

キウイフルーツのコラゲナーゼの精製と性質

堤 ちはる, 永弘悦子, 田中初美,
中島史絵, 吉中哲子

(青葉学園短期大学)

原稿受付平成8年7月24日; 原稿受理平成9年10月3日

Purification and Some Properties of Collagenase in Kiwifruit

Chiharu TSUTSUMI, Etsuko NAGAIRO, Hatsumi TANAKA,
Shie NAKAJIMA and Tetsuko YOSHINAKA

Aoba Gakuen Junior College, Setagaya-ku, Tokyo 154

Proteases in kiwifruit play an important role in the softening of carnivores. In this study, collagenase in kiwifruit was investigated as a novel softening agent. Collagenase activity in the tissue around the seed was higher than that in the core, the activity in a crude extract being optimum at pH 5.0 and 60°C. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation and Q ion-exchange and gel-filtration chromatography. The molecular mass of the purified enzyme was about 52 kDa by gel filtration and 60 kDa by SDS-PAGE, with a single band. HgCl₂ inhibited the collagenase activity, indicating that the SH group at the active site and/or the conformationally important site of the enzyme was critical. A bivalent metal ion may not be required because no effect of EDTA was apparent. No protease activity was detected in the purified enzyme. Collagenase activity was higher in pineapple, and lower in fig, papaya, ginger and mango than that in kiwifruit. These results suggest that collagenase in kiwifruit contributes to the softening of carnivores together with proteases.

(Received July 24, 1996; Accepted in revised form October 3, 1997)

Keywords: kiwifruit キウイフルーツ, collagenase コラゲナーゼ, protease プロテアーゼ, actinidin アクチニジン, enzyme 酵素.

1. 緒 論

キウイフルーツ (*Actinidia chinensis* Planch) は、ニュージーランド特産の果実として知られているが、近年では日本国内でも生産されるようになり、その美しい緑色と豊富なビタミンC含有量から生食の他にジャム、ワイン、ジュースなど様々に利用されている。キウイフルーツ果汁には、牛肉軟化作用 (和辻と宮本 1985, 128) やゼラチンの低分子化作用 (松本と河村 1988, 123) が知られている。これらの作用はプロテアーゼにより、食肉の可食部の構造を維持している筋原線維たんぱく質が分解される結果と考えられている。

キウイフルーツのプロテアーゼ活性は、Arcus (1959, 242) によりアクチニジンとして命名され、その後 McDowall (1970, 214) や他の研究グループ (Boland and Hardman 1972, 282; Carne and Moore 1978, 73) によって精製された。この酵素は、パパイ

ン、フィシン、プロメラインと同様、チオールプロテアーゼ (McDowall 1970, 214) であり、従来このプロテアーゼ活性はカゼインや合成ペプチドを基質として測定されてきた (Yamaguchi *et al.* 1982, 1983; 橋永等 1986, 65; McDowall 1970, 214; Brocklehurst *et al.* 1981, 739; Wilson and Burns 1983, 1101)。著者らも豚肉軟化作用について報告したが (堤等 1994, 603)、その軟化作用の強さから、現在までに報告されているプロテアーゼによって切断されないコラーゲンを特異的に切断するコラゲナーゼの存在する可能性が考えられた。

コラゲナーゼは、近年、がん (Liotta *et al.* 1982, 277)、肝硬変 (市田等 1988, 410)、歯肉炎 (Golub *et al.* 1985, 12) 等に深く関与していることが報告されている。また、コラゲナーゼは組織を結合するコラーゲン線維に作用し、各種の臓器から組織をほとんど

傷つけることなく遊離させることから、心筋(津田と赤池 1982, 126), 膵臓のランゲルハンス島(谷口等 1982, 299)などの細胞の切り出し用酵素としても利用されている。

コラゲナーゼ活性を有する植物として、パパイヤと生姜が報告されているが(Thompson *et al.* 1973, 652; 橋本等 1991, 127), キウイフルーツのコラゲナーゼについては知られていない。そこで、今回著者らはキウイフルーツのコラゲナーゼ活性について検討し、本酵素がキウイフルーツに存在することを新たに見だし、その生化学的性状を明らかにしたので報告する。

2. 実験方法

(1) 実験材料

キウイフルーツはニュージーランド産ヘイワード種を用いた。コラゲナーゼ活性の比較のためにフィリピン産パイナップル、アメリカ合衆国産パパイヤ、メキシコ産マンゴー、国産いちじくならびに国産の生姜(生姜根茎)を用いた。

(2) キウイフルーツならびに各種果実の粗抽出液の調製

キウイフルーツを剥皮し、長軸方向に4等分し、果心部(白色部分)と果肉部(緑色部分)に分け、クッキングカッター(東芝 CQM-50)でそれぞれホモジナイズし、さらし(綿)でろ過した(キウイフルーツ粗抽出液)。

パイナップル、パパイヤ、マンゴー、いちじく、ならびに生姜は剥皮した。その後パイナップルは長軸方向に8等分し、果心部を除去し果肉部のみとしたものを、パパイヤ、マンゴーは種を除いたものを、また、いちじく、生姜は剥皮したものを、キウイフルーツ粗抽出液を調製するのと同様の方法を用いてそれぞれの粗抽出液を調製した。

(3) 熟度判定法

熟度の判定は、はじめに片手でキウイフルーツをにぎり、硬いもの、やややわらかいもの、やわらかいものに分類した。次にそれぞれの果実を剥皮し、短軸方向に1 cmの厚さに切り、硬度計(ASKER F型、高分子計器社)を用いて硬さを測定した。その結果、硬さは硬いもの 91 ± 2 、やや硬いもの 83 ± 4 、やわらかいもの 75 ± 1 であった。そこで固さがこの範囲に入るものをそれぞれ、未熟果、適熟果、過熟果と分類した。なお、あわせて糖度についても糖度計(ATC-1, アタゴ社)を用いて測定したところ、それぞれ未熟果 14.8

± 0.4 度、適熟果 16.0 ± 0.6 度、過熟果 15.8 ± 0.4 度であった。

(4) コラゲナーゼ活性の測定法

Mandle 法(Mandle *et al.* 1953, 1323)を改良した方法で測定した。キウイフルーツ粗抽出液 25 μ l に緩衝液(10 mM sodium acetate-acetic acid (pH 5.0), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl_2)を加え 0.5 ml とし、5 mg/ml の牛アキレス腱 I 型コラーゲン(Sigma 社)を 0.5 ml 加え十分混和し、各温度で一定時間反応させた後、10%トリクロル酢酸溶液 1 ml を加えて反応を停止させた。30 分間室温にて静置後、3,000 rpm, 15 分間冷却遠心分離し、得られた上清にニンヒドリン試薬を加えて発色させ、570 nm における吸光度を測定する方法(Moore and Stein 1957, 907)により酸可溶性ペプチド量を算出した。L-ロイシンを標準物質として用い、コラゲナーゼ活性は、1 分間に 1 μ mol のロイシンに相当する遊離量を 1 unit と定義し、酵素活性の単位とした。

(5) 硫酸アンモニウム(硫安)分画

キウイフルーツ粗抽出液を 8,000 rpm, 20 分間冷却遠心分離してでんぷんを除いた。得られた上清液に 20%飽和になるよう硫酸アンモニウムを加えて氷水中で 1 時間塩析し、15,000 rpm, 20 分間冷却遠心分離を行い 0~20%飽和画分を得た。さらに、得られた上清液に同様の操作をくり返し 20~40%, 40~60%飽和画分を得た。これらの画分をそれぞれ少量の緩衝液(10 mM sodium acetate-acetic acid (pH 5.0), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl_2)に溶解後、一晚同上の緩衝液中で 4 $^{\circ}\text{C}$ にて透析し、これら標品のコラゲナーゼ活性を測定した。なお、精製操作はすべて 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で行った。

(6) プロテアーゼ活性の測定法

プロテアーゼ活性の測定は中西等(1994, 609)の方法に準じて行った。カゼイン(和光純薬社)1 g を 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0) 100 ml に懸濁させ、15 分間沸騰水中で湯煎にかけたものを用いた(1%カゼイン溶液)。精製酵素 200 μ l に 1%カゼイン溶液 200 μ l を添加後、ただちに混和し 30 分間反応させた後、5%トリクロル酢酸溶液 600 μ l を添加し反応を停止させた。30 分間室温にて静置後、10,000 rpm, 3 分間遠心分離し、得られた上清の 280 nm における吸光度を測定した。ポジティブコントロールとして 1%パプアイン溶液(ナカライテスク社)を用いて同様の操作を行った。

キウイフルーツのコラゲナーゼの精製と性質

(7) イオン交換クロマトグラフィー

あらかじめ緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) で平衡化した Econo-Pac Q Ion Exchange Cartridge (1.2×4 cm, 充填剤 Macro Prep Q Support, BIO-RAD 社) にコラゲナーゼ活性をもつ 20~40% 飽和硫酸画分を添加し, 吸着させた. カラムの平衡化に用いた緩衝液で洗浄後, 100 mM から 300 mM NaCl の直線的濃度勾配によるイオン交換クロマトグラフィーを流速 0.5 ml/min, 採取量 1 ml で行った. 得られた各画分の 280 nm における吸光度とコラゲナーゼ活性を測定した.

(8) ゲルろ過クロマトグラフィー

上記で得られたコラゲナーゼ活性の存在する画分を限外ろ過フィルター (ウルトラフリー 20, ウルトラフリー CL Plus 10,000, Millipore 社) を用いて濃縮した. 次に 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ からなる緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 カラム (1.5×50 cm, Pharmacia 社) に添加後, 同様の緩衝液を用いて流速 0.5 ml/min で溶出し, 採取量 1 ml でゲルろ過クロマトグラフィーを行った. 分子量マーカー (BIO-RAD 社) にはビタミン B₁₂ (分子量 1,350), ミオグロビン (分子量 17,000), オボアルブミン (分子量 44,000), γ -グロブリン (分子量 158,000), チログロブリン (分子量 670,000) を用いた. 得られた各画分の 280 nm の吸光度とコラゲナーゼ活性を測定した. コラゲナーゼ活性を示した画分をプールし, これをキウイフルーツ精製酵素とした.

(9) 電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は Laemmli (1970, 680) の方法に準じて行った. 分離ゲルは, 7.5% アクリルアミド, 濃縮ゲルは 2.5% アクリルアミドを用いた. 電気泳動は熱変性した試料および熱非変性の試料を用いて行った. 熱変性した試料を用いた方法は, 試料に 0.5 M の 2-メルカプトエタノールを添加し, 100℃ で 5 分間加熱することにより行った. その試料 10 μ l を上記組成のゲルに添加した. 2-メルカプトエタノールは, タンパク質分子内の S-S 結合を切断し, SDS とタンパク質を結合しやすくする目的で使用した. 濃縮ゲルでは 10 mA, 分離ゲルでは 50 mA の定電流で, 1.5 時間, 室温で通電した (denatured SDS-PAGE). 電気泳動後, ゲルは 0.25%, クーマシーブリリアントブルー R-250 を用いて一昼夜染色し, 酢酸を用いて脱色した.

熱非変性の場合, 2-メルカプトエタノールを添加せ

ず, また, 試料は非加熱で Shimizu *et al.* (1989, 489) の方法に準じて泳動した (none-denatured SDS-PAGE). すなわち泳動に先立ち, 試料にグリセロールと SDS を最終濃度がそれぞれ 10% と 1% になるように加え, 振とうしながら 24 時間, 4℃ で反応させた. この試料 10 μ l を濃縮ゲルに添加後, 10 mA の定電流で 3 時間 4℃ で通電した. 電気泳動後, ゲルの一部は上記の方法で染色後, 脱色した. 残りのゲルは染色しないで 5 mm 幅に切り, それぞれのゲルを 0.5% ウシアルブミン血清を含む緩衝液中 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) で, 5℃, 48 時間振とうすることによりタンパク質を抽出した. 抽出液を 12,000 rpm, 3 分間の冷却遠心分離後, 上清中のコラゲナーゼ活性を測定した. また, 最終濃度 1% の SDS はコラゲナーゼ活性測定系に影響を及ぼさないことを確認した.

電気泳動の分子量マーカー (BIO-RAD 社) には, オボアルブミン (分子量 43,000), ウシ血清アルブミン (分子量 66,000) フォスフォリラーゼ b (分子量 79,000), β -ガラクトシダーゼ (分子量 116,000), ミオシン (分子量 200,000) を用いた.

(10) たんぱく質の定量法

たんぱく質の定量は, ウシ血清アルブミンを標準物質として, たんぱく質測定キット (BIO-RAD 社) を用いて行った.

3. 実験結果

(1) キウイフルーツ中のコラゲナーゼ活性

1) コラゲナーゼ活性の存在

キウイフルーツ果汁中にコラゲナーゼの存在の有無を知るために牛アキレス腱 I 型コラーゲンを基質として, キウイフルーツ粗抽出液を 5 分間煮沸した標品と非加熱標品のコラーゲン分解能の比較を行った. その結果, 非加熱標品ではコラーゲン分解能が観察されたが, 加熱標品には活性が認められなかった (実験データ省略). このことからキウイフルーツ粗抽出液中に含まれるコラゲナーゼ活性は酵素によるものと考えられた.

2) コラゲナーゼの果実内分布と熟度

キウイフルーツコラゲナーゼの果実内での存在部位を明らかにするために, キウイフルーツ果実を果心部と果肉部にわけ, 粗抽出液のコラゲナーゼ活性の比較を行った. その結果, 果肉部にコラゲナーゼ活性が存在し, 果心部には存在していなかった (実験データ省

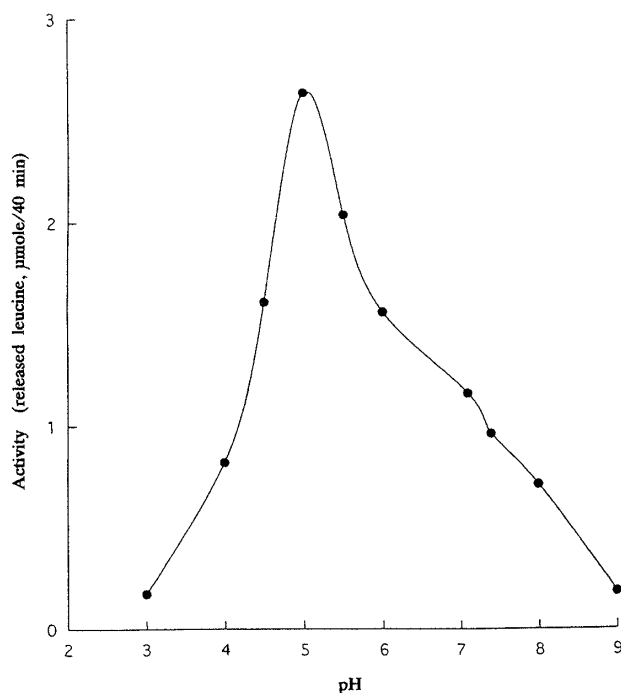


Fig. 1. Effect of pH on the collagenase activity of a crude extract of kiwifruit

A reaction mixture consisting of 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl, 5 mg of bovine achilles tendon collagen (Type I), and the crude extract was incubated at 60 °C for 40 min in different pH-range buffers (10 mM): glycine-HCl (pH 3.0), sodium acetate (pH 4.0, 4.5, 5.0 and 5.5), sodium hydrogen malate-NaOH (pH 6.0), PIPES (pH 7.0), Tris-HCl (pH 7.4, 8.0), and glycine-NaOH (pH 9.0).

略)。さらに、熟度によるコラゲナーゼ活性の変化を観察したところ、適熟果のコラゲナーゼ活性を100%とすると未熟果約68.0%、過熟果約82.6%で共に活性は低かった。

3) コラゲナーゼ活性の至適測定条件の検討

pHの影響を知るために、pH 3.0から9.0の範囲でキウイフルーツ粗抽出液のコラゲナーゼ活性を調べたところ、pH 5.0で最大活性を示した (Fig. 1)。キウイフルーツ果汁のpHは3.3~3.5の間にあるので、コラゲナーゼ活性は果実の状態よりややpHの高い状態で強い活性を示すことが明らかになった。

次に本活性の温度依存性について25°Cから80°Cの範囲で検討した。コラゲナーゼ活性は40°Cから60°Cにかけて急激に上昇し、70°Cでやや低下し、80°Cでほとんど失われた (Fig. 2)。

上記実験より明らかとなった至適条件 (pH 5.0 および 60°C) 下で、コラゲナーゼ活性の経時変化を観察した。その結果、反応開始後40分まで反応生成

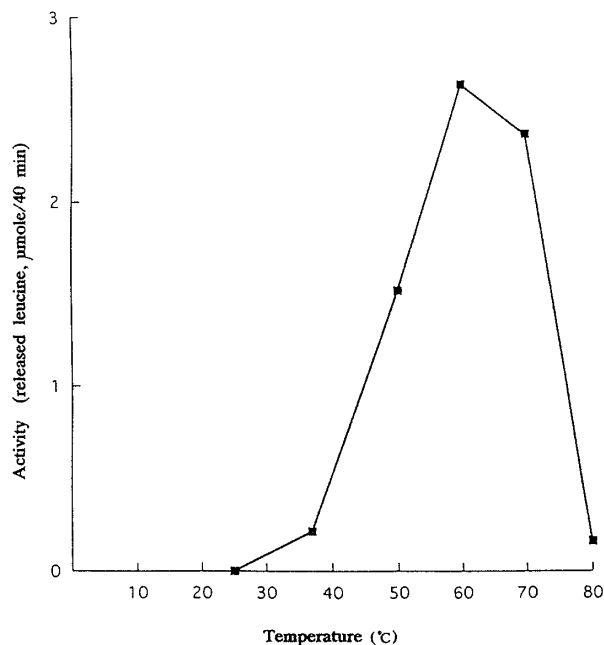


Fig. 2. Effect of incubation temperature on the collagenase activity in the crude extract of kiwifruit

The reaction mixture containing the 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was incubated for 40 min at various temperatures.

物は経時的に増加し、その後平衡に達した。そこで以後のコラゲナーゼ活性の測定は、pH 5.0, 60°C, 40分間の反応条件で行うことにした。

4) キウイフルーツコラゲナーゼに及ぼす保存条件の影響

キウイフルーツ粗抽出液の保存条件によるコラゲナーゼ活性の変化について検討した。調製直後の粗抽出液のコラゲナーゼ活性を100%とすると、5°C, 24時間で約95%, 48時間で約75%, また-20°C, 7日間で約97%, 1カ月間で約89%の活性がみられた (Table 1)。

5) 各種果実に含まれるコラゲナーゼ活性の比較

キウイフルーツ粗抽出液のコラゲナーゼ活性と、他の果実のコラゲナーゼ活性とを比較検討した。新鮮重量あたりのコラゲナーゼ活性は、キウイフルーツの活性を100%とすると、パイナップルは約185%と高く、いちじく約66.1%, パパイヤ約36.6%, 生姜約8.9%, マンゴー約5.0%であった。

(2) キウイフルーツコラゲナーゼの精製

1) イオン交換クロマトグラフィー

コラゲナーゼ活性の存在した20~40%飽和硫酸成分を透析した後、陰イオン交換クロマトグラフィーに

キウイフルーツのコラゲナーゼの精製と性質

供した。その結果、コラゲナーゼ活性は NaCl 濃度 175 mM で溶出された (Fig. 3)。

2) ゲルろ過クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーより得られたコラゲナーゼ活性画分 (Fraction No. 74~100) を濃縮後、Sephacryl S-300 カラムに供した。その結果、たんぱく質の溶出画分と重なる位置にコラゲナーゼ活性をもつ画分が溶出した (Fig. 4)。この溶出位置から分子量は約 52 kDa と推定された。この画分 (Fraction No. 70~89) をキウイフルーツ精製酵素として以下の実験

Table 1. Stability of collagenase activity in a crude extract of kiwifruit stored under different conditions

Storage conditions		Relative activity (%)
Temperature (°C)	Period	
20	(Fresh)	100
5	24 h	95.0
5	48 h	75.2
-20	7 days	97.0
-20	1 month	89.3

に供した。

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

精製酵素を常法に従い SDS-PAGE で泳動した。すなわち、試料を 2-メルカプトエタノールと SDS の存在下、5 分加熱後泳動した。その結果、約 60 kDa の位置に単一バンドが検出された (Fig. 5)。

次に加熱変性せずに none-denatured SDS-PAGE で検討したところ、denatured SDS-PAGE と同様に、約 60 kDa の位置に単一バンドが認められた (Fig. 6)。また、ゲルを 5 mm 間隔で切り出し、活性を調べたところ約 60 kDa の単一バンドを含む画分に活性が存在した (Fig. 6)。これら電気泳動の結果から、キウイフルーツコラゲナーゼは単量体で活性を発現することが明らかとなった。

(3) キウイフルーツコラゲナーゼの諸性質

1) コラゲナーゼ活性に及ぼす EDTA の影響

EDTA がコラゲナーゼの阻害剤であることはよく知られているため (Gallop *et al.* 1957, 891), キウイフルーツ精製酵素を用いてその影響を調べた。その結果、EDTA 非添加のコラゲナーゼ活性を 100% とすると、EDTA 10 mM の添加で約 87%, 100 mM の添加でも約 84% の活性が残存した。

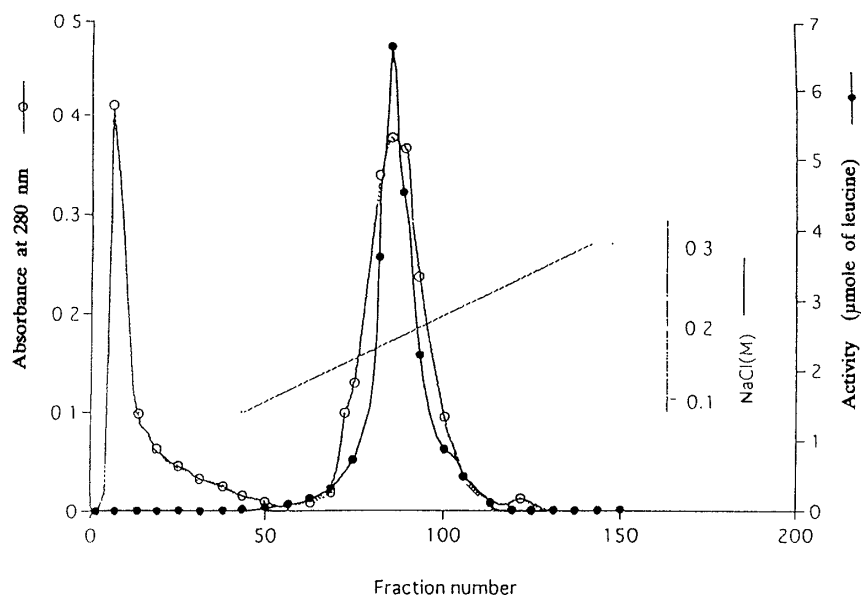


Fig. 3. Q ion-exchange column chromatography of kiwifruit collagenase

A dialyzed solution of the ammonium sulfate-precipitated preparation (20-40%) was applied to an Econo-Pac Q ion-exchange cartridge (1.2 ϕ $\times$ 4 cm), and eluted with a linear gradient of 0.1 to 0.3 M NaCl. Fractions were collected in 1-ml batches.

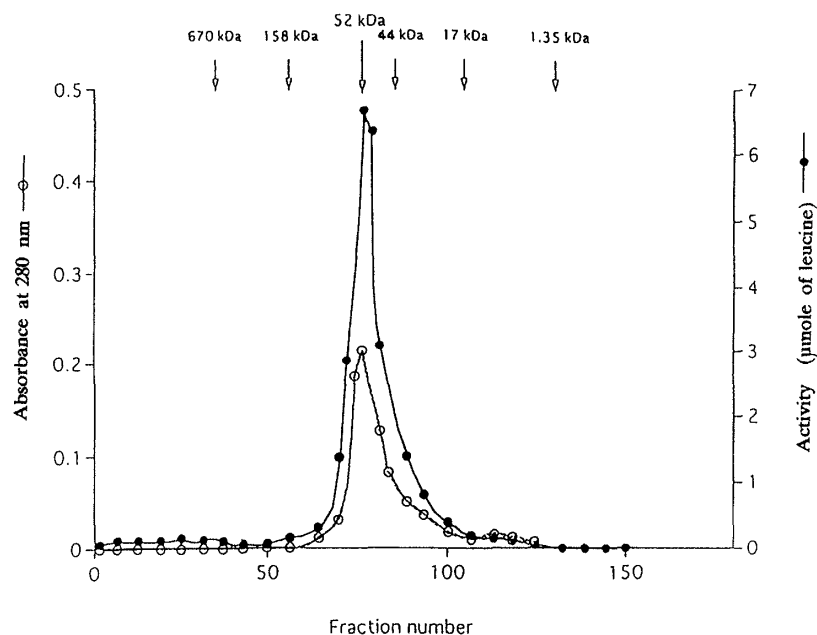


Fig. 4. Gel-filtration chromatography of kiwifruit collagenase

Concentrated fractions from Q ion-exchange column chromatography were applied to a column of Sephacryl S-300 (1.5 × 50 cm). Fractions were collected in 1-ml batches.

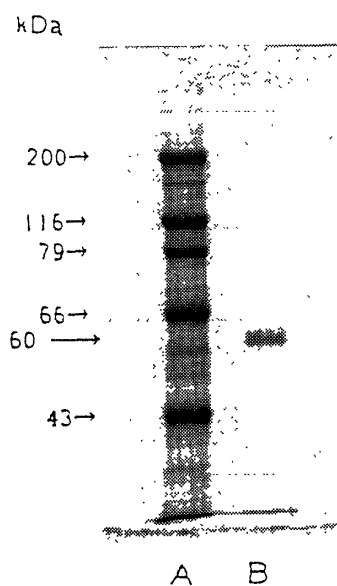


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of the purified kiwifruit collagenase

A sample was boiled with 0.5 M 2-mercaptoethanol and 1 mM SDS for 5 min. Lane A, molecular weight marker; lane B, purified kiwifruit collagenase (10 μg of protein).

2) キウイフルーツコラゲナーゼ活性に及ぼす HgCl₂ の影響

SH 酵素であるバパインは、水銀などの 2 価の金属イオンの添加でその酵素活性が抑制されることは知ら

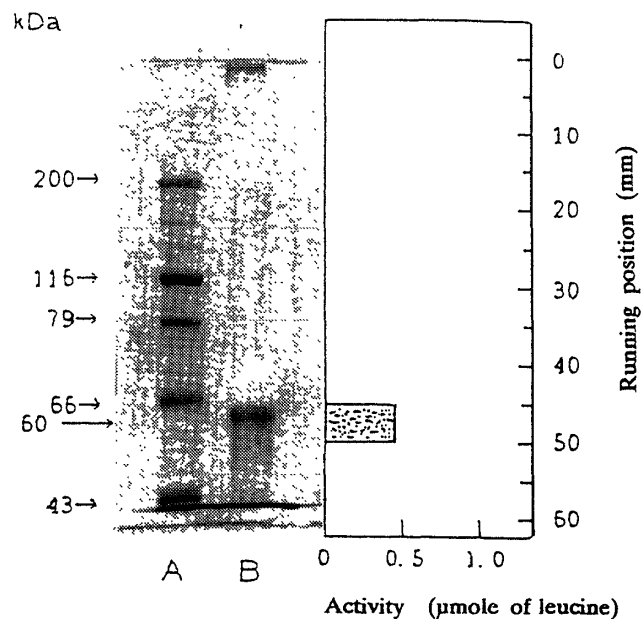


Fig. 6. Native SDS-PAGE analysis of the purified kiwifruit collagenase

A sample was applied to SDS-PAGE without 2-mercaptoethanol. Lane A, molecular weight marker; lane B, none-denatured purified kiwifruit collagenase (10 μg of protein). The right-side box in the figure is from part of the gel cut into a 5-mm length; collagenase was eluted and the activity was determined.

キウイフルーツのコラゲナーゼの精製と性質

Table 2. Protease and collagenase activities of the purified collagenase preparation

Origin of enzyme	Substrate	pH	Temperature (°C)	Activity	
				Protease ($A_{280\text{ nm}}$)	Collagenase ($A_{570\text{ nm}}$)
Papain	Casein	7.0	30	0.69	—
Kiwifruit	Casein	7.0	30	<0.01	—
Kiwifruit	Casein	5.0	60	<0.01	—
Kiwifruit	Collagen	7.0	30	—	0.05
Kiwifruit	Collagen	5.0	60	—	0.77

The protease and collagenase activities were assayed at 30 and 60°C for 30 min in a 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) or 10 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.0) containing 5 mM CaCl_2 and 100 mM NaCl. The substrate for protease activity was a 1% casein solution. A crude extract of papain was used for the positive control of protease activity. The substrate for collagenase activity was 5 mg/ml of a bovine achilles tendon collagen (Type I) solution. $A_{280\text{ nm}}$, absorbance at 280 nm; $A_{570\text{ nm}}$, absorbance at 570 nm.

れている (Kimmel and Smith 1954, 515). そこで、精製酵素 (20 μg) を用いて HgCl_2 の影響を観察した。その結果、コラゲナーゼ活性は反応液に 0.1 mM の HgCl_2 を添加すると無添加の場合の約 10% に活性は低下した。次に 30 分間、4 °C にて 0.1 mM の HgCl_2 と反応させた後に、SH 化合物であるシステインを 1 mM 反応液に加えたところ、 HgCl_2 による活性の阻害は解除され、活性は HgCl_2 添加前の約 84% に回復した。また、1 mM システインのみの処理により、顕著な活性の変化は観察されなかった。

3) キウイフルーツプロテアーゼ (アクチニジン) との比較

従来報告されているキウイフルーツプロテアーゼ (アクチニジン) との異同を知るために、精製酵素のプロテアーゼ活性を、カゼインを基質として、中西等 (1994, 609) の方法で測定した。その結果、精製酵素はカゼインを基質としたプロテアーゼ測定条件下でプロテアーゼ活性を示さず、また、コラゲナーゼ活性測定の至適条件である pH 5.0, 60°C でも活性を示さなかった (Table 2)。コラーゲンを基質とした場合には、粗抽出液とはほぼ一致した結果が得られた。これらの結果から、本精製酵素にはプロテアーゼ活性が認められないことが明らかとなった。

4) キウイフルーツコラゲナーゼの精製過程の要約

キウイフルーツ中のコラゲナーゼの精製過程をまとめた (Table 3)。果実 10 個 (約 1.2 kg) より、20~40% 硫酸分画で 2.1 倍、イオン交換クロマトグラフィーで 5.4 倍、ゲルろ過クロマトグラフィーで 11.6 倍

と精製され最終的には 1.38 mg のコラゲナーゼが得られた。単純に計算するとキウイフルーツ 1 個あたり最低量 138 μg のコラゲナーゼが含まれていることになる。回収率は約 11.4% であった。

4. 考 察

キウイフルーツのタンパク質分解酵素として、プロテアーゼに関する研究は多いが (Arcus 1959, 242; McDowall 1970, 214; Boland and Hardman 1972, 282; Carne and Moore 1978, 73)、これまでにコラゲナーゼについては知られていない。

キウイフルーツコラゲナーゼの最終精製酵素は、プロテアーゼ活性をもたない分子量 52 kDa ないしは 60 kDa の既存のプロテアーゼとは異なる酵素であることを明らかにした。さらに、この酵素は電気泳動を熱変性条件と非熱変性条件で行ったところ分子量に差が見られなかったこと (Fig. 5, 6)、およびゲルろ過クロマトグラフィーの結果 (Fig. 4) から、単量体で活性を発現すると考えられた。

キウイフルーツのプロテアーゼはこれまでに SDS-PAGE により 31 kDa (中西等 1994, 609)、Sephadex G-50 カラムを用いたゲルろ過により 12.8 kDa (McDowall 1970, 214)、アミノ酸分析により 23.5 kDa (Carne and Moore 1978, 73) の複数の分子量の酵素が報告されている。これらのプロテアーゼの至適 pH は 5.0~7.0 の範囲にあり、橋永等 (1986, 65) は pH 3.9 と 6.5 が、曾田等 (1987, 36) は pH 4.2 付近が至適であったと報告している。また、至適温度は

Table 3. Summary of purification stages for collagenase activity from kiwifruit

Purification stage	Total protein (mg)	Total activity (unit*)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	140.00	197.4	1.41	1.0	100
20-40% saturated ammonium sulfate	25.66	77.5	3.02	2.1	39.3
Econo-pac Q ion-exchange chromatography	4.08	31.0	7.59	5.4	15.7
Sephacryl S-300 gel filtration	1.38	22.6	16.40	11.6	11.4

*One unit of enzyme activity is that required to catalyze the release of 1 μ mol of leucine/min.

40~50℃ (橋永等 1986, 65), あるいは 20℃ (曾田等 1987, 36) であると報告している。

熟度によるキウイフルーツのプロテアーゼとコラゲナーゼ活性を比較すると, プロテアーゼは追熟が進むに従い活性が増加した (橋永等 1986, 65)。一方, コラゲナーゼは追熟が進むに従い活性が低下したことから両酵素は経時的な活性の変化が異なる酵素であることが示された。

以上の報告および結果から, キウイフルーツのコラゲナーゼとプロテアーゼは一部類似の性質をもつものの, 本コラゲナーゼ活性にはプロテアーゼ活性が認められず (Table 2), また, 分子量や至適 pH, 温度などの生化学的性状や物理化学的性状が異なったため, 明らかにこれまでに報告されたプロテアーゼとは異なる別の酵素であると考えられた。

キウイフルーツのプロテアーゼ (橋永等 1986, 65) と本コラゲナーゼは室温よりも高い温度で活性を示したことから (Fig. 2), 両酵素は食肉の調理に際して加熱処理の初期の段階をゆっくり通過する調理操作方法をとることにより, タンパク質の分解を助けることが示唆された。

Thompson 等は, ウシ血清アルブミンを基質として精製した生姜のプロテアーゼ中に, コラゲナーゼ活性の存在を報告した (Thompson *et al.* 1973, 652)。このコラゲナーゼ活性は pH 5.0, 50℃ の条件下で最大活性を示した。生姜のコラゲナーゼの分子量は明らかにされていないが, プロテアーゼ活性の有無を除き, キウイフルーツのコラゲナーゼとよく似た性状の酵素であると思われる。

一方, パパイヤのプロテアーゼもコラゲナーゼ活性を有している (橋本等 1991, 127)。このパパイヤ中

のコラゲナーゼの分子量も明らかにされていないが, pH 7.4, 50℃ の条件下でパパイヤ中のコラゲナーゼは生姜より弱い活性を示した。キウイフルーツ, 生姜, パパイヤは共に比較的高温 (50℃) でも活性を示すことから, これらの酵素は熱安定性の高い酵素であると思われる。

金属キレート剤 (EDTA) により, 従来型のコラゲナーゼの活性は阻害されることが知られている (Gallop *et al.* 1957, 891)。橋本等 (1991, 127) は生姜コラゲナーゼに 10 mM の EDTA を添加しても本研究の結果と同様, 活性に影響はなかったと報告している。このことからキウイフルーツコラゲナーゼと生姜コラゲナーゼは従来型のコラゲナーゼとは異なり, 2 価金属要求性がないと推定された。

また, SH 酵素であるパパインは水銀などの 2 価の金属イオンを添加すると酵素活性が抑制される (Kimmel and Smith 1954, 515)。同様の阻害は, 生姜コラゲナーゼについても観察された (橋本等 1991, 127)。キウイフルーツコラゲナーゼも金属イオンで活性が阻害され, 活性の回復に SH 化合物を必須とすることから SH 酵素であることが強く示唆された。

本研究の結果から, キウイフルーツにはこれまでに報告されているプロテアーゼの他に, コラゲナーゼ活性の存在することが新たに明らかになった。キウイフルーツはコラゲナーゼの存在により, 種の保存を容易にしているのではないと思われる。すなわち, コラーゲンを含有する食物を摂取する雑食性の動物が好んでキウイフルーツを摂取することにより, 種子が遠隔地まで広まるという有利性のために存在するのかもしれない。

本研究に用いた粗抽出液は, 加熱や冷凍保存に対し

キウイフルーツのコラゲナーゼの精製と性質

でも比較的安定であり (Fig. 2, Table 1), 新鮮重量あたりの活性が, いちじく, パパイヤ, 生姜, マンゴーに比べて高かったことから, 日常の調理において各種食品, 特に畜肉, 魚介類, 内臓肉などに添加した場合は, それらの可食部の構造を維持している基質たんぱく質であるコラーゲンに作用し, さらに従来のプロテアーゼとも協調的に作用して, 比較的容易に肉を軟化させ, テクスチャーに影響を及ぼすことが推察された。また, 精製酵素を用いて筋原線維たんぱく質に対する特異性等の諸性質を明らかにすることにより, 食品加工貯蔵の分野や, 消化剤等医療の分野への応用の可能性についても今後検討していきたい。

5. 要 約

キウイフルーツ果汁中のコラゲナーゼ活性の存在を新たに明らかにし, さらにその精製を行い, その生化学的性質について検討し, 以下のような結果を得た。

(1) 粗抽出液の活性は果肉部にあり, 至適 pH は 5.0, 至適温度は 60℃であった。このことから, 加熱調理の初期の段階で本酵素は強く作用するものと思われる。

(2) 粗抽出液を -20℃で 1 カ月冷凍保存しても安定であり, 調製直後のものの約 89% の活性が保持されていた。

(3) 粗抽出液のコラゲナーゼ活性は新鮮重量あたり, いちじく, パパイヤ, 生姜, マンゴーより高く, パイナップルより低かった。

(4) ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出位置から, 本酵素の分子量は約 52 kDa と推定された。精製酵素の SDS-PAGE では約 60 kDa の位置にコラゲナーゼ活性を有する単一バンドが検出された。

(5) 精製酵素のコラゲナーゼ活性は, 100 mM の EDTA の添加によって著明な減少は認められなかった。

(6) 精製酵素のコラゲナーゼ活性は, HgCl₂ により阻害され, システインによりその阻害は回復した。このことから SH 酵素であることが考えられた。

(7) 精製酵素はプロテアーゼ活性を示さなかった。

(8) キウイフルーツ 1 個あたり最低量 138 μg のコラゲナーゼが含まれていた。

終わりに, 本研究に際し有益なご助言, ご指導をいただきました東邦大学医学部分子生物学研究室の逸見仁道博士に深謝いたします。

引 用 文 献

- Arcus, A. C. (1959) Proteolytic Enzyme of *Actinidia chinensis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 242-244
- Boland, M. J., and Hardman, M. J. (1972) Kinetic Studies on the Thiol Protease from *Actinidia chinensis*, *FEBS Lett.*, **27**, 282-284
- Brocklehurst, K., Baines, B. S., 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
- Carne, A., and Moore, C. H. (1978) The Amino Acid Sequence of the Tryptic Peptides from Actinidin, a Proteolytic Enzyme from the Fruit of *Actinidia chinensis*, *Biochem. J.*, **173**, 73-83
- Gallop, P. M., Seifter, S., and Meilman, E. (1957) Studies on Collagen I. The Purification, Assay, and Mode of Activation of Bacterial Collagenase, *J. Biol. Chem.*, **227**, 891-906
- Golub, L. M., Wolff, M., Lee, H. M., McNamara, T. F., Ramamurthy, N. S., Zambon, J., and Giancio, S. (1985) Further Evidence that Tetracyclines Inhibit Collagenase Activity in Human Crevicular Fluid and from Other Mammalian Sources, *J. Periodontal Res.*, **20**, 12-23
- 橋本昭彦, 竹内洋子, 河原有三, 安本教傳 (1991) ショウガ根茎のプロテイナーゼおよびコラゲナーゼ活性, *栄食誌*, **44**, 127-132
- 橋永文男, 福留哲朗, 伊藤三郎 (1986) キウイフルーツ果実の追熟中のプロテアーゼ活性とその分布, *鹿児島大農学部学術報告*, **36**, 65-69
- 市田隆文, 八木一芳, 山田慎二, 荒川謙二, 井上恭一, 宮際 幹, 小玉修嗣, 岩田和士, 早川太郎 (1988) 肝疾患におけるコラゲナーゼインヒビターの臨床的意義, *肝臓*, **29**, 410
- Kimmel, J. R., and Smith, E. L. (1954) Crystalline Papain I. Preparation, Specificity, and Activation, *J. Biol. Chem.*, **207**, 515-531
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4, *Nature*, **227**, 680-685
- Liotta, L. A., Thorgeirsson, U. P., and Garbisa, S. (1982) Role of Collagenases in Tumor Cell Invasion, *Cancer Metast. Rev.*, **1**, 277-288
- Mandle, I., MacLennan, J. D., and Howes, E. L. (1953) Isolation and Characterization of Proteinase and Collagenase from *Cl. histolyticum*, *J. Clin. Invest.*, **32**, 1323-1329
- 松本睦子, 河村フジ子 (1988) ゼラチンゲルにおよぼすキウイフルーツの影響について, *東京家政大研究紀要*, **28**, 123-127
- McDowall, M. A. (1970) Anionic Proteinase from *Actinidia chinensis*, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214-221
- Moore, S., and Stein, W. H. (1957) A Modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino

- Acid and Related Compounds, *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913
- 中西洋子, 成瀬明子, 梶田武俊 (1994) 高度に精製したキウイフルーツプロテアーゼ (アクチニジン) の自己消化に及ぼす温度の影響, *家政誌*, **45**, 609-614
- Shimizu, Y., Nakamura, T., Niki, T., Hemmi, H., and Sugamura, K. (1989) Purification and Characterization of a T Lymphocyte-Derived Differentiation Inducing Factor for Human Promyelocytic Cell Line (HL-60) and Its Relationship to Lymphotoxin, *Microbiol. Immunol.*, **33**, 489-501
- 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
- 谷口 洋, 江尻一成, 石原建造, 馬場茂明 (1982) VII. 単離細胞を用いた医化学研究の諸方法. 3. 臍島の培養とその機能, 代謝, **19**, 299-311
- Thompson, E. H., Wolf, I. D., and Allen, C. E. (1973) Ginger Rhizome: A New Source of Proteolytic Enzyme, *J. Food Sci.*, **38**, 652-655
- 津田泰夫, 赤池紀扶 (1982) 単一心筋研究の現況, 生体の科学, **33**, 126-134
- 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, 宮本悌次郎 (1985) キウイフルーツの牛肉軟化効果について, *調理科学*, **18**, 128-132
- Wilson, E. L., and Burns, D. J. W. (1983) Kiwifruit Juice Processing Using Heat Treatment Techniques and Ultrafiltration, *J. Food Sci.*, **48**, 1101-1105
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I., and Kiso, H. (1982) Proteolytic Enzymes in Green Asparagus, Kiwi Fruit and Miut: Occurrence and Partial Characterization, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1983-1986

注：本論文投稿後に、キウイフルーツにプロテアーゼおよびコラゲナーゼ活性を有する 22 kDa の酵素の存在が、大山等 (1997, 57) によって報告された。しかしながら、分子量、至適条件ならびにプロテアーゼ活性の有無などから、本論文の酵素とは異なる酵素であると考えられた (大山秀夫, 榎本俊樹, 永山伸一郎 (1997) キウイ果汁プロテアーゼの多様性とコラーゲン分解活性, *栄食誌*, **50**, 57-62)。