溶存酸素による赤身魚肉の褐変抑制効果のシミュレーション

小澤 秀夫,^{1*} 落合 芳博²

(2020 年 5 月 25 日受付, 2020 年 6 月 29 日受理, 2020 年 8 月 28 日 J-STAGE 早期公開)

¹神奈川工科大学応用バイオ科学部, ²東北大学大学院農学研究科

Simulation of the inhibitory effect of dissolved oxygen against browning of red-fleshed fish meat

HIDEO OZAWA^{1*} AND YOSHIHIRO OCHIAI²¹Faculty of Applied Bioscience, Kanagawa Institute of Technology, Atsugi, Kanagawa 243-0292, ²Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8572, Japan

The commercial value of red-fleshed fish meat is decreased by browning, which is caused by the oxidation of myoglobin (Mb) to metMb. The formation of metMb proceeds by the S_N2 reaction caused by a water molecule in the distal heme pocket attacking the heme iron in oxyMb. The higher partial pressures of oxygen and nitrogen reduce the rate of metMb formation from oxyMb. The present research was performed to determine whether free oxygen molecules could prevent oxidation of oxyMb. Simulation of the molecular dynamics of the system consisting of oxyMb with one oxygen molecule was performed. The partial oxygen pressure was estimated to be approx. 1.6 atm, causing about 40% of oxygen molecules to interact with oxyMb, and the number of water molecules in the distal heme pocket decreased to about two-thirds. Under an oxygen pressure of 1 atm, the rate of metMb formation was expected to reduce to about three-fourths compared to that under vacuum packaging.

キーワード：赤身魚肉, ガス置換, 褐変抑制, 分子動力学シミュレーション, ミオグロビン, メト化

筋肉の色調, 特に赤みは主としてヘムタンパク質のミオグロビン (Mb) の濃度に依存して強くなる。Mb はヘムとタンパク質部分のグロビンよりなる。ヘムはポルフィリン環と鉄原子から構成されており, グロビン部の近位ヒスチジンとの結合により保持されている。また, 鉄原子に配位する酸素分子は遠位ヘムポケットと呼ばれる空間に存在し,¹⁾ グロビンの遠位ヒスチジンと水素結合を形成することによって配位を安定化している。²⁾

マグロ類の普通筋や赤身魚の血合筋は, 褐変によりその商品価値が大きく損なわれる。^{3,4)} 褐変は Mb のメト化によるものであり,³⁾ Mb のヘム鉄が 2 価から 3 価に変化することがその原因である。生理機能を持つ Mb の鉄原子は 2 価であるが, 酸素と結合しているものをオキシ Mb と呼び, 酸素が脱離しているものをデオキシ Mb と呼ぶ。前者は鮮やかな赤色を, 後者は暗赤紫色を呈す。

デオキシ Mb からメト Mb への酸化の主要な経路は, まず水分子がヘム鉄に結合し, さらに酸素などの酸

化剤により電子が一つ奪われる反応である。⁵⁾ 死後の魚肉で到達しうる pH 5 から 6 付近におけるオキシ Mb からメト Mb への主要な酸化経路は, 鉄原子に配位する酸素分子に遠位ヒスチジンからプロトンが供与され, さらに水分子が鉄原子を攻撃する S_N2 反応により,^{6,7)} ヒドロペルオキシラジカル (HO₂) を生成する反応である (式 1)。^{5,7)}

上述の通り, デオキシ Mb とオキシ Mb のメト化経路は異なる。Mb の半飽和酸素濃度は μM オーダーであり,⁸⁾ 精製 Mb を用いた実験系では, 溶存酸素が半飽和酸素濃度程度のとき, Mb のメト化速度は最大値をとる。^{5,9)} 酸素濃度が 10 μM 程度において, メト化されるデオキシ Mb とオキシ Mb の数は一致し, それよりも高い酸素濃度においては, 酸素濃度が高くなるにつれデオキシ Mb の濃度およびメト化速度は 0 に, オキシ Mb のメト化速度は一定の値に収束する。⁵⁾ 大気圧付近で

は、溶存酸素濃度は0.4 mM程度であり、サブmMオーダーの濃度では、オキシMbのみがメト化される。そのため、精製オキシMbを用いた大気下の実験では、酸素濃度の多少の変動に左右されず一定の値をとる。⁵⁾ その一方で、大気下の実験であっても、肉内部の酸素濃度は極めて低くなり得るため、デオキシMbのメト化が起こる。¹⁰⁾

精製Mbで見られるのと同様のメト化速度の酸素濃度依存性はマグロ肉の冷蔵保存においても観測され、酸素濃度1%弱にマグロ肉を封入した場合、メト化速度は最大値をとる。¹¹⁾ また、酸素濃度が0.04%の時のメト化速度は、大気圧におけるメト化速度よりも小さい。¹¹⁾

-10°Cから-20°Cの冷凍温度では、脱気封入や厚いグレーズ処理と比較し、肉表面における非脱気封入のメト化速度は遅い。¹⁰⁾ 脱気条件の肉表面では、酸素濃度が半飽和酸素濃度程度となり、デオキシMbのメト化が発生しているのだろう。なお、肉内部のメト化は脱気やグレーズ処理の影響を受けない。¹⁰⁾ 酸素分圧は、非脱気封入肉表面>脱気封入およびグレーズ処理肉表面>肉内部の順であると考えられる。肉内部のメト化速度は、非脱気封入表面を明確に下回ることがなく、脱気封入表面を明確に上回ることもなかった¹⁰⁾ ため、単純な酸素による酸化⁵⁾を仮定すると、肉内部の酸素濃度は1 μ M前後と予想される。ただし、肉内部のメト化は、過酸化水素¹²⁾など他の酸化剤による可能性も否定できないため、酸素濃度はより低い可能性がある。なお、精製Mbに3分間窒素ガスを吹き込むことによって得られたデオキシMbでは、オキシMbよりも-6から-20°Cにおいてメト化速度が大きい¹³⁾ことから、冷凍条件下における実験で酸素を完全に除くのは容易ではないと予想される。

いくつかの報告^{14,15)}では、上記の酸素濃度とメト化の解釈を単純に当てはめることができない。そこで、気体分子がオキシMbのメト化を抑制しているとの仮説を立てた。高濃度窒素環境下では-20°Cおよび-30°Cにおいて、脱気条件下と比較してプリ血合筋の褐変は抑制される。¹⁴⁾ 脱気処理を行わないことにより、肉表面における酸素濃度はオキシMbが存在する程度に保たれ、なおかつ窒素分子がオキシMbと相互作用し、メト化を抑制していると考えられた。高濃度酸素環境下では、高濃度窒素環境下や空気環境下と比較してメト化が抑制される¹⁵⁾ため、Mbがオキシ化している条件下において、同圧では酸素の方が窒素よりもメト化抑制効果が高い可能性がある。

本研究では、赤身魚肉を冷凍あるいは冷蔵した時、ヘム鉄に結合していない酸素分子がオキシMbのメト化を抑制するか否かを明らかにするため、オキシMbと

酸素分子の相互作用を分子動力学(MD)シミュレーションによって検討した。その結果、真空包装と比較した場合、窒素や酸素の分圧が高い環境下において褐変が抑制される分子機構は、オキシMbと気体分子との相互作用によって遠位ヘムポケット内における水分子の数が減少することであることが確認された。

材料と方法

タイセイヨウマグロ *Thunnus atlanticus* オキシMbの結晶構造(PDB ID: 3QM5)を鋳型に、プリ *Seriola quinqueradiata* Mbの配列¹⁶⁾に基づきホモロジーモデリング¹⁷⁾によってプリ・オキシMbの構造モデルを得た。両Mbのアミノ酸配列の同一率は77.3%であった。本モデルMbのN末端は既報¹⁸⁾および結晶構造解析の通りアセチル化アラニンとした。以下、このN末端のアラニンを1残基目として残基番号を付けた。C末端のグリシンは、結晶構造解析では位置が同定されていないため手入力した。

分子動力学ソフトはAmber18 (University of California)を用いた。¹⁹⁾ Amber18に含まれるtleapにより、1分子のオキシMb、10,134分子の水および0.1 M NaClを含む系を作成した。さらに必要に応じて、酸素分子を1個加えた。²⁰⁾ 死後の魚肉が到達しうるpH 5-6²¹⁾を模倣するため、ヒスチジンは δ および ϵ 窒素の両方がプロトン化した状態(HIP)を採用した。ただし近位ヒスチジンの ϵ 窒素と鉄原子は結合しているため、Amberのヘム力場通り δ 窒素のみがプロトン化した状態を採用した。鉄に配位する酸素分子は、遠位ヒスチジンと水素結合を形成するため、鉄に配位しない方の酸素原子と遠位ヒスチジンの ϵ 窒素に結合する水素原子との間に距離拘束をかけた。平衡距離は2.0 Åとし、2.0から2.5 Åまでは、ばね定数5 kcal/(mol $\cdot$ Å²)の調和振動子による距離拘束とし、2.5 Å以上離れた場合は、2.5 kcal/(mol $\cdot$ Å)の復元力が作用するようにした。水のエネルギー最小化、系のエネルギー最小化および系の一定体積下での平衡化(20 ps)は、既報の通り実施した。²²⁾ ただし、水分子の位置エネルギー最小化において、C末端グリシンの位置は固定せず、グリシンの構造最適化も同時に行った。その後、1 barかつ300 Kにおいてプロトン化状態を固定したMDシミュレーションを500 ns間、実施した。温度調節は、衝突頻度を2 ps⁻¹としたLangevin法を用いて行い、圧力緩和時間は2 ps、1ステップ当たりの時間は2 fsとした。さらに、水素原子とその他の原子間の結合についてはSHAKE法²³⁾を適応し、距離を固定した。シミュレーションに関する上記以外の設定についてはデフォルト値を用いた。

データ解析にはcpptraj²⁴⁾を用いた。解析対象は、100-500 ns間について10 psごとにサンプリングした

40,000 のスナップショットとした。ただし, Mb と相互作用する酸素分子の分布については, 200 ps ごとの 2,000 スナップショットを用いた。また, Mb と相互作用する水分子の分布については, 酸素を加えた条件におけるシミュレーション終了時の構造 (1 スナップショット) を使用した。さらに, Mb と相互作用する水分子の個数については, 10 ns ごとにサンプリングした 40 スナップショットにより評価した。

式 (1) よりメト化速度は,

$$\frac{d[\text{metMb}]}{dt} = k[\text{oxyMb}][\text{H}^+][\text{H}_2\text{O}] = k'[\text{H}_2\text{O}]_{\text{d.p.}} \quad (2)$$

と表される。ただし, k および k' は速度定数, $[\text{H}_2\text{O}]_{\text{d.p.}}$ は遠位ヘムポケット内の水分子の濃度である。

MD シミュレーションは反応過程を直接, 模倣することができないため, 式 2 よりメト化速度と比例すると予想される遠位ヘムポケット内の水分子の数を解析の指標とした。水分子の酸素原子が, 近位ヒスチジンの ϵ 窒素よりも鉄原子に近く, さらに鉄原子との距離が 4.5 Å 以下の場合, 遠位ヘムポケット内にあるとみなした (Fig. 1)。遠位ヘムポケット内の水分子と鉄原子の距離は, それぞれの原子の中心間の距離とした。酸素分子については, よりヘム鉄に近い方の原子について同様に評価した。

Mb の各原子より 3.4 Å 以内の分子を, Mb と相互作用する分子とみなし, VMD²⁵⁾ (University of Illinois at Urbana-Champaign) を用いて Mb と相互作用する酸素分子および水分子の酸素原子を QuickSurf モデル (Resolution 1, Radius Scale 0.2, Density Isovalue 1.5, Grip Spacing 0.5) により描画した。さらに, Mb と相互作用する分子の数を求め, Mb と相互作用しない遊離の水分子ならびに酸素分子の数より, 酸素および Mb 濃度を求めた。酸素分子とオキシ Mb の解離定数 K は, 以下の式で表される。

$$K = [\text{oxyMb}][\text{O}_2] / [\text{oxyMb-O}_2] \quad (3)$$

ただし, $[\text{oxyMb}]$ および $[\text{O}_2]$ はそれぞれ相互作用していないオキシ Mb と酸素分子の濃度, $[\text{oxyMb-O}_2]$ は, 酸素分子と相互作用しているオキシ Mb の濃度である。酸素分子と相互作用している Mb の割合は $[\text{O}_2] / ([\text{O}_2] + K)$ となる。さらに, 大気圧における酸素分圧を 0.209 atm²⁶⁾ とすると, 遊離の水分子 1 万個当たり遊離の酸素分子が 0.0820 個溶解している²⁷⁾ ことから, 酸素分圧を求めた。

揺らぎの大きい N 末端および C 末端を除いた 6-141 残基目について, 主鎖の原子である C, C α および N 原子を対象に質量荷重根平均二乗揺らぎ (root mean square fluctuation, RMSF) を求めた。Mb 分子の全長における N 末端側からの各ヘリックスの位置は, A-ヘ

リックス (2-15 残基目), B-ヘリックス (17-31), C-ヘリックス (33-38), E-ヘリックス (55-72), F-ヘリックス (80-88), G-ヘリックス (96-112) および H-ヘリックス (119-138) とした。²⁸⁾

MD シミュレーションは, 酸素を加えた条件および加えない条件について, それぞれ 20 回ずつ行い, 等分散を仮定しない Student の t 検定により有意差検定を行い, $p < 0.05$ を有意とした。本文中では, 標準偏差が計算できる場合には平均 $\pm$ 標準偏差として表した。図中のエラーバーは標準偏差とした。RMSF については, 各残基について酸素を加えた条件および加えない条件について同様に t 検定を行った後, Benjamini と Hochberg 法²⁹⁾ により偽陽性発見率の調整を行い, $q < 0.05$ を有意とした。さらに, 各残基について RMSF の平均値を求め, 酸素を加えた条件および加えない条件について, 対応する t 検定を行った。

結 果

ホモロジーモデリングでは GMQE および QMEAN が信頼性や質の指標となる。GMQE は 0-1 で表され, 値が大きいほど信頼性が高く, 本モデリングでは 0.93 であった。QMEAN が 0 程度の場合, 質の高いモデリングであることを示すが, -4 以下の場合には質の低いモデリングとみなされる。本モデリングにおける QMEAN 値は -0.22 であった。従って, 本ホモロジーモデリングによって比較的良い初期構造が得られた。ホモロジーモデリングによって得られた構造では, ヘム鉄とそれに配位する酸素分子の原子間の距離は 2.0 と 3.0 Å, 酸素原子に配位している遠位ヒスチジンの ϵ 窒素原子と鉄原子の距離は 4.4 Å であった。鉄原子とヘムのポルフィリン環および近位ヒスチジンの δ 水素 (5.1 Å) を除く原子と鉄原子間の距離は 4.5 Å 以下, ポルフィリン環の水素原子と鉄原子間の距離は 4.5 Å 程度であり, コンフォメーションにより変化する。以上より, ヘムポケットに入っているかどうかの閾値となる鉄原子からの距離を 4.5 Å とした (Fig. 1)。

気体分子がヘム鉄上の配位部位から溶媒へ移動する場合, 遠位ヒスチジン付近のヒスチジンゲートを通る経路, タンパク質 (グロビン) 内部を通して近位ヒスチジン近傍を経る経路, タンパク質のそれ以外の空洞を通る経路が知られている。³⁰⁾ 今回の MD シミュレーションにおいても, 酸素分子はこれらの経路を通っていることが確認された (Fig. 2)。また, 遠位ポケット, 近位ヘムポケット (Xe1) およびヘムポケットの奥の部位であり Xe1 部位に近接する Xe2 部位に酸素分子は特に多く分布した。水分子は Mb 内部に侵入していたが, 酸素分子のようにその位置は局在化していなかった。

本研究で用いた力場では, 鉄原子, 酸素分子および水

Fig. 1 The positional relationship of myoglobin (Mb) among the heme, oxygen molecule bound to an iron atom, and histidines. The oxygen molecule is shown in red as a Van der Waals model. Heme and distal histidines are shown as a licorice model. Proximal histidine is shown as a ball and stick model. The sphere of 4.5 Å in diameter is centered at an iron atom, which is shown as a pink sphere. The sphere includes the oxygen molecule, porphyrin ring and imidazole ring of proximal histidine, except for the δ hydrogen atom (indicated with an asterisk) of proximal histidine. Note that almost all of the hydrogen atoms in the porphyrin ring are included in the sphere.

分子の酸素原子のファンデルワールス半径がそれぞれ、1.2000、1.6000 および 1.7683 Å であった。原子と水分子のファンデルワールス半径から考えると、水分子の酸素原子と鉄原子の距離が 3 Å 以下をとることが予想されたものの、鉄原子から 3 Å 以内に水分子が侵入することはなかった (Fig. 3)。これは、酸素分子が立体障壁となっているためであろう。

ヘム鉄から 4.5 Å 以内の遠位ヘムポケット内の水分子は、酸素分子を加えていない条件および加えた条件において、それぞれ 0.066 ± 0.040 および 0.045 ± 0.023 個であった ($p < 0.05$; Fig. 3, Table 1)。したがって、メト化が酸素分子により抑制されることが示された。

酸素分子を加えた条件において、ヘム鉄から 4.5 Å 以内の遠位ヘムポケット内の遊離の酸素分子は 0.0050 ± 0.0073 個であった。遠位ヘムポケット内の水分子と酸素分子の和について、酸素分子の添加の有無による有意差はなかったため、酸素分子が遠位ヘムポケット内の水と置換している以外の効果が存在するとは断定はできない。しかしながら、気体分子が Mb 内に入ることによ

Fig. 2 The distribution of free oxygen (red) and water (blue) molecules in and around Mb. The locations of these molecules are shown as a QuickSurf model. The heme, the oxygen molecule bound to the iron atom in heme, and the distal histidine are shown in green as a licorice model. Proximal histidine is shown in orange as a licorice model. A, B, C, E, F, G, and H stand for A, B, C, E, F, G, and H helices. Xe1 and Xe2 are the xenon binding sites in mammalian Mb.

Fig. 3 The number of water molecules in the distal pocket within the distance from the iron atom in heme. The error bars indicate the standard deviations. By adding one oxygen molecule to the system, the water molecule in the distal pocket decreased (red line), in contrast to the absence of free oxygen molecule (blue line).

Table 1 Effects of oxygen molecules on oxyMb

	Water molecules in the distal heme pocket ^a	RMSF ^b	Water molecules interacting with Mb
Without oxygen	$0.066 \pm 0.040^*$	0.77 ± 0.05	623 ± 4
With oxygen	$0.045 \pm 0.023^*$	0.80 ± 0.05	624 ± 5

^a Those with the distance from the iron atom being less than 4.5 Å.

^b For the main chain atoms from the 6th to 141st residues.

The asterisks show significant differences ($p < 0.05$).

りグロビンの構造の揺らぎが抑えられ,³¹⁻³³⁾ 結果的に遠位ヘムポケットへの水分子の侵入が抑えられる可能性が考えられた。

そこで、構造の硬さの指標である主鎖の RMSF 値を検討した (Fig. 4a)。また、酸素分子を加えたかどうかは、各残基の RMSF に有意差を与えなかった。酸素を加えない場合および加えた場合の RMSF につき、残基平均はそれぞれ 0.77 ± 0.05 および 0.80 ± 0.05 と、有意差はなかった (Fig. 4b, Table 1)。ただし、標準偏差は、残基間のばらつきではなく、シミュレーション間のばらつきを示す。以上より、気体分子が Mb の構造揺らぎを抑える効果は確認されなかった。

酸素分子を加えない条件において、オキシ Mb と相互作用する水分子の数は 623 ± 4 個であった (Table 1)。オキシ Mb に酸素分子を加えた条件では、Mb と相互作用する水分子と酸素分子の数はそれぞれ 624 ± 5 お

よび 0.39 ± 0.11 個であった。オキシ Mb と相互作用する水分子の数については、酸素分子の添加の有無による有意差は認められなかった。これは、鉄原子に配位しない気体分子との相互作用によって Mb の構造は大きく変化しないこと³¹⁻³³⁾ と矛盾しない。Mb と相互作用しない酸素濃度は 3.6 ± 0.6 mM、この時の酸素分圧は 1.6 ± 0.3 atm であった。

式 3 およびその式変形より、オキシ Mb と酸素分子の解離定数は 6.9 ± 4.7 mM であった。1 atm の酸素圧下では 2.18 mM の酸素分子が溶解しており、 $29 \pm 13\%$ のオキシ Mb が酸素分子と相互作用していると計算された。酸素分子と相互作用しているオキシ Mb の割合と遠位ヘムポケット内の水分子の減少量が比例すると仮定すると、1 atm の酸素圧下においてヘムポケット内の水分子の数は 0.050 個となり、酸素分子を加えなかった時と比較し、オキシ Mb のメト化速度は 0.75 倍に減少することが予想された。また、オキシ Mb と相互作用する酸素分子が 1 となる条件において遠位ヘムポケットに含まれる水分子の数は 0.011 個であり、酸素分子がない時と比較し、オキシ Mb のメト化速度は気体分子によって 0.17 倍にまで減少すると予想された。

考 察

オキシ Mb とデオキシ Mb の相互変換における過程を理解するため、Mb と気体分子の相互作用についてはこれまで詳細に解析されている。メト Mb^{31,32,34)} やカルボニル Mb³⁵⁾ の空洞における気体分子と Mb との相互作用や Mb 分子中の気体分子の動きなどが結晶構造解析により検討されている。気体分子が Mb 内に侵入しても大きな構造変化はなく、構造の揺らぎが小さくなることが報告されている³¹⁻³³⁾ もの、本研究では構造の揺らぎの減少は確認されなかった。100 atm 程度の高圧条件下では、オキシ Mb の遠位および近位ヘムポケット内に、鉄原子に配位していない酸素分子が入ることが認められており、³⁶⁾ 本研究においても酸素分子が局在していることが確認された。カルボニル Mb から離脱した一酸化炭素が Mb 内部を移動する様子も明らかにされており、³⁷⁻⁴²⁾ オキシ Mb からデオキシ Mb への変化に伴い、酸素分子はグロビン内部を通して近位ヒスチジン付近より放出されることが示されている。^{34,35)} デオキシ Mb およびカルボニル Mb の MD シミュレーションでは、近位ヒスチジン付近を通る経路のほか、遠位ヒスチジン付近のヒスチジンゲートやそれ以外の Mb 内の空洞を通る経路も示されている。³⁰⁾ オキシ Mb を対象とする今回の研究における酸素分子の挙動は、先行研究^{30,34,35,37-42)} における気体の挙動と同様のものであった。

酸素分子と水分子の Mb 内における局在は大きく異なった (Fig. 2)。タンパク質の側鎖の多くと主鎖は親

Fig. 4 (a) Root mean square fluctuation (RMSF) of yellowtail oxyMb without free oxygen molecule. (b) Δ RMSF values were obtained by subtracting RMSF of oxyMb without free oxygen molecule from that with its presence. The upward and downward error bars indicate the standard deviations of RMSF with and without free oxygen molecule, respectively. In (a) and (b), A-helix (the 2nd–15th residues), B-helix (17th–31st), C-helix (33rd–38th), E-helix (55th–72nd), F-helix (80th–88th), G-helix (96th–112th), and H-helix (119th–138th) regions are shown as horizontal bars at the bottom. The distal (58th) and proximal (87th) histidines are shown with an asterisk (*) and a dagger (†), respectively.

水性であるため、水分子との相互作用が可能である。その一方で、酸素分子は無極性であり水素結合を作らないために、疎水性の空洞に局在したと考えられる。なお、Fig. 2は酸素分子を添加した条件における水の分布であるが、酸素分子を添加しなかった場合においても同様の結果が得られた。

RMSF 値については各残基間に有意差はなかった。ヘリックスやターンごとに平均した RMSF 値を同様に比較した場合においても、Bonferroni 補正により有意差は消滅した。ただし、F-ヘリックスおよび FG ターンのアミノ酸残基については、Bonferroni 補正前において有意差が認められた ($p < 0.05$)。F-ヘリックスは近位ヒスチジンを含むため、酸素分子を加えた条件において F-ヘリックスの RMSF が大きかったのは、酸素分子がヘムポケット内に侵入し、何らかの相互作用を及ぼした可能性がある。有意差は得られなかったが、 β 過誤であるかもしれない、今後検討する必要がある。

気体分子のメト化抑制作用については、酸素と窒素の比較、あるいは二酸化炭素の影響についてブリ¹⁴⁾およびマグロ類¹⁵⁾を対象とした研究が報告されている。同圧の酸素と比較すると、窒素はモル比で 48% しか水に溶解しない。²⁷⁾ 両者ともに等核二原子分子であり、オキシ Mb との相互作用には差がないと予想されるため、溶解度の違いが窒素および酸素¹⁵⁾のメト化抑制効果の差異に寄与していると考えられた。

二酸化炭素は酸素分子と比較し、モル比で 35 倍程度、水に溶解しやすいが、大気中には酸素の 500 分の 1 程度しか存在しない。そのため大気下では、溶解している二酸化炭素の分子数は酸素分子よりもはるかに少ない。高濃度の二酸化炭素環境下でも、メト化は若干抑制される可能性があるにすぎない。^{14,15)} その原因として、二酸化炭素の溶存濃度の増加に伴い水が酸性化し、式 (1) の反応が促進されることがあげられる。また、二酸化炭素は 3 原子分子であり、酸素分子と比較し大きく、Mb 内に侵入しにくいことも原因として考えられる。さらに、極性の有無は、オキシ Mb との相互作用に大きな影響を与える (Fig. 2)。二酸化炭素はその極性のため、オキシ Mb に対し酸素分子と同様の相互作用を示さないことも原因としてあげられる。

本研究で証明されたオキシ Mb に対する気体分子のメト化抑制作用とこれまでの知見^{5,10,14,15)}を合わせ、冷凍および冷蔵における酸素分子と窒素分子のメト化抑制の分子機構を次のように解釈した。冷凍貯蔵かつ真空包装の魚肉表面においてメト化が進む^{10,14)}のは、酸素分圧が極端に低下しデオキシ Mb がメト化する経路、^{5,10)} およびオキシ Mb と相互作用する気体分子が少なくなりオキシ Mb がメト化する経路のいずれかの理由によるものと予想された。なお、前者の経路は非常に有力であ

るものの、それを仮定しなくてもこれまでの魚肉を用いた報告を説明できる。前者の経路では、魚肉中の酸素濃度が 10 μM 以下にまで減少して⁵⁾いる一方、後者の経路ではそれよりも高濃度の酸素濃度であると予想される。冷凍貯蔵かつ高濃度の窒素ガス環境下においてもメト化が遅い¹⁴⁾のは、魚肉の酸素濃度はデオキシ Mb が存在しない程度の酸素分圧に保たれ、かつ十分な量の気体分子がオキシ Mb と相互作用することができ、褐変が遅くなるためと予想された。

解凍後¹⁴⁾および冷蔵¹⁰⁾において真空包装によりメト化を抑制することができるのは、真空包装および細胞の酸素消費により酸素濃度を数 μM ⁵⁾よりも十分低くすることで、デオキシ Mb のメト化を抑制しているためと解釈される。その一方で、解凍後および冷蔵において高濃度酸素下におき、すべてオキシ Mb としてメト化を抑制する方法¹⁵⁾は、酸化されやすいデオキシ Mb⁵⁾の生成を防ぎつつ、溶解度の高い酸素分子とオキシ Mb を相互作用させることにより、メト化を抑制していると解釈される。

オキシ Mb のメト化や生体内のそれ以外の経路によって生じた O_2^- や HO_2^- は、活性酸素分解酵素スーパーオキシドディスムターゼにより酸素分子と過酸化水素に変換される。オキシ Mb と比較し、デオキシ Mb は過酸化水素と 100 倍以上の反応性を示す。¹²⁾ デオキシ Mb の過酸化水素との反応は 2 電子酸化であり、ヘム鉄はいったん 4 価となってデオキシ Mb と反応し、メト Mb へと変換される。¹²⁾ ただし、生じた過酸化水素はメト Mb やカタラーゼによっても分解されうる。⁴³⁻⁴⁵⁾ ペルオキシラジカル O_2^- 、 HO_2^- および過酸化水素と Mb の関係は複雑であるが、これらの活性酸素種は精製 Mb のメト化速度にはほとんど影響しない⁵⁾ものの、魚肉におけるメト化にどの程度の影響があるのか検討が必要であろう。

ヘムポケット内の気体分子の移動速度は Mb 内部の空洞内のアミノ酸残基の置換の影響を受け、⁴⁶⁾ 気体分子との相互作用によっても空洞の大きさは変化する。⁴²⁾ メト化速度と空洞を関連させた研究は少ないものの、クロマグロ Mb 内部の空洞はイワシクジラ Mb のそれと比較し小さくいため、⁴⁷⁾ 水分子が入りにくく、メト化は遅いと予想されるが、マグロ類 Mb はクジラ類 Mb と比較してメト化速度の実測値は大きい。^{7,48)} メト化速度とアミノ酸置換の関係には、空洞の大きさよりも、グロビン構造の安定性の違い⁴⁹⁾の方が重要なかもしれない。急速凍結と比較すると、緩慢凍結においてマグロ精製オキシ Mb は解凍後に速やかにメト化するが、⁵⁰⁾凍結解凍によってグロビンが不安定化したためであろう。⁵¹⁾ オキシ Mb の変性剤に対する安定性が高いほどメト化しにくいことが知られている⁴⁹⁾が、ヘムポケット内に

水分子が侵入しにくくなっていることが原因と考えられる。ヘムポケット内部のアミノ酸置換や空洞の体積がどのようにメト化速度に影響を与えるか、および凍結条件がどのように水や酸素分子と Mb の相互作用に違いを及ぼすのかについては、今後さらに検討する必要がある。

死後の魚肉内部ではデオキシ Mb の割合が高い一方で、表面ではオキシ Mb の割合が高い。デオキシ Mb は酸素分子によりメト化されやすい一方で、高い酸素分圧ではオキシ Mb へと変換される。式 1 の通り、オキシ Mb のメト化の主要な経路にはプロトンが関与しており、pH が低いほどメト化しやすい。一方で、デオキシ Mb のメト化には直接的にはプロトンが関与していないため、pH の影響を受けにくいと予想されるが、詳細は不明である。また脂質含量の多い魚肉では、特に酸素封入した際に脂質酸化物が発生し、メト化を促進させる可能性が高い。また、分子機構は不明であるものの、ATP はオキシ Mb に対してメト化抑制能を示す。⁵²⁾ 魚肉中のメト化抑制効果の原理の解明や開発は、これらのことを前提として行うべきであろう。ATP によるメト化抑制効果や比較的高い冷凍温度においてメト化が速く進行することなど、その分子機構が未解明な現象については、MD シミュレーションも有効な手段となりうることも本研究により示された。これらの現象に関する検討も進行中である。

謝 辞

本研究の一部は水産庁「養殖業成長産業化技術開発事業」(酸素充填解凍を用いた生鮮用冷凍水産物の高品質化技術開発事業)の一環として実施した。

文 献

- Phillips SE. Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1980; **142**: 531–554.
- Phillips SE, Schoenborn BP. Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature* 1981; **292**: 81–82.
- Bito M. Studies on the retention of frozen tuna-I. Absorption spectra of the aqueous extract of frozen tuna meat undergoing discoloration. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1964; **30**: 847–857 (in Japanese with English abstract).
- Nurilmala M, Ushio H, Kaneko G, Ochiai Y. Assessment of commercial quality evaluation of yellowfin tuna *Thunnus albacares* meat based on myoglobin properties. *Food Sci. Technol. Res.* 2013; **19**: 237–243.
- Brantley RE Jr, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. The mechanism of autooxidation of myoglobin. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 6995–7010.
- Satoh Y, Shikama K. Autoxidation of oxymyoglobin. A nucleophilic displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* 1981; **256**: 10272–10275.
- Kitahara Y, Matsuoka A, Kobayashi N, Shikama K. Autoxidation of myoglobin from bigeye tuna fish (*Thunnus obesus*). *Biochim. Biophys. Acta* 1990; **1038**: 23–28.
- Marcinek DJ, Bonaventura J, Wittenberg JB, Block BA. Oxygen affinity and amino acid sequence of myoglobins from endothermic and ectothermic fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; **280**: 1123–1133.
- Matsuura F, Hashimoto K, Kikawada S, Yamaguchi K. Studies on the autoxidation velocity of fish myoglobin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1962; **28**: 210–216 (in Japanese with English abstract).
- Bito M. Studies on the retention of meat color of frozen tuna-VI. Effect of plastic film packaging and ice-grazing on the rate of discoloration. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1969; **35**: 218–226 (in Japanese with English abstract).
- Tanaka M, Nishino H, Satomi K, Yokoyama M, Ishida Y. Gas-exchanged packaging of tuna fillets. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1996; **62**: 800–805 (in Japanese with English abstract).
- Yusa K, Shikama K. Oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin with hydrogen peroxide: involvement of ferryl intermediate. *Biochemistry* 1987; **26**: 6684–6688.
- Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S. Effect of frozen temperature on autoxidation and aggregation of bluefin tuna myoglobin in solution. *J. Food Biochem.* 2004; **28**: 123–134.
- Hiraoka Y, Ohsaka E, Narita K, Yamabe K, Seki N. Preventive method of color deterioration of yellowtail dark muscle during frozen storage and post thawing. *Fish. Sci.* 2004; **70**: 1130–1136.
- 今村伸太郎, 鈴木道子, 山下倫明, 大村裕治. 酸素ガス置換包装又は酸素ガス置換貯蔵を用いたマグロ類等の筋肉の冷蔵, 冷凍, 解凍, 貯蔵法, 並びに酸素ガス置換包装されたマグロ類等の筋肉, 特許第 6529106 号, 2019.
- Hasan MM, Watabe S, Ochiai Y. Structural characterization of carangid fish myoglobins. *Fish Physiol. Biochem.* 2012; **38**: 1311–1322.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 2009; **4**: 1–13.
- Ueki N, Chow CJ, Ochiai Y. Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to the thermostability-structure relationship. *J. Agric. Food Chem.* 2005; **53**: 4968–4975.
- Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wires Comput. Mol. Sci.* 2013; **3**: 198–210.
- 小澤秀夫. 窒素分子存在下での分子動力学シミュレーション. 神奈川工科大学情報教育研究センター研究報告 2019; **13**: 85–86.
- Huang MH, Cho SC, Ochiai Y, Watabe S. Evaluation of biochemical properties of burnt and normal meat in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Int. J. Nut. Food Sci.* 2017; **6**: 203–210.
- Ozawa H, Umezawa K, Takano M, Ishizaki S, Watabe S, Ochiai Y. Structural and dynamical characteristics of tropomyosin epitopes as the major allergens in shrimp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; **498**: 119–124.
- Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes. *J. Comput. Phys.* 1977; **23**: 327–341.
- Roe DR, Cheatham III TE. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.* 2013; **9**: 3084–3095.

- 25) Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD—Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* 1996; **14**: 33–38.
- 26) U.S. Standard Atmosphere. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Aeronautics and Space Administration, and United States Air Force, Washington, D.C. 1976; 3.
- 27) 化学工学会. 「化学工学便覧」丸善, 東京. 1999.
- 28) Birnbaum GI, Evans SV, Przybylska M, Rose DR. 1.70 Å resolution structure of myoglobin from yellowfin tuna. An example of a myoglobin lacking the D helix. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1994; **50**: 283–289.
- 29) Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Royal Statist. Soc. B* 1995; **57**: 289–300.
- 30) Ruscio JZ, Kumar D, Shukla M, Prisant MG, Murali TM, Onufriev AV. Atomic level computational identification of ligand migration pathways between solvent and binding site in myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; **105**: 9204–9209.
- 31) Tilton RF Jr, Kuntz ID Jr, Petsko GA. Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin-xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry* 1984; **23**: 2849–2857.
- 32) Tilton RF Jr, Petsko GA. A structure of sperm whale myoglobin at a nitrogen gas pressure of 145 atmospheres. *Biochemistry* 1988; **27**: 6574–6582.
- 33) Bossa C, Amadei A, Daidone I, Anselmi M, Vallone B, Brunori M, Di Nola A. Molecular dynamics simulation of sperm whale myoglobin: effects of mutations and trapped CO on the structure and dynamics of cavities. *Biophys. J.* 2005; **89**: 465–474.
- 34) Savino C, Miele AE, Draghi F, Johnson KA, Sciara G, Brunori M, Vallone B. Pattern of cavities in globins: the case of human hemoglobin. *Biopolymers* 2009; **91**: 1097–1107.
- 35) Teeter MM. Myoglobin cavities provide interior ligand pathway. *Protein Sci.* 2004; **13**: 313–318.
- 36) Vojtechovský J, Chu K, Berendzen J, Sweet RM, Schlichting I. Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophys. J.* 1999; **77**: 2153–2174.
- 37) Brunori M, Vallone B, Cutruzzola F, Travaglini-Allocatelli C, Berendzen J, Chu K, Sweet RM, Schlichting I. The role of cavities in protein dynamics: crystal structure of a photolytic intermediate of a mutant myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; **97**: 2058–2063.
- 38) Chu K, Vojtechovský J, McMahon BH, Sweet RM, Berendzen J, Schlichting I. Structure of a ligand-binding intermediate in wild-type carbonmonoxy myoglobin. *Nature* 2000; **403**: 921–923.
- 39) Šrajcar V, Ren Z, Teng TY, Schmidt M, Ursby T, Bourgeois D, Pradervand C, Schildkamp W, Wulff M, Moffat K. Protein conformational relaxation and ligand migration in myoglobin: a nanosecond to millisecond molecular movie from time-resolved Laue X-ray diffraction. *Biochemistry* 2001; **40**: 13802–13815.
- 40) Schotte F, Lim M, Jackson TA, Smirnov AV, Soman J, Olson JS, Phillips GN Jr, Wulff M, Anfinrud PA. Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved x-ray crystallography. *Science* 2003; **300**: 1944–1947.
- 41) Hummer G, Schotte F, Anfinrud PA. Unveiling functional protein motions with picosecond x-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; **101**: 15330–15334.
- 42) Tomita A, Sato T, Ichianagi K, Nozawa S, Ichikawa H, Chollet M, Kawai F, Park SY, Tsuduki T, Yamato T, Koshihara SY, Adachi S. Visualizing breathing motion of internal cavities in concert with ligand migration in myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; **106**: 2612–2616.
- 43) Tajima G, Shikama K. Autoxidation of oxymyoglobin. An overall stoichiometry including subsequent side reactions. *J. Biol. Chem.* 1987; **262**: 12603–12606.
- 44) Egawa T, Shimada H, Ishimura Y. Formation of compound I in the reaction of native myoglobins with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 34858–34866.
- 45) Lardinois OM, Ortiz de Montellano PR. Intra- and intermolecular transfers of protein radicals in the reactions of sperm whale myoglobin with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 36214–36226.
- 46) Bourgeois D, Vallone B, Arcovito A, Sciara G, Schotte F, Anfinrud PA, Brunori M. Extended subnanosecond structural dynamics of myoglobin revealed by Laue crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; **103**: 4924–4929.
- 47) Ochiai Y, Watanabe Y, Ozawa H, Ikegami S, Uchida N, Watabe S. Thermal denaturation profiles of tuna myoglobin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; **74**: 1673–1679.
- 48) Ochiai Y, Watanabe Y, Uchida N, Ozawa H, Watabe S. Biochemical and thermodynamic characteristics of myoglobin from the skeletal muscle of sei whale *Balaenoptera borealis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2010; **76**: 686–694 (in Japanese with English abstract).
- 49) Chow CJ. Relationship between the stability and autoxidation of myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* 1991; **39**: 22–26.
- 50) Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K. Autoxidation of bluefin tuna myoglobin associated with freezing and thawing. *Food Sci.* 1987; **52**: 589–591.
- 51) Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K. Reduced stability and accelerated autoxidation of tuna myoglobin in association with freezing and thawing. *J. Agric. Food Chem.* 1989; **37**: 1391–1395.
- 52) Inohara K, Kimura I, Yuan CH. Suppressive effect of ATP on autoxidation of tuna oxymyoglobin to metmyoglobin. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 503–511.