



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the formation mechanism of zinc protoporphyrin IX from heme proteins via the heme dissociation in nitrite/nitrate-free meat products [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Zhai, Yang
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15296号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89544">https://hdl.handle.net/2115/89544</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Zhai_Yang_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(農学) 氏名 翟 洋 (Zhai Yang)

## 学位論文題名

Studies on the formation mechanism of zinc protoporphyrin IX from heme proteins via the heme dissociation in nitrite/nitrate-free meat products

亜硝酸塩/硝酸塩無添加食肉製品中におけるヘムの解離を介したヘムタンパク質から亜鉛プロトポルフィリン IX の形成機構に関する研究

### 【背景】

食肉製品では、亜硝酸塩・硝酸塩等の発色剤が広く使用されている。発色剤は食肉製品特有の好ましい鮮やかな色調形成だけでなく、ボツリヌス菌の増殖抑制や、酸化に伴う不快臭の発生抑制、食肉製品特有の風味の醸成をもたらす。しかし、酸性条件下で食品中のアミンやアミド類と反応して発がん性のニトロソ化合物を産生することがあることから、消費者の中にはそのリスクを懸念する声がある。イタリアの伝統的な生ハムであるパルマハム (*Prosciutto di Parma*) は、発色剤を使用していないにも関わらず、鮮やかな色調を示しており、その原因として亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) が多量に形成して蓄積することを当研究室では明らかにした。形成機構に関する研究において、ミオグロビン (Mb) やヘモグロビン (Hb) などのヘムタンパク質由来のヘムから、脱鉄ならびに亜鉛挿入されて ZnPP が形成すると提唱されている。ZnPP そのものは不溶性であるにも関わらず、パルマハムから多くの ZnPP が水で抽出でき、その大部分が Hb と結合していることを当研究室では明らかにした。家畜をと畜する際に放血を行うことから、食肉内に残存している Hb は少ないにも関わらず、Hb の関与が強く示唆されていることとは矛盾がある。そこで本研究では第一に、ZnPP 形成モデル実験系を新たに構築して、Mb よりも Hb が ZnPP 形成の前駆物質である原因を検討した。一方、発色剤は ZnPP 形成を阻害することが知られており、亜硝酸塩から産生される一酸化窒素 (NO) が ZnPP 形成に関与するフェロケラターゼの活性本体である[2Fe-2S]クラスターを破壊するためと考えられていたが、ヘムタンパク質からヘムの解離を阻害するために ZnPP の形成を阻害する可能性もある。そこで第二に、ZnPP 形成機構におけるヘムタンパク質からのヘムの解離の重要性を検討するため、NO に加えて、ヘム鉄の電価の違いにより結合性の異なる一酸化窒素 (CO) とアジ化物を用い、ヘムの遊離しやすい Hb を用いて検証した。さらに、得られた作用機序に関する知見に基づき、発色剤無添加の非加熱食肉製品における ZnPP 形成機構を提唱した。

### 1. 新たな ZnPP 形成モデル実験系を用いたパルマハムにおける水溶性 ZnPP 複合体形成機構の調査

新たに構築した ZnPP 形成モデル実験系は、従来のモデル実験系よりも水溶性 ZnPP を 7 倍、不溶性 ZnPP を 4 倍多く形成でき、尿素電気泳動 (Urea-PAGE) やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC-HPLC) 等に供しても検出できるようになり、このモデルで形成された水溶性 ZnPP はパルマハムと同様に Hb ダイマーと主に複合体を形成することが確認された。このため、この新しいモデル実験系はパルマハムでの ZnPP 形成を再現する有用な実験系であることが確認でき、以降の実験に用いた。外因性の Mb の添加効果を検討したところ、無添加のものとは比べて、水溶性 ZnPP や全 ZnPP の形成量、遊離の非ヘム鉄含量に有意な増加は見られなかった。一方、外因性の Hb の添加は、無添加や Mb 添加のものとは比べて、水溶性 ZnPP、全 ZnPP ならびに遊離非ヘム鉄量が急速かつ有意に増加し、Hb 由来のヘムは Mb のものとは比べて脱鉄と亜鉛の挿入により ZnPP 形成されやすいことが示唆された。Mb と Hb

の構造安定性を検討したところ、3日間の嫌氣的インキュベートにより Hb ではヘムの解離とみられるソーレー帯のピークの低下が見られたが、Mb では観察されなかった。また、Hb はタンパク質のアンフォールディングに起因するトリプトファン (Trp) の蛍光の変化が Mb よりも著しく大きく、Mb よりもタンパク質の構造が脆弱なため、グロビタンパク質の分解を経ずにヘムが遊離しやすいことが示唆された。さらに、ヘムの遊離に伴う Hb のアポタンパク質 (apo-Hb) は、ZnPP とは非酵素的に結合できることも明らかにした。パルマハム中の水溶性 ZnPP は、主に Hb が Mb よりも構造的に不安定なため、遊離しやすくなったヘムから ZnPP に変換され、分解されていない apo-Hb と ZnPP が非酵素的に容易に結合して水溶性の ZnPP-Hb 複合体が形成されて蓄積すること示された。

## 2. 亜硝酸塩の ZnPP 形成阻害作用とヘムの解離の関係性の解明

構築したモデル実験系に亜硝酸ナトリウムとアジ化ナトリウムを添加すると、濃度依存的に ZnPP の形成が阻害され、CO ガスと反応させると ZnPP の形成は著しく抑制された。一方、予め酸素、CO、NO およびアジ化物をリガンドとして結合させた Hb 誘導体 (OxyHb、COHb、NOHb、N<sub>3</sub>mHb) をモデル実験系に添加すると、外因性の COHb、NOHb、N<sub>3</sub>mHb の添加における ZnPP ならびにその前駆物質である金属の配位していないプロトポルフィリン IX (PPIX) の形成量は、添加しない対照区と差がなかったが、OxyHb だけ ZnPP と PPIX の形成量が有意に増加した。これらの Hb 誘導体のみを嫌氣的にインキュベートすると、OxyHb のみがヘムに由来する吸収スペクトルが大きく変化し、Trp 由来の蛍光も著しく変化したため、COHb、NOHb、N<sub>3</sub>mHb はこれらの分子がヘムに配位することにより、Hb の構造を安定化させてヘムの解離を抑制することにより、ZnPP への変換を阻害すると示唆された。ヘムを 1-メチルイミダゾール (IMI) との複合体として溶解したものでは、いずれの分子もリガンドとしての結合に伴う吸収スペクトルの変化が観察されなかった。これらの結果から、Hb や Mb などのヘムタンパク質からのヘムの解離が重要であることが明らかになった。一方、酸化したヘム (ヘミン) と IMI の複合体では ZnPP の形成が認められず、遊離したヘムは還元型である必要性が示されたが、過度な還元は ZnPP の形成を抑制したことから、肉内の酸化と還元バランスが重要であることが示唆された。

以上、本研究により、パルマハムなどの発色剤無添加の非加熱食肉製品において ZnPP が特異的に形成する機構として、発色剤の添加は関連酵素の阻害だけでなく、Mb や Hb などのヘムタンパク質からのヘムの解離抑制の両方から ZnPP の形成を阻害することが示された。Hb は Mb よりも構造的に不安定なため、放血後も残存している血液中の Hb から apo-Hb の分解を経ずにヘムが解離して、脱鉄と亜鉛挿入が行われて ZnPP が形成され、再び apo-Hb と非酵素的に結合して水溶性の ZnPP-Hb 複合体として存在すると示された。これは、Hb が Hb-ヘムスカベンジャー系により容易にヘムの解離するシステムと合致するが、ヘムの解離はヘムの自己酸化が不可欠とされている。一方、酸化したヘムからは ZnPP が形成されなかったことから、食肉の内在性の還元活性や還元剤の存在が酸化したヘムの還元で不可欠であるが、過度に還元された状況では Hb-ヘムスカベンジング系でのヘムの自己酸化による解離が阻害され、ZnPP の形成が抑制されることが示唆された。本研究による Hb が Mb よりも優先的に ZnPP に利用される形成機構の解明は、発色剤無添加の食肉製品の色調改善技術の開発の一助になるものである。今後、形成機構の全貌が解明されれば、より具体的な色調改善技術ができると期待される。