

氏 名	ちやう とうあん たん CHAU TUAN THANH
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 6 2 8 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	New Approach in Application of Ferrochelatase onto Meat Processing to Generate Meat Color (食肉加工における自然赤色生成へのフェロケラターゼの新しい利用法)
審 査 委 員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 功刀 滋 教授 鈴木秀之

論文内容の要旨

Ferrochelatase は二価鉄をプロトポルフィリンに挿入してヘムを合成する反応を司るが、生体外では亜鉛、コバルト、錫などの二価金属を基質とする事が知られている。最近、本酵素がヘムから鉄を抜く反応を触媒することがわかり、ヘムから亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) の変換反応も起こると考えられる。そこで、ブタ Ferrochelatase cDNA を単離して性質を調べた。アミノ酸配列からミトコンドリア移入のための 53 個のシグナルペプチドを含む 421 残基からなり、カルボキシル末端付近には鉄-イオウクラスター特異的な 4 個のシステイン残基が認められた。全体のアミノ酸配列は 80% 以上他の哺乳動物のそれらとの相同性があった。次に得られた cDNA を用いて大腸菌にて機能発現させた。発現した酵素は精製後、Zn-PP の生成を検討するためにヘミン、もしくはミオグロビンを基質に用いて protoporphyrin や Zn-PP の生成を種々の反応条件を用いて詳細に検討したところ、正反応は pH 7.5-8.0、変換反応は pH 5.5-6.0、そして逆反応 pH 5.5-6.0 でそれぞれ高い活性を示した。 k_{cat} 値は正反応が逆反応より高く、本酵素の反応は正反応にかたよっていることが分った。正逆の両反応の活性は脂質を添加する事で共に著しく増加したが、2 価金属イオンでは低下した。これらの性質はヒトを始めとする哺乳動物の Ferrochelatase に相似することが分った。

ハムの赤色は豚肉を亜硝酸ナトリウムで処理することで作られるが、これを熱処理して付随的に生成するニトロソ化合物は癌を誘発する可能性がある。一方、生ハムに含まれる ZnPP は天然の安定な赤色化合物である。生肉であるブタ筋肉組織中での ZnPP の生成は組織内のミトコンドリアでゆっくり起こっていると考えられている。ZnPP 生成を高める事を目的にして豚、酵母や好熱菌のバクテリア由来の組み換え Ferrochelatase を用いる事を試みた。アスコルビン酸やシステインを始めとする還元剤を添加した嫌気条件ではヘム蛋白質 (ミオグロビン) のヘムから ZnPP の生成が短時間で認められ、変換効率が著しく改善された。また、組み換え酵素を用いて豚筋肉内での ZnPP の生成を調べた結果、酵母 Ferrochelatase を用いた場合にヘムの約 70% が ZnPP に変換される最も高い成績を得た。ブタやバクテリア酵素でも ZnPP 生成の促進は認められるが、その程度は低かった。これらの結果は、新しい食品加工の開発への方法の扉を開ける事を示した。

論文審査の結果の要旨

食肉の亜硝酸処理は発ガン性のニトロソ化合物の生成の可能性がある、食の安全面から Zn-Protoporphyrin (ZnPP) などの天然の色素の利用が望まれる。本論文はヘムタンパク質から生肉を材料にして Ferrochelatase が Zn-Protoporphyrin の産生関与する事を明らかにした研究結果である。

- ① Ferrochelatase がヘムから鉄を抜く反応ならびにヘムから ZnPP の変換反応を触媒することを調べるために、まずブタ Ferrochelatase cDNA を単離することに成功している。塩基配列からアミノ酸配列からミトコンドリア移入のための 53 個のシグナルペプチドを含む 421 残基から構成される事、カルボキシル末端付近には鉄-イオウクラスターが存在することを新しい知見として見つけている。次に得られた cDNA を用いて大腸菌にて機能的に発現させることに成功した。発現した活性酵素の性質について ZnPP の生成をヘミン、もしくはミオグロビンを基質に用いて証明している。その中で正反応は pH 7.5-8.0, 変換反応は pH 6.0-5.5, そして逆反応 pH 5.5-6.0 でそれぞれ高い活性を示すことなどを詳細に調べている。 k_{cat} 値は正反応が逆反応より高く、反応が正反応にかたよっていることを初めて証明した。また、筋肉組織の多く含まれる脂質や金属の添加効果を調べるなど詳細な性質を明らかにした。
- ② 一般に生ハムは半年から 1 年をかけて作られることが知られており、生ハムに含まれる天然の安定な赤色化合物である ZnPP の生成にも長い時間必要とされと考えられている。生肉であるブタ筋肉組織中での ZnPP の生成は組織内のミトコンドリアでゆっくり起こっていると考えられている。ZnPP 生成には Ferrochelatase が関与することを先の研究で見いだしたので、これを用いて ZnPP 産生を高めるために、豚、酵母や好熱菌のバクテリアの組み換え Ferrochelatase を用いる事を試みている。諸条件を検討の上で、食品添加物であるアスコルビン酸やシステインの還元剤を添加するとミオグロビン中のヘムから ZnPP の生成が短時間で認められることを発見した。この条件で変換効率が著しく改善されるが、さらに組み換え酵素を用いて豚筋肉組織での ZnPP の生成を調べた結果、酵母 Ferrochelatase を用いた場合にヘムの約 70% が ZnPP に変換されるという生ハムの色素組成に似た条件を作り出した。ブタや好熱菌酵素をも試して生産性を上げる事を試みたが、酵母酵素の生成量には至らない事を示した。ZnPP 生成のこれらの結果は、Ferrochelatase は生ハム生産されるなかで ZnPP の生成を触媒する事を示すと同時に、新しい安全性に富む食肉加工の開発への方法の扉を開ける事を示した事で高く評価した。

これらの研究の成果は、下記の国際科学雑誌 3 編（主論文 2；参考論文 1）に掲載されている。

「公表論文」

主論文

1. Chau Tuan Thanh, Matsumi Ishigaki, Takao Kataoka, Shigeru Taketani (2010)
Characterized by Porcine ferrochelatase Porcine Ferrochelatase: The Relationship between Iron-Removal Reaction and the Conversion of Heme to Zn-Protoporphyrin *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 74, 1415-1420.
2. Chau Tuan Thanh, Matsumi Ishigaki, Takao Kataoka, Shigeru Taketani (2011)

Ferrochelatase Catalyzes the Formation of Zn-protoporphyrin of Dry-Cured Ham via the Conversion Reaction from Heme in Meat *Agric. Food Chem.* 2011, 59, 12238–12245.

参考論文

1. Ohgari, Y., Miyata, Y., Chau T.T., Kitajima, S., Adachi, Y., & Taketani, S. Quinolone compounds enhance delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumor cells *J. Biochem.* (2011) 149(2): 153-160.