

北海道産サルナシ果実中のシステインプロテアーゼの 生化学的諸性質および生理学的機能の解析

宮崎 早花^{1,2)}・米田 実央^{3,4)}・小塚 美由記^{5,6)}
山根 拓也^{5,7)}・荒川 義人^{3,4)}・大久保 岩男^{3,8)}

Analysis of biochemical properties and physiological functions of cysteine protease
in Sarunashi fruit harvested in the Hokkaido district

Sayaka MIYAZAKI^{1,2)}, Mio YONETA^{3,4)}, Miyuki KOZUKA^{5,6)},
Takuya YAMANE^{5,7)}, Yoshihito ARAKAWA^{3,4)} and Iwao OHKUBO^{3,8)}
(Accepted 7 December 2017)

背景と目的

サルナシ（猿梨，学名：*Actinidia arguta*）は、植物学的分類上、マタタビ科マタタビ属（*Actinidia*）に分類され、雌雄異株または雌雄雑居性の蔓性落葉植物である¹⁾。マタタビ科にはクレマトクレスラ属（*Clematoclethra*）、タカサゴシラタマ属（*Saurauia*）、マタタビ属（*Actinidia*）の3属があり、種として300種以上存在するとされている²⁾。

サルナシはわが国では、北海道から九州まで全国にまたがって自生している。開花時期は地域、品種・系統によっても異なるが、5月上旬から6月中旬前後であり、果実の収穫期は9月下旬から11月上旬である³⁾。花は白色で、果皮は無毛の淡緑黄色、果肉は淡緑色で中に細かい種子を多く含み、キウイフルーツを無毛にして小型化したような形態である^{1,3)}。果実の味はキウイフルーツよりも香りが強く、かすかな酸味や強い甘みがある⁴⁾。

サルナシの語源の由来は、「サルが好んで食べる

梨のような実」という説があるように、野生動物の餌としても重要な位置にあり、ニホンザルやツキノワグマ、ヒグマ、鳥類などが大量に摂食して種子散布に貢献しているとされている^{5,6)}。また、貝原益軒著書の大和本草（西暦1708年）にも記述があり、サルナシがおおよそ300年前より食されていたことが分かる^{2,7)}。

サルナシは地域によって、コクワ、コクワヅル、シラクチカズラ、シラクチヅルと呼ばれているが、北海道では主に「コクワ」として親しまれている。また、アイヌ語では「クッチブンカル」と呼ばれ、生食の他、果実を乾燥させて腎臓病の薬としても古くから使用されていた^{8,9)}。

サルナシ果実の栄養成分の特徴は、ビタミン類が多いとされている。特にビタミンCに関しては、キウイフルーツの約2.5倍含まれている。西山らのマタタビ科の果実間のビタミンC含量を比較した研究があるが、その中でもサルナシのビタミンC含量が高いことが報告されている¹⁰⁾。また、ビタミンE

1) 天使大学大学院博士課程前期

Department of Nutrition, School of Nursing and Nutrition, the doctoral program (first semester), Tenshi College, Higashi-ku, Sapporo 065-0013, Japan

2) 酪農学園大学循環農学類

Department of Sustainable Agriculture, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

3) 天使大学栄養学科

Department of Nutrition, School of Nursing and Nutrition, Tenshi College, Higashi-ku, Sapporo 065-0013, Japan

4) 札幌保健医療大学栄養学科

Department of Health and Nutrition, Sapporo University of Health Sciences, Higashi-ku, Nakanuma, Sapporo 007-0894, Japan

5) 北海道大学薬学研究院

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan

6) 北海道文教大学健康栄養学科

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Science, Hokkaido Bunkyo University, Eniwa 061-1449, Japan

7) 大阪府立大学生物資源開発センター

Center for Research and Development Bioresources, Research Organization for University-Community Collaborations, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

8) 市立三笠総合病院小児科

Department of Pediatrics, Mikasa City Hospital, 489-1 Miyamotocho, Mikasa, Hokkaido 068-2156, Japan

はキウイフルーツの3.5倍量含まれている¹¹⁾。このことから、サルナシは豊富なビタミン源であると考えられる。

サルナシは、生食の他、果実酒、ジュース、ワイン、ジャム等の加工品として流通している¹²⁾。また、サプリメントにも使用されている。

サルナシの食品化学的機能や生理機能に関する報告は、抗アレルギー作用、抗炎症作用^{13,14)}、骨髄細胞増殖促進作用¹⁵⁾、腭リパーゼ阻害作用^{16,17)}、糖化最終産物の形成阻害作用¹⁸⁾、ポリフェノール画分による糖質消化酵素活性阻害作用⁷⁾などが明らかにされている。

一方で、サルナシ果実中のタンパク質に関する研究は殆ど報告されていない。

サルナシと同属の緑色果肉のキウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*) にはタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) である Actinidin が含まれていることが Arcus によって発見された¹⁹⁾。Actinidin はパパインスーパーファミリーに属し、パパインとアミノ酸配列に相同性があるシステインプロテアーゼ [EC 3.4.22] である^{20,21,22)}。キウイフルーツの果汁や精製 Actinidin は、タンパク質の消化促進効果も期待されているが、Actinidin によって生じる問題点として、ゼラチンゼリー形成阻害や、主要アレルギーとして食物アレルギーを引き起こす可能性や、生食時の口腔刺激性などが報告されている^{23,24)}。

サルナシ果実中にも、キウイフルーツと同様にタンパク質分解酵素の一つであるシステインプロテアーゼ [EC 3.4.22] が存在すると考えられる。本研究では、サルナシ果汁中のシステインプロテアーゼの生化学的諸性質の解析と食物中に含まれる幾つかのタンパク質に対する分解能の解析を行ったので報告する。

1. 実験材料および実験方法

1) 実験材料

試料：本実験では、2012～2015年北海道札幌市南区で生産されたサルナシを3日間室温に静置した後、冷凍保存し、用時に解凍して使用した。

マタタビ (*Actinidia polygama*) は、2012～2013年北海道東部網走地方で生産されたマタタビ果実を用いた。グリーンキウイおよびゴールドンキウイは市販品を用いた。

試薬：

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), 2-Mercaptoethanol (β -ME), Dimethyl sulfoxide

(DMSO), エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 等は和光純薬(株)の製品を用いた。SDS-PAGE 用分子量マーカー, BSA (bovine serum albumin), Coomassie G-250, Quick startTM Bradford 1x dye solution, ミニプロテイン Tertra セル, Mini-protean TGX precast gels, any kD 10-well および 12-well などは BIO-RAD 社より購入した。合成基質として用いた Z-Leu-Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCA および AMC 基質, Antipain, E-64, E-64c, Leupeptin, Z-LLLH (aldehyde), Leuhistin, CA-074 はペプチド研究所から購入した。

ゼラチンは和光純薬工業(株), α -カゼインおよび γ -カゼインは MP Biomedicals, LLC, β -カゼインは和光純薬工業(株)より購入し、スキムミルクは雪印メグミルク(株), 明治ブルガリアヨーグルトは(株)明治より購入した。また、Transferrin および Lactoferrin は、それぞれヒト血漿およびヒト精漿より大久保らにより精製されたものを用いた (未発表)。

その他の試薬としては全て特級品を用いた。

2) 実験方法

① サルナシの処理と酵素溶液の調製

サルナシの処理と酵素溶液の調製は以下のように行った (図1)。

② Bradford 法を用いたタンパク質量測定

試料中のタンパク質の定量には Bradford 法^{25,26)}を用いた。

標準タンパク質として、6種類の濃度 (0.125 mg/ml～1.5 mg/ml) の BSA (bovine serum albumin) を用い、標準曲線を作製した。この6種類の溶液をそれぞれ 20 μ l とり、エッペンドルフチューブに入れ、ついで Coomassie G-250 を含む Quick startTM Bradford 1x dye solution を 1 ml 加え、

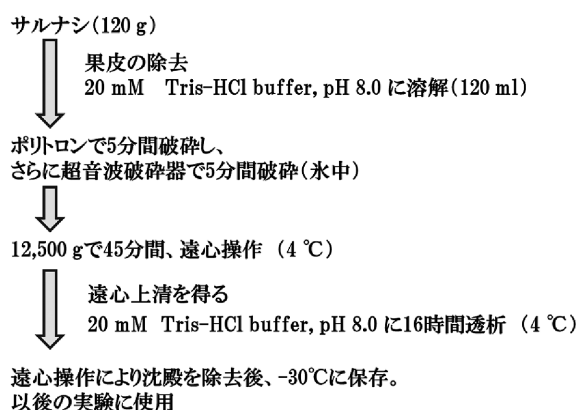


図1 酵素溶液の調製

vortex で攪拌し、5 分間室温に静置した。ついで、それらの吸光度は分光光度計（日立 U-1500）を用い、吸光度波長 595 nm で測定した。ブランクとして、超純水または 20 mM リン酸緩衝液、pH 6.0 を用いた。

サルナシ、マタタビ、グリーンキウイおよびゴールデンキウイ果汁中のタンパク質量の測定は、各試料 20 μ l に、1 ml の Quick start™ Bradford 1x dye solution を加え、5 分間室温に静置した後、上記のように吸光度を測定し、その吸光度を上記標準曲線に当てはめ、算出した。

③ 酵素活性測定法

基本的な酵素反応系は、本酵素溶液（10～20 μ l）、0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0（100 μ l）、 β -ME（10 μ l）、超純水（860～840 μ l）の順に混合し、酵素反応は基質 10 mM（10 μ l）を加えることより開始し、全量を 1 ml とした。37℃で 30 分のインキュベート後、0.2 M 酢酸 2 ml を加えることにより酵素反応を停止した。酵素活性の測定は、遊離した AMC の相対的蛍光ユニット（RFU）を測定することにより行った（励起光（Ex）360 nm：蛍光（Em）460 nm）（表 1）。測定機器としては、Versa Fluor Fluorometer（BIO-RAD 社製、米国カリフォルニア州）を用いた。

④ 標準曲線の作成

酵素活性測定系の AMC 基質の量を徐々に増やし、相対的蛍光ユニット（RFU）の測定を行った。AMC 基質 10 μ l（100 nmoles に相当）を用いたときの強度を 10,000 に設定した。従って、サルナシ果実由来の溶液を用いた酵素活性の測定で RFU が 5,000 と表示されれば、その酵素反応系で 50 nmoles の AMC が遊離されたことを意味する（図

2-A, B）。

⑤ 基質特異性の決定

12 種類の合成基質（Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCA, Z-Leu-Arg-MCA, Z-Gly-Pro-Arg-MCA, Z-Val-Val-Arg-MCA, Z-Arg-Arg-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA, Boc-Val-Pro-Arg-MCA, Suc-Ala-Ala-Ala-MCA, Pro-Phe-Arg-MCA, Boc-Gln-Arg-MCA, Ala-Ala-Phe-MCA）を用い、表 1 に示した方法で、酵素活性の測定を行った。

⑥ 還元剤 β -ME による酵素の活性化

基質として Z-Leu-Arg-MCA を用い、酵素反応系に β -ME（最終濃度 10 mM）加えることにより、酵素活性が増強するか否かを調べた。

⑦ 最適 pH の決定および pH 安定性の決定

酵素反応系に用いる緩衝液の pH が酵素活性に及ぼす影響を調べた。

最適（至適）pH 決定には、GTA 緩衝液（pH 3.5～10）、クエン酸緩衝液（pH 3.0～6.0）、およびリン酸緩衝液（pH 6.0～8.0）を用い、各々の pH における酵素活性を調べた。

pH 安定性には、GTA 緩衝液（pH 3.5～10.0）を用いた。酵素溶液 20 μ l に 5 μ l の 0.5 M GTA 緩衝液（最終濃度 100 mM）を加え、4℃に 24 時間静置した後、酵素活性の測定に用いた。

尚、GTA 緩衝液の組成と作成法は下記のとおりである。

・ 3,3-dimethyl glutaric acid	16 g
・ tris (hydroxymethyl) aminomethane	12.1 g
・ 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol	10.5 g

蒸留水 1l 中に上記の 3 試薬を溶解させ、GTA 緩衝液とした。各 pH（3.5～12.0）への補正は、0.5 M HCl または 0.5 M NaOH を用いて行った。

⑧ 酵素反応時間依存性

酵素量を一定として酵素測定系のインキュベーションの時間を 0～60 分に変化させることにより行った。

⑨ 最適温度の決定および温度安定性の決定

最適（至適）温度は、酵素反応系のインキュベーションの温度を 4～60℃に変えることにより決定した。

表 1 酵素反応系の組成および反応系

1	酵素溶液 Enzyme Solution	10～20 μ l (diluted 5～10 fold)
2	緩衝液 Buffer (0.5 M Sodium phosphate buffer, pH 7.0)	100 μ l (final conc. 50 mM)
3	還元剤 β -ME (2-ME)	10 μ l (final conc. 10 mM)
4	超純水 dH ₂ O	860～840 μ l
5	基質 Substrate (10 mM)	10 μ l (final conc. 100 μ M → 100 nmoles)
6	→ incubate for 15～20 min at 37℃	
7	→ terminate the reaction by adding 2 ml of 0.2 M acetate (CH ₃ COOH)	
8	→ determine the fluorescence at Ex 360 nm and Em 460 nm	

温度安定性は、酵素反応系のインキュベーションの温度 4~60℃に変え、各々の温度に 10 分間静置した上で、酵素活性の測定を行い決定した。

⑩ ソディウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

Laemmli 法²⁷⁾で行った。泳動装置は、ミニプロテイン Tertra セル (BIO-RAD 社)、電気泳動用ゲルは、Mini-protean TGX precast gels, any kD 12-well (BIO-RAD 社)、泳動電源は、Power Pac Basic (BIO-RAD 社)を用い、200 V で約 30 分間の電気泳動を行った。泳動後のゲルは、Bio-Safe Coomassie G-250 stain を用いて 60 分間染色し、その後、蒸留水による脱色を一晩行った。

⑪ 各種酵素阻害剤による本酵素活性に及ぼす影響

本酵素がシステインプロテアーゼであるかを調べるために、種々の酵素に対する 10 種類の阻害剤 (EDTA, AEBSF, Antipain, E-64, E-64c, Leupeptin, Z-LLLH (aldehyde), Leuhistin, CA-074 および Pepstatin A) を用いた。

⑫ 本酵素溶液によるゼラチン、カゼイン、スキムミルクなどの分解能の解析

ゼラチン、カゼイン、スキムミルクなど種々のタンパク質に対し、重量比で 12~70 分の 1 になるように本酵素溶液を添加し、37℃、1 時間反応させた後、ただちに電気泳動用色素を 3~4 μ l 添加し、95℃、5 分間熱処理をして酵素失活させた。次いで、Laemmli 法²⁷⁾による SDS-PAGE を行った。またゲル板は Mini-PROTEIN TGX Precast Gel (Any kD, BIO-RAD 社製)を用いた。電気泳動後のゲル板上のタンパク質は、Bio-Safe Coomassie G-250 (BIO-RAD 社製)を用いて染色した。

2. 実験結果

1) 標準曲線の作成

① 標準曲線の作成において、直線性が得られた (図 2-A, B)。図にも示したが、RFU 値が 10,000 であれば、100 nmoles、5,000 であれば 50 nmoles の AMC が遊離されたことを意味する。

② Bradford 法による標準曲線

タンパク質濃度の測定の為に用いた Bradford 法による標準曲線を示した (図 3)。若し、595 nm での測定値が 1.0 である場合、その試料中には 0.45 mg/ml のタンパク質が含まれることを意味する。

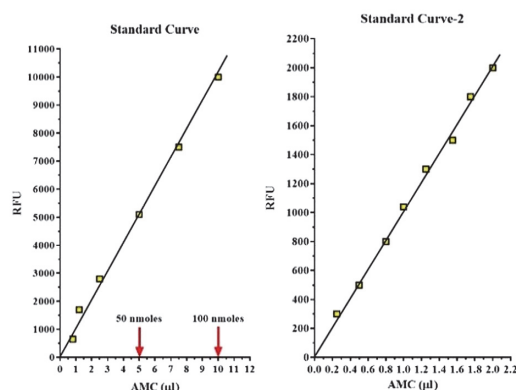


図 2-A 標準曲線
(RFU 0~10,000)

図 2-B 標準曲線
(RFU 0~2,000)

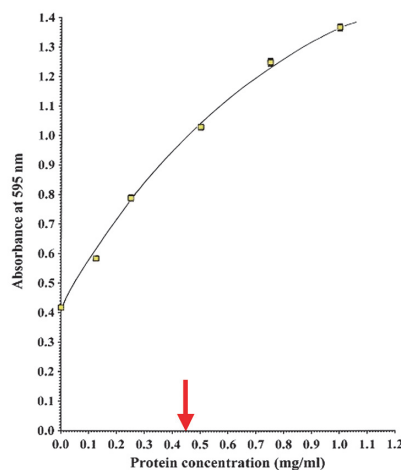


図 3 Bradford 法による標準曲線 (mean \pm SEM, n = 10)

2) 酵素反応時間依存性

酵素反応の量的依存性を、本酵素を希釈せずに行うと使用酵素溶液量が 5 μ l 以下において蛍光測定範囲の上限を超えてしまうため、酵素溶液を 5 倍希釈した後、酵素反応時間経過による本酵素の活性を調べた。その後、20 分まで直線性が得られた (図 4)。以後は、原則として酵素溶液を 5~10 倍希釈し、反応時間を 15~20 分間として、本研究に使用した。

3) 基質特異性の決定

種々の合成基質を用いて基質特異性を調べた (図 5)。本実験では、5 倍希釈したサルナシ果汁 5 μ l (0.42 μ g) を用い、反応時間を 10 分間で行った。図に示したように、サルナシ果汁中の酵素は、Z-Leu-Arg-MCA > Boc-Val-Leu-Lys-MCA > Z-Val-Val-Arg-MCA > Z-Phe-Arg-MCA > Pro-Phe-Arg-MCA の順に加水分解能を発揮した。また、Z-Gly-Pro-Arg-MCA や Z-Arg-Arg-MCA などその他の合成基質に

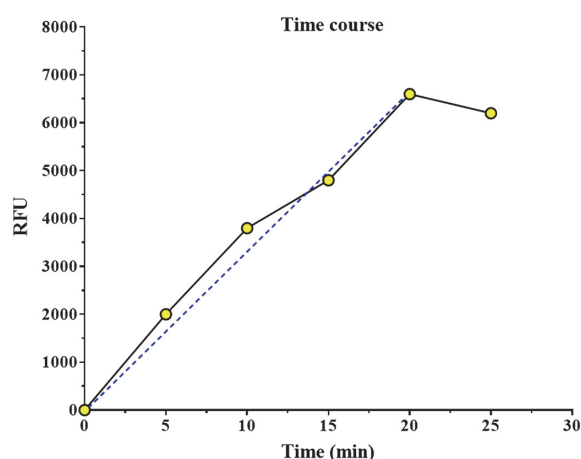


図4 反応時間と酵素活性

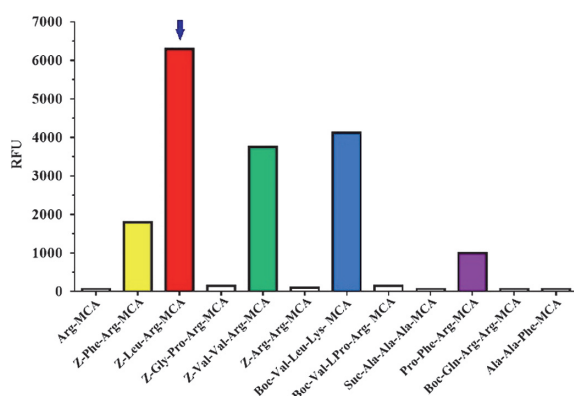


図5 基質特異性

対しては極々弱い活性を示した。以後の実験では基質として Z-Leu-Arg-MCA を使用した。

4) 還元剤 β -ME による酵素の活性化

サルナシ由来の酵素活性に及ぼす β -ME の効果を、基質として Z-Arg-Arg-MC を用いて調べた。果実の果皮を除去後、フードプロセッサーを用いて粉碎し、10,000 g で 30 分間遠心分離し、上清を得た。この上清について β -ME が存在しない場合とする場合で酵素活性がどのように変化するかを分析した。試料 5~10 μ l の範囲で行った酵素活性は非常に低かった (50 RFU 以下) が、 β -ME (最終濃度 10 mM) を反応系に加えることにより、図 6 に示したように 180~200 倍まで活性化した。この結果は、サルナシ果汁中において本酵素は活性を発現しない状態で存在すると考えられた。また、 β -ME のような還元剤で酵素が活性化されるとシステインプロテアーゼとしているが、本酵素もその範疇に入ると推定された²⁸⁾。

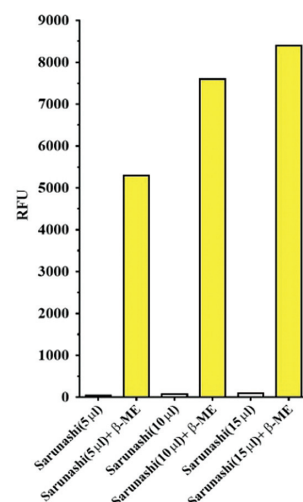
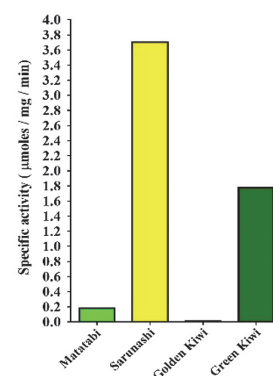
図6 還元剤 β -ME による酵素の活性化

図7 サルナシ、グリーンキウイ、ゴールデンキウイおよびマタタビ果汁中のシステインプロテアーゼ活性の比較

5) サルナシ、グリーンキウイ、ゴールデンキウイおよびマタタビ果汁由来のシステインプロテアーゼの活性比較

サルナシ、グリーンキウイ、ゴールデンキウイおよびマタタビ果実 (各々~20 g) に、ほぼ等量の 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 を加えた後、フードプロセッサーを用いて粉碎し、さらに 10,000 g で 30 分間遠心し、各上清を得た。これらの上清中のシステインプロテアーゼ活性を 10 mM β -ME の存在下で測定し、比較した (図 7)。その結果、マタタビの酵素活性 (0.18 μ moles/mg/min) を 1 とすると、グリーンキウイはマタタビの約 8 倍、サルナシはグリーンキウイの約 2.1 倍、マタタビの約 18.5 倍の比活性を示した。サルナシ、グリーンキウイおよびマタタビ果実中のシステインプロテアーゼの中で、サルナシ由来の酵素が最も比活性が強かった。なお、ゴールデンキウイ由来の酵素はサルナシの酵素

の約 400 分の 1 以下, キウイ約 200 分の 1 以下の活性しか存在しなかった。

6) 最適 pH の決定および pH 安定性の決定

本酵素の最適 pH を, 5 倍希釈したサルナシ果汁 $5\ \mu\text{l}$ ($0.2\ \mu\text{g}$) を用い, GTA 緩衝液 (pH 3.5~9.5), クエン酸緩衝液 (pH 3.0~6.0) およびリン酸緩衝液 (pH 6.0~8.0) を用いて, 最適 pH を求めたところ pH 6.5~7.0 に最適 pH が存在することが明らか

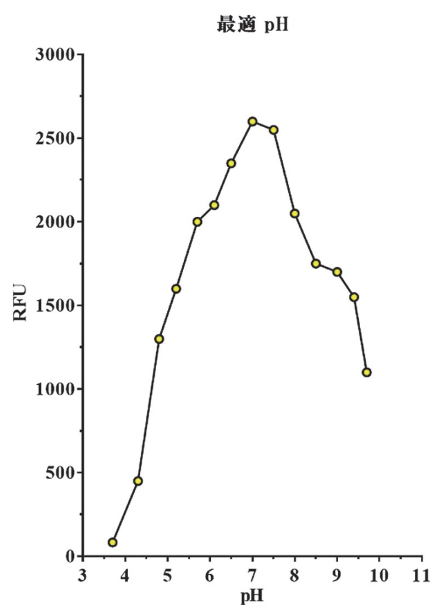


図 8-A 最適 pH

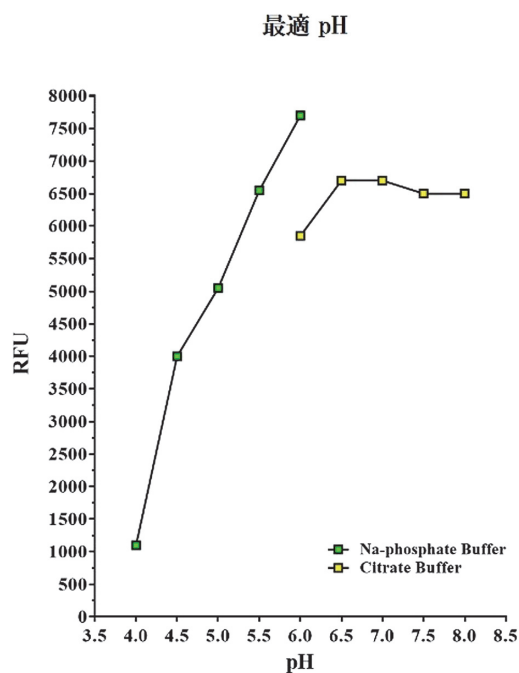


図 8-B クエン酸緩衝液 (pH 3.0~6.0) およびリン酸緩衝液 (pH 6.0~8.0) 使用による最適 pH の決定

となった (図 8-A)。これらの結果を基に, 酵素活性測定には最終濃度 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いることとした。

pH 安定性の解析において, GTA 緩衝液 (pH 3.0~10.0) を使用し, 5 倍希釈した本酵素溶液 $10\ \mu\text{l}$ ($0.84\ \mu\text{g}$) に, 0.5 M GTA 緩衝液を加え, 最終濃度が 75 mM となるようにし, $4\ ^\circ\text{C}$ に 24 時間静置した後, 活性測定を行ったところ pH 5.5~9.0 の広い範囲の pH に安定性を示した (図 8-C)。

7) 最適温度の決定および温度安定性の決定

5 倍希釈したサルナシ果汁 $5\ \mu\text{l}$ ($0.42\ \mu\text{g}$) を用い, 温度変化による酵素活性の変化を測定した結果を図 8-D に示した。本酵素の最適温度は, $45\sim 50\ ^\circ\text{C}$ にあった。しかし, 生体内で本酵素が働く場合のことを考慮して以後の実験の諸実験には $37\ ^\circ\text{C}$ を用いた。

温度安定性による活性を測定した結果を図 8-E に示した。本酵素は, $55\ ^\circ\text{C}$ まではほぼ安定であるが,

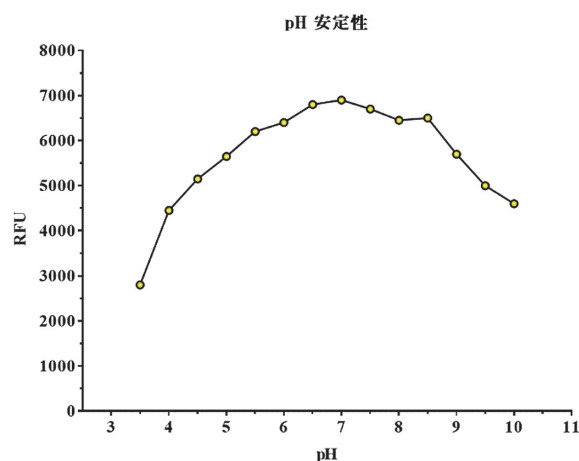


図 8-C GTA 緩衝液 (pH 3.5~10.0) を用いた時の pH 安定性の決定

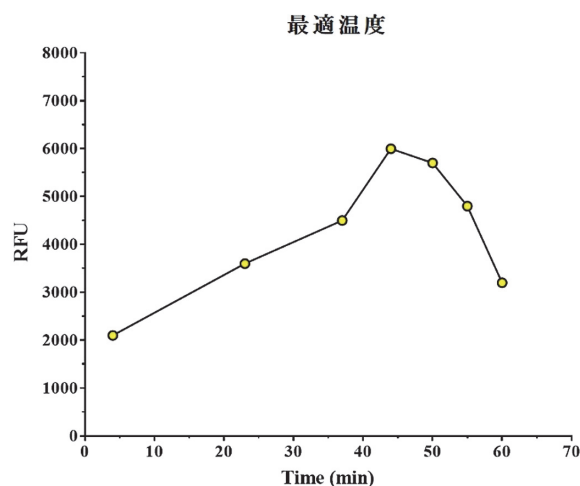


図 8-D 最適温度

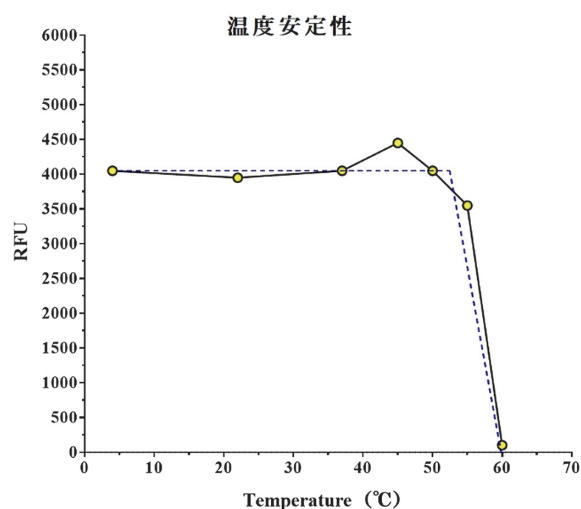


図 8-E 温度安定性

60℃を超えると熱変性により失活した。

8) 各種酵素阻害剤の本酵素活性に及ぼす影響

5倍希釈したサルナシ果汁 5 μ l (0.42 μ g) を用い、本酵素活性に各種阻害剤が影響を及ぼすのか否か解析した (図 9)。

本酵素活性は、システインプロテアーゼの阻害剤である Antipain, E-64, E-64c, Leupeptin, Z-LLL-H により強く阻害された (95%以上)。しかし、セリンプロテアーゼの阻害剤である AEBSF や金属プロテアーゼの阻害剤である EDTA, さらに酸性プロテアーゼ (アスパラギン酸プロテアーゼ) の阻害剤である Pepstatin A はほとんど阻害活性を示さなかった。これらの結果 (図 9) および還元剤により強く活性化されることから (図 6), 本酵素がシステインプロテアーゼであることが強く示唆された。そこで、本研究では本酵素をサルナシシステインプロテアーゼ (以後 SCP と略) と名付けた。

9) SCP による各種タンパク質の分解

① ゼラチン

ゼラチン (10 μ g) に SCP 溶液 2 μ l (0.84 μ g) を添加し、37℃に1時間反応させた後、電気泳動用色素を加え、95℃、5分間熱処理した後、SDS-PAGEを行った (図 10)。ゼラチンのみでは、分子量約 300,000 に濃いバンドおよび分子量 125,000~37,000 にスメア状の薄いバンドが認められた。ゼラチンに SCP を添加し、1時間反応後の SDS-PAGE 上では、SCP と考えられる分子量 26,000 にバンドが見られたのみであった。この結果は、SCP がゼラチンを容易に分解する機能を有していること

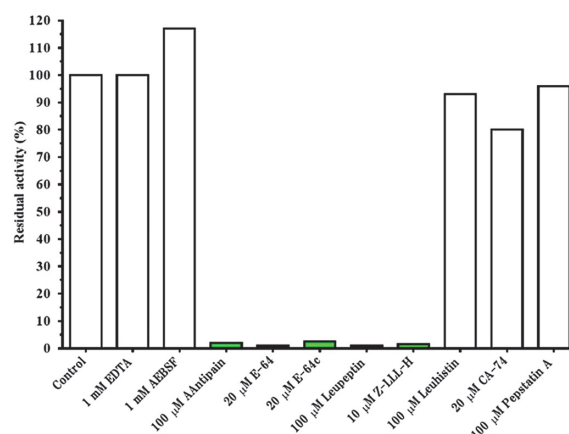
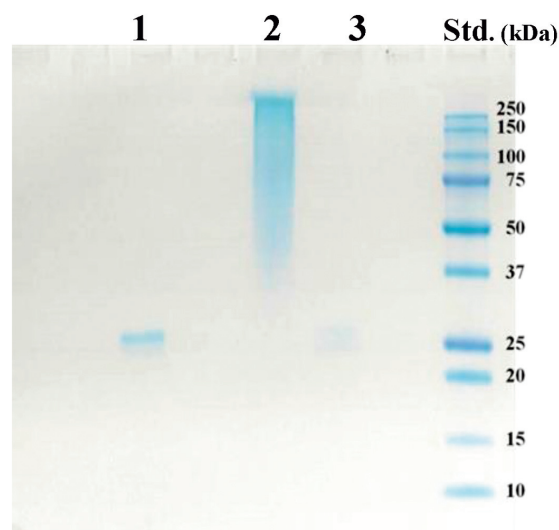


図 9 種々の酵素阻害剤による酵素活性阻害



1. SCP 2 μ l (0.84 μ g)
2. ゼラチン 10 μ g
3. ゼラチン 10 μ g + SCP 2 μ l (0.84 μ g)

図 10 SCP によるゼラチンの分解

が判明した。

② 精製 Transferrin および精製 Lactferrin (以下、Tf および Lf) の分解

精製 Tf 10 μ g および Lf 10 μ g に SCP 溶液 2 μ l (0.84 μ g) を添加し、37℃に1時間反応させた。反応後、電気泳動用色素を加え、95℃、5分間熱処理した後、SDS-PAGEを行った (図 11)。Tf のみでは、分子量約 70,000 にバンドが認められた。Tf に SCP 溶液を添加し、1時間反応後の SDS-PAGE 上では、分子量 80,000 および 70,000, 60,000, および 20,000, 16,000, 10,000 のバンドが新たに認められ、分解されたことが示された。また、Lf のみでは、分子量 72,000 と 75,000 附近にバンドが認められた。

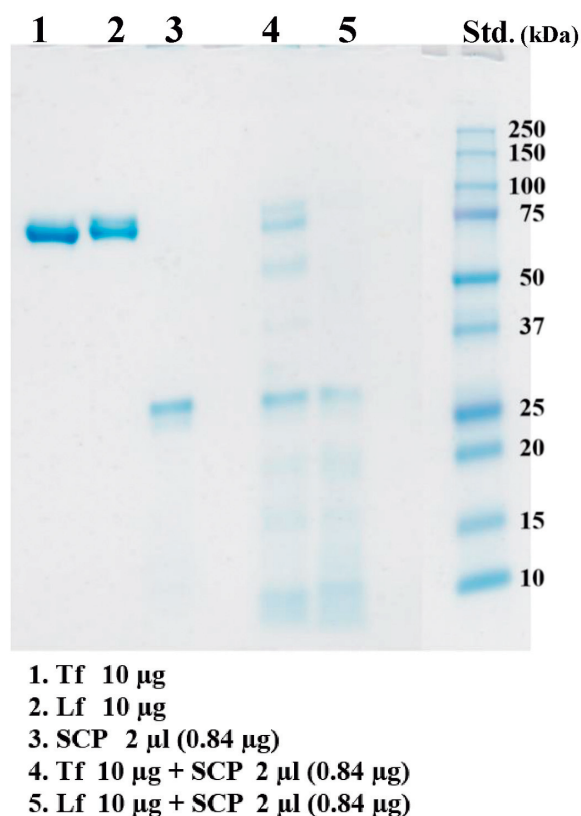


図 11 SCP による精製 Transferrin および精製 Lactferrin (以下、Tf および Lf) の分解

Lf に SCP 溶液を添加し、1 時間反応後の SDS-PAGE 上では、Tf の場合と同じように、20,000、16,000 および 10,000 のバンドが新たに認められ、Tf と比較して分解されやすいことが判明した。

③ カゼイン

各種カゼイン (α , β , γ : 各カゼイン 20 μg) に SCP 溶液 1 μl (0.42 μg) を添加し、37℃ に 1 時間反応させた後、SDS-PAGE を行った。 α -カゼインのみでは、分子量 30,000~25,000 の主バンドが見られたが、SCP 溶液を添加し、1 時間反応後の SDS-PAGE 上では、14,000~5,000 にバンドがみられた。 β -カゼインのみでは、分子量 30,000~25,000 の主バンドが見られたが、SCP を添加し、1 時間反応後の SDS-PAGE 上では、分子量 15,000~5,000 以下に、 α -カゼインの場合と同様に多数のバンドが見られた。 γ -カゼインのみでは、分子量 30,000~25,000 の主バンドが認められた。 γ -カゼインに SCP 溶液を添加し、1 時間反応後の SDS-PAGE 上では、分子量 10,000~5,000 以下にスミア状のバンドが認められた。この結果は、SCP が各種カゼインを強く分解する機能を有していることを示唆していた。

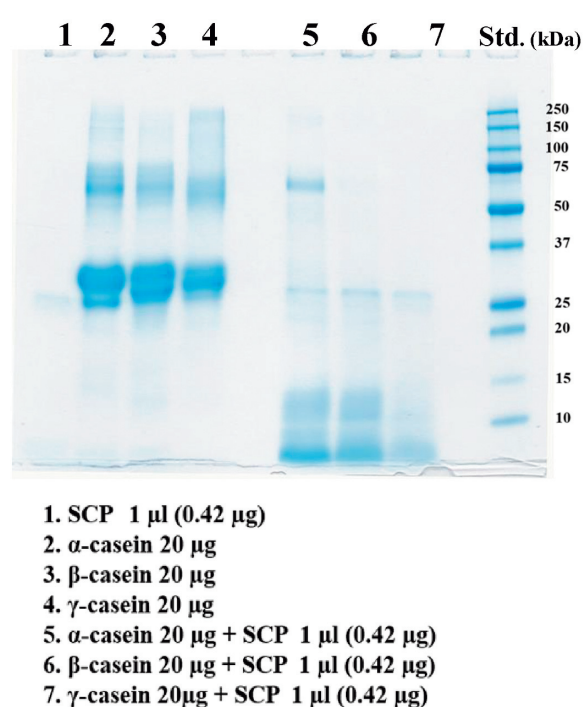


図 12 SCP によるカゼインの分解

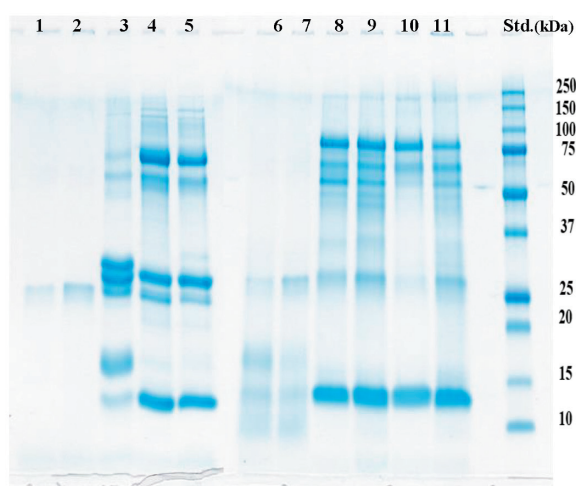
なお、分子量 26,000 附近のバンドは SCP 由来と考えられる (図 12)。

④ スkimミルクおよびヒト母乳タンパク質

Transferrin (Tf) や Lactferrin (Lf) および α , β , γ -カゼインが SCP により分解されることから、スキムミルクやヒト母乳中に含まれているこれらのタンパク質が実際に分解されるのか否かを分析した (図 13)。

SDS-PAGE 上のレーン 1 および 2 にそれぞれ SCP 溶液 1 μl (0.42 μg), 2 μl (0.84 μg) を添加した。レーン 3 にはスキムミルク、レーン 4 には初乳、レーン 5 には成乳が添加されている。

スキムミルク 3 μl (24 μg) にレーン 6 および 7 に SCP 溶液を 1 μl (0.42 μg), 2 μl (0.84 μg) それぞれ添加し、0.5 M リン酸緩衝液 pH 7.0 を 0.45 μl または 0.5 μl 添加したもの、初乳 1 μl (29 μg) に SCP 溶液をレーン 8 および 9 に 1 μl (0.42 μg), 2 μl (0.84 μg) それぞれ添加し、0.5 M リン酸緩衝液 pH 7.0 を 0.23 μl , または 0.34 μl 添加したものを、成乳 1 μl (27 μg) に SCP 溶液をレーン 10 および 11 に 1 μl (0.42 μg), 2 μl (0.84 μg) それぞれ添加し、0.5 M リン酸緩衝液 pH 7.0 を 0.23 μl または 0.34 μl 添加したものを、37℃, 1 時間静置した後、直ちに電気泳動用の色素 4 μl を添加し、95℃, 5 分間熱処理をして酵素を失活させた。次いで、Laemmli 法に



- 1: SCP 1 μ l (0.42 μ g)
 2: SCP 2 μ l (0.84 μ g)
 3: Skim milk 3 μ l (24 μ g)
 4: Colostrum 1 μ l (29 μ g)
 5: Mature milk 1 μ l (27 μ g)
 6: Skim milk 3 μ l + SCP 1 μ l
 7: Skim milk 3 μ l + SCP 2 μ l
 8: Colostrum 1 μ l + SCP 1 μ l
 9: Colostrum 1 μ l + SCP 2 μ l
 10: Mature milk 1 μ l + SCP 1 μ l
 11: Mature milk 1 μ l + SCP 2 μ l

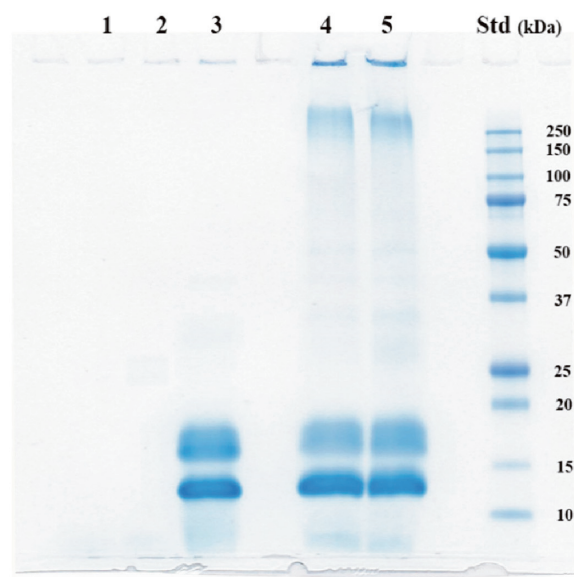
図 13 SCP によるスキムミルクおよびヒト母乳タンパク質の分解

よる SDS-PAGE を行った。

対照としてのスキムミルク 3 μ l (24 μ g) では分子量 75,000, 60,000, 30,000, 28,000, 25,000, 13,000 にバンドが見られた。スキムミルクに SCP 溶液を 1 μ l, 2 μ l, それぞれ添加すると、いずれも 18,000 と 14,000 に薄いバンドが認められた。したがって、スキムミルクのうち、カゼインが SCP によって強く分解されることが判明した。

しかし、分子量 16,500 と 13,000 のバンドはそれぞれ β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンの分子量に相当することから、いわゆるホエータンパク質のうち α -ラクトアルブミンは分解されないと推定された。

初乳 1 μ l (29 μ g) では、分子量は 75,000, 60,000, 50,000, 28,000, 25,000, 14,000 にバンドが見られた。初乳に SCP 溶液を 1 μ l, 2 μ l, それぞれ添加し、反応後の SDS-PAGE 上には、分子量 75,000, 60,000, 50,000, 28,000, 25,000, 14,000 にバンドが認められた。成乳 1 μ l (27 μ g) では、分子量 75,000, 60,000, 50,000, 28,000, 25,000, 14,000 にバンドが見られた。成乳に SCP 溶液を 1 μ l, 2 μ l, それぞれ添加すると、分子量は 75,000, 60,000, 50,000, 28,000, 14,000 にバンドが認められた。この結果から、スキムミルクおよび母乳（初乳・成乳）



- 1: SCP 0.5 μ l (0.21 μ g)
 2: SCP 1.0 μ l (0.42 μ g)
 3: Whey 11.9 μ l (10 μ g)
 4: Whey 11.9 μ l + SCP 0.5 μ l
 5: Whey 11.9 μ l + SCP 1.0 μ l

図 14 SCP によるホエータンパク質の分解

のカゼインは SCP によって分解されることが判明した。

⑤ ホエータンパク質

SDS-PAGE 上のレーン 1 および 2 にそれぞれ SCP 溶液 0.5 μ l (0.21 μ g), SCP 溶液 1 μ l (0.42 μ g) 添加した。レーン 3 にはホエータンパク質のみ添加した。ホエータンパク質は市販のヨーグルトの浸出液を遠心操作して得た。

ホエータンパク質、11.9 μ l (10 μ g) は、分子量 14,000, 19,000 にバンドが見られた (図 14)。

ホエータンパク質に、SCP 溶液 0.5 μ l (0.21 μ g), 1.0 μ l (0.42 μ g) をそれぞれ添加し、1 時間、37°C に反応後の SDS-PAGE では分子量 16,500 および 13,000 にバンドが見られた。従って、SCP はホエータンパク質である β -ラクトグロブリンの一部は分解するものの、 α -ラクトアルブミンを殆ど分解しないことが判明した。また、分子量 300,000 附近に認められるバンドは、ホエータンパク質の凝集体と推測された。

3. 考 察

食品には、第一次機能（栄養特性）、第二次機能（嗜好特性）、第三次機能（生体調節特性）がある²⁹⁾。本研究では、サルナシの北海道産食材としての第三次機能を解明することにより、ヒトの健康保持に寄与

する食材としての可能性を探ることを目的とした。

サルナシの一次機能成分については、先行研究が幾つかあり、サルナシと同属のキウイフルーツ、ゴールドエンキウフルーツ、マタタビと比較したところ、サルナシはタンパク質、脂質、炭水化物の含有量が多く、したがってエネルギー量も最も大きく、またビタミン C も豊富に含まれると報告されている^{7,30)}。

サルナシに於けるタンパク質含量は 100 g 当たり 1.5 g であったが、その中にキウイフルーツに含まれている Actinidin 様のタンパク質分解酵素（システインプロテアーゼ）が存在するのか、存在すればその生化学的諸性質を明らかにすべく本研究を進めた。

システインプロテアーゼはウイルス、細菌から哺乳類に至るまで広く分布しているタンパク質分解酵素であり、活性の発現に活性中心が還元状態になる必要がある²⁸⁾。

図 6 に示したようにサルナシ果汁の合成基質（Z-Leu-Arg-MCA）に対する活性はほぼ認められなかったが、還元剤である β -ME を添加すると 200 倍近く酵素の活性化が起こり、サルナシ果汁中にシステインプロテアーゼの存在を認めることになり、本研究では本酵素を、サルナシシステインプロテアーゼ（SCP）と名付けた。

SCP の基質特異性の決定では、Z-Leu-Arg-MCA が最も良い基質であった（図 5）。サルナシと同科のキウイフルーツにはシステインプロテアーゼである Actinidin が含まれていることから、サルナシのプロテアーゼはシステインプロテアーゼである可能性が高いと考え、以後の実験で基質として使用した。各種酵素阻害剤の本酵素活性に及ぼす影響を解析したところ、本酵素活性は Antipain, E-64, E-64c, Leupeptin, Z-LLL-H により 95% 以上阻害された。しかし、セリンプロテアーゼの阻害剤である AEBSF や金属プロテアーゼの阻害剤である EDTA、さらには酸性プロテアーゼの阻害剤である Pepstatin A はほとんど阻害活性を示さなかった。この結果は、SCP がシステインプロテアーゼであることをさらに強く示唆した。

SCP の生理機能を検証する目的で、ヒトを含む種々の生体内物質であるトランスフェリン（Transferrin, Tf）およびラクトフェリン（Lactoferrin, Lf）、また我々が日常的に食している食肉、牛乳、卵などに含まれるタンパク質が如何に分解されるのかを、ゼラチン、カゼイン（ α , β , γ ）ホエータンパク質、スキムミルクおよび母乳を

例に検証した。

Tf および Lf にサルナシ果汁を添加し、37℃、1 時間の反応後 SDS-PAGE を行った（図 11）。Lf および Tf は限定分解的に分解されていたが、やや Lf の方が分解されやすい様に考えられた。Tf および Lf はその 1 分子上に 2 原子の鉄イオンを含むことが知られており^{31,32)}、この実験の結果は SCP が食物として摂取された鉄供与体としての Tf や Lf から鉄を遊離させる役割を担っており、それらの分子中の鉄の摂取が鉄欠乏性貧血の防止に役立っていることが考えられた。

ゼラチンに SCP 溶液を添加し、37℃に 1 時間反応後の SDS-PAGE を行った（図 10）。

ゼラチンのみでは、分子量約 300,000 に濃いバンドおよび分子量 125,000~37,000 にスミア状の薄いバンドが認められるのに対し、ゼラチンに本酵素を添加し、1 時間反応後の SDS-PAGE 上では、SCP と考えられる分子量 25,000~26,000 にバンドのみが見られた。この結果は、SCP がゼラチンを容易に分解する機能を有していることが判明した。ゼラチンはコラーゲン由来のタンパク質であるが、その分子中にはグリシン（Gly）残基が多く含まれる。SCP がゼラチンを強く分解したことは、SCP の基質特異性として P1 サイトに Gly が存在すれば、Gly 残基と次のアミノ酸残基（P1' サイト）の間のペプチド結合を切断することを意味している³⁴⁾。さらに Kunii ら³⁴⁾ は、Actinidin によるタイプ I コラーゲンの切断部位の研究において、P1 サイトに Gly 以外のアミノ酸（Ala, Phe, Glu, Asn, His, Val, Tyr および Gln）が存在しても切断することを報告している。従って、Actinidin や SCP は Arg や Lys に対してのみ基質特異性を示すのではなく、その他 8 種類のアミノ酸に対しても基質特異性を発揮すると理解される。ゼラチンの凝固作用を利用した菓子等への利用には、キウイ果汁の場合と同様にサルナシ果汁がゼラチンを分解してしまうため、サルナシ果汁を前もって加熱等の処理が必要であることが再確認された。

各種精製カゼイン（ α , β , γ ）に SCP 溶液を添加し、SDS-PAGE を行った。精製カゼインのみでは、分子量 30,000~25,000 の主バンドが見られたが、SCP を添加し、反応後 1 時間反応後の SDS-PAGE 上では、主バンドは殆ど認められなかった。この結果は、SCP が各種カゼインを強く分解する機能を有し、カゼインの分子構造が壊されカルシウムが遊離し、小腸で吸収されることを容易にすることを示唆していた³⁵⁾。さらに、SCP がゼラチンの場合

表2 SCPによる各種タンパク質の分解

各種たんぱく質の種類		分解程度
ゼラチン		+++
精製 Tf		++
精製 Lf		+++
カゼイン	$\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	+++
スキムミルク	カゼイン $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$	+++
	β -ラクトグロブリン	+++
	α -ラクトアルブミン	—
母乳	カゼイン (26 kDa, 24 kDa)	+++
	α -ラクトアルブミン	—
	Lf	±
ホエータンパク質	β -ラクトグロブリン	±
	α -ラクトアルブミン	—

+ ~ +++ : 軽度~強度の分解, — : 分解なし ± : 僅かに分

と同様に強く精製カゼインやスキムミルクおよび母乳中のカゼインを強く分解したことは、タイプIコラーゲンに対する Actinidin の作用と同じように考えてよいと思われた。

一方で、ホエータンパク質中では分子量 16,500 の β -ラクトグロブリンおよび、13,000 の α -ラクトアルブミンが含まれるが、ホエータンパク質にそれぞれ添加した場合、いずれの場合も分子量 16,500 と 13,000 の両バンドが見られ、SCP はホエータンパク質を分解し難いことが分かった。また、スキムミルクやヒト母乳中（初乳および成乳）に含まれているこれらのタンパク質が実際に分解されるのか否かを分析したところ、ホエータンパク質以外はいずれも本酵素によって分解されることが分かった。従って、SCP が分解するスキムミルクおよび母乳中のタンパク質はカゼインが主であることが考えられる。なお、ホエータンパク質である β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミン、特に α -ラクトアルブミンが、SCP により分解されなかったが、両タンパク質とも Arg や Lys を 9.4~9.1% 含有しており^{36,37)}、カゼインとは大きな含有量に差が認められなかった。しかし、カゼインが分解され、ホエータンパク質が分解されなかったことは、両ホエータンパク質の立体構造が SCP の分解作用を阻害している可能性が高いと推定された。表2に、SCP による上記各種タンパク質の分解状況をまとめて示した。

近年、キウイを食した時に起こる口腔アレルギー症候群を含むアレルギーが注目されている。このアレルギーの原因となる抗原タンパク質はキウイ果実中の Actinidin であると指摘されている^{38,39)}。サルナシ果実中の SCP も Actinidin 同様抗原タンパク質となる可能性がある。

現時点で、サルナシに対するアレルギーはさほど

注目されていないが、摂食に際しては、アレルギーに対する注意が必要であることが強く示唆された。

Actinidin には、Kaur^{40,41)} らや Montoya^{42,43)} らによって、タンパク質の消化促進効果があることが既に検証されている。また、Rush⁴⁴⁾ らはキウイフルーツ果実（ヘイワード種）を3週間継続して食べることで高齢者の排便の回数や量が増加し、腸の動きが改善されることを報告している。また、慢性的な便秘症の患者や過敏性腸症候群の患者でもキウイフルーツの摂取によって排便が促され腸の機能が改善することが示されている⁴⁵⁾。極近縁種であるサルナシも同様に食物繊維を多く含むことから、その効果を期待できる可能性が高い。また、サルナシの SCP 活性はキウイフルーツの Actinidin よりも比活性で約2倍高いため（図7）、少ない酵素量でタンパク質の消化促進効果が得られる可能性が高い。

このようなタンパク質分解酵素特性を活かした、アミノ酸摂取の効率を向上させる経腸栄養剤作製への応用、さらには消化機能の低下がみられる低胃酸症や萎縮性胃炎の患者および高齢者に対して、SCP の摂食タンパク質分解の補助作用は有益であると考えられる。

参考文献

- 1) 荒瀬輝夫, 内田泰三. 長野県中南部に自生するサルナシ (*Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. Ex Miq.) の果実形態と収量の系統間差異. 信州大学農学部 AFC 報告. **7**: 1-19, 2009.
- 2) 社団法人日本果樹種苗協会: 特産果樹. 145-155, 2006.
- 3) 荒澤直樹, 高橋和博, 駒林和夫. サルナシの自生系統の諸特性. 東北農業研究 **54**: 163-164, 2001.
- 4) 西山一朗. ベビーキウイ (サルナシ) 果実の特性. 日本家政学会誌 **61**: 501-504, 2010.
- 5) 鳥居春己. 大井川上流域におけるツキノワグマの食性. 日本林学会誌 **71**: 417-420, 1989.
- 6) 北海道におけるエゾライチョウの食性. 山階鳥類研究所研究報告 **34**: 73-79, 2002-2003.
- 7) 倉兼静江. サルナシの抗生活習慣病食品素材・成分としての開発と作用機構. 岩手大学大学院学位論文, 2011.
- 8) 宇治原清吉. 山の珍果サルナシづくり, 寒冷地域の林業技術, 寒冷地林業試験場刊. **24**: 4-5, 1997.
- 9) 福岡イト子. アイヌ植物誌, 草風館, 1-244,

- 1995.
- 10) Nishiyama I, Yamashita Y, Yamanaka M, Shimohashi A, Fukuda T, Oota T. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other actinidia species. *J Agric Food Chem.* **52**: 5472-5475, 2004.
 - 11) Nishiyama I, Fukuda T, Oota T. Genotypic differences in chlorophyll, lutein, and α -carotene contents in the fruits of actinidia Species. *J Agric Food Chem.* **53**: 6403-6407, 2005.
 - 12) 遠藤直子, 鈴木東子. サルナシの搾汁と飲料加工. *東北農業研究* **56**: 265-266, 2003.
 - 13) Kim D, Kim S H, Park E J, Kang C Y, Cho SH, Kim S. Anti-allergic effects of PG102, a water-soluble extract prepared from *Actinidia arguta*, in a murine ovalbumin-induced asthma model. *Clin Exp Allergy.* **39**: 280-289, 2009.
 - 14) Park EJ, Kim B, Eo H, Park K, Kim Y, Lee HJ, Son M, Chang YS, Cho SH, Kim S, Jin M. Control of IgE and selective T(H)1 and T(H)2 cytokines by PG102 isolated from *actinidia arguta*. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **116**: 1151-1157, 2005.
 - 15) Takano F, Tanaka T, Tsukamoto E, Yahagi, N, Fushiya S. Isolation of (+)-catechin and (-)-epicatechin from *Actinidia arguta* as bone marrow cell proliferation promoting compounds. *Planta Med.* **69**: 321-326, 2003.
 - 16) Kim J, Jang DS, Kim H, Kim JS. Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta*. *Arch Pharm Res.* **32**: 983-987, 2009.
 - 17) Jang DS, Lee GY, Kim J, Lee YM, Kim JM, Kim YS, Kim JS. A new pancreatic lipase inhibitor isolated from the roots of *Actinidia arguta*. *Arch Pharm Res.* **31**: 666-670, 2008.
 - 18) Jang DS, Lee GY, Lee YM, Kim YS, Sun H, Kim DH, Kim JS. (2009). Flavan-3-ols having a gamma-lactam from the roots of *Actinidia arguta* inhibit the formation of advanced glycation end products in vitro. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* **57**: 397-400.
 - 19) Arcus AC. Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochim Biophys. Acta.* **33**: 242-244, 1959.
 - 20) Carne, A., Moore CH. The amino acid sequence of the tryptic peptides from Actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. *Biochem.J.* **173**: 73-83, 1978.
 - 21) MEROPS The Peptidase Database (<http://merops.sanger.ac.uk/>)
 - 22) BRENDA The Comprehensive Enzyme information system. (<http://www.brenda-enzymes.org/>)
 - 23) 渡邊一礼. 口腔アレルギー様症状発現におけるキウイフルーツアクチニジン特異抗体及び唾液中 S-type cystatin の関与について. 酪農学園大学大学院酪農学研究科, 学位論文, 2012.
 - 24) 西山一朗. キウイフルーツ果汁のアクチニジン濃度およびプロテアーゼ活性の品種間差. *日本食品科学工学会誌* **49**: 401-408, 2002.
 - 25) Bio-Rad 社マニュファクチャラーズガイド (Bio-Rad 社 使用説明書)
 - 26) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 246-254, 1976.
 - 27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
 - 28) 鈴木紘一. システインプロテアーゼ. 早石 修監修, プロテアーゼとそのインヒビター——生理的意義および病態との関連——. 東京, Medical View 社, 40-47, 1993.
 - 29) 知地英征, 荒川義人, 池添 彦, 葛西隆則, 鮫島邦彦, 中河原俊治, 藤島利夫, 前田利恭. 食べ物と健康 I. 三共出版, 150, 2005.
 - 30) 和田実央. マタタビの機能性に関する研究, 天使大学院看護栄養学研究科栄養管理学専攻, 修士論文, 2013.
 - 31) 島崎敬一. ミルクのラクトフェリン, 日本乳業技術協会. *乳業技術* **51**: 1-21, 2001.
 - 32) 山内恒治: ラクトフェリン, *日本食品科学工学会誌* **53**: 193, 2006.
 - 33) Wally J, Buchann SK. A structural comparison of serum transferrin and lactoferrin. *Biomaterials.* **20**: 249-262, 2007.
 - 34) Kunii S, Morimoto K, Nagai K, Saito T, Sato K, Tonomura B. Actidain-hydrolyzed type I collagen reveals a crucial amino acid sequence in fibril formation. *J Biol Chem.* **285**: 17465-17470, 2010.
 - 35) 小野伴忠. 乳タンパク質におけるカルシウム動態とその応用. *Milk Science.* **54**: 53-62, 2005.

- 36) Dao P, Jain S, Nayak S, Apparao KBC, Totey SM, Garg LC. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding beta-lactoglobulin in *Bubalus bubalis*. *DNA Seg.* **10**: 105-108, 1999.
- 37) Findlay JBC, Brero K. The complete amino-acid sequence of human alpha-lactalbumin, *Eur J Biochem.* **27**: 65-86, 1972.
- 38) Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, Ispano M, Incorvaia C, Giuffrida MG, Ortolani C. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol.* **101**: 531-537, 1998.
- 39) Lucas JS, Nieuwenhuize NJ, Atkinson RG, MacRae EA, Cochrane SA, Warner, JO, Hourihane JO. Kiwifruit allergy: actinidin is not a major allergen in the United Kingdom, *Clin and Exp Allergy.* **37**: 1340-1348, 2007.
- 40) Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an in vitro gastric digestion model, *J Agric Food Chem.* **58**: 5068-5073, 2010.
- 41) Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an in vitro digestion model. *J Agric Food Chem.* **58**: 5074-5080, 2010.
- 42) Montoya CA, Hindmarsh JP, Gonzalez L, Boland MJ, Moughan PJ, Rutherford SM. Dietary actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) increases gastric digestion and the gastric emptying rate of several dietary proteins in growing rats. *J Nutr.* **144**: 440-446, 2014.
- 43) Montoya CA, Rutherford SM, Olson TD, Purba AS, Drummond LN, Boland J, Moughan PJ. Actinidin from kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) increases gastric digestion and the gastric emptying rate of meat proteins in the growing pig. *Br J Nutr.* **111**: 957-967, 2014.
- 44) Rush EC, Patel M, Plank LD, Ferguson LR. Kiwifruit promotes laxation in the elderly. *Asia Pac. J Clin Nutr.* **11**: 164-168, 2002.
- 45) 西山一朗. キウイフルーツの消化促進効果に関する研究動向 — アクチニジンの役割 —. 栄養学雑誌 **72**: 12-20, 2014.

Abstract

Objective: Sarunashi (*Actinidia arguta*) is an edible small fruit producing perennial vine belonging to the *Actinidia* genus in the *Actinidiaceae* family. Although the fruit is expected to have health benefits as a functional food, little is known about functional proteins in the fruit. Kiwi fruit is well known to contain a cysteine protease (actinidin). In this study, the biochemical properties and physiological functions of cysteine protease in sarunashi fruit were determined.

Methods and Results: Frozen samples of fruit that had been harvested in 2012~2015 in the vicinity of Sapporo City and ripened for 3 days at room temperature were used in this study. Sarunashi fruit enzyme solution obtained by homogenization, dialysis and centrifugation was used for biochemical characterizations. Enzyme activity was measured by fluorometrical determination using Z-Leu-Arg-MCA as a specific substrate. This enzyme was activated to 200-fold by adding β -ME, and the activity was strongly inhibited by E-64, E-64c, antipain and leupeptin. These data strongly indicated that the enzyme is a cysteine protease. The enzyme was tentatively designated as sarunashi cysteine protease (SCP). The proteolytic degradation of biological materials such as transferrin (Tf) and lactoferrin (Lf) and that of proteins contained in meat, cow and human milk were determined. Tf and Lf were moderately degraded by SCP, and gelatin and caseins (α -, β - and γ -) were strongly degraded by SCP.

Conclusion: SCP was biochemically confirmed to be a cysteine protease. The enzyme degraded several proteins. The possibility of sarunashi produced in Hokkaido contributing the maintenance and improvement of health was also discussed.

