

技術資料

新規特産品種の育成に向けたターゲット遺伝子の調査研究
— サルナシ果実の成熟過程におけるアクチニジンの変動 —¹

上辻 久敏・杉山 康雄²

The study of target genes for breeding new speciality varieties
Fluctuation in actinidin during ripening of *Actinidia arguta*¹

Hisatoshi Kamitsuji, Yasuo Sugiyama²

サルナシやキウイフルーツの果実に含まれるアクチニジンは、システインプロテアーゼの1種であり、食肉軟化作用を持つことから、食品加工への応用が期待されている。しかし、サルナシを生食する場合、アクチニジンは口腔刺激性の原因とされ、食味に影響する。そこで、アクチニジン含有量の少ないサルナシを育種することができれば生食での商品価値が向上する可能性があると考えた。県内に自生するサルナシからアクチニジン含有量の少ない株の探索や収穫時期でアクチニジン含有量が少ないタイミングを探索するために、抗体を用いて高感度でアクチニジンを検出する評価系を作成した。苗畑に植栽しているサルナシの果実を経時的に測定した結果、糖度が上昇する収穫時期にアクチニジン含有量も上昇することが分かった。収穫時期でアクチニジン含有量を下げするには、糖度の低い時期に収穫する必要がある。

キーワード : アクチニジン, サルナシ, 成熟過程, 果実

I はじめに

サルナシ *Actinidia arguta* は、日本に分布するマタタビ科マタタビ属の植物である。現在、国内では、近縁のキウイフルーツが流通しており、入手できるキウイフルーツの品種は十品種以上存在する (小川 1997; 垣内 1991; 末沢 2000)。これらは中国から導入された *A. chinensis*, ニュージーランドで品種改良された *A. deliciosa* に大別される。このうち、栽培品種として主に流通している品種は、ヘイワード種 (*A. deliciosa* cv. Hayward) である。以下、本文で「キウイフルーツ」と表示する場合「ヘイワード」のことを表すこととする。

果実の特徴としては、①独特の淡緑色～濃緑色を示す果肉色、②極めて高いビタミンC含量、③果実表面に密生する茶褐色の毛茸がキウイフルーツにはあり、サルナシには少ない。④タンパク質分解酵素のシステインプロテアーゼの一種であるアクチニジン (EC3.4.22.14) を含むことなどが挙げられる (西山ら 2004)。

このうち、アクチニジンに関しては、サルナシやキウイフルーツの機能性や調理・加工特性に、大きな影響をもつことが知られている。たとえば、キウイフルーツの

果汁 (鮫島ら 1991; 堤ら 1994; 西山 2000) やキウイフルーツアクチニジン (西山 2000; 2001) は、食肉タンパク質を加水分解するため、食肉軟化作用を有することが報告されている。また、タンパク質の消化促進効果があり食品加工への応用も期待されている。一方、アクチニジンがもたらす問題点としては、ゼラチンゼリー形成の阻害 (Arcus 1959) や、キウイフルーツの主要アレルゲンとして食物アレルギーを引き起こす可能性 (Pastrello et. al 1998), 生食時の口腔刺激性 (Boyes et. al 1997) などが報告されている。また、ヨーグルトなどと混ぜ合わせた場合、乳タンパク質の加水分解に起因すると考えられる苦味が発生することも知られている。

以上のようにサルナシやキウイフルーツに含まれるアクチニジンの量や活性の相違は、食品学的に重要な要素であるにもかかわらず、ヘイワード種以外の品種におけるアクチニジン含量や活性についての報告は、極めて限られているのが現状である (Boyes et. al 1997; 和辻ら 1992)。

西山 (2004) はサルナシと 12 品種のキウイフルーツのアクチニジン含量ならびにプロテアーゼ活性を測定し

¹ 本研究の一部は、日本農芸化学会 2007 年度大会で発表した。

² 前所属 名古屋大学理学部遺伝子実験施設

比較した。その結果サルナシのアクチニジンに関して、キウイフルーツよりもタンパク質を分解する働きが高いことが示された（西山ら 2004）。この報告から生食を行う際にアクチニジンの存在が、キウイフルーツよりもサルナシで、より食味に影響しうる因子であると考えられる。

そこで、本研究では、サルナシ (*A. arguta*) 果実中に存在するアクチニジンタンパク質の抗体を用いた分析系の確立とサルナシ果実中のアクチニジンの含有量の変動に関する調査を行ったので報告する。

II 方法

1. 供試材料

実験に用いたキウイフルーツ果実は市販のものを購入した。キウイフルーツ果実（ヘイワード）のアクチニジン活性は、追熟に伴い上昇することが報告されている（増田ら 1987）ため、追熟後の適熟果実を供試した。サルナシは、岐阜県森林研究所構内の苗畑にて栽培している個体から採取した。サルナシは着果したまま熟すことから、果実の収穫後、追熟せずに供試した。

2. 粗酵素の抽出

サルナシとキウイフルーツ果実からアクチニジンを含む果汁の抽出は、果実を剥皮した後、ブレンダーにて果肉を粉碎し（5000r.p.m. × 10min）、4重のガーゼを用いてろ過した。このろ液を遠心分離（12000g × 10min）して、得られた上清を粗酵素液として以後の活性測定、アクチニジンの精製および分析に用いた。

3. アクチニジンの精製

アクチニジンの精製は、キウイフルーツとサルナシ果肉を材料として、Brocklehurst et al. (1981)の方法を参考に行った。酵素の精製は全て4℃で行った。ガーゼにて搾汁ろ過した果汁を遠心分離（9000 r.p.m. × 30min）した後、70%飽和の硫酸沈殿法により得た粗酵素画分を透析膜にて脱塩した。脱塩後、ダイアフローメンブレン（アミコン社製）で限外濃縮粗酵素液を得た。精製中のタンパク質濃度は、牛血清アルブミン（Sigma）を標準としてBradford法により定量した。

3-1. プロテアーゼ活性の測定

プロテアーゼ活性は、Filippova et al. (1984)の方法を改変して測定した。合成基質である L Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine pnitroanilide (PFLNA, Sigma) を用い、ロイシン残基のカルボキシル側の加水分解による p-ニトロアニリンの遊離を波長 405nm の吸光度で測定した。試験管に 25mM L-システインおよび 10mM エチレンジアミン四酢

酸を含む 50mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) を 0.8ml とサルナシまたはキウイフルーツ果汁 0.1 ml を取り、30℃の恒温槽内に 5 分間保った。これに 0.1 ml の 5mM PFLNA (ジメチルスルホキシド溶液) を加え混和し、30℃に 5 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 (10000g × 1 min) により除タンパクした後、光学用マイクロプレート (0.33ml) 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 $\epsilon = 405 = 9920 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ として、1 分間に遊離される p-ニトロアニリンの量によって表した。以下、アクチニジンの精製と果実中のプロテアーゼ活性はすべて本方法により測定した。

3-2. DEAE-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィー

10mM クエン酸緩衝液 (pH 5.5) で透析した粗酵素液を DEAE-Sepharose CL-6B カラム (2.5cm × 10cm) を用いて分画した。このカラムを 10mM クエン酸緩衝液 (pH 5.5) で緩衝化した後、濃縮した酵素を添加した。吸着したタンパク質を 1 M 硫酸アンモニウムを含む同緩衝液を用いて、溶出速度を、1.2ml/min とし、ステップワイズ法で 20ml ずつに分画した。それぞれの溶出液について 280nm の吸光度を測定してタンパク質の溶出を確認し、プロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ活性を示す画分を回収し、ダイアフローメンブレンとビバスピリン（アミコン社製）によって 20ml まで濃縮した。

3-3. HiLoad-Superdex 75pg カラム高速液体クロマトグラフィー

HiLoad-Superdex 75pg カラム (1.6cm × 60cm)、限外排除分子量 70kDa を用いて分画した。このカラムを 0.1 M 硫酸アンモニウムを含む 10mM クエン酸緩衝液 (pH 5.5) により緩衝化した後、50ml に濃縮した酵素を添加した。溶出の速度は、1 ml/min とし、タンパク質の検出は 280nm の吸光度の測定により行った。各分画についてプロテアーゼ活性を測定し、プロテアーゼ活性を示す画分を回収し、ビバスピリンにより濃色脱塩した。

3-4. Mono-Q HR (5/5) カラム高速液体クロマトグラフィー

DEAE-Sepharose CL-6B カラムによって得られた酵素液を Mono-Q HR (5/5) カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる精製に供した。同カラムは 10mM クエン酸緩衝液 (pH5.5) で緩衝化し、70 分間で硫酸アンモニウムによるグラジエント溶出を行った。溶出速度は、1 ml/min とし、タンパク質の検出は 280nm における吸光度の測定により行った。

4. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

酵素の分子量測定は、第一化学薬品製のタンパク質分子量マーカーを用いて行った。酵素は、SDS 保存液 [12.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) + 5mM エチレンジアミン四塩酸 (EDTA) + 0.025M Tris-AcOH Buffer] と 1 M ジチオスチレイトールを 4:1 の割合で混合して得られた SDS 緩衝液で、100°C、3 分間加熱処理を行い、泳動に供した。また、分子量マーカータンパクも SDS 緩衝液に溶解し、同様に処理して用いた。泳動後、ゲルを固定液 [エタノール：酢酸：蒸留水 = 5 : 4 : 1] で 10 分間固定し、次にコマジープリリアントブルー (CBB) R-250 を用いて 60°C で 10 分間染色を行った。染色液は脱色液 [エタノール：酢酸：蒸留水 = 25:8:67] で脱色しタンパク質のバンドを検出した。

5. キウイフルーツアクチニン抗血清による検出

上記の精製アクチニンを抗原としてウサギに免疫することにより、抗アクチニン抗血清を作製した。抗血清の作製は、Biorad 社に委託した。上記のとおり SDS-PAGE 法により分離したタンパク質をセミドライプロット装置 (アトー) により、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (ImmobilonP, Watman) に 2mA/cm², 1 時間の条件で転写した。この PVDF 膜を 0.05% Tween 20 を含むトリス緩衝塩溶液 (pH7.5, TBS-T) で 2 回洗浄した後、5% スキムミルク (Gibco) を含む TBS-T により、2 時間のブロッキングを施した。次に TBS-T で希釈したウサギ抗アクチニン抗血清 (1:4000) により 1 時間インキュベートした後、TBS-T により 4 回洗浄し、非結合抗体を除去した。アクチニン免疫反応性の検出は得られた抗血清の抗原検出感度をウエスタンブロットで調べた。抗原である精製アクチニンとサルナシアクチニンの量を 1 ng から 100ng まで変えてウエスタンブロット検出を行った。1 次抗体として、抗キウイフルーツ抗血清と抗サルナシ抗血清を比較した。アクチニン—1 次抗体複合体はアルカリホスファターゼを連結した 2 次抗体で発色検出した。

6. 栽培サルナシ株の果実におけるサルナシプロテアーゼ活性と糖度の経時変化

苗畑からサルナシ果実を経時的に採取して、果肉をガーゼにて搾汁ろ過した粗酵素液を遠心分離 (9000rpm, × 30min) した後、プロテアーゼ活性と糖度を経時的に測定した。プロテアーゼ活性は、収穫したサルナシ果実を粉砕し、4 重のガーゼでろ過し、人工基質 (Pyr-Phe-Leu-pNA) を用いて、30°C で 5 分間反応 (pH 6.0) させ測定した。糖度は、糖度計で Brix% を測定した。2007 年 8 月 9 日から 10 月 28 日まで (収穫日 8/9, 8/16, 8/23, 8/30, 9/7, 9/18, 9/28, 10/8, 10/18, 10/28) 10 回苗畑サルナシ果実を収穫した。その後、果実が一斉に落下したため果実の収穫は終了とした。

7. 栽培サルナシ株の果実に含まれるタンパク質の SDS-PAGE 分析とアクチニン抗体によるウエスタンブロット検出

方法 6 で活性と糖度を測定した同じ粗酵素液を用いて、SDS-PAGE によるタンパク質の分析とアクチニン抗血清でアクチニンバンドのウエスタンブロット検出を行った。分析に用いた粗酵素液を標準として牛血清アルブミン (Sigma) を用いた Bradford 法により定量し、SDS-PAGE には、0.5 μg、アクチニン抗血清を用いた分析には、0.1 μg のタンパク質量を供試した。

III 結果

1. アクチニンの精製

1-1. DEAE-SepharoseCL-6B カラムクロマトグラフィ

Brocklehurst の方法を参考にして得られた酵素液を限外濃縮後 DEAE-SepharoseCL-6B カラムクロマトグラフィに供した (図-1a)。キウイフルーツおよびサルナシから抽出された粗酵素液は、それぞれ 1M と 0.25M の硫酸アンモニウムでプロテアーゼ活性を有するタンパク質が溶出された。キウイフルーツでは 2 つのピークとして溶出されたが、サルナシでは単一ピークとして溶出された (図-2a)。その画分を回収し次のステップへと進んだ。

1-2. HiLoad-Superdex 75pg カラム高速液体クロマトグラフィ

キウイフルーツから抽出された粗酵素液は、タンパク質量が多く、ブロードな 2 つのピークに分かれ精製が困難であることが予想されたので、HiLoad-Superdex 75pg カラムを用いて、イオン交換では取り除くことができない分子量が異なる夾雑タンパク質の除去を行った。それより、活性を示す画分は検量線より分子量約 20kDa から 30kDa の溶出時間であった。目的とする画分の高分子側と低分子側で、余分なタンパク質を除去することができた。酵素活性のある単一ピークを形成した。酵素画分は濃色脱塩し、次の精製段階へ進んだ (図-1b)。

1-3. Mono-QHR (5/5 カラム高速液体クロマトグラフィ)

得られた酵素液を Mono-QHR (5/5) カラムを用いた HPLC による精製に供した。その結果を図-1c、図-2b に示した。キウイフルーツのプロテアーゼ溶出時間 25 分に酵素活性のある単一ピークが検出された。活性のあるピークを回収し最終精製とした (図-1c)。サルナシ由来のプロテアーゼでは 25 分に酵素活性のある単一ピークが検出され、プロテアーゼ溶出時間 23、25 分にプロテアーゼ活性のある 2 つのピークが認められた (図-2b)。

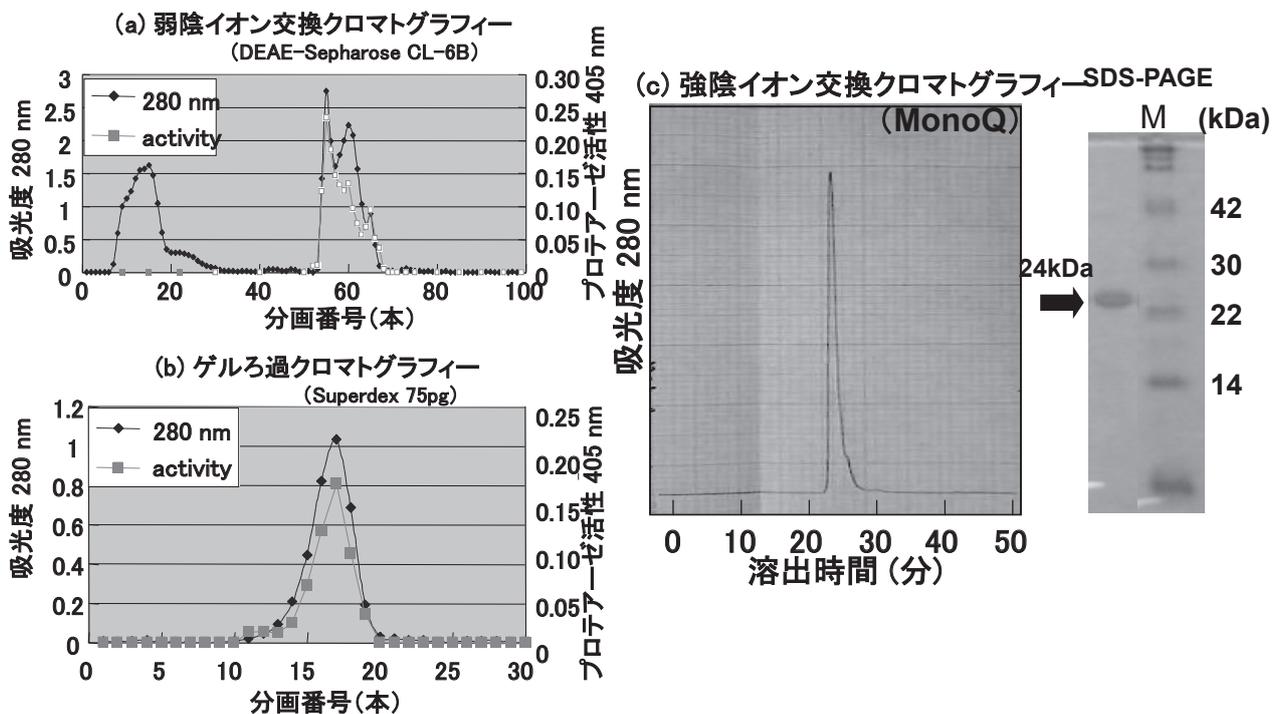


図-1 キウイフルーツアクチニジンの精製

2. SDS-PAGE 分析

精製したキウイフルーツ由来アクチニジンとサルナシ由来アクチニジンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。分子量マーカータンパク質として (分子量 42kDa), (分子量 30kDa), (分子量 22kDa), (分子量 14kDa) のタンパク質を用いた検量線より精製タンパク質の分子量は共に 24kDa であると算出された (図-3)。

3. キウイフルーツアクチニジン抗血清による検出

3-1. アクチニジン抗血清による精製アクチニジンタンパク質検出感度の確認

1, 5, 10, 50, 100ng のキウイとサルナシ由来精製アクチニジンを用いて, SDS-PAGE を行い, PVDF 膜に転写後, キウイフルーツアクチニジン抗体を用いた検出結果を図-3 に示した。キウイ由来のアクチニジン抗体によるサルナシアクチニジンの検出とサルナシ由来のアクチ

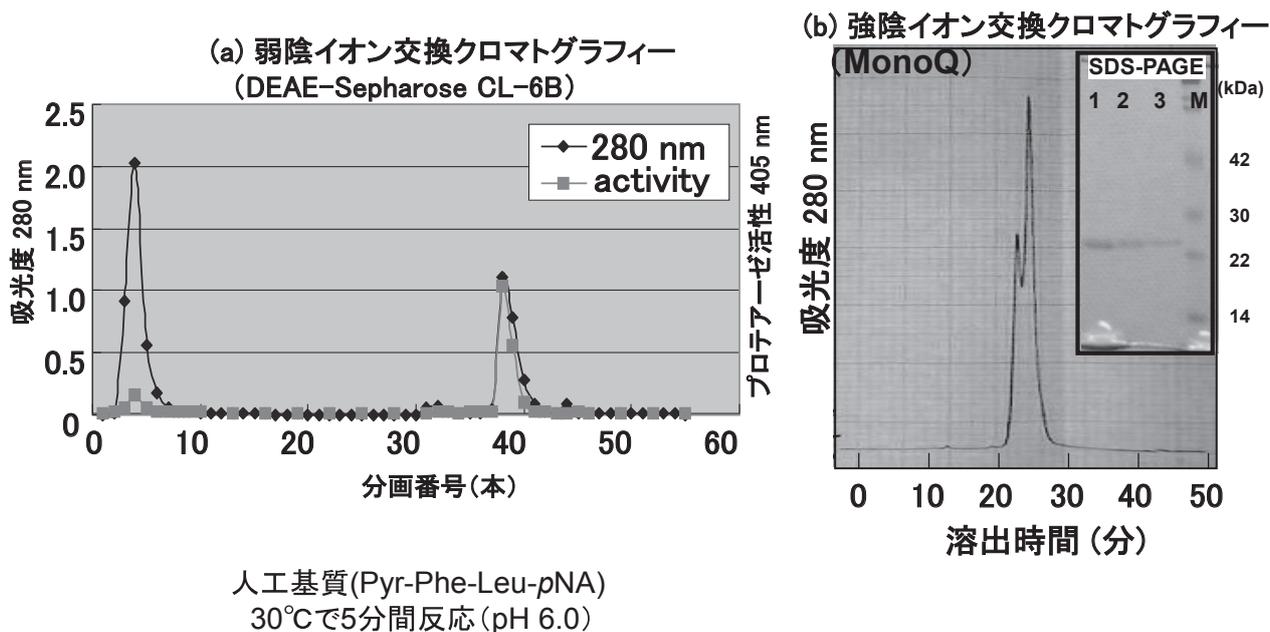


図-2 サルナシアクチニジンの精製

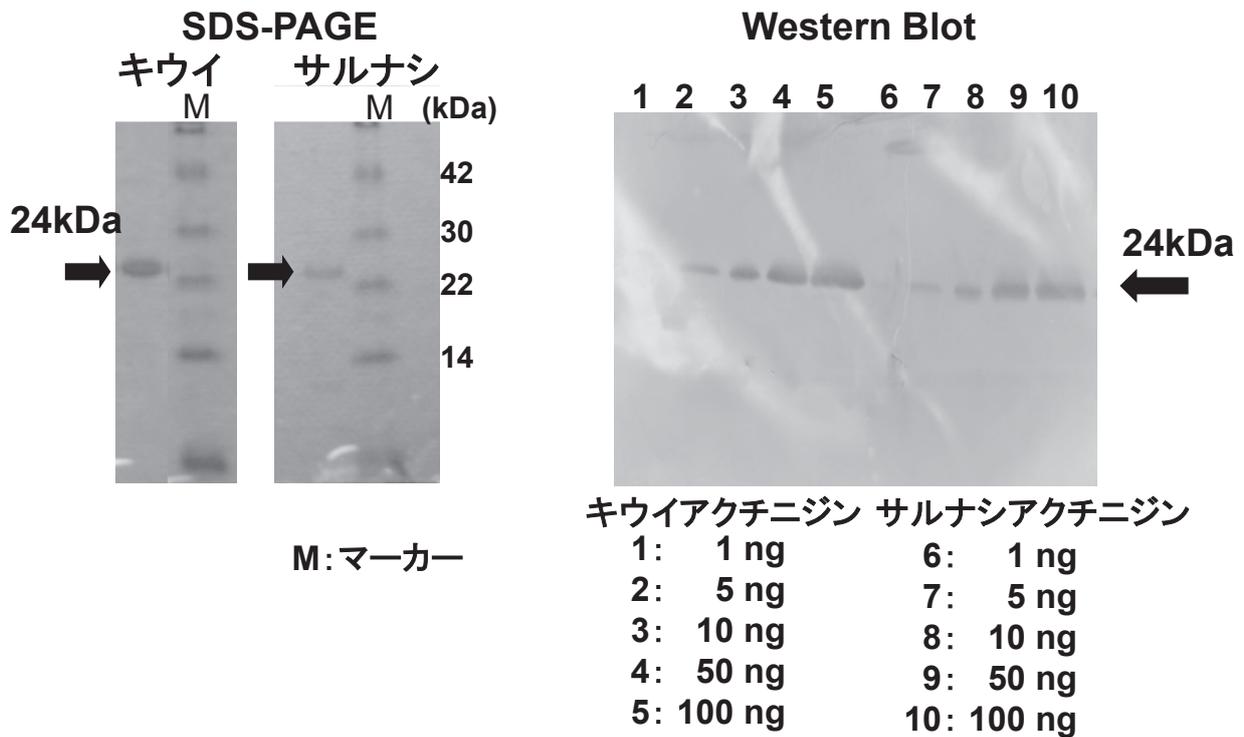


図-3 精製アクチニジンの SDS-PAGE 分析と抗アクチニン抗血清による検出

ニジン抗体によるキウイアクチニジンの検出が共に可能であった。精製タンパク質添加量の増加に伴い、相当する抗体による検出バンドの濃さが、上昇することが視覚的に観察された。アクチニンと1次抗体複合体は発色感度が高いアルカリホスファターゼを連結した2次抗体で発色検出した。矢印で示した位置のバンドがアクチニンである。いずれの抗血清も両抗原を同程度の量(10ng タンパク)まで検出できた。さらに抗原の量を少なくした所、1 ng

タンパク質でも検出可能であった。作成した抗体は同程度の感度で抗原を認識でき、抗キウイフルーツ抗血清と抗サルナシ抗血清はアクチニン類を高感度に分析できる抗体であると評価した。

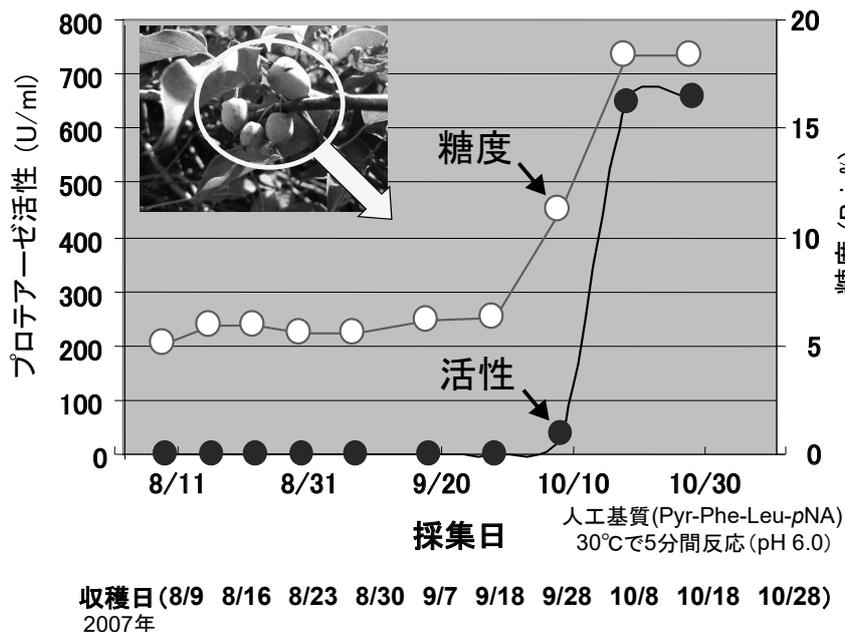


図-4 サルナシ果実のプロテアーゼ活性と糖度の経時変化

4. 栽培サルナシ株の果実におけるサルナシプロテアーゼ活性と糖度の経時変化

8/9 から 9/18 まで、サルナシ果実の糖度は 5.0 ~ 7.0 とほぼ一定であり、人工基質 (Pyr-Phe-Leu-pNA) を用いた測定方法でプロテアーゼ活性は検出されなかった。10/8 日の収穫物から、糖度の上昇が認められ、プロテアーゼ活性もわずかであるが検出された。この収穫から 10 日後の 10/18 には、プロテアーゼ活性は 650U/ml に急激に上昇し、さらに 10 日後の 10/28 にも 665U/ml となった (図-4)。

5. 栽培サルナシ株の果実に含まれるタンパク質の SDS-PAGE 分析とアクチニジン抗血清によるアクチニジン検出

サルナシ果実から抽出された粗酵素液の経時的な SDS-PAGE 分析とウエスタンブロット分析による電気泳動像を図-5 に示す。アクチニジンのバンドは、分子量 24kDa 付近に認められた (図-3)。果汁から、人工基質を用いた測定方法でプロテアーゼ活性が検出されなかった時期においても、Western Blot により精製アクチニジンが示した 24kDa と同じ分子量のシグナルが検出された。人工基質を用いた測定方法で活性は検出されなかった (図-4) が、Western Blot レーン 3 の 8/23 の収穫物からレーン 7 の 9/28 の収穫物には、果実中にアクチニジンタンパク質が存在していることが示された (図-5)。プロテアーゼ活性上昇時のレーン 8 から 10 までは薄いタンパク質のバンドが検出され、抗体を用いた Western Blot 分析では、強い発色バンドが検出された。抗体を用いることで、活性測定や SDS-PAGE によるタンパク質のバンドが検出されない時期から高感度でアクチニジンタンパク質の挙動を検出することが可能となった。

IV 考察

今回作成した抗体は植物由来のシステインプロテアーゼと交差するので、果実のみならず様々な植物組織におけるシステインプロテアーゼの所在と量を評価する上で有用な評価系が確立できたと考えられる。今後はキウイフルーツとサルナシのアクチニジンの物性比較 (酵素活性、熱安定性、活性保持剤の効果) を行い、単離した遺伝子の塩基配列情報と関連つけることが必要である。さらに遺伝子の発現調節機構の解析の情報も必要となる可能性がある。キウイフルーツとサルナシのアクチニジンを含む植物由来のシステインプロテアーゼの生理作用の解明が求められる。

サルナシアクチニジン含有量の経時的な測定から収穫時期によって変動していることが分かった。糖度が上昇する収穫適期にアクチニジン含有量が最大値を示した。アクチニジン量を低下させるためには、糖度の低い時期における果実を採取することが適切と考えられた。

県内の果実をつけているサルナシ野生株から果実を採集し糖度とプロテアーゼ活性、アクチニジンの抗体検出を行ったところ、自然界で発見したサルナシ果実でも糖度とアクチニジン含有量の上昇がパラレルな関係を示した (上辻未発表) ことから、自然界から低アクチニジンサルナシ株の取得は難しいと予想される。

さらに遺伝子配列情報と推定アミノ酸配列の情報も取得しており (上辻未発表)、人工的な改変技術による低アクチニジンサルナシ株を作成できる可能性があると考えられる。今後、糖度上昇時期に発現しているアクチニジン遺伝子がいくつ存在するか、特に高発現しているアクチニジン遺伝子が存在するかについても明らかにして開発にのぞむ必要がある。

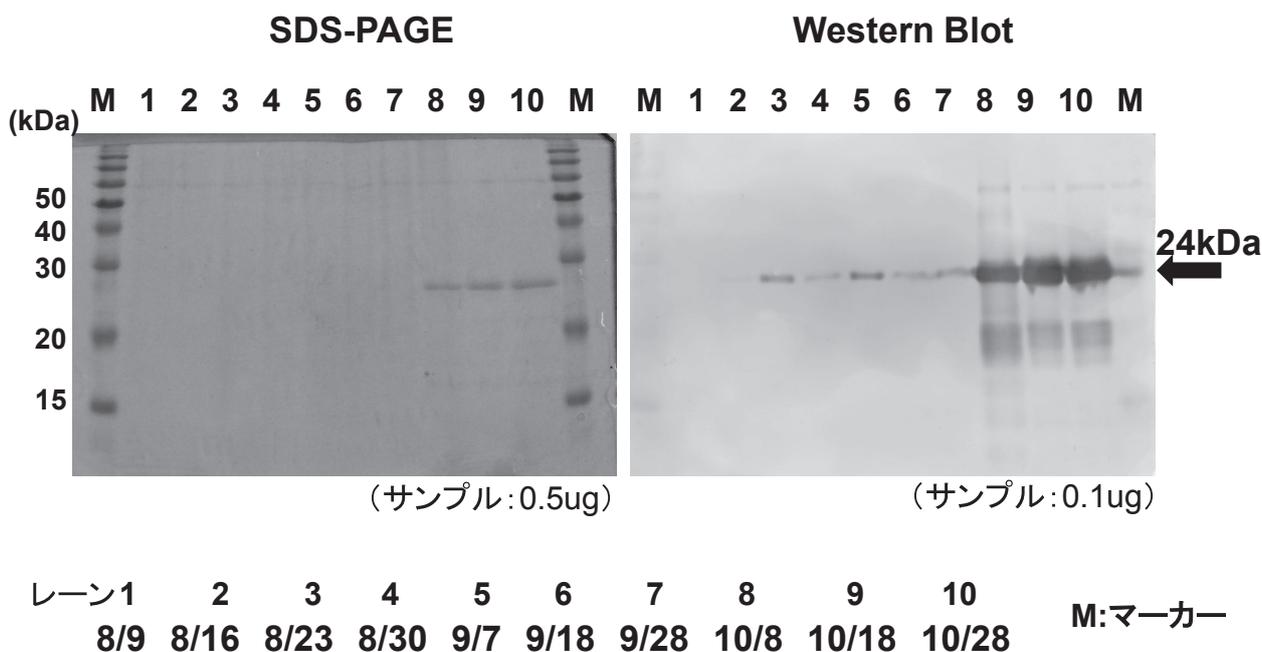


図-5 サルナシ果実の経時的な SDS-PAGE 分析と抗アクチニジン抗血清によるアクチニジンタンパク質の検出

引用文献

- Arcus, A. C. (1959) Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 33 : 242-244
- Boyes, S., Strbi, PandMarsh, H. (1997) Actinidin levels in fruit of *Actinidia* species and some *Actinidia arguta* rootstock-scion combinations. *Lebensm. Wiss. Technol.* 30 : 379-389
- Brocklehurst, K., Baines, B. and Malthouse, P. G. (1981) Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. *Biochem. J.* 197 : 739-746
- Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B. and Demeyer, D. (1995) Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. *Meat Sci.* 39 : 177-193
- Filippova, I. Y., Lysogorskaya, E. N., Oksennoit, E. S., Rudenskaya, G. N. and Stepanov, V. M. (1984) L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-pnitroanilide-Achromogenic substrate for thiolprotein assay. *Anal. Biochem.* 143 : 293-297
- 垣内典夫 (1991) キウイフルーツ「シリーズ食品の科学 果実の科学」(初版, 伊藤三郎編). 213pp, 朝倉書店, 東京. 122-123
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685
- 曾田功・金子美穂・佐藤隆英・中川弘毅・小倉長雄 (1987) キウイフルーツプロテアーゼの利用について. *日食工誌* 34 : 36-41
- McGhie, T. K. and Ainge, G. D. (2002) Color of fruit of the genus *Actinidia* : Carotenoid and chlorophyll compositions. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 117-121
- 西山一郎 (2000) キウイフルーツ果汁のタンパク質分解作用—Hayward種とHort16A種の比較—. *家政誌* 51 : 621-626
- 西山一郎 (2001) 精製アクチニジンによる筋原線維タンパク質分解作用のpH依存性. *家政誌* 52 : 1083-1089
- 西山一郎・福田哲生・太田忠親 (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. *園芸学雑 (J. Japan. Soc. Hort. Sci.)* 73(2) : 157-162
- 小川浩史 (1997) キウイフルーツ「最新果汁・果実飲料事典」(初版). 653 pp, 朝倉書店, 東京. 210-213
- Pastorello, E. A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., Spano, M., Incorvaia, C., Giuffrida, M. G. and Ortolani, C. (1998) Identification of actinidins as the major allergen of kiwifruit. *J Allergy Clin. Immunol.* 101 : 531-537
- 鮫島邦彦・崔一信・石下真人・早川忠照 (1991) アクチニジン (キウイフルーツタンパク質分解酵素) による筋肉構成タンパク質の分解. *日食工誌* 38 : 817-821
- 末澤克彦 (2000) 品種「果樹園芸大百科 12 キウイフルーツ」(初版, 農文協編). 244 pp, 農山漁村文化協会, 東京. 23-26
- Sugiyama, S., Ohtsuki, K., Sato, K. and Kawabata, M. (1996) Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins, Toyopearl-Super Q and Bakerbond WP-PEI. *Biosci., Biotech., Biochem.* 60 : 1994-2000
- 堤ちはる・三好恵子・谷武子・仙北谷至乃・殿塚婦美子・永弘悦子・河野聡子・吉中哲子 (1994) キウイフルーツの豚肉軟化効果について. *家政誌* 45 : 603-607
- 和辻敏子・茶珍和雄・宮崎正則 (1992) キウイフルーツ可溶性タンパク質の電気泳動パターン及びプロテアーゼ活性. *日食工誌* 39 : 966-971