

サルナシ果実に含まれるアクチニジン様酵素の精製

西山 一朗^{1*}、福田哲生^{2a}、末澤克彦^{2b}

Purification of Actinidin-like Enzyme in *Actinidia arguta* Fruits

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

Abstract

Actinidia arguta fruit, known as 'hardy kiwifruit' or 'baby kiwifruit', contains a large amount of protease similar to actinidin which is found in the fruit of kiwifruit. In the present study, the actinidin-like enzyme was purified from 'Mitsuko' fruit, and the physico-chemical and enzymatic properties of the protease were compared to those of actinidin. Chromatographic and electrophoretic analyses have revealed that the major isozymes in the actinidin-like enzyme are different molecules from the actinidin isozymes A1 or A2. Moreover, the actinidin-like enzyme showed clear differences in substrate selectivity from actinidin. These results suggest the possibility that the actinidin-like enzyme in *A. arguta* fruit, which has conventionally been called actinidin, is a different kind of enzyme from actinidin in the fruit of kiwifruit.

キーワード：サルナシ，アクチニジン様酵素，プロテアーゼ，アイソザイム

Key words : *Actinidia arguta* (Hardy kiwifruit), Actinidin-like enzyme, Protease, Isozyme

1. 諸言

サルナシは、マタタビ科マタタビ属の落葉性のつる性植物であり、秋季に5～15 gの小型の果実をつける¹⁾(図1)。サルナシには多種の品種・系統が存在するが、その多くは食味良好で、独特の芳香を有する。地域によってはコクワとも呼ばれるサルナシ果実は、そのまま生食に供されるほか、ジャム、ジュース、ワインや菓子類などにも加工され利用される¹⁾。

サルナシ果実には、グルコース、フルクトース、スクロースなどの糖質が含まれ、また、糖アルコールである *myo*-イノシトールも極めて豊富に含まれている^{2,3)}。有機酸としては、クエン酸とキナ酸が主であり、次いでリンゴ酸が多く、その組成は近縁のキウイフルーツ果実と類似している^{2,3)}。サルナシ果実のアスコルビン酸(ビタミンC)濃度は、品種・系統により異なるが、可食部100 g当り100～200 mgの

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 (Corresponding author) : inishiya@komajo.ac.jp

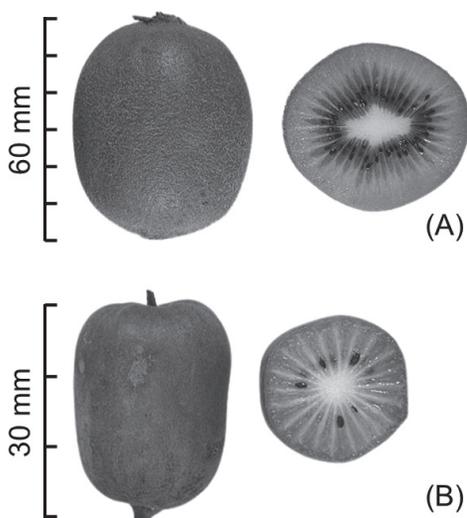


図1 キウイフルーツおよびサルナシ果実の形状
‘ヘイワード’果実 (A) ならびに‘光香’果実 (B)
の外観と横断面を示す。

ものが多く^{3, 4)}、極めて優れたビタミンCの供給源である。ルテインや β -カロテンなどのカロテノイドも豊富に含んでいる^{3, 5)}。

サルナシ果実の特徴としては、システインプロテアーゼを豊富に含んでいることも挙げられる^{3, 6-8)}。このプロテアーゼについては、同じマタタビ属のキウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンとの類似性から、詳細な検討を欠いたままアクチニジンと呼ばれてきた。しかし著者らは、サルナシ果実のアクチニジン様酵素が、キウイフルーツ果実のアクチニジンとは明瞭に異なる基質選択性を示すことを先に報告した^{3, 6-8)}。本研究では、サルナシ果実に含まれるアクチニジン様酵素とキウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンとが、同一の酵素であるか否かを確認することを目的として、両酵素の精製を試みた。その結果、サルナシ果実のアクチニジン様酵素とキウイフルーツ果実のアクチニジンには、それぞれ複数のアイソザイムが存在するものの、両者に共通するアイソザイムは検出されなかった。このことから、

両者は異なる酵素である可能性が示唆された。

2. 実験方法

(1) 材料

実験に用いたサルナシおよびサルナシとキウイフルーツの交雑種の品種/系統とその果実特性を表1に示す。Ananasnaya 果実は、東京都内の青果店で‘ベビーキウイ’という商品名で販売している、米国オレゴン産の果実を購入して使用した。その他の品種・系統の果実はいずれも、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用いた。いずれも可食期の果実を実験に供した。

(2) アクチニジンおよびアクチニジン様酵素の精製

アクチニジンおよびアクチニジン様酵素は、それぞれ‘ヘイワード’果実および‘光香’果実の果肉を材料として、Brocklehurst et al.⁹⁾の方法により精製した。すなわち、硫酸沈殿法により粗酵素画分を得た後、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酵素を得た。精製酵素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.¹⁰⁾の方法により定量した。

(3) 電気泳動法による分析

タンパク質成分の還元条件下における電気泳動は、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)法により行った。ポリアクリルアミドゲル (12.5%) をセットしたミニスラブ電気泳動装置 (アトー) を用い、Laemmli¹¹⁾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アントブルー R-250による染色ならびに脱色を施した。

表1 実験に用いた品種・系統

品種・系統名	果肉色	毛茸密度	果重 (g)	果汁中アクチニン /アクチニン様 酵素濃度 (mg/mL)
<i>Actinidia deliciosa</i>				
ヘイワード	緑	密	95.7 ^a	2.9 ^a
<i>A. arguta</i>				
光香	緑	無	13.1 ^a	9.3 ^a
平野	緑	無	7.5 ^a	10.7 ^a
月山	緑	無	13.2 ^a	10.6 ^a
一才	緑	無	7.9 ^a	1.6 ^a
高知	緑	無	9.8 ^c	8.8 ^c
島根	緑	無	8.3 ^c	3.7 ^c
長野	緑	無	9.3 ^c	7.8 ^c
Ananasnaya	緑	無	7.4 ^b	5.5 ^b
<i>A. rufa</i> × <i>A. chinensis</i> *				
香粹	緑	無	39.5 ^a	N.D. ^a
<i>A. arguta</i> × <i>A. deliciosa</i>				
信山	緑	無	20.0 ^a	5.1 ^a

N.D.: 検出されず

^a 文献 (7) より引用

^b 文献 (8) より引用

^c 西山等、未発表データ

* 品種登録データベース上は *A. arguta* × *A. deliciosa* とされているが、その後の DNA 解析の結果から、*A. rufa* × *A. chinensis* であることが判明している。

非還元条件での Native PAGE は、Sugiyama et al.¹²⁾ 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) による酵素の精製

上記 (2) で精製した酵素を、陰イオン交換カラム TSK-GEL SUPERQ- 5PW (7.5 mm × 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 まで直線的に高めることにより、酵素の溶出を行った。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。精製した各アイソザイム溶液のタンパク質濃度は、上記 (2) に記載の方法により定量した。

(5) 酵素活性の測定

酵素精製時のプロテアーゼ活性の測定は、Filippova et al.¹³⁾ 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-pNA (Pyr-FL、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℃の恒温槽内に5分間保った。これに0.05 mL の5 mmol/L Pyr-FL (ジメチルスルホキシド溶液) を加え混和し、25℃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 × 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-FLに加えて Bz-Phe-Val-Arg-*p*NA (Bz-FVR、Sigma-Aldrich)、Bz-Pro-Phe-Arg-*p*NA (Bz-PFR、Sigma-Aldrich)、Z-Phe-Arg-*p*NA (Z-FR、Bachem AG)、Ac-Phe-Gly-*p*NA (Ac-FG、Bachem AG) および Z-Asp-Glu-Val-Asp-*p*NA (Z-DEVD、Bachem AG) の各人工基質 (ジメチルスルホキシド溶液) を用いて、上記と同様に酵素活性を測定した。実験は3反復し、結果はその平均値で表した。

(6) アイソザイム構成比率の品種/系統間差異

各品種/系統の果実の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。この果汁を試料として、上記 (3) に記載の方法により非還元条件下での Native PAGE 分析を行っ

た。

3. 実験結果と考察

(1) 電気泳動法による精製酵素の分析

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 (A) ならびにアクチニジン様酵素 (M) を、還元条件下で SDS-PAGE に供した結果を図2左図に示す。いずれの酵素も、分子量24,000付近に単一バンドとして検出された。次にこれらの精製酵素を非還元条件下で Native PAGE に供したところ、それぞれが近接した2本のバンドに分離されることが示された (図2右図)。この結果から、それぞれの精製酵素は、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。キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンには複数のアイソザイムが存在することが知られている^{12, 14, 15)} が、先行研究¹⁶⁾ より上方のバンドが A1、下方のバ

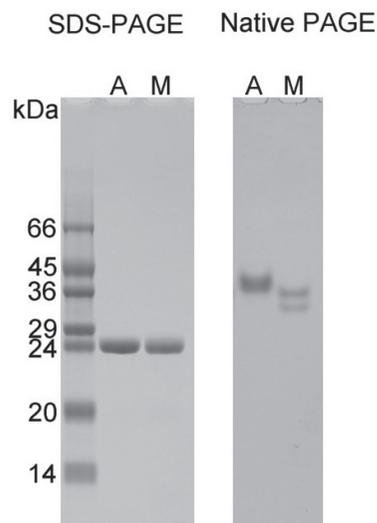


図2 精製アクチニジンおよびアクチニジン様酵素の電気泳動分析

‘ハイワード’果実から精製したアクチニジン (A) および‘光香’果実から精製したアクチニジン様酵素 (M) を SDS-PAGE あるいは native PAGE に供した。

ンドが A2に相当することがわかる。一方、サルナシのアクチニジン様酵素については、アイソザイムに関する報告がほとんど存在しない。次にそれぞれの精製酵素を、陰イオン交換カラムを用いた HPLC 分析に供した。

(2) アイソザイムの精製

図 3 は、‘ヘイワード’果肉から精製したアクチニジン (A) および‘光香’果肉から精製したアクチニジン様酵素 (B) を、陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供したときの、それぞれの溶出プロファイルを示す。既報¹⁶⁾ のとおり精製アクチニジンでは、保持時間14.0分ならびに14.9分付近に、主要なアイソザイム A1および A2のピークが、それぞれ認められた(図 3A)。

一方、‘光香’のアクチニジン様酵素では、プロテアーゼ活性をもつ4つの主要なピークが検出された。保持時間の短い方から、M1 (10.4

分)、M2 (14.1分)、M3 (15.0分) および M4 (15.9分) と名付けた。この結果から、‘光香’果実に含まれるアクチニジン様酵素は、少なくとも4種類のアイソザイムから構成されるものと考えられた。これらのアイソザイムの保持時間は、アクチニジンアイソザイムである A1や A2の保持時間のいずれとも一致しなかった。このことは、サルナシ果実のアクチニジン様酵素と、キウイフルーツ果実のアクチニジンとは、主要なアイソザイムに共通性がないことを示唆した。なお、M1画分では M2～M4画分と比較して、 A_{280} が低いにもかかわらず酵素活性が高いことから、Pyr-FL を基質として用いた時の比活性が高いことが示唆された。

次にそれぞれのアイソザイムの精製を、同様の実験系による2回の再クロマトグラフィーによって試みた。単離した各アイソザイムの溶出プロファイルを図 4 に示す。いずれも単一ピークとして検出された。A1と M2および A2と

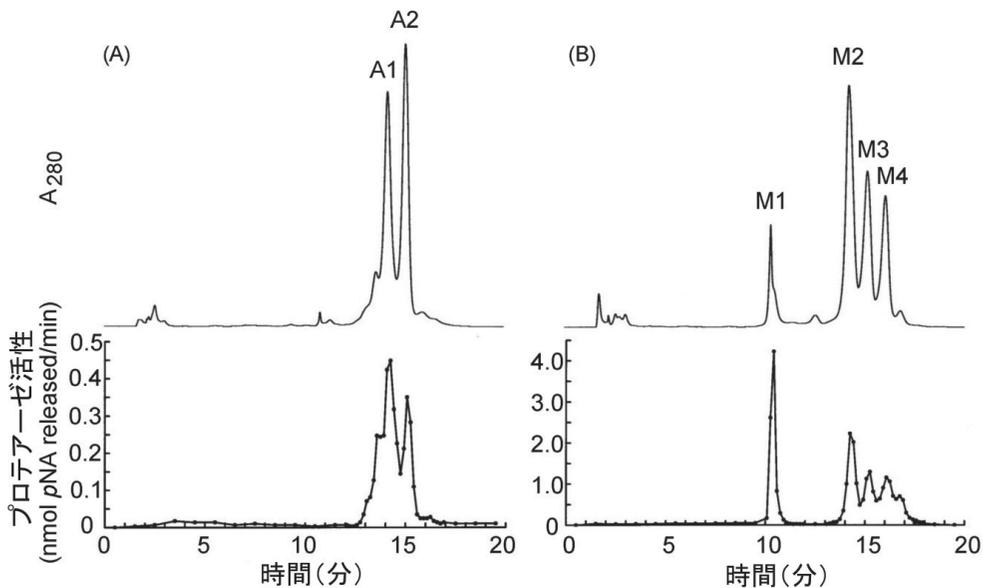


図3 精製アクチニジンおよびアクチニジン様酵素の HPLC 分析における溶出プロファイル

精製したアクチニジン (A) およびアクチニジン様酵素 (B) を、陰イオン交換カラムを用いた HPLC 分析に供した。上段は280 nm における吸光度、下段はプロテアーゼ活性をモニターした結果を示す。

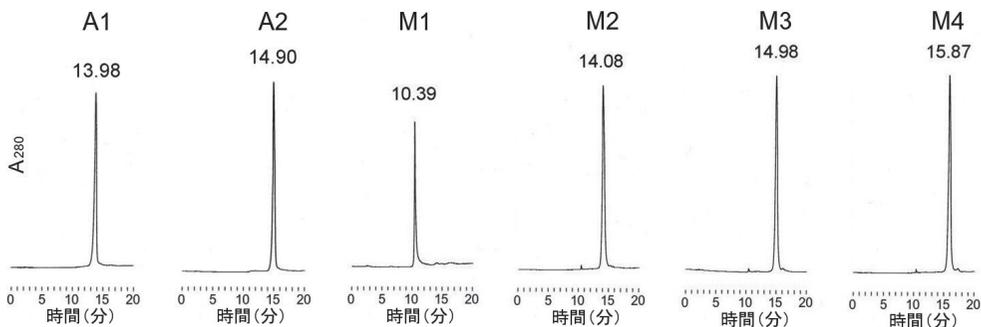


図4 アクチニジンおよびアクチニジン様酵素のアイソザイムの HPLC 分析

再クロマトグラフィーによって精製したアクチニジンアイソザイム (A1および A2) ならびに部分精製したアクチニジン様酵素アイソザイム (M1～M4) を、陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供した。280 nm における吸光度をモニターした。

M3は、その保持時間がそれぞれ近接するものの、わずかに異なっていた。念のために A1と M2 あるいは A2と M3を混合して同様の HPLC 分析に供したところ、いずれもシングルピークとはならず、分離が不十分な2つのピークと認められた (データは示していない) ため、異なる分子種であることが確認された。

単離した各アイソザイムについて、次に電気泳動法での解析を行った。M1については解析に必要な量を確保することが困難であったため、M2、M3および M4を非還元条件下での Native PAGE に供した。その結果、M2と M4は単一のバンドとして認められたが、M3については2本のバンドが認められ、精製が不十分であることが確認された (図5)。この M3画分に含まれる2種のタンパク質は、その泳動距離から M2と M4のように見えるが、上記の HPLC 分析の結果より、これらとは明らかに異なるものだと判定される。この結果より、'光香'果実に含まれるプロテアーゼは、少なくとも5種類の分子種 (M1、M2、M4および M3画分中の2種) から構成されていることが示された。

(3) 各プロテアーゼの基質特異性

数種の人工基質を用いて、それぞれのプロテ

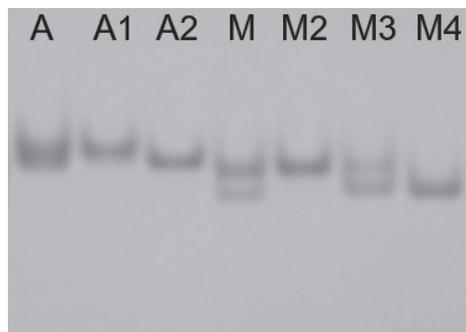


図5 HPLC により精製した A1、A2および M1～M4の Native PAGE 像

陰イオン交換カラムを用いた再クロマトグラフィーにより精製した A1、A2および M2～M4を、非還元条件下で Native PAGE に供した。レーン A およびレーン M 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およびアクチニジン様酵素を示す。

アーゼの酵素活性を測定した結果を、図6に示す。アクチニジンアイソザイム A1、A2では、Bz-FVR で最も高い比活性が見られ、次いで Z-FR で高い比活性を示した (図6)。一方、サルナシのアクチニジン様酵素アイソザイム M2と M4では、Z-FR で最も高い比活性が見られ、次いで Bz-FVR で高い比活性を示した。精製が不十分な M3画分においても、M2や M4と同様の基質特異性が認められた (図6)。M1画分においても、Z-FR で最も高い比活性が見られ

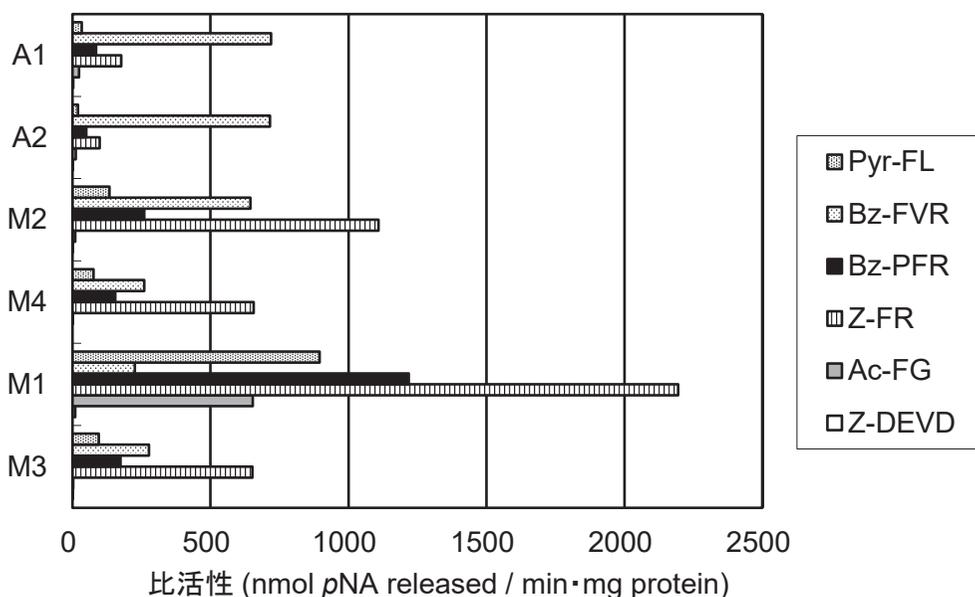


図6 アクチニジンおよびアクチニジン様酵素の基質選択性
精製したA1、A2、M2、M4および、部分精製したM1画分、M3画分のプロテアーゼ活性を、7種類の人工基質を用いて測定した。

たが、これに次いでBz-PFR、Pyr-FL、Ac-FGの順に高い比活性を示した(図6)。このことから、M1画分はM2やM4、M3画分とは大きく異なる基質選択性を示すことがわかった。また、M1画分に含まれるプロテアーゼは、果実中の含量は少ないものの、その比活性はアイソザイムM2やM4と較べて顕著に高いことも示された。

Patel et al.¹⁷⁾の報告によれば、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が酵素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されている。本研究の結果でも、アクチニジンやアクチニジン様酵素は、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が存在する人工基質で、高い比活性を示すことがわかった。また、キウイフルーツ果実のアクチニジンは、P2サイトにバリンをもつ基質に対して高い選択性を示し、サルナシ果実のアクチニ

ジン様酵素は、P2サイトにフェニルアラニンをもつ基質に対して高い選択性を示すことが示唆された。以上のように、キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンと、サルナシ果実に含まれるアクチニジン様酵素とでは、人工基質に対する選択性に明瞭な差異があることが示されたが、食品タンパク質に対する基質特異性の違いについては、今後の検討課題である。

(4) 各品種/系統サルナシ果汁のNative-PAGE分析

種々の品種/系統のサルナシおよびサルナシとキウイフルーツの交雑種の果実から調製した果汁中のタンパク質について、Native-PAGE分析を行った(図7)。「一才」(レーン4)果実は、アクチニジン様酵素の含量が少ないことが知られている(表1)が、今回の実験でもアクチニジン様酵素のバンドは非常に薄く、検出が困難であった。また、「香粹」(レーン9)果

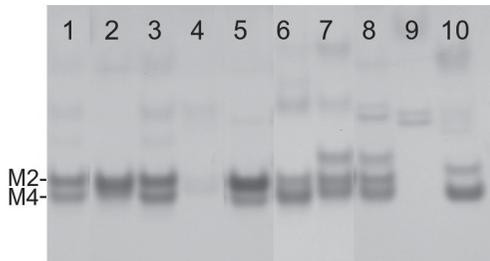


図7 各品種・系統果汁タンパク質の native PAGE 分析

各品種/系統のサルナシおよびサルナシとキウイフルーツの交雑種の果汁について、非還元条件下での Native PAGE 分析を行った。アクチニジン様酵素アイソザイム M2および M4の泳動位置を左端に示す。1：光香、2：平野、3：月山、4：一才、5：高知、6：島根、7：長野、8：Ananasnaya、9：香粹、10：信山

実は、プロテアーゼをほとんど含んでいないことが報告されている（表1）が、Native-PAGE 分析でもアクチニジン様酵素のバンドは検出されなかった。

その他のサルナシのうち、‘平野’（レーン2）、‘月山’（レーン3）、‘高知’（レーン5）および‘島根’（レーン6）の果汁では、今回アクチニジン様酵素の精製の材料とした‘光香’果汁（レーン1）と類似したプロファイルが認められた。すなわち、M2と M4に相当する位置に、2本のバンドが認められた。ただし、それぞれのバンドに相当するプロテアーゼの相対的な量比には、品種・系統間差異があることが示唆された。今回の実験では定量的な解析は行っていないが、そのプロファイルから、‘平野’（レーン2）や‘高知’（レーン5）では M2に相当するバンドが濃く、M4に相当するバンドが薄いのに対し、‘島根’（レーン6）ではその逆の傾向が認められた。

一方、‘長野’（レーン7）や‘Ananasnaya’（レーン8）では、M2に相当する位置にはバンドが認められたが、M4に相当する位置にはバンド

が認められなかった。そのほか、M2よりも上部と、M2と M4の間にもバンドが見られた。この結果は、サルナシ果実に含まれるアクチニジン様酵素には、‘光香’果実に含まれている分子種以外のものも複数存在する可能性を示唆した。サルナシとキウイフルーツの交雑品種である‘信山’果汁では、1本のバンドは M4の位置に見られ、他方のバンドは M2の位置よりも上部に見られた。この上方のバンドは、キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンアイソザイムの泳動位置と一致しているが、同一の分子種であるかどうかについては、今後の検討を要する。

本実験では、キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンと、サルナシの一品種である‘光香’果実に含まれるアクチニジン様酵素では、少なくとも主要なアイソザイムに共通する分子種がないことが示された。また、人工基質を用いた実験により、アクチニジン様酵素とアクチニジンでは、基質選択性に明瞭な差異があることも示された。これらの結果は、従来アクチニジンと呼ばれてきたサルナシ果実のプロテアーゼが、アクチニジンとは別種の酵素である可能性を示唆するものである。この点については、今後の慎重な検討が必要である。

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) 佐藤一男 (2000) サルナシ：果樹園芸大百科16 落葉特産果樹、(農文協編)、p. 171-194. 農山漁村文化協会、東京。
- 2) Nishiyama I et al. (2008) Sugar and organic acid composition in the fruit juice of different *Actinidia* varieties. *Food Sci*

- Technol Res* 14 : 67-73
- 3) Nishiyama I (2007) Fruits of the *Actinidia* genus. *Adv Food Nutr Res* 52 : 293-324
 - 4) Nishiyama I et al. (2004) Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. *J Agric Food Chem* 52 : 5472-5475
 - 5) Nishiyama I et al. (2005) Genotypic differences in chlorophyll, lutein, and β -carotene contents in the fruits of *Actinidia* species. *J Agric Food Chem* 53 : 6403-6407
 - 6) 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. 食科工誌 49 : 401-408
 - 7) 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
 - 8) 山中美穂・他 (2004) マタタビ属果実における果汁中アクチニジン濃度およびプロテアーゼ活性の品種間差異. 食科工誌 51 : 491-494
 - 9) 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
 - 10) Lowry OH et al. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275
 - 11) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685
 - 12) Sugiyama S et al. (1996) Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins, Toyopeael-superQ and Bakerbond WP-PEI. *Biosci Biotech Biochem* 60 : 1994-2000
 - 13) 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
 - 14) McDowall MA (1970) Anionic proteinase from *Actinidia chinensis* / Preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem* 14 : 214-221
 - 15) Sugiyama S et al. (1997) Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. *J Nutr Sci Vitaminol* 43 : 581-589
 - 16) 西山一朗・福田哲生・末澤克彦 (2022) 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. 駒沢女子大学研究紀要 [人間健康学部・看護学部編] 4 : 11-18
 - 17) 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

