



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	https://hdl.handle.net/2115/89544
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Zhai_Yang_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏名 翟 洋 (Zhai Yang)

審査担当者 主査 准教授 若松 純 一
副査 教授 玖村 朗 人
副査 教授 西 邑 隆 徳
副査 助教 早 川 徹
副査 教授 後 藤 貴 文 (大学院環境科学院)

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の亜鉛プロトポルフィリン IX の形成機構に関する研究)

本論文は 5 章からなり、図 23、表 3、文献 74 を含む、総頁数 87 の英語論文である。別に 1 編の参考論文が添えられている。

ヘムに配位している鉄が亜鉛に置換した亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) は発色剤を添加しない伝統的な非加熱食肉製品中においてのみ形成される鮮赤色の色素で、発色剤無添加の食肉製品の色調に重要な役割を果たしている。現在、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、脱鉄ならびに亜鉛が挿入されて ZnPP が形成することが提唱されている。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 との複合体として存在している。しかし、と畜の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 形成の前駆物質として優勢である原因、ならびに ZnPP と Hb との複合体の形成機構を検討した。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経路を検討するため、ヘム鉄の電価の違いにより結合性の異なる一酸化炭素 (CO) と亜硝酸ナトリウム、アジ化ナトリウムを用いて検証した。

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、従来のものよりも水溶性 ZnPP を 7 倍、不溶性 ZnPP を 4 倍多く形成でき、形成された水溶性 ZnPP はパルマハムと同様に Hb 二量体と主に複合体を形成することが確認され、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が、外因性の Hb の添加は、無添加や Mb 添加のものと比べて、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 のものものと比べて脱鉄と亜鉛の挿入により ZnPP が形成されやすいことが示唆された。この原因について、Mb と Hb の構造安定性を検討したところ、Hb は Mb よりもタンパク質の構造が脆弱なため、グロビン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。

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

予め酸素、CO、亜硝酸ナトリウムおよびアジ化ナトリウムと反応させた Hb 誘導体 (OxyHb、COHb、NOHb、N₃mHb) を、構築したモデル実験系に添加すると、OxyHb 添加区において ZnPP と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) の形成量が、添加しない対照区と比べて有意に増加した。一方、COHb、NOHb、N₃mHb 添加区においては、ZnPP ならびに PPIX の形成量は増加しなかった。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 のみが構造変化を示したが、COHb、NOHb、N₃mHb は構造が安定であった。これらの結果から、構造を安定化させるリガンドとの結合は、ヘムの解離を抑制することによって、ZnPP への変換を阻害することが示され、発色剤添加の食肉製品中で ZnPP が形成されない原因を解明した。さらに、ヘムポケット内の酸化型のヘム (ヘマチン) と結合するアジ化ナトリウムをモデル実験系に添加すると、濃度依存的に ZnPP の形成が阻害され、ヘムタンパク質からのヘマチンでの解離が示唆された。しかし、溶解したヘマチンからは ZnPP の形成が認められなかったが、還元剤の添加により ZnPP は形成されたことから、ZnPP 形成にはヘマチンではなく還元型のヘムである必要性が示された。一方、過度な還元は ZnPP の形成を抑制したことから、肉中の酸化と還元バランスが重要であることが示唆された。

以上より、Hb は Mb よりも構造的に不安定なため、肉中に残存している血液由来の Hb から apo-Hb の分解を経ずに酸化型のヘマチンが解離して、食肉中の還元作用によりヘムに還元された後、脱鉄と亜鉛の挿入が行われて 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ことを明らかにした。

本研究は、無塩漬非加熱食肉製品中に特異的に産生される、主要な赤色色素である水溶性 ZnPP 複合体の形成機構の全貌を解明したものであり学術的に高く評価される。さらに、本赤色色素の形成機構解明は発色剤無添加で色調の好ましい食肉製品の開発の一助となる成果であり、畜産業および食品製造業に大きく資するものと評価できる。よって、審査員一同は、翟洋が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。