることが報告された（本間, 2016; Wakamatsu *et al.*, 2019）。1 つの機構は ZnPP 形成能はより高く、遅筋型筋線維の割合と正の相関を呈する遅筋型機構であり、もう 1 つの機構は ZnPP 形成能はより低く、形成量は筋線維型

に依存しない機構（非依存型機構）である。この 2 種類の ZnPP 形成機構のいくつかの特性が類似しており、ZnPP の形成には同様に豚肉中の不溶性成分、水溶性で 10 kDa 以上の成分、水溶性で 10 kDa 以下の成分が必要とされ (Akter, 2019)、0.1 M 以上の塩濃度、酸素、亜硝酸塩により抑制された (本間, 2016; 奥井, 2006)。一方、この 2 種類の ZnPP 形成機構で形成された水溶性の ZnPP 結合タンパク質の様相は異なることが示されたが (齋藤, 2018)、それらの結合タンパク質は明らかにされていない。このため、この 2 種類の ZnPP 形成機構を解明するためには、ZnPP 結合タンパク質を明らかにすることが手掛かりになるかもしれない。

そこで本研究では、食肉中における ZnPP 形成機構を解明するため、もっとも研究されている豚肉を研究対象とした。先行研究で提唱されている 2 つの PPIX 形成経路（ヘム脱鉄経路と生合成経路）は、食肉中の 2 つの ZnPP 形成機構（遅筋型機構と非依存型機構）と密接な関連性があるという仮説を立てた。ZnPP 形成の経路と機構の関連性を解明するため、第 2 章では、遅筋型機構と非依存型機構を再現した ZnPP 形成モデルを用い、ヘム脱鉄経路と生合成経路で異なる挙動を示すポルフィリンと鉄、亜鉛の量の推移を分析することで、ZnPP 形成の機構と経路との関係性を検証した。また、パルマハムでは水溶性 ZnPP 複合体が形成され、両モデルで形成される異なる水溶性 ZnPP 複合体との関連性が示された (齋藤, 2018)。そこで第 3 章では、パルマハムにおける ZnPP と結合する水溶性タンパク質を分離同定し、パルマハムにおける ZnPP 形成機構の推定を試みた。

## 第 2 章 ZnPP 形成モデルにおける鉄、亜鉛および各種ポルフィリン量の推移

### 第 1 節 緒論

豚肉ホモジネートを用いた ZnPP 形成モデルでは 2 種類の異なる ZnPP 形成機構が存在すると報告された (本間, 2014)。一つの機構では至適 pH が 4.75 であり、最適温度 37°C において ZnPP が多く形成され、遅筋型筋線維の割合と正の相関と示した (遅筋型機構)。もう 1 つの機構では至適 pH が 5.5 であり、最適温度 25°C において、ZnPP はもともと形成するが、遅筋型機構と比べると形成量は少なく、筋線維型の割合に依存しない (非依存型機構)。この 2 種類の ZnPP 形成機構を調べるために、それぞれ棘下筋 (IS: *infraspinatus*) と最長筋 (LTL: *longissimus thoracis et lumborum*) を用いたモデル (IS モデルと LTL モデル) を確立した (本間, 2014; Wakamatsu *et al.*, 2004b; 2007)。IS モデルでは、Mb の分解が起こり、外因性 Mb の添加は ZnPP 形成を促進したため、Mb は ZnPP 前駆物質の 1 つであり、ヘムを提供して ZnPP を形成することが示唆されたが、インキュベーション期間にヘムの減少はみられなかった (Akter, 2019; 本間, 2016)。一方、LTL モデルでは、Mb の分解と外因性 Mb 添加による ZnPP 形成の促進効果が観察されず (Akter, 2019; 本間, 2016)、ヘムの量的変化がなく、インキュベーション期間に ZnPP の増加に伴ってポルフィリンの総量が増加した (Wakamatsu *et al.*, 2007)。しかし、この 2 種類の ZnPP 形成機構の具体的な反応経路は未だに明らかにされていない。

一方、豚肉中における ZnPP 形成の最終段階は、PPIX に亜鉛が FECH による酵素的、および非酵素的挿入されることが報告された (Becker *et al.*, 2012)。ZnPP 形成に主に寄与している酵素的反応については、FECH の基質である二価鉄や亜鉛が FECH 内部の活性部位である [2Fe-2S] に結合後、PPIX

も同様に FECH 内部に進入し、PPIX の構造を歪ませて二価鉄や亜鉛が挿入され、それぞれヘムと ZnPP を形成する (Medlock *et al.*, 2007; Senge *et al.*, 2015)。二価鉄と亜鉛は FECH の活性部位を競合しており、二価鉄がキレートされると、ZnPP の形成は促進される (Camadro & Labbe, 1982)。過量の亜鉛は不競合阻害で FECH の活性を抑制する (Davidson *et al.*, 2009)。一方、豚肉中の非酵素的に PPIX に亜鉛の挿入反応は、酵素反応ほど重要ではないが、ZnPP の形成に一部が寄与している (Becker *et al.*, 2012)。この研究では PPIX に亜鉛が挿入される非酵素反応は可逆反応であり、亜鉛が PPIX より遙かに多い場合は、平衡状態では約 50% の PPIX が ZnPP を形成することを報告した。しかし、食肉中での PPIX の形成経路はまだ明らかにされていない。

食肉中の PPIX の形成経路は、ヘム脱鉄経路と生合成経路の 2 種類の仮説が提唱された (Chau *et al.*, 2011; Wakamatsu *et al.*, 2007)。ヘム脱鉄経路に関しては、ヘムは FECH により脱鉄されて PPIX を形成する反応がヘミンを用いたモデルで観察された (Chau *et al.*, 2011; Taketani *et al.*, 2007)。FECH の脱鉄反応には、NADH と  $b_5$  レダクターゼによりヘミンがヘムに還元される必要があり (Taketani *et al.*, 2007)、その還元作用はアスコルビン酸で代替可能である (Chau *et al.*, 2011)。ヘムの脱鉄反応の至適 pH は 5.5–6.0 であり (Chau *et al.*, 2010)、食肉の pH と同程度であるため、食肉中でヘム脱鉄反応が発生する可能性を示した。しかし、筋線維中では FECH はミトコンドリアの内膜に局在しており、筋漿内の Mb の分布とは異なるため (Larsen *et al.*, 2012; Ramanathan *et al.*, 2020)、FECH と Mb の接触は容易ではない。加えて、ヘムが FECH の活性部位に触媒されるためには、ヘムが完全に FECH 内部に進入する必要がある (Medlock *et al.*, 2007)。ヘムは Mb の内部にある疎水ポケット内に埋没し、ヘムの中心に配位する鉄はグロビンとも配位結合しているため (西邑, 2011)、立体障害の関係で FECH と Mb 中のヘムとは接触することができない。このため、FECH が Mb の疎水ポケットに位置するヘム

に対して、どのように脱鉄操作を行うのかは未だ不明である。一方、生合成経路に関しては、食肉中では ZnPP の形成に伴い、ヘムと ZnPP の総量が増加したこと (Parolari *et al.*, 2016; Wakamatsu *et al.*, 2007) から、食肉中の ZnPP はヘムからではなく、生体内のように 5-アミノレブレン酸などの前駆物質から PPIX が形成され、亜鉛が挿入されて ZnPP を形成することが提唱されている。PPIX への親和力は亜鉛が二価鉄より高いが、生体内では二価鉄はより直接的に FECH と接触できるため、主にヘムが合成される (Senge *et al.*, 2015)。しかし、生体内が異常な状態、例えば鉄不足や鉄の還元能の低下、鉄の代謝異常の状態では、ヘムの形成量が減少し、ZnPP の形成量は大幅に増加する (Labbé *et al.*, 1999)。また、死後筋肉である食肉では生体とは大きく環境が異なり、嫌氣的解糖により pH は 5.5–6.0 に下がる (服部, 2011)。この pH では豚由来の FECH は PPIX に二価鉄を挿入する活性がないが (Porra & Jones, 1963)、亜鉛を挿入する活性がある程度で残っている (Chau *et al.*, 2011)。以上のことから、生合成経路を介して形成される PPIX は FECH により亜鉛が挿入されて ZnPP が形成される可能性が考えられる。しかし、ZnPP 形成モデルに、PPIX 生合成経路の最初の中間物質である 5-アミノレブリン酸の添加はポルフィリン類の形成が促進されず、生合成経路における全ての反応が起こらないことが示唆された (林, 2009)。以上のように、食肉中の ZnPP 形成のヘム脱鉄経路と生合成経路が提唱されているが、各々疑問点が数多く残っており、実際の現象を示しているとは言えないであろう。

そこで本章では、豚肉における ZnPP 形成の遅筋型機構と筋線維型非依存機構の具体的な形成経路を明らかにするために、2 種類の ZnPP 形成機構を観察できる IS モデルと LTL モデルを用いた。ヘム脱鉄経路が発生する場合はヘム鉄の減少と非ヘム鉄の増加が起こり、生合成経路が発生する場合は総ポルフィリン量は増加すると考えられる。そこで、2 つの経路共通の PPIX に挿入する亜鉛の推移を加え、両モデル中の鉄、亜鉛関連物質およびポルフィリン含量

の経時的変化を測定した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 第 1 項 実験材料

チルド豚部分肉（北海道産）から最長筋（LTL）および棘下筋（IS）を採取し、脂肪および結合組織を切除してミンチし、小分けして真空包装後、使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

### 第 2 項 試薬の調製

#### (1) 標準溶液

ZnPP (Sigma Aldrich) 10 mg をジメチルホルムアミド (DMF, 関東化学) に溶解して 50 mL にメスアップした。PPIX (Sigma Aldrich) 10 mg を少量の濃塩酸を添加した DMF に溶解後、DMF で 50 mL にメスアップした。ヘミン (Sigma Aldrich) 10 mg を少量の 5% アンモニウム溶液に溶解後、DMF で 50 mL にメスアップした。各標準溶液を調製後、遮光下で冷凍保存 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) した。

#### (2) 亜鉛測定試薬

亜鉛測定試薬の調製は Makino らの方法 (1982) を一部改変して行った。すなわち、0.2 M 炭酸緩衝液 (pH 9.8)、10 mM dimethylglyoxime (99.5% エタノール溶液)、680 mM クエン酸ナトリウム、2.5 mM 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]phenol (5-Br-PAPS)、超純水を 50 : 20 : 25 : 1 : 4 の比例で混合し、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (3) HPLC 溶離液

1 M 酢酸アンモニウム (和光純薬工業) を調製し、酢酸で pH 5.16 となるように調整した。メタノール (HPLC 用, 和光純薬工業) と酢酸アンモニウム溶

液を 86:14 の比例で混合し、メンブレンフィルター（孔径 0.2  $\mu\text{m}$ , 東洋ろ紙）でろ過したものを、HPLC 溶離液とした。

### 第 3 項 ZnPP 形成モデル試料の調製

Akter の方法（2019）に従って、LTL と IS モデル試料を調製した。すなわち、解凍した LTL または IS 肉に 4 倍量の超純水を加え、氷冷しながら 10,000 rpm で 2 分間ホモジナイズ（CELL MASTER CM-100, アズワン）した。抗生物質を終濃度がペニシリン G カリウム（和光純薬工業）70  $\mu\text{g/mL}$ 、ストレプトマイシン硫酸塩（和光純薬工業）100  $\mu\text{g/mL}$ 、ゲンタマイシン（和光純薬工業）50  $\mu\text{g/mL}$  となるように添加した後、1 M 塩酸を用いて LTL モデルでは pH 5.5 に、IS モデルでは pH 4.75 に調整した。試験管に分注後、酸素吸収剤（A-500 HS, アイ・エス・オー）と共にハイバリア専用保存袋（アズワン）に入れて密封し、LTL モデルは 25°C、IS モデルは 37°C で嫌氣的にインキュベートしたものをモデル試料とした。

### 第 4 項 分析方法

#### (1) 非ヘム鉄濃度の測定

Ahn らの方法（1993）を一部改変して行った。モデル試料 3.5 mL、1 M クエン酸リン酸緩衝液（pH 5.5）0.3 mL、1 M 塩酸を含む 0.5 M アスコルビン酸 0.2 mL を混合し、室温で 30 分間インキュベートした後、11.3%トリクロロ酢酸 2 mL を加えて遠心分離（25°C, 16,200  $\times$  g, 20 分間）した。その後、上清液をろ紙（No. 2, 東洋ろ紙, 東京）でろ過した。ろ液 2 mL、10%酢酸アンモニウム 0.45 mL と 0.5 mM 1,10-phenanthroline 0.55 mL を混合し、室温で 30 分間インキュベート後、分光光度計（UV-1800, 島津製作所）を用いて 510 nm の吸光度を測定した。鉄標準液（和光純薬工業）により作成した検量線により非ヘム鉄濃度を算出し、モル濃度で示した。

## (2) 比色法による総亜鉛濃度の測定

Makino らの亜鉛比色測定法 (1982) に従って行った。上記モデル試料 1 mL に、11.3%トリクロロ酢酸 1 mL を加えて遠心分離 ( $16,200 \times g$ , 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) し、上清液を採取した。上清 0.25 mL に、11.3%トリクロロ酢酸 0.125 mL、超純水 0.125 mL、29 mM サリチルアルドキシム 0.5 mL と亜鉛測定試薬 2 mL を混合し、室温で 30 分間反応後に分光光度計 (UV-1800) を用いて 554 nm の吸光度を測定した。亜鉛標準液 (和光純薬工業) により作成した検量線により総亜鉛濃度を算出し、モル濃度で示した。

## (3) 逆相クロマトグラフィー (RP-HPLC) によるポルフィリンの定量

Wakamatsu らの方法 (2009a) に従って行った。モデル試料 1 mL に 9 mL のポルフィリン抽出液 (酢酸エチル:酢酸 = 4:1) を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間抽出した後、よく混合したものを、遠心分離 ( $1,460 \times g$ , 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した。得られた上清に等量の HPLC 溶離液を加え、シリンジフィルター (孔径  $0.45 \mu\text{m}$ , Minisart RC4, Sartorius) でろ過し、HPLC に供試した。以上の操作は遮光下で行った。HPLC システムは Prominence (島津製作所)、UV-Vis 検出器は SPD-20A、分光蛍光検出器は RF-10A XL、カラムは STR ODS II ( $4.6 \times 150 \text{ mm}$ , 粒径  $5 \mu\text{m}$ , 信和化学工業) を用いた。HPLC の設定は第 1 表のように行った。ZnPP と PPIX 含量は各々の標準溶液で作成した検量線を用いて算出し、モル濃度で示した。このため、ZnPP と ZnPP に結合した亜鉛の濃度は同じ値を示す。

第 1 表 HPLC の設定

| 項目                  | 設定                  |
|---------------------|---------------------|
| 流速                  | 1.0 mL/分            |
| 注入量                 | 10 $\mu$ L          |
| カラム温度               | 35°C                |
| アウトプット (UV-Vis 検出器) | 400 nm              |
| アウトプット (分光蛍光検出器)    |                     |
| ZnPP 検出波長           | 励起 420 nm、蛍光 590 nm |
| PPIX 検出波長           | 励起 400 nm、蛍光 630 nm |
| ゲイン                 | $\times 4$          |
| 感度                  | 高                   |
| レコーダー出力レンジ          | 1                   |

#### (4) 分解法による総鉄・総亜鉛量の測定

鈴木と安井のマイクロ波湿式分解法(1997)に従って、モデル試料を分解した。すなわち、モデル試料 5 g を PFA 内部小容器 (DV-7, 三愛科学) に量り取り、230°C のサンドバスを用いて溶液を乾固させた。そして、濃硝酸(和光純薬工業) 2 mL、60%過塩素酸(和光純薬工業) 0.3 mL、濃塩酸(和光純薬工業) 0.15 mL の順に加えた。密封した DV-7 を PTFE 製試料容器 (PT-25, 三愛科学) に入れ、さらに PT-25 をポリプロピレン製外筒 (PP-25, 三愛科学) に入れ、トルクレンチとバイスにより 18 N・m で締め付けて密封した。試料を入れた 3 個の PP-25 を 50 mL 以上の純水を入れたビーカーと共に電子レンジに入れ、出力 210 W で 3 分間加熱した。その後、ビーカーのみを取り出し、再び 210 W で 3 分間加熱した。電子レンジから PP-25 を取り出し、10 分間室温で静置して放冷させた後、ゆっくりとレンチとバイスで開封し、230°C のサンドバスで内容物を乾固させた。残渣を 2%硝酸 5 mL に溶解させ、総金属測定液とした。

総鉄量および総亜鉛量の測定は、上述の非ヘム鉄濃度および総亜鉛濃度の比色法により行った。なお、総鉄量の測定では測定液の pH を 3.5–4.0 に、総亜鉛量では pH を 9.0–9.5 になるように 5 N 水酸化ナトリウムで調整した。

#### (5) ヘム量の測定

##### (a) 直接法

岡山と永田の方法(1979)に従って行った。すなわち、モデル試料 2 mL から終濃度が 1%塩酸、75%アセトンとなるような溶液 10 mL を調製し、遮光下で 4°C に静置して 30 分間抽出した。そして、4°C で 2,600 × g、10 分間遠心分離した後、上清液を採取し、沈殿物に再び 10 mL の 1%塩酸を含む 75%アセトンを加えて 1 回目と同様に抽出した。各抽出液をそれぞれ 383 nm の吸光度を測定し、ヘミンで作成した検量線からヘム含量を算出した。なお、物質

量の推移を評価するため、モル濃度で示した。このため、ヘムとヘム鉄のモル濃度は同じ値を示す。

#### (b) 分解法

小島と安井の方法 (1993) に従って行った。すなわち、モデル試料 4 mL から終濃度が 0.7%塩酸、80%アセトンとなるように溶液 20 mL を調製し、4°C の暗室で 1 時間抽出した。その後、遠心分離 (4°C, 16,200 × g, 20 分間) した上清液 10 mL を、超純水 10 mL と混合してプレセップ- C18 カラム (和光純薬工業) を通過してヘムを吸着させ、0.35%塩酸を含む 40%アセトン溶液 5 mL、2%塩酸 5 mL の順にカラムを洗浄し、0.7%塩酸を含む 80%アセトン溶液 20 mL によりヘムを溶出した。溶出液を第 3 項 (4) のように溶媒を蒸発させて分解後、総鉄量の測定を行った。ヘム鉄の含量は鉄標準液で作成した検量線により算出した。なお、物質量の推移を評価するため、モル濃度で示した。このため、ヘムとヘム鉄の濃度は同じ値を示す。

### 第 5 項 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。R-3.5.1 統計処理ソフトウェア (2018 The R Foundation for Statistical Computing) を用いて一元配置分散分析を行い、Tukey の多重比較検定によって有意差検定を行った。 $P < 0.05$  をもって統計学的に有意であるとした。

## 第3節 結果

### 第1項 標準品を用いた総鉄・総亜鉛量測定法の検証

総鉄・総亜鉛量測定法は正確に測定できることを検証するため、ヘミン、ZnPP などの鉄と亜鉛関連物質の標準品を用いて総金属量の測定を行った（第2表）。これらの標準品から良好な回収率が得られ、変動係数も大きくなかった。このため、総金属量の測定結果の正確さが示された。

### 第2項 ZnPP 形成モデル中の金属イオンおよびポルフィリンの推移

次に、IS と LTL モデルを行って ZnPP を形成させ、それらの鉄、亜鉛関連物質およびポルフィリン含量の経時的变化を測定した。

鉄関連物質の量的推移に関しては、まず、ヘムの直接法、非ヘム鉄および総鉄の測定を行った（第3表、試験1）。IS モデルでは有意にヘム鉄の減少と非ヘム鉄の増加が認められた。LTL モデルではヘム鉄が増え続けたが、非ヘム鉄では有意な違いは観察されなかった。また、インキュベート前の IS モデルのヘム鉄の量は LTL モデルのものよりもおよそ 3.4 倍高かった。両モデルとも 0 日目におけるヘム鉄は総鉄の 60–70% ほどを占め、ヘム鉄と非ヘム鉄の合計は総鉄と同等であった。また、インキュベートに伴い、ヘム鉄と非ヘム鉄の和は増加する傾向がみられた。ところで、ヘムの直接法による測定では、測定対象物が温度や光により容易に変色するため、ヘム鉄含量を過大評価する可能性がある（岡山と永田, 1979）。このため、試験1で用いたヘムの直接法の代わりにヘムの分解法を用い、非ヘム鉄と総鉄は同様の測定法を用いて行った（第3表、試験2）。なお、サンプリング誤差を検証するため、総鉄の経時的測定を行った。IS モデルでは5日目が0日目と比べてヘム鉄が有意に減少して非ヘム鉄が有意に増加し、試験1と同じ傾向を示した。0日目のヘム鉄と非ヘム鉄の合計は総鉄と概ね同等であり、ヘム鉄の割合は 65% を占めた。一方、LTL モ

第2表 異なる標準品による総金属量測定法の検証

| 標準品    | 回収率(%) | 変動係数 (%) |
|--------|--------|----------|
| ヘミン    | 99.8   | 3.4      |
| ヘモグロビン | 97.8   | 3.2      |
| 亜鉛イオン  | 99.3   | 4.3      |
| ZnPP   | 94.6   | 3.5      |

全ての標準品の分析は  $n = 3$  で行った。

第3表 ZnPP 形成モデルにおける鉄関連物質含量の推移 (nmol/g 肉)

|     | インキュベート<br>期間 (日) | 試験 1                     |                          |             | 試験 2                       |                          |             |
|-----|-------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|----------------------------|--------------------------|-------------|
|     |                   | ヘム鉄 (直接法)                | 非ヘム鉄                     | 総鉄          | ヘム鉄 (分解法)                  | 非ヘム鉄                     | 総鉄          |
| IS  | 0                 | 137.2 ± 6.0 <sup>a</sup> | 60.7 ± 2.3 <sup>c</sup>  | 185.3 ± 2.6 | 135.4 ± 7.2 <sup>a</sup>   | 75.2 ± 1.1 <sup>c</sup>  | 209.1 ± 6.6 |
|     | 5                 | 117.8 ± 1.1 <sup>b</sup> | 109.3 ± 2.8 <sup>b</sup> | -           | 101.3 ± 9.0 <sup>b</sup>   | 113.1 ± 1.7 <sup>b</sup> | 227.3 ± 5.1 |
|     | 10                | 108.1 ± 1.8 <sup>c</sup> | 136.3 ± 4.7 <sup>a</sup> | -           | 124.3 ± 10.3 <sup>ab</sup> | 121.7 ± 1.7 <sup>a</sup> | 215.2 ± 7.4 |
| LTL | 0                 | 40.6 ± 0.4 <sup>c</sup>  | 27.0 ± 2.0               | 53.6 ± 2.2  | 85.6 ± 1.8 <sup>a</sup>    | 22.1 ± 1.7 <sup>c</sup>  | 71.2 ± 10.1 |
|     | 5                 | 54.0 ± 1.5 <sup>b</sup>  | 35.6 ± 4.7               | -           | 94.5 ± 9.2 <sup>a</sup>    | 31.8 ± 1.7 <sup>b</sup>  | 86.3 ± 5.1  |
|     | 10                | 66.7 ± 2.3 <sup>a</sup>  | 28.8 ± 3.4               | -           | 67.3 ± 3.9 <sup>b</sup>    | 38.2 ± 0.0 <sup>a</sup>  | 69.0 ± 5.7  |

数値は平均値 ± 標準誤差を示す (n = 3)。abc: 同じモデルの同一測定法内の異なる文字間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

デルの測定結果では、ヘム鉄は 10 日目が 5 日目より有意に減少してインキュベート期間に非ヘム鉄が有意に増加し、直接法と比べると逆の結果が得られた。また、インキュベート前のヘム鉄と非ヘム鉄の合計は総鉄より高くなり、ヘム鉄の割合は約 80%であった一方、IS モデルのヘム量は LTL モデルのものよりもおよそ 1.6 倍高かった。また、総鉄の経時的変化は有意な違いがみられなかったが、試験 1 と同一調製試料であったけれども、サンプリング日毎に 20% ほどの誤差が見られ、安定しなかった。

亜鉛関連物質に関して、前述の試験 1 で測定した ZnPP と総亜鉛量を示す（第 4 表）。ZnPP 中の亜鉛量は、両モデルともにインキュベートに伴って増加したが、IS モデルは LTL モデルと比べて形成量が多かった。総亜鉛含量は、両モデルとも測定法による濃度の違いがみられず、IS モデルの量は LTL モデルのものよりもおよそ 2 倍高かった。また、10 日間のインキュベート後の LTL モデルと IS モデルでは、総亜鉛量のうちに、僅か 0.3%、2.4%しか ZnPP の形成に使われなかった。

ポルフィリン量に関して、前述した直接法（試験 1）と分解法（試験 2）で測定したヘム量、PPIX、ZnPP およびそれらの総量を示した（第 5 表）。試験 1 では IS モデルの PPIX の形成が観察されたが、ヘム量と ZnPP 量と比べて極めて微量であった。一方、LTL モデルでは、試験 1、2 でも ZnPP は形成したが、その形成量はヘムと比べて著しく低く、ヘム量ならびに総ポルフィリン量の標準誤差よりも小さい値であった。また、PPIX 量はインキュベート期間中を通して検出限界以下であった。試験 1、2 の両モデルともに総ポルフィリン量はヘム量に大きく依存したため、総ポルフィリン量の変化傾向はヘム量とは同じであった。

第4表 ZnPP 形成モデルにおける亜鉛関連物質の推移 (nmol/g 肉)

|     | インキュベーション期間 (日) | ZnPP 中の亜鉛              | 総亜鉛          |              |
|-----|-----------------|------------------------|--------------|--------------|
|     |                 |                        | 比色法          | 分解法          |
| IS  | 0               | N.D.                   | 508.6 ± 20.1 | 536.0 ± 11.9 |
|     | 5               | 12.2 ± 4.0             | 495.9 ± 11.7 | -            |
|     | 10              | 13.2 ± 2.1             | 515.1 ± 33.0 | -            |
| LTL | 0               | N.D.                   | 255.7 ± 4.5  | 275.3 ± 7.5  |
|     | 5               | 0.2 ± 0.1 <sup>b</sup> | 257.1 ± 7.4  | -            |
|     | 10              | 0.2 ± 0.1 <sup>b</sup> | 254.9 ± 6.9  | -            |

数値は平均値 ± 標準誤差を示す (n = 3)。N.D.: 検出限界以下を示す。ab: 同じモデルの同一測定法内の異なる文字間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

第5表 ZnPP 形成モデルにおけるポルフィリン含量の推移 (nmol/g 肉)

| インキュベ<br>ート期間<br>(日) |    | 試験 1        |                        |                          |                           | 試験 2     |                        |                            |                           |
|----------------------|----|-------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                      |    | PPIX        | ZnPP                   | ヘム<br>(直接法)              | 総ポル<br>フィリン               | PPIX     | ZnPP                   | ヘム<br>(分解法)                | 総ポル<br>フィリン               |
| IS                   | 0  | N.D.        | N.D.                   | 137.2 ± 6.0 <sup>a</sup> | 137.2 ± 6.0 <sup>a</sup>  |          | N.D.                   | 135.4 ± 7.2 <sup>a</sup>   | 135.4 ± 7.2 <sup>a</sup>  |
|                      | 5  | 0.04 ± 0.05 | 12.2 ± 4.0             | 117.8 ± 1.1 <sup>b</sup> | 130.1 ± 3.7 <sup>ab</sup> | 測定<br>せず | 2.3 ± 0.5 <sup>b</sup> | 101.3 ± 9.0 <sup>b</sup>   | 103.6 ± 8.9 <sup>b</sup>  |
|                      | 10 | 0.02 ± 0.02 | 13.2 ± 2.1             | 108.1 ± 1.8 <sup>c</sup> | 121.3 ± 2.0 <sup>b</sup>  |          | 7.0 ± 1.3 <sup>a</sup> | 124.3 ± 10.3 <sup>ab</sup> | 131.3 ± 10.4 <sup>a</sup> |
| LTL                  | 0  | N.D.        | N.D.                   | 40.6 ± 0.4 <sup>c</sup>  | 40.6 ± 0.4 <sup>c</sup>   |          | N.D.                   | 85.6 ± 1.8 <sup>a</sup>    | 85.6 ± 1.8 <sup>a</sup>   |
|                      | 5  | N.D.        | 0.2 ± 0.1 <sup>b</sup> | 54.0 ± 1.5 <sup>b</sup>  | 54.2 ± 1.5 <sup>b</sup>   | 測定<br>せず | 0.8 ± 0.1 <sup>b</sup> | 94.5 ± 9.2 <sup>a</sup>    | 95.3 ± 9.2 <sup>a</sup>   |
|                      | 10 | N.D.        | 0.7 ± 0.0 <sup>a</sup> | 66.7 ± 2.3 <sup>a</sup>  | 67.4 ± 2.3 <sup>a</sup>   |          | 1.3 ± 0.1 <sup>a</sup> | 67.3 ± 3.9 <sup>b</sup>    | 68.6 ± 3.8 <sup>b</sup>   |

数値は平均値 ± 標準誤差を示す (n = 3)。N.D.: 検出限界以下を示す。abc: 同じモデルの同一測定法内の異なる文字間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ )。

## 第 4 節 考察

### 第 1 項 IS モデルの ZnPP 形成機構

IS モデルでは、インキュベートによる ZnPP の形成に従い、ヘム鉄の減少、非ヘム鉄の増加、ならびに微量の PPIX 形成が観察された（第 3、5 表）。ヘム鉄の減少と非ヘム鉄の増加は、ヘム脱鉄反応による PPIX の形成が示唆された。豚肉中のヘムは主に Mb として存在しているが（Hazell, 1982）、IS モデルでは Mb は ZnPP 形成の前駆物質であり、Mb の著しい分解が観察された（Wakamatsu *et al.*, 2019）。Mb の疎水性ポケットの破壊により多量の遊離ヘムが形成され、ヘム脱鉄経路における重要酵素である FECH との接触が促進されたのかもしれない。以上のことから、IS モデルでは Mb が分解されて形成した遊離ヘムがヘム脱鉄経路を介して PPIX を形成したことが示唆された。

IS モデルでは、インキュベートを通して微量の PPIX しか観察されず、ZnPP より遥かに少なかった（第 5 表）。IS モデルでは ZnPP の由来は PPIX に亜鉛が挿入されて形成された（Akter, 2019）ことから、ヘムの脱鉄反応から形成された PPIX のほとんどが速やかに ZnPP に形成したと考えられる。PPIX への亜鉛イオンの挿入反応は、FECH による酵素反応と非酵素反応の両方が寄与している（Becker *et al.*, 2012）が、酵素反応が主要な反応である（大屋, 2015）。また、微量の PPIX が形成されたが、蓄積が観察されなかったため、ヘムから PPIX の脱鉄反応は律速反応である可能性がある。Chau ら（2010）もヘムから ZnPP の形成では、律速反応はヘムから PPIX に形成する脱鉄反応であり、PPIX への亜鉛の挿入反応ではないと報告しており、この結果を支持するものである。以上のことから、IS モデルにおける ZnPP 形成の律速反応は、主に FECH により触媒される PPIX への亜鉛の挿入反応ではなく、遊離したヘムからの脱鉄反応であることが示唆された。

IS モデルで形成された ZnPP の結合亜鉛量は総亜鉛量と比べて極めて少なかった（第 4 表）。豚肉中では遊離状態の亜鉛はほぼ存在せず、水溶性亜鉛はアルブミン、酵素、小分子キレート剤などに結合し（Hazell, 1982）、他にも一部の亜鉛はミトコンドリアの膜（Camadro *et al.*, 1984）などの不溶性のものに局在している。このため、ZnPP の形成にはこれらのものに弱く結合している亜鉛を利用したと考えられる。また、キレート剤により遊離亜鉛を不足させた場合は、ZnPP の代わりに PPIX が蓄積する（Wakamatsu *et al.*, 2019）が、IS モデルでは PPIX の蓄積がみられなかった。豚心臓やネズミ肝臓のミトコンドリアを純化し、Mb とともにインキュベートすると、PPIX の大量蓄積がみられ、外因性亜鉛の添加が ZnPP の形成を促進した（Ishikawa *et al.*, 2007; Taketani *et al.*, 2007）。これらの研究では、ミトコンドリア純化の処理過程に他の亜鉛源が除かれたため、亜鉛不足になり、PPIX が蓄積したと考えられる。一方、亜硝酸塩無使用の塩漬豚肉や ZnPP 形成モデルでは PPIX の形成がみされず、亜鉛の添加によって ZnPP の形成を阻害した（Adamsen *et al.*, 2006a; Becker *et al.*, 2012）。この原因は過量の亜鉛は不競合阻害で FECH の活性を抑制した（Davidson *et al.*, 2009）ためと思われる。以上のことから、形成された PPIX に速やかに挿入されたため、残存の PPIX は微量であったと考えられる。

以上のことから、IS モデルでは、Mb の分解により多量遊離ヘムが産生され、律速反応と思われる脱鉄反応が起こって PPIX を形成した後、豊富に存在する亜鉛が速やかに PPIX に挿入されて ZnPP を形成すると推察された。

## 第 2 項 LTL モデルの ZnPP 形成機構

LTL モデルでは、ヘム鉄、非ヘム鉄、ヘム量に大きく依存している総ポルフィリン量と比べて、ZnPP の形成量は極めて微量であった（第 3、5 表）。これまでに、LTL モデルのインキュベーション期間にヘムの量的変化がなく、ZnPP の

形成により総ポルフィリン量が増加したことから、生合成経路から形成した PPIX に亜鉛が挿入されて ZnPP を形成すると提唱された (Wakamatsu *et al.*, 2007)。試験 1 ではこれと合致したが、試験 2 では矛盾した結果が得られた。Wakamatsu ら報告 (2007) では LTL モデルの 5 日間インキュベート後、約 4 nmol/g 肉の ZnPP を形成し、総ポルフィリン量の約 13% を占めたが、本研究の 10 日間のインキュベートで形成した ZnPP は総ポルフィリン量の約 1% までにとどまっていた。ZnPP 形成量は微量であり、ヘムや総ポルフィリン量の誤差よりも小さく、ZnPP の変化量をヘム量などから説明することはできなかった。また、ポルフィリンの測定法も違っており、ZnPP 形成能の低さは原因不明であるが、前駆物質含量や酵素活性などの因子に違いが生じた可能性がある。このため、LTL モデル中の ZnPP 形成量が少なかったため、PPIX の由来経路を明らかにできなかった。

LTL モデルでは PPIX 含有量は検出限界以下であった (第 5 表) が、ZnPP が蓄積した。LTL モデルの pH 5.5 では、PPIX に亜鉛イオンの挿入反応はヘムから脱鉄する反応より著しく速い (Chau *et al.*, 2011)。このため、LTL モデルでは PPIX に亜鉛は速やかに挿入され、律速反応ではないと考えられる。また、LTL モデルでは ZnPP 中の亜鉛が総亜鉛に占める割合が極めて低かった (第 4 表) ため、ZnPP の形成には亜鉛の量は十分であることが示された。また、LTL モデル中の PPIX に亜鉛の挿入反応は FECH 触媒反応および非酵素的反応の両方とも重要であることが報告された (大屋, 2015)。このため、LTL モデルでは PPIX に亜鉛の挿入反応は、豊富な亜鉛源を持ち、FECH による酵素的反応と非酵素的反応の両方が寄与し、ZnPP 形成の律速反応ではなく、PPIX が形成されるまでが律速反応であることが示唆された。

本章では、LTL モデルにおける ZnPP の形成量は極めて少なく、また、ZnPP の前駆物質である PPIX は生合成経路を支持する結果とヘム脱鉄経路を支持する結果の両方が得られたため、PPIX の形成経路を明らかにできなかった。

一方、形成された PPIX への亜鉛イオンの挿入反応には、豊富な亜鉛源を持ち、FECH 触媒反応および非酵素的の挿入反応の両方とも寄与していることが示唆された。インキュベーション期間を通して PPIX 量は検出限界以下であったことから、LTL モデルにおける ZnPP 形成は、PPIX までの形成が律速で重要であることが示唆された。

### 第 3 章 パルマハムにおける水溶性 ZnPP 結合タンパク質の同定

#### 第 1 節 緒論

パルマハム中の水溶性 ZnPP は、ZnPP 分子に水溶性タンパク質が結合して水溶化されると考えられている (Møller *et al.*, 2007; 奥村, 2013; 齋藤, 2018)。パルマハム中の水溶性 ZnPP の割合は約 ZnPP 総量の 40–80%を占め、筋肉や個体によって幅があるが、低 pH では水溶性 ZnPP の割合が減少する相関がみられた (阿部, 2020)。乾塩漬生ハムでは、不溶性の ZnPP は筋線維中のミトコンドリアに主に存在し、水溶性 ZnPP は筋線維中に一様に弱く分布していることが報告された (下田, 2012; 2014)。しかし、パルマハム中の不溶性の ZnPP の存在状態は明らかにされていないだけでなく、水溶性 ZnPP 結合タンパク質についてもまだ明らかにされていないため、結合状態の解明は、ZnPP の形成機構や経路の解明に重要であると考えられる。

パルマハム中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質の特性はいくつか報告されている。等電点は 6.5–7.0 付近であり (山崎, 2007; 林, 2009; 奥村, 2011)、飽和硫酸濃度 70–90%の範囲で沈殿するが、ZnPP も解離する (山崎, 2007)。また、SDS などの界面活性剤の添加によっても ZnPP が解離すること (小林, 2008; 林, 2009) も報告されている。さらに、ZnPP 結合タンパク質は陽イオンクロマトグラフィーにより少なくとも 4 種類が存在していることも報告された (奥村, 2013)。水溶性 ZnPP の分子量に関して、Adamsen ら (2006b) は SEC-HPLC を用いて 20 と 51 kDa と推定し、51 kDa の方はパルマハムの熟成期間に伴って形成したと報告した。小林 (2008) も限外ろ過により 30–50 kDa であることを示した。これらの報告から、パルマハム中の主要な水溶性 ZnPP 結合タンパク質の等電点は中性付近で、高濃度硫酸で析出し、分子量は約 30–50 kDa と示されたが、未だ同定されていない。

食肉中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質は SEC-HPLC から得られた候補の分子量、ヘムの結合性などから Mb と Mb 二量体であると考え、Mb 内のヘムの鉄が FECH により亜鉛に置換されて ZnPP-Mb 複合体を形成すると提唱された (Adamsen *et al.*, 2006b; Khozroughi *et al.*, 2019) が、いずれも直接的な証拠がなかった。一方、Mb の ZnPP 複合体は、ZnPP と Mb 標準品を用いた *in vitro* の実験系で形成される (de Jong *et al.*, 2004; Feitelson & Spiro, 1986)。しかし、これらの標準品を用いた研究では、Mb の ZnPP 複合体の形成は FECH によって触媒されたのではなく、Mb を酸性 (pH 4.3 以下) や高濃度の尿素 (5.4 M) などの極端な条件下でヘムを遊離させて Apo-Mb を形成させた後、ZnPP と反応させて ZnPP-Mb 複合体を作成した。しかし、食肉やパルマハムなどでは、このような極端な条件が起こるとは考えにくく、FECH がどのように Mb の疎水ポケットに位置するヘムの金属置換を触媒するのかは疑わしい。さらに、推定されたパルマハム中の ZnPP 結合タンパク質の分子量 (Adamsen *et al.*, 2006b; 小林, 2008) は Mb よりも大きかった。このため、パルマハム中で形成された水溶性 ZnPP 複合体は、ZnPP 分子が主に Mb 以外の水溶性タンパク質に結合しているかもしれない。

そこで本研究では、パルマハム中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質を同定するために、様々なクロマトグラフィーおよび電気泳動法の組み合わせによりパルマハム水抽出液 (PHE) から ZnPP 結合タンパク質候補を純化し、N 末端アミノ酸配列分析により同定した。同定したタンパク質を免疫沈降法およびウェスタンブロッティング (WB) 分析に供し、ZnPP との結合を検証した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 第 1 項 実験材料

異なる 3 個体から製造されたパルマハム原木（14–18 か月間熟成, Corte Buona 社と Disossatura Prosciutti 社, 除骨済み）を使用した。パルマハム原木から約 2 cm の厚さのスライスを切り出し、大腿四頭筋（QF）、大腿二頭筋（BF）、半膜様筋（SM）、半腱様筋（ST）の 4 つの筋肉を採取した。これらの脂肪および結合組織を切除後、フードプロセッサーを用いて細切し、小分けして真空包装した後、使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。ZnPP 標準品は第 2 章で調製したものを使用した。

### 第 2 項 水溶性タンパク質の抽出

小分けしたパルマハム細切品を解凍後、4 倍量の超純水を加え、ホモジナイザー（セルマスター CM-100, アズワン、またはヒスコトロン NS-42, マイクロテック・ニチオン）を用いて氷冷下で 10,000 rpm、2 分間ホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離（ $38,900 \times g$ , 30 分間,  $4^{\circ}\text{C}$ , himac CS100, 日立工機）した後、得られた上清液をろ紙（No. 2, 東洋ろ紙）を用いてろ過し、得られたろ液をパルマハム水抽出液（PHE）とした。

### 第 3 項 サイズ排除クロマトグラフィー（SEC-HPLC）

HPLC システムは Prominence（島津製作所）、UV-Vis 検出器は SPD-20A、分光蛍光検出器は RF-10AXL を用いた。SEC カラム（TSKgel G3000PW,  $7.5 \times 300 \text{ mm}$ , 東ソー）を用い、分析前に予め移動相（0.9% NaCl を含む 10 mM クエン酸-リン酸緩衝液（pH 5.5））で平衡化した。HPLC 試料は、サンプルと移動相を等量混合し、メンブレンフィルター（Minisart RC4, 孔径  $0.45 \mu\text{m}$ , Sartorius）でろ過したものを使用した。HPLC の設定条件は第 6 表に示した。

第 6 表 SEC-HPLC の設定

| 項目                  | 設定                                 |
|---------------------|------------------------------------|
| 流速                  | 0.5 mL/分                           |
| 注入量                 | 10 $\mu$ L                         |
| カラム温度               | 40°C                               |
| アウトプット (UV-Vis 検出器) |                                    |
| 検出波長                | 280 nm                             |
| 強度単位                | Volt                               |
| AUX レンジ             | 0.5 AU/V                           |
| レコーダー出力レンジ          | 0.0050                             |
| アウトプット (分光蛍光検出器)    |                                    |
| 検出波長                | 励起 420 nm、蛍光 590 nm                |
| ゲイン                 | $\times 4$                         |
| 感度                  | 高                                  |
| レコーダー出力レンジ          | 1                                  |
| フラクションコレクター         |                                    |
| (12.5–17.5 分に回収の場合) |                                    |
| Valve open          | 12.5                               |
| Initial vial        | 12.5–17.0 分の 0.5 分間<br>ずつで 0-9 に設定 |
| Valve close         | 17.5                               |

分取画分の濃縮を行う場合は遠心エバポレーター (CVE-2000, 東京理化機械) を用いた。なお、分子量の検量線の作成では、ウシ血清アルブミン (66 kDa, Sigma Aldrich)、オボアルブミン (43 kDa, ナカライテスク)、ウマ心臓ミオグロビン (17 kDa, ナカライテスク)、ウシ肺アプロチニン (7 kDa, 和光純薬工業)、ヒトアンジオテンシン (1 kDa, ペプチド研究所) を用いた。

#### 第 4 項 陽イオン交換クロマトグラフィー (CIEX)

##### (1) 試料の調製

PHE をサンプルとする場合は 1 M クエン酸を用いて pH 5.0 に調整した。HIC 回収画分をサンプルとする場合は透析チューブ (36/32, 積水マテリアルソリューションズ) に入れて 5 L の超純水を 3 回交換して一晩透析したものを、200 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) と 9 : 1 で混合した。

##### (2) CIEX 分離

CIEX カラム (Toyopearl CM-650 M, 1.5 × 9 cm, 東ソー) は分析前に予め 20 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) により平衡化した。試料を供試後、20 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) 60 mL で洗浄し、吸着成分を 400 mL の NaCl による直線的濃度勾配 (0→0.3 M) で溶出させた。流速は 1.0 mL/分で、フラクションコレクター (Pharmacia LKB RedFrac, Pharmacia) を用いて 5 分毎に回収した。分離画分の蛍光強度 (励起: 420 nm/蛍光: 590 nm) および蛍光スペクトル (励起: 420 nm) は蛍光分光光度計 (RF-5300PC, 島津製作所) を用いて測定した。

#### 第 5 項 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)

##### (1) 試料の調製

約 60 mL の PHE と等量の 0.2 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.5) を混合

し、乳鉢で粉碎した 29.16 g 硫安（40%飽和硫安濃度，関東化学）を、ゆっくりと添加して溶解させた。その後、この溶液を遠心分離（4°C, 38,900 × g, 30 分間）し、上清液をシリンジフィルター（ナイロン，直径 25 mm, 孔径 0.45 μm, Membrane Solutions）でろ過したものを HIC 試料とした。

## (2) HIC 分離

HIC カラム（Toyopearl Butyl-650 M, 3 × 12.5 cm, 東ソー）は分析前に予め 1.8 M 硫安を含む 20 mM クエン酸-リン酸緩衝液（pH 5.0）を用いて平衡化した。HIC 試料を供試後、1.8 M 硫安を含む 20 mM クエン酸-リン酸緩衝液（pH 5.0）180 mL で洗浄し、硫安の段階的濃度勾配（1.5 → 1.0 → 0 M 硫安を含む 20 mM クエン酸-リン酸緩衝液（pH 5.0））各 180 mL により吸着成分を溶出させた。流速は 1.5 mL/分で、分取間隔は 5 分間とした。分離画分の蛍光強度（励起: 420 nm/蛍光: 590 nm）および蛍光スペクトル（励起: 420 nm）は蛍光分光光度計（RF-5300PC）を用いて測定した。

## 第 6 項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

### (1) 電気泳動用試料の調製

SDS-PAGE 用試料処理液は、40%グリセリン、4%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、500 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 6.8）、0.3%クマシーブリリアントブルーR-250（CBB）となるように調製した。サンプルと試料処理液を等量混合し、還元剤使用の場合は 2-メルカプトエタノールを 5%になるように添加し、均一に混合した後、ヒーティングブロックを用いて 100°C で 5 分間加熱し、処理したサンプルは SDS-PAGE 試料として 4°C で保存した。

### (2) ゲルの調製

SDS-PAGE は、Laemmli の方法（1970）に従って行った。ゲルの調製は電

電気泳動装置 (AE-6530P, アトー) の取扱説明書に従って行った。分離ゲル (10% または 20% アクリルアミド、0.1% SDS、375 mM Tris-HCl (pH 8.8)) を調製後、速やかに縦 100 mm、横 120 mm のゲルプレート (間隙 1.0 mm, アトー) に注ぎ、水を重層した後、室温で 1 時間静置してアクリルアミドを重合させた。次に、重層した水を除いた分離ゲル上に、濃縮ゲル (4.5% アクリルアミド、0.1% SDS、125 mM Tris-HCl (pH 6.8)) を注ぎ込んで、14 レーンのコームを差し込み、室温で 1 時間静置してアクリルアミドを重合させた。ゲルは使用するまで 4°C で保存した。

### (3) 電気泳動

作製したゲルを電気泳動装置に設置し、SDS-PAGE 泳動バッファー (25 mM トリス, 192 mM グリシン, 0.1% SDS) を陽極槽と陰極槽に入れて気泡を除いた後、SDS-PAGE 試料は 2–20  $\mu$ L ずつ、分子量マーカー (Multicolor III, フナコシ) は 3  $\mu$ L 供試した。泳動は室温で、ゲル 1 枚あたり 10 mA で 30 分間泳動後、20 mA で 90 分間行った。

### (4) ゲルの染色および脱色

ポリアクリルアミドゲルの CBB 染色については、泳動後のゲルをプラスチック箱に入れ、RO 水でゲルを 3 回洗浄後、約 50 mL の CBB 染色液 (0.025% CBB, 30% メタノール, 10% 酢酸) を添加し、室温で 1 時間振とうして染色した。その後、染色液を除いて RO 水でゲルを 3 回洗浄後、約 50 mL の脱色液 (30% メタノール, 10% 酢酸) を加え、室温で一晩振とうして脱色した。一方、銀染色については、Ez Stain Silver (アトー) の取扱説明書に従って行った。染色したゲルの撮影は、画像撮影装置 (ChemiDoc XRS Plus System, Bio-Rad) を用いて行った。

## 第 7 項 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE)

### (1) 試料の調製および電気泳動

第 6 項に示した SDS-PAGE の試料処理液、ゲル、泳動バッファーから SDS を除いたものを用いて調製した。ゲルのアクリルアミド濃度は、分離ゲルでは 10%、濃縮ゲルでは 4.5%となるように調製した。試料は実験直前に調製し、試料処理液と等量混合後、実験条件に応じて終濃度 1% 2-メルカプトエタノールを添加した。ゲルを電気泳動槽に設置し、泳動バッファー (25 mM トリス, 192 mM グリシン) を陽極槽と陰極槽に入れた後、試料 15  $\mu$ L を供試した。電気泳動は 4°C で 1 枚あたり 10 mA で 30 分間行った後、20 mA で 90 分間行った。

### (2) 蛍光像および明視野像の撮影

紫色 LED およびデジタルカメラを用いた ZnPP 自家蛍光の検出法 (Wakamatsu *et al.*, 2006) を一部改変して行った。紫色 LED (OSSV5111A, OptoSupply) を 10.16 mm 間隔で 5 個直列に取り付け、電流は 2 つの定電流ダイオード (10 mA CRD, E103) を並列に組み込んで制御した。これを 9 列並列につなげ、合計 45 個を基板に取り付けた照明装置を 2 個使用した。それぞれに 420 nm 付近の波長を透過するシートタイプのバンドパスフィルター (BPB-42, 富士フィルム) を装着したものを ZnPP の励起光源とした。電力供給は 24 V、1 A の AC アダプターを介して行った。

電気泳動ゲルの明視野像および蛍光像の撮影は、泳動直後のガラス板に挟んだ状態で、第 7 表の条件に設定したデジタルカメラ (D3300, ニコン) を用いて行った。非染色の明視野像は、白板上で撮影した。蛍光像は、デジタルカメラに 600 nm 付近を透過するシートタイプのバンドパスフィルター (BPB-60, 富士フィルム) を装着して 2 個の紫色 LED 照明装置を 45 度の左右対称で、中心の高さが約 15 cm になるよう、黒い板に載せたガラス板に均一に照射し

第 7 表 デジタルカメラの設定

| 項目        | 設定                |
|-----------|-------------------|
| 撮影モード     | マニュアル             |
| 画質モード     | JPEG (FINE)       |
| 画素数       | 4496 × 3000       |
| 撮影感度      | 明視野像 : ISO 400    |
|           | 蛍光像 : ISO 1600    |
| ホワイトバランス  | 明視野像 : Daylight   |
|           | 蛍光像 : Fluorescent |
| 絞り        | f/8               |
| 露出補正      | 0.0               |
| レンズ・ゲル距離  | 20 cm             |
| 焦点距離      | 55 mm             |
| シャッタースピード | 明視野像 : 1/160 s    |
|           | 蛍光像 : 30 s        |
| 評価測光      | マルチパターン測光         |
| フォーカスモード  | MF (soft)         |

ながら撮影した。

## 第 8 項 尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動（尿素-PAGE）

### （1）試料の調製

尿素-PAGE 試料処理液は 100 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 6.8）、8 M 尿素、30%グリセリン、0.2% CBB R-250 となるように調製して常温で保存した。サンプルと試料処理液を等量混合後、終濃度 1%となるように 2-メルカプトエタノールを添加したものを尿素-PAGE 試料とした。尿素-PAGE 試料は電気泳動直前に調製した。

### （2）ゲルの調製

分離ゲル（4 M 尿素を含む 10%アクリルアミド）は、30%アクリルアミド溶液（29.2%アクリルアミド、0.8% N,N'-メチレンビスアクリルアミド）、8 M 尿素を含む 0.75 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.8）および純水を 2:3:1 の割合で混合し、この溶液 18 mL に対して 10%過硫酸アンモニウム（APS）70  $\mu$ L および N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）10  $\mu$ L を添加した。その後、速やかに縦 100 mm、横 120 mm のゲルプレート（間隙 1.0 mm）に注ぎ、水を重層した後、室温で 1 時間静置してアクリルアミドを重合させた。濃縮ゲル（4 M 尿素を含む 4.5%アクリルアミド）は、30%アクリルアミド溶液、8 M 尿素を含む 0.25 M トリス-塩酸緩衝液（pH 6.8）と純水を 3:10:7 の割合で混合し、この溶液 6 mL に対して 10% APS 20  $\mu$ L および TEMED 10  $\mu$ L を添加した。その後、重層した水を除いた電気泳動プレートに注ぎ込み、14 レーンのコームを差し込んで、室温で 1 時間静置してアクリルアミドを重合させた。ゲルは使用するまで 4°C で保存した。

### (3) 電気泳動

ゲルを電気泳動槽に設置して泳動バッファー (25 mM トリス, 192 mM グリシン) を陽極槽と陰極槽に入れ、サンプルを 15  $\mu$ L ずつ供試した。電流は 5 mA で 1 時間、その後 20 mA で 1 時間、4°C で泳動を行った。

## 第 9 項 ウェスタンブロッティング (WB) 分析

### (1) PVDF 膜への転写

転写溶液として、転写 A 溶液 (300 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 20%メタノール)、転写 B 溶液 (25 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 20%メタノール)、転写 C 溶液 (25 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 20%メタノール, ホウ酸で pH 9.5 に調整した) を調製して室温で保存した。泳動後のポリアクリルアミドゲルの転写範囲を決めた後、転写範囲と同じ大きさの PVDF 膜 (GE ヘルスケア) 1 枚、ろ紙 (No. 2, 東洋ろ紙) または画用紙を 6 枚切り出した。PVDF 膜は 5 分間メタノールに浸漬して親水化処理した後、転写 B 溶液に 1 時間浸漬した。ろ紙は転写 A、B、C 溶液にそれぞれ 2、1、3 枚ずつ、1 時間浸漬した。転写前に転写範囲のゲルを切り出して転写 C 溶液に 5 分間浸漬した。転写にはセミドライ式転写システム (AE-6677, アトー) を用いた。下の陽極側から転写 A 溶液を含むろ紙 2 枚、転写 B 溶液を含むろ紙 1 枚、PVDF 膜、ゲル、転写 C 溶液を含むろ紙 3 枚の順に重ねて、気泡を除いた後、定電流 2 mA/cm<sup>2</sup> で 30 分間、室温で転写を行った。

### (2) 免疫染色および検出

転写後の PVDF 膜をプラスチック箱に入れ、2%スキムミルク (雪印メグミルク) を加え、室温で 50 rpm、2 時間振とうしてブロッキングした。その後、検出する目標タンパク質に応じて、抗 Mb 抗体 (10,000 倍希釈, ヤギポリクローナル, Bethyl Laboratories) と西洋ワサビペルキオキシダーゼ (HRP) 標識

二次抗体（15,000 倍希釈，抗ヤギ IgG, SeraCare Life Sciences）、抗ヘモグロビン（Hb）抗体（7,000 倍希釈，ウサギポリクローナル, Cloud-Clone Corp.）と HRP 標識二次抗体（20,000 倍希釈，抗ウサギ IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories）、または抗ピルビン酸キナーゼ（PK）抗体（1,000 倍希釈，ウサギポリクローナル, Proteintech. Inc.）と HRP 標識二次抗体（5,000 倍希釈，抗ウサギ IgG）の組み合わせを使用した。一次抗体反応は 4°C で 50 rpm、14 時間振とうさせて行い、二次抗体反応は 4°C で 50 rpm、2 時間振とうさせて行った。免疫染色の全工程において、溶液を交換する毎に、洗浄液（0.1% Tween 20 を含む PBS）で 5 分間の洗浄を 3 回ずつ行った。検出は、PVDF 膜を化学発光溶液（ケミルミワン L, ナカライテスク）と 1 分間反応させ、画像撮影装置（ChemiDoc XRS Plus System）を用いて行った。

#### 第 10 項 N 末端アミノ酸配列分析

第 6 項の SDS-PAGE 分離後のゲルを、第 9 項（1）の方法で PVDF 膜に転写し、ボンソーS 溶液（0.1%ボンソーS を含む 5%酢酸溶液）を用いて室温で 5 分間染色した後、7%酢酸で 3 回脱色した。目標のバンドを洗浄なメスで切り出して、0.2 M 水酸化ナトリウムで脱色し、PBS で 3 回洗浄したものをアミノ酸配列分析用試料とした。N 末端アミノ酸配列分析（Procise 492HT, Perkin Elmer）は北海道大学創成研究機構の機器分析受託サービスにて行った。検出した N 末端アミノ酸配列を blastP データベース (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) における *sus scrofa* に存在するタンパク質と照合して同定した。

#### 第 11 項 免疫沈降

免疫沈降は Bio-Rad 社の磁気ビーズ（SureBeads）を用いて取扱説明書に従って行った。はじめに、均質化した磁気ビーズ（PK と Hb の場合は protein

A 結合ビーズ、Mb と Alb の場合は protein G 結合ビーズを用いた) 100  $\mu$ L を 1.5 mL 遠心チューブに移し、一次抗体を 10  $\mu$ g 相当量添加した。PBS で 200  $\mu$ L に希釈し、室温でマイクロチューブミキサー (MT-360, トミー精工) を用いて目盛り 5 で 20 分間振とうした。その後、1 mL の洗浄液 (0.1% Tween 20 を含む PBS) を加えて混合後、専用の磁石ラックで磁気ビーズを集めてマイクロピペットで洗浄液を除く洗浄工程を 3 回繰り返した。PHE 250  $\mu$ L と PBS 250  $\mu$ L の混合液を添加して室温で 2 時間振とうした。再び 1 mL の洗浄液で 3 回洗浄した後、洗浄液を除き、沈殿物に 75%アセトン 300  $\mu$ L を加えて、4°C で 30 分間の ZnPP の抽出を行った。抽出液をマイクロ蛍光セル (FM20, ジーエルサイエンス) に入れて、蛍光分光光度計 (RF-5300PC) により蛍光スペクトル (Ex: 420 nm, バンド幅 Ex/Em: 20/20 nm) を測定した。

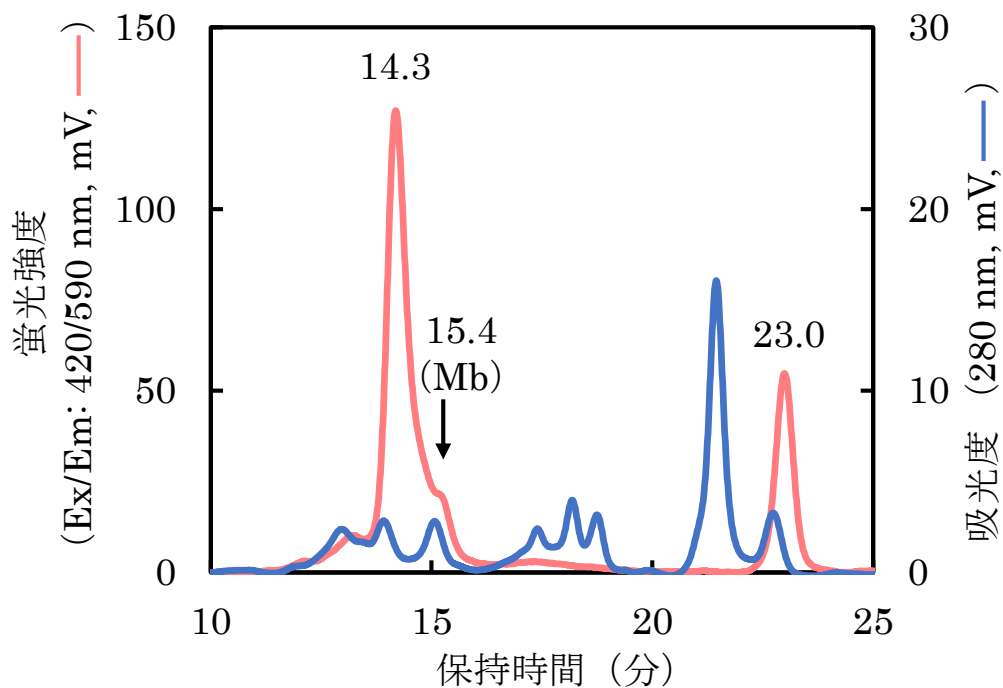
### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 各種クロマトグラフィーを用いた ZnPP 結合タンパク質候補の分離と同定

##### (1) SEC-HPLC を用いた分離

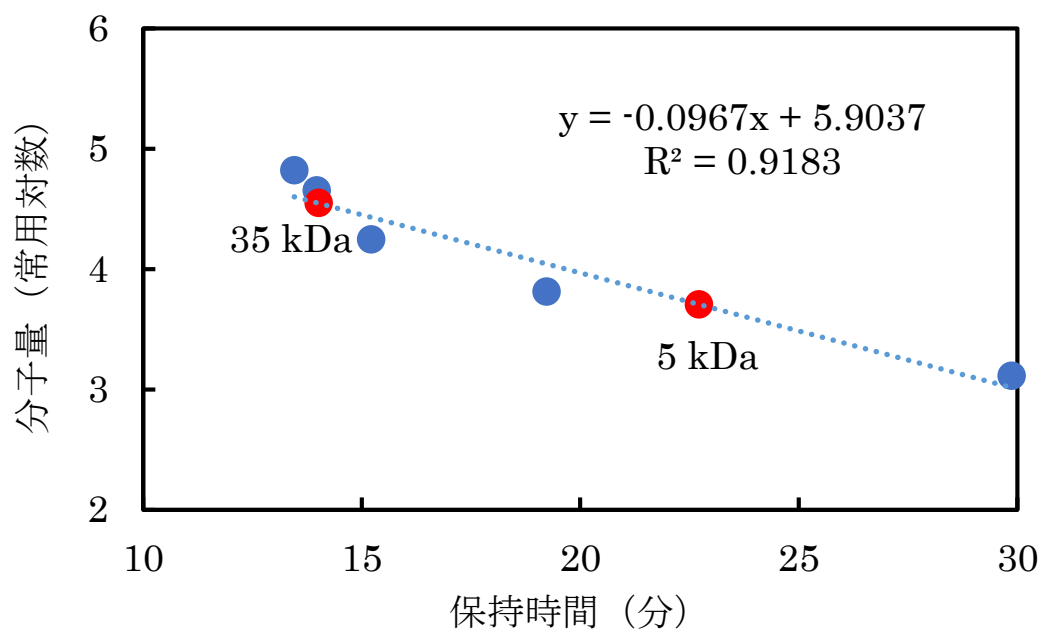
SEC-HPLC を用いて PHE を分離したところ、蛍光検出（励起: 420 nm／蛍光: 590 nm）においては 14.3 分および 23.0 分の溶出時間に 2 つの主要なピークと 15.4 分に小さな肩ピークが検出された（第 3 図）。一方、タンパク質の吸光検出波長（280 nm）では、2 つの主要の蛍光ピークに対応する単一の吸光ピークが観察されなかったが、小さい蛍光肩ピークに対応する吸光ピークが観察され、その保持時間は Mb 標準品と一致した。検量線を作成して 2 つの主要蛍光ピークの分子量を推定したところ、14.3 分に溶出したピークは 35 kDa、23.0 分に溶出したピークは 5 kDa の分子量に相当した（第 4 図）。この 2 つの主要なピークを回収して蛍光スペクトルを測定したところ、35 kDa の蛍光物質では ZnPP に特徴的な 588 nm を極大とするピークを示した（第 5 図 A）。しかし、5 kDa の蛍光物質では ZnPP の特徴的なピークが観察されず、ピークが 500 nm より短い波長の強い蛍光で、588 nm まで及んでいることが観察された（第 5 図 B）。そのため、35 kDa 蛍光物質は ZnPP 結合タンパク質由来であるが、5 kDa の蛍光物質は ZnPP 由来ではなく、不純物由来と考えられた。

ZnPP 結合タンパク質候補を絞るために、SEC-HPLC の 12.5–17.5 分の溶出時間から 0.5 分間ずつ回収した画分を SDS-PAGE に供試したが、タンパク質濃度が低く、感度が高い銀染色でも ZnPP 結合タンパク質の候補は観察されなかった（データ示さず）。また、高濃度の PHE は粘度が高いため、大量供試できなかった。SEC-HPLC のサンプル供試量上限は 50  $\mu$ L と限られているため、サンプルを多く供試できる充填カラムを試みた。



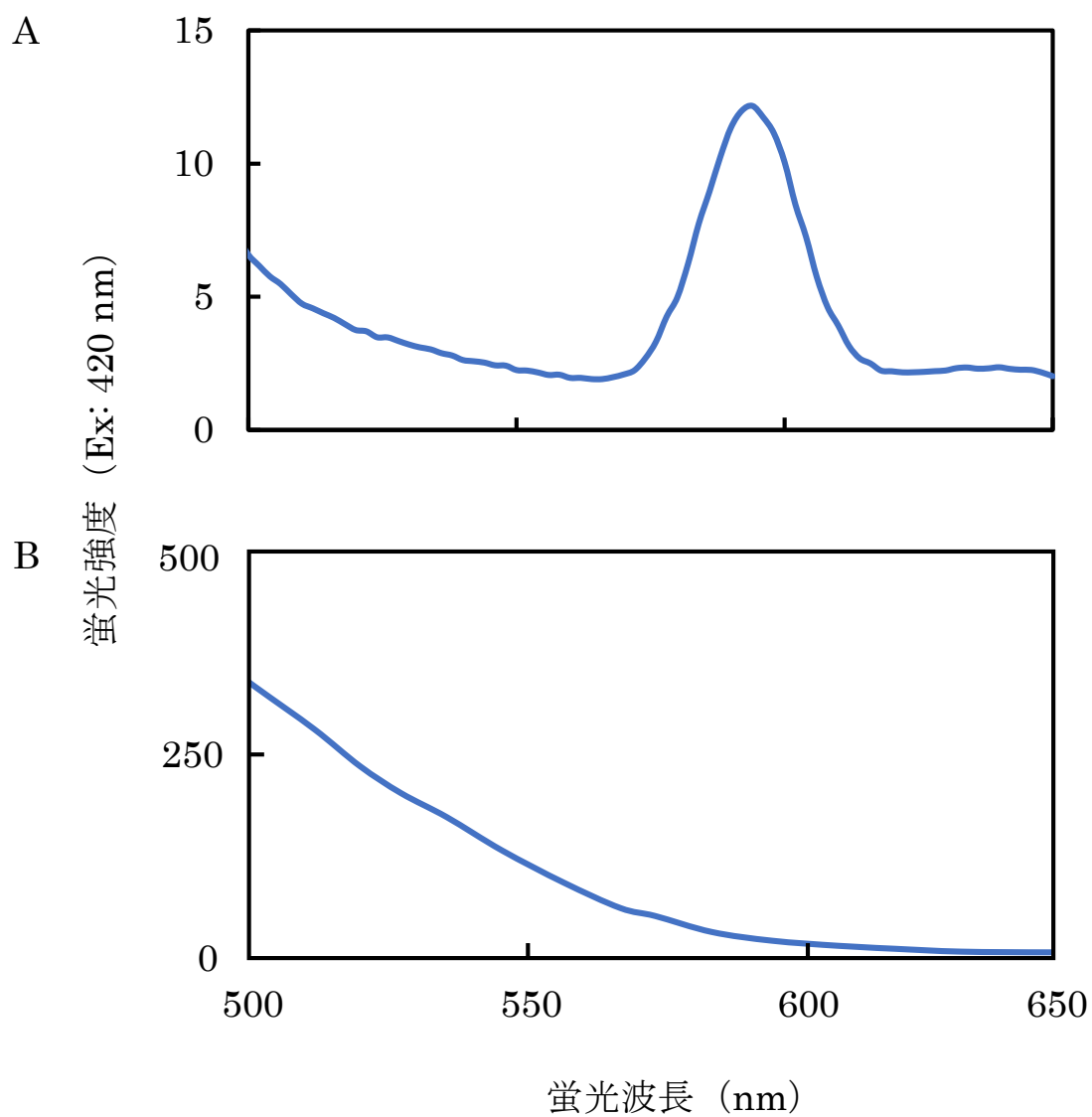
第3図 SEC-HPLC による PHE の分離像

PHE を SEC-HPLC カラム (TSKgel G3000PW, 7.5 × 300 mm) に供試して、流速 0.5 mL/分で分離した。蛍光強度 (Ex/Em: 420/590 nm, —) および吸光度 (280 nm, —) を測定した。主要な蛍光ピークの保持時間と Mb の溶出位置を示す。



第4図 SEC-HPLC による PHE を分離した蛍光物質の分子量推定

各種標準品 (● :ウシ血清アルブミン (66 kDa)、オボアルブミン (43 kDa)、ウマ心臓ミオグロビン (17 kDa)、ウシ肺アプロチニン (7 kDa)、ヒトアンジオテンシン (1 kDa)) を用い、第3図と同様に SEC-HPLC に供して、280 nm におけるピークの溶出時間から分子量の検量線を作成し、第3図で検出された2つの主要な蛍光ピーク (●) の分子量を推定した。標準品から得られた検量線とその近似式および算出された2つの蛍光ピークの分子量を示す。



第 5 図 PHE を SEC-HPLC により分離した 35 kDa (A) と 5 kDa (B) 蛍光物質の蛍光スペクトル

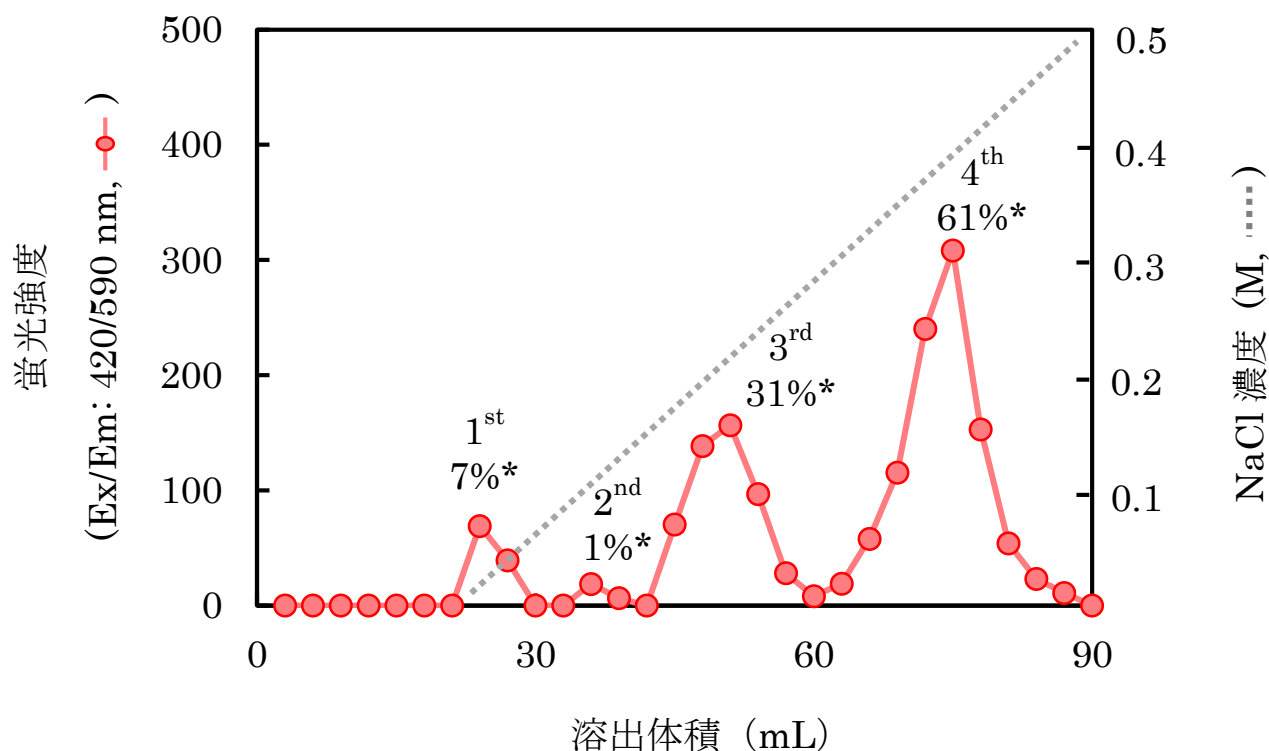
第 3 図の保持時間 14.3 分 (A) と 23.0 分 (B) に溶出した画分を回収し、励起波長 420 nm における蛍光スペクトルを測定した。

## (2) CIEX と SEC-HPLC を用いた分離

次に、CIEX 充填カラムを用いて PHE 中の ZnPP 結合タンパク質を NaCl の直線的濃度勾配を用いて分離した。CIEX では、1 つの非吸着ピーク (1<sup>st</sup>) と 3 つの吸着ピーク (2<sup>nd</sup>–4<sup>th</sup>) が分離された。溶出 NaCl 濃度は、2<sup>nd</sup> ピークは約 0.05 M NaCl、3<sup>rd</sup> ピークは約 0.18 M NaCl、4<sup>th</sup> ピークは約 0.38 M NaCl で、総 ZnPP に対する割合は非吸着ピークが約 7%、吸着ピークはそれぞれ約 1%、31%、61%を占めた (第 6 図)。これら 4 つの蛍光ピークを回収して各々を SEC-HPLC に供試したところ、全ての蛍光ピークが溶出時間 14.2 分前後で検出された (第 7 図)。加えて、これらの蛍光ピークの形状は類似し、パルマナムには多量のタンパク質が分解することから、この 4 つの蛍光ピークは 1 つの水溶性 ZnPP 結合タンパク質の分解程度が異なるものの可能性が示された。また、タンパク質の検出波長である 280 nm 吸光度では、いずれの蛍光ピークの対応するタンパク質の吸光ピークが観察されなかったことから、結合タンパク質は水抽出物中のメジャーなタンパク質ではなく、マイナーなタンパク質であると考えられた。さらに、第 6 図の CIEX 分離結果から観察された ZnPP 蛍光強度が最も強い 4<sup>th</sup> ピークの画分を回収して SDS-PAGE に供試し、SDS-PAGE バンドの強さと蛍光強度を比較したところ、数本の ZnPP 結合タンパク質候補のバンドが観察されたが、明確な候補を絞れず、他のタンパク質とも混在して単離できなかった (第 8 図 A, B)。

## (3) HIC、CIEX および SEC-HPLC を用いた分離

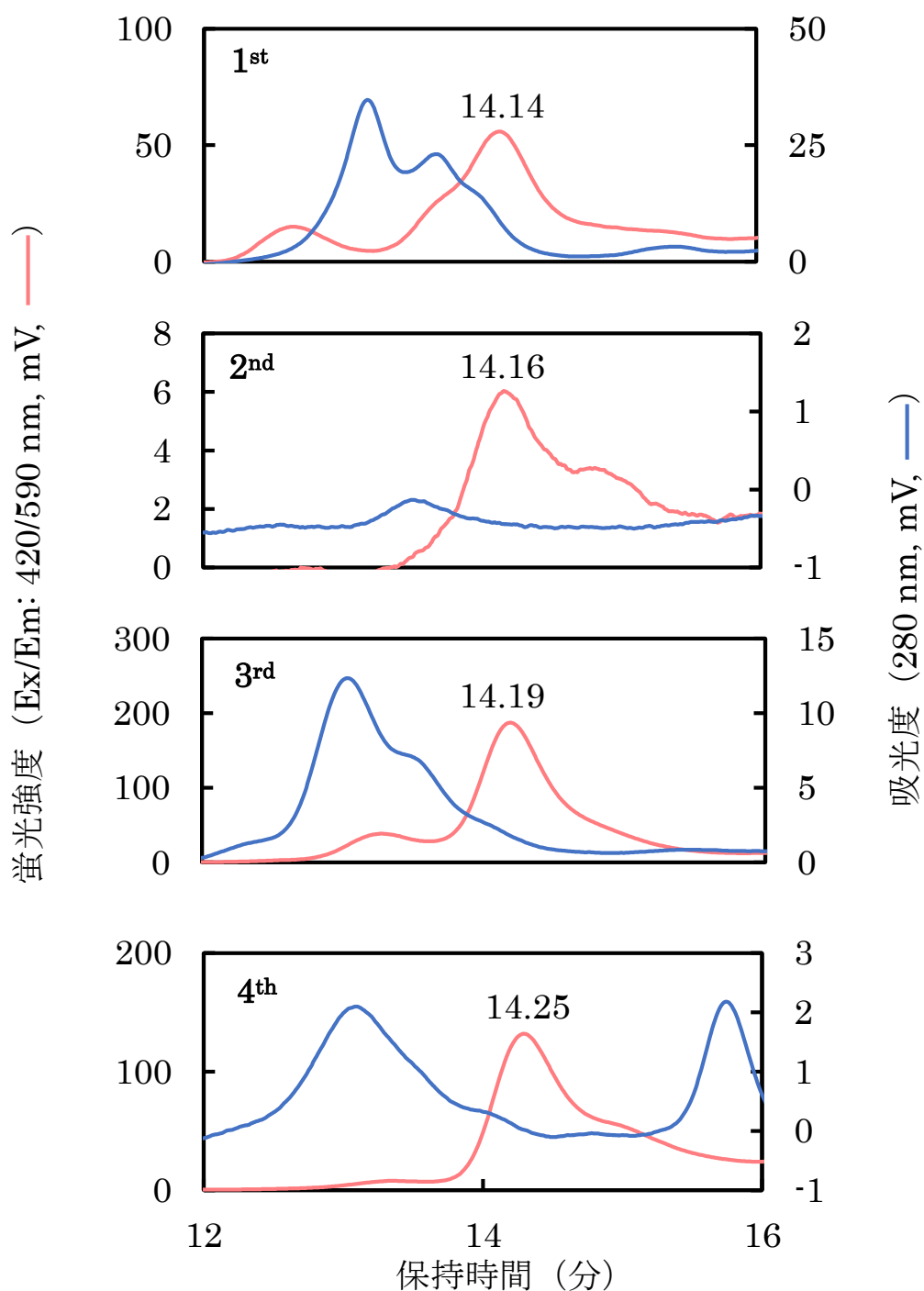
次に、HIC による分離法も加え、HIC、CIEX、SEC-HPLC の順に PHE から ZnPP 結合タンパク質の分離を試みた。HIC を用いた PHE の分離は、初めに硫酸の直線的濃度勾配を用いて行ったが、1 つの広い蛍光ピークしか観察されなかったため (データ示さず)、回収画分の液量が多く、次の CIEX カラムへの吸着に適さなかった。段階的濃度勾配を用いて分離したところ、ほとんど



第 6 図 CIEX を用いた PHE の分離像

PHE を CIEX カラム (Toyopearl CM-650 M,  $1.5 \times 9$  cm) に供試後、20 mM クエン酸リン酸緩衝液 (pH 5.0) の NaCl の直線的濃度勾配 (.....) により吸着成分を溶出した。流速は 1.0 mL/分にして、5 分毎に分取して、各画分の蛍光強度 (Ex/Em: 420/590 nm, —●—) を測定した。1<sup>th</sup>–4<sup>th</sup> は観察された蛍光ピークを示す。\*は下式に示すように全体の蛍光強度に対する各ピークの蛍光強度の割合を算出した。

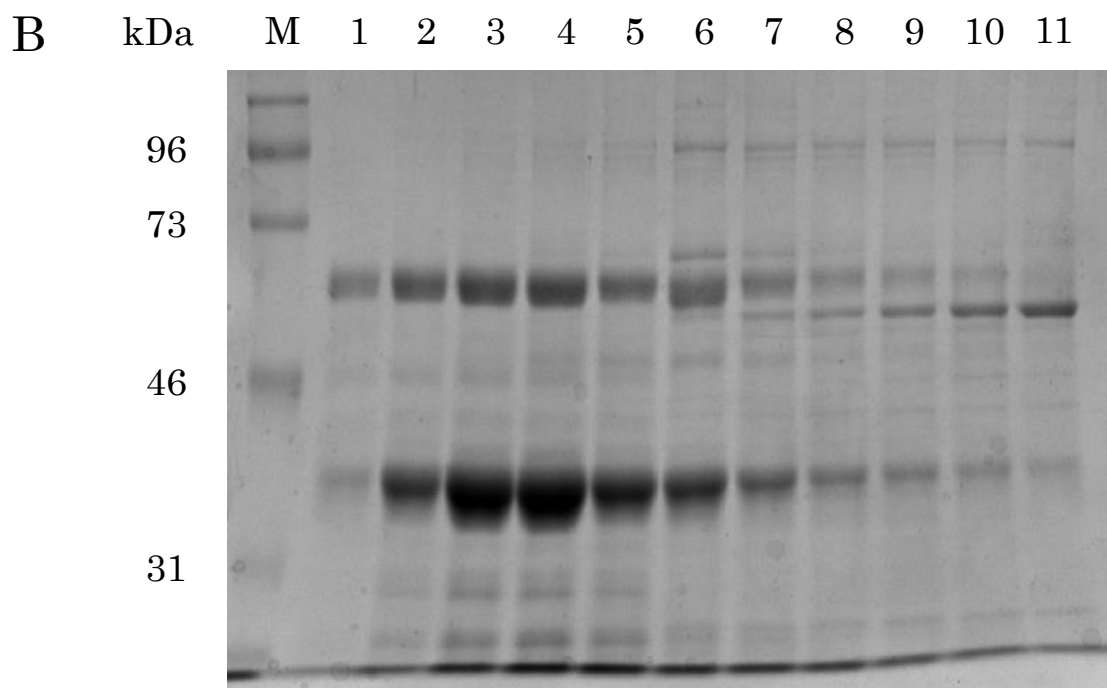
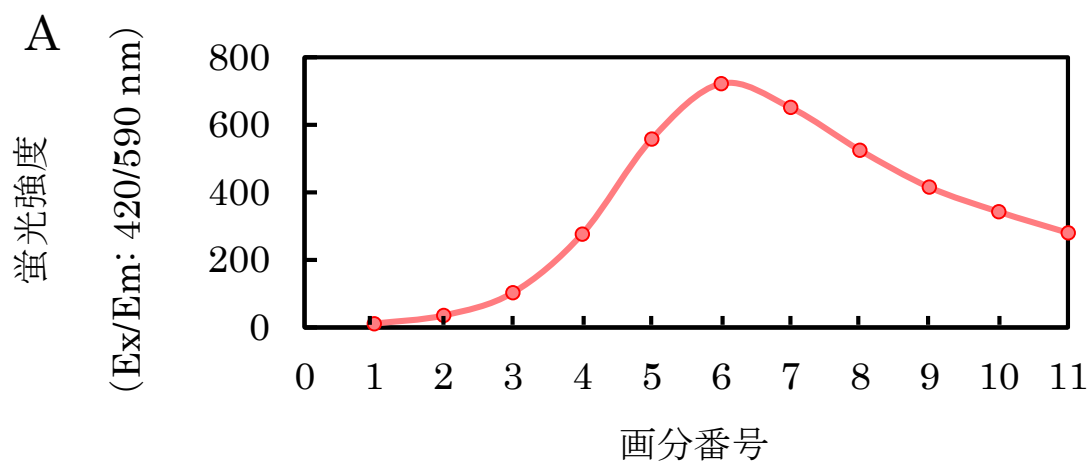
$$\text{ピーク蛍光強度の割合} = \frac{\text{当該ピークの蛍光強度} \times \text{各画分の容積}}{\text{全体の蛍光強度} \times \text{各画分の容積}} (\%)$$



第 7 図 CIEX で分離した PHE の各ピークの SEC-HPLC 分離像

第 6 図で分離した 4 つの蛍光ピーク (1<sup>st</sup>–4<sup>th</sup>) を回収して SEC-HPLC

(TSKgel G3000PW, 7.5 × 300 mm) に供試した。流速は 0.5 mL/分として、蛍光強度 (Ex/Em: 420/590 nm, —) および吸光度 (280 nm, —) を測定した。主要な蛍光ピークの溶出時間を示す。



第 8 図 CIEX で分離した 4<sup>th</sup> ピーク画分の蛍光強度 (A) と SDS-PAGE 像 (B)

第 6 図の CIEX 分離の 4<sup>th</sup> ピーク吸着成分を分取して各画分を蛍光強度 (Ex/Em: 420/590 nm, —●—) の測定 (A) ならびに SDS-PAGE (10%アクリルアミド分離ゲル) (B) に供試した。SDS-PAGE 分離後の CBB 染色像を示す。M は分子量マーカーを示す。

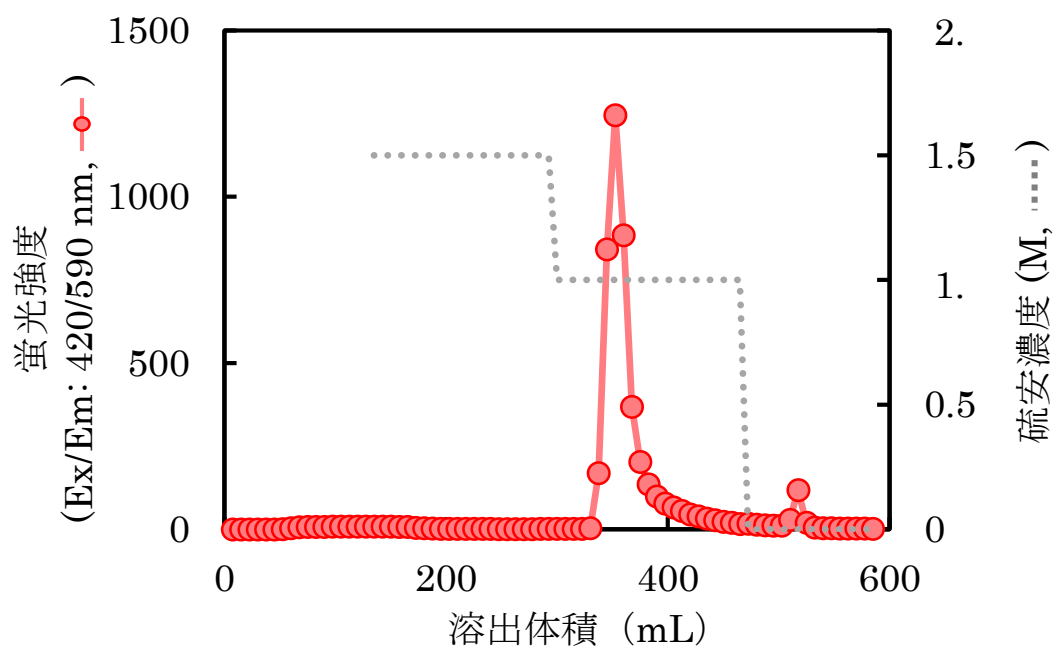
の ZnPP 結合タンパク質が 1.0 M 硫酸濃度で溶出され、硫酸を含まない画分に小さな蛍光ピークが観察された (第 9 図)。このため、ZnPP 結合タンパク質が主に含まれる 1.0 M 硫酸濃度で溶出した画分を回収した。

HIC から回収した画分を透析して硫酸を除去したものを CIEX に供試した。NaCl の直線的濃度勾配を用いて分離したところ、約 47% の ZnPP 結合タンパク質は吸着されず、残りの約 53% の ZnPP 結合タンパク質がカラムに吸着して 0.15 M NaCl 付近で溶出した (第 10 図)。非吸着成分には不純物が多く含まれていると考えられたため、カラムに吸着した ZnPP 結合タンパク質を含む画分のみを回収した。

CIEX の回収画分を濃縮して SEC-HPLC に供試した。タンパク質の検出波長である 280 nm 吸光度では 1 つの主要なピークが溶出時間 13.3 分で検出され、ZnPP 蛍光検出波長 (励起: 420 nm/蛍光: 590 nm) においては 1 つの主要なピークが溶出時間 14.3 分で検出された (第 11 図 A)。蛍光ピークの範囲である 12.5 分から 17.5 分の保持時間において 0.5 分間ずつ分取した。次に、各画分を濃縮後、SDS-PAGE に供試し、SEC-HPLC の各画分の蛍光強度と SDS-PAGE のバンドの強さを比較して ZnPP 結合タンパク質候補を検討した (第 11 図 B)。SEC-HPLC に分離前のサンプル (N) は 3 つの主要なバンド (Band 1, 2, 3) と数本の弱いバンドが得られ、主要なバンドの分子量はそれぞれ 53、44、38 kDa と推定された。SEC-HPLC で分取した画分では、3 つの主要なバンドの強度のいずれも蛍光強度のピークより少し早く溶出したが、他の候補は観察されておらず、推定した ZnPP 結合タンパク質の分子量 (35 kDa) に近いこと、Band 1、2、3 を ZnPP 結合タンパク質候補として回収した。

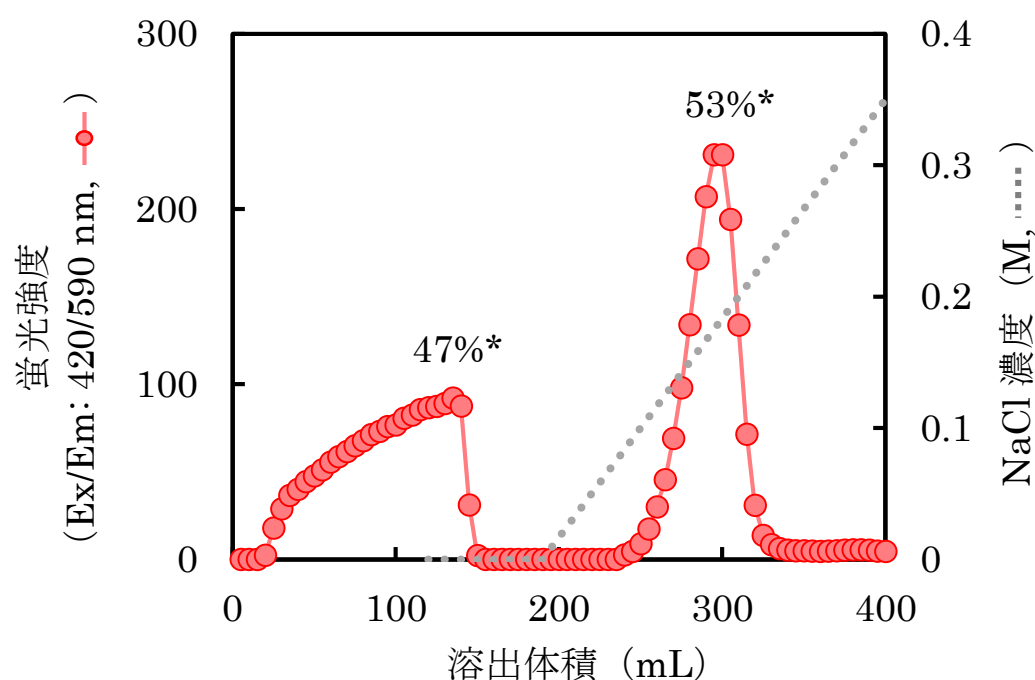
#### (4) ZnPP 結合タンパク質候補の同定

得られた ZnPP 結合タンパク質候補 (バンド 1, 2, 3) を N 末端アミノ酸配列分析したところ、バンド 1 はピルビン酸キナーゼ (PK) の N 末端から 2-9



第9図 HIC による PHE の分離像

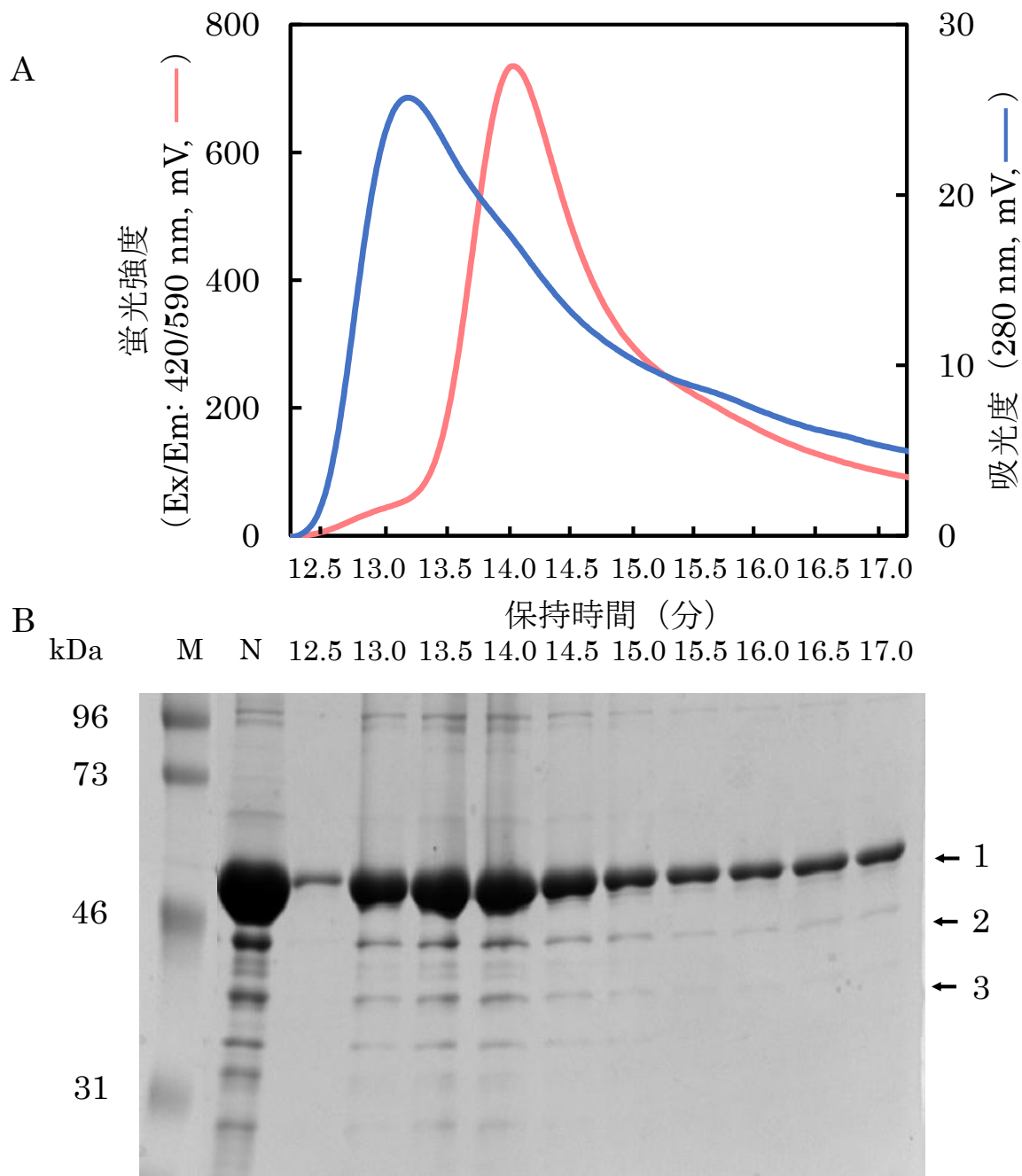
PHE に 40%飽和硫安濃度となるように硫安を添加後、遠心分離後の上清液を回収し、HIC カラム (Toyopearl Butyl-650 M,  $3 \times 12.5$  cm) に供試した。硫安の段階的濃度勾配 (.....) により吸着成分を溶出した。流速 1.5 mL/分にして、5 分毎に分取して、各画分の蛍光強度 (Ex/Em: 420/590 nm, ●) を測定した。



第 10 図 HIC 回収画分の CIEX による分離像

HIC の 1.0 M 硫酸濃度回収画分（第 9 図）を超純水に透析後、CIEX カラム（Toyopearl CM-650 M, 1.5 × 9 cm）に供試した。NaCl の直線的濃度勾配（.....）により吸着成分を溶出した。流速は 1.0 mL/分にして、5 分毎に分取して、蛍光強度（Ex/Em: 420/590 nm, ●）を測定した。\*は下式に示すように全体の蛍光強度に対する各ピークの蛍光強度の割合を算出した。

$$\text{ピーク蛍光強度の割合} = \frac{\text{当該ピークの蛍光強度} \times \text{各画分の容積}}{\text{全体の蛍光強度} \times \text{各画分の容積}} (\%)$$



第 11 図 CIEX 回収画分の SEC-HPLC による分離 (A) と SDS-PAGE 像 (B)

CIEX で吸着・溶出した ZnPP 蛍光ピーク (第 10 図) を回収して濃縮したもの (N) を、SEC-HPLC (TSKgel G3000PW,  $7.5 \times 300$  mm) に供試した (A)。流速 0.5 mL/分で分離し、蛍光強度 (Ex/Em: 420/590 nm, —) および吸光度 (280 nm, —) を測定した。12.5–17.5 分の保持時間に、0.5 分毎に分取した画分 (12.5–17.0, 各画分に分取開始時間を示す) を SDS-PAGE (10%アクリルアミド分離ゲル) に供試した (B)。SDS-PAGE 分離後の CBB 染色像を示す。矢印のバンド 1–3 を ZnPP 結合タンパク質候補とした。M は分子量マーカーを示す。

番目のアミノ酸配列と一致した。N 末端のアミノ酸であるメチオニンは翻訳後修飾で切られるため、バンド 1 はインタクトな PK と同定された(第 8 表)。バンド 2 は PK の N 末端から 102–109 番目のアミノ酸配列と一致したため、PK 分解産物であると同定された。しかし、バンド 3 は濃度不足のため同定できなかった。バンド 1 およびバンド 2 の N 末端アミノ酸配列から推定した理論分子量は SDS-PAGE の推定分子量と一致した。続いて、バンド 3 の正体を調べるため、HIC と CIEEX で分離した高 ZnPP 画分(第 11 図の N)を抗 PK 抗体を用いた WB 分析を行ったところ、バンド 1–3 だけでなく、38–53 kDa 範囲内の数本の弱いバンドも抗 PK 抗体との陽性反応を示した(第 12 図)。このため、バンド 1–3 の ZnPP 結合タンパク質候補は全て PK およびその分解産物由来であることが示された。

#### (5) 免疫沈降法による ZnPP 結合タンパク質の検証

免疫沈降法により PK と ZnPP の結合を検証した。Protein A 磁気ビーズと抗 PK 抗体を用いて PHE から PK を沈降させ、75%アセトンにより沈降物から ZnPP を抽出して蛍光を測定した。PK 抗体添加群とコントロール群(抗体無添加群)のいずれにおいても ZnPP に特徴的な蛍光ピークが観察されず(第 13 図)、PK と ZnPP の結合は確認されなかった。

### 第 2 項 クロマトグラフィーと各種ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた ZnPP 結合タンパク質の分離と同定

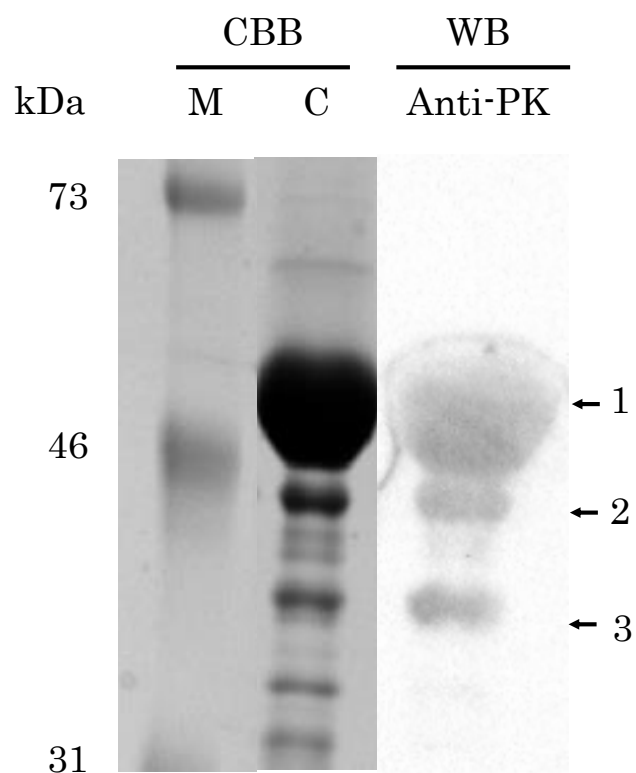
これまでの報告(林, 2009)と同様に、SDS-PAGE による分離では SDS の添加により ZnPP が結合タンパク質から解離し(データ示さず)、分離されたタンパク質と ZnPP との結合を直接的に示すことができなかった。このため、本項では各種ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、ZnPP をタンパク質から解離させることなく分離し、ゲル上の蛍光を直接的に観察することで ZnPP

第 8 表 HIC、CIEX、SEC-HPLC から分離した ZnPP 結合タンパク質候補の N 末端アミノ酸配列分析と推定分子量

| バンド* | 同定アミノ酸配列 | 同定タンパク質*とその理論分子量                | SDS-PAGE からの推定分子量 |
|------|----------|---------------------------------|-------------------|
| 1    | PKPHSDAG | ピルビン酸キナーゼ<br>(PK, 2-9) - 57 kDa | 53 kDa            |
| 2    | PILYRPVA | PK 分解産物<br>(102-109) - 47 kDa   | 44 kDa            |
| 3    | -        | 同定不可                            | 38 kDa            |

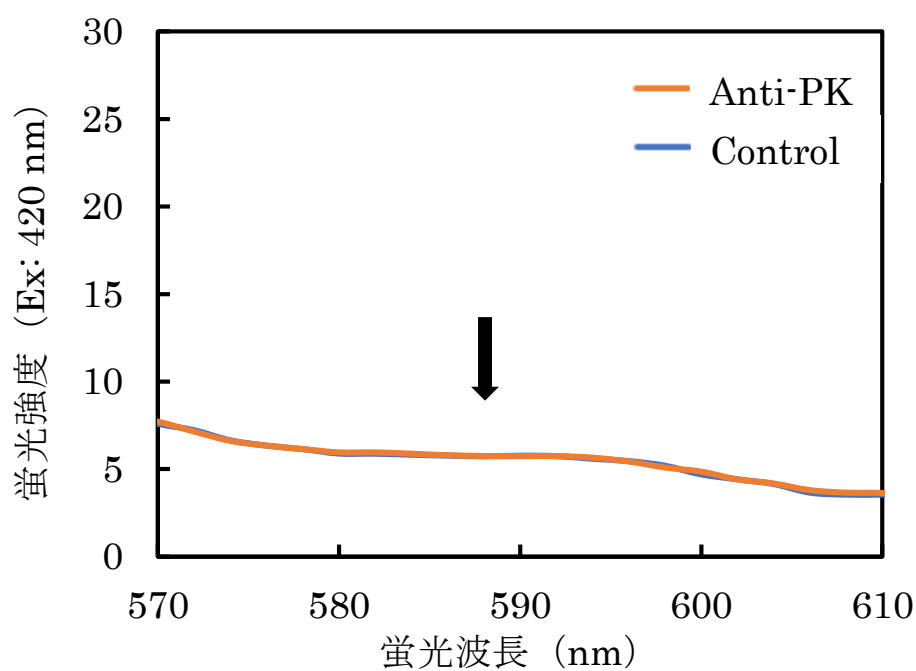
\*：第 11 図から得られた ZnPP 結合タンパク質候補を示す。

#：カッコ内は同定した N 末端からの配列番号を示す。



第 12 図 CIEX 溶出画分の SDS-PAGE 像  
と WB 像 (抗 PK 抗体)

CIEX で吸着・溶出した ZnPP 蛍光ピーク (第 10 図) を回収して濃縮したものを SDS-PAGE (10%アクリルアミド分離ゲル) に供試後、CBB 染色および WB 分析を行った。WB 分析では泳動したゲルを PVDF 膜へ転写し、一次抗体 (抗 PK 抗体) と二次抗体 (HRP 標識抗ウサギ抗体) と反応させ、化学発光法で検出した。C は CIEX 溶出画分を示す。Anti-PK は抗 PK 抗体を示す。バンド 1-3 は ZnPP 結合タンパク質候補を示す。M は分子量マーカーを示す。



第 13 図 PHE の抗 PK 抗体免疫沈降物の蛍光スペクトル

抗 PK 抗体を結合させた protein A 結合磁気ビーズ (Anti-PK, —) を用いて PHE から PK を沈降させ、沈降物を 75%アセトンで抽出した。抽出液の励起波長 420 nm における蛍光スペクトルを測定した。矢印は ZnPP 特有の蛍光ピーク (588 nm) を示す。Control (—) は PK 抗体を加えない磁気ビーズで同様の処理を行ったものを示す。

結合タンパク質の候補を分離して同定し、ZnPP との結合を検証した。

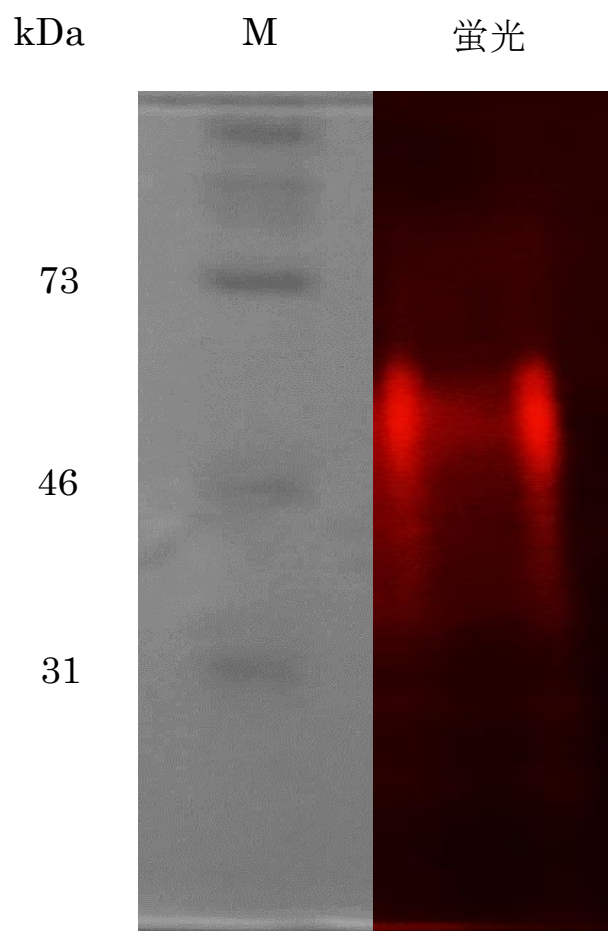
### (1) Native-PAGE を用いた分離

はじめに、native-PAGE を用いて PHE 中の ZnPP 結合タンパク質を分離し、ZnPP の励起波長である 420 nm における蛍光を観察したところ、約 50 kDa の位置にスミアな蛍光バンドが観察された (第 14 図)。この ZnPP 結合タンパク質と思われる蛍光バンドが第 1 項で ZnPP と結合する可能性が示された PK 由来かどうかを検証するために、抗 PK 抗体を用いた WB 分析に供したが、陽性反応は示さなかった (データ示さず)。このため、PHE 中の主要な ZnPP 結合タンパク質は PK ではないと考えられた。

Native-PAGE の ZnPP 結合タンパク質と思われる蛍光バンドを明らかにするために、蛍光バンドを切り出し、含まれたタンパク質を抽出した。抽出液を SDS-PAGE に供試したところ、数本のバンドが観察された (第 15 図 N)。約 51–54 kDa のもっとも濃いバンド (第 15 図矢印) を N 末端アミノ酸配列分析に供試したところ、純度が低くて同定できなかった (データ示さず)。Native-PAGE の分離度を改善することで、ZnPP 結合タンパク質候補を純化できると考えた。

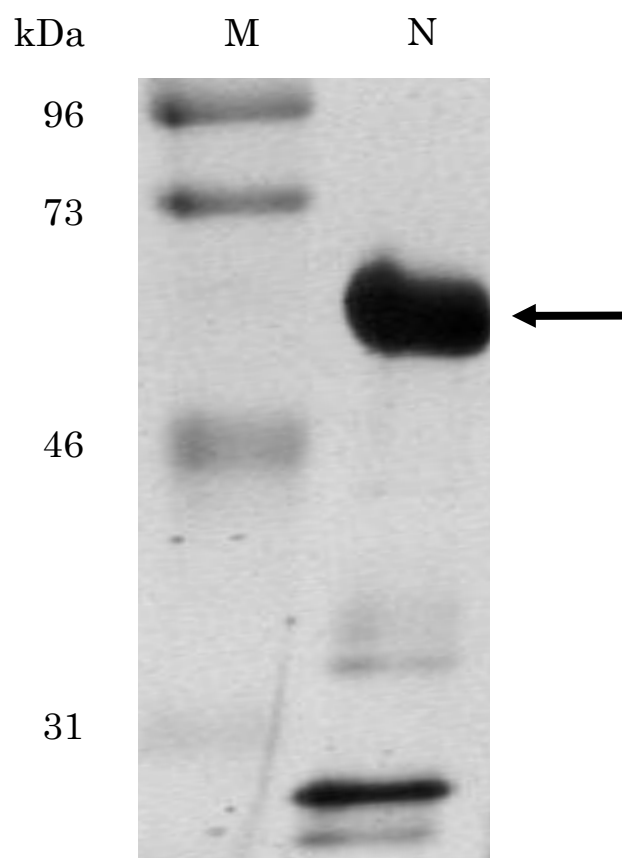
### (2) 尿素-PAGE を用いた分離

Native-PAGE に尿素を添加 (尿素-PAGE) して、PHE を分離したところ、7 本の明瞭な蛍光バンドが観察され、バンド 1–4 とバンド 7 は特に強かった (第 16 図)。また、個体や筋肉の違いにより ZnPP 結合タンパク質が異なるのかを調べるため、3 個体分のパルマハムの 4 つの筋肉 (半膜様筋, SM; 大腿二頭筋, BF; 半腱様筋, ST; 大腿四頭筋, QF) について、それぞれの水抽出液を尿素-PAGE に供試した。全ての分離パターンは類似していたが、いずれの個体においても QF の蛍光強度が他の筋肉より強かったため、以降の実験では



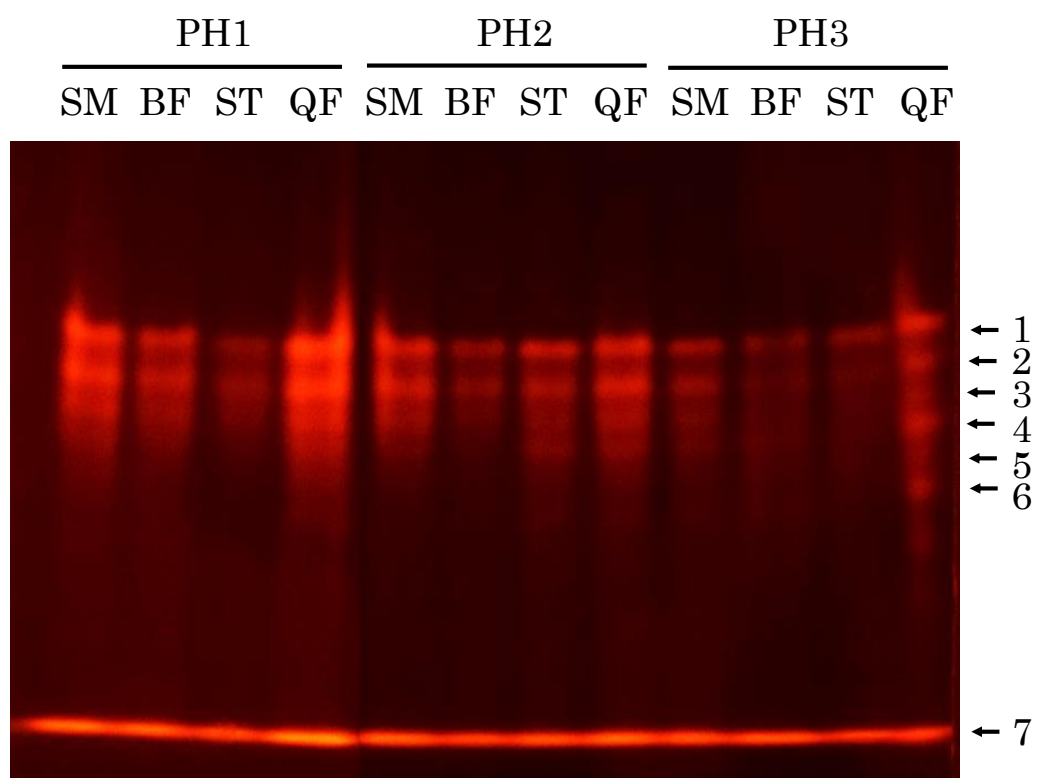
第 14 図 PHE の native-PAGE 像

PHE を native-PAGE に供試し、波長 420 nm 付近光源の光を照射して波長 600 nm 付近の蛍光を検出した（蛍光）。M は分子量マーカを示す。



第 15 図 Native-PAGE 蛍光バンド抽出液の SDS-PAGE 像

第 14 図の蛍光バンド抽出液 (N) を SDS-PAGE (10%アクリルアミド分離ゲル) に供試して銀染色した。矢印は ZnPP 結合タンパク質候補を示す。M は分子量マーカーを示す。



第 16 図 各個体と各筋肉から得られた PHE の尿素-PAGE 像

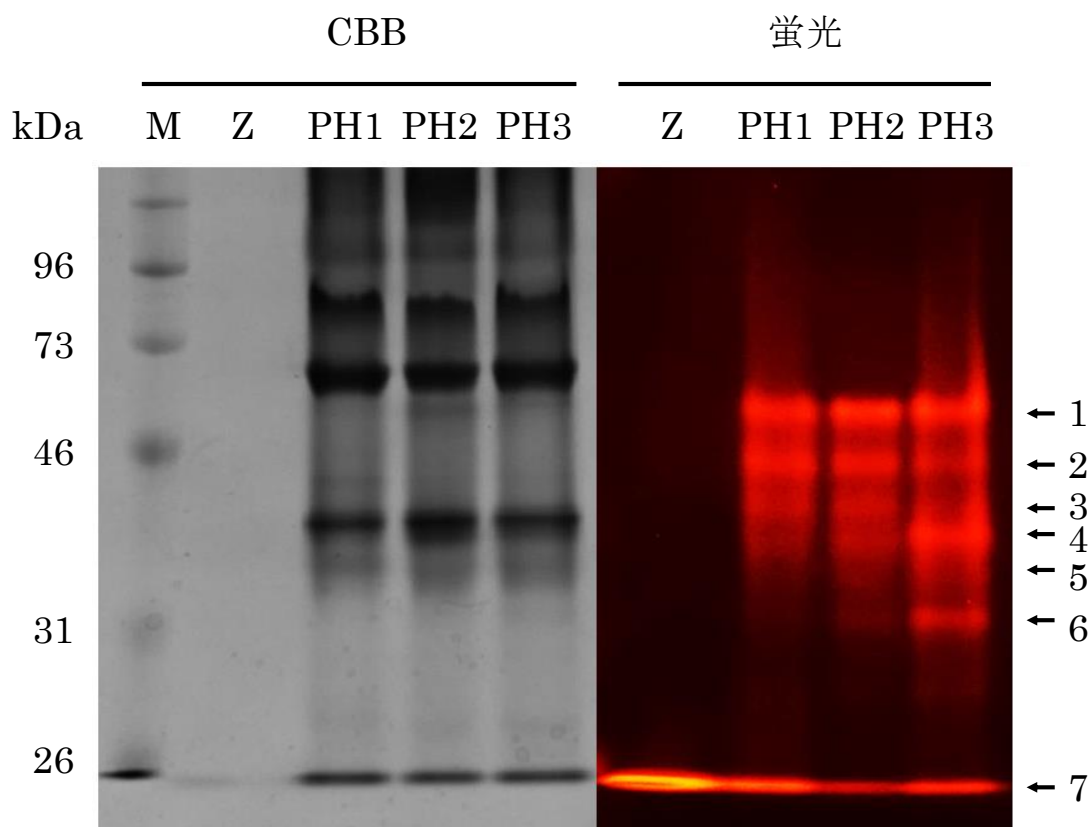
異なる 3 つのパルマハム（PH1：14 か月間熟成；PH2 と PH3：18 か月間熟成）から、大腿四頭筋（QF）、大腿二頭筋（BF）、半膜様筋（SM）、半腱様筋（ST）を採取し、それぞれの PHE を尿素-PAGE に供試し、波長 420 nm 付近の光を照射して波長 600 nm 付近の蛍光を検出した。1-7：検出された蛍光バンドを示す。

QF の水抽出液を用いて分析を行った。 尿素-PAGE における QF の分離結果で観察された 7 つの蛍光バンドにおいて、バンド 7 の移動度は泳動の先端で ZnPP 標準品と同じであったため、遊離 ZnPP 由来であると考えられた (第 17 図)。バンド 1-6 の移動度は 30-50 kDa の間にあり、ZnPP 標準品の位置とは異なったため、ZnPP 結合タンパク質由来であると考えられた。CBB 染色したものでは、バンド 4 に対応するタンパク質のバンドが観察されたが、他の蛍光バンドには対応する明瞭なタンパク質のバンドが観察されなかったことから、含有量だけでなく、純度も低い可能性がある。

### (3) HIC と尿素-PAGE を用いた分離

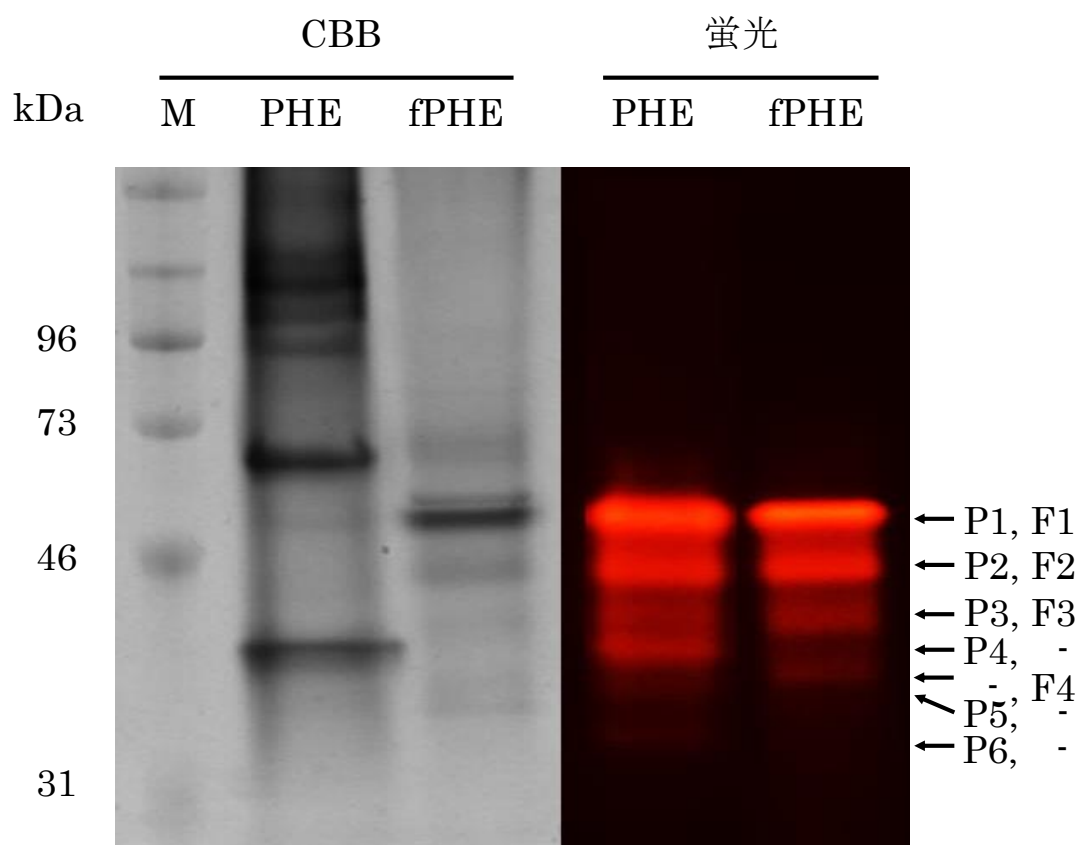
不純物を除くため、PHE を第 1 項 (3) で用いた HIC の 1 M 硫酸濃度で溶出した画分 (fPHE) を回収して、尿素-PAGE に供試したところ、CBB 染色像では、fPHE のバンド数が PHE と比べて明らかに減少していた (第 18 図)。蛍光像では、PHE は 6 つのバンド (P1-6) が観察されたが、fPHE においては 4 つのバンド (F1-4) のみが観察された。P1-3 と F1-3 のバンドが同じ位置にあったが、fPHE では P4-6 と同じ位置にバンドは観察されず、新たに F4 蛍光バンドが観察された。F4 はもともと PHE に存在しており、P4-6 が消失したため目立つようになったのかもしれない。蛍光像と CBB 染色像を比較すると、PHE では P4 蛍光バンドのみ対応する CBB 染色バンドが明瞭にみられた。一方、fPHE においては F1-4 の蛍光バンドに対応する CBB 染色バンドが明瞭にみられたが、P4 と同じ位置に CBB 染色バンドは観察されず、HIC により除去されたと考えられた。

続いて、高濃度の ZnPP 結合タンパク質候補を回収するため、PHE と fPHE をそれぞれ濃縮して尿素-PAGE に供したところ、両方のサンプルで染色しなくても肉眼で確認できる複数の赤色バンドが観察され、色素タンパク質であることが示された (第 19 図)。PHE の非染色像では P1-3 の位置に弱い赤色バ



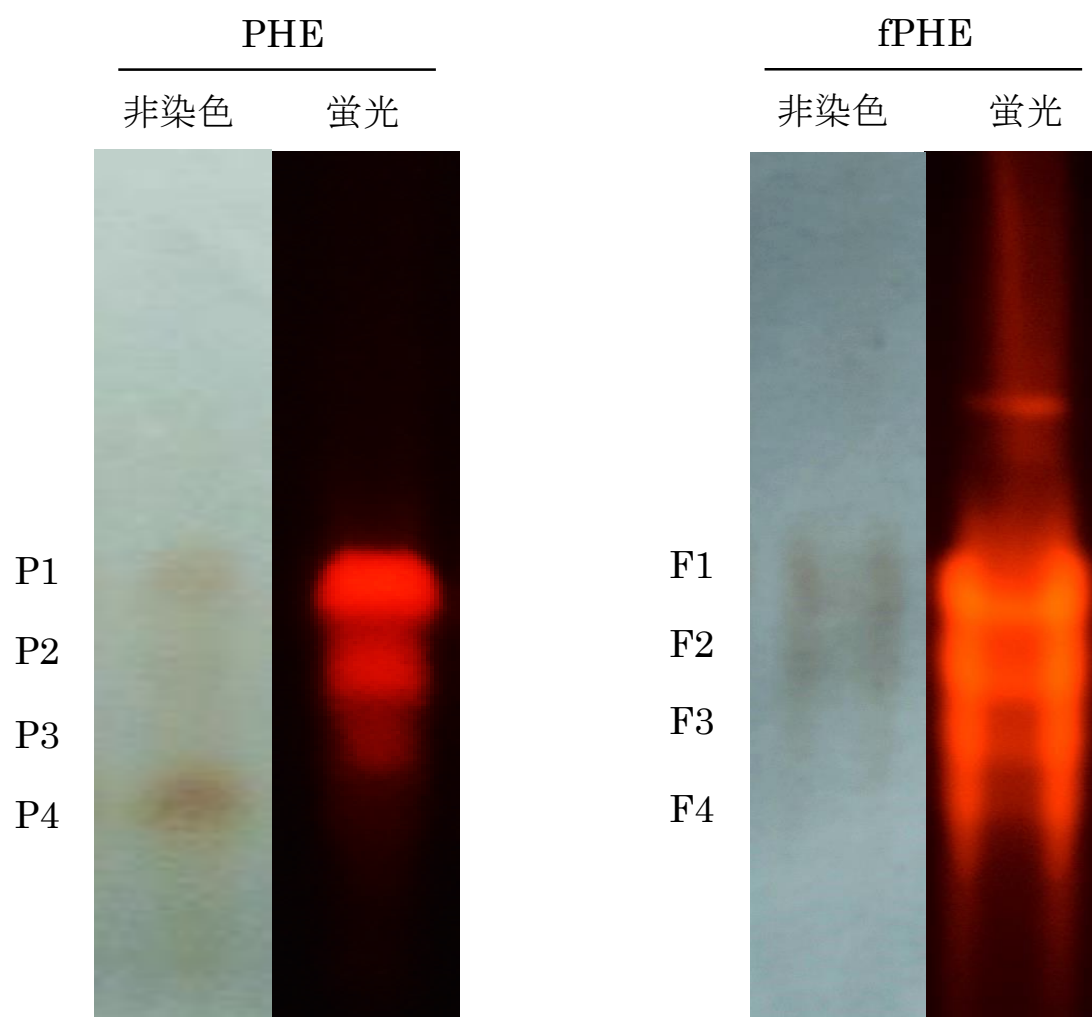
第 17 図 尿素-PAGE により分離した異なる 3 つの PHE の CBB 染色像と蛍光像

異なる 3 個体パルマハムの QF 抽出液 (PH1-3) と ZnPP 標準品 (Z) を尿素-PAGE に供試後、蛍光像を観察して CBB 染色を行った。1-7 は検出された蛍光バンドを示す。M は分子量マーカを示す。



第 18 図 HIC で分画した PHE の尿素-PAGE の CBB 染色像と蛍光像

第 9 図の PHE を HIC に供試して 1 M 尿素で溶出した画分 (fPHE) と PHE を尿素-PAGE に供試し、CBB 染色および蛍光検出を行った。P1-P6 は PHE から分離観察された 6 本の蛍光バンドを、F1-F4 は fPHE から分離観察された 4 本の蛍光バンドを示す。M は分子量マーカーを示す。



第 19 図 尿素-PAGE で分離した PHE と fPHE の  
非染色像と蛍光像

PHE と fPHE を濃縮して、尿素-PAGE に供試したものの非染色像と蛍光像を示す。バンド名は第 18 図のものと対応し、P1-P4 は PHE を分離後の 4 つの蛍光バンド、F1-F4 は fPHE を分離後の 4 つの蛍光バンドを示す。

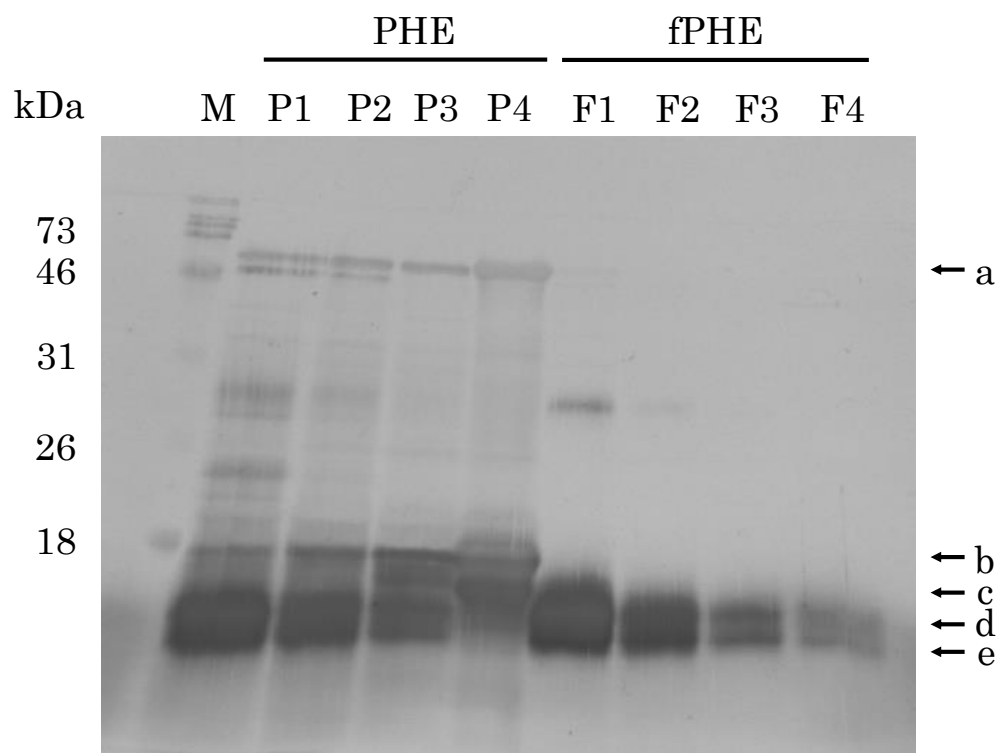
ンドが観察され、蛍光像では強い蛍光が観察されたが、非染色像で強い赤色バンドが観察された P4 については、蛍光像では蛍光がほとんど観察されなかった。一方、fPHE では F1-4 の位置に非染色像の赤色バンドと強い蛍光が観察され、両者の相関係数は 0.8949 と正の相関を示したが、P4 に相当する位置に PHE でみられた蛍光がない赤色バンドは観察されなかった。主要な赤色色素タンパク質と蛍光バンドである P1-4 と F1-4 を切り出し、タンパク質を抽出してさらに検討した。P1-4 と F1-4 バンドの各抽出液を SDS-PAGE に供した（第 20 図）。F1-4 の全てで 16 kDa (d) および 15 kDa (e) のバンドが観察され、それらの強さは F1 から F4 の順に弱くなっていた。P1-4 ではこの 16 kDa および 15 kDa のバンドに加え、60、18、17 kDa (a、b、c) のバンドも観察された。これらの 3 つのバンドは、P4 において特に強く観察されたことから、この中には fPHE の分離過程に除かれた ZnPP 結合タンパク質（第 18、19 図の P4）が存在するかもしれない。このため、バンド a-e を ZnPP 結合タンパク質候補とした。

#### (4) ZnPP 結合タンパク質候補の同定

バンド a-e を N 末端アミノ酸配列解析に供試したところ、バンド a、b、e はそれぞれアルブミン (Alb)、Mb、ヘモグロビン (Hb)  $\alpha$  鎖の翻訳後修飾の N 末端配列が得られて同定された（第 9 表）。バンド c および d は同定できなかったが、バンド d については、全ての候補 (P1-P4、F1-F4) において Hb の  $\alpha$  鎖 (e) と同じ程度の太さ、分子量は  $\alpha$  鎖より少し大きく、抗 Hb 抗体と陽性反応を示したこと（データ示さず）から Hb の  $\beta$  鎖と推定された。以上より、ZnPP 結合タンパク質の候補として Alb、Mb と Hb が同定された。

#### (5) 免疫沈降法による ZnPP 結合タンパク質の検証

同定された ZnPP 結合タンパク質候補の ZnPP との結合を検証するため、



第 20 図 尿素-PAGE から回収した蛍光バンド  
の SDS-PAGE 像

第 19 図に示す尿素-PAGE から回収した 8 つのバンド (P1-P4、  
F1-F4) を SDS-PAGE (20%アクリルアミド分離ゲル) に供試  
して銀染色した。a-e は ZnPP 結合タンパク質候補を示す。M は  
分子量マーカを示す。

第 9 表 N 末端アミノ酸配列分析による ZnPP 結合タンパク質候補バンドの同定結果

| バンド* | 同定アミノ酸配列 | 同定タンパク質 <sup>#</sup> |
|------|----------|----------------------|
| a    | DTYKSEIA | アルブミン (25–32)        |
| b    | GLSDGEWQ | ミオグロビン (2–9)         |
| c    | -        | 未同定                  |
| d    | -        | 未同定                  |
| e    | VLSAADKA | ヘモグロビン α 鎖 (2–9)     |

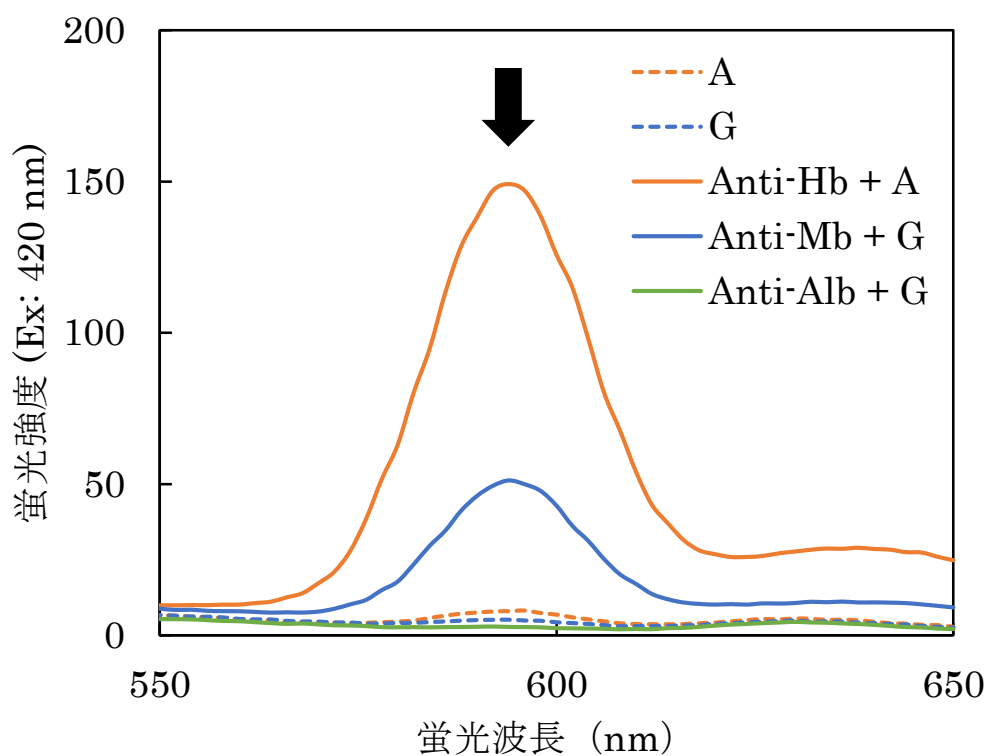
\*: バンド名は第 20 図に示す。<sup>#</sup>: かつこ内は同定した配列の N 末端からの配列番号を示す。

免疫沈降法を行った。ZnPP 結合タンパク質候補の抗体、およびその抗体に対応した磁気ビーズを用いて PHE から Alb、Mb、Hb を沈降させ、沈降物から 75%アセトンで ZnPP を抽出して蛍光測定を行った。コントロールとして抗体を添加しなかった群は ZnPP の特異蛍光がほとんど観察されなかった（第 21 図 A、G）。抗 Hb 抗体と抗 Mb 抗体の添加群では 594 nm に極大となる強い蛍光ピークが観察され、特に Hb で高かった（第 21 図 Anti-Hb + A、Anti-Mb + G）。しかし、抗 Alb 抗体添加群では ZnPP 特有の蛍光が観察されなかった（第 21 図 Anti-Alb + G）。この蛍光ピークは ZnPP 由来であり、蛍光検出のバンド幅を広くしたため、蛍光極大値の 588 nm 波長はわずかに長波長に推移したと考えられる。以上の結果から、Hb と Mb は両方とも ZnPP 結合タンパク質であり、Alb は ZnPP 結合タンパク質ではないことが明らかになった。

#### (6) 尿素-PAGE で観察された蛍光バンドと Hb、Mb の関連性

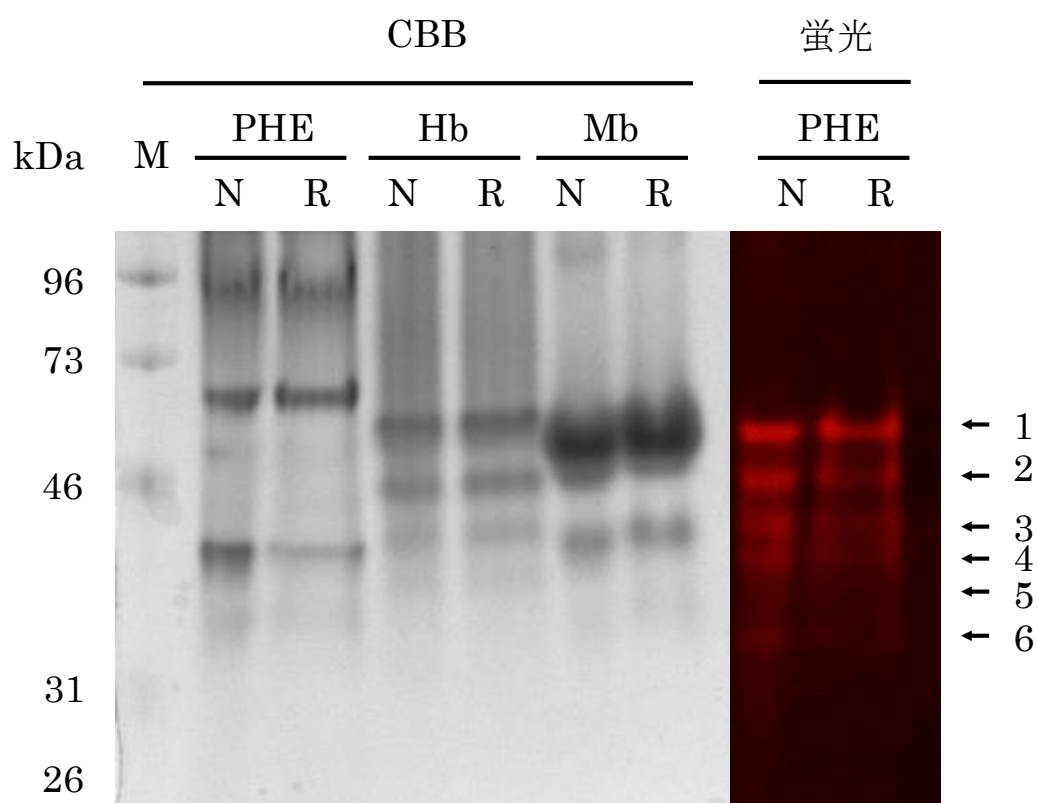
次に、尿素-PAGE において、PHE から分離された 6 本の ZnPP 結合タンパク質由来の蛍光バンドと、Hb および Mb との関連性を解明するために、PHE と Hb、Mb の標準品を同時に泳動してそれらの移動度を比較した。また、Hb のサブユニットの解離は泳動パターンに大きく影響するため、解離状態に影響する還元剤の有無についても検討したが、全てのサンプルにおいて還元剤の添加はタンパク質の移動度に影響しなかった（第 22 図）。Hb 標準品の移動度は蛍光バンド 1-3 の移動度と一致した。しかし、Mb 標準品も蛍光バンド 1-3 の間に相当する範囲に 3 本のバンドが観察されたが、位置がずれており、第 20 図で示したように Mb が蛍光バンド 4 の位置に存在していることも矛盾している。これは、Mb 標準品は馬心臓由来であることから、畜種間の差による Mb の移動度は異なるのかもしれない。

そこで、畜種間の違いを解決するため、新鮮豚もも肉抽出液（PE）を豚由来のインタクトな Hb と Mb のコントロールとして、PHE と共に尿素-PAGE に



第 21 図 ZnPP 結合候補タンパク質の免疫沈殿物の蛍光スペクトル

抗 Hb 抗体 (Anti-Hb)、抗 Mb 抗体 (Anti-Mb) および抗 Alb 抗体 (Anti-Alb) を結合させた Protein A (A) または protein G (G) 結合磁気ビーズを用いて PHE から沈降させ、75%アセトンにより抽出し、励起波長 420 nm における蛍光スペクトルを測定した。矢印は ZnPP 特有の蛍光ピーク (594 nm) を示す。破線は抗体の無添加群を示し、実線は各種抗体と対応の磁気ビーズを添加群を示す。3 個体 QF のうち、それぞれの条件における最も代表的な結果を示す。

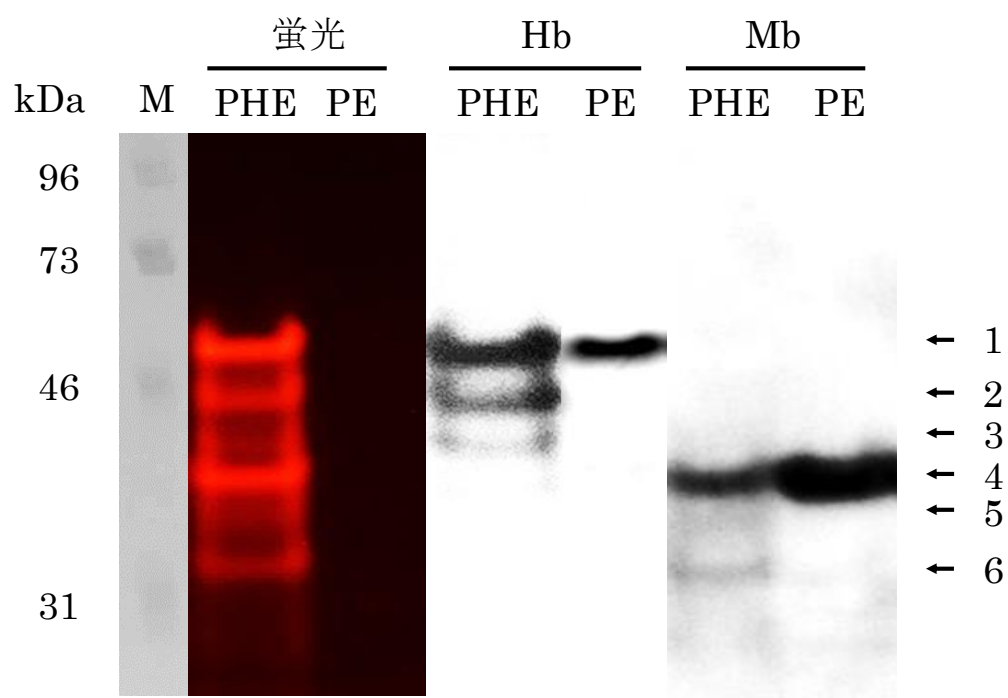


第 22 図 PHE、Hb と Mb 標準品の尿素-PAGE 像とその蛍光像

PHE と Hb、Mb 標準品に対してそれぞれ還元剤無添加 (N) または 1% 2-メルカプトエタノールを添加 (R) したものを尿素-PAGE に供試し、CBB 染色像および蛍光像を示す。1-6 は検出された蛍光バンドを示す。M は分子量マーカを示す。

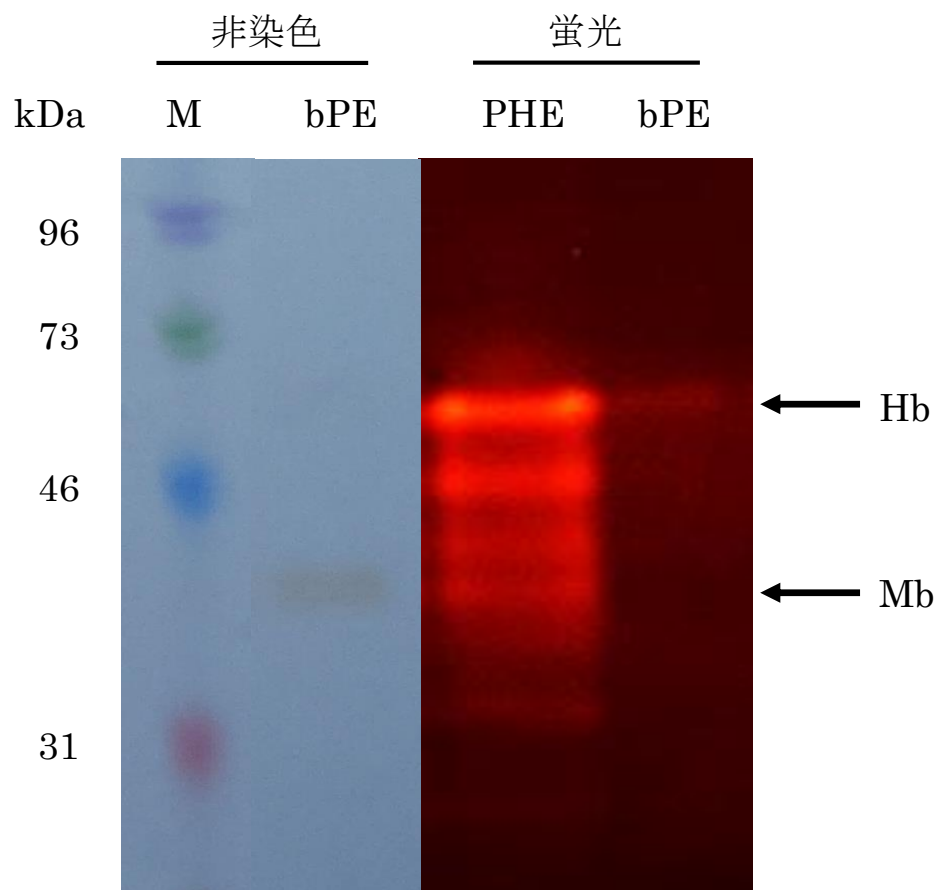
より分離後、WB 分析（抗 Hb、抗 Mb 抗体）を行った（第 23 図）。PE においては、抗 Hb 抗体はバンド 1 のみと反応し、抗 Mb 抗体がバンド 4 のみと反応した。このため、この 2 つのバンドは各々インタクトな Hb と Mb であると同定した。PHE では、蛍光像におけるバンド 1-3 が抗 Hb 抗体と反応し、バンド 4-6 が抗 Mb 抗体と反応した。Hb と Mb とともに複数のバンドが観察され、一部のバンドはパルマハムの熟成期間中における Hb と Mb の分解物由来の可能性が考えられた。このため、バンド 2 と 3 は Hb 分解産物で、バンド 5 と 6 は Mb 分解産物であることが示唆された。また、パルマハム中の Hb と Mb の部分分解は ZnPP-Hb と ZnPP-Mb の形成に及ぼす影響を明らかにするために、第 23 図の蛍光像および WB 像について、ImageJ を用いて蛍光バンドと WB 染色バンドの強さの相関性を評価した。部分分解は ZnPP の形成を促進する場合は、インタクト Hb と Mb 由来の蛍光バンドと結合タンパク質バンドの強さの割合は、Hb と Mb 分解物由来のものより低いと推測された。その結果、蛍光バンド 1-3 と Hb、蛍光バンド 4-6 と Mb のバンドの強さの割合はそれぞれ一定であった。このため、Hb と Mb の ZnPP 複合体の形成量は部分分解と関係なく、結合タンパク質濃度にのみ関与していることが示された。一方、豚肉の鮮度が低下すると ZnPP の形成が報告されていることから（Durek *et al.*, 2012）、劣化した豚肉の水抽出液（bPE）を尿素-PAGE により分離したところ、PHE のインタクト Hb の当該位置に非染色像では赤色色素が観察されなかったが、弱い ZnPP の蛍光バンドが観察された（第 24 図 Hb）。一方、PHE のインタクト Mb に該当する位置に非染色像では赤色色素が観察されたが、対応する ZnPP 蛍光バンドは観察されなかった（第 24 図 Mb）。濃度が低い Hb が優先に ZnPP 複合体を形成することから、豚肉中では Hb が Mb より容易に ZnPP 複合体を形成することが示唆された。

PHE 中の Hb と Mb の ZnPP 複合体（ZnPP-Hb、ZnPP-Mb）の割合をパルマハム 3 個体の 4 種類の筋肉（SM, BF, ST, QF）水抽出液の尿素-PAGE 蛍光



第 23 図 PHE と豚肉水抽出物の尿素-PAGE 像と WB による Hb と Mb の同定

PHE と新鮮豚もも肉抽出液 (PE) を尿素-PAGE に供試し、蛍光像および抗 Hb 抗体と抗 Mb 抗体を用いた WB 像を示す。1-6 は観察された蛍光バンドを示す。M は分子量マーカを示す。



第 24 図 劣化した豚肉の水抽出液の尿素-PAGE 分離後の非染色像と蛍光像

3 回凍結融解した豚もも肉の水抽出液 (bPE) と PHE を尿素-PAGE に供試し、非染色像と蛍光像を示す。矢印はインタクトの Hb とインタクトの Mb の位置を示す。M は分子量マーカーを示す。

像（第 16 図）の蛍光バンドの強度から評価したところ、ZnPP-Hb の割合は全水溶性 ZnPP 結合タンパク質の 58–83%（第 10 表）と大半を占めることが示された。

### 第 3 項 パルマハム中の Hb と Mb の分解状態

パルマハム中の Hb と Mb の分解程度を調べるために、PHE を SDS-PAGE により分離し、抗 Hb と抗 Mb 抗体を用いて WB 分析を行った。Hb では 2 本の主要バンド（15、16 kDa）と数本の Hb 多量体または非特異性反応由来の弱いバンド（45、29、26 kDa）が観察されたが、低分子には分解された Hb の陽性バンドはみられなかった（第 25 図）。一方、Mb では 18 kDa に単一のバンド、45 kDa に多量体または非特異的反応由来の弱いバンドが観察されたが、低分子には同様に分解された Mb の陽性バンドはみられなかった。PHE 中の主な Hb および Mb 陽性バンド位置は PE との違いがみられなかったため、パルマハムでは Hb と Mb の分解程度が弱いと考えられた。PHE と PE のバンドの強さと比べると、PHE 中の Hb は PE のバンドに比べて強かったが、Mb はより弱かった。

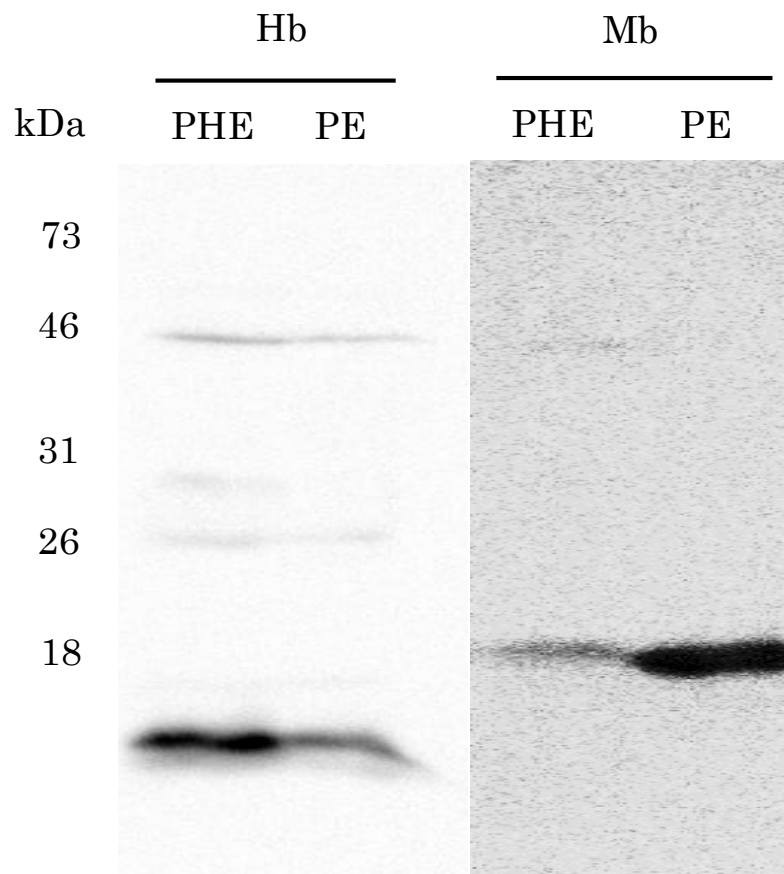
PHE における Hb の重合状態を調べるために、還元剤を使用しないで SDS-PAGE 後に WB 分析（抗 Hb 抗体）を行った。PHE と PE ともに Hb 抗体が複数のバンドと反応し、それらのパターンは概ね同じであったが、PHE において 26 および 31 kDa の位置に弱いバンドが現れた（第 26 図）。これらのバンドは Hb 二量体の分解産物や Hb が他のタンパク質と結合したものの分解産物由来であるかもしれない。また、PHE 中の ZnPP 結合 Hb（ZnPP-Hb）が単量体、二量体あるいは四量体の状態で存在するのかを解明するために、尿素-PAGE から回収した ZnPP-Hb の蛍光バンドを、還元剤を添加しない SDS-PAGE に供した。ZnPP-Hb 蛍光バンドサンプルでは主に 29 と 16 kDa に陽性反応が観察され（第 26 図矢印）、分子量からそれぞれが Hb 二量体と単量体

第 10 表 全パルマハムの 4 つ筋肉における全水溶性 ZnPP に対する ZnPP-Hb の割合\*

| ZnPP-Hb<br>割合 (%) | 筋肉 |    |    |    |
|-------------------|----|----|----|----|
|                   | SM | BF | ST | QF |
| PH1               | 75 | 70 | 77 | 80 |
| PH2               | 83 | 80 | 75 | 69 |
| PH3               | 69 | 58 | 70 | 64 |

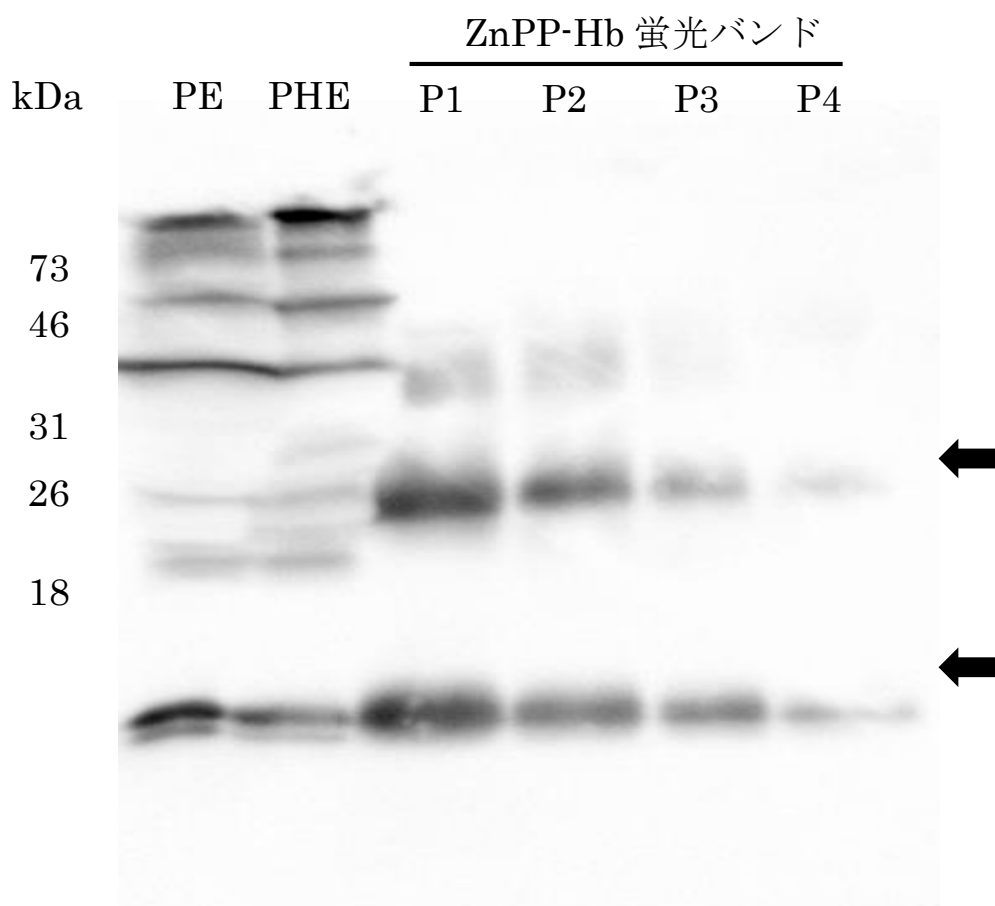
\*第 16 図の蛍光バンド強度から、下式から全水溶性 ZnPP に対する ZnPP-Hb の割合を算出した。

$$\text{ZnPP-Hb (\%)} = \frac{\text{蛍光バンド 1-3 の全蛍光強度}}{\text{蛍光バンド 1-6 の全蛍光強度}}$$



第 25 図 PHE と PE の WB 像（還元剤添加）

PHE および豚もも肉水抽出液（PE）の前処理において終濃度 5% 2-メルカプトエタノールとなるように添加し、SDS-PAGE（20%アクリルアミド分離ゲル）に供試し、抗 Hb 抗体と抗 Mb 抗体を用いた WB 像を示す。



第 26 図 PE、PHE、および尿素-PAGE で分離した ZnPP-Hb の WB 像（抗 Hb 抗体、還元剤なし）

豚もも肉水抽出液（PE）、PHE、第 19 図の尿素-PAGE の Hb 由来の水溶性蛍光バンド抽出液（P1-P4）の前処理に 2-メルカプトエタノールを添加しないで、SDS-PAGE（20%アクリルアミド分離ゲル）に供試し、抗 Hb 抗体を用いた WB 像を示す。矢印は ZnPP-Hb 蛍光バンドサンプル中の主要な陽性反応バンドを示す。

であると考えられた。43 kDa にも弱い陽性バンドが観察され、Hb 三量体や非特異性反応などの可能性が考えられた。ZnPP-Hb 蛍光バンドサンプル中の二量体のバンドは PHE 中の二量体のバンドより遥かに濃かったが、ZnPP-Hb 蛍光バンドサンプル中の単量体のバンドと PHE 中の単量体のバンドは同じぐらいの強さを示した。

## 第 4 節 考察

本研究ではパルマハム中の ZnPP 形成機構を解明するために、パルマハム中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質を同定した。ZnPP 結合タンパク質候補は異なる純化方法から得られ、N 末端アミノ酸配列分析により PK、Alb、Hb、Mb を同定したが、PHE 中の ZnPP との結合を検証したところ、Hb と Mb のみが ZnPP 結合タンパク質であることが示された。さらに、WB 分析から PHE 中の主要な ZnPP 結合タンパク質は Hb、Mb とそれらの分解産物から構成されていることも示された（第 23 図）。Hb と Mb は食肉中の主要なヘムタンパク質であり（Ramanathan *et al.*, 2020）、それらのヘムが ZnPP に置換された複合体もよく報告されている（Feitelson & Spiro, 1986; Miyazaki *et al.*, 1999）ため、パルマハム中の ZnPP が ZnPP-Hb と ZnPP-Mb として存在する可能性は十分に考えられる。一方、SEC-HPLC において、PHE 中の主要な ZnPP 結合タンパク質の分子量は 35 kDa と推定され、Mb の保持時間には Mb 由来の吸光ピークが観察されたが、蛍光ピークは強くなかった（第 3, 4, 5 図）。ZnPP-Hb を還元剤なしの SDS-PAGE に供したところ、29 kDa に太いバンドが観察され（第 26 図）、還元剤使用の SDS-PAGE で分析すると Hb の  $\alpha$  と  $\beta$  鎖（15 と 16 kDa）両方とも観察された（第 20 図）。また、Hb の単量体は Mb の分子量よりも小さいが、SEC-HPLC で Mb よりも遅いところに蛍光ピークが観察されなかった（第 3 図）。このため、パルマハム中の主要な ZnPP 結合タンパク質は ZnPP が Hb 二量体と結合している可能性が示された。この結果は食肉中の Hb は主に二量体の状態で存在するという報告（Kranen *et al.*, 1999）と一致し、Hb 二量体の分子量、等電点、硫安沈殿の濃度範囲などの特性は、先行研究で報告された PHE 中の主要な ZnPP 結合タンパク質の特性（Adamsen *et al.*, 2006b; 林, 2009; 小林, 2008; 奥村, 2011; 斉藤, 2018; 山崎, 2007）とも一致した。Khozroughi ら（2019）はパルマハム中の ZnPP は

Mb の二量体と結合していると報告したが、本研究では Mb の二量体との ZnPP 複合体が観察されなかった。以上のことから、パルマハム中の水溶性 ZnPP 結合タンパク質は主に Hb 二量体と結合し、少量が Mb と結合していること、そして一部は分解を受けていることが示唆された。

PHE 中では ZnPP-Hb が ZnPP-Mb より多く (第 10 表)、ZnPP 複合体を形成していない Mb が多く観察された (第 19, 20 図, 第 9 表)。PHE の免疫沈降の実験においても Hb の免疫沈澱物の蛍光が高かった (第 21 図)。一般に、と畜時に放血のため食肉中では Mb が Hb よりも多く含まれている (西邑, 2011)。また、劣化した豚肉水抽出液においては Hb が Mb より少なかったが、ZnPP-Hb のみが形成されていた (第 24 図)。これらの結果から、ZnPP-Hb の形成能力は ZnPP-Mb より高いことが考えられる。Hb が Mb と比べて容易に ZnPP 複合体に形成する原因として、以下の 3 つが挙げられる。1 つ目は、死後の筋肉が食肉になると、その pH、浸透圧などが急激に変化し、赤血球は溶血する (Sowemimo-Coker, 2002; Warriss, 1977)。赤血球から放出された Hb 四量体は希釈、pH 低下のため、直ちに解離して二量体となり (Huang *et al.*, 2013; Schaer *et al.*, 2014)、ヘム解離速度が急速に上昇する (Hargrove *et al.*, 1997)。2 つ目は、Hb と Mb のアミノ酸残基の違いによるヘムのポケット内での安定性の影響がある。Mb 内のヘムは周囲の多くのアミノ酸残基と水素結合を形成することでヘムを安定化させている (Cai *et al.*, 2016; Hunter *et al.*, 1997)。一方、Hb の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の Leu (F7) と Leu (FG3)、 $\alpha$  鎖の His (CD3)、 $\beta$  鎖の Ser (CD3) はヘムとの水素結合が弱い、または形成できないため、ヘムの安定性は低くなる (Cai *et al.*, 2016; Hargrove *et al.*, 1994)。このため、Hb の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘム解離速度は Mb と比べてそれぞれ 50 倍と 1000 倍高い (Hargrove *et al.*, 1994; 1997)。3 つ目は、Hb と Mb の酸化されやすさの違いがある。食肉中の Mb が酸化され、metMb に変化しても酵素、非酵素、電子伝達系などの経路によりすぐに還元される (Ramanathan *et al.*, 2020)。

一方、赤血球から漏出した Hb は、還元酵素を失い、容易に酸化される (Schaer *et al.*, 2014)。Hb が酸化されると、ヘム解離速度は 50 倍以上に上昇する (Hargrove *et al.*, 1994)。以上のことから、食肉中で溶血して二量体化した Hb は、Mb よりもヘムが容易にヘムポケットから遊離することにより、Apo-Hb がより多く形成され、形成した遊離 ZnPP が結合されることで、ZnPP-Hb がより多く形成されると推察された。

一方、ZnPP の形成に関わる重要酵素である FECH はミトコンドリア中に局在しており、Hb と Mb の分布とは異なる。通常 Hb は血管内の赤血球中に存在している (Surgenor, 2012)。食肉中では赤血球は溶血し、内部の成分が毛細血管の壁を通り抜けて周囲の組織に侵入することが報告されており (Warris, 1977)、溶血によって Hb が筋肉組織に進入することが考えられる。食肉中の Hb の移動に関する報告は限られているが、生体内の溶血機構では Hb の食肉内の移動を強く支持している (Hargrove *et al.*, 1997; Schaer *et al.*, 2014)。さらに、Hb からヘムが遊離しやすいが、細胞外のヘムタンパク質と遊離ヘムはそれぞれエンドソームと HCP1 輸送タンパク質により細胞内に取り込まれることから (Larsen *et al.*, 2012)、Hb とその遊離ヘムのいずれも筋漿に浸透している可能性がある。また、長期熟成の食肉製品では組織の破壊なども起こっており、Hb は容易に移動すると考えられる。下田 (2012) は乾塩漬生ハムにおいては水溶性 ZnPP が筋線維中に一様に存在することを報告したことから、主要な水溶性 ZnPP である Hb や Mb との ZnPP 複合体は筋漿に存在すると考えられる。一方、FECH と遊離ヘムの接触に関しては、筋漿中の Hb と Mb からヘムが遊離したが、ヘムをミトコンドリア内部に輸送するタンパク質に関する報告がなかった (Larsen *et al.*, 2012)。ミトコンドリア外膜が熟成中に破壊されるために遊離ヘムが FECH に接触したか、ミトコンドリアの外膜にも位置する FECH (Sakaino *et al.*, 2009) が Hb と Mb 由来の遊離ヘムを触媒して ZnPP に形成したか、ミトコンドリア内部から形成した ZnPP

が外部へ遊離した可能性が考えられる。以上のことから、筋漿内に局在する Mb と筋漿内に移動した Hb のヘムが遊離後、ZnPP と結合して複合体を形成することが示唆されたが、遊離ヘムと FECH の接触による ZnPP の形成については明らかにすることができなかった。

パルマハム中の Hb と Mb は大部分がインタクトまたはインタクトに近い状態で存在しており、Hb と Mb の部分分解はそれらの ZnPP 複合体形成量との関連性はみられなかった（第 23, 25 図）。Paganelli ら（2016）はペプシンを用いて Mb を 13 kDa まで分解することにより、ヘムと FECH の接触を促進して ZnPP を形成させると報告した。一方、ZnPP 形成モデル中では、Mb の分解はあまり起こらず、Mb の分解が ZnPP の形成に必要ではないことが示唆された（Khozroughi *et al.*, 2017）。IS モデルではヘムタンパク質の著しい分解が起こり（Wakamatsu *et al.*, 2019）、大量の遊離ヘムを形成して ZnPP の形成を促進した（第 3, 4, 5 表）。しかし、パルマハムの熟成期間にヘムタンパク質の分解はあまり起こらず（第 25 図）、ZnPP 結合タンパク質の形成への促進効果はみられなかった。IS モデルのようなヘムタンパク質の著しい分解は ZnPP の形成を促進するが、パルマハムではヘムタンパク質の分解が起こっていなくても大量の ZnPP 結合タンパク質が形成した。このため、ZnPP 形成にはヘムタンパク質の分解は不可欠ではないことが示唆された。

HIC による PHE の分離では、1 M 硫安濃度で溶出した ZnPP-Hb が含まれる主要な蛍光ピーク以外に、0 M 硫安濃度で溶出した小さい蛍光ピークが観察された（第 9 図）。この小さい蛍光ピークでは ZnPP の蛍光特性が示された（データ示さず）。ZnPP-Mb は主要な蛍光ピークに含まれなかったものの（第 18, 20 図）、一般に HIC では Mb は Hb より高い硫安濃度、つまり溶出時間が早い方に溶出される（Han *et al.*, 1994; Oellingrath *et al.*, 1990）ため、この小さいピークは ZnPP-Mb 由来ではないと考えられる。また、40%硫安飽和濃度では Mb が沈殿しない（Kranen *et al.*, 1999）ため、40%飽和硫安で処理した

試料では Mb が上清液に存在し、HIC に供試されている。ZnPP-Mb が検出されない原因としては、パルマハムの ZnPP 複合体は高硫安濃度により ZnPP を解離させた報告（山崎, 2007）があることから、硫安沈殿で用いられた高硫安濃度で ZnPP が Mb から解離したためかもしれない。また、食肉中のヘムタンパク質は、Hb と Mb 以外に、微量のカタラーゼ、シトクロムなども存在している。これらの微量ヘムタンパク質が Hb と Mb と同様に ZnPP 結合タンパク質に形成する可能性があり、HIC で溶出した小さい蛍光ピークとして検出されたと考えられる。しかし、これらの ZnPP 結合タンパク質は極めて微量のため、尿素-PAGE 後の蛍光検出で観察できず、本研究では同定できなかった。

PHE の尿素-PAGE 蛍光像には ZnPP 結合タンパク質以外にも最下端に遊離 ZnPP が観察された（第 17 図）。この結果は、これまでの報告（林, 2009）と一致した。一般に、ZnPP 自体は不溶性のため、水抽出できないと考えられる（Møller *et al.*, 2007）が、低分子であるため、凝集していなければ水溶液中に分散している可能性もある。また、高濃度尿素が Hb や Mb の His-Fe 結合を弱めることが報告されているため（Wollocko *et al.*, 2017）、一部の ZnPP は尿素-PAGE 中に Hb、Mb もしくは他の非特異的結合タンパク質から外れた可能性も考えられるが、本研究では明らかにすることはできなかった。

以上の結果をまとめると、パルマハム中における水溶性 ZnPP 複合体は、主に ZnPP-Hb とその分解産物であり、Mb との複合体は多くはないことが明らかとなった。また、パルマハム中の Hb と Mb はあまり分解されず、部分分解は ZnPP 結合タンパク質の形成に不可欠ではなく、促進効果もみられなかった。それらの複合体の由来は、溶血後、二量体化した Hb が筋漿内に移動し、Mb と共にヘムが遊離されて形成した Apo-Hb と Apo-Mb であると考えられる。Hb のヘム解離速度は Mb より高いため、Apo-Hb がより多く形成され、遊離 ZnPP と結合して多くの ZnPP-Hb を形成することが示唆された。しかし、遊離 ZnPP の由来については明らかにできなかった。

## 第 4 章 総合考察

本研究では、パルマハムにおける ZnPP 形成機構を明らかにするために、豚肉中において ZnPP 形成の遅筋型機構と非依存型機構を再現した IS と LTL モデルを用いて、提唱されている ZnPP 形成経路における関連物質の量的推移を測定し、両モデルにおける ZnPP 形成経路の解明を試みた。また、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し、異なる水溶性 ZnPP 複合体様相を形成する両モデルとの関連性とパルマハムにおける ZnPP 形成機構の解明を試みた。

### 第 1 節 IS モデルにおける ZnPP 形成の推定機構

最適 pH 4.75 の IS モデルは、Mb のグロビン部分の著しい分解によって、大量に形成された遊離ヘムが脱鉄されて PPIX を形成して直ちに、亜鉛が挿入されて ZnPP を形成することが示唆された（第 3, 4, 5 表）。しかし、Chau ら（2011）のヘム、ヘムタンパク質と FECH の標準品を用いたモデルではヘム脱鉄反応の最適 pH は 5.5 であり、最適 pH 4.75 の ZnPP 形成機構は観察されなかった。Mb と Hb のグロビンは水溶液中では pH 4.75 で分解されない（Chi & Asher, 1998; Kristinsson, 2002）が、IS モデルではヘムタンパク質が分解された（Akter, 2019）。このため、IS モデルにおけるヘムタンパク質の分解は食肉中の内因性プロテアーゼによるものと考えられる。食肉や乾塩漬生ハム中のもっとも活性が高い内因性プロテアーゼであるカテプシン D は主に pH 3–5 に作用しており（Sentandreu *et al.*, 2007; Toldrá & Etherington, 1988）、pH 4.75 ほどの低さになるとヘムタンパク質の分解により遊離ヘムを大量に増加させたと考えられる。一方、FECH が触媒するヘムの脱鉄反応と PPIX への亜鉛挿入反応は pH 5.5 より低いほど弱くなり、pH 4.5 まで低下すると

FECH 活性はほぼ消失する (Chau *et al.*, 2011)。このため、IS モデルの最適 pH 4.75 は、ヘムタンパク質が内因性プロテアーゼにより著しく分解されて多量の遊離ヘムが形成され、かつ FECH の活性がある程度残っている pH であると考えられる。

また、IS モデルでは ZnPP 形成量は遅筋型筋線維の割合と正の相関を示した。遅筋型筋線維は速筋型筋線維と比べると、ヘムタンパク質、ミトコンドリアがより多く含まれ(西邑, 2011)、ZnPP の前駆物質や関連酵素が多い。一方、と畜後の遅筋型筋線維のタンパク質分解程度は速筋型筋線維より低い (Muroya *et al.*, 2010)。IS モデルではホモジネートを使用するため、筋肉中の局在とは関係なく、組織が壊されるため、ヘムタンパク質が大量分解されて形成した遊離ヘム量とミトコンドリアに含まれる内因性遊離ヘムや FECH が、ZnPP 形成量と遅筋型筋線維の正の相関に寄与した可能性がある。

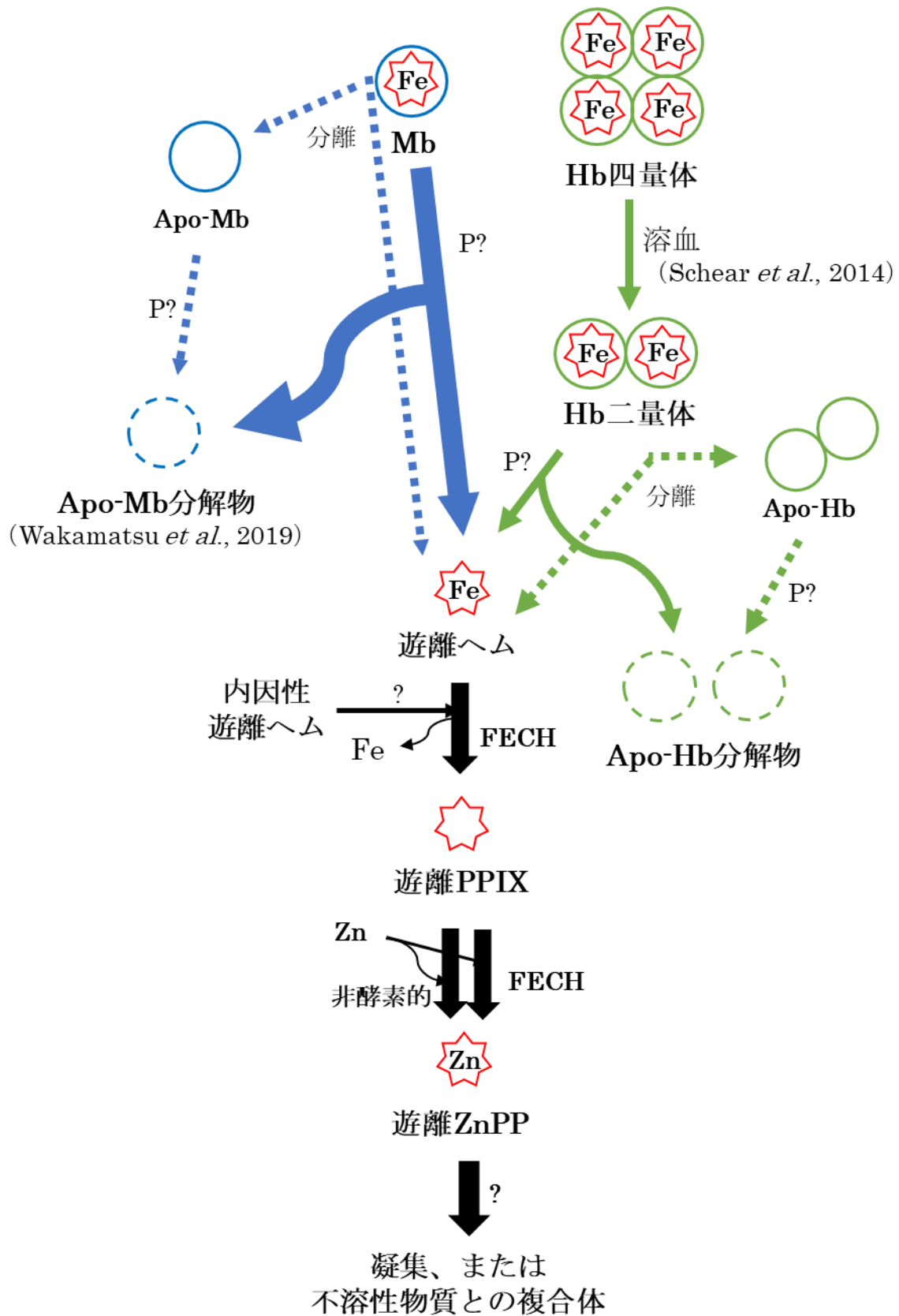
一方、SEC-HPLC を用いて PHE の分析では、35 kDa と 5 kDa の蛍光物質が検出され(第 3, 4 図)、5 kDa 蛍光物質は蛍光スペクトルから水溶性 ZnPP 複合体ではないことが示された(第 5 図 b)。しかし、齋藤(2018)の同様の分析方法から、IS モデルでは 5 kDa の蛍光物質のみが形成された。このため、IS モデルでは水溶性 ZnPP 複合体を形成せず、形成された ZnPP は全て不溶性の状態で存在することが示唆された。パルマハム中では Hb と Mb の両方の ZnPP 複合体が観察され、ヘムの遊離反応を発生することが可能であるが、IS モデルでは全てのヘムタンパク質が分解されたため、ヘムタンパク質からの遊離反応を明らかにできなかった。以上のことから、IS モデルでは食肉内因性プロテアーゼによる Hb と Mb の分解によって、第 3 章で示したように水溶化するための Apo-Hb や Apo-Mb が存在しないため、水溶性 ZnPP 複合体を形成できず、不溶化していることが示唆された。

以上のことから、推察される IS モデルにおける ZnPP 形成機構の推定経路

を第 27 図に示す。死後の筋肉が溶血後、Hb 四量体は速やかに二量体となって、食肉中に存在している。IS モデルのインキュベート期間に、Hb 二量体からヘムが遊離して Apo-Hb を形成後、食肉中の内因性プロテアーゼにより分解、あるいは、Hb 二量体がプロテアーゼにより著しく分解されながらヘムを遊離していることが考えられる。一方、Mb も同様に Apo-Mb とヘムに分離された後に内因性プロテアーゼによる Apo-Mb の分解、あるいは、分解されながらヘムを遊離することが考えられる。しかし、Mb の疎水ポケットにおけるヘムの安定性が Hb よりも高いため、分解を受けながらヘムを放出する可能性が高いと考えられる。また、肉中では Hb よりも Mb の含有量が高いため遊離するヘムは Mb 由来の方が多いと考えられる。形成された多量の遊離ヘムは、ミトコンドリア由来の内因性遊離ヘム（第 2 図）と共に FECH により脱鉄されて遊離 PPIX となり、再び FECH により酵素的、または非酵素的に亜鉛が挿入されて遊離 ZnPP を形成する。水溶化するための Apo-Hb や Apo-Mb が分解消失しているため、ZnPP は凝集して不溶化したり、不溶性物質と結合することによって不溶性として存在することと推測した。

## 第 2 節 LTL モデルにおける ZnPP 形成の推定機構

SEC-HPLC 分析においては、PHE から分離された 35 kDa 蛍光物質は第 3 章の結果から、主に溶血して二量体となった Hb の ZnPP 複合体であることが示唆された（第 5, 26 図、第 10 表）。齋藤（2018）の LTL モデルにおいてもパルマハムで観察された同程度の分子量の蛍光物質が観察されたことから、LTL モデルも同様に Hb 二量体の ZnPP 複合体を形成することが考えられる。また、パルマハムにおいては ZnPP-Hb 以外にも、微量の ZnPP-Mb が観察された。LTL モデル中の Mb から ZnPP-Mb を形成する経路が存在するが、Mb のヘム解離速度が Hb より遅く、インキュベート期間はわずか数日間のため、観察される程度に形成できなかったのかもしれない。以上のことから、LTL モ



第 27 図 IS モデルの ZnPP 形成における遅筋型機構の推定経路

線の太さ: 関与の強さ、破線: 起こりうる反応経路、青線: Mb が関わる経路、緑線: Hb が関わる経路、P: プロテアーゼによる分解、?: 関与不明を示す。

デル中の水溶性 ZnPP 複合体は、パルマハムと同じように、主に溶血して二量体となった Hb からヘムが遊離されて Apo-Hb を形成し、遊離 ZnPP と結合した ZnPP-Hb 複合体であることが示唆された。

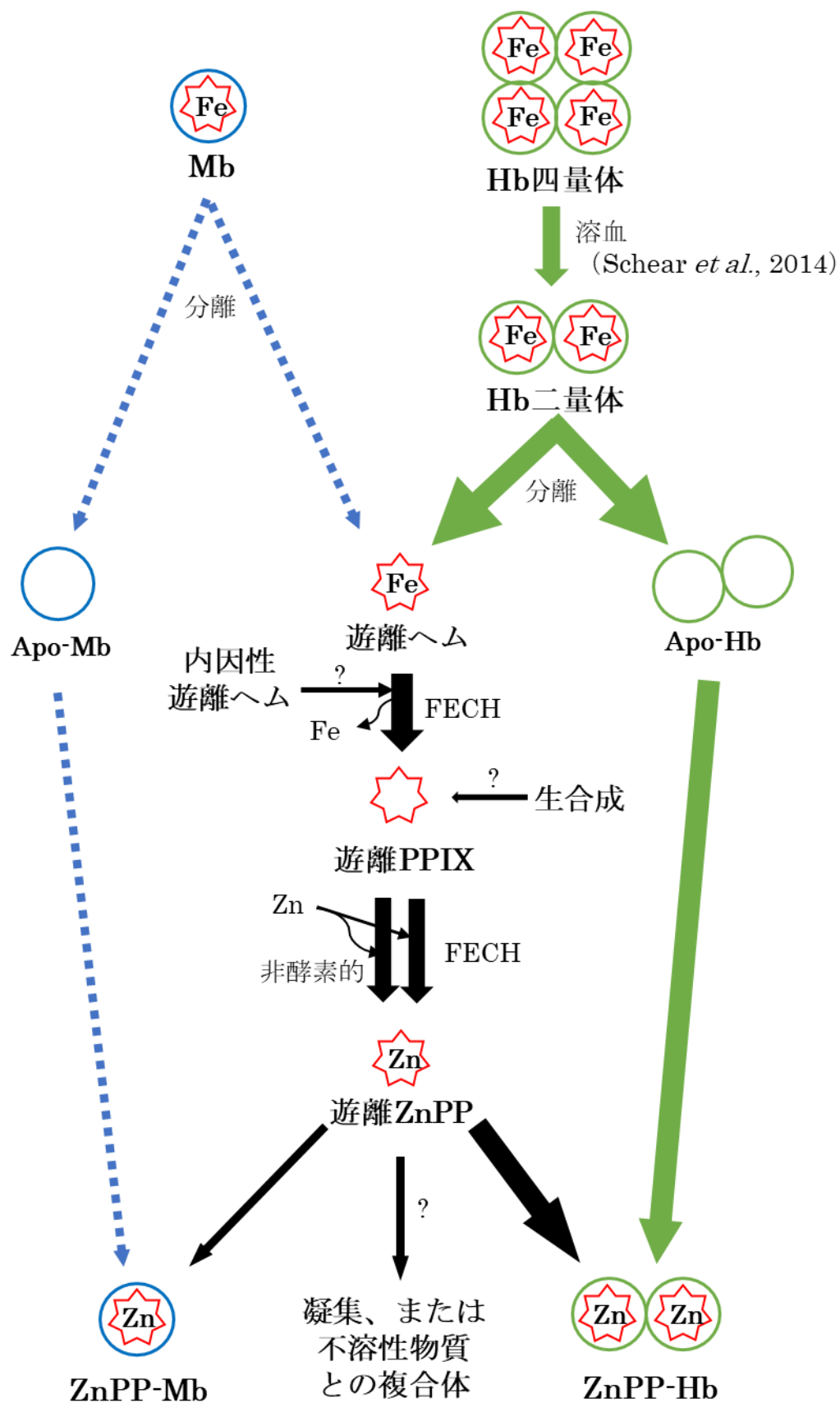
LTL モデルにおける ZnPP の形成経路は、関連物質の量的推移から PPIX が形成されると直ちに亜鉛が挿入されて ZnPP に形成されると推察されたが（第 5 表）、PPIX の由来を明らかにできなかった。ヘムタンパク質から遊離したヘムは、パルマハム中ではミトコンドリア中の FECH の局在とは異なるため、それらの接触によるヘム脱鉄経路の発生を明らかにできなかったが、LTL モデルでは筋肉組織が均質になるホモジネートが用いられるため、ミトコンドリア内の内因性遊離ヘムだけでなく、ヘムタンパク質からの遊離ヘムも FECH と接触することは可能である。また、LTL モデルの pH 5.5 は FECH の最適脱鉄 pH と一致し（Chau *et al.*, 2011）、ヘムを添加すると PPIX の形成を促進することから、ヘム脱鉄反応の可能性を示した（林, 2009）。Akter（2019）は LTL モデルにおける Mb の添加が ZnPP の形成を促進しないと報告したが、Mb のヘム解離速度が遅く、Mb 由来のヘムが FECH に利用されにくいという本研究の推察と一致した。このため、LTL モデルではヘム脱鉄経路を介して ZnPP を形成することは可能であるが、反応速度はヘムタンパク質のヘム解離速度に制限されるかもしれない。

また、LTL モデルでは最適 pH は 5.5 であり、ZnPP の形成量が筋線維型の割合に依存しない。LTL モデルではヘム脱鉄経路による ZnPP の形成が示唆され、ヘムの解離速度が ZnPP 結合タンパク質の形成量に大きく影響するため、ヘムの解離速度と FECH による脱鉄反応は ZnPP の形成に重要であると考えられる。この 2 つの要因はいずれも pH、ヘムの酸化還元状態、温度に大きく影響される（Hargrove *et al.*, 1994）。pH が低いほど、Hb と Mb からヘムの解離速度は速くなる一方、pH 5.5 に近づくほど FECH 活性が高くなる。ヘムタンパク質が酸化されると、ヘム解離速度が速くなる（Hargrove *et al.*,

1994) が、還元剤の添加は FECH によるヘム脱鉄反応を促進し、ZnPP の形成を促進した (Chau *et al.*, 2011)。また、温度が高いほどヘムの解離速度が上昇するが、FECH の最適温度を超えると ZnPP の形成は減少した (Chau *et al.*, 2010)。以上のように、pH、温度、ヘムの酸化還元状態がヘム遊離速度と FECH による脱鉄反応にいくつか逆の効果が示されたが、LTL モデル中の ZnPP 形成最適条件は FECH によるヘム脱鉄反応の最適条件に類似しており、ヘムの解離速度よりも、FECH によるヘムの脱鉄反応の方が重要であると推察された。ヘム脱鉄反応に影響する pH、温度、ヘム酸化還元状態は筋線維型と関係ないため、ZnPP の形成には筋線維型に依存しないのかもしれない。

LTL モデルの ZnPP 形成能は、IS モデルと比べて著しく低かった(第 4 表)。LTL モデル中ではヘムタンパク質が分解されないこと (本間, 2016) から、LTL モデルの大部分のヘムがヘムタンパク質の疎水性ポケットに留まっており、わずか少量のヘムしか遊離できないのかもしれない。一方、IS モデルではヘムタンパク質の著しい分解により大部分のヘムを遊離させた。このため、LTL モデルでは FECH と接触できる遊離ヘムの量は IS モデルより遥かに少ないため、ZnPP の形成能が低いことと考えられる。

以上のことから、LTL モデルにおける ZnPP 形成量は筋線維型に依存しない機構 (非依存型機構) を第 28 図に示す。LTL モデルでは溶血して二量体となった Hb からヘムが遊離されて Apo-Hb を形成する。遊離されたヘムと内因性遊離ヘムはヘム脱鉄経路を介して遊離 ZnPP を形成した後、再び Apo-Hb と結合して ZnPP-Hb を形成することが示唆された。一方、Mb も同様のヘム遊離反応が起きると考えられるが、ヘムは疎水ポケット内に安定に留まり、Hb よりもヘムが遊離されにくく、Apo-Mb の産生量が少ないため、形成された ZnPP は豊富な Apo-Hb と結合することと考えられる。Apo-Hb と Apo-Mb に結合しない ZnPP は、凝集して不溶化したり、不溶性タンパク質などと結合する可能性がある。本研究では LTL モデル中において生合成経路から PPIX の



第 28 図 LTL モデルの ZnPP 形成における非依存機構の推定経路

線の太さ: 関与の強さ、破線: 起こりうる反応経路、青線: Mb が関わる経路、緑線: Hb が関わる経路、?: 関与不明を示す。

形成を明らかにすることはできなかった。

### 第3項 パルマハムにおける ZnPP 形成の推定機構

遅筋型機構を再現する IS モデルでは、ヘムタンパク質の著しい分解から形成される遊離ヘムがヘム脱鉄経路を介して、多量の不溶性 ZnPP を形成する（第 27 図）が、パルマハムにおけるヘムタンパク質はほとんど分解されなかった（第 25 図）。また、IS モデルでは筋肉組織が均質されたホモジネートが用いられたため、筋肉中における ZnPP 形成の重要物質の局在は ZnPP の形成に影響がなかったが、パルマハムにおいてはヘムタンパク質と FECH の局在が異なる。ヘムは筋漿中のヘムタンパク質の疎水ポケット中に配位しているため、それらのヘムはミトコンドリア中に局在している FECH と反応するのは容易ではないと考えられる。このため、提唱された IS モデル中の ZnPP 形成機構はパルマハムにおいては重要ではないと考えられる。一方、乾塩漬生ハムにおいては、ZnPP 形成能が高く、遅筋型筋線維の割合と正の相関を呈する機構が報告された（下田, 2012; 2014）。この遅筋型機構で形成された ZnPP は主に不溶性であり、ミトコンドリア中に局在している。このため、パルマハムにおける遅筋型機構はヘムタンパク質の分解由来のヘムではなく、ミトコンドリア内部の ZnPP 形成機構、例えば生合成経路から形成された PPIX に亜鉛が挿入されるか、ミトコンドリア中の内因性遊離ヘムがヘム脱鉄経路を介して遊離 ZnPP を形成する可能性がある。

パルマハムで形成される主要な水溶性 ZnPP 複合体は ZnPP-Hb であり、他にも少量の ZnPP-Mb、両 ZnPP 複合体の分解産物が観察された。一方、非依存機構を再現する LTL モデルでも主に ZnPP-Hb である水溶性 ZnPP 複合体の形成が考えられた（第 28 図）。パルマハムの pH は LTL モデルの至適 pH 5.5 に近いいため、同様の ZnPP 形成機構が起こる可能性がある。パルマハムの熟成期間は LTL モデルのインキュベート期間より遥かに長いため、ZnPP-Hb

だけでなく、ヘム解離速度が遅い Mb 由来の ZnPP 複合体の形成が観察されるようになったと考えられる。また、LTL モデルではヘムタンパク質が分解されなかったが（本間, 2016）、パルマハムではヘムタンパク質の部分分解による ZnPP 複合体の形成の促進はみられなかった（第 23 図）。このため、パルマハム中のヘムタンパク質から水溶性 ZnPP 複合体の形成経路とヘムタンパク質部分分解とは独立の反応であることが示唆された。一方、乾塩漬生ハムにおいては ZnPP 形成能が弱く、ZnPP 形成量が筋線維型の割合に依存しない機構が観察された（下田, 2012）。この非依存型機構で形成される ZnPP は主に水溶性 ZnPP として筋漿に局在していると報告されたため、パルマハムにおける ZnPP-Hb は筋漿に分布していると考えられる。しかし、筋漿中のヘムタンパク質からの遊離ヘムとミトコンドリア内の FECH の局在が異なるため、LTL モデルのようなヘム脱鉄経路の発生を明らかにできなかった。遊離 ZnPP は生合成経路やミトコンドリア中の内因性ヘムから形成され、ミトコンドリア外膜を通して筋漿内に移動する可能性も考えられる。以上のことから、パルマハムにおける水溶性 ZnPP 形成機構は非依存型機構と相似していると考えられるが、遊離 ZnPP の由来は明らかにできなかった。

パルマハムにおける ZnPP 形成機構を推察した（第 29 図）。パルマハムでは溶血された後、Hb 四量体は速やかに二量体となり、ヘムは Hb 二量体の疎水性ポケットに不安定であるため、ヘムが容易に遊離して Apo-Hb を形成する。Apo-Hb は形成された遊離 ZnPP と結合することで、ZnPP-Hb を形成する。長期熟成のパルマハムでは、内因性プロテアーゼによる Hb 二量体、Apo-Hb、ZnPP-Hb の各段階で部分分解して、ZnPP-Hb 部分分解物を形成することが示唆されたが、どの段階で主に起こっているかは明らかにできなかった。さらに、グロビンの部分分解は水溶性 ZnPP 複合体形成の各段階への影響がみられなかった。一方、Mb は Hb 二量体と同様な経路が発生するが、Mb の疎水ポケット中のヘムは Hb 二量体のヘムより安定であり、ヘム解離速度は遅



いため、Apo-Mb の形成量が Apo-Hb と比べて少なくなり、ZnPP-Mb の蓄積は ZnPP-Hb よりも少ないと考えられた。また、Hb と同様に各段階でのプロテアーゼによる分解が起こっていることが示唆されたが、どの段階で主に起こっているかは明らかにできなかった。ヘムタンパク質からの遊離ヘムは、FECH との接触が不明であるため、脱鉄反応の発生を明らかにできなかった。PPIX の由来に関しては、生合成経路やミトコンドリア中の内因性遊離ヘムを由来とするヘム脱鉄経路を介した遊離 PPIX の形成の可能性も考えられる。PPIX が FECH による酵素的または非酵素的に亜鉛が挿入されて ZnPP を形成後、Apo-Hb と結合して水溶性の ZnPP-Hb およびその分解物としてパルマハムに存在することが示唆された。しかし、パルマハムにおける不溶性 ZnPP に関しては、遊離 ZnPP の凝集体や不溶性物質と結合している可能性があり、今後検討する必要がある。

## 第 5 章 要約

本研究では豚肉中の ZnPP 形成の遅筋型機構と非依存型機構、ヘム脱鉄経路と生合成経路の関連性を解明して、パルマハムにおける ZnPP 形成機構を推定することを目的に、それぞれの機構を再現する IS と LTL モデルを用いて、関連物質の量的推移を測定した。また、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。IS モデルでは、わずかの PPIX の形成、ヘム鉄の減少と非ヘム鉄の増加が観察された。このため、IS モデルでは、ヘム脱鉄経路を介してヘムから 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た。一方、LTL モデルでは、ZnPP 形成量が各形成経路における関連物質の検出精度以下であったため、生合成経路とヘム脱鉄経路の関与を明らかにできなかったが、PPIX が形成されると、直ちに亜鉛が挿入されて ZnPP を形成し、多くの水溶性の ZnPP 複合体を形成することが示唆された。パルマハムでは IS モデルのようなヘムタンパク質の著しい分解がなく、IS モデルの挙動とは大きく異なっていた。一方、パルマハム中の ZnPP 形成機構は LTL モデルのように水溶性 ZnPP 複合体が形成され、それらの結合タンパク質は Hb、Mb とそれらの分解産物であると同定され、分子量などから Hb は二量体の状態で存在することが示唆された。水溶性 ZnPP 複合体の形成経路は、溶血して二量体となった Hb はヘムが遊離されやすいため Apo-Hb となり、形成された ZnPP が Apo-Hb と結合するため、ZnPP-Hb 複合体が形成されたと推察された。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに論文作成において、研究の自由探索機会や能力の伸びる環境を作り、丁寧のご指導、ご助言をくださいました若松純一准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行ならびに論文のご校閲の際に、貴重なご意見を頂きました玖村朗人教授、西邑隆徳教授、早川徹助教に深く感謝いたします。

試料採取や日常業務の際、お世話になりました鳥羽悠技術職員、日置昭二技術職員および農学部事務員の皆様に深く感謝いたします。

1年半、異なる国からの留学生との交流を企画し、生活面に多大の支援をくださいました岩谷直治記念財団に深く感謝いたします。

留学の際、多大のご協力、ご助言をくださいました台湾大学の陳力騏教授、謝博全准教授に深く感謝いたします。

いつも元気よく、研究面、生活面に多大の助力になってくださいました阿部悠さんに深く感謝いたします。同じ研究グループとして、たくさんの議論の場と成長の機会をくださいました Mofassara Akter さん、Md. Asaduzzaman 君、Md. Kauser-Ul-Alam 君、翟洋君、呼倫君、中原健人君、齋藤貴洋君、尾崎あかりさん、池谷征君、加藤聖弥君、栗子和洋君、青井綾花さん、金子真也君、丸岡夏実さん、山之内海映さん、譚業穎さんに深く感謝いたします。研究室での生活において、温かく接し、楽しませてくださいました町谷泰紀君、佐藤恵実さん、高橋勇太郎君、細野誠君、窪野佑君、前田菖花さん、李宗霖さん、趙芄さん、Napaporn Chintagavongse さん、岡田実那美さん、松崎陽平君、工藤秀佳さん、米田智樹君、宍戸雄君、滝口颯君、宮木温香さん、Sermsakul Siriwedchayant さん、季明萱さんに深く感謝いたします。

3年間、研究生活ループからの心を休める居場所になり、貴重な体験として日本への認識、交流を深める機会をくださいました北海道大学スカッシュ部の

皆さんに深く感謝いたします。

最後に、何不自由もない留学生活を送らせて頂き、いつも暖かく支えてくれた家族に深く感謝いたします。

## 引用文献

阿部 悠 (2020) パルマハムから水抽出できない亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) の存在状態に関する研究、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文

Adamsen, C. E., Møller, J. K., Hismani, R., & Skibsted, L. H. (2004).

Thermal and photochemical degradation of myoglobin pigments in relation to colour stability of sliced dry-cured Parma ham and sliced dry-cured ham produced with nitrite salt. *European Food Research and Technology*, 218, 403-409.

Adamsen, C. E., Møller, J. K., Laursen, K., Olsen, K., & Skibsted, L. H.

(2006a). Zn-porphyrin formation in cured meat products: Effect of added salt and nitrite. *Meat Science*, 72, 672-679.

Adamsen, C. E., Møller, J. K., Parolari, G., Gabba, L., & Skibsted, L. H.

(2006b). Changes in Zn-porphyrin and proteinous pigments in italian dry-cured ham during processing and maturation. *Meat Science*, 74, 373-379.

Ahn, D. U., Wolfe, F. H., & Sim, J. S. (1993). Three methods for determining nonheme iron in turkey meat. *Journal of Food Science*, 58, 288-291.

Akter, M. (2019) Study on the ZnPP formation mechanism in two different

optimum pH at pH 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)、北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻、博士論文

Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S., & Jo, C. (2015).

Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 37-49.

Andrée, S., Jira, W., Schwind, K. H., Wagner, H., & Schwägele, F. (2010).

Chemical safety of meat and meat products. *Meat Science*, 86, 38-48.

青井 綾花 (2018) 各畜種での亜鉛プロトポルフィリン IX 形成に及ぼす pH と筋線維型の影響、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文

Asaduzzaman, Md. (2020) Studies on the color improvement technique &

mechanism with high ZnPP-forming bacteria in dry-cured meat

products (高 ZnPP 形成細菌による乾塩漬食肉製品の色調改善技術とそ

の改善機構に関する研究)、北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻、博

士論文

Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A.,

Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends:

A review of consumer food choice behavior and discussion of industry

implications. *Food Research International*, 99, 58-71.

- Becker, E. M., Cardoso, D. R., & Skibsted, L. H. (2011). Quenching of excited states of red-pigment zinc protoporphyrin IX by hemin and natural reductors in dry-cured hams. *European Food Research and Technology*, *232*, 343-349.
- Becker, E. M., Westermann, S., Hansson, M., & Skibsted, L. H. (2012). Parallel enzymatic and non-enzymatic formation of zinc protoporphyrin IX in pork. *Food Chemistry*, *130*, 832-840.
- Bedale, W., Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2016). Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. *Meat Science*, *120*, 85-92.
- Bou, R., Llauger, M., Arnau, J., & Fulladosa, E. (2018). Zinc-protoporphyrin content in commercial Parma hams is affected by proteolysis index and marbling. *Meat Science*, *139*, 192-200.
- Bou, R., Llauger, M., Arnau, J., Olmos, A., & Fulladosa, E. (2020). Effects of post mortem pH and salting time on Zinc-protoporphyrin content in nitrite-free Serrano dry-cured hams. *Food Research International*, 109156.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., & Corpet, D.

- (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 16, 1599-1600.
- Cai, H., Tatiyaborworntham, N., Yin, J., & Richards, M. P. (2016). Assessing low redox stability of myoglobin relative to rapid hemin loss from hemoglobin. *Journal of Food Science*, 81, C42-C48.
- Camadro, J. M., & Labbe, P. (1982). Kinetic studies of ferrochelatase in yeast: Zinc or iron as competing substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 707, 280-288.
- Camadro, J. M., Ibrahim, N. G., & Levere, R. D. (1984). Kinetic studies of human liver ferrochelatase. Role of endogenous metals. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 5678-5682.
- Chau, T. T., Ishigaki, M., Kataoka, T., & Taketani, S. (2010). Porcine ferrochelatase: The relationship between iron-removal reaction and the conversion of heme to Zn-protoporphyrin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 1415-1420.
- Chau, T. T., Ishigaki, M., Kataoka, T., & Taketani, S. (2011). Ferrochelatase catalyzes the formation of Zn-protoporphyrin of dry-cured ham via the conversion reaction from heme in meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12238-12245.

- Chi, Z., & Asher, S. A. (1998). UV resonance Raman determination of protein acid denaturation: selective unfolding of helical segments of horse myoglobin. *Biochemistry*, *37*, 2865-2872.
- Courrol, L. C., & Samad, R. E. (2018). Determination of chicken meat contamination by porphyrin fluorescence. *Journal of Luminescence*, *199*, 67-70.
- Davidson, R. E., Chesters, C. J., & Reid, J. D. (2009). Metal ion selectivity and substrate inhibition in the metal ion chelation catalyzed by human ferrochelatase. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*, 33795-33799.
- de Jong, E. P., Melanson, J. E., & Lucy, C. A. (2004). Noncovalent labeling of myoglobin for capillary electrophoresis with laser - induced fluorescence detection by reconstitution with a fluorescent porphyrin. *Electrophoresis*, *25*, 3153-3162.
- De Maere, H., Chollet, S., Claeys, E., Michiels, C., Govaert, M., De Mey, E., Paelinck, H., & Fraeye, I. (2017). In vitro zinc protoporphyrin IX formation in different meat sources related to potentially important intrinsic parameters. *Food and Bioprocess Technology*, *10*, 131-142.
- Delcanale, P., Montali, C., Rodríguez-Amigo, B., Abbruzzetti, S., Bruno, S., Bianchini, P., Diaspro, A., Agut, M., Nonell, S., & Viappiani, C. (2016).

Zinc-substituted myoglobin is a naturally occurring photo-antimicrobial agent with potential applications in food decontamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8633-8639.

Durek, J., Bolling, J. S., Knorr, D., Schwägele, F., & Schlüter, O. (2012).

Effects of different storage conditions on quality related porphyrin fluorescence signatures of pork slices. *Meat Science*, 90, 252-258.

Feitelson, J., & Spiro, T. G. (1986). Bonding in zinc proto- and

mesoporphyrin substituted myoglobin and model compounds studied by resonance Raman spectroscopy. *Inorganic Chemistry*, 25, 861-865.

Font-i-Furnols, M., & Guerrero, L. (2014). Consumer preference, behavior

and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Science*, 98, 361-371.

Gassara, F., Kouassi, A. P., Brar, S. K., & Belkacemi, K. (2016). Green

alternatives to nitrates and nitrites in meat-based products—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2133-2148.

Grasso, S., Brunton, N. P., Lyng, J. G., Lalor, F., & Monahan, F. J. (2014).

Healthy processed meat products—Regulatory, reformulation and consumer challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 39, 4-17.

Grossi, A. B., do Nascimento, E. S., Cardoso, D. R., & Skibsted, L. H. (2014).

Proteolysis involvement in zinc–protoporphyrin IX formation during

Parma ham maturation. *Food Research International*, 56, 252-259.

Han, D., McMillin, K. W., & Godber, J. S. (1994). Hemoglobin, myoglobin,

and total pigments in beef and chicken muscles: Chromatographic

determination. *Journal of Food Science*, 59, 1279-1282.

Hargrove, M. S., Singleton, E. W., Quillin, M. L., Ortiz, L. A., Phillips, G. N.,

Olson, J. S., & Mathews, A. J. (1994). His64 (E7)--> Tyr apomyoglobin

as a reagent for measuring rates of heme dissociation. *The Journal of*

*Biological Chemistry*, 269, 4207-4214.

Hargrove, M. S., Whitaker, T., Olson, J. S., Vali, R. J., & Mathews, A. J.

(1997). Quaternary structure regulates heme dissociation from human

hemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 17385-17389.

服部 昭仁 (2011) 乳肉卵の機能と利用、第 2 章 9 講、アイ・ケイコーポレ

ーション、東京

林 宣隆 (2009) 発色剤無添加の食肉製品における亜鉛プロトポルフィリン

IX (ZPP) 形成機構に関する研究、北海道大学大学院農学院共生基盤学専

攻、修士論文

Hazell, T. (1982). Iron and zinc compounds in the muscle meats of beef, lamb,

pork and chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33, 1049-1056.

Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68-76.

本間 文佳 (2014) 亜鉛プロトポルフィリン IX 形成に及ぼす筋線維型と pH の影響、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文

本間 文佳 (2016) 至適 pH の異なる 2 つの亜鉛プロトポルフィリン IX 形成機構に関する研究、北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻、修士論文

Huang, Y. X., Wu, Z. J., Huang, B. T., & Luo, M. (2013). Pathway and mechanism of pH dependent human hemoglobin tetramer-dimer-monomer dissociations. *PLoS One*, 8, e81708.

Hunter, C. L., Lloyd, E., Eltis, L. D., Rafferty, S. P., Lee, H., Smith, M., & Mauk, A. G. (1997). Role of the heme propionates in the interaction of heme with apomyoglobin and apocytochrome *b<sub>5</sub>*. *Biochemistry*, 36, 1010-1017.

Ishikawa, H., Kawabuchi, T., Kawakami, Y., Sato, M., Numata, M., & Matsumoto, K. (2007). Formation of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX from oxymyoglobin in porcine heart mitochondria. *Food Science and Technology Research*, 13, 85-88.

- Khozroughi, A. G., Jander, E., Schirrmann, M., Rawel, H., Kroh, L. W., & Schlueter, O. (2017). The role of myoglobin degradation in the formation of zinc protoporphyrin IX in the longissimus lumborum of pork. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 22-27.
- Khozroughi, A. G., Kroh, L. W., Schlüter, O., & Rawel, H. (2018). Assessment of the bacterial impact on the post-mortem formation of zinc protoporphyrin IX in pork meat. *Food Chemistry*, 256, 25-30.
- Khozroughi, A. G., Braga, T. W., Wagner, J., & Rawel, H. (2019). Investigation of the post mortem zinc protoporphyrin IX fluorescence with respect to its protein-bound and unbound occurrence in aqueous meat extracts. *Food Chemistry*, 283, 462-467.
- 小林 瑞穂 (2008) パルマハム水抽出液における ZPP の存在状態に関する研究、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文
- 小島 一良、安井 明美 (1993) 動物性食品中のヘム鉄及び非ヘム鉄の分別定量法、日本食品工業学会誌、40、35-41
- Kranen, R. W., Van Kuppevelt, T. H., Goedhart, H. A., Veerkamp, C. H., Lambooy, E., & Veerkamp, J. H. (1999). Hemoglobin and myoglobin content in muscles of broiler chickens. *Poultry Science*, 78, 467-476.
- Kristinsson, H. G. (2002). Acid-induced unfolding of flounder hemoglobin:

- evidence for a molten globular state with enhanced pro-oxidative activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 7669-7676.
- Labbé, R. F., Vreman, H. J., & Stevenson, D. K. (1999). Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clinical Chemistry*, *45*, 2060-2072.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Larsen, R., Gouveia, Z., Soares, M. P., & Gozzelino, R. (2012). Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *3*, 77, 1-17.
- Makino, T., Saito, M., Horiguchi, D., & Kina, K. (1982). A highly sensitive colorimetric determination of serum zinc using water-soluble pyridylazo dye. *Clinica Chimica Acta*, *120*, 127-135.
- Medlock, A., Swartz, L., Dailey, T. A., Dailey, H. A., & Lanzilotta, W. N. (2007). Substrate interactions with human ferrochelatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 1789-1793.
- Miyazaki, G., Morimoto, H., Yun, K. M., Park, S. Y., Nakagawa, A., Minagawa, H., & Shibayama, N. (1999). Magnesium (II) and zinc (II)-protoporphyrin IX's stabilize the lowest oxygen affinity state of human hemoglobin even more strongly than deoxyheme. *Journal of Molecular*

*Biology*, 292, 1121-1136.

Møller, J. K., Adamsen, C. E., & Skibsted, L. H. (2003). Spectral characterisation of red pigment in Italian-type dry-cured ham. Increasing lipophilicity during processing and maturation. *European Food Research and Technology*, 216, 290-296.

Møller, J. K., Adamsen, C. E., Catharino, R. R., Skibsted, L. H., & Eberlin, M. N. (2007). Mass spectrometric evidence for a zinc-porphyrin complex as the red pigment in dry-cured Iberian and Parma ham. *Meat Science*, 75, 203-210.

Morita, H., Niu, J., Sakata, R., & Nagata, Y. (1996). Red pigment of Parma ham and bacterial influence on its formation. *Journal of Food Science*, 61, 1021-1023.

Muroya, S., Ertbjerg, P., Pomponio, L., & Christensen, M. (2010). Desmin and troponin T are degraded faster in type IIb muscle fibers than in type I fibers during postmortem aging of porcine muscle. *Meat Science*, 86, 764-769.

西邑 隆徳 (2011) 乳肉卵の機能と利用、第1章 11 講、アイ・ケイコーポレーション、東京

Oellingrath, I. M., Iversen, A., & Skrede, G. (1990). Quantitative

determination of myoglobin and haemoglobin in beef by high-performance liquid chromatography. *Meat Science*, 28, 313-320.

大屋 桃 (2015) 食肉製品中の亜鉛プロトポルフィリン IX 形成に及ぼす金属イオンの影響、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文

岡山 高秀、永田 致治 (1979) 肉製品中のヘム色素定量法、日本畜産学会報、50、15-21.

奥井 潤 (2006) パルマハムにおける ZPP 形成機構に関する研究、北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻、修士論文

奥村 好未 (2011) パルマハムにおける亜鉛プロトポルフィリン IX の存在状態に関する研究、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文

奥村 好未 (2013) 発色剤無添加食肉製品における亜鉛プロトポルフィリン IX 結合タンパク質の探索、北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻、修士論文

尾崎 あかり (2019) 形態学的手法による非加熱乾塩漬食肉製品における亜鉛プロトポルフィリン IX の形成機構解明に関する研究、北海道大学大学院農学院共生基盤学専攻、修士論文

Paganelli, M. O., Grossi, A. B., Dores-Silva, P. R., Borges, J. C., Cardoso, D. R., & Skibsted, L. H. (2016). Limited proteolysis of myoglobin opens channel in ferroxidase-globin complex for iron to zinc

- transmetallation. *Food Chemistry*, 210, 491-499.
- Parolari, G. (1996). Achievements, needs and perspectives in dry-cured ham technology: the example of Parma ham/Revisión: Avances, necesidades y perspectivas de la tecnología del jamón curado: el ejemplo del jamón de Parma. *Food Science and Technology International*, 2, 69-78.
- Parolari, G., Aguzzoni, A., & Toscani, T. (2016). Effects of processing temperature on color properties of dry-cured hams made without nitrite. *Foods*, 5, 33, 1-14.
- Porra, R. J., & Jones, O. T. G. (1963). Studies on ferrochelatase. 1. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract. *Biochemical Journal*, 87, 181-185.
- Pouzo, L. B., Zaritzky, N. E., Pavan, E., Rossetti, L., & Descalzo, A. M. (2016). Utilization of fluorescence spectroscopy as a novel approach to evaluate the oxidative stability in beef retail displayed. *Meat Science*, 119, 7-13.
- Ramanathan, R., Suman, S. P., & Faustman, C. (2020). Biomolecular interactions governing fresh meat color in post-mortem skeletal muscle: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. XXX, XXX-XXX.
- 齋藤 貴洋 (2018) パルマハム及び至適 pH の異なる 2 つの形成機構における水溶性亜鉛プロトポルフィリン IX 結合タンパク質に関する研究、北海

- Sakaino, M., Ishigaki, M., Ohgari, Y., Kitajima, S., Masaki, R., Yamamoto, A., & Taketani, S. (2009). Dual mitochondrial localization and different roles of the reversible reaction of mammalian ferrochelatase. *The FEBS Journal*, 276, 5559-5570.
- Schaer, D. J., Vinchi, F., Ingoglia, G., Tolosano, E., & Buehler, P. W. (2014). Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways—basic science, clinical perspectives, and drug development. *Frontiers in Physiology*, 5, 415, 1-13.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*, 77, 136-147.
- Senge, M. O., MacGowan, S. A., & O'Brien, J. M. (2015). Conformational control of cofactors in nature—the influence of protein-induced macrocycle distortion on the biological function of tetrapyrroles. *Chemical Communications*, 51, 17031-17063.
- Sentandreu, M. Á., Armenteros, M., Calvete, J. J., Ouali, A., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2007). Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry*, *55*, 3613-3619.

下田 啓介 (2012) 乾塩漬生ハム製造中における亜鉛プロトポルフィリン IX  
の局在に関する研究、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文

下田 啓介 (2014) 非加熱乾塩漬食肉製品における亜鉛プロトポルフィリン  
IX の形成機構解明に向けた形態学的アプローチ、北海道大学大学院農学  
院共生基盤学専攻、修士論文

Sowemimo-Coker, S. O. (2002). Red blood cell hemolysis during  
processing. *Transfusion Medicine Reviews*, *16*, 46-60.

Surgenor, D. M. (2012). *The red blood cell* (Vol. 1). Academic Press.

鈴木 忠直、安井 明美 (1997) 食品試料中の無機元素定量のための密閉系マ  
イクロ波システムによる迅速湿式分解. 食品総合研究所研究報告、*61*、9-  
14.

Taketani, S., Ishigaki, M., Mizutani, A., Uebayashi, M., Numata, M., Ohgari,  
Y., & Kitajima, S. (2007). Heme synthase (ferrochelatase) catalyzes the  
removal of iron from heme and demetalation of  
metalloporphyrins. *Biochemistry*, *46*, 15054-15061.

Toldrá, F., & Etherington, D. J. (1988). Examination of cathepsins B, D, H  
and L activities in dry-cured hams. *Meat Science*, *23*, 1-7.

Wakamatsu, J., Nishimura, T., & Hattori, A. (2004a). A Zn-porphyrin

complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Science*, *67*, 95-100.

Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., & Hattori, A. (2004b).

Establishment of a model experiment system to elucidate the mechanism by which Zn-protoporphyrin IX is formed in nitrite-free dry-cured ham. *Meat Science*, *68*, 313-317.

Wakamatsu, J., Odagiri, H., Nishimura, T., & Hattori, A. (2006).

Observation of the distribution of Zn protoporphyrin IX (ZPP) in Parma ham by using purple LED and image analysis. *Meat Science*, *74*, 594-599.

Wakamatsu, J., Okui, J., Hayashi, N., Nishimura, T., & Hattori, A. (2007).

Zn protoporphyrin IX is formed not from heme but from protoporphyrin IX. *Meat Science*, *77*, 580-586.

Wakamatsu, J., Odagiri, H., Nishimura, T., & Hattori, A. (2009a).

Quantitative determination of Zn protoporphyrin IX, heme and protoporphyrin IX in Parma ham by HPLC. *Meat Science*, *82*, 139-142.

Wakamatsu, J., Uemura, J., Odagiri, H., Okui, J., Hayashi, N., Hioki, S.,

Nishimura, T., & Hattori, A. (2009b). Formation of zinc protoporphyrin IX in Parma-like ham without nitrate or nitrite. *Animal Science*

*Journal*, 80, 198-205.

Wakamatsu, J., Hayashi, N., Nishimura, T., & Hattori, A. (2010). Nitric oxide inhibits the formation of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX. *Meat Science*, 84, 125-128.

Wakamatsu, J., Murakami, N., & Nishimura, T. (2015). A comparative study of zinc protoporphyrin IX-forming properties of animal by-products as sources for improving the color of meat products. *Animal Science Journal*, 86, 547-552.

Wakamatsu, J., Akter, M., Honma, F., Hayakawa, T., Kumura, H., & Nishimura, T. (2019). Optimal pH of zinc protoporphyrin IX formation in porcine muscles: Effects of muscle fiber type and myoglobin content. *LWT – Food Science and Technology*, 101, 599-606.

Wakamatsu, J., Kawazoe, H., Ohya, M., Hayakawa, T., & Kumura, H. (2020). Improving the color of meat products without adding nitrite/nitrate using high zinc protoporphyrin IX-forming microorganisms. *Meat Science*, 161, 107989.

Warriss, P. D. (1977). The residual blood content of meat—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 457-462.

Wollocko, H., Anvery, S., Wollocko, J., Harrington, J. M., & Harrington, J.

P. (2017). Zero-link polymerized hemoglobin (OxyVita® Hb) stabilizes the heme environment: potential for lowering vascular oxidative stress. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45, 701-709.

山崎 さなえ (2007) パルマハム水抽出液における ZPP の存在状態に関する研究、北海道大学農学部畜産科学科、卒業論文