米ぬかフィチン酸によるペプシン作用の阻害とその機構

金谷 健一郎, 安本 教傳, 満田 久輝

京都大学農学部食品工学教室

Pepsin Inhibition by Phytate Contained in Rice Bran

Kenichiro KANAYA, Kyoden YASUMOTO, Hisateru MITSUDA

Department of Food Science and Technology, Kyoto University, Kyoto 606

Studies were conducted to detect and identify proteinase inhibitors in rice bran. Water extracts of rice bran exhibited significant inhibitory capacities against trypsin (EC 3.4.21.4) and pepsin (EC 3.4.23.1), but little and practically no inhibitory capacities against α -chymotrypsin (EC 3.4.21.1) and elastase (EC 3.4.21.11) respectively. The trypsin inhibitor appeared to be a thermolabile proteinaceous substance which was relatively abundant in the germ portion. The pepsin inhibitor distributed relatively evenly over the whole bran fraction, and was a highly thermostable substance containing phosphorus in its molecule.

Kinetic analyses of pepsin inhibition by the water extracts of rice bran revealed that the inhibitor combines with the substrate protein so rendering the protein poorly available for the peptic action. Dispersibility of the substrate protein, measured in the media of varied pH, was found to be significantly lowered by the added bran extracts especially under the pepsin assay conditions. Authentic phytate showed essentially the same effect on the protein dispersibility as observed with the bran extracts. Pepsin inhibitory capacities of cereals and soybean paralleled with their phytate contents. These results and other considerations lead to the conclusion that phytate is a factor which accounts for most of the pepsin inhibition by the bran extracts, and also suggest the possibility that the inhibition by phytate may be of some nutritional significance in animals that consume relatively large amounts of phytate.

(Received February 25, 1976)

玄米の搗精時に副生する米ぬかは、精白米にくらべてたん白質含量が高く、その栄養的価値も優れている¹⁾²⁾。著者らは、米粒に含まれる全たん白質をより有効に利用することを目的とした研究の一環として、米ぬかたん白質の抽出・分離および、その食品への利用について研究を進めてきた³⁾⁴⁾。

多くの穀実中には、動物の生長阻害因子や消化酵素の作用を阻害する因子が存在し、これら阻害因子の多くはたん白質であることが知られている⁵⁾。したがって、原料穀実からのたん白質の分離もしくは濃縮に際して、あるいはその加工工程において、これらの因子が最終製品中に残存する可能性がある。実際にダイズの分離たん白や組織状たん白質では、有意量のトリプシン阻害物質が検出されたという報告がある^{6)~8)}。米ぬかの分離たん白質についても同様のことが起こると考えられたので、米ぬかの水抽出液について、プロティナーゼ阻害因子を検索した。その結果、トリプシン (EC 3.4.21.4)、 α -キモトリプシン (EC 3.4.21.1) に対する阻害活性とともに、ペプシン (EC 3.4.23.1) 阻害活性が認められた。自然

界には、ペプシン阻害物質が数例知られているが^{9)~15)}、植物起源のものはみられない。本報告は、このペプシン阻害因子について検討を加え、米ぬかの主要含リン成分であるフィチン酸 (*myo*-inositol hexaphosphate) がおもな原因物質であることを確認したものである。

試料および実験方法

1. 試料・試薬

玄米、白米、米ぬか、ダイズ、コムギふすまは市販品を用いた。米ぬかの種被部分 (糊粉層を含む) と胚芽部分とは比重差を利用して分離調製した。ペプシン (2回結晶化, プタ胃粘膜), トリプシン (2回結晶化, ウシ臍), α -キモトリプシン (3回結晶化, ウシ臍), エラスターゼ (EC 3.4.21.11, 2回結晶化, プタ臍) は、シグマ社の製品を用いた。ペプシンの特異的阻害剤の一種 “ペプシン C” (“ペプスタチン”¹⁵⁾ の N-アセチル類縁体で、S-PI¹⁰⁾¹¹⁾ と同じものは、エーザイ株式会社川島技術研究所より供与されたものである。メトヘモグロビン (酵素基質用, ウシ) はマイルス社より、血清アルブミン (フラクション V, ウシ) はアーマー社より入手した。

2. プロティナーゼ阻害活性

被検抽出液 2ml を酵素液 (0.02% ペプシン, 0.03% トリプシン, 0.03% α -キモトリプシン, 0.01% エラスターゼ, いずれも 0.01M クエン酸緩衝液 pH 4.3 に溶解したもの) 0.4ml に添加し, 37°C で 10 分間あらかじめ保温した混合液についてプロティナーゼ活性を測定し, 無添加の対照と比較して阻害活性を求めた。プロティナーゼ活性は, 上記混合液 0.5ml をそれぞれの基質溶液 (ペプシンには, 0.1M KCl-HCl 緩衝液 pH 1.9 に溶解した 0.5% ウシメトヘモグロビン, その他には, 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.5 に溶解した 1% ミルクカゼイン) 3ml に添加し, 37°C で所定時間保温したのち, 8% トリクロル酢酸 6ml を添加して反応を停止させた。基質の加水分解量は, その上澄中のペプチド, アミノ酸量を紫外外部吸収法および Lowry-Folin 法の Miller による改良法¹⁶⁾で測定した。

3. 阻害因子の水抽出および分別

米ぬか 1g に対し 20ml の水を用いて抽出を行なった。得られた抽出液は弱酸性 (pH 4~5) で, これをアルカリで中和すると多量の白色沈殿を生じ, トリプシン阻害活性の約 90% が上澄中に, ペプシン阻害活性の約 70% が沈殿中に認められた。本報告では, この沈殿法で阻害因子の分別をした。

4. フィチン酸の定量

試料を 5 倍量 (v/w) の 10% トリクロル酢酸で抽出し, 間接的定量法¹⁷⁾の Samotus-Schwimmer による改良法¹⁸⁾でフィチン酸を定量した。すなわち, 被検液に塩化第二鉄を加えてフィチン酸第二鉄の沈殿を生じさせ, 残存する鉄イオンを定量した。沈殿中の Fe:P 比としては 1.18 を用いた。

5. たん白質の水分散度

イオン強度 0.33 におけるたん白質 (ウシメトヘモグ

ロビンおよびウシ血清アルブミン) の水中分散度を 1200 $\times g$, 15 分間の遠心分離における沈殿性より評価した。すなわち, 遠心分離後の上澄中たん白質を Miller の方法で定量し, これを分散可能なたん白質量とした。

結 果 と 考 察

1. 米ぬかのプロティナーゼ阻害活性

Table 1 は米ぬか, ならびに米ぬかから調製した種被および胚芽の水抽出液について, 4 種のプロティナーゼに対する阻害活性を測定した結果である。ペプシン, トリプシンに対しては顕著な阻害活性が認められたが, α -キモトリプシン阻害活性は低く, エラスターゼの場合には阻害活性がまったく検出できなかった。米ぬか水抽出液のトリプシン阻害活性は, ダイズ水抽出液の約 20 分の 1 に相当し, 胚芽に高い分布を示した。これに対してペプシン阻害活性は胚芽よりも, むしろ種被に高い傾向が認められた。

Fig. 1 は, トリプシン阻害因子とペプシン阻害因子とを沈殿法で分別したのち, Sephadex G-75 カラムを用いてゲルろ過を行なった際の溶出パターンを示したものである。なお, ペプシン阻害活性画分 (沈殿画分) は, pH 3 に調節して再溶解させたのちに供試した。トリプシン阻害物質はその溶出位置 (Fig. 1 の上図) からみて, 分子量 10,000 以上であると考えられた。また, 加熱あるいはペプシン消化によって容易に活性が減少した。これらの結果から, 米ぬかに含まれるトリプシン阻害因子は, たん白質の一種であると結論できた。他方, ペプシンに対する阻害因子は, Fig. 1 の下図に示されるような位置に溶出され, 最も高い活性の検出された溶出画分について湿式灰化を行ない, 無機成分の分析を行なったところ多量のリン酸が検出された。また 100°C で 2 時間加熱しても, ほとんどそのペプシン阻害活性を失う

Table 1. Proteinase inhibitory activities in rice bran.

Source ^{a)}	Inhibition degree (%) ^{b)}			
	Pepsin	Trypsin	α -Chymotrypsin	Elastase
Whole bran	23	59	6	0
"Bran"	24	52	—	—
"Germ"	19	79	—	—

^{a)} Rice bran as obtained from commercial source was designated as whole bran and the fractions obtained by winnowing as "bran" and "germ" respectively. They were extracted with 20 volumes of distilled water and the extracts were assayed for the inhibitory activities against the proteinases.

^{b)} Determined by the difference between the proteinase activities of the preincubates with and without the addition of the bran extracts (0.4 ml of the enzyme solution with 2.0 ml of the extracts or buffer solution); 0.5 ml portion of the preincubates was added to 3.0 ml of respective substrate solution to start the proteolysis. Details of the proteinase assay are given in the text.

Fig. 1. Gel filtration patterns from Sephadex G-75 column ($1.8 \phi \times 30$ cm) of trypsin inhibitor fraction (top) and pepsin inhibitor fraction (bottom) prepared from water extracts of rice bran.

The bran extracts were neutralized and subsequently centrifuged. A 2 ml portion (corresponding to 0.2 g of the bran) of the supernatant fraction, in which about 90% of trypsin inhibitory activity originally found in the bran extracts was recovered, was applied on the column and eluted with 0.1 M NaCl (top pattern). A portion (corresponding to 0.8 g of the bran) of the precipitates fraction that contained about 70% of pepsin inhibitory activity originally present in the bran extracts was dissolved in 2 ml of 0.1 M glycine buffer of pH 3, and applied on the column which was then eluted with the glycine buffer (bottom pattern). Effluent was continuously monitored by absorbance at 280 nm and 4 ml fractions were collected and assayed for the inhibitory activities.

ことはなかった。これらのことから、米ぬかのペプシン阻害因子は、リンを含む低分子化合物であろうと推定された。

2. ペプシン作用に対する米ぬか抽出液の阻害機構

ペプシン阻害因子の作用形式を判定するために、種々の基質濃度 (s) におけるペプシン反応の速度 (v) を測定した。Fig. 2 の両逆数プロットにみられるように、阻害形式は拮抗型であった。このような拮抗型阻害がみられる機構としては、

1) 酵素分子に対して、基質とそのアナログ (阻害物質) が拮抗する場合

Fig. 2. Lineweaver-Burk plots for the reaction of pepsin preincubated with (solid circle) and without (open circle) water extracts of rice bran.

Experimental conditions were essentially the same as described in Table 1 except for the varied substrate concentrations and 5 min duration of the proteolytic reaction period.

Fig. 3. Amounts of "Pepsidine C" and the bran extracts required to produce a half inhibition of pepsin activity.

Indicated amounts of pepsin were preincubated with varied amounts of "Pepsidine C" or the bran extracts and assayed for the residual activity by the same procedure as in Table 1. Amounts of the inhibitor to be added to the preincubation mixtures to produce the half inhibition were calculated and plotted against the amounts of pepsin in the preincubates.

2) 基質に対して酵素と阻害物質が拮抗する場合が考えられる。ペプシンに対して 1) の機構で阻害する物質としては多くの例があり、2) の機構によるものとしてはカラギーナン⁽⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁹⁾ が知られている。Fig. 3 はペプシン作用を 50% 阻害するに要した抽出液および「ペ

Table 2. Inhibition of peptic digestion of different substrate proteins.

Substrate	Inhibition degree (%)	
	"Pepsidine C"	Rice bran extracts
Bovine methemoglobin	49	50
Bovine serum albumin	44	21

The experimental conditions were essentially the same as described in Table 1 except for following modifications: amounts of "Pepsidine C" employed for the preincubation was $0.54 \mu\text{g}$ (in total volume of 2.4 ml); 0.4% solution of respective substrate was used and the pepsin reaction was allowed to proceed for 5 min in the medium of ionic strength of 0.03.

プシジンC"量をペプシン量に対してプロットしたものである。"ペプシジンC"の必要量がペプシン量の増加とともに化学量論的な増加を示すのに対して、米ぬか抽出液の必要量はペプシン量とは無関係に一定である。このことは、米ぬか抽出液中の阻害因子がペプシンと複合体を形成する際、その解離定数が酵素濃度にくらべて著しく大きい(1)の機構による場合、あるいはペプシンに直接作用するのではなく、基質との相互作用を通じて、その有効濃度を低減させている(2)の機構による場合)ことを示している。Table 2は、ペプシンの基質としてウシ血清アルブミンとウシメトヘモグロビンを用いた場合の阻害効果を、米ぬか抽出液とペプシジンについて比較したものである。"ペプシジンC"がいずれの基質の場合も同程度に阻害したのに対して、米ぬか抽出液は基質によって阻害度を異にし、血清アルブミンを基質とした場合の阻害度は酸変性ヘモグロビンの場合の約40%にしかすぎなかった。これらのことから、米ぬかに含まれているペプシン阻害因子は、2)の機構によって阻害する可能性が考えられた。また、Fig. 2において米ぬか抽出液添加系では、基質濃度が 0.4% より低い(1/sが2.5より大きい)領域で、直線関係からの著しいずれが観察される。このようなずれは、2)の機構に特徴的なものとされている²⁰⁾。

3. ペプシン阻害物質

阻害形式に関する知見から、米ぬかに含まれるペプシン阻害因子はウシメトヘモグロビンやウシ血清アルブミンと相互作用して、これらのたん白質をペプシンの作用しづらい状態に変換させると推定された。ところでダイズ、落花生、棉実^{21)~23)}あるいは米²⁴⁾などの種実たん白質が、その等電点より酸性領域でフィチン酸と結合し、その水中分散度を減ずることが知られている。米ぬか中には、総リン量の約90%、米ぬか重量の約10%に相当するフィチン酸が含まれており²⁴⁾²⁵⁾、その大部分は水易溶性である²⁶⁾。著者らも、米ぬかたん白質を抽出・分離する際に多量のフィチン酸が混入することを認めてい

Fig. 4. Dependence on pH of dispersibility of bovine methemoglobin in the presence (solid circle) and absence (open circle) of the bran extracts.

To each 1 ml of 3% bovine methemoglobin was added 0.4 ml of the bran extracts or distilled water; the mixture was filled up to 3 ml with HCl, NaOH, or NaCl solution to produce the suspensions of indicated pH and of a constant ionic strength (0.3 to 0.35), and then left overnight at room temperature for equilibration; dispersibility was calculated from the amount of protein found in the supernatant after centrifugation of the suspensions at $1200 \times g$ for 15 min.

る³⁾⁴⁾。そこで、米ぬか水抽出液と別に化学標品として得られるフィチン酸のカルシウム塩との両者について、基質として用いたウシメトヘモグロビンの水中分散度に与える影響を比較検討した。Fig. 4に示したように、米ぬか抽出液はヘモグロビンの分散度をその等電点の両側、とくに酸性側で著しく低下させている。ここでとくに注目されるのは、ペプシンのプロテナーゼ作用の至適pHとされる $1.5 \sim 2.5$ 近辺で分散度の低下(すなわち両曲線間の差)が最も著しいことである。Fig. 5は、ウシメトヘモグロビンの水中分散度に及ぼすフィチン酸濃度の影響を米ぬか抽出液とフィチン酸カルシウムについてpH 2.1で比較したものである。両者の間には、有意の差がほとんど認められない。このことから、米ぬか

Fig. 5. Dispersibility of bovine methemoglobin as a function of phytate concentration. Dispersibility of the protein was determined by the procedure described in Fig. 4. The medium, pH 2.1 and ionic strength of 0.25 to 0.34, contained the indicated concentration of either the authentic phytate (solid circle) or the bran extracts (open circle), concentration of which was expressed in terms of the endogenous phytate. Phytate assay procedure is given in the text.

Fig. 6. Dispersibility of bovine methemoglobin (top) and bovine serum albumin (bottom) in the presence and absence of authentic phytate at varied pH.

The experimental conditions and the symbols were essentially the same as in Fig. 4.

抽出液によるウシメトヘモグロビンの酸性領域における水中分散度の低減は、主としてフィチン酸に起因するものと推定された。Fig. 6は、ウシメトヘモグロビンとウシ血清アルブミンの水中分散度に及ぼすフィチン酸カルシウムの影響を比較したものである。いずれのたん白質も、フィチン酸カルシウムによってペプシンの至適 pH

Fig. 7. Relationship between phytate contents of and pepsin inhibitory capacities of cereals and soybean.

Materials were extracted with 20 volumes of water, and the extracts were assayed for the phytate contents and the pepsin inhibitory activities by the procedures described in Table 1 and in the text. Materials: 1, brown rice; 2, polished rice; 3, rice bran; 4, rice germ; 5, wheat bran; 6, soy bean.

近辺で分散度を著しく低下させられており、この結果は Fig. 4 の米ぬか抽出液による場合と良く符合している。ところで、これら両たん白質の分散度が影響を受ける pH の範囲に差のあることは注目される。Table 2 において、これら両たん白質を基質とした場合の米ぬか抽出液による阻害度に差異が認められたが、これはペプシン活性を測定している pH 範囲 (pH 1.8~2.0) において、ウシ血清アルブミンの分散度がウシメトヘモグロビンにくらべて、かなり大きいことに起因するものと考えられる。

フィチン酸は米ぬかのみならず、米胚乳部や他の穀類、豆類などにも多く含まれている。Fig. 7 は玄米、精白米、米ぬか、米胚芽とダイズおよびコムギふすまについて、これらのフィチン酸含量と、その水抽出液が示すペプシン阻害度との関係を示したものである。両者の間には、明らかな相関関係が認められる。

光永はコムギ、とくにそのふすまにペプシン阻害因子が存在することを指摘している²⁷⁾。このものが熱に對しきわめて安定である点は、著者らの結果と一致している。植物界ではこのほかに、じゃがいもの粗抽出液から硫酸アンモニウム分画法で得られたトリプシン阻害因子がペプシンをも不活性化するという Werle らの報告²⁸⁾²⁹⁾がある。しかしながらその後、じゃがいものペプシン阻害因子が単離・精製されたという報告はない。

フィチン酸は古くより、穀類、豆類におけるくる病

誘発因子の一つとされており³⁰⁾、高フィチン食を摂取したヒトや動物では、Ca, P, Fe, Zn 等の吸収率が低下すると報告されている^{31)~34)}。他方、フィチン酸はカルシウムやリン、とくにイノシトールの重要な供給源だとも考えられている^{35)~38)}。またシネルギストもしくは金属イオンの捕獲剤として、各種の抗酸化剤と併用される場合もある。今回著者らが得た結果は、食品中のフィチン酸がペプシン作用を阻害することによって、たん白質の消化率に影響を及ぼす可能性を示唆している。

要 約

- 1) 米ぬかの水抽出液は、トリプシン、 α -キモトリプシンおよびペプシンの作用を阻害した。
- 2) トリプシン阻害物質が非耐熱性高分子であるのに対して、ペプシン阻害物質は耐熱性低分子としての性質を有していた。
- 3) ペプシン阻害物質は、米ぬか中の主要な含リン成分であるフィチン酸 (*myo*-inositol hexaphosphate) であると判断され、玄米、白米、米ぬか、米胚芽、ダイズおよびコムギふすまのフィチン酸含量とこれらの水抽出液が示すペプシン阻害度との間には高い相関関係が認められた。
- 4) フィチン酸によるペプシン作用の阻害は、フィチン酸がペプシンの至適 pH 近辺で正に帯電した基質たん白質と相互作用し、ペプシンの作用しにくい状態に変換させる結果として誘起されるものと推定された。

文 献

- 1) Houston, D.F.: Rice Bran and Polish, in "Rice Chemistry and Technology" (ed. Houston, D.F.), The American Association of Cereal Chemists, 272 (1972)
- 2) Mitsuda, H. and Yasumoto, K.: The Amino Acid Fortification of Intact Cereal Grains, in "New Protein Foods," Vol. 1A (ed. Altschul, A.M.), Academic Press, 121 (1974)
- 3) 満田久輝, 村上和雄, 高木宗司: 栄養と食糧, **23**, 80 (1970)
- 4) 満田久輝, 池田清和, 安本教伝: 栄養と食糧, **26**, 171 (1973)
- 5) Liener, I.E.: Toxic Factors in Protein Foods, in "Proteins in Human Nutrition" (ed. Porter, J.W.G. and Polls, B.A.), Academic Press, 481 (1973)
- 6) Rackis, J.: *Food Technol.*, **20**, 1482 (1965)
- 7) Bressani, R., Teri, F.U., Elias, L.G., Saghi, S., Alvarado, J. and Odell, A.D.: *J. Nutr.*, **93**, 349 (1967)
- 8) Cogan, U. and Zimmerman, G.: *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 196 (1968)

- 9) Abu-Erreish, G.M. and Peanasky, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 1558 (1974)
- 10) Fukumura, M., Satoi, S., Kuwana, N. and Murao, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1310 (1971)
- 11) Murao, S. and Satoi, S.: *ibid.*, **35**, 1477 (1971)
- 12) Morishima, H., Takita, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: *J. Antibiotics*, **23**, 263 (1970)
- 13) Levey, S. and Scheinfeld, S.: *Gastroenterology*, **27**, 625 (1954)
- 14) Anderson, W. and Watt, J.: *J. Physiol.*, **147**, 52 (1959)
- 15) Houck, J.C., Bhayana, J. and Lee, T.: *Gastroenterology*, **39**, 196 (1960)
- 16) Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 964 (1959)
- 17) Oberleas, D.: The Determination of Phytate and Inositol Phosphates (ed. Glick, D.), Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers, Vol. 20, 87 (1971)
- 18) Samotus, B. and Schwimmer, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 389 (1962)
- 19) Vaughan, O.W., Filer, L.J. Jr. and Churella, H.: *J. Agr. Food Chem.*, **10**, 517 (1962)
- 20) Webb, J.L.: Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, Vol. 1, 173 (1963)
- 21) Foutain, T.D., Pons, W.A. Jr. and Irwing, G.W. Jr.: *J. Biol. Chem.*, **164**, 487 (1946)
- 22) Bourdillion, J.J.: *ibid.*, **189**, 65 (1951)
- 23) Courtois, J.E. and Delrieu, P.: *Biochem. Appl.*, **5**, 65 (1958)
- 24) 斉尾恭子, 久保彰治: 農化誌, **36**, 163 (1962)
- 25) McCall, E.R., Jurgens, J.F., Hoffpauir, C.L., Pons, W.A. Jr., Stark, S.M. Jr., Cucullu, A.F., Heinzelman, D.C., Cirino, V.C. and Murray, M.D.: *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 988 (1953)
- 26) 森 治夫: 栄養と食糧, **16**, 442 (1962)
- 27) Mitsunaga, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **20**, 153 (1974)
- 28) Vogel, R., Trautschhold, I. and Werle, E.: 蛋白質分解酵素インヒビター (鈴木友二ら訳), **34** (1974), 共立出版
- 29) Werle, E., Appel, W. and Happ, E.: *Z. Vitamin-, Hormon-u. Fermentforsch.*, **10**, 127 (1959); *Chem. Abstract*, **54**, 21342-d (1960)
- 30) Harrison, D.C. and Mellanby, E.: *Biochem. J.*, **33**, 1660 (1939)
- 31) McCance, R.A. and Widdowson, E.M.: *J. Physiol.*, **101**, 44, 304, 350 (1942)
- 32) 土屋重義: 栄養と食糧, **6**, 120 (1953)
- 33) O'Dell, B.L. and Savage, J.E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 304 (1960)
- 34) Sharp, L.M., Peacock, W.C., Cooke, R. and Harris, R.S.: *J. Nutr.*, **41**, 433 (1950)
- 35) Hoff-Jørgensen, E., Anderson, O. and Nielsen, G.: *Biochem. J.*, **40**, 555 (1946)
- 36) Pileggi, V.J., DeLuca, H.F. and Steenbock, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 194 (1955)
- 37) Woolley, D.W.: *J. Biol. Chem.*, **140**, 461 (1941)
- 38) Eagle, H., Oyama, V.I., Levy, M. and Freeman, A.E.: *ibid.*, **226**, 191 (1957)

(昭和51年2月25日受理)