

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580288

研究課題名 (和文) 亜鉛プロトポルフィリン IX 形成機構の解明とその応用

研究課題名 (英文) Studies on mechanism by which zinc protoporphyrin IX is formed in meat product and its applications

研究代表者

若松 純一 (WAKAMATSU JUN-ICHI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30344493

研究成果の概要 (和文)：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 (ZPP) 形成機構の解明と、ZPP を利用して食肉製品の色調改善に応用することを目的とした。塩漬食肉製品で ZPP が形成されない機構を明らかにした。豚肉での 3 成分以上が ZPP 形成に不可欠であること、パルマハム中に形成された水抽出可能な ZPP は、ある解糖系酵素と結合していることを明らかにした。レバーを用いて食肉製品の色調改善を試みたところ、ZPP を多量に形成することができ、酸の種類によって非加熱食肉製品における形成能は異なり、色調の望ましい食肉製品の開発につながることを示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Our objectives in this study are to elucidate the mechanism by which zinc protoporphyrin IX (ZPP) in meat products with no addition of nitrite or nitrate and to improve the color of meat products by using ZPP. Protoporphyrin IX (PPIX), to which metal ion is not coordinated, was formed both from heme biosynthesis route and heme. It seems to be that nitric oxide (NO) inhibits the formation of PPIX and consequently inhibits the formation of ZPP. Water-soluble component(s) and water-insoluble component(s) in meat are essential for the formation of ZPP. The water-soluble component(s) seems not to be myoglobin with heme. Water-soluble ZPP in Parma ham could be separated as a single peak by using gel chromatography. It was suggested that ZPP is bound a glycolytic enzyme. Although pork liver in which a large amount of ZPP has been formed was added to cooked sausage, the color was not improved because of liver color. As to salami, raw sausage, the addition of liver and the adjustment of pH (5.5) increased ZPP content and improved the color of salami. The amount of ZPP formed in model experiment varied with acidifiers. By selecting proper acidifier and adjusting pH, a large amount of ZPP was likely to be formed in meat product, resulting in improvement of its color.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：亜鉛プロトポルフィリン IX、パルマハム、色調、食肉製品

## 1. 研究開始当初の背景

イタリアのプロシュート・ディ・パルマ(パルマハム)などのある種の伝統的に長期熟成した乾塩漬食肉製品では発色剤を一切使用していないにも関わらず、安定かつ鮮やかな赤色を呈しており、加熱しても褐色化せず、赤色を呈したままである。この色素は既知のミオグロビン誘導体とは異なり、*Staphylococcus* 属などの微生物により作られる未同定の赤色色素が存在すると報告された (Morita et al., 1996)。この赤色色素はパルマハム製造中に増加し、脂肪親和性が増加することや (Møller et al., 2003)、抗酸化活性を有することも示された (Adamsen et al., 2003)。さらに、光や熱に対して安定であることが示された (Adamsen et al., 2004) が、色素の正体については、不明のままであった。

我々は、このパルマハムにはヘムの鉄分子が亜鉛分子に置き換わった亜鉛プロトポルフィリン IX (ZPP) が存在することを明らかにした (Wakamatsu et al., 2004; Wakamatsu et al., 2007)。さらに、抗生物質を添加して、ミオグロビンと食肉を嫌氣的に保持することにより、ZPP がモデル的に形成されることを確認し、pH や温度、食肉添加量、イオン強度などに依存性を示すことから、その形成は微生物以外の食肉内在成分の関与の可能性を強く示唆する報告を行った (Wakamatsu et al., 2004)。最近になってパルマハム以外にもスペインのイベリアハムにも ZPP の存在が確認され (Møller et al., 2007)、我々の報告は確固たる事実として認知された。

その後の ZPP 形成モデル系を用いた先駆的研究の中で、外因性のミオグロビンの添加は ZPP 形成に不可欠ではないことがわかり、微生物制御下で食肉のみを嫌氣的にインキュベートすることにより、ZPP は形成され、pH や温度、食肉添加量、イオン強度などに既報告と同様の依存性を示し、化学量論的に各種ポルフィリンを定量したところ、ヘムの減少は見られず、ZPP の増加が見られた (Wakamatsu et al., 2008)。これはヘムから鉄が解離して、その後に亜鉛が挿入される鉄-亜鉛置換反応が起こっていない可能性が示された。また、金属キレート剤の添加では ZPP の形成やヘムの減少が見られない代わりに、ZPP に亜鉛が配位していないプロトポルフィリン IX (PPIX) が増加したことから、ZPP 形成は、ヘムが脱鉄してから亜鉛が挿入されて形成するのではなく、ヘム以外から形成した PPIX に亜鉛が挿入されて形成される可能性が示唆された (Wakamatsu et al., 2008)。また、ZPP の蛍光特性より、パルマハム中の ZPP の局在を観察したところ、肉塊

内部にやや多く分布しており、ZPP が表層などの特定の部分から浸透・拡散したのではないことが示唆された (Wakamatsu et al., 2006)。

一般に、ヘムの分解においてはヘムオキシゲナーゼの作用により、脱鉄以前にポルフィリン環の開裂が起こることからも、新たに PPIX が形成される経路には、ヘム生合成系における前駆物質であるプロトポルフィリノーゲンの可能性が大である。無色のプロトポルフィリノーゲンは、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) の作用により酸化されて、PPIX が形成される。しかし、プロトポルフィリノーゲンは光や酸素によっても容易に酸化されて、PPIX を形成することが知られている。モデル系による実験においても、酸化還元電位をわずかに高める(酸化する)と ZPP 形成量は増加し、酸化還元電位を下げる(還元する)と ZPP 形成は抑制され、プロトポルフィリノーゲンから PPIX が形成する経路が存在する可能性を示した (Wakamatsu et al., 2007)。また、ヘム合成酵素で PPIX に鉄を挿入するフェロケラターゼ (EC 4.99.1.1) は、PPIX に亜鉛の挿入することも多数報告されており、ZPP 形成に関与しているものと想像される。

パルマハム内の ZPP の分布状態を明らかにしたものの (Wakamatsu et al., 2006)、ZPP はヘムから形成されないこと (Wakamatsu et al., 2008) から、ZPP は食肉中の主なヘムタンパク質であるミオグロビンのグロビントタンパク質とは結合していないと考えられる。実際に ZPP は非水溶性であることと、パルマハム内には水抽出可能な ZPP と抽出不可能の ZPP が存在することから (未発表)、様々な物質と複合体を形成して存在していると考えられる。しかしながら、詳細については未だ不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、食肉製品中の ZPP 形成機構の解明と、ZPP を利用して食肉製品の色調改善に応用することを目的に、以下の点について検討した。

### (1) ZPP 形成機構の解明

- ① ヘム生合成経路の関与の検討
- ② 発色剤の ZPP 形成阻害機構の解明
- ③ ZPP 形成に関与する物質の探索

### (2) 形成された ZPP の存在状態

### (3) 食肉製品の色調改善への応用

- ① 加熱食肉製品への応用
- ② 非加熱食肉製品への応用

## 3. 研究の方法

### (1) ZPP 形成機構の解明

ZPP ならびに前駆物質である PPIX の形成機構の解明については、我々が確立したモデル実験系を用いて検討した。

#### (2) 形成された ZPP の存在状態

パルマハム中の ZPP の存在状態については、パルマハムから各種タンパク質分離手法を用いて分離し、電気泳動ならびに MALDI-TOFMS と PMF 法により、タンパク質の同定を行った。

#### (3) 加熱食肉製品の色調改善への応用

ZPP を形成させた肝臓を用いて、モデルソーセージの色調改善効果を各種測色技法により検討した。

#### (4) 非加熱食肉製品の色調改善への応用

肝臓ならびに各種酸を添加したサラミを製造し、ZPP の形成能の違いや各種測色技法による色調改善効果について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ZPP 形成機構の解明

ヘム生合成経路からの PPIX 形成は、BPG 以降の物質より合成されたコプロポルフィリノーゲン III が CPO によってプロトポルフィリノーゲン IX となり、プロトポルフィリノーゲン IX が非酵素的に酸化されて PPIX が形成されることが示唆された。一方で、ミオグロビンやヘミンも PPIX の形成量を増加させたことから、PPIX はヘムの生合成経路とミオグロビン中のヘムからの両方から形成されていることが示唆された。また、ヘムからの PPIX 形成反応には、ミオグロビン中のヘムよりも遊離のヘムの方が利用されやすいことが示唆された。

発色剤（亜硝酸塩等）を使用すると食肉製品中に ZPP が形成されないのは、亜硝酸塩が示す酸化作用の影響ではなく、亜硝酸塩より発生する一酸化窒素が、ヘム生合成に関与する酵素の活性を阻害したり、ヘムと結合して PPIX の基質を減少させることで PPIX の形成を阻害したためであることが示唆された（図 1）。

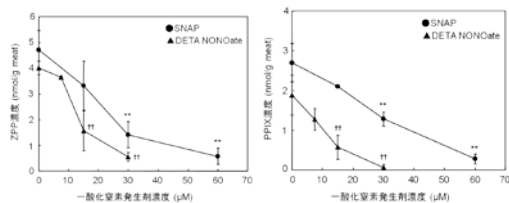


図 1 ZPP と PPIX 形成に及ぼす一酸化窒素発生剤の影響

#### (2) ZPP 形成に寄与する成分の探索

我々の構築したモデル実験系により、豚肉の水溶性画分をゲルろ過により分離したものと、豚肉の水抽出残渣を混合して保持したところ、ヘムを含有するミオグロビンではなく、他の筋漿タンパク質と水抽出残渣との混

合により、ZPP が形成することが示さ、ヘム（ポルフィリン）がなくても ZPP が形成される可能性が示された。

水溶性成分を中心に検証したところ、成分について特定することはできなかったが、限外ろ過等により 10 kDa 以下の成分と 100 kDa 以上のタンパク質が不可欠で、10 kDa 以上の成分は前駆物質のプロトポルフィリン IX (PPIX) の形成にも寄与するため、亜鉛ではない可能性が示された。

#### (3) パルマハム中の ZPP の存在状態

パルマハム中の水溶性 ZPP はミオグロビンではなく、アルブミンをはじめとする特定の水溶性タンパク質と弱い結合で複合体を形成していることが示唆された。パルマハム中の水溶性 ZPP は、PPIX より形成された ZPP がアルブミンなどの限られた水溶性タンパク質と弱い結合をして可溶化し、パルマハム中に存在していることが示唆された。

次に、パルマハムから水抽出可能な ZPP をゲルろ過により分離したところ、単一ピークで溶出することができ（図 2）、SDS-PAGE で分離されたバンドと ZPP の蛍光強度との相関、ならびに MALDI-TOFMS と PMF 法より、ある解糖系酵素であると同定することができた。今後は直接的な方法により結合性について検討する必要がある。水抽出不可能な ZPP は界面活性剤による抽出では、ZPP が解離することが示され、分離法として望ましくないことが示された。尿素等の変性剤の使用により、ZPP を分解することなく、パルマハムの水抽出残渣を溶解することができ、水不溶性の ZPP を分離できる可能性が示された。

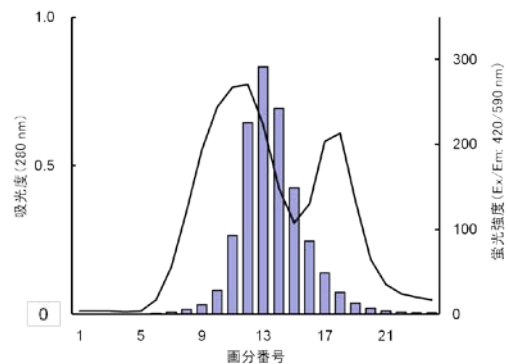


図 2 ゲルろ過クロマトグラフィによるパルマハム水抽出物の溶出パターン

#### (4) ZPP を用いた食肉製品の色調改善

効率的に ZPP を産生させるために、ZPP 形成能について可食できる組織を検討したところ、肝臓（レバー）と腎臓が高く、肝臓では骨格筋（食肉）のおよそ 10 倍高いことが示された。そこで、ZPP 形成能が著しく高い

豚レバーを用いて、加熱ソーセージの色調改善効果を検討したところ、ZPPは多量に形成するものの、レバーの色調が強くなるために、色調改善することができなかった(図3)。

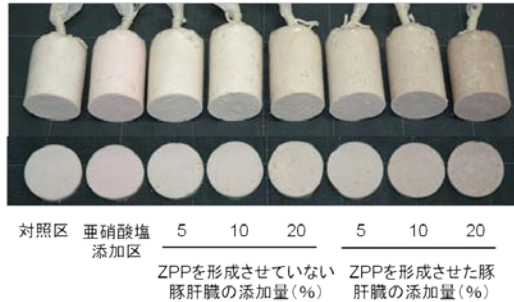


図3 ZPPを形成させた肝臓を添加したソーセージの色調

非加熱のサラミ中にZPPを形成させて色調改善を試みたところ、レバー添加によりZPP形成量は増大したけれども、ZPPは劇的には増加しなかった。この原因としてレバー添加するとZnケラターゼ活性は増加したが、乾燥・熟成中にその活性が大きく低下したことが原因と考えられた。

また、食肉製品中のZPP形成を高める技術を検討したところ、我々がこれまで報告したようにpHがZPP形成ならびに色調改善に重要であることがサラミを用いた試験で明らかにした。さらに、pHを調製する酸の種類によっても、ZPP形成能ならびに色調が異なることが示され(図4)、酸の選択とpHの調製により、多くのZPPが形成されて色調の望ましい食肉製品の開発につながることを示唆された。

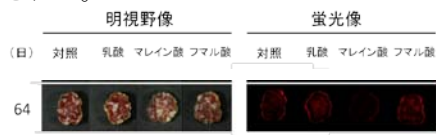


図4 pH調整剤の異なるサラミの色調とZnPP自家蛍光の観察

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① 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. 査読有
- ② 若松純一 (2010) 生ハムの聖地、パルマを訪れて、北海道畜産学会会報, 52, 67-70. 査読無
- ③ 若松純一 (2010) 生ハムの都、パルマ

滞在記. 食肉の科学, 51, 25-30. 査読無

- ④ Wakamatsu, J., Uemura, J., Odagiri, H., Okui, J., Hayashi, N., Hioki, S., Nishimura, T. & Hattori, A. (2009). Formation of Zn protoporphyrin IX in Parma-like dry-cured ham without the addition of nitrate or nitrite. *Animal Science Journal*. 80, 198-205. 査読有
- ⑤ 若松純一 (2008) パルマハムに存在する赤色色素「亜鉛プロトポルフィリンIX」. 食肉の科学, 49, 157-170. 査読無

[学会発表] (計1件)

- ① Hayashi, N., Yamazaki, S., Kobayashi, M., Wakamatsu, J., Nishimura, T. and Hattori, A. Form in which water-soluble zinc protoporphyrin IX (ZPP) exists in Parma ham. *54th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)*, CapeTown, South Africa, Aug 10-15, 2008

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

若松 純一 (WAKAMATSU JUN-ICHI)  
北海道大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：30344493

(2) 研究分担者

西邑 隆徳 (NISHIMURA TAKANORI)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10237729

服部 昭仁 (HATTORI AKIHITO)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：50125027

(3) 連携研究者

なし