総 説

植物性食品のプロテアーゼインヒビターに関する研究*

伊 吹 文 男

京都府立大学農学部農芸化学科

Studies on the Proteinase Inhibitors in Plant Foodstuffs

Fumio IBUKI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyoto Prefectural University, Sakyo-ku, Kyoto

1. はじめに

動物腸内において、たん白質消化に主要な働きを示すトリプシン、キモトリプシンなどのプロテアーゼを阻害するたん白質、すなわちプロテイン・プロテアーゼインヒビター（以下インヒビター）は広く植物界一般、とくにマメ科植物 *Leguminosae* に存在し、単離精製の報告がなされているものは、現在数十に及んでいる^{1)~4)}。ダイズ粉の水抽出液が、トリプシンやタカジアスターゼのプロテアーゼのゼラチン液化を阻害することが、Read および Haas⁵⁾ によって 1938 年報告されたのが、植物性トリプシンインヒビターに関する最初の知見と思われる。このときすでに、ダイズ抽出液はパバインやプロメラインのプロテアーゼ活性を抑えないことも見だしている。一方、生ダイズを与えて飼育したラットは、加熱ダイズを与えたものと比較して成長抑制のおこることも、すでに今世紀のはじめから知られていた¹⁾。この熱不安定成長抑制因子は現在、ダイズトリプシンインヒビター（STI）としてよく知られているところである。このように、インヒビターは元来、動物飼料中に含まれる成長抑制因子の一種、すなわちある意味での毒物として、栄養学者の注目をひき現在もおインヒビター研究の重要課題となっている。このことは Liener によって編集・出版された “Toxic Constituents of Plant Food Stuffs”¹⁾ のなかにプロテアーゼインヒビターが含まれていることでも明らかである。また Kunitz⁶⁾ によるダイズトリプシンインヒビターの結晶化以来、インヒビターは異種たん白質間の相互作用を研究するうえでの恰

好の材料として、生化学者の興味ある題材ともなっている。とくに Laskowski, Jr. 一派の研究は、インヒビターの阻害機構解明に大きな貢献をなした⁷⁾。現在、完全に一次構造の決定されたもの、あるいは部分的に解明されつつあるインヒビターは、植物由来のもののみでも 10 種にとどまらない⁸⁾。近年、消炎剤として実際に治療面にインヒビターが臨牀的に用いられるに及んで、より広い関心をもたれるようになった⁴⁾。しかし、植物におけるこの広いインヒビターの存在にもかかわらず、その生理的意義については、植物生理学者を中心とする研究によっても、いまだ推測の域を出ない⁹⁾¹⁰⁾。

さて、Liener¹⁾ も述べているように、われわれ人間は直接、間接に植物を摂取して生きているのに、植物性食品に多種多様に含まれている毒性成分が、顕著な障害を現わさないのはどうしてであろうか。急性毒性を示すものは、経験的に摂取することを避けたのであろうし、また調理、加工することによって、無毒化することを知ったからであろう。現在、最もよくインヒビターの研究が行なわれているマメ類についていえば、飼料として用いる以外は、まずわれわれが生食することはないであろう。このことは、後述するが比較的良好インヒビターの研究が行なわれている穀類についても同じことがいえる。しかし比較的生食する機会の多い蔬菜類については、インヒビターの研究は、ほとんどないのが現状である¹¹⁾。本総説はここ数年来、著者が行なってきたナス *Solanum melongena* L. のインヒビターを中心に、植物性食品のプロテアーゼインヒビターについての概説を行なうものである。なお、この章に記した以外の総説^{12~16)}をも参考にしていただければ幸いである。

* 本総説は昭和53年度日本栄養・食糧学会賞の対象となったものである。

2. インヒビターの存在、分布および活性測定

すでに述べたように、マメ科植物の種子には、ほとんど例外なくインヒビターが存在している。とくにダイズは古来より重要なたん白質資源であり、インヒビター研究の最もよい材料でもある。Kunitz のトリプシンインヒビター (STI, 分子量 20,100) と Bowman-Birk インヒビター (BBI, 分子量約 8,000) は、一次構造、反応機構の解析などにしばしば用いられ、インヒビターの基礎的研究の素材となったものである⁸⁾。最近、Odani および Ikenaka によってダイズより、さらに BBI と性質のよく似たインヒビターが単離され、進化や遺伝の問題とも関連して、興味ある報告がなされている^{17)~21)}。また Hwang らによっても同じような結果が報告されている²²⁾。ダイズ以外では、アズキ^{23)~25)}、キントキマメ²⁶⁾、カラスノエンドウ²⁷⁾²⁸⁾、ヒヨコマメ²⁹⁾³⁰⁾からそれぞれトリプシンやキモトリプシンあるいは両者を阻害するインヒビターが、ここ数年に報告されている。また、いままでにインヒビターの存在がすでに知られているササゲマメからも新たに2種のインヒビターの存在が報告されている³¹⁾。

イネ科植物 *Gramineae* は古来より、われわれ人類にとって最も重要な栽培植物であり、たん白質資源としてよりは、むしろ糖質資源として利用されてきたものである。しかしコムギたん白質³²⁾は比較的早くより研究が行なわれ、またコメたん白質も近年よく研究されている³³⁾。

コメ、オオムギ、コムギ、ライムギなどイネ科植物の種子に、また牧草アルファルファでは葉にインヒビターが存在している¹⁾²⁾³⁴⁾。最近もオオムギ³⁵⁾やコメヌカ³⁶⁾

からのインヒビターの報告がある。イネ科には属さないが、ある地方では主食として用いられていたソバからもインヒビターの存在が認められた³⁷⁾。

さてナス科植物³⁸⁾ *Solanaceae* には元来有毒植物が多く、チョウセンアサガオやハシリドコロなどアルカロイドを含むものは、古くより医薬に用いられてきた。タバコ、トウガラシ、クコなどもナス科に属するが、食用植物として広く栽培されているのはジャガイモ、トマト、ナスである。ジャガイモ *Solanum tuberosum* には、最も多種多様のインヒビターの存在が知られ、トリプシンキモトリプシン以外にカルボキシペプチダーゼを特異的に阻害するインヒビターも存在する。これらについては、一次構造その他詳細な研究⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾³⁹⁾⁴⁰⁾がなされているが、とくに Iwasaki ら⁴¹⁾⁴²⁾による活性フラグメントの研究は興味深い。Ryan⁹⁾ によるトマト *Lycopersicon esculentum* Mill のキモトリプシンインヒビターの研究は、たん白質化学的なものではなく、傷つけた葉にインヒビターの蓄積がおこる現象を認めたもので、植物生理学的に、またインヒビター存在意義を考察するうえで注目すべきものである。先述のハシリドコロ *Scopolia japonica* の培養細胞から Sakato ら⁴⁴⁾によって低分子量のインヒビターが見つけられている。

世界の各地で古くより主食に近い食物として用いられているイモ類は植物分類学的には多様であるが、ジャガイモ以外サツマイモ¹⁾、サトイモ⁴⁵⁾、クワズイモ⁴⁶⁾などにインヒビターが認められている。このようにインヒビターの分布は、予想以上に広く、インヒビターの存在しない植物はないのではないかと考えられるほどであり、今後より広い検索が期待される。

Fig. 1. Specific activities of trypsin inhibitor in various parts of eggplant at 3 weeks after the flowering.

1, flower; 2, flower bud other than calyx; 3, flower bud calyx; 4, fruit sarcocarp; 5, fruit exocarp; 6, fruit calyx; 7, old leaves; 8, young leaves; 9, stem; 9', graft stock; 10, root

さて、ナスでは、すでに秦ら⁴⁷⁾によって、その種子中にトリプシンインヒビター活性がみつめられている。著者らは、数年にわたって圃場にナス苗を栽培し、ナス苗各部のトリプシンインヒビター活性を測定^{48)~50)}してきた。その結果の一例を Fig. 1 に示す。ナス苗は一般に耐病性の点を考慮して、接木苗が用いられており、Fig. 1 は現在食用に最も広く用いられているセンリョウ実生苗と、アカナスを接木台木として用いたものの、開花結実後、3週間目の各部位のインヒビターの比活性を比較したものである。Green および Ryan⁴⁹⁾ がトマトで報告しているのとは異なり、ナスでは、あらゆる部位に活性がみつめられた。とくに可食部では、果皮に比活性が強く、量的にも多いことから、果皮よりインヒビターの精製を試みることもとなった。

さて、ここでインヒビターの活性測定法について概説する^{51)~56)}。トリプシン、 α -キモトリプシンは通常ウシスイ臓より結晶状に単離されたものが用いられる。天然基質としてはカゼインを用いるのが最も多く、ペプシンに対してはヘモグロビンが用いられる。合成基質としては α -N-ベンゾイルアルギニン- ϵ -カニトロアニリド (BANA) がトリプシンに、 α -N-ベンゾイルチロシン- ϵ -カニトロアニリド (BTNA) がキモトリプシンに対して用いられる。アミノ酸としては DL 体、あるいは L 体 が用いられる。これらの基質は加水分解によって ϵ -カニトロアニリンを生成し、黄色を呈するため、クロモゲン基質といわれ、広く用いられているが、水に溶けにくいのが欠点である。トシルアルギニンメチルエステル (TAME)、アセチルチロシンエチルエステル (ATEE) はそれぞれ、トリプシン、キモトリプシンに対する合成エステル基質で、クロモゲン基質を用いるより、感度が高いため用いられるが、プロトンの遊離を測定するために、pH スタットの装置を必要とする。しかし、とくに Fig. 1 に示した実験のように細胞顆粒体などがある程度、含んでいるような試料の活性を測定するには、最適の方法であり、Fig. 1 は、pH スタットを用いて、TAME を基質として測定した結果である。つねにインヒビター試料を加えないときのプロテアーゼの活性を標準として、インヒビターを添加したときの阻害率でインヒビターの活性は示されるが、著者らは通常、1 mg のプロテアーゼを阻害するインヒビター量をもって 1 ユニットと定めている。

以上、要するにインヒビター活性の測定はプロテアーゼ活性測定と密接な関連性がある。現在も水可溶性の合成基質 N -ベンゾイル-アルギニン- ϵ -アミノ安息香酸をトリプシンに対して用いる方法⁵⁷⁾、蛍光基質として、7-アミノ-4-メチルクマリンをアシルアミノ酸に結合させたものを用いる方法⁵⁸⁾、¹²⁵I で標識化したたん白質を、

さらにセファローズに結合させたものを基質として用いる⁵⁹⁾など、新しい測定法が研究されている。とくに蛍光基質を用いたものは、プロテアーゼとして 1 ng 単位の測定が可能である (通常は 5~20 μ g)。また古くから用いられているカゼイン法やカゼイン寒天プレート法に対しても、より正確な方法⁶⁰⁾⁶¹⁾が提唱されているので参考にされたい。

先述のようにナス果実では果皮に最も多くインヒビターが存在することが判明したので、果皮よりたん白質としてインヒビターを調製することを試みた。粗インヒビターの段階で阻害活性を測定し (Fig. 2)、またインヒビターの種類を検索すべく、焦点電気泳動を行なった結果が Fig. 3 である⁵¹⁾。このインヒビターは、ナス果皮を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) で磨碎、抽出液を 80°C、20 分加熱したのち、濾過、濾液を硫酸 80% 飽和で沈殿する画分を透析したものである。Fig. 2 に示すように、粗な段階でも、トリプシンに対し化学量論的な阻害を示しており、インヒビターの存在がたしかである。また Fig. 3 では、このインヒビターは明らかに 450 nm で測定されている色素物質とは分離される性質のもので

Fig. 2. The trypsin inhibitory activity of the crude inhibitor.

Fig. 3. Isoelectrofocusing of the crude inhibitor. — absorbance at 280 nm, -- absorbance at 450 nm, ● pH, ○ trypsin inhibitory activity

あることがわかった。同時に、pH 4.7 に等電点を示すインヒビター画分の他に、量的には少ないが、2, 3 のインヒビターの存在することが確認された。

3. 単離と精製

先章で述べた粗インヒビター調製のさいに、著者らはインヒビター活性の一部が着色物質とともに透析膜セルロースチューブよりもれることを知った⁵¹⁾。この透析外液に出てくるインヒビター活性は、褐色の着色物質とほぼ挙動をともし、着色物質が外液にでてなくなるまで、透析外液を何度も交換することによって、透析膜内部に保たれるインヒビター画分と外液に出てくるインヒビター画分に分別することができた。著者らは、この時点においては、ナス果皮抽出液には、高分子性のインヒビターと、透析膜を通過する低分子性のインヒビターが存在するものと考え、それぞれ別個に精製を試みた⁵²⁾⁵³⁾。すなわち高分子性のものについては、すでに脱塩されているので以後、DEAE セルロースクロマトグラフィーによる脱色、ゲル濾過などによって部分的に精製を行ないその性質を研究したが、精製が進むにつれ、透析操作を行なうと、インヒビター活性が損失していくことが判明した。

これに対し透析性低分子量インヒビターと考えられるものは、透析外液を 40°C 以下で減圧濃縮、脱塩はすべてダイアフィルター（膜として、G-01T、分子量 1,000 以下通過を使用）を用いて行ない、脱色後、セファデックスの G-25、G-50 によるゲル濾過をくり返して、たん白質化学的にみて、完全に均一な標品にまで精製することができた⁵⁴⁾。

この両者を比較してみると各種プロテアーゼに対する阻害特異性はよく一致していた。その後、透析膜内に残存するインヒビターを DEAE-セファデックス A-25 クロマトグラフィー、セファデックス G-50 によるゲル濾過にて均一なものとして精製し、トリプシン、キモトリプシンに対する阻害様式、アミノ酸組成などを検討したところ、透析外液より均一標品として精製したものと、すべての点で完全に一致した⁶²⁾。現在低分子性インヒビターとして代表的なものは分子量約 8,000 のダイズの BBI であり、分子量 10,000 以下のものを一般に低分子性と分類しているが、その調製法を検討してみても、とくに透析に注意を払っているものは少ない²²⁾⁴⁴⁾。その理由の一つとしてインヒビターの会合性があげられ、実際は二量体、三量体で存在することが多く⁶³⁾、分子量が大きくなっているためではないかと考えられる。しかしナスのインヒビターの場合は、プロテアーゼとの結合、分子量測定の結果から考えても、インヒビター同士の会合は、非常に考えがたく、粗インヒビターの一部が非透析

性となるのは、むしろ色素物質との関連ではないかと考えているものの、詳細は不明である。以上要するに、透析性、非透析性と考えていたインヒビターは、まったく同一のたん白質であり、収量の点を考慮して以下の精製法⁶⁴⁾に従って調製した。

要点は、できるだけ透析を避けるために揮発性の緩衝液を用いたことと、セルロースチューブを無水酢酸-ピリジン中でアセチル化して、膜目を細かくしたものを透析に用い、インヒビターたん白質がいったい、透析外液にももれないようにしたことである。Fig. 4 はナス果皮抽出液の 80% 硫酸飽和沈殿画分を、透析脱塩後凍結乾燥したものを *N*-エチルモルフォリン-酢酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、同じ緩衝液を用いて行なった DEAE-セルロースクロマトグラフィーの溶出図を示している。この条件で、粗抽出液の段階から存在していた褐色色素は強くカラムに吸着され、インヒビター画分は、ほとんど吸着されることなくカラムを素通りしてくる。この主活性部分を集め、ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 5.4) を用いて、DEAE-セファデックス A-25 のカラムクロマトグラフィーを行なった結果を Fig. 5 に示す。インヒビター画分は、カラムに吸着されたのち、食塩濃度勾配によって溶出された。Fig. 4 では、インヒビター画分の前に、Fig. 5 では後にそれぞれインヒビターの小さいピークが認められているが、これが先述した焦点電気泳動 (Fig. 3) で認められた量の少ないインヒビターである。メインインヒビター画分を集めて、セファデックス G-50 を用いるゲル濾過を行なったのが Fig. 6 で、たん白質とインヒビターのピークは完全に一致した。このたん白質は、ディスク電気泳動 (pH 9.4, 7.5% ゲル)、および SDS

Fig. 4. DEAE-cellulose chromatography of 80% ammonium sulfate fraction.
● absorbance at 280 nm, ○ trypsin inhibitory activity

Table 1. Summary of the purification procedure for the eggplant trypsin inhibitor.

Fraction	Volume (liter)	Protein (mg) ^a	Total activity (units) ^b	Specific activity (units/mg protein)	Ratio	Yield (%)
Extract	43.0	98,900	1,630	0.0165	1.00	100
Heat treatment	38.4	74,300	1,610	0.0217	1.32	98.8
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate (0.8 satn.)	3.10	7,910	1,590	0.201	12.2	97.5
DEAE-cellulose chromatography	5.00	1,310	1,090	0.832	50.4	66.9
DEAE-Sephadex A-25 chromatography	0.670	205	683	3.33	202	41.9
Sephadex G-50 gel filtration	0.313	202	682	3.38	205	41.8

^a Protein=nitrogen content×6.25.

^b 1 unit=the amount of inhibitor required for the complete inhibition of 1 mg of active trypsin based on the casein-digestion method.

Fig. 5. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of the active fraction obtained by DEAE-cellulose chromatography.

● absorbance at 280 nm, ○ trypsin inhibitory activity, -- NaCl concentration

Fig. 6. Sephadex G-50 gel filtration of the inhibitor obtained by DEAE-Sephadex A-25 chromatography.

● absorbance at 280 nm, ○ trypsin inhibitory activity

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (20% ゲル) で完全に 1 本のバンドを示し、その均一性が確認された。以上の結果をまとめたのが Table 1 であり、28 kg のナス果皮 (果実にして約 280 kg) から 200 mg の均一なインヒビター標品を得ることができた。

ナスは比較的容易にかつ安価に入手しうるが夏期に限られるのが欠点である。現在著者らは、夏期ナス果皮をアセトン粉末として保存する手段をとっている。アセトンによって相当量のナス色素が除かれ、さらに、インヒビター抽出にはまったく影響を与えないがアセトン処理によって相当量のたん白質が変性され、最初の抽出段階ですでに 10 倍ほど比活性があがっているという結果を得ている。なおこのアセトン粉末より調製したインヒビ

ターは新鮮なナス果皮から調製したものと、まったく変わらない。

さて 1 種類の植物からは、数種類のインヒビターが見いだされているのが通常である。プロテアーゼに対する特異性を異にするもの、あるいは、特異性や分子量もほぼ同一でありながら、たん白質構造の異なるものなど多種多様であり、イソ酵素にならってイソインヒビターとよばれることもある^{37,30)}。Fig. 4, 5 で示したように、ナス果皮からも、主インヒビター以外に、その存在が認められているので、その単離を試みた⁵⁶⁾。主インヒビターと比較してあまりにその量が少なく、総活性にして、主インヒビターの 2% 弱しか認められず、著者らはこれ

Table 2. Inhibitory specificities of the main and minor inhibitors.

Inhibitor	pI	Inhibitory activity unit		
		Trypsin	Chymotrypsin	Ratio ^a
Main inhibitor	4.66	3.056	1.949	0.64
Minor inhibitor (I)	4.36	0.658	0.923	1.40
	5.98	0.586	1.124	1.92
Minor inhibitor (II)	4.06	0.264	0.187	0.71
	4.51	0.574	0.287	0.50

^a The ratio value was calculated by the following equation; chymotrypsin inhibitory activity/trypsin inhibitory activity.

をマイナーインヒビターと称している。なお、このように1種のインヒビターが圧倒的に多い例はほかにもある⁴⁶⁾。粗インヒビター画分の脱色のさい、DEAE-セルロースクロマトグラフィーにおいて、主インヒビターの前に溶出する画分をマイナーインヒビター (I)、DEAE-セファデックスA-25 のクロマトグラフィーで主インヒビターのあとに溶出される画分をマイナーインヒビター (II) とした。これら (I)、(II) のインヒビターは、焦点電気泳動によって、さらにそれぞれ等電点を異にする2種のインヒビターに分画された (Fig. 7, 8)。次章以後では、主インヒビターにのみ限って稿を進めてゆくの、やや前後するが、マイナーインヒビターの特性をTable 2 に示しておく。ゲル濾過 (セファデックス G-50) を用いて測定したマイナーインヒビターの分子量はいずれも 6,200~6,500 であった。とくにマイナーインヒビター (I) は、キモトリプシンをトリプシンよりも強く阻害する点で、明らかにマイナーインヒビター (II) や主インヒビターとも異なっている。マイナーインヒビター (II) のうち pI 値、4.51 のものは、主インヒビターと相同と考えられ、主インヒビターを含めて、ナスには最低4種類のインヒビターの存在することが明らかとなった。

4. 特 性

たん白質化学的にみて、ナス果皮より調製したインヒビターが均一であることはすでに前章で述べた。本章では分子量の問題、アミノ酸組成の特異性について述べたのち、インヒビターの特性を論じる。

分子量の測定として、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、セファデックスG-50 を用いるゲル濾過法および沈降平衡法を用いた⁶⁵⁾。結果は Fig. 9 に示すとおりで、いずれも、分子量はほぼ6,000であることを示している。また沈降平衡の結果は電気泳動の単一バンドの結果同様、本インヒビターが完全に均一なたん白質であ

Fig. 7. Isoelectrofocusing pattern of the minor inhibitor (I).

● absorbance at 280 nm, ○ trypsin inhibitory activity, -- pH at 25°C

Fig. 8. Isoelectrofocusing pattern of the minor inhibitor (II).

● absorbance at 280 nm, ○ trypsin inhibitory activity, -- pH at 25°C

ることを示しているとともに会合性も有していないことを示唆している。

Table 3 はトリプシンインヒビターのアミノ酸組成を、他の分子量 10,000 以下のインヒビターと比較のものに表示したものである。ダイズではよく知られている

Table 3. Amino acid composition of trypsin inhibitors from eggplant and others.

Amino acid	Eggplant ⁶⁴⁾	Soybean			Azuki bean ²³⁾	<i>Scopolia japonica</i> ⁴⁴⁾		Potato ⁶⁸⁾ A-5
		BBI ^{66) 67)}	C-II ¹⁷⁾	II ²²⁾		I-1	I-5	
Lys	4	5	3	4	4	3	3	5
His	0	1	3	1	4	2	1	0
Arg	3	2	4	5	3	5	2	2
Asp	7	11	13	10	9	9	5	7
Thr	2	2	4	3	3	4	2	3
Ser	4	9	12	8	10	3	4	4
Glu	5	7	4	5	6	6	3	5
Pro	5	6	5	5	6	3	0	3
Gly	7	0	1	1	1	6	4	7
Ala	3	4	4	0	3	5	2	3
Cys/2	8	14	14	14	12	2	0	8
Val	0	1	0	0	1	1	1	1
Met	0	1	3	3	2	0	3	0
Ile	4	2	1	1	2	4	0	3
Leu	2	2	3	3	4	0	0	2
Tyr	2	2	1	2	0	2	0	4
Phe	2	2	1	1	1	2	2	2
Trp	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	58	71	76	66	71	57	32	58
M.W.	6203	7865	8315	7538	7894	6283	3963	6426

Fig. 9. Molecular weight determination of the purified inhibitor.

(a) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (b) Gel filtration on Sephadex G-50. (c) Equilibrium centrifugal analysis. The marker proteins are: 1, bovine insulin (*M.W.* 5730); 2, horse cytochrome *c* (*M.W.* 12400); 3, whale myoglobin (*M.W.* 17800); 4, bovine chymotrypsinogen A (*M.W.* 25000); 5, ovalbumin (*M.W.* 45000).

BBI と最近相次いで報告された BBI 類似のインヒビターの一部を示した。なお BBI のアミノ酸組成は Frat-tali⁶⁶⁾ が示したデータよりアスパラギン酸が一つ少ない Odani および Ikenaka⁶⁷⁾ らのものを示した。特徴的なことは、すべての低分子性インヒビターにトリプト

ファン欠けていることである。このことは分子量 8,000~9,000 のライマビーン (4 種類)²⁾、ゴガツササゲ³⁾ のインヒビターについてもいえる。同じナス科のハシドコロの培養細胞とジャガイモに、ナスのインヒビターと、ほとんど等しいアミノ酸残基数をもつインヒビ

ターが存在しているのは興味深い。とくにジャガイモ A-5 インヒビターとはその組成も非常によく似ている。ただし、このインヒビターは通常四量体で存在し、分子量は 22,000 である。ナスインヒビターはヒスチジン、バリン、メチオニン、トリプトファンの4種ものアミノ酸を欠いており、分子量 5,000 以上のインヒビターでは、現在、ほかに例はない。しかしアミノ酸残基数は 97 個と多いが、Iwasaki ら⁶⁹⁾によるジャガイモのプロテアーゼインヒビター IIa のアミノ酸組成が、トリプトファン、メチオニン、ヒスチジンを欠いているのは、科の同一性を考えるうえで示唆的である。なおハシリドコロの I-5 は現在知られている最も分子量の小さいインヒビターと考えられるが、これを除けば、ナスインヒビターは、分子量的に最も小さい群に属し、そのアミノ酸組成も特異的である。

さてその生理的意義はともかく、インヒビターを栄養学的、食品学的な立場からとりあげるならば、問題になるのは、どのようなプロテアーゼを阻害するか、その強さ、調理加工などに対する安定性などであろう。

ナスインヒビターはウシのトリプシンを最も強く化学量論的に阻害し、ウシキモトリプシンも阻害する。微生物由来のプロテアーゼでは、ナガーゼ、プロナーゼを阻害するが、各種プロテアーゼの混合物と考えられているプロナーゼではとくに、トリプシン型のものが強く阻害される。ペプシンはまったく阻害を受けず、また各種カルボキシペプチダーゼ A, B, Y はいずれも阻害されない^{53), 54), 70)}。結果の一例を Fig. 10 に示す。ウシトリプシンは、インヒビター 1 μg で 4 μg の量が阻害され、この値からも分子量はほぼ 6,000 と求められる。さて興味あるのは、ヒトプロテアーゼに対する阻害であるが、純粋なヒトプロテアーゼが得られないので、ヒトスыв液を部分精製し、合成基質を用いて検討したが、トリプシンに対する阻害はかなり強く、キモトリプシンに対しては弱かった⁷⁰⁾。

精製過程中に熱処理の操作を行なっていることでも明らかのごとく、ナスインヒビターは耐熱性であり、80°C 60 分の加熱でも、ほとんど活性は失われない⁵³⁾。また常温では pH 1~11 の広い範囲で長時間その阻害活性を保つ。

このように耐熱、耐 pH のインヒビターであるが、ではこのインヒビターが阻害しない消化酵素では、どのような変化を受けるであろうか。Fig. 11 に示すように、1:100 モル比で検討したところ、カルボキシペプチダーゼ A やペプシンによって短時間ではまったく活性の損失はなく、70 時間の反応によってようやく 30% ほどの失活をきたす⁷⁰⁾。このことは、ナスインヒビターは、それ自体阻害しないプロテアーゼに対しても分解されにく

Fig. 10. Anti-proteolytic activity of the eggplant inhibitor.

proteinases. — pepsin, Δ Pronase, $\blacktriangle$ Nagarse, $\circ$ α -chymotrypsin, $\bullet$ trypsin

Fig. 11. Resistivity of the eggplant inhibitor against proteinase digestion.

$\circ$ carboxypeptidase A digestion, $\bullet$ pepsin digestion, enzyme/inhibitor, 1/100 (w/w)

い構造を有しているものと考えられる。ナスを漬け物（スカ漬け）にした場合、果皮と果肉の分離は困難でありそのまま測定したが、インヒビターの活性は、ほとんどと変わらなかった（未発表）。

以上のことからナスインヒビターは非常に安定なたん白質といえるが、一方インヒビターとプロテアーゼとの結合の強さを定量的に示すパラメーターとして現在用いられているのが K_d 値、すなわち、プロテアーゼ (E) とインヒビター (I) との複合体の解離定数で、 $K_d = [E][I]/[E-I]$ で示される。その阻害機構から考えて、インヒビターとプロテアーゼ基質は、酵素に対して拮抗

的に作用するものであり、Lineweaver-Burk プロットで解析すれば拮抗型阻害を示すはずである⁷⁾。しかし実際には、インヒビターとプロテアーゼとの結合が非常に強く、みかけ上、非拮抗型阻害を示すことが多い。著者らも Fig. 12 に示すように⁵²⁾、ナスインヒビターが阻害の強いトリプシンに対しては、非拮抗的に、比較的弱いプロナーゼに対しては、拮抗的に作用することをみいだしている。しかし現在 K_d 値は 2 次反応速度式に該当する会合速度定数 (k_a) と 1 次反応速度式に従う解離速度定数 (k_d) の比 $k_d/k_a=K_d$ として求めるのがより正確と考えられている⁷¹⁾⁷²⁾。この方法により求めた値を Table 4 に示す⁷³⁾。なお表に示してある熱力学定数は、温度を変えて k_a , k_d を測定することにより求めることができる。一般に K_d 値として 10^{-9} ~ 10^{-11} の報告が多く、ナスインヒビターの 1.5×10^{-10} は K_d として小さいほう、すなわち、インヒビターとしてはトリプシンと強く結合する部類に属することがわかる。

5. 反応部位

一般にトリプシンを阻害するインヒビターは、トリプシンの基質特異性より、その反応部位にリジンカアルギニンをもつと考えられる⁷⁴⁾。事実、現在知られている多くのトリプシンインヒビターは、リジン型かアルギニン型かに分類される。現在たん白質を構成するアミノ酸残基を、比較的容易に、特異的に化学修飾することができる^{74)~78)}。著者らは、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) と無水酢酸を用いて、ナスインヒビターのアミノ基を、1,2-シクロヘキサジオン (CHD) とグリオキサールを用いてアルギニン残基の修飾を試みた。その結果は Table 5 に示すとおりで⁵⁵⁾、修飾化アミノ酸とトリプシン阻害活性の関係より、ナスインヒビターは明らかに反応部位にアルギニンをもつことがわかる。また CHD によってアルギニン残基が 40% 弱しか修飾されていないのに、80% の活性が失われていることは、インヒビターに 3 個含まれているアルギニンのうち、1 個の反応性がとくに高いことを意味している。

たん白質中のジスルフィド結合は、すべてのたん白質の高次構造保持のため重要な役割を果たしていることは

Fig. 12. Lineweaver-Burk plots for the inhibition on trypsin and Pronase.

[a] trypsin 20 μg , ■ without inhibitor, ● with 10 μg inhibitor, ○ with 13 μg inhibitor. [b] Pronase 50 μg , ■ without inhibitor, ▲ with 25 μg inhibitor, △ with 50 μg inhibitor.

Table 4. Kinetics and thermodynamic characteristics of the interaction of trypsin with eggplant inhibitor.

25°C, pH 8.0	
k_a ($\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$)	1.5×10^6
k_d (sec^{-1})	2.3×10^{-4}
K_a (M^{-1})	6.5×10^9
K_d (M)	1.5×10^{-10}
ΔG_a° (kcal mol^{-1})	-13.2
ΔH_a° (kcal mol^{-1})	-2.2
ΔS_a° (cal $\text{mol}^{-1} \text{deg}^{-1}$)	36.9

論をまたない。インヒビターでは S-S 結合が阻害活性と密接な関係があることが知られている¹⁶⁾。ナスインヒビターも分子量の割には多い 8 個の半システイン、すなわち 4 個の S-S 結合を 1 分子中に含んでいるので、活性との関連性をみるため、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) で還元を行なった⁵⁵⁾。ナスインヒビターはとくに尿素などの変性剤を用いる必要もなく、容易に還元され、同時に阻害活性を失った。また還元されて出現してくる SH 基と阻害活性の低下は完全に一致した。この

Table 5. Inactivation of eggplant inhibitor by chemical modification.

Reagent	Modified residue	Modified (%)	Loss of trypsin inhibitory activity (%)
1,2-Cyclohexanedione	Arginine	38	78
Glyoxal	Arginine	80	99
Acetic anhydride	Lysine	80	8
2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid	Lysine	80	0

Fig. 13. Effect of disulfide bond reduction on inhibitory activity.

● residual inhibitory activity, ○ sulfhydryl groups per mole of inhibitor

ことは活性の低下が、ある特殊なジスルフィド結合の還元によるものでなく、全体的な構造変化によるものと考えられる。Fig. 13 にこれらの結果を示す。

上記のごとくナスインヒビターの反応に直接関与する残基は、化学修飾によりアルギニンであることが明らかとなったが、ペプチド鎖のどの位置に存在するのであるうか。通常酵素などの場合も、反応に関与するアミノ酸残基がわかって、その位置を知るためには、全一次構造の決定をまたねばならない。1966 年 Ozawa および Laskowski, Jr.⁷⁹⁾ が見いだしたダイズ・トリプシンインヒビター (STI) が、触媒量のトリプシンによって反応部位のペプチド結合のみが水解されるという現象は、これ以後のインヒビターの反応機構、構造解明などに大きな進歩をもたらした。すなわちインヒビターの場合、一次構造の決定をまたずして、その正確な反応部位を知ることが可能になったわけである。このことを STI を例として模式的に示すと、次のようになる (Fig. 14)。すなわち pH 3.75 で 1~2 モル%のトリプシンを STI に作用させると、反応部位である No. 63 のアルギニンと No. 64 のイソロイシン間のペプチド結合が水解される。このときもとのインヒビターを native または virgin とよび、水解されたものを modified インヒビターといい、このような操作を、化学修飾に対してインヒビターの enzymatic modification という。modified インヒビターもインヒビターとしての活性は virgin と変わらない。しかし適当な pH を選べばこの二つは、電気泳動やイオン交換クロマトグラフィーによって分離は可能である。ジスルフィド結合を還元切断すると modified インヒビターは二つのペプチドになり、ゲル濾過その他適当な手段によって分別することができ、それぞれのアミノ酸を分析することにより切断されたアミノ酸の位置を知ることができる。また水解によって新たに生成した C 末端, N 末端のアミノ酸を同定することにより反応に関与するアミノ酸残基を容易に知ることできる。

Fig. 14. The conversion of virgin to modified soybean trypsin inhibitor.⁸⁾⁷⁹⁾

Fig. 15. Disc gel electrophoreses of the native and trypsin modified eggplant inhibitor. (a) native inhibitor; (b) the mixture of native and modified inhibitor.

ナスインヒビターの場合、pH 3~4 では modified インヒビターの生成は少なく、pH 2~2.5 とより酸性で高い生成率を示した⁵⁵⁾。native と modified インヒビターをディスク電気泳動で分離したのが Fig. 15 である。(a) が native インヒビター、(b) がインヒビターを触媒量のトリプシンと pH 2.5 で 24 時間反応させたもので、より易動度の大きい modified インヒビターの生成が明瞭にみられる⁵⁵⁾。この反応生成物である native と modified インヒビターの混合物にカルボキシペプチダーゼ B を作用させると、アルギニンの遊離とともに活性の低下が認められた⁵⁵⁾ (Fig. 16)。またエドマン法で検

Fig. 16. Inactivation of trypsin-modified inhibitor by carboxypeptidase B digestion.
● native inhibitor, ○ mixture containing modified and native inhibitors

討した結果、新しく生成したN末端はセリンであり、ナスインヒビターの反応部位はアルギニルセリン結合と結論した。

さらに著者らは、先述の最適条件で modified インヒビターを多量調製し、ゲル濾過でトリプシンを除去したのち、QAE-セファデックス A-25 のカラムクロマトグラフィーにより、native と modified インヒビターの完全分離に成功した。modified インヒビターを還元したのち、セファデックス G-25 を用いてゲル濾過を行なったところ、明らかに分子量を異にする二つのペプチドを得た。おのおののアミノ酸の分析を Table 6 に示す (未発表)。F-I と F-II のアミノ酸残基数の和は完全に native インヒビターと一致している (Table 3)。末端基分析などによって、著者らは小さいほうの F-II がN末端側に、アミノ酸残基数 44 個のペプチドがC末端側に位置すること、したがって反応部位のアルギニンとセリンは No. 14, No. 15 に位置すると結論した。

反応部位に関連して、インヒビターでしばしば問題になるのは、いわゆる single head か double head かである。すなわちインヒビターがトリプシンとキモトリプシンあるいはそれより多くのプロテアーゼを阻害する場合、それぞれに反応部位を有する場合を double head ないしは multi head, 同じ部位で反応する場合を single head とよんでいる。現在多価インヒビターの多くは double head であるとの知見が多くなっている⁸⁾。著者らは、次のような観点よりナスインヒビターはトリプシン、キモトリプシンその他のプロテアーゼを阻害するが single head であると考えている。まずトリプシンに対する阻害活性が他のプロテアーゼの共存によって抑制されることである⁵²⁾⁵³⁾。すなわち、他のプロテアーゼが本来トリプシンの占めるべき位置を占めるために、それだけトリプシンに対する阻害が減少するというのである。次にインヒビターを、トリプシンよりやや過剰に用いて、すなわち遊離のトリプシンの存在しない条件でト

Table 6. Amino acid composition of two fragments obtained from modified eggplant inhibitor.

Amino acid	F-I	F-II	Total
Lys	4	0	4
His	0	0	0
Arg	2	1	3
Asp	5	2	7
Thr	2	0	2
Ser	3	1	4
Glu	5	0	5
Pro	4	1	5
Gly	5	2	7
Ala	2	1	3
Cys/2	6	2	8
Val	0	0	0
Met	0	0	0
Ile	2	2	4
Leu	1	1	2
Tyr	1	1	2
Phe	2	0	2
Trp	0	0	0
Total	44	14	58

リプシン・インヒビター複合体を形成させ、この複合体がキモトリプシンをまったく阻害しないことを確認している⁸⁰⁾。しかし最近、このような条件でもキモトリプシンは、トリプシンと異なる部位で反応するとの報告²⁵⁾もあり、今後なお検討の必要があると考えている。

本章を終えるにさいし、インヒビターの modification に対し付言しておく必要がある。近年、アフィニティクロマトグラフィーの進歩はめざましく、たん白質調製に多く用いられている⁸¹⁾。インヒビター調製にもよく用いられ、トリプシン・セファローズは市販されており、アフィニティクロマトグラフィーを用いて最終標品を得ている報告³¹⁾⁴⁴⁾が多い。一般にインヒビター調製の場合は、中性でトリプシンカラムに吸着させ、酸性で溶出させることが多く、著者らの最近の経験では、このさい、先述の modified インヒビターが生成することを見いだしている (未発表)。既述のように native と modified インヒビターはクロマトグラフィー上、挙動を異にする場合があるので、イソインヒビターの調製などには、十分注意する必要がある。

6. おわりに

植物界、それもわれわれが日常食品として摂取しているものに広く分布しているプロテアーゼインヒビターでありながら、その研究は、あまりにマメ類に集中しているのが現状である。材料としてすぐれている点は十分理解できるが、食品学、栄養学の立場からみれば、より広く食品全般にわたるインヒビターの検索と基礎的研究が必要かと考えている。現在、植物における生理的意義としては⁹⁾¹⁰⁾、インヒビターそのものが貯蔵たん白質であるか、あるいはたん白質貯蔵時になんらかの役割を果たしていること、昆虫や微生物に対する防御作用の役割を果たしていること、そして植物に元来存在しているプロテアーゼ類に作用している³¹⁾⁸²⁾のではないかと考えられているが、いずれも決定的なものではない。

初めに述べたごとく、元来インヒビターの研究は飼料中の成長抑制因子として出発したのであり¹⁾、現在も飼料材料、対象動物を変えての研究はあつと絶たず^{83)~87)}、インヒビターの基礎的研究とともに、栄養学的に今後ますます重要な研究課題となろう。著者らもいままで、ウシの結晶プロテアーゼに対するナスインヒビターの作用をみてきたが、最近ナスインヒビターは、ラットスイ臓トリプシンを強く阻害するのに、そのキモトリプシンをまったく阻害しないという現象をみだしている⁸⁸⁾。本稿を終えるにあたり、著者らの研究の今後の展望として、上記研究を簡単に述べておく。ラットは古くより栄養学の重要な実験動物として用いられながら、その精製スイ臓酵素に対する知見は非常に乏しい。著者らはインヒビターのラットに対する影響を研究する第一段階として、まずラットスイ臓プロテアーゼの精製にとりかかった。アフィニティクロマトグラフィーを用いたが、ダイズインヒビターがラットのトリプシン、キモトリプシンの両者に親和性を示すのに対し、ナスインヒビターは、トリプシンしか吸着せず、キモトリプシンは未吸着画分として得られ、両者の分別が可能になった。また吸着したラットトリプシンも、酸性下の溶出において3種類に分別され、それぞれナストリプシンインヒビターに対する親和力、すなわち K_d などを異にすることを見いだしている。詳細な検討は目下進行中であるが、アフィニティクロマトグラフィーが微妙なたん白質の親和性の差異の識別を可能にする一例かと考えている。

本稿を終えるにあたり、執筆の機会をいただいた日本栄養・食糧学会に厚くお礼申し上げる。また本研究は京都府立大学農学部農芸化学科栄養化学講座で行なわれたものであり、終始変わらぬご指導とご鞭撻をいただいた本講座教授の金森正雄先生に深甚の謝意を表する。また本研究にご協力、ご尽力をいただいた数多くの講座専攻

の諸兄姉に心より感謝の意を捧げたい。

なお本稿をまとめるにあたり、一部未発表のデータを使用させていただいた。また文献は比較的近年のものに限り、総説や著者論文に含まれるものは、一部を除いて重複を避けたので、それぞれ原報を参照していただきたい。

文 献

- 1) Liener, I.E. *et al.*: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs (Liener, I.E., ed.), p.1 (1969), Academic Press (New York)
- 2) Kassell, B.: Methods in Enzymology (Perlmann, E. and Lorand, L., eds.), Vol. 19 p.839 (1969), Academic Press (New York)
- 3) Birk, Y. *et al.*: Methods in Enzymology (Lorand, L., ed.), Vol. 45 p.695 (1976), Academic Press (New York)
- 4) Vogel, R., Trautschold, I. and Eugen, W.: *Natürliche Proteinase-Inhibitoren*, (1966), Georg Thieme Verlag (Stuttgart); 鈴木友二, 長沢滋治, 山口 登記: 蛋白分解酵素インヒビター, (1974), 共立出版 (東京)
- 5) Read, J.W. and Haas, L.W.: *Cereal Chem.*, 15, 59 (1938)
- 6) Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, 29, 149 (1946)
- 7) Laskowski, M. Jr. and Sealock, R.W.: *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), Vol. 3, p. 376 (1971), Academic Press (New York)
- 8) 小谷昌司, 池中徳治: 生化学, 49, 1 (1977)
- 9) Ryan, C.A.: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 24, 173 (1973)
- 10) Richardson, M.: *Phytochemistry*, 16, 159 (1977)
- 11) Chen, I. and Mitchell, H.L.: *Phytochemistry*, 12, 327 (1973)
- 12) 伊吹文男: 化学と生物, 14, 227 (1976)
- 13) 池中徳治: 化学と生物, 14, 378 (1976)
- 14) Proteinase Inhibitors-Bayer Symposium V (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E., eds.) (1974), Springer Verlag (Berlin)
- 15) 池中徳治, 小出武比古: 化学と生物, 8, 1 (1970)
- 16) 小出武比古, 池中徳治: 蛋白質 核酸 酵素, 17, 270 (1972)
- 17) Odani, S. and Ikenaka, T.: *J. Biochem.*, 82, 1513 (1977)
- 18) Odani, S. and Ikenaka, T.: *J. Biochem.*, 82, 1523 (1977)
- 19) Odani, S. and Ikenaka, T.: *J. Biochem.*, 83, 737 (1978)
- 20) Odani, S. and Ikenaka, T.: *J. Biochem.*, 83, 747 (1978)
- 21) Odani, S. and Ikenaka, T.: *J. Biochem.*, 84, 1 (1978)
- 22) Hwang, D.L.-R., Lin, K.-T.D., Yang, W.-K. and Foard, D.E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 495, 369 (1977)
- 23) Yoshida, C. and Yoshikawa, M.: *J. Biochem.*, 78, 935 (1975)
- 24) Yoshikawa, M., Ogura, S. and Tatsumi, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2235 (1977)
- 25) Yoshikawa, M. and Ogura, S.: *Agric. Biol.*

- Chem.*, 42, 1753 (1978)
- 26) Miyoshi, M., Hamaguchi, Y., Matsumoto, K. and Mizuno, I. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24, 195 (1978)
 - 27) Abe, O., Ohata, J., Utsumi, Y. and Kuromizu, K. : *J. Biochem.*, 83, 1737 (1978)
 - 28) Abe, O., Shimokawa, Y., Araki, T. and Kuromizu, K. : *J. Biochem.*, 83, 1749 (1978)
 - 29) Belew, M. and Eaker, D. : *Eur. J. Biochem.*, 62, 499 (1976)
 - 30) Belew, M. : *Eur. J. Biochem.*, 73, 411 (1977)
 - 31) Gennis, L.S. and Cantor, C.R. : *J. Biol. Chem.*, 251, 734 (1976)
 - 32) 渡辺篤二ら : 食の科学, 41, 19 (1978)
 - 33) 森田雄平 : 農化, 51, R65 (1977)
 - 34) 根木史郎, 佐々木卓治 : 日本農芸化学会昭和 53 年度大会講演要旨集, p.124 (1978)
 - 35) Yoshikawa, M., Iwasaki, T., Fujii, M. and Oogaki, M. : *J. Biochem.*, 79, 765 (1976)
 - 36) Tashiro, M. and Maki, Z. : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1119 (1978)
 - 37) Ikeda, K. and Kusano, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 309 (1978)
 - 38) 西田 誠 : 世界の植物 (北村二郎, 本田正次, 佐藤達夫総監修), p. 281 (1976), 朝日新聞社 (東京)
 - 39) Hass, G.M., Ako, H., Grahm, D.T. and Neurath, H. : *Eur. J. Biochem.*, 15, 93 (1976)
 - 40) Ako, H., Hass, G.M., Grahm, D.T. and Neurath, H. : *Biochemistry*, 15, 2573 (1976)
 - 41) Iwasaki, T., Kiyohara, T. and Yoshikawa, M. : *J. Biochem.*, 79, 381 (1976)
 - 42) Iwasaki, T., Wada, J., Kiyohara, T. and Yoshikawa, M. : *J. Biochem.*, 82, 991 (1977)
 - 43) Green, T.A. and Ryan, C.A. : *Plant Physiol.*, 51, 19 (1973)
 - 44) Sakato, K., Tanaka, H. and Misawa, M. : *Eur. J. Biochem.*, 55, 211 (1975)
 - 45) 緒方英博, 吉田紀夫, 牧角 啓 : 生化学, 49, 891 (1977)
 - 46) Sumathi, S. and Pattabiraman, T.N. : *Biochim. Biophys. Acta*, 485, 167 (1977)
 - 47) 秦 忠夫, 小川 正, 林 力丸 : 京大食研報告, 30, 51 (1967)
 - 48) 山田正明, 伊吹文男, 金森正雄 : 栄養と食糧, 29, 478 (1976)
 - 49) 伊吹文男, 西村敏行, 小垂 真, 金森正雄, 山田正明 : 栄養と食糧, 31, 110 (1978)
 - 50) 伊吹文男, 西村敏行, 小垂 真, 金森正雄 : 第32 回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, p.121 (1978)
 - 51) Kanamori, M., Ibuki, F., Tashiro, M., Yamada, M. and Miyoshi, M. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 21, 421 (1975)
 - 52) Kanamori, M., Ibuki, F., Yamada, M., Tashiro, M. and Miyoshi, M. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 21, 429 (1975)
 - 53) Kanamori, M., Ibuki, F., Yamada, M., Tashiro, M. and Miyoshi, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 839 (1976)
 - 54) Kanamori, M., Ibuki, F., Tashiro, M., Yamada, M. and Miyoshi, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 439, 398 (1976)
 - 55) Yamada, M., Tashiro, M., Yamaguchi, H., Yamada, H., Ibuki, F. and Kanamori, M. : *J. Biochem.*, 80, 1293 (1976)
 - 56) Yamada, M., Santo, S., Yamaguchi, H., Tashiro, M., Ibuki, F. and Kanamori, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2343 (1977)
 - 57) Zassenhaus, P.H., Hanson, K.M. and Wolgemuth, R.L. : *Anal. Biochem.*, 76, 321 (1976)
 - 58) Zimmerman, M., Ashe, B., Yurewicz, E.C. and Patel, G. : *Anal. Biochem.*, 78, 47 (1977)
 - 59) Sevier, E.D. : *Anal. Biochem.*, 74, 592 (1976)
 - 60) Reimerdes, E.H. and Klostermeyer, H. : Methods in Enzymology (Lorand, L., ed.), Vol. 45, p. 26 (1976), Academic Press (New York)
 - 61) Sandholm, M., Smith, R.R., Shih, J.C. and Scott, M.L. : *J. Nutr.*, 106, 761 (1976)
 - 62) Kanamori, M., Ibuki, F., Tashiro, M. and Yamada, M. : *Sci. Rep. Kyoto Pref. Univ., Agric.*, 29, 101 (1977)
 - 63) Millar, D.B.S., Willick, G.E., Steiner, R.F. and Frattali, V. : *J. Biol. Chem.*, 244, 281 (1969)
 - 64) Ibuki, F., Yamada, M., Tashiro, M. and Kanamori, M. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 23, 133 (1977)
 - 65) Ibuki, F., Tashiro, M., Yamada, M., Miyoshi, M. and Kanamori, M. : *Sci. Rep. Kyoto Pref. Univ., Agric.*, 28, 172 (1976)
 - 66) Frattali, V. : *J. Biol. Chem.*, 244, 274 (1969)
 - 67) Odani, S. and Ikenaka, T. : *J. Biochem.*, 71, 839 (1972)
 - 68) Ryan, C.A. and Santarius, K. : *Plant Physiol.*, 58, 683 (1976)
 - 69) Iwasaki, T., Kiyohara, T. and Yoshikawa, M. : *J. Biochem.*, 73, 1039 (1973)
 - 70) 田代 操, 山田正明, 三好正満, 伊吹文男, 金森正雄 : 日本農芸化学会昭和 50 年度大会講演要旨集, p.304 (1975)
 - 71) Vincent, J.P. and Lazdunski, M. : *Biochemistry*, 11, 2967 (1972)
 - 72) Schweitz, H., Vincent, J.P. and Lazdunski, M. : *Biochemistry*, 12, 2841 (1973)
 - 73) Ibuki, F. and Kanamori, M. : Proc. 10th Intern. Cong. Nutr., 521 (1976)
 - 74) White, F.H. Jr. *et al.* : Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W., ed.), Vol. 11 p.481 (1967), Academic Press (New York)
 - 75) White, F.H. Jr. *et al.* : Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.), Vol. 25 p.384 (1972), Academic Press (New York)
 - 76) Kehyon, G.L. *et al.* : Methods in Enzymology (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.), Vol. 47 p.407 (1977), Academic Press (New York)
 - 77) Means, G.E. and Feeney, R.E. : Chemical Modification of Proteins (1971), Holden-Day (San Francisco); 石井信一監訳 : タンパク質の化学修飾法 (1973), 広川書店 (東京)
 - 78) 生化学実験講座 (日本生化学会編), 1-IV (1977), 東京化学同人 (東京)
 - 79) Ozawa, K. and Laskowski, M. Jr. : *J. Biol. Chem.*, 241, 3955 (1966)
 - 80) 伊吹文男, 田代 操, 三好正満, 金森正雄 : 第28 回日本栄養・食糧学会総会要旨集, p.68 (1974)
 - 81) 生化学実験講座 (日本生化学会編), 1-I (1976),

- 東京化学同人 (東京)
- 82) Baumgartner, B. and Chrispeels, M.J. : *Plant Physiol.*, **58**, 1 (1976)
 - 83) Nitsan, Z. and Liener, I.E. : *J. Nutr.*, **106**, 292 (1976)
 - 84) Nitsan, Z. and Liener, I.E. : *J. Nutr.*, **106**, 300 (1976)
 - 85) Nitsan, Z. : *Br. J. Nutr.*, **37**, 81 (1977)
 - 86) Marquardt, R.R., Campbell, L.D. and Ward, T. : *J. Nutr.*, **106**, 275 (1976)
 - 87) Bielorai, R., Tamir, M. and Hurwitz, S. : *J. Nutr.*, **107**, 1775 (1977)
 - 88) 小垂 真, 西村敏行, 広田佳卓, 伊吹文男, 金森正雄 : 日本農芸化学会昭和 53 年度大会講演要旨集, p.313 (1978)

(昭和 53 年 11 月 10 日受理)