

## キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンの簡易測定法

岡田昌己\*, 西山一朗\*

A Simple and Rapid Method for Measuring Actinidin Concentration in Kiwifruit.

Masaki OKADA\*, Ichiro NISHIYAMA\*

キーワード：プロテアーゼ、人工基質、プレートリーダー、迅速測定

### 1. 緒言

キウイフルーツ果実には、システインプロテアーゼであるアクチニジン（アクチニジン）が豊富に含まれている<sup>1)</sup>。アクチニジンは、筋原線維タンパク質を加水分解するため、食肉軟化剤としての応用が試みられている<sup>1)</sup>。また、食肉以外にも種々の食品タンパク質を加水分解するため、消化促進効果があるものと期待されている<sup>1)</sup>。その他にも、アクチニジンには舌苔除去作用<sup>2)</sup> や口臭抑制作用<sup>3)</sup> があることが報告されており、キウイフルーツ果汁を原料とした口腔ケアタブレットも実用化されている。一方、アクチニジンによる望ましくない作用としては、ゼラチンのゲル化を妨げることや、主要なアレルギーとして食物アレルギーの原因となることなどがあげられる<sup>1)</sup>。また、口腔刺激性の原因になる可能性も示唆されている<sup>4)</sup>。

最も一般的に市販されているキウイフルーツは緑色果肉品種のヘイワード種であるが、そのほかにもキウイフルーツには多種多様な品種/系統が存在する<sup>1)</sup>。しかし、それらの品種/系統の中で、広く一般に市販されているものは、ヘイワード種とホート16A種（ゼスプリ・ゴールド）のみである。消費者の幅広いニーズに対

応するため、食味や栄養成分、食品機能性等に優れ、貯蔵性にも優れた高品質果実の作出が求められている。上記の通りアクチニジンには、食品成分として望ましい面と望ましくない面とがあるため、キウイフルーツの新品種を開発するときには、果実内アクチニジン濃度は果実の品質や機能性を評価するための指針として重要である。

果実内のアクチニジン濃度は、そのタンパク質分解酵素活性を測定する方法<sup>4,5)</sup> や、定量的電気泳動法で測定する方法<sup>5)</sup> が報告されているが、いずれも交配による新品種開発のための数百にも及ぶ多検体に適応するには困難が伴う。そのため、アクチニジン濃度の簡易迅速測定法の開発が求められる。アクチニジンの簡易迅速検出法としては、(株)プリマハムから販売されている抗アクチニジンモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトキットが利用可能である。この検出キットは、操作が非常に簡便なうえ特異性が高い<sup>6)</sup> という長所がある半面、定量実験には不向きなことと、多量の検体に適用するにはコストが高いという実用面での難点がある。また、抗アクチニジン抗体を用いてELISA系を構築する方法も考えられるが、この場合もコス

\*人間健康学部 健康栄養学科

ト面での制約が大きいと考えられる。

本研究では、低コストのアクチニジン簡易迅速測定法の開発を目指して、キウイフルーツ果汁のタンパク質分解酵素反応を96穴プレートで行い、これをプレートリーダーで定量化することを試みた。

## 2. 材料と方法

### (1) 植物材料と果汁の調製

ニュージーランド産のハイワード種キウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*) を東京都内の青果店にて購入し、実験材料として用いた。それぞれの果実を剥皮し、可食部をフードプロセッサ (クイジナート DLC-1) によりピューレーとした。このピューレーを遠心分離 (5,000×g, 4℃, 10分間) して、得られた上清を果汁とした。果汁の調製は、一果ごとに別々に行った。

### (2) アクチニジンの精製

ハイワード種果実からのアクチニジンの精製は、Brocklehurst *et al.*<sup>7)</sup> の方法に従って行った。すなわち、硫酸沈殿法により得られた粗アクチニジン画分を、Thiopropyl-Sepharose 6B (Amersham Biosciences) カラムを用いたコバレントクロマトグラフィーに供し、精製アクチニジンを得た。精製アクチニジン溶液のタンパク質濃度は、牛血清アルブミン (Sigma, Fraction V) を標準として、Lowry *et al.*<sup>8)</sup> の方法により定量した。

### (3) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法によるアクチニジン濃度の測定

果汁中のアクチニジン濃度は、既報<sup>5)</sup> に従い SDS-PAGE 法によって求めた。すなわち、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたミニスラブ電気泳動を Laemmli<sup>9)</sup> 法によって行った。

泳動後のゲルにクマジーブリリアントブルー R-250染色を施し、得られた電気泳動像を CS アナライザー (アトー) により解析し、アクチニジンの定量を行った。結果は2回の実験の平均値で表した。

### (4) プロテアーゼ活性の測定

アクチニジンの人工基質に対する選択性を調べる実験は、Filippova *et al.*<sup>10)</sup> の方法を改変して行った。すなわち人工基質を用いて、そのカルボキシ末端の加水分解による *p*-ニトロアニリンの遊離を、波長405nmにおける吸光度として測定した。試験管に25mmol/L L-システインおよび10mmol/L エチレンジアミン四酢酸を含むクエン酸-NaOH 緩衝液 (50mmol/L, pH 6.0) 0.8mL と0.2mg/mL 精製アクチニジン 0.1mL を取り、25℃の恒温槽内に5分間保った。これに0.1mL の各人工基質 (5 mmol/L、ジメチルスルホキシド溶液) を加え混和し、25℃に5分間保持した後、50%トリクロロ酢酸溶液を0.1mL 加え反応を停止した。遠心分離 (10,000×g, 1分間) により除タンパクした後、光学用マイクロセル (1 mL) 中にて405nmの吸光度を測定した。ブランクとしては、トリクロロ酢酸溶液を加えた後に酵素基質を加え、同様に吸光度測定を行った。プロテアーゼ活性は、*p*-ニトロアニリンのモル吸光係数を  $\epsilon_{405} = 9,920 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  として、1分間に遊離される *p*-ニトロアニリンの物質量をアクチニジン 1 mg 当たりとして表した。

ハイワード種果実から調製した果汁のプロテアーゼ活性の簡易測定は、96穴プレートを用いて行った。各ウェルに25mmol/L L-システインおよび10mmol/L エチレンジアミン四酢酸を含むクエン酸-NaOH 緩衝液 (50mmol/L, pH 6.0) 150 $\mu$ L と同緩衝液にて5倍に希釈したキウイフルーツ果汁 2 $\mu$ L を取り、室温下で5分

間保った。これに 2 mmol/L の Bz-Phe-Val-Arg- $\rho$ NA (ジメチルスルホキシド溶液) を 25  $\mu$ L 加え混和し、室温に 6 分間保持した後、50%トリクロル酢酸溶液を 20  $\mu$ L 加え反応を停止した。その後直ちにマイクロプレートリーダー (コロナ電気、MTP450Lab) を用い、405nm の吸光度を測定した。

いずれの場合も、結果は 3 回の実験の平均値で表した。

### (5) 人工基質

Bz-Phe-Val-Arg- $\rho$ NA、Bz-Pro-Phe-Arg- $\rho$ NA、Bz-Val-Gly-Arg- $\rho$ NA および Z-Gly-Gly-Leu- $\rho$ NA は Sigma-Aldrich Japan より、Z-Phe-Arg- $\rho$ NA および Z-Asp-Glu-Val-Asp- $\rho$ NA は BIOMOL Research Laboratories より、Pyr-Phe-Leu- $\rho$ NA、Bz-Arg- $\rho$ NA および Z-Ala-Ala-Leu- $\rho$ NA はペプチド研究所より、また Ac-Phe-Gly- $\rho$ NA は Bachem Feinchemikalien AG より購入した。いずれの人工基質も 2 あるいは 5 mmol/L となるようジメチルスルホキシドに溶解し、実験に供した。

## 3. 結果と考察

### (1) アクチニジンの基質選択性

各種の人工基質を用いたときの精製アクチニジンの比活性を、表 1 に示した。アクチニジンやパパインなどのシステインプロテアーゼでは、基質の P2 サイトにおける疎水性アミノ酸の存在が重要であるとされている<sup>11)</sup>。本実験の結果も、P2 サイトにバリンやフェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸残基をもつ人工基質で比活性が高い傾向が認められ、それらの中でも、Bz-Phe-Val-Arg- $\rho$ NA が最も高い比活性を示した (表 1)。この基質では、Filippova *et al.*<sup>10)</sup> によってシステインプロテアーゼ用の基質として推奨された Pyr-Phe-Leu- $\rho$ NA よりも 30 倍近く高い比活性が得られた (表 1)。この結果は、Bz-Phe-Val-Arg- $\rho$ NA を用いることにより、アクチニジンの迅速な測定が可能となることを意味する。また、キウイフルーツ果実にはクエン酸などの有機酸が多く含まれており<sup>12)</sup>、強い緩衝作用を有しているため、酵素活性測定に先だって果汁の pH 調整が必要であるが、感度の高い基質を用いることによって用いる果汁の体積を少なくできるため、果汁の pH 調整が不要となり前処理の手間が省ける。そのため、簡易

表 1 各種人工基質に対するアクチニジンの選択性

人工基質	比活性 (nmol $\rho$ NA/min·mg protein)
Bz-Phe-Val-Arg- $\rho$ NA	1268
Z-Phe-Arg- $\rho$ NA	225
Bz-Pro-Phe-Arg- $\rho$ NA	134
Pyr-Phe-Leu- $\rho$ NA	44.0
Ac-Phe-Gly- $\rho$ NA	29.2
Z-Asp-Glu-Val-Asp- $\rho$ NA	3.67
Bz-Arg- $\rho$ NA	2.76
Z-Ala-Ala-Leu- $\rho$ NA	1.17
Bz-Val-Gly-Arg- $\rho$ NA	0.18
Z-Gly-Gly-Leu- $\rho$ NA	0.14

迅速測定法の開発のためには、Bz-Phe-Val-Arg-pNA を用いることが望ましいものと判断した。

### (2) SDS-PAGE 法によるアクチニジンの定量

ハイワード種果実から一果ごとに調製した果汁を SDS-PAGE に供した結果を、図 1 に示す。アクチニジンは、分子量 24,000 前後に単一バンドとして認められた (図 1、レーン A) が、これに相当するバンドの濃さには、大きな個体間格差が認められた。この電気泳動像からデンストメトリーによる定量化を行ったところ、果汁中アクチニジン濃度は 0.69~1.72 mg/mL であることが示された。この結果より、同一の品種であっても、果実ごとのアクチニジン濃度には大きな個体間差異があることが確認された。

### (3) 酵素活性測定法によるアクチニジンの定量

96穴プレートを用いて酵素反応を行い、プ

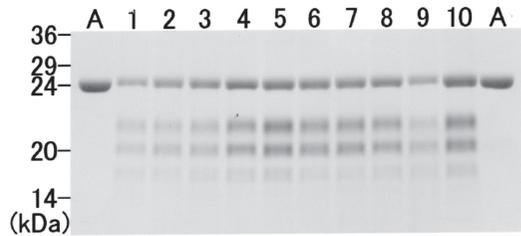


図 1 ハイワード種キウイフルーツ果汁のドデシル硫酸-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 像

ハイワード種キウイフルーツ果汁を、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供した (レーン 1-10)。レーン A は、2 mg/mL の精製アクチニジンを泳動した結果を示す。

レートリーダーでアクチニジン活性を測定したところ、図 2 a のような検量線が得られた。この結果より、少なくとも 50-500 mg/mL の濃度範囲において、アクチニジン濃度の測定が可能であることが示唆された。しかし、この検量線を用いて測定する場合、毎回検量線作成のために各種濃度の標準アクチニジンを作製し測定する必要があり、手間と時間がかかる。そこで図 2 b に示すようにプロットし直したところ、ア

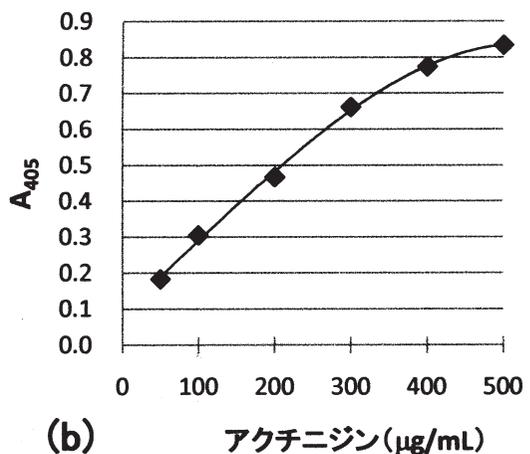
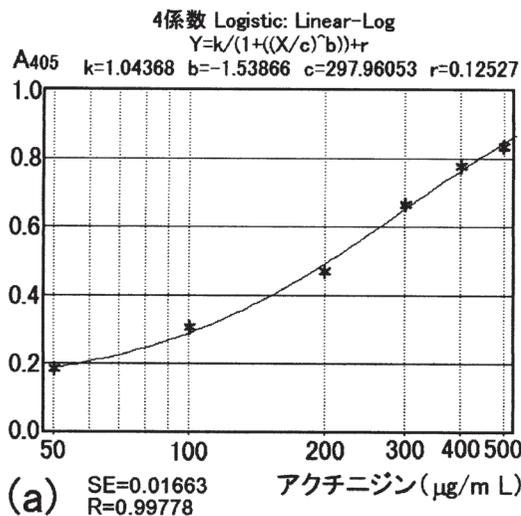


図 2 酵素活性測定法によるアクチニジンの検量線

精製アクチニジンの濃度 (50-500 mg/mL) とプレートリーダーによって測定した酵素活性との関係を示した (A)。アクチニジン濃度 50-300 mg/mL の範囲では、相関係数 0.998 で直線性が認められた。

クチニジン濃度50-300mg/mLの濃度範囲では、相関係数0.998で濃度と吸光度との間に比例関係が認められた。この結果より、アクチニジン濃度が50-300mg/mLの範囲となるように果汁を希釈して測定を行えば、2点検量線法でも測定が可能であり、より簡略化が実現できることが示唆された。

上記のように酵素活性測定法で求めたアクチニジン濃度と、SDS-PAGE法により求めた値との相関性を図3に示す。各測定値の間には、相関係数0.988で非常に高い正の相関性が認められた。この結果から、96穴プレートを用いた酵素活性測定法によって、簡便かつ迅速なアクチニジン濃度の評価が可能であることが示唆された。ただし、酵素活性測定法で求めたアクチニジン濃度とSDS-PAGE法によって求めた値とは一致せず、前者は后者の60%程度の低値を示した。この原因としては、果汁中のアクチニジンの一部が不活性化されている可能性が考えられる。アクチニジンが活性を示すためには、

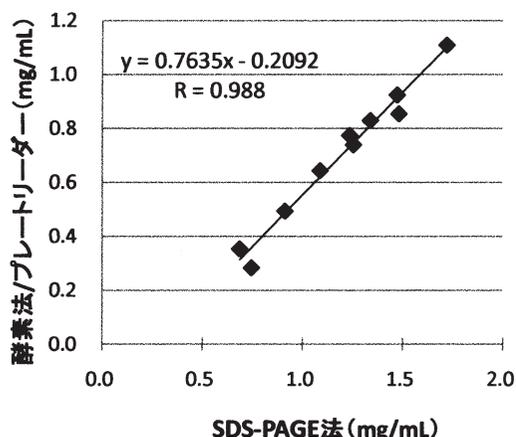


図3 SDS-PAGE法ならびに酵素活性測定法により求めたアクチニジン濃度の相関性

ヘイワード種キウイフルーツ果汁のアクチニジン濃度を、一果ごとにSDS-PAGE法ならびに酵素活性測定法(酵素法)によって定量しプロットした。両者の間には、相関係数0.988で非常に高い正の相関性が認められた。

活性中心に存在するSH基が重要であり、これが酸化されると不活性型に変化することが知られている<sup>7)</sup>。本実験において標準品として用いたアクチニジンは、コバレントクロマトグラフィーによって精製したものであるため、そのほとんどが活性型であったと考えられる<sup>7)</sup>。一方、キウイフルーツ果汁中のアクチニジンは、その一部が不活性型であったとすると、SDS-PAGE法では活性型および不活性型のすべてのアクチニジンが測定されるのに対して、酵素活性測定法では活性型のアクチニジンのみが測定されることになる。そのために、定量値の不一致が生じたのではないかと推察される。

本実験の結果から、96穴プレートを用いた酵素活性測定法によって、キウイフルーツ果汁中アクチニジン濃度の評価が簡便かつ迅速に行えることが示唆された。今後は、果汁調製法の簡略化についても検討を行い、キウイフルーツの優良品種選抜等の目的に応用可能な実用的な方法の開発を目指したい。

本研究の一部は科学研究費補助金「基盤研究(C)20580040」を受けて行った。

#### 参考文献

- 1) Nishiyama, I (2007) Fruits of the *Actinidia* genus. *Adv Food Nutr Res* 52 : 293-324
- 2) 吉松大介、杉村真司、井岡俊之、白石浩荘、米谷俊、山賀孝之、宮崎秀夫 (2006) プロテアーゼ含有タブレットの舌苔除去効果、口腔衛生学雑誌 56, 37-41
- 3) 吉松大介、杉村真司、井岡俊之、白石浩荘、米谷俊、山賀孝之、宮崎秀夫 (2007) プロテアーゼ含有タブレットの口臭抑制効果、口腔衛生学雑誌 57, 22-27
- 4) Boyes, S, Strübi, P, Marsh, H (1997) Actinidin levels in fruit of *Actinidia* species and some

- Actinidia arguta* rootstock-scion combinations. Lebensm Wiss Technol 30 : 379-389
- 5) 西山一朗、大田忠親 (2002) キウイフルーツ果汁のアクチニジン濃度およびプロテアーゼ活性の品種間差、日本食品科学工学会誌 49, 401-408
- 6) 西山一朗、加藤重城、秋元政信、穂山浩、福田哲生、末澤克彦、大田忠親 (2007) キウイフルーツ等マタタビ属果実中アクチニジンのイムノクロマトグラフィーによる簡易迅速検出法、園芸学研究 6 別冊 2, 481
- 7) Brocklehurst, K, Baines, B and Malthouse, PG (1981) Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. Biochem J197 : 739-746
- 8) Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, R J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275.
- 9) Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685
- 10) Filippova, IY, Lysogorskaya, EN, Oksennoit, ES, Rudenskaya, GN, Stepanov, VM (1984) L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide—A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. Anal Biochem 143 : 293-297
- 11) Patel, M, Kayani IS, Mellor, GW, Sreedharan, S, Templeton, W, Thomas, EW, Thomas, M, Brocklehurst, K (1992) Variation in the P2-S2 stereochemical selectivity towards the enantiomeric N-acetylphenylalanylglycine 4-nitroanilides among the cysteine proteinases papain, ficin and actinidin. Biochem J281 : 553-559
- 12) Nishiyama, I, Fukuda, T, Shimohashi, A, Oota, T (2008) Sugar and Organic Acid Composition in the Fruit Juice of Different *Actinidia* Varieties. Food Sci Technol Res 14 : 67-73