

ハヤトウリ(*Sechium edule Swartz*)中のタンパク質 分解酵素に関する研究

林 あつみ

(平成11年9月30日受理)

Studies on Protease in *Sechium edule Swartz*

Atsumi HAYASHI

(Received on September 30, 1999)

諸言

プロテアーゼは動植物界に広く分布し、古来より食品加工や医療用として製品化され利用されてきた。それぞれのプロテアーゼは、作用pH範囲、熱安定性、基質特異性などに大きな差があり、その特色に応じて幅広く用いられている。

欧米において最も急激に発展した分野に肉質軟化剤としてのプロテアーゼの利用がある。この目的には、パパイヤのパパイン[EC 3. 4. 22. 2]、イチジクのフィシン[EC 3. 4. 22. 3]、パイナップルのブロメライン[EC 3. 4. 22. 4]といった植物プロテアーゼが用いられている。さらに、近年キウイフルーツのアクチニジン[EC 3. 4. 22. 14]にも同様の食肉軟化作用のあることが報告されている¹⁾²⁾。また、トロンピン[EC 3. 4. 21. 5]は毛細管性出血の局所的止血剤として、キモトリプシン[EC 3. 4. 21. 1]は外傷に合併した炎症及び浮腫の治療に利用され、医学的にも重要な役割を果たしている。

ペプチド結合を加水分解する酵素をプロテアーゼと称するが、その基質への作用様式によりエキソペプチダーゼとエンドペプチダーゼに区別される。エキソペプチダーゼには、アミノペプチダーゼとカルボキシペプチダーゼ、ジペプチダーゼ、トリペプチダーゼなどがある。また、特殊なタンパク質に作用するプロテアーゼとして、コラゲナーゼ[EC 3. 4. 24. 3]、エラスターゼ[EC 3. 4. 21. 11]、ケラチナーゼ[EC 3. 4. 99. 11]などがある。

ハヤトウリ(*Chayote, Sechium edule Sw.*)は、熱帯アメリカ原産のウリ科の蔓性多年草で、日本には1917

年北アメリカから導入されたのが始まりである。しかし、その食用効果及び機能性に関する報告は少ない^{3)~5)}。さらに、プロテアーゼに関する詳細な報告は未だない。今回ハヤトウリ中に数種のプロテアーゼを見出したので報告する。

実験方法

1. 実験材料及び試薬

ハヤトウリは埼玉県桶川市で栽培されたものを使用した。

基質として用いた *N*α-Benzoyl-DL-Arginine-*ρ*-Nitroanilide (BAPA) はアルドリッチ社より、カゼインはメルク社より、そしてAzocoll, Fast Garnet GBCはシグマ社より購入した。

2. ハヤトウリより粗酵素液の抽出

ハヤトウリ実と同量の蒸留水を加え、電気ミキサー(東芝MX-K10GR)で粉碎し、9,000rpm、60分の遠心分離により得た上澄液を粗酵素液とした。これらの抽出操作は、氷中または4℃下で行った。

3. 酵素活性の測定

基質として、0.1Mトリス緩衝液(pH7.5)に溶解した1mM BAPA、そして0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した1%カゼイン及びアゾコールを使用した。基質溶液1mLに粗酵素液0.1mLを加え、37℃で一定時間反応の後、カゼインについては10%トリクロロ酢酸1mLを添加してタンパク質を沈殿させ、その上澄液を濾過により得、280nmの吸光度を測定した。BAPAについては30%酢酸0.3mLを加えて反応を停止させ、遊離した*ρ*-ニトロアニリンを410nmの吸光度で測定した。さらにアゾコールについては、氷中で反応を停止させ、

上清を580nmで測定した。

カゼイン及びアゾコール分解活性については、1分間に吸光度を1.0増加させるために必要な酵素量を、BAPA分解活性は、1分間に1 μ molのp-ニトロアニリンを遊離させる酵素量を1 unitとした。

4. タンパク質量の測定

Bio-Rad protein assay法により595nmで測定し、牛血清アルブミン(BSA)を標準として検量線より求めた。

5. 酵素活性に及ぼす阻害剤の影響

酵素液に10分の1量の阻害剤を加えて酵素反応を行い、残存活性を測定した。

6. ディスク電気泳動

ディスク電気泳動は、Davis⁶⁾の方法に準じて7%アクリルアミドゲルにより行った。泳動後の活性染色は、0.1Mトリス緩衝液(pH7.5)で溶解した各基質溶液にFast Garnet GBCを加え、37°C、60~120分インキュベートすることにより行った(ジアゾカップリング染色)。

結果及び考察

1. プロテアーゼ活性の測定

3種の基質を用いてハヤトウリ粗抽出液のプロテアーゼ活性を測定した(Table 1)。基質としてpH7.0のカゼイン、BAPAそしてアゾコールを用いた。いずれの基質においても分解活性が示されたが、BAPA分解活性が最も高かった。

また、アゾコール分解活性が示されたことより、ハヤトウリ中に食肉の結合組織繊維成分であるコラーゲンを分解する、すなわちパパイン、フィシン、プロメライン、

Table 1 Specific activity for several substrates on *Sechium edule* extract.

Substrate	Specific activity (U/mg protein)
Casein	0.467
BAPA	1.012
Azocoll	0.636

アクチニダインと同様の食肉軟化作用を有する酵素が存在する可能性が示唆された。

2. キウイフルーツとの比較

Table 2 Ratio of activity several substrates of *Sechium edule* and Kiwifruit.

Substrate	<i>Sechium edule</i> : Kiwifruit	
Casein	1	5
BAPA	1	1
Azocoll	1	75

ハヤトウリに含まれるプロテアーゼの各基質に対する分解活性の強さを、高いプロテアーゼ活性を有することが報告されている¹⁾キウイフルーツと比較した。ハヤトウリ中プロテアーゼ活性を1とした時のキウイフルーツの活性割合をTable 2に示した。BAPA分解活性は、キウイフルーツと同程度に高く、アゾコール分解活性についてはキウイフルーツの1/75と低いことが示された。

3. 阻害剤による影響

Table 3にハヤトウリ中の各種プロテアーゼ活性の阻害剤による影響を示した。カゼイン分解活性は、Leu-peptinのみで強く阻害された。BAPA分解活性は、TLCK, Leupeptin, Antipainで阻害されたことより、チオールタイプのBAPA分解酵素と推定された。ハヤトウリ中のBAPA分解酵素における阻害剤に対する性質については、四十九院ら⁷⁾が報告した黒緑豆中のBAPAaseと類似していた。また、アゾコール分解活性は、EDTAで阻害されたことより、メタルプロテアーゼであることが確認された。

4. アミノペプチダーゼの電気泳動

果物や野菜の味などは、アミノペプチダーゼによって生成するアミノ酸によっても影響されると考えられるので、ディスク電気泳動により活性バンドの検出を試みた。基質として種々のアミノ酸の β -ナフチルアミド誘導体を用い、ジアゾカップリング染色により酵素のバンドを検出した(Fig. 1)。その結果、アルギニン- β -ナフチルアミドの他にアラニン、ロイシン、フェニルアラニンの

Table 3 Effect of inhibitors.

	Concentration	Remaining activity (%)		
		Casein	BAPA	Azocoll
PMSF	1mM	100	100	75
TPCK	1mM	100	74	-
TLCK	1mM	94	18	50
Leupeptin	0.1mM	38	22	42
Antipain	0.1mM	96	20	100
Pepstatin	0.1mM	88	100	-
Chymostatin	0.1mM	100	100	-
Phosphotamidon	0.1mM	100	100	-
Monoiodoacetate	1mM	100	100	32
Dithiothreitol	1mM	89	100	100
PCMB	1mM	88	100	-
EDTA	20mM	100	100	7
STI	2mg/ml	89	100	-

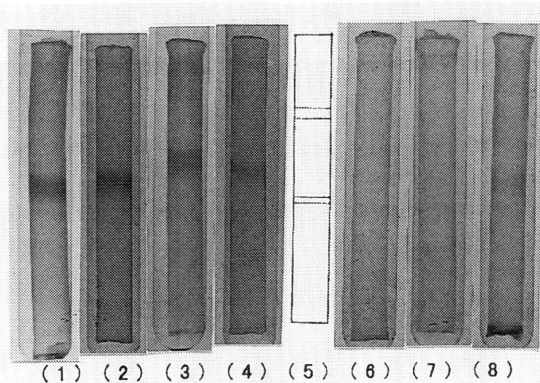


Fig. 1 Disk electrophoresis by various substrates.

- (1) L-Arg- β NA as substrate.
- (2) DL-Ala- β NA as substrate.
- (3) HCl-L-Leu β NA.
- (4) L-Phe- β NA as substrate.
- (5) L-Pro- ρ NA as substrate.
- (6) L-Asp- β NA as substrate.
- (7) L-Glu- β NA as substrate.
- (8) N α -Bz-DL-Arg β NA as substrate.

各々ナフチルアミド誘導体の結合を分解する酵素の活性バンドが検出された。ロイシン、フェニルアラニン、アラニン、アルギニンの順で陰極からの移動度が低く、そのうちアラニンとフェニルアラニンのナフチルアミド誘導体の結合を分解する酵素の活性バンドは、極めて近い位置に検出されたことより、同一の酵素が作用している可能性が考えられた。また、基質としてBz-アルギニンのナフチルアミド誘導体を用いてみたが、アルギニンのナフチルアミド誘導体で検出されたバンドと移動度が異なっていた。さらに、プロリンについてはプロリン- ρ -ニトロアニリドによる発色により、2本の活性バンドが確認されたが、プロリン- β -ナフチルアミドによる発色では検出されなかった。このことについての原因は不明である。さらに、アスパラギン酸、グルタミン酸の各々ナフチルアミド誘導体の結合を分解する酵素の活性バンドは検出されなかったことより、酸性アミノ酸に特異性を示す酵素の存在は確認されなかった。これらのことよ

り、ハヤトウリ果実抽出液中に数種のアミノペプチダーゼが存在することが確認された。

今後は精製を行い、各プロテアーゼの酵素的性質を明らかにする予定である。

要 約

1. ハヤトウリ果実中に異なる数種のプロテアーゼが存在することが確認された。
2. そのうち、BAPA分解酵素がキウイフルーツと同程度に高いことが示された。
3. 電気泳動後の活性染色により、アミノペプチダーゼの存在を確認したところ、アラニン、フェニルアラニン、アルギニン、ロイシンの各アミノペプチダーゼ、そしてプロリンイミノペプチダーゼの活性が検出された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導いただきました木元幸一教授に深謝いたします。また、実験にご協力いただいた本研究室卒論生飯島吉野、小野早苗の両氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 曾田功, 金子美穂, 佐藤隆英, 中川弘毅, 小倉長雄 :
日食工誌, **34**, 36-41 (1987)
- 2) 鮫島邦彦, 崔一信, 石下真人, 早川忠昭 : 日食工誌,
38, 817-821 (1991)
- 3) T.Uchikoba, K.Amakatsu, M. Kaneda :
Rep. Fac. Sci., Kagoshima Univ., **23**, 139-145
(1990)
- 4) K. S. Rao, Dominic, K. Singh, C. Kaluwin,
D. E. Rivett, G. P. Jones : *J. Agric. Food chem.*,
38, 2137-2139 (1990)
- 5) M. M. Vozari-Hampe, C. Vigas, C. Saucedo,
S. Rosseto, G. G. Manica, O. G. Hampe :
Phytochemistry, **31**, 1477-1480 (1992)
- 6) B. J. Davis : *Am. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404
(1964)
- 7) 四十院成子, 福場博保 : 栄食誌, **40**, 129 - 135
(1987)