

キウイフルーツ果実におけるアクチニジンアイソザイム組成の 品種 / 系統間差異

西山一朗^{1*}、福田哲生^{2a}、末澤克彦^{2b}

Isozyme Composition of Actinidin in the Fruit of Different Kiwifruit Varieties

Ichiro NISHIYAMA^{1*}、Tetsuo FUKUDA^{2a}、Katsuhiko SUEZAWA^{2b}

Abstract

Kiwifruit contains a cysteine protease called actinidin. It has been suggested that the actinidin in 'Hayward' fruit, the most common commercially available cultivar, can be divided into several isozymes. In the present study, two types of actinidin isozyme, A1 and A2, were purified from 'Hayward' fruit, and these concentrations in the fruit juice of 16 kiwifruit cultivars/selections were determined using ion-exchange high-performance liquid chromatography. The concentrations of A1 and A2 were in the ranges of 0 - 2.32 and 0 - 1.77 mg/mL, respectively. There was a considerable varietal difference in A1/A2 ratios, ranging from 100 : 0 to 28 : 72.

キーワード：キウイフルーツ，アクチニジン，アイソザイム組成，品種間差異

Key words : Kiwifruit, Actinidin, Isozyme composition, Varietal difference

1. 諸言

キウイフルーツ果実には、アクチニジンあるいはアクチニジンと呼ばれるシステインプロテアーゼが豊富に含まれている¹⁾。このアクチニジンは、食肉タンパク質であるアクチンやミオシンをよい基質とするため、キウイフルーツ果汁やその加工品は食肉軟化剤として利用されている¹⁾。またアクチニジンは消化管内でも活性を保ち、食肉、乳、大豆などのタンパク質を加水分解するため、消化促進効果を示すものと考えられている^{2, 3)}。このように、アクチニジ

ンは食品科学的に重要な成分である一方、キウイフルーツアレルギーに関連する主要なアレルゲンであるとの報告もある⁴⁾ ため、食品衛生的にも留意すべき成分である。

キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンには数種類のアイソザイムが存在することが、これまでに報告されている。McDowall⁵⁾ は、キウイフルーツ果実由来のアクチニジンが電気泳動によって2種類の構成成分に分けられることを示唆した。また Sugiyama et al.^{6, 7)} は、アクチニジンが6種類の生化学的に異なる酵素

¹人間健康学部 健康栄養学科

²香川県農業試験場府中果樹研究所

^a現在：香川県農業経営課

^b現在：オーチャードアンドテクノロジー（株）

*連絡先：inishiya@komajo.ac.jp

に分離されることを示した。いずれの報告においても材料としたキウイフルーツ果実の品種名が明示されていないものの、その時代背景を考慮すれば、いずれの研究においても、最も一般的な商業栽培品種である‘ヘイワード’種果実が供されたものと推測される。

このように、キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンのアイソザイムについては、‘ヘイワード’という単一品種に関する報告しかなく、他の品種/系統の果実に関する情報はほとんど認められない。本研究では、日本国内で入手可能な16品種/系統のキウイフルーツ果実を用いて、それぞれの果汁中のアクチニジンアイソザイム組成を調査した。

2. 実験方法

(1) 材料

実験に用いたキウイフルーツの品種/系統とその果実特性を表1に示す。‘ヘイワード’と

‘ホート16A’果実は、ニュージーランド産のものを東京都内の青果店にて購入した。‘ブルーノ’、‘アボット’、‘エルムウッド’および‘紅心’果実は、東京都澤登キウイ園より購入した。‘香緑’、‘讚緑’、‘ゴールデンキング’、‘アップルキウイ’、‘さぬきゴールド’、‘ACP-8’および‘さぬきエンジェルスイート’果実は香川県農業試験場府中果樹研究所の圃場で栽培されたものを使用した。また‘レインボーレッド’と‘小林39’果実は、静岡県小林農園より供与されたものを用いた。‘片浦イエロー’果実は、農業技術センター足柄地区事務所より供与されたものを用いた。いずれも追熟後の適熟果実を実験に供した。

(2) アクチニジンの精製

アクチニジンは、‘ヘイワード’種果実の果肉を材料として、Brocklehurst et al.⁸⁾の方法により精製した。すなわち、硫酸沈殿法により

表1 用いた品種/系統の果実特性

品種/系統名	果肉色	毛茸の密度
<i>Actinidia deliciosa</i>		
ヘイワード	緑	密
ブルーノ	緑	密
アボット	緑	密
エルムウッド	緑	密
香緑	濃緑	密
<i>A. deliciosa</i> × <i>A. chinensis</i>		
讚緑	黄緑	疎
<i>A. chinensis</i>		
紅心	黄 (わずかに赤)	疎～無
ゴールデンキング	黄	疎～無
アップルキウイ	黄～黄緑	疎～無
さぬきゴールド	黄	疎～無
ACP-8	黄	疎～無
レインボーレッド	黄 (一部に赤)	無
小林 39	黄	疎～無
ホート 16A	黄	疎～無
さぬきエンジェルスイート	黄 (一部に赤)	疎～無
片浦イエロー	黄	疎～無

粗アクチニン画分を得た後、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よって精製アクチニンを得た。精製アクチニン溶液のタンパク質濃度は、牛血清アルブミン (Sigma-Aldrich, Fraction V) を標準タンパク質として、Lowry et al.⁹⁾ の方法により定量した。

(3) 電気泳動法によるアクチニンの分析

タンパク質成分の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) 分析は、12.5%のポリアクリルアミドゲルをセットしたミニスラブ電気泳動装置 (アトー) を用い、Laemmli¹⁰⁾ の方法に従って行った。泳動後のゲルは、常法によりクマジーブリリアントブルー R-250による染色ならびに脱色を施した。

非還元条件での Native PAGE は、Sugiyama et al.⁶⁾ の方法に従って行った。すなわち、12.5%ポリアクリルアミドゲルと0.35 mol/L の β -アラニン-酢酸緩衝液 (pH 4.5) を用いて電気泳動を行い、上記と同様に染色、脱色を行った。

(4) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアクチニンアイソザイムの精製

上記のように精製したアクチニンを、陰イオン交換カラム TSK-GEL SUPERQ- 5 PW (7.5 mm \times 75 mm、東ソー) を用いた HPLC によって分析した。移動相として50 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 5.2) を用い、20分間で NaCl 濃度を0から0.5 mol/L まで高めることにより、アクチニンアイソザイムの溶出を行った。流速は1 mL/min とした。検出器は L-2455 PDA (日立) を用い、検出波長は280 nm とした。

分取した各アイソザイム画分は、60%硫酸沈

殿により濃縮した後、同様の HPLC をさらに2回繰り返して、それぞれが単一ピークとなるまで精製した。精製 A1 および A2 溶液のタンパク質濃度は、上記 (2) と同様の方法により定量した。

(5) 酵素活性の測定

アクチニンアイソザイム精製時のプロテアーゼ活性の測定は、Filippova et al.¹¹⁾ の方法を改変して行った。すなわち合成基質である Pyr-Phe-Leu-*p*NA (ペプチド研究所) を用い、ロイシン残基のカルボキシル末端側の加水分解による *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25 mmol/L L-システインおよび10 mmol/L エチレンジアミン四酢酸を含むクエン酸-NaOH 緩衝液 (50 mmol/L、pH 6.0) 0.85 ml と試料液0.1 ml を取り混和し、25°Cの恒温槽内に5分間保った。これに0.05 mL の5 mmol/L Pyr-Phe-Leu-*p*NA (ジメチルスルホキシド溶液) を加え混和し、25°Cに20分間保持した後、50%トリクロル酢酸溶液を0.1 mL 加え反応を停止した。遠心分離 (10,000 \times 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。プランクとしては、トリクロル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 $\epsilon_{405} = 9,920 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ として、1分間に遊離される *p*-ニトロアニリンの量によって表した。

各アイソザイムの基質特異性を調べる実験では、Pyr-Phe-Leu-*p*NA に加えて Bz-Phe-Val-Arg-*p*NA (Sigma-Aldrich)、Bz-Pro-Phe-Arg-*p*NA (Sigma-Aldrich)、Z-Phe-Arg-*p*NA (Bachem AG)、Ac-Phe-Gly-*p*NA (Bachem AG) および Z-Asp-Glu-Val-Asp-*p*NA (Bachem

AG) の各人工基質を用いて、同様に酵素活性を測定した。

(6) アクチニジンアイソザイム構成比率の品種 / 系統間差異

各品種 / 系統の果実を剥皮した後、果肉をフードプロセッサーで破碎し、2重のガーゼを用いて搾汁した。この搾汁を遠心分離 (12,000 × g, 4℃、10分間) して、得られた上清を果汁とした。この果汁 1 mL を取り、60% 飽和となるよう硫酸粉末を加え、15,000rpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、得られた沈殿を 1 mL の HPLC 移動相 (50 mmol/L 酢酸緩衝液、pH 5.2) に溶解して HPLC 分析に供した。

A1および A2の定量は、HPLC により精製したそれぞれの酵素を標準物質として作成した検量線を用いて行った。

3. 実験結果と考察

(1) 電気泳動法による精製アクチニジンの分析

コバレントクロマトグラフィーによって精製したアクチニジンを、還元条件下で SDS-PAGE に供した結果を図 1 左図に示す。アクチニジン (レーン A) は、分子量 25,000 付近に単一バンドとして検出された。精製前の果汁のプロファイル (レーン H) と比較すると、アクチニジンは 'ヘイワード' 果汁中の最も主要なタンパク質成分であることが示唆された。

次にこの精製アクチニジンを非還元条件下で Native PAGE に供したところ、近接した 2 本のバンドに分離されることが示された (図 1 右図)。この結果から精製アクチニジンは、少なくとも 2 種類のタンパク質の混合物であることが示された。アクチニジンには数種のアイソザイムが存在することが報告されている^{5,6)} ため、これらのバンドは、アクチニジンの主要なアイ

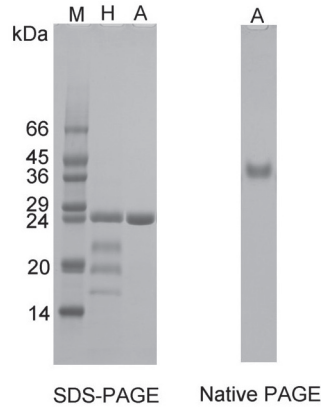


図 1 精製アクチニジンの電気泳動像

精製アクチニジンを、還元条件下 (SDS-PAGE) あるいは非還元条件下 (Native PAGE) においてポリアクリルアミドゲル電気泳動分析に供した。M: 分子量マーカータンパク質、H: 'ヘイワード' 果汁、A: 精製アクチニジン。

ソザイムであると考えられた。次にそれぞれのアイソザイムの HPLC による精製を試みた。

(2) アクチニジンアイソザイムの精製

図 2 は、精製アクチニジンを陰イオン交換カラムによる HPLC に供したときの溶出プロファイルを示す。精製アクチニジンは、保持時間 14.0 分ならびに 14.9 分の主要な 2 つのピークに分離されることが示された。それぞれの画分についてプロテアーゼ活性を調べた結果、これらのピークと活性のピークが一致することが確認された (図 2)。ここでは、先に溶出される酵素を A1、遅れて溶出される酵素を A2 と呼ぶことにした。A1 よりもわずかに速く溶出される小さなピークにも活性が認められたが、マイナーな成分であるため、まずは主要な成分である A1 と A2 を精製することとした。

A1 および A2 の精製は、同様の実験系で再クロマトグラフィーを 2 回繰り返すことによって行った。精製した A1 および A2 の溶出プロファイルを図 3 に示す。いずれも単一ピークとして

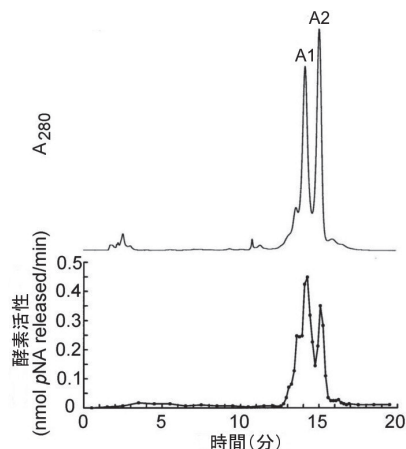


図2 精製アクチニジンのHPLC分析における溶出プロファイル

精製アクチニジン、陰イオン交換カラムを用いたHPLCに供した。上図は280 nmの吸光度、下図はプロテアーゼ活性を示す。

検出された。

精製したA1およびA2を非還元条件下でのNative PAGEで分析した結果を、図4に示す。この結果より、精製アクチニジン（図1右図および図4のレーンA）で認められた近接した2本のバンドは、上方が主にA1、下方が主にA2からなることが示された。以上の結果から総合的に判断すると、本実験で得られたA1およびA2は、McDowall⁵⁾の名付けたA1およびA2にそれぞれ相当し、また、Sugiyama et al.⁶⁾の名付けたKP4およびKP6にそれぞれ相当するものと考えられた。

(3) A1およびA2の基質特異性

数種の人工基質を用いて、A1およびA2の酵素活性を測定した結果を、表2に示す。比活性については、いずれの人工基質を用いた場合でも、A2よりもA1の方が高い傾向が見られた。どの人工基質に対して高い比活性を示すかという点では、A1とA2とで顕著な差異は認められなかった。いずれの酵素もBz-Phe-Val-Arg-

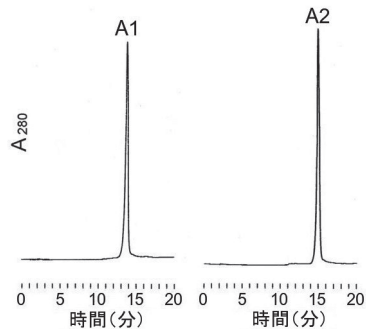


図3 A1およびA2のHPLC分析における溶出プロファイル

精製したアクチニジンアイソザイムA1（左図）およびA2（右図）を、陰イオン交換カラムを用いたHPLCに供した。



図4 A1およびA2のNative PAGE像

精製したアクチニジンアイソザイムA1およびA2を、非還元条件下でNative PAGEに供した。レーンAは、コバレントクロマトグラフィーにより精製したアクチニジンを示す。

pNAを最も良い基質とし、次いでZ-Phe-Arg-pNAで高い比活性が認められた。いずれの基質も、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、P1サイトにアルギニンが存在している。この結果は、アクチニジンやパパンなどのシステインプロテアーゼが活性を発揮するためには、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したPatel et al.¹²⁾の報告と矛盾しない。

以上のように、A1とA2とでは人工基質に対

表2 アクチニジンアイソザイムの基質特異性

合成基質	比活性			
	(nmol pNA released/min・mg protein)			
	[Pyr-Phe-Leu-pNA に対する相対値]			
	A1		A2	
Pyr-Phe-Leu-pNA	34	[1.0]	20	[1.0]
Bz-Phe-Val-Arg-pNA	720	[21.4]	716	[35.1]
Bz-Pro-Phe-Arg-pNA	85	[2.5]	50	[2.5]
Z-Phe-Arg-pNA	177	[5.3]	99	[4.9]
Ac-Phe-Gly-pNA	23	[0.7]	13	[0.6]
Z-Asp-Glu-Val-Asp-pNA	2.9	[0.1]	1.6	[0.1]

Pyr, L-pyroglyutamyl; Bz, benzoyl; Z, carbobenzyloxy; Ac, acetyl

する特異性に大差がないことが示されたが、食品タンパク質に対する基質特異性の差異については、今後の検討課題である。

(4) A1/A2構成比率の品種 / 系統間差異

種々の品種 / 系統のキウイフルーツ果実から調製した果汁中に含まれる A1 および A2 の濃度を、HPLC 法によって測定した。まず精製した A1、A2 それぞれの標品について、その濃度と HPLC 分析を行った時のピーク面積との関係を確認した。その結果、いずれの場合にも少なくとも 50 - 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲では直線性があることが示された (図5)。以後の実験では、A1 および A2 の濃度がこの範囲に収まる

ように、果汁から調製した試料液を希釈して実験に供した。

それぞれの果実から調製した試料を HPLC 分析に供したところ、いずれの品種 / 系統においても、夾雑物のピークに干渉されることなく、A1 と A2 の定量を行うことができた。いくつかの溶出プロファイルを図6に示す。‘ヘイワード’や‘アボット’では、A1 と A2 のピークの大きさがほぼ同等であったのに対し、‘讚緑’や‘ゴールデンキング’では A1 よりも A2 のピークが大きく、一方‘片浦イエロー’では A1 のピークのみが認められ A2 は検出されなかった。

HPLC による定量の結果を表3にまとめた。キウイフルーツ果汁における A1 と A2 の構成

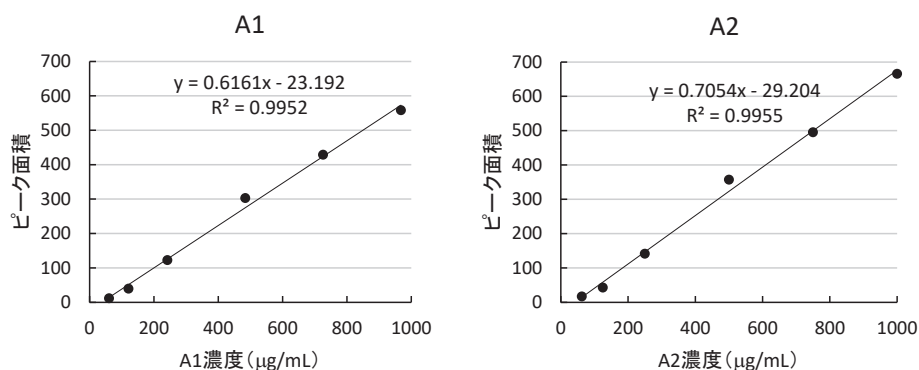


図5 A1 および A2 の検量線

精製したアクチニジンアイソザイム A1 (左図) および A2 (右図) を、陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供したときの、濃度とピーク面積との関係をプロットした。

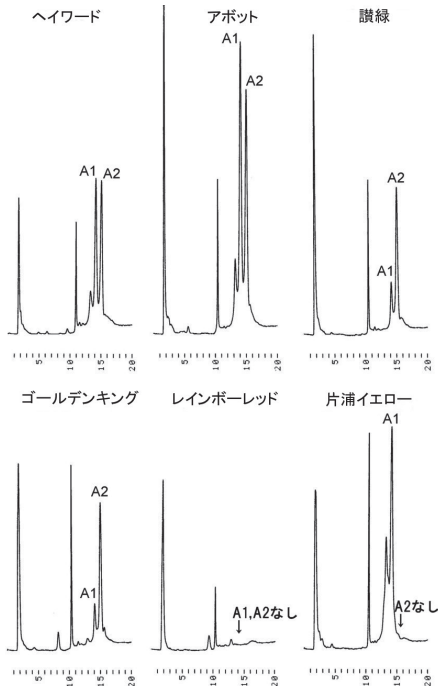


図6 キウイフルーツ果汁のHPLC分析

各品種/系統のキウイフルーツ果汁から調製した試料を、陰イオン交換カラムを用いたHPLC分析に供し、A1およびA2濃度を定量した。横軸は時間(分)を示す。

比率には、大きな品種/系統間差異があること

が確認された。A1の比率は、‘片浦イエロー’で100%と最も大きく、次いで‘さぬきエンジェルスイート’で83%、‘エルムウッド’で80%と高値を示した。一方A2の比率は、‘讃緑’および‘ゴールデンキング’の72%が最大で、次いで‘紅心’で71%、‘香緑’で61%と高い値が認められた。このA1とA2の構成比率については、総アクチニジン濃度との相関性は認められず、また、緑肉種である*A. deliciosa*種と黄肉種である*A. chinensis*種とでどちらが高いというような傾向も認められなかった。

本実験では、‘ Hayward ’種以外の品種/系統のキウイフルーツ果実において、そのアクチニジンアイソザイムの構成を初めて明らかにした。その結果、アクチニジンアイソザイムの構成比率には、大きな品種/系統間差異があることが示された。キウイフルーツの近縁種として、同じマタタビ属に属するサルナシやシマサルナシ、マタタビ、ミヤママタタビなどがある。これらのうち、サルナシ^{1,13)}やミヤママタタビ(未発表データ)果実には、アクチニジン類似

表3 各品種/系統果汁のA1およびA2濃度

品種/系統名	A1 A2 A1 + A2			A1 : A2
	(mg/mL)			
Hayward	1.15 ± 0.18	1.01 ± 0.18	2.16 ± 0.35	53 : 47
ブルーノ	0.77 ± 0.11**	0.66 ± 0.10**	1.43 ± 0.20**	54 : 46
アボット	2.06 ± 0.15**	1.77 ± 0.10**	3.83 ± 0.25**	54 : 46
エルムウッド	0.78 ± 0.03**	0.20 ± 0.02**	0.98 ± 0.05**	80 : 20
香緑	0.68 ± 0.06**	1.06 ± 0.08	1.74 ± 0.14	39 : 61
讃緑	0.37 ± 0.01**	0.96 ± 0.01	1.33 ± 0.01**	28 : 72
紅心	0.33 ± 0.01**	0.80 ± 0.07*	1.13 ± 0.08**	29 : 71
ゴールデンキング	0.38 ± 0.01**	0.97 ± 0.08	1.35 ± 0.08**	28 : 72
アップルキウイ	1.44 ± 0.20*	1.11 ± 0.18	2.55 ± 0.38**	56 : 44
さぬきゴールド	1.89 ± 0.10**	0.98 ± 0.08	2.87 ± 0.18*	66 : 34
APC-8	1.50 ± 0.22**	0.78 ± 0.11**	2.28 ± 0.33**	66 : 34
レインボーレッド	ND	ND	ND	—
小林39	0.73 ± 0.02**	0.39 ± 0.01**	1.12 ± 0.02**	65 : 35
ホート16A	ND	ND	ND	—
さぬきエンジェルスイート	1.10 ± 0.08	0.23 ± 0.01**	1.33 ± 0.09**	83 : 17
片浦イエロー	2.32 ± 0.34**	ND	2.32 ± 0.34**	100 : 0

A1およびA2の濃度は、平均値±標準偏差で示した。NDは、検出限界以下を示す。

*, **: ‘ Hayward ’種の値に対してP < 0.05およびP < 0.01で有意差あり(マン・ホイットニーのU検定)。

の酵素が含まれていることが知られている。今後は、サルナシやミヤマタタビ果実に含まれるアクチニジン類似酵素を精製し、今回得られたA1やA2との比較を行う予定である。これにより、マタタビ属果実に含まれるシステインプロテアーゼを系統的に理解するための一助としたい。

4. 利益相反

利益相反に相当する事項はない。

5. 参考文献

- 1) Nishiyama I (2007) Fruits of the *Actinidia* genus. *Adv Food Nutr Res* 52 : 293-324
- 2) 西山一朗 (2014) キウイフルーツの消化促進効果に関する研究動向 —アクチニジンの役割—。 *栄養学雑誌* 72 : 292-301
- 3) Park S et al. (2021) The impact of Hayward green kiwifruit on dietary protein digestion and protein metabolism. *Eur J Nutr* 60: 1141-1148
- 4) Pastorello EA et al. (1998) Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol* 101: 531-537
- 5) McDowall MA (1970) Anionic proteinase from *Actinidia chinensis* / Preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem* 14: 214-221
- 6) Sugiyama S et al. (1996) Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins, Toyopeael-superQ and Bakerbond WP-PEL. *Biosci Biotech Biochem* 60: 1994-2000
- 7) Sugiyama S et al. (1997) Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. *J Nutr Sci Vitaminol* 43: 581-589
- 8) Brocklehurst K et al. (1981) Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. *Biochem J* 197: 739-746
- 9) Lowry OH et al. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- 10) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- 11) Filippova IY et al. (1984) L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-*p*-nitroanilide — A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. *Anal Biochem* 143: 293-297
- 12) Patel M et al. (1992) Variation in the P2-S2 stereochemical selectivity towards the enantiomeric N-acetylphenylalanylglycine 4-nitroanilides among the cysteine proteinases papain, ficin and actinidin. *Biochem J* 281: 553-559
- 13) 西山一朗・福田哲生・大田忠親 (2004) サルナシおよびシマサルナシ果汁におけるアクチニジン濃度とプロテアーゼ活性の品種間差異. *園学雑* 73 : 157-162