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

和辻敏子*・茶珍和雄**・宮崎正則***

Electrophoretic Patterns of Kiwifruit Soluble Proteins and Protease Activity

Tosiko WATSUJI*, Kazuo CHACHIN** and Masanori MIYAZAKI***

* Koshien Junior College, Kawarabayashi-cho, Nishinomiya, Hyogo, 663

** College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Gakuencho,
Sakai, Osaka, 593

*** Toyo Institute of Food Technology, Minami-Hanayashiki,
Kawanishi, Hyogo, 666

The soluble proteins and the protease activity in kiwifruit during development were examined by electrophoresis and gel filtration. (1) The protease activity, soluble protein contents and the yield of acetone powder from kiwifruit increased up to the 16th week after anthesis. A high positive correlation was found between the protease activity and the yield of acetone powder with three cultivars of kiwifruit. (2) The electrophoretic patterns of soluble proteins of 3 cultivars showed that proteins around 60 kDa, which were slightly observed in the 4~12th weeks after anthesis, increased after 16th week. It was also showed that some bands around 30 kDa and below were apparently observed during the development of Bruno fruit, but in other samples tended to decrease. (3) Gel filtration chromatography of the crude enzyme fractions at the 12th and the 24th week after anthesis did not show significant differences. The highest activity of protease was eluted with cytochrome c. (4) The highest protease activity in a gradient polyacrylamide gel was found in a section of around 13 kDa protein. (5) The ripening of kiwifruit was accelerated by ethylene treatment, and the protease activity in the fruit was slightly declined. (Received Jan 27, 1992)

キウイフルーツは温州ミカンの転換作物の一つとして導入されて以来十数年を経過しニュージーランド産及び国産とで1年中市場に出回るようになった。しかし近年、国内産キウイフルーツは生産が急増したために生産過剰になる傾向があり、また、ニュージーランドからの輸入時期が拡大されていることから、輸入キウイフルーツとの競合が懸念されるようになってきた。その為に生食以外の加工品や利用等について研究¹⁾²⁾がさらに求められ

る。

キウイフルーツのプロテアーゼについては基礎的な研究や理化学的性質³⁾⁴⁾、追熟中の活性や利用^{5)~8)}等についての報告がある。またプロテアーゼの分子量に関連する研究^{9)~13)}もされている。著者らは調理加工におけるキウイフルーツのプロテアーゼ利用に関して検討^{14)~16)}を行っており、またタンパク質の成育、貯蔵中における活性の変化¹⁹⁾についても報告している。今後さらにブ

* 甲子園短期大学 (〒663 兵庫県西宮市瓦林町)

** 大阪府立大学農学部 (〒593 大阪府堺市学園町)

*** 東洋食品研究所 (〒666 兵庫県川西市南花屋敷)

ロテアーゼの利用について検討を行っていくために、本研究ではキウイフルーツの可溶性タンパク質及びプロテアーゼを電気泳動法とゲル濾過法により分離し、プロテアーゼの活性をもつ分子種と分子量の推定を行った。また、果実の肥大成熟中ならびに品種間のタンパク分子種の変化および果実のプロテアーゼ活性に及ぼすエチレン処理の影響についても検討した。

実験方法

1. 実験材料

試料は前報¹⁹⁾と同じく東洋食品研究所農場で栽培され開花後4週～24週の間収穫されたキウイフルーツ (*Actinidia deliciosa* (chev) LIANG et FERGUSON) のヘイワード、アボット、およびブルーノの3品種の果実を用いた。本実験に用いた果実はM級であった。エチレン処理をおこなった試料は、和歌山県新岡果実園で栽培され11月20日収穫されたキウイフルーツのヘイワード(M級)を用いた。

2. 粗酵素液の調製

前報¹⁹⁾と同様に処理したアセトン粉末50 mgに20 mMのクエン酸緩衝液(pH 6.0, 5 mM システイン, 3 mM EDTAを含む) 20 mlを加え5℃で1時間抽出後、10 000 rpm 15分間遠沈して得た上清液を粗酵素液として用いた。粗酵素液(タンパク質含量 150～200 µg/ml)透析膜のチューブに入れ周囲をポリエチレングリコール6 000で覆いタンパク質含量1 mg/mlまで濃縮したものを電気泳動法とゲル濾過法に用いた。

3. 酵素活性の測定

前報¹⁹⁾に準じて行った。電気泳動をした分離ゲル上の酵素活性は分離ゲルを10等分しさらに0.5 cm幅に切り0.6% カゼイン液を加え38℃で1時間反応させた後、0.4 M トリクロロ酢酸5 mlを加えて停止させ、以後前報¹⁹⁾酵素活性の測定に準じて行った。

またゲル濾過法では得られた画分(5 ml)について酵素活性を測定した。

4. 電気泳動

スラブ型ポリアクリルアミドゲル電気泳動法²⁰⁾で果実の肥大成熟中の可溶性タンパク質の分子種、プロテアーゼ活性の変化を調べ分子量の推定を行った。分離ゲルは4～30% グラジエントゲルからドデシル硫酸ナトリウムを除いて調製した。試料をSDS処理をした場合は緩衝液にも0.1%のSDSを加え、標準タンパクとして、ファーマーシア社のLow Molecular Weight Calibration kit (α -Lactalbumin, M.W. 14 400, Soybean

Trypsin Inhibitor, M.W. 20 100, Carbonic Anhydrase, M.W. 30 000, Ovalbumin, M.W. 43 000, Bovine Serum Albumin, M.W. 67 000, Phosphorylase, B.M.W. 94 000)を用いた。

5. ゲル濾過法

開花後12週及び24週のアボットの粗酵素調製物をSephadex G-100(ファーマーシア社)を用い20 mM クエン酸緩衝液(pH 6.5, 5 mM システイン, 3 mM EDTAを含む)により溶出し、流速は15 ml/hで5 mlずつ分取した。

6. タンパク質含量

前報¹⁹⁾と同様に3品種における生育中の可溶性タンパク質含量、開花後12週及び24週のアボットの粗酵素調製物のタンパク質含量をCoomassie brilliant blue Gを用いた染色定量法²¹⁾により求めた。

7. エチレン処理

約120 ppmのエチレンガスで10日間エチレン処理を行った。本実験中試料をいれているインキュベーター内のガス組成の変化には特に注意し、二酸化炭素の蓄積を除くためにソーダライムを入れた。また乾燥を防ぐために脱脂綿に蒸留水を浸しインキュベーター内に置き、1日1回一定時間に開放し空気を交換させ、そのつどエチレンガスで処理した。

実験結果と考察

1. 酵素活性と可溶性タンパク質量、アセトン粉末収量との相関性

生育中の酵素活性、可溶性タンパク質量、アセトン粉末収量はFig. 1に示したように3品種ともに開花後16週までは増加した。16週以後は横ばい、または減少傾向を示した。前報¹⁹⁾と同様に酵素活性とアセトン粉末収量との間に3品種ともに高い正の相関(ヘイワード $r=0.982$, アボット $r=0.966$, ブルーノ $r=0.945$)がみられた。また、キウイ果実の生育中における可溶性タンパク質量と酵素活性も平行して増加の傾向が見られた。一般に果実の生育中の粗タンパク量(果実当たり)について日本ナシ、20世紀(小林²²⁾、西洋ナシ(BAIN²³⁾)等は増加の推移を報告している。しかしキウイフルーツでは単位重量当たりの可溶性タンパク質量およびプロテアーゼ活性が増加した。同様なことがパイナップルでも認められている²⁴⁾。このような生育に伴うプロテアーゼ活性の増加の生理学的な意味については、今後調査されなければならないと考えられる。

Fig. 1 Changes in the yield of acetone powder, protease activity and the protein content during development of kiwifruit

▲—Yield of acetone powder ●—Protease activity □—Protein content

Fig. 2 Changes in the electrophoretic patterns of kiwifruit proteins during development (4~16 weeks after anthesis)

1: α -Lactalbumin (m.w. 14 400). 3: Carbonic Anhydrase (m.w. 30 000).

5: Bovine Serum Albumin (m.w. 67 000)

M: Molecular weight marker H: Hayward A: Abbott B: Bruno

2. 生育に伴う可溶性タンパク質の電気泳動パターンの変化

開花後 4 週～16 週における可溶性タンパク質の電気泳動パターンの変化を Fig. 2 に示した。ブルーノでは開花後 4 週～16 週まで、ヘイワードとアボットでは開花後 4 週～8 週にかけて分子量 3 万以下に約 5 本のバンドが明らかに検出された。しかし 16 週のヘイワード、アボットではバンドが不鮮明になる傾向がみられた。さらにヘイワード、アボットでは開花後 21～24 週 (Fig. 3)

にかけて分子量 3 万以下のバンド 1 本以外は鮮明には検出されなかった。しかしブルーノでは他の 2 品種に比較して分子量 3 万以下に 5 本のバンドが開花後 24 週でも明らかに認められ、生育中を通して顕著な変化はみられなかった。一方、開花後 16 週以後 3 品種とも分子量 6 万付近に分離は不鮮明であるがタンパク質が増加することが認められた。

試料を SDS 処理した場合の開花後 16 週から 24 週までの電気泳動パターンは各品種について生育中における

Fig. 3 Changes in the electrophoretic patterns of kiwifruit protein during development (21~24 weeks after anthesis)

1: α -Lactalbumin (m.w. 14 400). 3: Carbonic Anhydrase (m.w. 30 000).
5: Bovine Serum Albumin (m.w. 67 000)
M: Molecular weight marker H: Hayward A: Abbott B: Bruno

Fig. 4 Protease activity to Hayward on the separation gel

1: α -Lactalbumin (m.w. 14 400). 2: Soybean Trypsin Inhibitor (m.w. 20 100).
3: Carbonic Anhydrase (m.w. 30 000). 4: Ovalbumin (m.w. 43 000).
5: Bovine Serum Albumin (m.w. 67 000). 6: Phosphorylase b (m.w. 94 000).
These proteins were used as molecular weight markers

変化はほとんどみられなかったが、ブルーノ種が他の2品種に比べてやや異なったパターンを示し、分子量3万と4万の間に他の品種にみられないバンドがみられた。

3. 分離ゲル上の活性

ヘイワード種について開花後4週と24週およびSDS処理をした24週のヘイワード種の試料をそれぞれ電気泳動をした。その分離ゲルの上部から下部までを10等分し、ゲルのまま直接酵素活性を調べた (Fig. 4)。そ

の結果、開花後4週では酵素活性はゲルの一番下のバンド付近において他の部位に比較して僅かに活性がみられた。収穫期の開花後24週ではゲル最下部に高い活性がみられ、それ以外の部分ではほとんど活性が認められなかった。この結果からプロテアーゼの活性部位はこのゲル最下部のバンドであると考えられた。

4. プロテアーゼのゲル濾過溶出パターンと活性

開花後12週、24週のアボットの粗酵素調製物を

Sephadex G 100 を用いてゲル濾過法により分離し、タンパク質量、酵素活性を測定した (Fig. 5, 6). その結果、プロテアーゼ活性はチトクローム C (分子量 12 400) の溶出位置にはほぼ一致して認められ、ゲル濾過溶出パターンは開花後 12 週, 24 週との間で大差は見られなかった. さらにゲル濾過法で最も活性の高かった画分 (開花後 24 週のアボット) について電気泳動をおこ

Fig. 5 Gel filtration pattern of the crude protease on Sephadex G-100

Column: Sephadex G-100 (2.5 × 95 cm)

Elution speed: 15 ml/h.

Sample protein content: 1 mg/ml (12 weeks after anthesis)

Fig. 6 Gel filtration pattern of the crude protease on Sephadex G-100

Column: Sephadex G-100 (2.5 × 95 cm)

Elution speed: 15 ml/h.

Sample protein content: 2 mg/ml (24 weeks after anthesis)

ない分子量を推定した. その結果, 分子量 14 400 の標準タンパク (α -ラクトアルブミン) よりも少し下方に位置し, 単一のパンドであった. このパンドの位置は前述の分離ゲル上から得られたプロテアーゼ活性画分と一致した. このプロテアーゼ活性画分の分子量は 12 800 であると算定された.

これは MACDWAL⁵⁾ のゲル濾過法による $12\,800 \pm 700$ との報告と一致している. しかし, BARKER⁶⁾ は X 線, BOLAND と HARDMAN⁷⁾ は高速平衡密度勾配法によりキウイフルーツのプロテアーゼの分子量を 26 000 であると報告し, CARNE と MORE¹⁷⁾ はプロテアーゼのアミノ酸組成から求めて 23 500 としている. LUH と WANG²⁵⁾ はこの様な相違について, 分子量測定方法によっていることを指摘している.

5. エチレン処理による影響

エチレン処理により果実の追熟が促進され, それに伴ってプロテアーゼ活性およびアセトン粉末収量は 3 日までやや減少したが, それ以後はほとんど変化が認められなかった (Fig. 7). このような活性変化はエチレン処理区より遅れて追熟が進行した対照区と同様でありエチレンの直接的影響はないものと思われた.

要 約

キウイフルーツの生育中における可溶性タンパク質およびプロテアーゼ活性の変化について, 電気泳動法とゲ

Fig. 7 Effect of ethylene treatment on the protease activity of kiwifruit

○—Protease activity (control)

●—Protease activity (C_2H_4 treatment)

ル濾過法により検討した結果、次のことが認められた。

(1) 生育中の酵素活性、可溶性タンパク質量、アセトン粉末収量は3品種共に開花後16週までは増加した。又酵素活性とアセトン粉末収量との間に3品種共に高い正の相関がみられた。

(2) ヘイワード、アボット、ブルーノの品種における果実の生育過程の可溶性タンパク質の電気泳動パターンは開花後4週～12週のものには分子量6万以上のものが少なく16週から増加の傾向がみられた。品種間においてブルーノ種がややことなったパターンを示し、果実の発育中分子量3万以下および3万付近のバンドがブルーノ種では認められたが、21週後における他の品種では減少の傾向がみられた。

(3) 開化後12週および24週の粗酵素調製物のゲル濾過パターンには大差がなく、分子量12400(チトクロームC画分)付近に最も高いプロテアーゼ活性が認められた。

(4) 分離ゲル上のプロテアーゼ活性を調べると、分子量13000付近に最も高い活性がみられた。

(5) エチレン処理は果実の追熟を促進し、それに伴って果実のプロテアーゼ活性の低下が若干見られた。

本研究を行うにあたり、ご助言ご指導を賜りました大阪府立大学農学部 岩田 隆教授に深謝致します。

文 献

- 1) WILDMAN, T. and LUH, B.S.: *J. Food Sci.*, **46**, 387 (1981).
- 2) WILSON, E.L. and BURNS, D.J.W.: *J. Food Sci.*, **48**, 1101 (1983).
- 3) ARCUS, A.C.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **33**, 242 (1959).
- 4) 福井正夫・野田善良・山田正純: 香川県農業試験場研究報告, **28**, 67 (1976).
- 5) MCDOWALL, M.A.: *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214 (1970).
- 6) BAKER, E.N.: *J. Mol. Biol.*, **115**, 263 (1977).
- 7) BOLAND, M.J. and HARDMAN, M.J.: *FEBS Lett.*, **27**, 282 (1972).
- 8) MCDOWALL, M.A.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **293**, 226 (1973).
- 9) LEWIS, D.A. and LUH, B.S.: *J. Food Biochem.*, **12**, 109 (1988).
- 10) 小倉長雄・斎藤裕子・金子美穂・佐藤隆英・中川弘毅: 千葉大園学報, **36**, 21 (1985).
- 11) 橋永文男・福留哲朗・伊藤三郎: 鹿大農学術報告, **36**, 65 (1986).
- 12) 曾田 功・金子美穂・佐藤隆英・中川弘毅: 日食工誌, **34**, 36 (1987).
- 13) 鮫島邦彦・崔 一信・石下真人・早川忠昭: 日食工誌, **38**, 817 (1991).
- 14) 和辻敏子・宮本悌次郎: 調理科学, **18**, 128 (1985).
- 15) 和辻敏子・宮本悌次郎: 調理科学, **21**, 213 (1988).
- 16) 和辻敏子・宮本悌次郎: 調理科学, **22**, 317 (1989).
- 17) CARNE, A. and MORE, C.H.: *Biochem. J.*, **173**, 73 (1978).
- 18) BROCKLEHURST, K., BRINES, B.S. and MALT-HOUSE, J.G.: *Biochem. J.*, **197**, 739 (1981).
- 19) 和辻敏子・茶珍和雄・宮崎正則: 日食低温誌, **17**, 135 (1991).
- 20) 堀尾武一・山下仁平: 蛋白質・酵素の基礎実験法(南江堂), p. 322 (1984).
- 21) 菅原 潔・副島正美: 蛋白質の定量法(学会出版センター), p. 163 (1981).
- 22) 小林 章・中川昌一: 果樹園芸原論, (養賢堂), p. 294 (1978).
- 23) BAIN, I.M.: *J. Botany.*, **9**, 99 (1961).
- 24) 伊藤三郎: 果実の科学, (朝倉書店), p. 156 (1991).
- 25) LUH, B.S. and WANG, Z.: *Advances in Food Research* **29**, 297 (1984).

(平成4年1月27日受理)