

キーウィフルーツ・プロテアーゼの分離・精製

（新しいイオン交換充填剤 Bakerbond WP-PEI による分離）

大槻 耕三・三宅 智恵子・佐藤 健司・河端 信

Separation and Purification of Kiwifruit Protease — Purification with Bakerbond WP-PEI

KOZO OHTSUKI, CHIEKO MIYAKE, KENJI SATO and MAKOTO KAWABATA

Kiwifruit protease (EC 3. 4. 22. 14) was purified with conventional DEAE-cellulose and Octyl-Sepharose, a packing material of hydrophobic chromatography. With these methods, a rapid purification or concentration of the enzyme was obtained. The partially purified protease was further purified and successfully separated on the column of Bakerbond WP-PEI with a linear-gradient elution of 0-0.75 M NaCl into two enzymes, A₁ and A₂, which were named by McDowall (Biochim. Biophys. Acta, 293, 226 (1973)). Kiwifruit proteases A₁ and A₂ were purified to 90% and 93% homogeneity of mol.wt. as checked by TSK G2000SW XL gel-chromatography.

(Received August 10, 1993)

I. 緒 言

キーウィフルーツ (chinese gooseberry, *Actinidia chinensis*) は中国原産の果物でニュージーランドで品種改良され、現在では世界各地で栽培されている。

キーウィフルーツにはタンパク質加水分解酵素が多く含まれていて、この酵素についての研究報告が数多く出されている。^{1)~3)} 我々は、キーウィフルーツの成分分析について2報^{4,5)}、「食肉に対する柔軟化および加水分解作用」について1報⁶⁾、報告したが、今回は、キーウィフルーツプロテアーゼの分離、精製について新しい方法および結果を得たので報告する。

キーウィフルーツ・プロテアーゼ (EC 3.4.22.14) は、代表的なチオールプロテアーゼのパパイン⁷⁾と同様に植物起源のタンパク質加水分解酵素である。¹⁾ このキーウィフルーツ・プロテアーゼ中に2種⁸⁾のものが存在し、A₁とA₂に分離したとされているが¹⁾²⁾、詳

細な報告や図説が少ない。本研究では、新しいイオン交換樹脂や新しい方法により迅速にA₁とA₂を分離したので、その詳細な結果を述べる。

II. 実験材料および方法

(1) 実験材料

市販のニュージーランド産 (ヘイワード種) のものを1992年4月27日および10月5日購入して使用した。

なお、1990年2月に購入し、果実の皮がついたまま冷凍保存していたものも試用したが、酵素活性が特に弱まっているとは認められなかった。

(2) 試料の調製法

キーウィフルーツ・プロテアーゼの抽出および前処理による粗酵素の調製法は、Fig.1に示すような方法によって行った。ジュースを採取し、5mM クエン酸バッファー (1mM EDTAを含む) pH6 に透析し

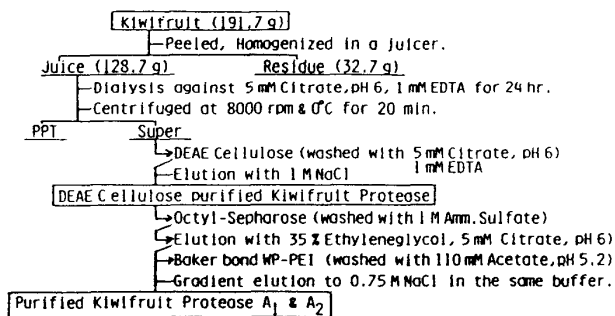


Fig.1. Extraction and Purification of Kiwifruit Protease.

DEAE セルロース吸着までは McDowall¹⁾ の方法によったが、以後は新しく改良した。すなわち、粗酵素抽出液量が多量となったので、オクチル・セファロース（ファルマシア社製）による疎水クロマトグラフィーを行った。このカラムは、1M 硫酸アンモニウム中で疎水性相互作用を酵素タンパク質との間に持ち、溶出液のイオン強度を弱めて行くと順次各種タンパク質を分離していく性質をもっている。Fig. 1において、1M 硫酸アンモニウム中で酵素タンパク質は吸着され、35%エチレングリコールを含むバッファーでステップワイズに溶出させると酵素が濃縮され、脱着された。これらは次の Fig. 2 に示す酵素活性測定により確かめた。ここで得られた粗酵素を次に Bakerbond WP-PEI (15 μ m, 1 \times 7cm) に吸着させる。このカラム充填剤は、DEAE-セルロースや DEAE-セファデックス A-25²⁾ などと同じ、アニオン交換樹脂であるが、より強い交換能力を持つものである。酢酸バッファー (0.11M, pH5.2) で平衡化しておき、これに上記粗酵素を加え、同バッファーで洗浄する。その後、同バッファーを用いて、0 \rightarrow 0.75M NaCl の直線的グラジエント溶出を行なう。

なお、プロテアーゼの自己消化を抑制するため、オクチル・セファロースから脱着した酵素に過剰のパラクロロ安息香酸水銀を加え可逆的に失活させた。

(3) 酵素活性測定法

プロテアーゼ活性は 1% カゼイン（ハマーステン、メルク社製）を用いた。

エステラーゼ活性はベンジルオキシカーボニル-L-チロシン-パラニトロフェニルエステル (Z-Tyr-ONp, ナカライテスク社) を使用し、Fig. 2 に示した方法により測定した。

(4) タンパク質濃度測定

精製プロテアーゼの蛋白質量を測定するために、各

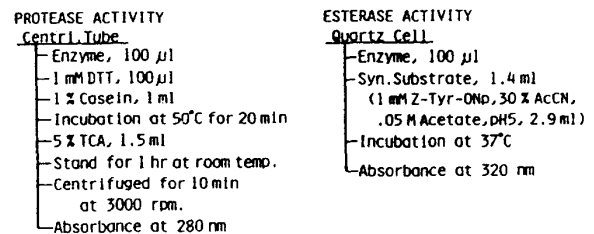


Fig.2. Enzyme Assay of Kiwifruit Protease.

試料 100 μ l に蛋白質定量用 CBB 液（バイオラッド社）を 5 倍希釈したものを 1ml 加え 5~60 分以内に 595nm での吸光度を測定した³⁾。簡便には、紫外部 280nm における吸光度を日立 100 型分光光度計で測定した。精製酵素の紫外吸光スペクトルは日立 100-50 型分光光度計で測定した。

(5) 液体クロマトグラフィー用装置

溶出液の送液にはペリスタポンプ（アトー社製）を用い、溶出タンパク質の検出には東京理化社製 HPLC 検出器 UV-9000 を使用した。

(6) ポリアクリルアミド電気泳動⁹⁾

通常のスラブポリアクリルアミド電気泳動装置（アトー社製）を用いた。酢酸とトリスで分離ゲル用バッファーの pH を pH5.0 に調整した。標準タンパク質マーカーとしてウシ血清アルブミン（シグマ社）を使用した。

(7) 高速ゲルクロマトグラフィー

精製酵素の分子量分布を試験するために、東ソ社製 TSKgelG-2000SWXL のカラムを使用した。HPLC 装置は島津 LC-6A で溶出溶媒は 150mM 炭酸アンモニウムを使用した。分子量マーカーはシグマ社製のウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、大豆トリプシンインヒビター、およびウシ肺アプロチニンを用いた。

III. 結果および考察

抽出および精製の概略について Fig. 1 に主な点をまとめた。DEAE-セルロースによる吸脱着は、ガラスフィルター (25G3) によるバッチ法で行っていて、粗酵素を吸着させる時、一部の活性が素通りして、もれて行くので、その液をもう一度上へもどし、吸着をくり返した。流速はなるべく遅く流れるように自然流下させた。1M NaCl による脱着もゆっくり行ない、粗酵素の希釈を抑えた。この溶出液に硫酸アンモニウ

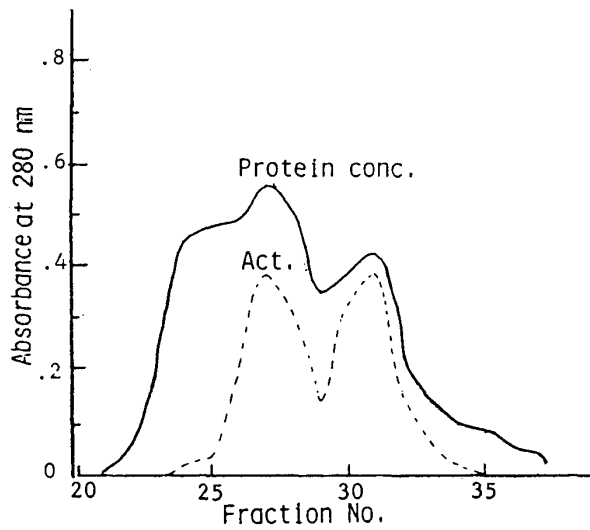


Fig. 3. Separation of Kiwifruit Protease A₁ and A₂ on Bakerbond WP-PEI Column (1×7 cm). A linear gradient elution of NaCl (0 - 0.75M) in 0.11 M Na-acetate, pH5.2.

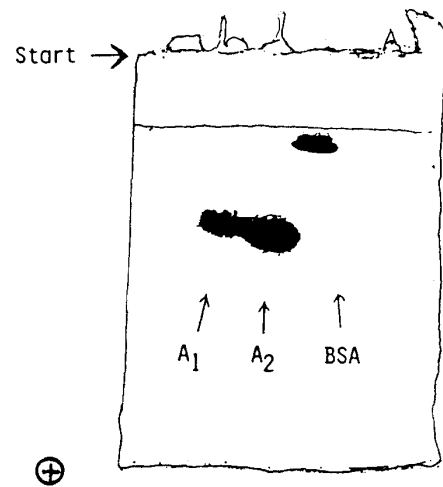


Fig. 4. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Kiwifruit Protease A₁ and A₂. PAG conc., 12.5%; 20 mM Tris-acetate buffer, pH 5.0; BSA, bovine serum albumin.

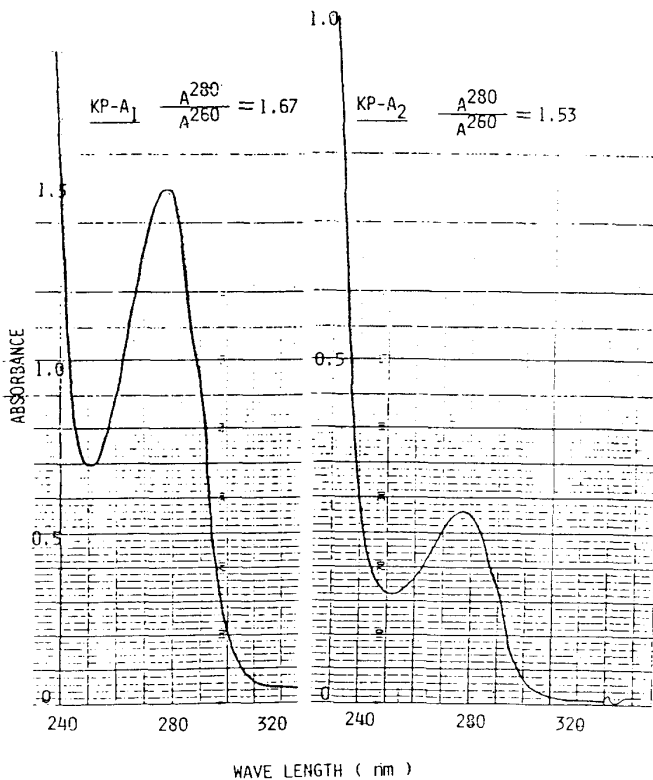
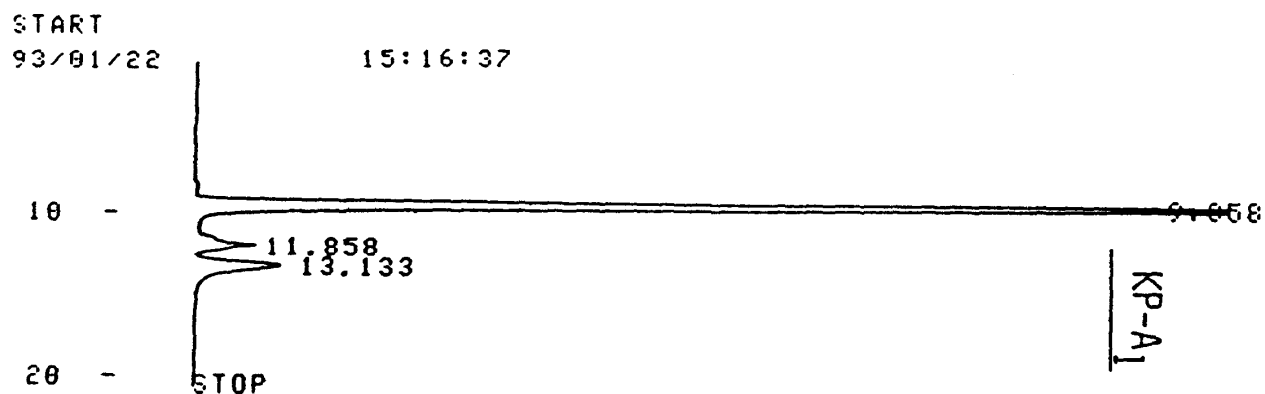


Fig. 5. Ultra Violet Absorption Spectra of Kiwi fruit Protease A₁ and A₂.

ムを加え 1M の濃度に合わせオクチル・セファローズ (2.5×10cm) のカラムへゆるやかに試料添加を行なった。同バッファー (1M 硫酸アンモニウムを含む 5mM くえん酸緩衝液, pH6) でカラムを洗浄し粗酵素以外のタンパク質を洗い流し、次に 35% エチレングリコール・くえん酸緩衝液 (pH6) でゆるやかに溶出を行なうと、酵素活性部が濃縮できて、以後のイオン交換クロマトグラフィーが容易になった。Bakerbond WP-PEI は DEAE-セルロース等に比較すると、かなり強い吸着を示したので、今回のイオン交換クロマトグラフィーでは Fig. 3 に示したように、吸着の時の緩衝液の pH は低めでかつイオン強度も比較的強い条件で行ったが、それでも、この酵素の pI が低いため、充分吸着され、NaCl 濃度グラジェントの 1M に近い時に溶出された。Fig. 3 から第 1 ピークは酵素活性のないタンパク質、第 2 ピーク、第 3 ピークは McDowall の命名した A₁, A₂ に相当する酵素が得られた。これらを pH5 で電気泳動した結果が Fig. 4 である。A₁ は Bakerbond WP-PEI から早く溶出されるから、A₂ より陽イオンを帯び、電気泳動では陽極への易動度が A₂ より小さくなり、A₂ はその逆である。対照のため BSA (pI=4.9) を同時に泳動させた。

A₁ と A₂ の紫外外部吸収スペクトルを Fig. 5 に示す。A₁ は A²⁸⁰/A²⁶⁰ の値が 1.67, A₂ は 1.53 となり、いずれも 1.5 以上の値となり¹⁹⁾ タンパク質以外の不純物の混入は少ないと考えられる。

上記 PEI のイオン交換クロマトグラフィーにより精製された A₁ および A₂ の分子量的な均一性や純度を調べるために TSKgel G2000SWXL によるゲルク

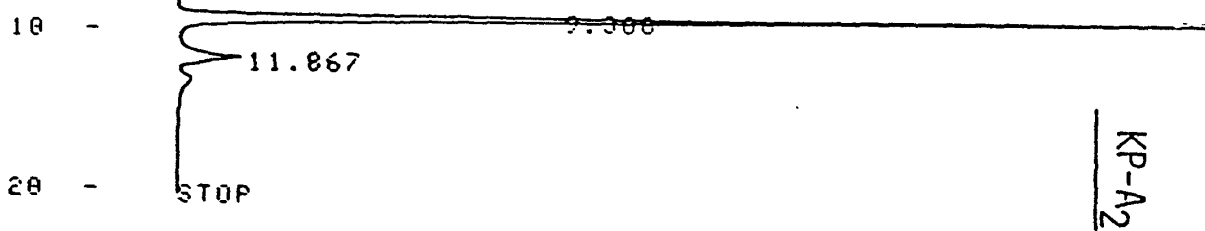


CHROMATOPAC C-R3A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1539

FILE METHOD 9 441

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	9.358	41193			90.0355	
2	11.858	1636			3.5765	
3	13.133	2923			6.228	
TOTAL		45751			100	

START
93/01/22 15:39:46



CHROMATOPAC C-R3A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1540

FILE METHOD 9 441

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	9.308	17671			92.9127	
2	11.867	1348			7.0872	
TOTAL		19019			100	

Fig.6. High Performance Gel Chromatography of Kiwifruit Protease A₁ and A₂ on TSK gel G2000SW XL. Elution, 150mM ammonium acetate, 1.0 ml/min.

IV. 要 約

キーウィフルーツ・プロテアーゼの分離・精製のため、従来から使用されてきた DEAE・セルロースとオクチル・セファロースを用い、酵素タンパク質溶液を濃縮・精製して、精製工程の迅速化を計った。

さらに新しいイオン交換樹脂の Bakerbond WP-PEI を用い、酵素の分離・精製の精密化を計った。

その結果、従来の DEAE-セルロースや DEAE-セファロースでは困難であったキーウィフルーツ・プロテアーゼの A₁ と A₂ を分離することが可能になった。また Bakerbond WP-PEI はコアが固いシリカであるので、セルロース系やセファデックス系では不可能なカラムに充填したままの再生、再使用が可能であった。この WP-PEI のカラムを使用した精製法により、キーウィフルーツ・プロテアーゼ A₁ と A₂ は分子量的にそれぞれ 90% と 93% 以上の純度が得られた。

文 献

- 1) M.A. McDowall, Eur. J. Biochem., **14**, 214 (1970)
- 2) M.A. McDowall, Biochim. Biophys. Acta, **293**, 226 (1973)
- 3) A. Carne, C.H. Moore, Biochem. J., **173**, 73 (1978)
- 4) 大槻耕三, 河端信, 田口邦子, 京府大学術報告, 理生, 第 33 号 p47 (1982)
- 5) 大槻耕三, 河端信, 田口邦子, 京府大学術報告, 理生, 第 35 号 p21 (1984)
- 6) 大槻耕三, 河端信, 伊藤記念財団, 食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol.4, p232 (1986)
- 7) A.N. Glazer, E.L. Smith, The Enzymes, Vol.3, p501 (1971)
- 8) M. Bradford, Anal. Biochem., **72**, 248 (1976)
- 9) U.K. Laemmli, Nature, **227**, 680 (1970)
- 10) 菅原潔, 副島正美, 蛋白質の定量法 (生物化学実験法) 第 2 版, p136 学会出版センター (1969)
- 11) P.T. Englund, T.P. King, L.C. Craig, A.Walti, Biochem., **7**, 163 (1968)
- 12) G.Voordouw, M.Gaucher, R.Roche, Biochem. Biophys. Res. Commun., **58**, 8 (1974)
- 13) W.J. Brockbank, K.R. Lynn, Biochim. Biophys. Acta, **578**, 13 (1979)

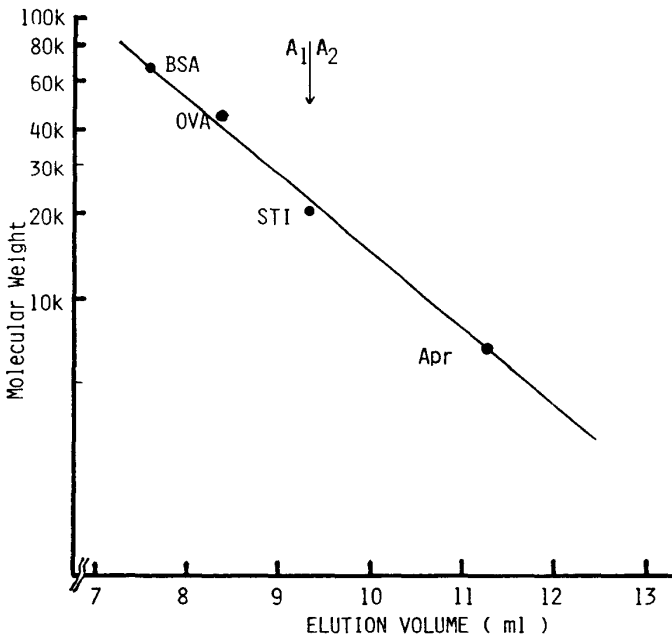


Fig.7. Molecular Weight Determination of Kiwifruit Protease A₁ and A₂ on TSK gel G2000SW XL. BSA, bovineserumalbumin; OVA, ovalbumin; STI, soybean trypsin inhibitor; Apr, bovine lung aprotinin.

ロマトグラフィーを行った。Fig. 6 にそれぞれの溶出パターンを示す。A₁ では分子量的に約 90%, A₂ では約 93% の均一性が得られていることが明らかとなった。

このゲルクロマトグラフィーの結果と、分子量マーカータンパク質の溶出位置とを分子量・溶出位置のグラフにプロットすると Fig. 7 に示すような結果を得た。Fig. 7 から、キーウィフルーツプロテアーゼ A₁ および A₂ ともほぼ同位置に溶出され、分子量が約 2 万 3 千程度の値となる。以前、McDowall はセファデックス G-50 のゲルクロマトグラフィーから分子量を約 1 万 5 千 4 百という値を得ていたが、この値は、セファデックスに対して異常な吸着が生じたためと考えられる。同様な例が数件報告¹¹⁻¹³⁾ されている。今回我々が得た分子量は、Carne³⁾ が報告している値 23,500 に大変近い値であった。