
総 説

小麦のプロテアーゼインヒビターについて

光 永 俊 郎

Protease Inhibitors in Wheat

Toshio Mitsunaga

1. はじめに

小麦はイネ科に属する一年生草本で、気候と土質に対する適応性が大きく、温帯から亜熱帯に至るまでの広い地域に生育できることと、他の穀類にないグルテンとよばれる特殊なタンパク質を含み、いろいろな形態の加工食品をつくることにより、世界に広く栽培されている。食物としては小麦の穀粒を利用するが、この穀粒は胚乳が数層からなる外皮で包まれていて、この外皮は穀粒の約13.5%を占め、製粉した場合、ふすま(麩)になる部分である。この外皮の内部に胚乳部があり、穀粒の約84%を占め、小麦粉になる主要部分である。このほか、穀粒の先端には胚芽があり、2.5%程度を占めている。

わが国では年間560万トンの小麦が消費されている。そのうち小麦粉として460万トンが生産され、そのほとんどがパン、めん類、菓子類などの二次加工食品の原料として、一部はそのままの形で調理材料として市販されている。副産物の胚芽、麩は食料、飼料材料として利用されている。小麦は約10%のタンパク質を含み、植物タンパク質源として重要な食品材料であるが、小麦中にはトリプシンなどの哺乳動物のタンパク質消化酵素の働きを阻害する物質(プロテアーゼインヒビター)の存在することが知られている。このインヒビターはそれ自身がタンパク質であるが、このタンパク質はわれわれがタンパク性食品を摂取した際に毒性を示し、消化、吸収をさまたげる天然毒である。

現在このプロテアーゼインヒビターと呼ばれているタンパク質は種々の動、植物の組織中に含まれている
京都女子大学食物学科食品学第4研究室(食品化学)

ことが知られており、食品学、栄養学はじめ農学、生化学、医学など多くの分野の研究者の関心を集めている。このうち植物性食品材料のプロテアーゼインヒビターに関する研究は、生大豆が動物の成長を阻むことが発見¹⁾されて以来、生大豆中の栄養価を低下させる原因物質が追求されたことに端を発している。そして1946年に Kunitz²⁾ が大豆よりトリプシンインヒビターを単離して以後、大豆を中心にしてプロテアーゼインヒビターに関する研究は著しい進展がみられた。しかし小麦のプロテアーゼインヒビターについての研究は大豆に比較して極めて少ない。この一原因として両者に含まれているプロテアーゼインヒビターの量の差が挙げられる。大豆は多量のプロテアーゼインヒビターを含んでいるが、小麦ではその1/10にもみたない。しかし食品学の立場において大豆とともに重要な植物性タンパク質源である小麦のプロテアーゼインヒビターを無視するわけにはいかない。そこで小麦粉はじめ種々の小麦製品中にプロテアーゼインヒビターがどのように分布、存在しているか、どのような性質を示すのか、調理・加工時にどのように挙動するのか、またなぜ小麦に存在するのか、といった点を明らかにすることは、家政学だけでなく、生化学、食品製造学の立場においても興味ある課題であると考え、この10年間筆者は小麦のプロテアーゼインヒビターについて検討してきた。筆者が得た結果を中心として、この総説をまとめた。

2. 小麦穀粒のプロテアーゼインヒビターの種類と分布

先に述べたごとく、小麦穀粒は粉碎されて胚乳(小

麦粉), 胚芽, 麩にわけられ, それぞれ食料, 飼料として利用されている。これら小麦の各部位におけるプロテアーゼインヒビターの存在については, Hites ら³⁾が1951年に, 胚乳, 麩にパパイン, フィシンに対して阻害作用をする物質の存在することを報告しており, さらに1960年に Learmonth⁴⁾ が小麦粉中にトリプシンインヒビターが, また1962年に Creek⁵⁾ が胚芽中にトリプシンインヒビターが存在することを示した。しかし1974年にはプロテアーゼインヒビターの分布について系統的な研究は行なわれていなかったのので, われわれはまず小麦穀粒部位——胚乳, 胚芽, 麩——についてその存在, 分布を調べた⁶⁾。

まず小麦各部位粉末に海砂を加えて磨砕した後, 0.1M 食塩溶液を加えて, 可溶性成分を抽出した。その抽出液についてトリプシン, キモトリプシンおよびペプシンの3種類のプロテアーゼに対する阻害活性の有無を調べた。その結果は表1に示すように, 小麦の胚乳, 胚芽, 麩のいずれの部位にも, この3つの酵素に対する阻害活性のあることがわかった。とくに興味あることは, 胚乳はキモトリプシンに対して, 胚芽はトリプシンに, 麩はペプシンに対して強い阻害活性を示したことである。

これらのインヒビターのうち, 各部位のトリプシンインヒビターを調製用ゲル電気泳動法で分画し, SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって, それぞれのインヒビターの分子量を推定した。その結果, 胚乳には少なくとも3種類, 胚芽には4種類, 麩には2種類のトリプシンインヒビターの存在が認められ, 分子量は10,000~56,000の範囲に分布していた。これらのトリプシンインヒビターのうち胚乳の2種類, 胚芽の3種類, 麩の1種類はキモトリプシンに対しても阻害活性を示した。なおペプシンインヒビターはゲル電気泳動によって同定することは不可能であった。これについて, さらに検討した結果, ペプシンインヒビターはタンパク質でなくフィチン酸塩であることがわかった。

3. 種々のプロテアーゼインヒビターの単離およびそれらの性質について

3.1. 胚乳部のトリプシンインヒビター

1960年に Learmonth⁴⁾ は小麦粉抽出液中にトリプシンに対して阻害を示す成分の存在することを示した。1964年に Shyamala ら⁷⁾が小麦粉よりトリプシンインヒビター活性成分を抽出, 塩析, CM-セルローズカラムによるクロマトグラフィーにより分画した。この画分は熱に対して不安定であると報告している。さらに1974年に Petracci ら⁸⁾は小麦粉に0.15M 食塩溶液を加えて可溶性タンパク質を抽出し, 塩析, 透析後, セファデックス G-100 カラムによるゲル濾過を行ない5つのタンパク質画分を得た。そのうち分子量24,000と12,500と推定される画分にトリプシンインヒビターがあることを認めた。1981年には Chang ら⁹⁾が小麦粉抽出液をアフィニティクロマトグラフィーにより分画し, 分子量12,000から38,500の活性画分の存在を示している。また1981年には Boisen ら¹⁰⁾は0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液を用いて小麦粉よりトリプシンインヒビター活性成分を抽出し, DEAE-セファデックス, SP-セファデックスカラムを用いてイオン交換クロマトグラフィー, さらにゲル濾過により分子量12,300と12,500のトリプシンインヒビターを単離した。これらのインヒビターはpH 2.0で, ペプシンに対して安定であり, 100°C に加熱しても失活しなかったと報告している。

これに対して筆者ら¹¹⁾は0.1M 食塩溶液により胚乳部よりトリプシンインヒビター活性画分を抽出し, 熱処理, 塩析, 透析, CM-セファデックスカラムによるイオン交換クロマトグラフィーにより図1に示すように4種類の活性成分(F-I, II, III, IV)を得た。F-IVが主画分で, F-III, II, Iの順に活性が弱くなり, とくにF-Iは微量活性成分であった。次にF-IV, IIIおよびIIについてそれぞれ精製を行った。

まず画分F-IVはセファデックス G-75 カラムによるゲル濾過, SP-セファデックス C-25 カラムによるイオン交換クロマトグラフィー, さらに図2に示すご

表1 小麦穀粒各部位のプロテアーゼ・インヒビターの分布⁶⁾

	Trypsin-inhibitory activity (IU/ml)	α -Chymotrypsin-inhibitory activity (IU/ml)	Pepsin-inhibitory activity (IU/ml)
Endosperm	2.9	17.0	2.7
Germ	33.8	9.0	2.4
Bran	3.1	8.2	14.2

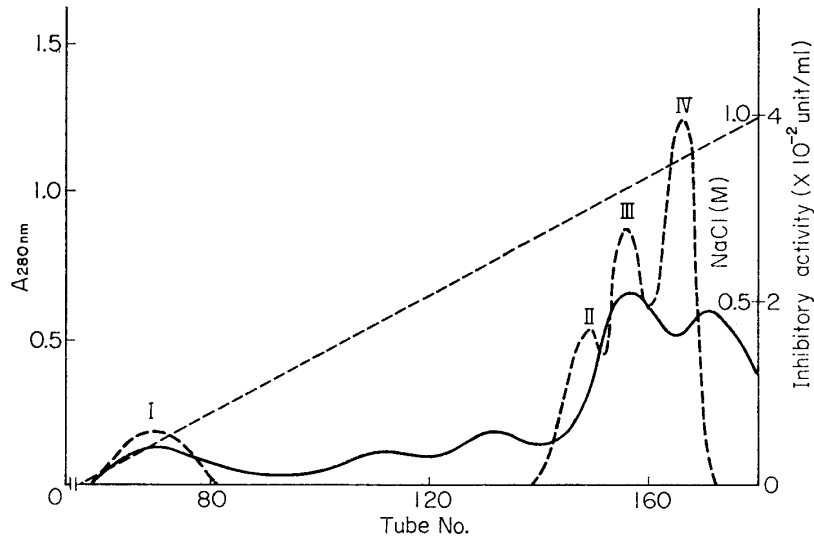


図1 CM-セファデックス C-25 カラムによる粗製小麦胚乳トリプシンインヒビター画分のクロマトグラム

—, 吸光度 (280 nm); ……., トリプシンインヒビター活性; ---, 食塩濃度

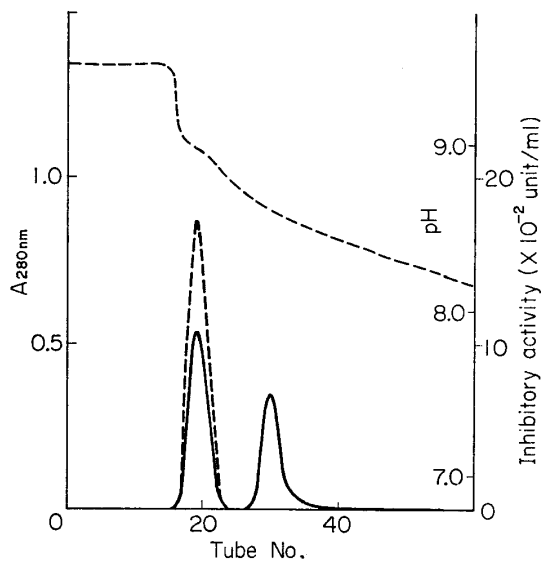


図2 ポリバッファー交換体 PBE 94 カラムによる WETI-I のクロマトグラム

—, 吸光度 (280 nm); ……., トリプシンインヒビター活性; ---, pH

とくポリバッファー交換体 PBE 94 カラムによるクロマトフォーカシングにより精製した。活性画分はポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、単一のバンドを示し、電気泳動的に均一な小麦胚乳トリプシンインヒビター I (WETI-I) を得た。WETI-I はアミノ酸のみからなるポリペプチドで等電点は 9.35 であった。分子量は 7,800 で、トリプシンに対して強い阻害活性を示し、1:1 のモル比で 100% 阻害した。その活性中心はアルギニンであり、トリプシンに対する阻害形式は非競合阻害を示した。

画分 F-III および II についてもゲル透過、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシングを用いて精製して、それぞれ電気泳動的に均一なトリプシンインヒビター活性画分を得た。これらを WETI-II, III とした。これらインヒビターはともに糖を含まないポリペプチドのみからなるタンパク質であった。はじめの食塩溶液での抽出液と比較すると、50 倍から 300 倍に精製された^{12,13)}。

小麦胚乳部より単離された WETI-I, II, III を比較してみると、それぞれ分子量が 7,800, 11,000 および 9,000 と低分子のインヒビターであった。等電点は 9.35, 約 10.3, 約 9.2 と異なっていたが、塩基性のタンパク質であった。アミノ酸組成は主構成アミノ酸が I, II はアルギニン、プロリンであるのに対して III はヒスチジンで 87 残基のアミノ酸のうち 10 残基と多く含まれていた。I, II, III ともトリプシンと強く反応し 1:1 のモル比で 100% 阻害した。またプロナーゼに対しては強い阻害を示したが、キモトリプシン、ナガーゼに対しては弱い阻害活性しか示さず、ペプシンに対しては全く活性は認められなかった。pH に対しては同じ挙動を示し、酸性側では安定であったが、塩基性側ではやや不安定であった。熱に対しては II, III, I の順で不安定であり、これら 3 種類のインヒビターはそれぞれ異なった性質をもつトリプシンインヒビターであることが明らかとなった。

3.2. 胚乳部のキモトリプシンインヒビター

植物性プロテアーゼインヒビターについては、そのほとんどがトリプシンインヒビターに関する研究であ

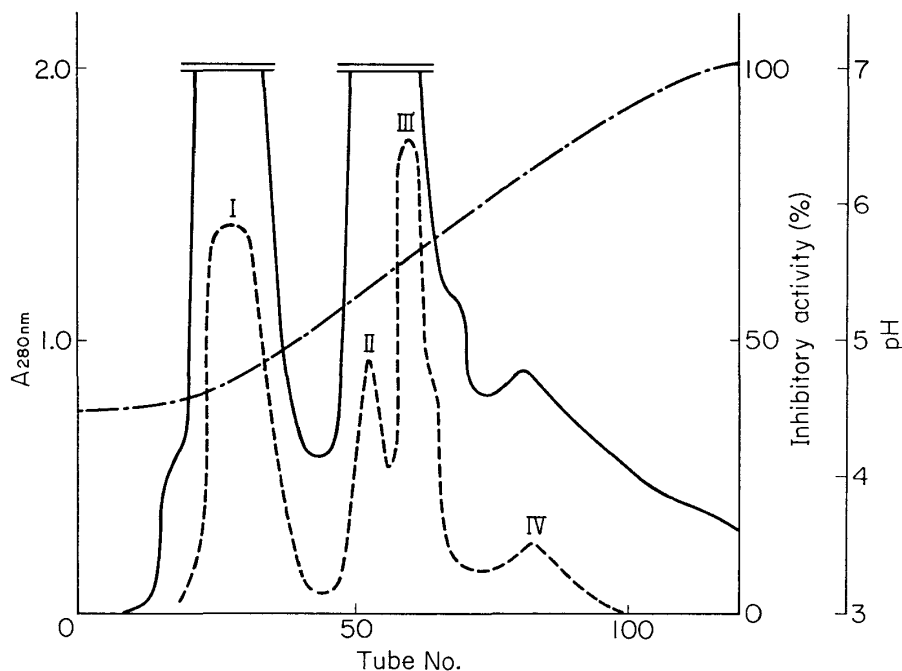


図3 SP-セファデックス C-25 カラムによる粗製小麦胚乳キモトリプシンインヒビター画分のクロマトグラム
 —, 吸光度 (280 nm); ---, キモトリプシンインヒビター活性; - · - ·, pH

る。単離されたトリプシンインヒビターがキモトリプシンに対して阻害活性を示すという報告があるのみで、キモトリプシンインヒビターはバレイショのキモトリプシンインヒビター I に代表され、ほとんど単離されていない。小麦胚乳はトリプシンインヒビター活性よりキモトリプシンインヒビター活性の方が強い⁶⁾。そこで筆者らはこのインヒビターの単離を試みた¹⁵⁾。

小麦胚乳はカナダ・ウェスタン種の硬質小麦の胚乳を用いた。これに 0.1M 食塩溶液を加えて活性成分を抽出した後、塩析、透析、SP-セファデックス C-25 カラムによるクロマトグラフィーにより、図3に示すごとく4つの活性成分 (F-I, II, III, IV) を得た。このうち主画分の F-III をポリバッファー交換体 PBE 94 カラムを用いて精製した。精製画分は電気泳動的に均一であることが認められたので、小麦胚乳キモトリプシンインヒビター-I (WECI-I) とした。WECI-I は等電点約 8 の糖を含まないポリペプチドのみからなるタンパク質であった。このインヒビターの主構成アミノ酸はグルタミン酸、プロリン、ヒスチジン、グリシンであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量は 33,000 と推定された。キモトリプシンに対して 1:1 のモル比で化学量論的に反応するインヒビターであるが、トリプシンに対しては全く阻害活性を示さなかった。

3.3. 小麦胚芽部のトリプシンインヒビター

1962 年に Creek ら⁵⁾ が胚芽抽出液にトリプシンインヒビター活性の存在することを認め、1969 年に Hochstrasser ら¹⁶⁾ がアフィニティークロマトグラフィーを用いて胚芽抽出液より分子量 17,000 のインヒビターを単離した。さらにこのインヒビターの主構成アミノ酸は、プロリン、システイン、アルギニン、セリン、アスパラギン酸であり、活性中心はアルギニンであることを明らかにした。しかしこの精製画分はトリプシンにより活性中心部もしくは他のペプチド結合部分が加水分解された修飾インヒビターであった。そこで筆者は別の方法を用いて分離、精製を行った¹⁷⁾。

脱脂胚芽粉末に 0.1M 食塩溶液を加えて活性成分を抽出した。熱処理、塩析、透析、凍結乾燥した後、バイオゲル P-30 カラムを用いて図4に示すように3つの活性画分 (F-I, II, III) を得た。画分 F-I, II についてさらに DEAE-セファデックス A-25, CM-セファデックス C-25 カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーおよびセファデックス G-75 を用いてゲル濾過を行って、精製画分 I, II を得た。これらは SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および超遠心的に均一であったので、それぞれ小麦胚芽トリプシンインヒビター I, II (WGTI-I, II) とした。

WGTI-I は小麦胚芽中の含有量が多いが、他のインヒビターに比較してトリプシンに対し弱い阻害活性

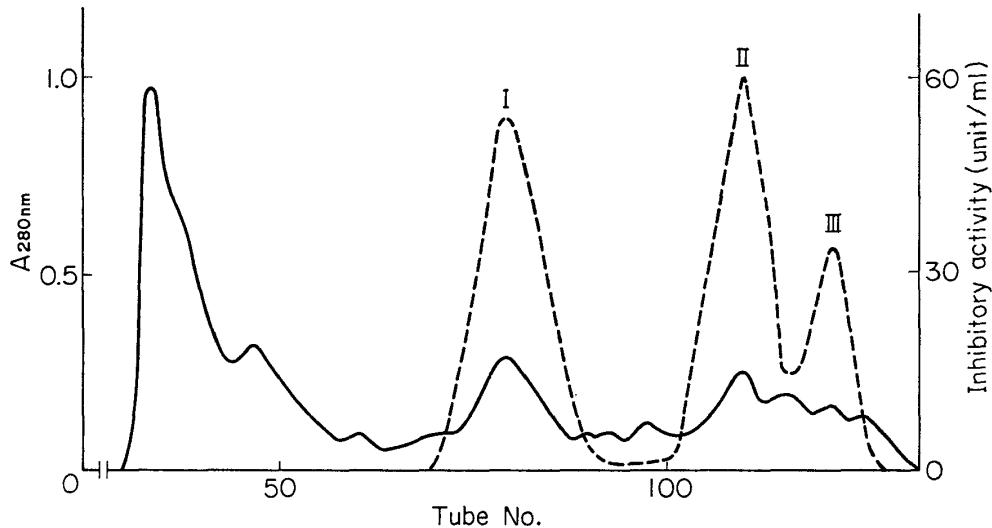


図4 バイオゲルP-30カラムによる粗製小麦胚芽トリプシンインヒビター画分のクロマトグラム
—, 吸光度 (280 nm); ---, トリプシンインヒビター活性

を示した。このインヒビターは SDS-ゲル電気泳動において単一なバンドを示し、超遠心沈降やゲル濾過においても単一なピークを与えるが、SDS が存在しない場合はポリアクリルアミドゲル電気泳動で3つ以上のバンドを示し、超遠心沈降パターンも不均一な沈降界面を示した。SDS 存在下で、沈降定数が正の濃度依存性を示すこと、およびゲル濾過における溶出容積が濃度とともに小さくなることなどから、WGTI-I は SDS が存在しない条件下では単一の、もしくは大きさの接近したいくつかのサブユニットが会合した状態にあり、SDS の存在下では解離の方向へ傾くものと推定された。このサブユニットは SDS-ゲル電気泳動法により分子量16,000と推定された。またこのインヒ

ビターはトリプシンに対して興味深い阻害作用を示した。すなわち WGTI-I をトリプシンと長時間反応させると、阻害活性をもつ低分子量のペプチドを生成した。

WGTI-II は分子量10,000でトリプシンに対して1:1のモル比で反応し、その阻害形式は非競合阻害であった。pH 2 から12の間で高い安定性を示し、熱に対しても WGTI-I より安定であった。またプロナーゼに対して強い阻害活性をもち、キモトリプシンに対しても弱い阻害活性を示した。しかしペプシンに対しては作用しなかった。

この2つのインヒビターの主構成アミノ酸はグルタミン酸、グリシン、アラニンであり、活性中心のアミ

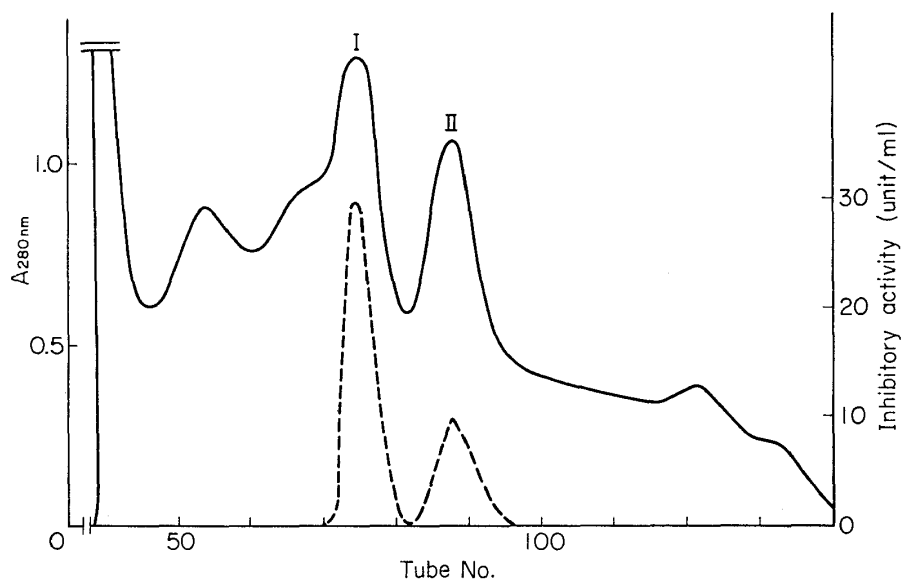


図5 セファデックス G-75 カラムによる粗製小麦麩トリプシンインヒビター画分のクロマトグラム
—, 吸光度 (280 nm); ---, トリプシンインヒビター活性

ノ酸はともにアルギニンであった。またともに糖などを含まないポリペプチドのみよりなるタンパク質であった。

3.4. 麩のトリプシンインヒビター

1974年筆者により麩にトリプシンインヒビター活性成分の存在が示され⁹⁾ さらに1982年われわれはカナダウエスタン種の小麦麩より活性成分を単離した¹⁸⁾。

小麦麩に同量の海砂を加えて乳鉢で磨碎し、それに0.1M 食塩溶液を加えて、活性成分を抽出し、熱処理、塩析、透析、凍結乾燥、さらにセファデックス G-75 カラムにより分画した。図5に示すごとく2つの活性画分(F-I, II)を得た。主画分F-IについてCM-セファデックス C-25 カラムを用いて、さらに精製を行った。そしてトリプシンインヒビター活性を示す2画分を得た。これらはともに電気泳動的に均一であったので、それぞれ小麦麩トリプシンインヒビター I, II (WBTI-I, II) とした。

WBTI-I は抽出溶液に対して約300倍に精製することができた。分子量16,800のアミノ酸のみよりなるタンパク質で、主構成アミノ酸は、グルタミン酸、アラニン、グリシンであった。トリプシンに対して1:1のモル比で100%阻害したが、 K_d 値は $2 \times 10^{-8} M$ と大きく、トリプシンインヒビターとしては弱いインヒビターであった。

WBTI-II は SDS 存在下でのゲル電気泳動では単

一のバンドを示したが、SDS が存在しないゲル電気泳動では複数のバンドが認められた。トリプシンに対する阻害活性は WBTI-I より弱く、胚芽の WGTI-I と同じく解離会合系のタンパク質であろうと推定された。

以上のごとく小麦穀粒各部位には多くのプロテアーゼインヒビターが存在している。表2に示されるように、現在までに胚乳部では10種類のトリプシンインヒビターと1種類のキモトリプシンインヒビターの存在が示されており、胚芽部より3種類、麩部より1種類のトリプシンインヒビターが単離されている。これら15種類のプロテアーゼインヒビターのうち14種類がトリプシンインヒビターである。これらのトリプシンインヒビターのうち分子量、アミノ酸組成が明らかにされている8種類について比較すると表3に示すごとくなる。

これらインヒビターの分子量は8,000より17,000の間にあり、すべて比較的分子量の小さいタンパク質である。またそれぞれのインヒビターの主構成アミノ酸は胚乳部の4種類では WETI-I はアルギニン、プロリン、WETI-II はプロリン、アルギニン、セリン、WETI-III はヒスチジン、また Boisen ら¹⁰⁾の単離したインヒビターは半シスチンである。これらのデータ一だけでも全く異なったインヒビターであることが示

表2 小麦穀粒各部位のプロテアーゼインヒビター

Part	Enzymes inhibited	Molecular Weight	References
Endosperm	Papain, Ficin	—	Hites, B. D. (1951) ³⁾
	Trypsin	—	Learmonth, E. M. (1960) ⁴⁾
	Trypsin	—	Shyamala, G. (1964) ⁷⁾
	Trypsin	—	Mikola, J. (1972) ¹⁹⁾
	Trypsin, Chymotrypsin	—	Mitsunaga, T. (1974) ⁶⁾
	Trypsin	12,000, 24,000	Petrucci, T. (1974) ⁸⁾
	Trypsin	19,500, 21,000 22,500, 36,800 38,500	Chang, C. R. (1981) ⁹⁾
	Trypsin	12,300, 12,500	Boisen, S. (1981) ¹⁰⁾
	Trypsin	8,000	Mitsunaga, T. (1982) ¹¹⁾
	Chymotrypsin	33,000	Mitsunaga, T. (1984) ¹⁵⁾
Germ	Trypsin	—	Creek, R. D. (1962) ⁵⁾
	Trypsin	17,000	Hochstrasser, K. (1969) ¹⁶⁾
	Trypsin, Chymotrypsin	—	Mitsunaga, T. (1974) ⁶⁾
	Trypsin	10,000, 16,000	Mitsunaga, T. (1979) ¹⁷⁾
Bran	Papain	—	Hites, B. D. (1951) ³⁾
	Trypsin, Chymotrypsin	—	Mitsunaga, T. (1974) ⁶⁾
	Trypsin	16,800	Mitsunaga, T. (1982) ¹⁸⁾

表3 小麦穀粒各部位のトリプシンインヒビターのアミノ酸組成

Amino acid	Endosperm				Germ			Bran
	WETI-I	WETI-II	WETI-III	(Boisen)	WGTI-I	WGTI-II	WI	WBTI-I
Aspartic acid	6	7	7	9	12	8	15	12
Threonine	6	6	7	9	9	5	11	7
Serine	4	9	5	5	10	6	15	10
Glutamic acid	6	7	7	9	25	14	10	19
Glycine	5	5	6	7	18	11	9	16
Alanine	5	7	5	7	20	10	9	18
Half-cystine	6	6	6	18	4	4	24	12
Valine	3	3	5	5	7	5	9	11
Methionine	4	3	1	4	2	2	2	3
Isoleucine	2	3	3	3	4	3	5	4
Leucine	2	5	3	4	9	4	4	10
Tyrosine	2	2	1	1	1	1	3	1
Phenylalanine	2	3	2	3	5	2	5	3
Lysine	2	5	3	4	11	5	10	6
Histidine	2	3	10	2	1	2	0	3
Arginine	8	9	7	10	9	7	15	9
Proline	7	16	9	11	4	6	23	8
Tryptophan	0	1	0	1	0	1	—	1
Total	72	100	87	111	151	95	147	153
Molecular weight	8,030	11,046	9,000	12,301	15,846	10,163	17,000	16,019

されている。胚芽部の3種類もWGTI-Iはグルタミン酸、アラニン、WGTI-IIはグルタミン酸、グリシン、Hochstrasserら¹⁶⁾の単離したWIは半シスチンであった。麩部のWBTI-Iはグルタミン酸、アラニン、グリシンであった。このように分子量、アミノ酸組成の比較では8種類はすべて異なったトリプシンインヒビターであることがわかった。

これらのインヒビターの存在意義については後述するが、小麦穀粒だけでなく大豆からもSTI²⁾、BBI^{20,21)}、をはじめRackisら^{22,23,24)}の単離したSBTIA₁、SBTIB₁、SBTIB₂、Frattali²⁵⁾らによるF₁、F₃、さらにOdaniら²⁶⁾によるC-II、D-II、E-IIなど10種類以上のトリプシンインヒビターが単離され、それぞれの性質が明らかにされている。なぜこのように多くのインヒビターが植物組織中に存在するかについては推測の段階であるが、興味ある今後の研究課題である。

4. プロテアーゼインヒビターの調理・加工時の変化

食品材料としての小麦は穀粒を粉碎したうえ、パン、めん類（茹めん、乾めん、即席めん、マカロニ、スパ

ゲティ）、菓子類（ビスケット、クラッカー、ケーキ）などに二次加工するという食形式をとって利用されている。この際に小麦穀粒に含まれている多数のプロテアーゼインヒビターはどのように変化するかを知るために、種々の市販小麦加工食品中にインヒビター活性が残存しているかどうか、これらプロテアーゼインヒビターはタンパク質であるため、調理・加工時の加熱によりどのように変化するか、また実際の調理加工操作中にどのような挙動を示すかを、製パン時について調べてみた。

4.1. 小麦加工食品中のプロテアーゼインヒビターの存在

市販小麦粉と種々の市販小麦粉加工食品のトリプシンおよびキモトリプシンに対する阻害活性の有無を調べた²⁷⁾。

市販製品 20 g に海砂を加えて乳鉢中で磨砕した。これに100 ml の0.1M食塩を含む0.01Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を加え、5°Cで2時間放置した後、遠心分離して得た上清を試料液としてトリプシンおよびキモトリプシンに対するインヒビター活性を調べた。その結果は図6に示す通りである。市販小麦粉では強力粉

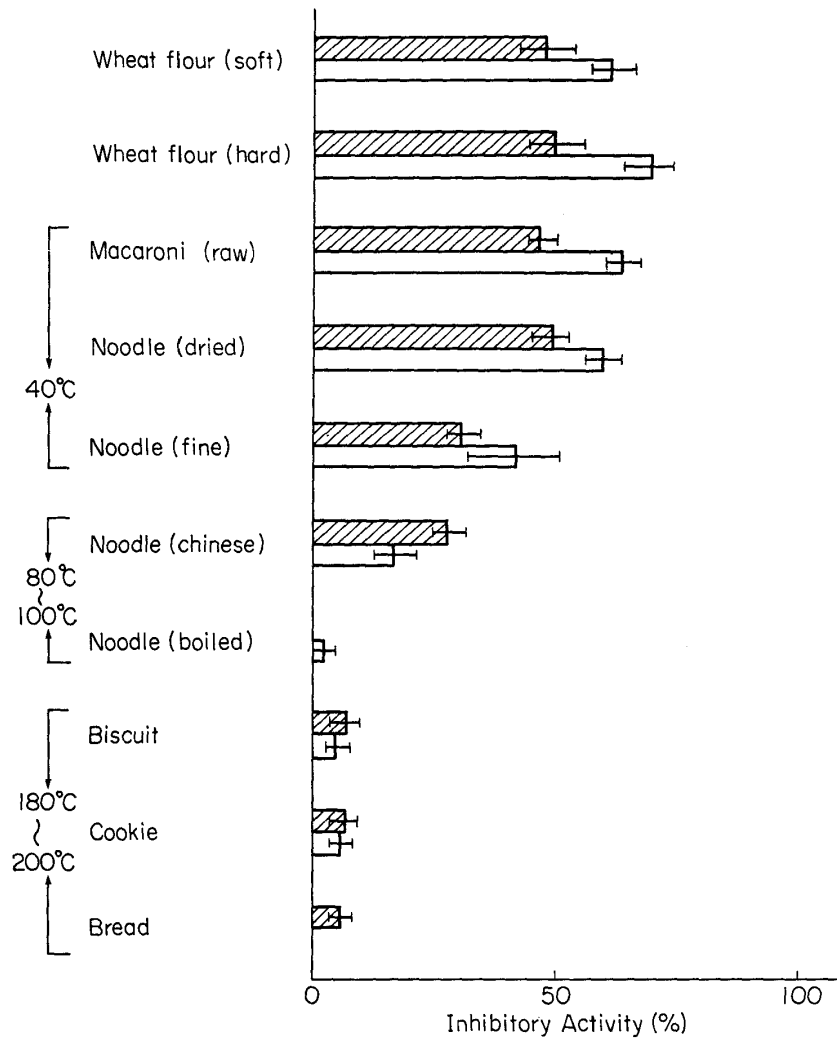


図6 市販小麦粉および小麦粉加工食品のプロテアーゼインヒター活性
 ▨, トリプシンインヒター活性
 □, キモトリプシンインヒター活性

がわずかに薄力粉より高い阻害活性を示している。トリプシンに対しては42~56%, キモトリプシンに対しては60~70%であった。しかしそれぞれのプロテアーゼについての差は小さかった。小麦粉加工食品については、マカロニ、乾めんは原料である小麦粉との差はほとんど認められず、素めんはやや低い値を示した。これらに対して、中華めんは両インヒター活性とも原料の小麦粉より低下していた。とくにキモトリプシンに対する阻害活性は小麦粉の25%まで低下していた。この傾向は茹めんでさらに著しく、両インヒター活性ともほとんど失活していた。またビスケット、クッキー、パンなども両インヒター活性ともわずかに残存している程度であった。この原因として加工時の熱履歴およびpHによる影響が考えられる。図6では各小麦粉加工食品を加工温度別に並べたが、インヒビ

ター活性が加工温度に影響されることは明らかである。しかし茹めんは加工温度に比して著しい失活が認められた。

また小麦胚芽は良質のタンパク質をはじめ多くの特殊成分を含み、栄養的に優れているので種々の食品材料として利用されている。小麦胚芽は胚乳の数倍のトリプシンインヒター活性を示すので熱処理されて市販されているが、市販小麦胚芽粉末を調べると、16.6~35.0%のトリプシンインヒター活性が認められた。また胚芽添加のビスケットにも10.1~18.0%のインヒター活性が残存していた。胚芽無添加のビスケットに比較して3~5倍の高い値を示している。

以上、各種の小麦加工食品において、その材料、加工条件によりインヒター活性の残存していることが予測される。

4.2. プロテアーゼインヒビターの熱による活性変化

小麦粉はじめ小麦製品を調理、加工する際にプロテアーゼインヒビターがどのような変化をするか、小麦粉、胚芽末および麩粉末とこれら各部位より単離したプロテアーゼインヒビターについて熱による活性の変化を調べた²⁸⁾。

トリプシンインヒビター活性はどのような状態でも60°Cまでの温度では全く失活しなかった。水分含量10%以下の各試料粉末のインヒビター活性も80°Cまで変化なく100°Cでは小麦粉は20分で10%、60分で15%の失活が認められるのに、胚芽末、麩末では全く変化なく、失活が認められるのは120°Cからであった。しかしこれら試料粉末にその60%の水分を加えてペースト状にすると、80°Cでわずかに活性が失われ、100°C 20分では40~75%の失活を示し、水を加えることにより熱に対して不安定になった。これに対して各部位の部分精製インヒビター、精製インヒビターについて、熱による失活を調べると、部分精製インヒビターに比較してすべての精製インヒビターは顕著に熱に対して安定であった。この結果より、精製が進み不純物の存在が少なくなるほど熱に対して安定になると考えられる。また精製インヒビター溶液 (pH 7.0) では100°C 60分の熱処理で WETI-I 25%, WBTI-I 30%, WGTI-I 50%の失活を示し、各部位インヒビターの熱安定性に差異が認められた。

小麦各部位のキモトリプシンインヒビター活性の熱による変化はトリプシンインヒビター活性の変化よりさらに顕著であった。粉末では各試料とも120°Cまで活性の変化は全く認められなかったのに対して、ペースト状では80°Cで各試料とも活性の変化が認められ、30分で25%、60分で35%の失活を示した。100°Cでは10分で50%、40分ではほとんど活性を示さなくなった。さらに小麦粉の抽出液 (pH 7.0) で熱に対する活性の変化を調べると、80°C 30分で80%、60分で90%、100°Cでは10分で90%、20分ではほとんど失活してしまった。しかし WECI-I 溶液 (pH 7.0) は80°C、10分で10%、30分で20%、さらに98°C、30分で40%の失活を示した。ペースト状もしくは抽出液試料のキモトリプシンインヒビター活性に比較して WECI-I は極めて安定であった。

小麦穀粒各部位のプロテアーゼインヒビターの熱による活性の変化は、温度、時間とともに水分量が大きく影響した。この傾向は大豆トリプシンインヒビターの熱に対する挙動について報告されている結果と一致する。全脂あるいは脱脂圧扁大豆では100°C、15分間の

蒸気加熱処理でトリプシンインヒビター活性はほとんど失活した²⁹⁾。また丸大豆をあらかじめ25%水分にして20分間蒸気加熱すると、そのトリプシンインヒビター活性はほとんど失活してしまうが、水分含量が少ないと、失活するためにはより長時間または高い温度が必要となる。逆に丸大豆の水分を1晩浸漬して、60%あるいはそれ以上にすると、わずか5分間の加熱で完全に失活する³⁰⁾。後進国で大豆を食物とするのに、押出して、扁平にして加熱する簡単な調理法が行われているが、できた大豆料理にはトリプシンインヒビター活性がなく³¹⁾、栄養的にすぐれていた³²⁾。豆乳に含まれるトリプシンインヒビター活性は93°Cで30~75分、121°Cで5~10分加熱するか、もしくは121°C 30分間のスプレードライにより効果的に失活させることができる。そして豆乳中のトリプシンインヒビター活性の90%を失活させる条件で処理された豆乳が最大のタンパク質効率を示すことが報告されている^{33,34,35)}。また豆乳はじめ大豆製品に含まれているトリプシンインヒビター活性はpH 7以下で処理されると、とくに効果的であることが明らかにされている³⁶⁾。種々の市販大豆製品、大豆タンパク質濃縮物、繊維大豆タンパク質、幼児用大豆調理食品などは、約90%トリプシンインヒビター活性が破壊されていた^{37,38)}。

大豆以外の植物性食品材料のトリプシンインヒビターに対する熱処理の影響を扱った研究は少ない。インゲン豆を121°Cで5分オートクレーブ処理すると、トリプシンインヒビター活性の約80%が失活する。この熱処理した豆を与えたラットの成長は未熱処理インゲン豆を与えたラットと比較してかなり改善された³⁹⁾。ジャガイモのキモトリプシンインヒビターはジャガイモのままでは加熱により短時間で破壊されるが、精製すると非常に安定である⁴⁰⁾。ソラ豆のトリプシンインヒビター活性の約90%が120°C、20分のオートクレーブ処理、107°C、30分の超短波照射で失活する⁴¹⁾。またピーナツのインヒビター活性は、乾式加熱では125°C 5時間、140°C 2時間、150°C 1時間で90%失活するが、湿式加熱では100°C 5分で100%失活した⁴²⁾。

4.3. 製パン時の小麦粉プロテアーゼインヒビター活性の変化

種々の小麦粉加工食品中にもまだプロテアーゼインヒビター活性が存在していたが、その残存活性は食品の種類により著しく異なっていた。そこで小麦粉の調理、加工時にどのような変化をするかを製パン時について調べた⁴³⁾。

中種法でパンを作製した。小麦粉トリプシンインヒ

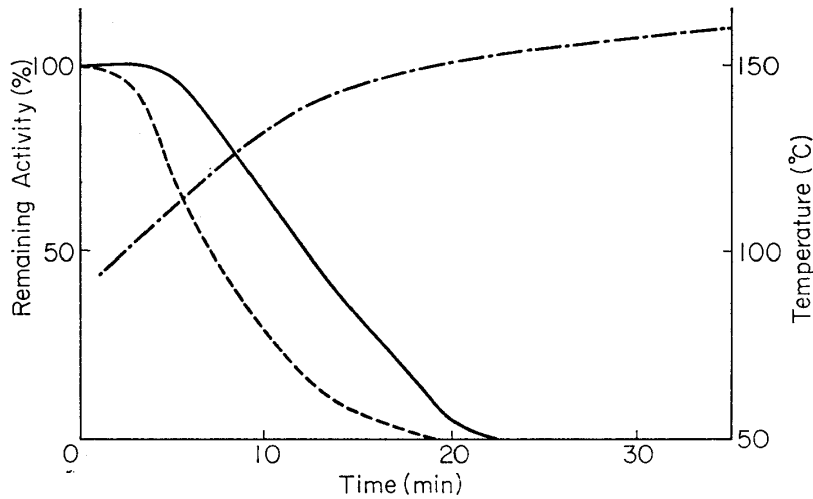


図7 焼成時のパン生地側面、底面部のプロテアーゼインヒビター活性と温度の変化
 —, トリプシンインヒビター活性; ---, キモトリプシンインヒビター活性
 ···, 温度

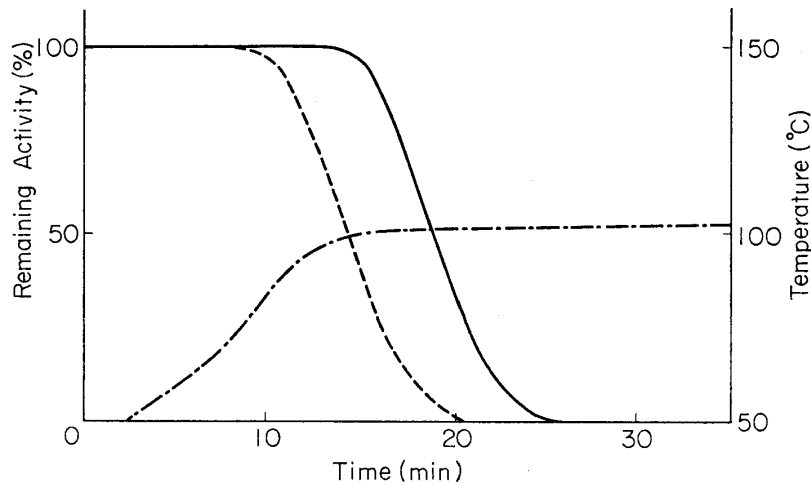


図8 焼成時のパン生地内部のプロテアーゼ活性と温度の変化
 図6と同様にして示した。

ビターおよびキモトリプシンインヒビターはともにタンパク質であるので、イースト中のプロテアーゼに影響されることが予想された。しかし中種生地を 28°C で180分発酵させても、またドウを 30°C で20分さらに 38°C で30分保持しても、パン生地中の両インヒビター活性は全く変化なく、小麦粉プロテアーゼインヒビターはイーストのプロテアーゼに対して安定であった。

発酵時に対して焼成時には両インヒビター活性とも失活が認められた。しかし焼成時の失活の程度がパン生地の部位により著しく異なった。図7に示されているように側面、底面部でのトリプシンインヒビター活性の変化は、焼成をはじめて4分後 105°C に達するとはじまり、10分後の 130°C で35%、15分後の 145°C

では70%の失活が認められ、150°C になる約20分間で完全に失活した。内部については図8に見られるように、温度上昇はおそく、100°C に達するのに焼成開始後14分も要し、焼成終了まで 100°C の温度が維持された。しかしトリプシンインヒビター活性は100°C に達すると約10分間で完全に失活した。側面、底面部、内部ともに活性の低下は焼成温度 100°C 付近で始まった。Boisenら⁴⁴⁾はライ麦パンについて同じような実験を行っているが、その結果と一致している。しかし部位間での顕著な温度差があるのに失活の速さは、その差と関係なく、温度の低い内部が他の部位より低温で、短時間に失活した。これは先に述べた水分量の影響によるものではないかと考えられる。パン生地の内部は他部位に比較して水分の蒸発がおそく、焼成時も

ある程度の水分が保持されているため、短時間で活性の変化がおこるのであろうと推察された。この傾向はキモトリプシンインヒビター活性について、図7,8に見られるように、さらに顕著に認められた。先に述べたごとく、キモトリプシンインヒビター活性は小麦粉のままでは120°Cまで全く失活しなかったが、パン生地では側面、底面部ともに焼成開始2分後の100°Cに達した点より低下がはじまり、6分後の115°Cで40%、10分後の130°Cでは70%、20分後の150°Cでは全く失活した。これに対して内部では焼成開始10分後に85°Cに達すると失活が認められ、5分経過して100°Cで60%、10分経過後では100°Cのままであるのに活性は全く認められなくなった。

5. プロテアーゼインヒビターの生理学的意義

小麦穀粒の各部位には多種類のプロテアーゼインヒビターが存在している。また小麦以外豆類、穀類、種実類、蔬菜類、果実類などの植物性食品にも多種多数のプロテアーゼインヒビターの存在が認められている。なぜこのような特異な性質をもつタンパク質が植物組織中に存在するのか。その生理学的意義、存在意義については多くの研究者の関心を集めている。

大豆の葉、莖、さやにはプロテアーゼインヒビター活性が認められていないが、開花後3週間の未熟大豆には成熟大豆の50%の活性が存在している。また大豆種子の発芽1週間はその活性が低下しなかった⁴⁵⁾。このように植物体の生育の間に著しいインヒビター活性の消長が認められている。Shainら⁴⁶⁾はレタスの種子のトリプシンインヒビターはレタス種子より単離された2種類のプロテアーゼのうち1つに対して阻害活性を示したと報告している。Ryan⁴⁷⁾によって、トマトの葉や莖を傷つけるとその部分にキモトリプシンインヒビターの蓄積が認められた。大麦の3種類のプロテアーゼインヒビターのうち1つは*Aspergillus*のプロテアーゼに対して阻害活性を示し、他の1つは大麦種子のプロテアーゼに対して阻害活性を示した⁴⁸⁾。大豆トリプシンインヒビターSTIはすべてのトリプシン様酵素を阻害するとは限らない⁴⁹⁾。またこのインヒビターは大豆の発芽を阻害しないが、大豆や他の植物の根の生長を強く阻害する。したがってこのインヒビターはタンパク質へのアミノ酸の取り込みを阻害するかもしれないとSzilazy⁵⁰⁾は示唆している。

これらの多くの研究結果よりプロテアーゼインヒビターの存在意義としていろいろのことが考えられる。タンパク質の合成と代謝の調節をしているのかあるい

は植物体の自己分解を防止する働きをもっているのか。また昆虫や微生物などに対する防御作用の役割を果しているのか。もしくは大豆などでは種子タンパク質の相当量がインヒビター活性成分であることより、インヒビターそのものが貯蔵タンパク質であると考えられている。しかしいずれも決定的なものでなく、明確な解答は示されていない。これらのプロテアーゼインヒビターの存在意義を考える上に必要なデータをうるため、小麦種子の発芽時のトリプシンインヒビターとキモトリプシンインヒビターの変動、および生育にともなうトリプシンインヒビターの変化について調べた。

5.1. 発芽時のトリプシンインヒビターの変動⁵¹⁾

発芽にともなうトリプシンインヒビター活性の変動を調べるために、小麦種子を正確に秤取し、白色蛍光灯での連続照射下20~24°Cで水栽培した。一定時間経過後、全部位あるいは幼芽、幼根、種子部に分けて採取した。それぞれに同重量の海砂を加えて乳鉢で磨砕した。これに5倍量の0.1M食塩溶液を加えて混合後2時間放置した。次に遠心分離して、得られた上清を試料液とした。

小麦種子の発芽にともなう窒素の変化は図9に示すごとくである。総窒素は発芽10日間ではほとんど変化が見られなかった。これに対して総可溶性窒素は時間経過にともなって増加し、未発芽種子（発芽0日目）に比較して10日目では6倍量となった。各部位の可溶性窒素の変化は種子部は3日目までわずかに増加の傾向を示したが、その後は日数を経るにつれて減少した。幼芽、幼根部は2日目に生成が認められ試料として採取できた。幼芽部の可溶性窒素は時間経過にともない増加し、10日目では2日目の5倍に達した。幼根部は生育にともない、わずかに増減を示すのみであった。これは植物種子の発芽に際して、プロテアーゼ活性が増加し、貯蔵タンパク質が流動化して発芽のために新たに利用されると推測した^{47,52,53)}結果と一致する。

窒素量の変化に対して、発芽10日間のトリプシンインヒビター活性の変化をみると、図10に示される結果を得た。総トリプシンインヒビター活性は幼芽、幼根の生成する2日目までは減少する傾向を示したが、3日目より増大し、幼葉梢より第1葉が突出し、伸長しはじめる6日目で最大値を示した。6日目の総トリプシンインヒビター活性は発芽前の約2倍の強さであった。しかし以後は10日目まで時間経過にともない活性の減少が認められた。各部位のトリプシンインヒビター活性の変化は、種子部はMayerら⁵²⁾およびSamac⁵³⁾の結果と同じく発芽とともに減少し、とくに2日目より

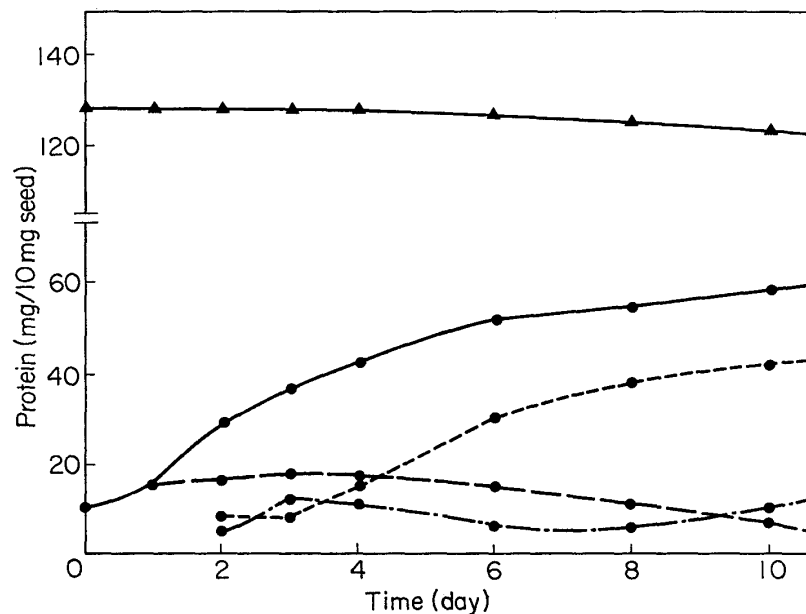


図9 小麦種子の発芽過程での窒素含量の変化

▲—▲, 総窒素量; ●—●, 可溶性総窒素量; ■—■, 種子部の可溶性窒素量
 ◆—◆, 幼芽部の可溶性窒素量; ×—×, 幼根部の可溶性窒素量

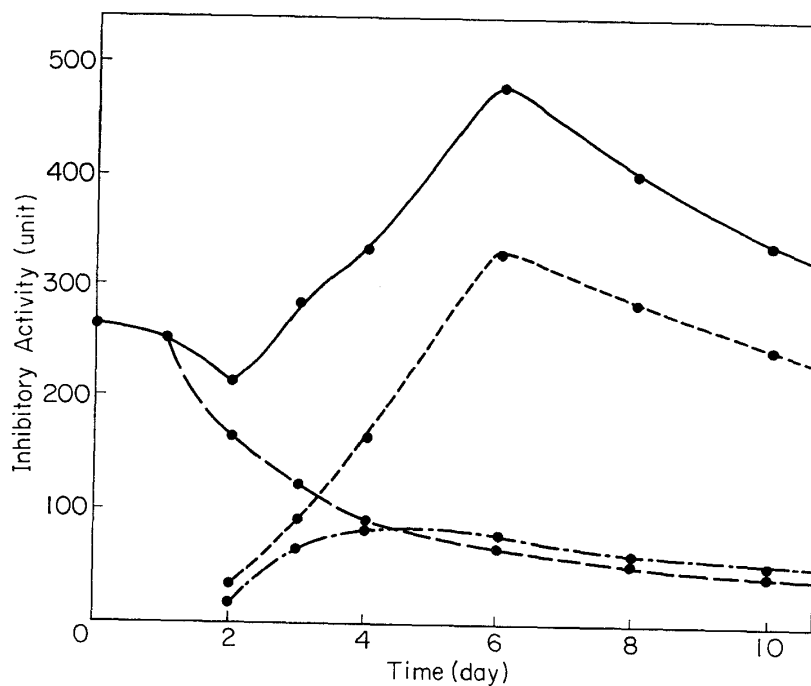


図10 小麦種子の発芽過程でのトリプシンインヒビター活性の変化

—, 総活性; ---, 種子部の活性;, 幼芽部の活性;
 -.-.-, 幼根部の活性

4日目が著しい変化を示した。それ以後は10日目まで漸減した。幼芽部は発芽にともなって活性が急激に増加し、6日目で最も強いトリプシンインヒビター活性を示した。幼根部は4日目から6日目にかけて最大値を示したが、その変化はわずかであった。この傾向は黒

緑豆の発芽時にも認められている⁵⁴⁾。また米種子の発芽の際にはトリプシンインヒビター活性は変化を示さない⁵⁵⁾が、多くの植物では一般に発芽にともない活性は減少している^{47,52,53,56)}。このように植物の種類により異なった挙動を示すことはトリプシンインヒビター

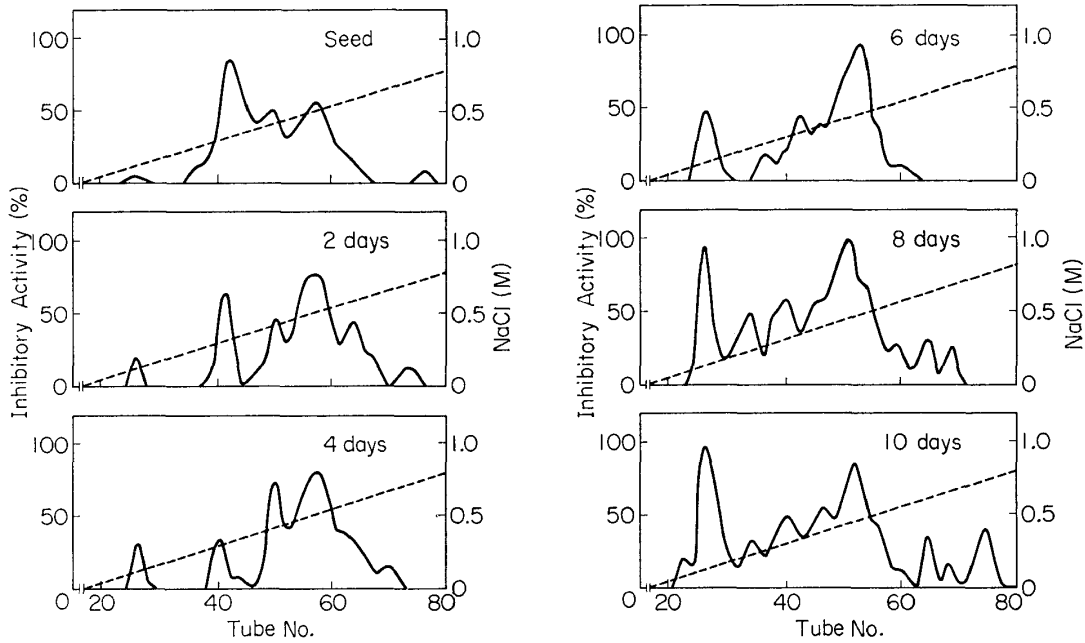


図11 発芽にともなうトリプシンインヒビター活性画分の経時変化
 —, トリプシンインヒビター活性; ---, 食塩濃度

がそれぞれの植物体において発芽時に異なった役割を持っていることを示唆している。

さらに小麦の発芽にともなうトリプシンインヒビター活性の変動で、インヒビター成分がどのように変化しているかを調べた⁵⁷⁾。未発芽種子、発芽2日目より10日目のそれぞれの試料について、種子部、幼芽部、幼根部をまとめて、これに0.1M食塩溶液を加えて活性成分を抽出した。抽出液を60°Cで5分間熱処理した後、遠心分離し、得られた上清を塩析、透析して試料液を調製した。この試料液をCM-セファデックスC-25カラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果は図11に示した。未発芽種子では食塩濃度0.3Mで溶出する画分に最も高いトリプシンインヒビター活性が、そして0.4M, 0.55M溶出画分にも活性が認められた。発芽2日目、4日目と時間経過にともなって0.3M溶出画分の活性は低くなった。発芽2日目では0.55M溶出画分が主画分となり、新しく0.45Mに溶出する活性画分が認められた。4日目ではさらに0.3M画分の活性が低くなり、0.45M画分の活性が高くなった。また未発芽種子で僅かに認められた0.15M溶出画分が時間経過とともにその活性を高めた。6日目になると2日目、4日目の主画分であった0.55M溶出画分が消失し、かわって0.45Mで溶出する画分が最も強い活性を示した。それとともに0.15M溶出画分の活性も強くなった。8日目では0.15M, 0.55M溶出画分が主画分となり、10日目では

0.15M溶出画分が最も強い活性を示した。以上発芽10日間で、時間経過にともなってトリプシンインヒビター活性画分のクロマトグラムに顕著な変化が認められ、それぞれ特徴のあるパターンを示した。この結果は小麦の発芽にともない種子のトリプシンインヒビター活性成分が消失し、幼芽部などで新しい活性成分が生成したことを示唆している。

5.2. 小麦幼芽のトリプシンインヒビター

トリプシンインヒビター活性が最大値を示した発芽6日目の幼芽部の活性成分を単離して、未発芽種子のトリプシンインヒビター活性成分と比較した。発芽6日目の幼芽部を採取し、0.1M食塩溶液で活性成分を抽出した。得られた抽出液を熱処理、塩析、透析、凍結乾燥、セファデックスG-75カラムにてゲル濾過、さらにCM-セファデックスC-25カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果は図12に示すごとく6活性画分(F-1, 2, 3, 4, 5, 6)が得られた。それぞれの活性画分を調製用ゲル電気泳動法で精製した。各精製画分ともトリプシンに対して強い阻害活性を示した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量の推定を行った。結果は図13に示すごとくで、それぞれの活性画分の分子量はF-1 25,000, F-2 16,000, F-3 17,000, F-4 14,000, F-5 23,000, F-6 20,000であった。先に述べた小麦穀粒のトリプシンインヒビターの分子量は8,000から17,000であり、これらと比較すると、同じもしくは大きい値を示している。

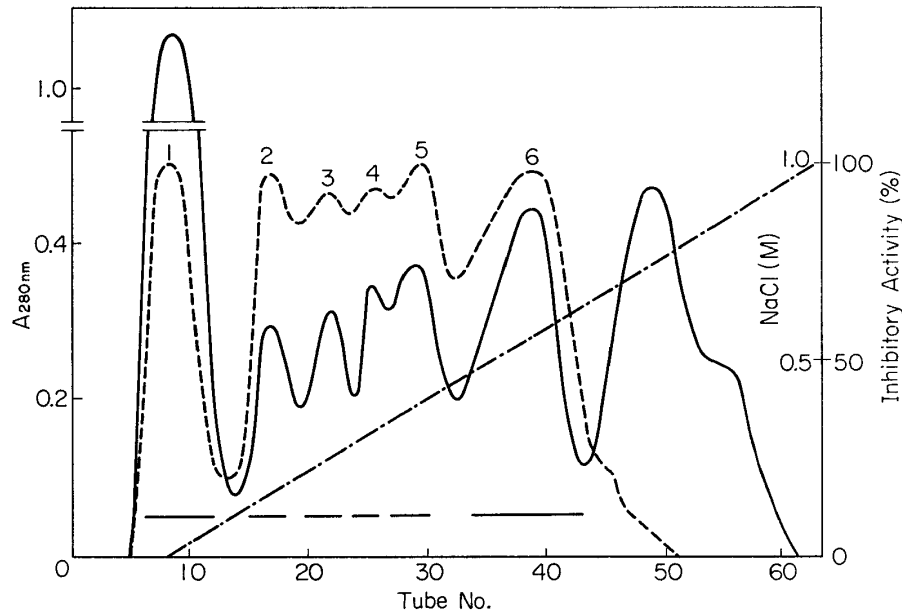


図12 CM-セファデックス C-25 カラムによる幼芽部（発芽6日目）トリプシンインヒビター活性画分のクロマトグラム
 —, 吸光度 (280 nm); - - -, トリプシンインヒビター活性, - · - ·, 食塩濃度

また幼芽採取時の総活性は未発芽種子の総活性より増加している。これらのことより小麦の発芽に際してトリプシンインヒビターが新しく生成されたか、あるいは種子中でトリプシンインヒビターの阻害活性の発現を抑えていた物質が発芽に際して除かれたと推察され、幼芽のトリプシンインヒビターは未発芽種子のインヒビターとは異なった種類であると考えられる。これらの結果は Lorensen ら⁵⁶⁾の緑豆のトリプシンインヒビターが発芽過程で内生のプロテアーゼにより加水分解され、新しいインヒビターが生成する経過とは全く異なっている。

5.3. 小麦の生育にともなうトリプシンインヒビター活性の変動

小麦の発芽の際に新しいトリプシンインヒビターの生成することが推察されたが、さらに小麦が生育する過程でトリプシンインヒビター活性がどのように変動するかを調べた⁵⁸⁾。その結果は図14に示しているごとく、葉部には生育初期はインヒビター活性の変化はほとんどみられない。しかし生育が盛んになり、穂が生成しはじめる30日目より40日目にかけて著しい活性の増加が認められた。さらに結実し、種子が成熟するにしたがって、葉部のトリプシンインヒビター活性は逆に減少した。茎部は穂が生成するまでは活性はほとんど変化を示さなかったが、穂の生成とともに茎上部のインヒビター活性が増し、結実まで続いた。これに対して茎下部はほとんど変化を示さなかった。根部は小

麦の生育過程では、ほとんど変化を示さず、時間経過にともないやや減少の傾向を示した。種子部は穂の生成、結実、さらに種子の成熟と、時間経過にともなってトリプシンインヒビター活性は増加し続けた。小麦の生育においては葉、茎、根、種子の各部位でインヒビター活性の消長が認められ、生育の盛んな部位が強い活性を示した。

5.4. 発芽時のキモトリプシンインヒビターの変動

プロテアーゼインヒビターの植物体での存在意義を知るために、小麦の発芽時のキモトリプシンインヒビター活性の変動についても調べた(未発表)。小麦の総キモトリプシンインヒビター活性は発芽にともなって減少を示した。ただ第1葉の生成する6日目には活性の増加が認められた。しかしその総活性は未発芽種子の約3/5にすぎなかった。その後総活性は時間経過にともなってさらに減少し、10日目では、もとの種子の総活性の1/3にまでなった。各部位の変化をみると、種子部は発芽とともに減少し、8日目には全く活性が認められなくなった。それに対して幼芽部では発芽とともに活性は増大し、6日目に最大値を示した。それ以後は時間経過にともなって減少し続けた。幼根部は2日目から4日目に僅かに活性が認められたが、5日目以後全く活性は認められなかった。発芽時のキモトリプシンインヒビター活性の変動はトリプシンインヒビター活性の変動と同じ傾向を示した。とくに幼芽部では発芽とともに増加し、トリプシンインヒビター活

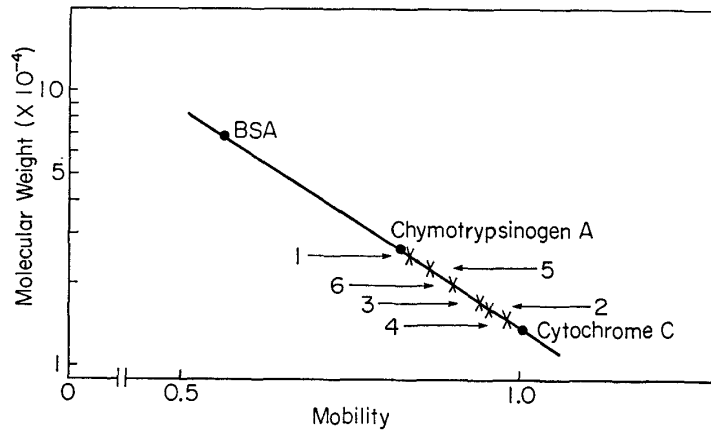


図13 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による幼芽部（発芽6日目）トリプシンインヒビター活性画分の分子量の推定

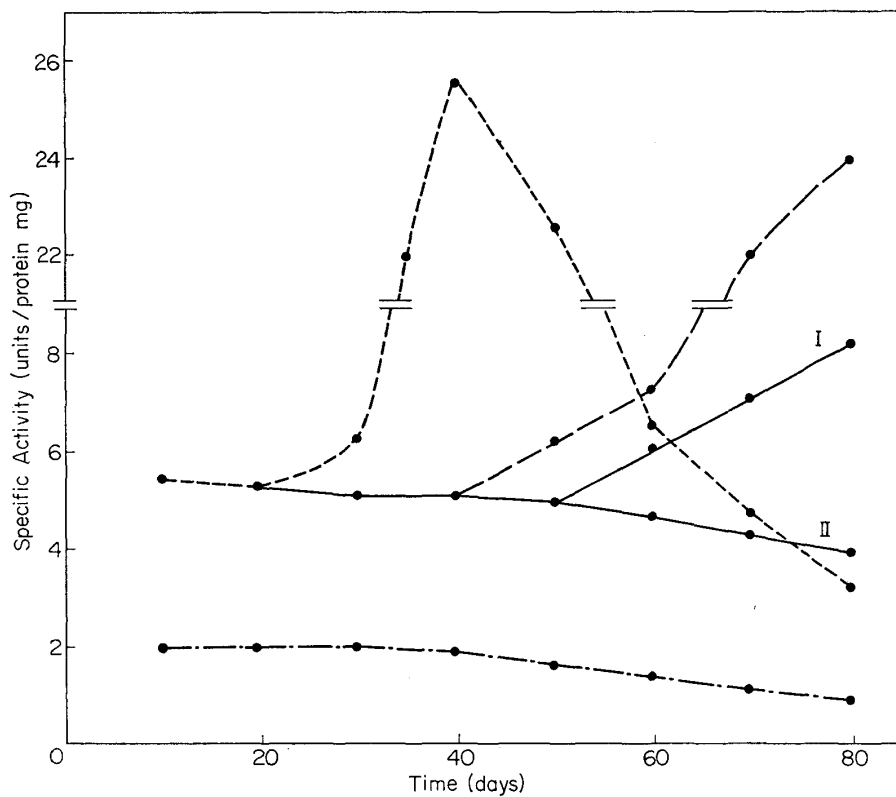


図14 小麦の生育にともなうトリプシンインヒビター活性の変動
 —, 茎部 (I 茎上部, II 茎下部); ----, 葉部;
 ---, 穂および種子; ---, 根部

性と同じように6日目に最大値を示した。このことは両活性成分ともに発芽時に同じ役割をしているのではないかと推察される。

小麦の発芽時のトリプシンインヒビターおよびキモトリプシンインヒビター活性は変動し、さらにトリプシンインヒビターは小麦の生育、結実といった経過において、生長の盛んな部位で増大が認められた。また幼芽部のトリプシンインヒビターが未発芽種子のインヒビターとは違ったタンパク質であろうと推察される

ことより、小麦に存在するこれらプロテアーゼインヒビターは小麦の代謝制御の役割があるのではないかとすることが強く示唆される。

6. おわりに

小麦穀粒中には胚乳はじめ各部位にプロテアーゼインヒビターが存在し、多くの研究により、現在までに15種類ものインヒビターが単離されている。これらインヒビターは酵素などの生理活性なタンパク質に比較

して熱に対して極めて安定な性質をもっているため、小麦製品を用いた調理、加工後の食物中にその活性の一部が残存している。しかしこれらを摂取したとき、われわれにどのような影響を与えるのか、小麦プロテアーゼインヒビターについては何も検討されていない。これに対して大豆のプロテアーゼインヒビターについては多くの研究報告がある。生大豆で飼育したラットは摂取後ただちに唾液の分泌が増大し⁶⁸⁾、9日後に顕著な膵臓肥大がみられた⁶⁹⁾。雛では大豆プロテアーゼインヒビター摂取後、膵臓肥大と唾液の分泌増加が数日後に遅れて認められた^{70,73)}。膵臓が大きくなるということは、腺細胞の異常増殖・生長により、その部位では細胞数の増加と同時に酵素源腺の枯渇が起り、さらにそれが発育抑制をもたらすということが多くの研究で示された^{74,75,76)}。この阻害機構について Gertler ら⁷⁷⁾はインヒビターが膵臓の肥大とプロテアーゼの合成を促してアミノ酸の要求を増大させ、結果的に内因性窒素の損失をもたらすためであると示唆している。このような現象は小麦プロテアーゼインヒビターを摂取したときにも、同じように起こることが予測される。しかし大豆に比較して、小麦はインヒビター含量が少ないので、摂取したときの影響がどの程度かは実際に検討しなければわからない。

小麦のプロテアーゼインヒビターの存在意義については、小麦の発芽、生育過程でのインヒビターの消長より、小麦の代謝制御のために存在することが示唆された。現在までに小麦には多くのプロテアーゼの存在することが研究報告されている。Prentice ら⁵⁹⁾は市販小麦胚芽より2種類のプロテアーゼを単離している。Wang ら⁶⁷⁾も小麦粉より2種類のプロテアーゼを単離し、その1つはグルテンと会合しており、もう1つはグルテン以外のタンパク質と結合した状態で存在していることを明らかにした。これらプロテアーゼ活性は小麦の貯蔵中に増加することが報告されている⁶⁰⁾。また小麦の発芽、生育過程で種々のプロテアーゼが単離されている。Preston ら^{62,63)}により発芽種子より2種類のカルボキシペプチダーゼが単離され、その性質が明らかにされている。また Prentice ら⁶⁶⁾も発芽種子より1種類の中性ペプチダーゼと2種類の酸性ペプチダーゼを単離している。小麦の生育過程でも、開花、結実、種子の成熟までにプロテアーゼ活性の消長が認められ^{64,65,71,72)}、数種の中性および酸性プロテアーゼが単離されている⁶¹⁾。しかしこれらの酵素はいずれもトリプシン、キモトリプシン様のプロテアーゼではなく、現在まで小麦プロテアーゼインヒビターにより阻害さ

れる内生プロテアーゼは発見されていない。この点を明らかにすることは今後の重要な研究課題の1つである。

以上現在までに小麦プロテアーゼインヒビターに関して明らかにされていることは、ごく一部であり、さらに研究されるべき多くの問題、不明な点が残されている。

われわれがおこなったこの一連の研究の費用の一部は昭和57, 58, 59年度文部省科学研究費補助金および昭和46, 48, 51, 52, 55, 56, 57年度本学研究助成金の援助によるものである。

引用文献

- 1) Osborn, T. B. and Mendel, L. B.: *J. Biol. Chem.*, **32**, 369-347 (1917).
- 2) Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149-152 (1946).
- 3) Hites, B. D., Sandstedt, R. M. and Schaumburg, L.: *Cereal Chem.* **28**, 1-7 (1951).
- 4) Learmonth, E. M. and Wood, J. C.: *Chem. and Indust.* **51**, 1569 (1960).
- 5) Creek, R. D. and Vasaitas, V.: *Poult. Sci.* **41**, 1351-1355 (1962).
- 6) Mitsunaga, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **20**, 153-159 (1974).
- 7) Shyamala, G., and Lyman, R. L.: *Can. J. Biochem.* **42**, 1825 (1964).
- 8) Petrucci, T., Tomasi, M., Cautagli, P. and Silano, V.: *Phytochemistry*, **13**, 2487-2495 (1974).
- 9) Chang, C. R. and Tsen, C. C.: *Cereal Chem.*, **58**, 207-210, (1981).
- 10) Boisen, S. and Djurtoft, R.: *Cereal Chem.*, **58**, 460-464 (1981).
- 11) Mitsunaga, T., Kimura, Y. and Shimizu, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **28**, 419-429, (1982).
- 12) 木村祐子, 光永俊郎, 布浦弘: 日本栄養食糧学会第21回近畿支部大会講演抄録集 p. 51 (1982.)
- 13) 木村祐子, 光永俊郎, 布浦弘: 日本学食糧学会第37回総会講演抄録集 p. 153 (1983).
- 14) Melville, J. C. and Ryan, C. A.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3445 (1972).
- 15) Mitsunaga, T., Manno, K. and Shimizu, M.: *Cereal Chem.* 投稿中.
- 16) Hochstrasser, K. and Werle, E.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **350**, 249-254 (1969).

- 17) Mitsunaga, T. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **25** 43-52 (1979).
- 18) 光永俊郎, 清水まゆみ : 日本農芸化学会誌 **56**, 7-12 (1982).
- 19) Mikola, J. and Kirsi, M. : *Acta Chem. Scand.* **26**, 787-795 (1972).
- 20) Bowman, D. E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **63**, 547 (1946).
- 21) Birk, Y., Gertler, A. and Khalof, S. : *Biochem. J.* **87**, 281 (1963).
- 22) Rackis, J., Sasame, H. A. Anderson, R. L. and Smith, A. K. : *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 6265 (1953).
- 23) Rackis, J., and Anderson, R. L. : *Arch. Biochem. Biophysic.* **98**, 471 (1962).
- 24) Rackis, J. and Anderson, R. L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 230 (1964).
- 25) Frattali, V. and Steiner, R. F. : *Biochemistry* **7**, 521 (1968).
- 26) Odani, S. and Ikenaka, T. : *J. Biochem.* **82**, 1513 (1977).
- 27) 光永俊郎, 西倫子, 清水まゆみ : 家政学雑誌 **34**, 258-261 (1983).
- 28) 光永俊郎, 清水まゆみ : 日本家政学会関西支部研究発表会抄録集 p. 7 (1983).
- 29) Rackis, J. J. : *Food Technol.* **20**, 102-104 (1966).
- 30) Albrecht, W. J., Mustakas, G. C. and McGhee J. E. : *Cereal Chem.*, **43**, 400-407 (1966).
- 31) Mustakas, G. C., Griffin, E. L., Jr., Allen, L. E., and Smith, O. B. : *J. Am. Oilchem. Soc.* **41**, 607-614 (1964).
- 32) Albrecht, W. J., Mustakas, G. C., McGhee, J. E., and Griffin, E. L. : *Cereal Sci. Today* **12**, 81-83 (1967).
- 33) Shurpalikar, S. R., Chandrasekkara, M. R., Swaminathan, M. and Subrahmanyam, V. : *Food Sci.* **11**, 52-64 (1961).
- 34) Hackler, L. R., Van Buren, J. P., Steinkraus, K. H., El-Rawi, I., and Hand, D. B. : *J. Food Sci.* **30**, 723-728 (1965).
- 35) Van Buren, J. P., Steinkraus, K. H., Hackler, L. R., El-Rawi, I., and Hand D. B. : *J. Agric. Food Chem.* **12**, 524-528 (1964).
- 36) Badenkop, A. F. and Hackler, L. R. : *Cereal Sci. Today* **15**, 84-88 (1970).
- 37) Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, E., and Puski, G. : *Cereal Chem.* **51**, 376-382 (1974).
- 38) Churella, H. R., Yao, B. C. and Thomason, W. A. B. : *J. Agric. Food Chem.* **24**, 393-397 (1976).
- 39) Kakade, M. L., and Evans, R. J. : *Br. J. Nutr.* **19** 269-276 (1965).
- 40) Ryan, C. A. : *Biochemistry* **5**, 1592-1596 (1966).
- 41) Marguardt, R. R., Campbell, L. D., and Ward, T. : *J. Nutr.* **106**, 275-284 (1976).
- 42) Woodham, A. A. and Danson, R. : *Br. J. Nutr.* **22**, 589-599 (1968).
- 43) 光永俊郎, 西倫子, 清水まゆみ : 家政学雑誌 **34** (10) 624-627 (1983).
- 44) Boisen, S., and Djurtoft, R. : *Cereal Chem.* **58**, 194-197 (1981).
- 45) Birk, Y. and Waldman, M. : *Vegetabilies*, **12**, 199-209, (1965).
- 46) Shain, Y., and Mayer, A. M. : *Physiol. Plant* **18**, 853 (1965).
- 47) Ryan, C. A. : *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**, 173 (1973).
- 48) Kirsi, M., and Mihola, J. : *Planta* **96**, 281 (1971).
- 49) Travis, J., and Robert, R. C. : *Biochemistry* **8**, 2284 (1969).
- 50) Szilagyi, E. : *Acta Biol. Debrecina* **6**, 157 (1968).
- 51) 光永俊郎, 朝倉直子, 清水まゆみ : 日本農芸化学会誌 **57**, 857 (1983).
- 52) Mayer, A. M., and Shain, Y. : *Annu. Rev. Plant Physiol.* **24**, 173 (1973).
- 53) Samac, D. and Storey, R. : *Plant Physiol.* **68**, 1339 (1981).
- 54) 四十九院成子, 吉田恵子, 福島博保 : 栄養と食糧 **32**, 321 (1979).
- 55) Horiguchi, T. and Kitagishi, K. : *Plant Cell Physiol.* **12**, 909 (1971).
- 56) Lorensen, E., Prevosto, R., and Wilson, K. A. : *Plant Physiol.* **68**, 88 (1981).
- 57) 光永俊郎, 牧野寿子, 清水まゆみ : 日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 29 (1984).
- 58) 光永俊郎, 朝倉直子, 清水まゆみ : 日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 533 (1983).
- 59) Prentice, N., Burger, W. C., Moeller, M. and Kastenschmidt, J. : *Cereal Chem.* **47**, 282-287 (1970).
- 60) Fleming, J. R., Johnson, J. A. and Miller, B. S. :

- Cereal Chem.* **37**, 363-370 (1960).
- 61) Preston, K. R. and Krwger, J. E. : *Can. J. Plant Sci.* **56**, 217-223 (1976).
- 62) Preston, K. R. and Kruger, J. E. : *Phytochemistry* **16**, 525-528 (1977).
- 63) Preston, K. R. and Kruger, J. E. : *Plant Physiol.* **58**, 516-520 (1976).
- 64) Kruger, J. E. and Preston, K. R. : *Cereal Chem.* **54**, 167-174 (1977).
- 65) Evers, A. D. and Redman, D. G. : *Chem. Ind.* **2**, 90-93 (1973).
- 66) Prentice, N., Burger, W. C. and Moeller, M. : *Phytochemistry*, **7**, 1899-1905 (1968).
- 67) Wang, C. C. and Grant, D. R. : *Cereal Chem.* **46**, 537-544 (1969).
- 68) Lyman, R. L., Wilcox, S. S. and Monsen, E. R. : *Am. J. Physiol.* **202**, 1077 (1962).
- 69) Rackis, J. J. : *Federation Proc.*, **24**, 1488 (1965).
- 70) Lepkovsky, S. : *Brit. J. Nutr.* **19** 41 (1965).
- 71) Buskuk, W., Hwang, P. and Wrigley, C. W. : *Cereal Chem.* **48**, 637-639 (1971).
- 72) Kruger, J. E. : *Cereal Chem.* **50**, 122-131 (1973).
- 73) Nitzan, Z. and Bondi, A. : *Brit. J. Nutr.*, **19**, 177 (1965).
- 74) Coates, M. E., Hewitl, D. and Golob, P. : *Brit. J. Nutr.*, **24**, 213 (1970).
- 75) Bredenkamp, B. L. F., and Luck, D. N. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **132**, 537 (1969).
- 76) Salman, A. J., Dalborgo, G., Pubols, M. H., and McGinnis, J. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **126**, 694 (1967).
- 77) Gertler, A., Birk, Y., and Bondi, A. : *J. Nutr.*, **91**, 358 (1967).