

## 粟種子 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの精製と性質

田代 操・牧 善 輔

### Purification and Characterization of an $\alpha$ -Amylase Inhibitor from the Grain of Foxtail Millet

Misao TASHIRO and ZENSUKE MAKI

An  $\alpha$ -amylase inhibitor was isolated and purified from the whole grain of foxtail millet, *Setaria italica*, by extraction with 1% NaCl, ammonium sulfate precipitation, and column chromatographies on DEAE-Sephadex CL-6B,  $\alpha$ -amylase bound Sephadex 4B, and CM-Sephadex C-25. The specific activity of the finally purified sample was over 600-fold of that of the extract, but it still did not show a homogeneous behavior in disc polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.0. The isoelectric focusing and Sephadex G-75 gel filtration of the crude preparation indicated that the inhibitor had an isoelectric point of 10 and a molecular weight of 19,000. This inhibitor was most stable from pH 7 to 8, while it lost the activity as the pH was decreased to 2 or increased to 10. The inhibitor showed powerful inhibitor activities against porcine pancreatic and human salivary  $\alpha$ -amylases, but failed to inhibit *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -amylase.

(Received August 15, 1986)

#### I 緒 言

種々の植物中には数多くの酵素阻害物質が含まれており、これらはその生化学的特性に興味を持たれるとともに生理学および栄養学的見地からも注目を集めている。澱粉消化酵素である $\alpha$ -アミラーゼを阻害する物質、 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに関しては、すでに1943年 Kneen と Sandstedt<sup>1)</sup>が小麦に、1945年 Bowman<sup>2)</sup>がインゲン豆にその存在を報告しているが、これらが蛋白質性のインヒビターであることが明らかにされたのは比較的最近のことである。<sup>3) 4)</sup>

植物起源の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは一般に動物の $\alpha$ -アミラーゼに特異的で、微生物や植物からの $\alpha$ -アミラーゼを阻害しない。<sup>5)</sup>したがって、これらは糖消化吸収に対する影響、さらに糖尿病の食事療法の

一つとしても関心を集めている。<sup>6)</sup>また、蛋白質性 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターには微細な $\alpha$ -アミラーゼ分子の違いを識別するものもあり、このことより本物質を臨床に応用しようとする試みもなされている。<sup>7)</sup>このように $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに関しては、近年その応用への可能性という点から改めて活発な研究が進められるようになり、穀類、豆類はもとより微生物<sup>8)</sup>からもその分離精製が試みられている。

雑穀の粟に関しては、今まで $\alpha$ -アミラーゼインヒビターが存在するとの報告はなかったが、最近我々はトリプシンインヒビター、システインプロテアーゼインヒビターと共にこの $\alpha$ -アミラーゼインヒビターがそこに存在するとの知見を得た。本論文ではこの $\alpha$ -アミラーゼインヒビターに関し、精製と性質を検討した結果を報告する。

## II 実験材料及び方法

### 1) 供試料

市販の粟全粒をミルで粉碎し、アセトンで脱脂後風乾し、インヒビター精製の出発材料とした。

### 2) 酵素及び酵素阻害活性測定法

$\alpha$ -アミラーゼ活性の測定には、通常酵素としてブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ (Sigma 社製, Type I-A), 基質として可溶性澱粉を用い、ヨウ素法で行なった。すなわち, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05% Triton X-100 を含む 25 mM PIPES (Piperazine-N, N'-bis 2-ethanesulfonic Acid) 緩衝液 (pH 6.9) 1.4 ml に酵素溶液 0.2 ml を加え, さらに 0.4 ml の 2.5% 可溶性澱粉水溶液を添加し反応を開始した。37°C で10分間の反応後 1.0 ml の 10% 酢酸を加え反応を止め, さらに反応混合液の 0.2 ml に 4 ml のヨウ素溶液 (1% I in 10% KI 溶液を要時200倍に希釈した液) を混合し700nm での吸光度を測定した。酵素活性は酵素を作用させる前に反応を止めたもの (盲検) と酵素を作用させたものとの吸光度の差で表し, 1 酵素単位は, 上記反応系において, 700nm での吸光度差が1分間の反応時間当り 0.01になる酵素量と定義した。なお, 結晶 $\alpha$ -アミラーゼは上述の PIPES 緩衝液で400倍に希釈したものを保存酵素液とし, その280nm での吸光度から酵素量を算出し, さらに要時最終的に10000倍に希釈して使用した。

$\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性は, インヒビター存在下における残余酵素活性から評価し, 1 阻害単位 (1 IU) は1 酵素単位を阻害するインヒビター量と定義した。

### 3) 蛋白質の定量

牛血清アルブミンを標準蛋白質として, Lowry の方法<sup>9)</sup>で行なった。

### 4) 焦点電気泳動

120ml 容積のカラムで, pH 3.5~10の carrier ampholyte (LKB 社製) を使用し, 凍結乾燥した粗インヒビター試料20 mg を4°C で 72時間1 Wの定電力で電気泳動した。泳動終了後, カラム内容液を2 ml ずつ分画し, 280nm での吸光度, pH,  $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性を測定した。

### 5) ディスク電気泳動

Reisfeldら<sup>10)</sup>に従い, pH 4.0でのディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。泳動後, ゲルを1%アミドブラック液に浸し, 蛋白質バンドを染

色した。また別のゲルについては長弘の方法<sup>6)</sup>に基づき $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの活性染色を行なった。

### 6) 分子量の測定

粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの分子量を Sephadex G-75を用いるゲル濾過法<sup>11)</sup>にて測定した。粗 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター30mg を2 ml の 0.1M 食塩を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解し, 遠心分離後, 上清を Sephadex G-75 カラム (2.5×54cm) に添加した。溶出液には上述のリン酸緩衝液を用い, 流速は 10 ml/hr, 3 ml ずつ分画し, 280nm での吸光度と $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性を測定した。分子量推定のための標準蛋白質としては, 牛血清アルブミン (分子量67,000), 卵白アルブミン (分子量 45,000), キモトリプシノーゲンA (分子量 25,000), ミオグロビン (分子量17,800) を用いた。

### 7) プレインキュベーション時間の影響

精製 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター溶液 0.05ml とブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ溶液 0.2ml に PIPES 緩衝液 (pH6.9) 1.3ml を加え, 37°C で種々プレインキュベーション時間を変えた後, 前述の活性測定法に従いインヒビター活性を測定した。

### 8) イオン強度の影響

精製インヒビターを PIPES 緩衝液 (pH6.9) で4倍希釈したもの 0.1 ml と $\alpha$ -アミラーゼ溶液 0.2 ml, さらにプレインキュベーション時の食塩の終濃度がそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 M となるよう調整した PIPES 緩衝液 (pH 6.9) 1.3ml を混合し, 60分間 37°C で放置した後, 前述の活性測定法に従いインヒビター活性を測定した。なお, 対照としてインヒビターが存在しない場合の酵素活性も同様の条件で測定した。

### 9) pH安定性

緩衝液として pH 2, 3 は 0.05 M 酢酸ナトリウム-塩酸系を, pH 4, 5 は 0.05M 酢酸ナトリウム-酢酸系を, pH 6, 7 は 0.05M リン酸ナトリウム緩衝液を, pH 8, 9 は 0.05M ホウ酸ナトリウム-リン酸1ナトリウム系を, pH10は 0.05M 炭酸ナトリウム-ホウ酸ナトリウム緩衝液を使用した。これらの緩衝液各 0.18ml に精製インヒビター 0.02 ml を加え, 37°C で2時間および24時間放置した。放置後, 各溶液に 1.2 ml の PIPES 緩衝液 (pH6.9) とブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ溶液 0.2 ml を加え, 60分間のプレインキュベーション後, 活性を測定した。

### 10) 各種 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害作用

精製インヒビターの $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用を, プ

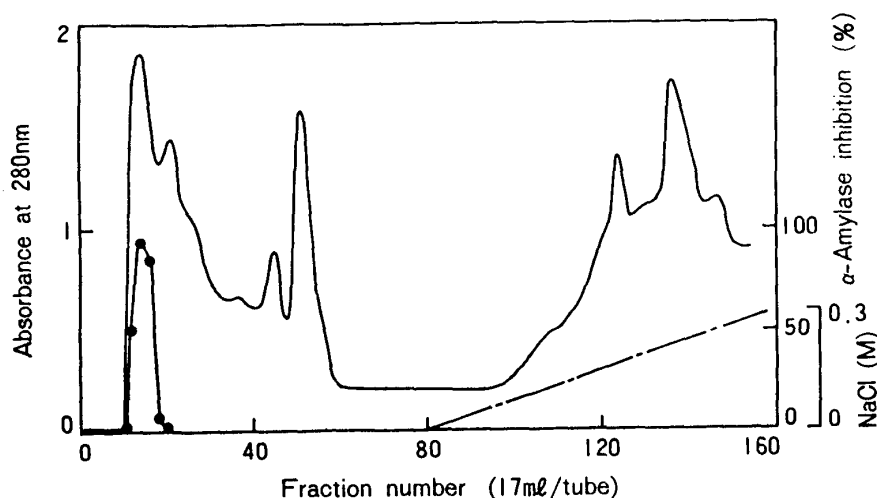


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of 90 % ammonium sulfate precipitate on a DEAE-Sephacel CL-6B column (3.0×55 cm). —, absorbance at 280nm; ●—●,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity; — — —, NaCl concentration.

タ膵臓、人唾液、および *Bacillus subtilis* 由来の $\alpha$ -アミラーゼを酵素試料として検討した。なお、ブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼと *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -アミラーゼ (Sigma 社, Type II-A) の酵素溶液の濃度は、それぞれ  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 24.1$  (280nm)<sup>12)</sup>,  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 25.6$  (280nm)<sup>12)</sup>を用いて計算した。人唾液 $\alpha$ -アミラーゼについては、人唾液を濾過し、濾液をさらにミリポアフィルターで濾過し、濾液を PIPES 緩衝液 (pH6.9) で150倍に希釈したものを酵素試料とした。これら3種の $\alpha$ -アミラーゼ溶液を、ほぼ等しい酵素活性を示すよう酵素液量を調節し、精製インヒビターと共に30分間および2時間プレインキュベーションし、前述の方法により活性を測定した。

### III 実験結果及び考察

#### 1) 粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの精製

粟穀粒アセトンパウダー 1 kg に5倍量の1%食塩水を加えホモジナイズした後遠心分離 (10000×g, 15分間) し上清を得た。沈澱物をさらに5倍量の1%食塩水で抽出し、先と同様に遠心分離し、得られた上清と先の上清を合わせて抽出液とした。この抽出液に90%飽和となるよう固体硫酸を加え、塩析した。一夜放置後、沈澱物を濾別し、少量の蒸留水に溶解し、透析チューブ (Spectrapor membrane tubing, m.w. cut off 3500) を用いて蒸留水に対して透析した。透析終了後、透析内液を遠心分離し、得られた上清を凍

結乾燥した。この凍結乾燥物を粗インヒビター画分とした。つづいてこの粗インヒビターを 50ml の 0.05 M Tris-塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶解し、遠心分離後、上清を同じ Tris-塩酸緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel CL-6B のカラム (3.0×55 cm) に添加し、イオン交換クロマトグラフィーを行なった。結果を Fig. 1 に示す。 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性は未吸着蛋白質画分の最初に現れ、図には示していないがトリプシンインヒビター活性と重複していた。次にこの $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性画分を集め、凍結乾燥し、これを 0.3M 食塩と 1 mM 塩化カルシウムを含む 10mM PIPES 緩衝液 (pH6.9) に溶解し pH を 6.9 に調整した後遠心分離し、上清を上述の PIPES 緩衝液で平衡化した $\alpha$ -アミラーゼ結合 Sepharose 4Bカラム (1.0×15cm) に添加し、アフィニティークロマトグラフィーを行なった。カラムの吸着容量が小さかったため、上清を数回に分けてクロマトグラフィーを行なった。Fig. 2 はその内の代表的な結果を示している。試料の添加後しばらく PIPES 緩衝液を流し、つづいて 50mM食塩と 1 mM 塩化カルシウムを含む 0.1M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 3.0) に切り変えた。 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターは pH 3 の緩衝液で溶出し、未吸着で溶出した大部分の蛋白質と分離することができた。なお、図には示していないが共存するトリプシンインヒビター活性は未吸着蛋白質画分に認められ、本アフィニティークロマトグラフィーが $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの精製のみでなくトリブ

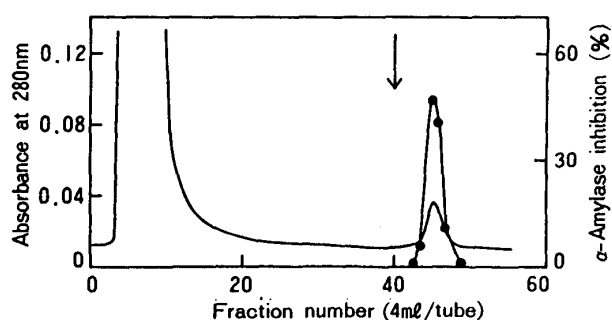


Fig. 2. Affinity chromatography of the inhibitor separated by DEAE-Sephacrose CL-6 B chromatography on an  $\alpha$ -amylase bound Sepharose 4B column (1.0×15 cm). The arrow indicates replacement of the eluting solution. —, absorbance at 280nm; ●—●,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity.

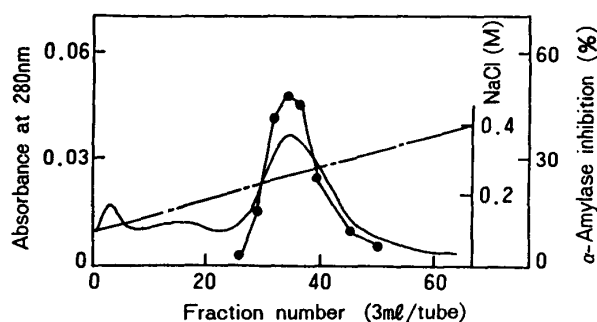


Fig. 3. Ion-exchange chromatography of the inhibitor obtained by the affinity chromatography on a CM-Sephadex C-25 column (1.0×20 cm). —, absorbance at 280nm; ●—●,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity; —, NaCl concentration.

シンインヒビターとの分離にも有効であることが示された。数回のアフィニティークロマトグラフィーで得られたインヒビター画分を集め、これに等量の 0.1M 食塩と 0.05% Triton X-100 を含む 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5) を加え、同じ緩衝液で平衡化した CM-Sephadex C-25 のカラム (1.0×18.5 cm) に添加し、最終精製としてイオン交換クロマトグラフィーを行なった。インヒビターはカラムに吸着し、Fig. 3

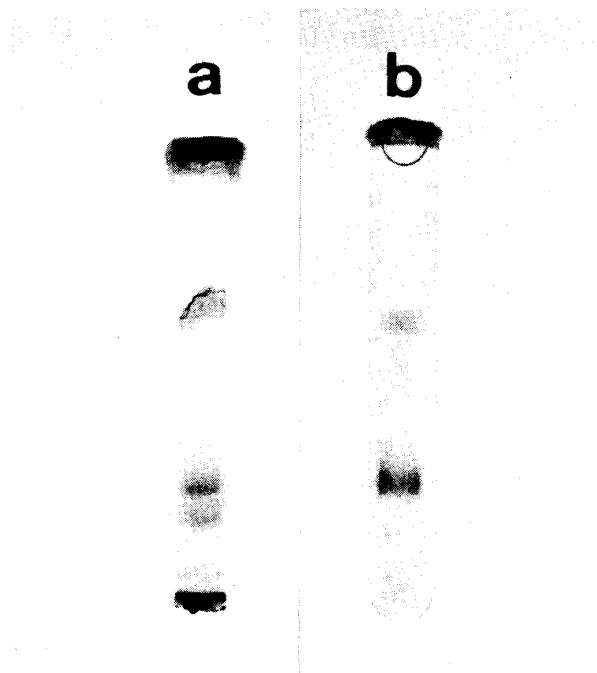


Fig. 4. Disc electrophoretic patterns of foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor. a, protein; b,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity.

Table 1. Summary of the Purification of Foxtail Millet  $\alpha$ -Amylase Inhibitor.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (IU)	Specific activity (IU /mg protein)	Ratio	Yield (%)
Extract	8910	65600	7.36	1.00	100
90% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	2900	35400	12.2	1.66	54.0
DEAE-Sephacrose CL-6 B active fraction	1090	24000	22.0	2.99	36.6
Affinity chromatography active fraction	4.20	10000	2380	323	15.2
CM-Sephadex C-25 active fraction	2.10	9920	4720	641	15.1

に示されるように、0.1~0.4Mの食塩グラジエントにより溶出した。得られた $\alpha$ -アミラーゼインヒビター画分を最終精製品として凍結保存した。以上の精製結果をまとめたのが Table 1 である。比活性は最初の抽出液に較べると最終的に約640倍になり、インヒビター活性の収量は約15%であった。Fig. 4 は最終精製品のディスク電気泳動図を示している。Fig. 4-a はアミドブラックで染色した蛋白質バンドを示し、Fig. 4-b は活性染色による活性バンドを示している。明らかに2本の蛋白質バンドが認められ、活性のあるものはそのうちの易動度の少ない方のバンドであることがわかる。したがって本 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターを均一にするためにはさらに精製を進める必要があると言える。

## 2) 等電点

焦点電気泳動の結果を Fig. 5 に示す。 $\alpha$ -アミラーゼインヒビター活性は pH 10 の位置に認められ、これより本インヒビターの等電点を10と決定した。

等電点に関しては、インゲン豆の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターが 5.2<sup>13)</sup> との報告があり、これと比較すると本インヒビターは非常に高い値となっている。

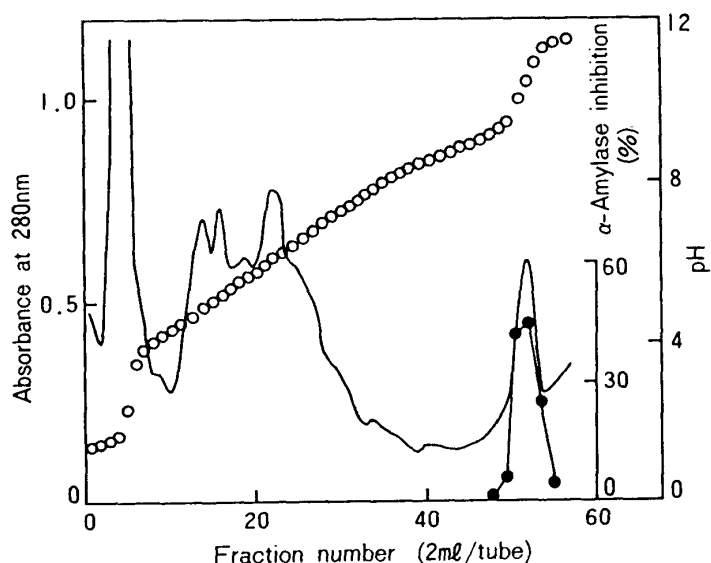


Fig. 5. Isoelectric focusing of the crude  $\alpha$ -amylase inhibitor from foxtail millet.

—, absorbance at 280nm; ●,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity; ○, pH.

## 3) 分子量

Sephadex G-75でのゲル濾過より評価した粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの分子量は Fig. 6 に示されるように19000であった。

植物起源の蛋白質性 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの

分子量はインゲン豆では43000,<sup>13)</sup> 小麦のものでは12000 (主要画分)<sup>14)</sup> と報告されている。さらに最近大麦のインヒビターでは約20000<sup>15)</sup> で、これは $\alpha$ -アミラーゼ以外に微生物起源のプロテアーゼであるサチライシンも阻害するとの報告がある。本インヒビターの場合、分子量的には大麦の $\alpha$ -アミラーゼ/サチライシンインヒビターと類似しており、分子進化の面からも興味ある題材であると思われる。

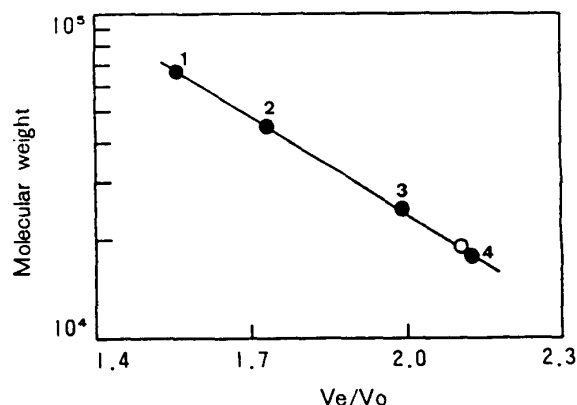


Fig. 6. Molecular weight estimation of foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor by gel filtration on Sephadex G-75.

1, bovine serum albumin; 2, ovalbumin; 3, chymotrypsinogen A; 4, myoglobin; ○, foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor.

## 4) 阻害活性に及ぼすブレインキュベーション時間の影響

Fig. 7 に粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターのブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼ阻害に及ぼすブレインキュベーション時間の影響を示す。図から明らかに約60分間のブレインキュベーションで阻害がほぼ最大値に達することがわかる。蛋白質性 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの阻害メカニズムは未だ良くわかっていないが、もしインヒビター蛋白質が酵素蛋白質と1:1のモル比で結合して阻害を示すと仮定するとその結合反応は2次であり、結合に要する時間は、両蛋白質の濃度に依存するであろう。本実験の場合、ブレインキュベーションにおける酵素濃度は  $4.3 \times 10^{-9}$  M であった。なお、インヒビター濃度に関しては、本インヒビターが均一蛋白質とは考えられないため算出することができなかった。

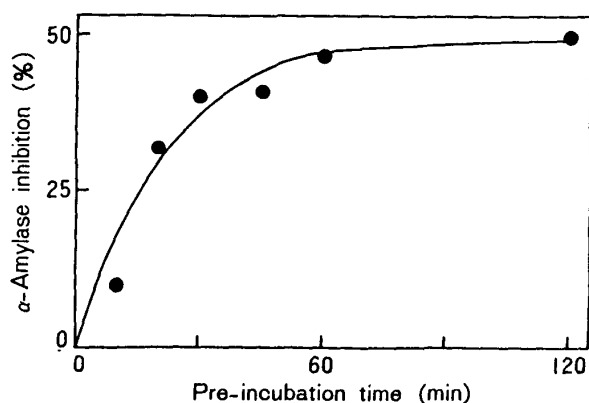


Fig. 7. Effect of pre-incubation time on the interaction between porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase and foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor.

5) 粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターとブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼの相互作用に及ぼすイオン強度の影響  
 粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターとブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼの相互作用に及ぼすイオン強度の影響を示しているのがFig. 8である。結果は明らかに両蛋白質のプレインキュベーション時にイオン強度が異なっても生じる阻害にほとんど影響のないことを示している。本実験の場合、各イオン強度でインヒビターが存在しない時の $\alpha$ -アミラーゼ活性を対照として測定しており、この場合はイオン強度の増加と共に酵素活性の低下が認められた。インヒビターが存在する時も同様にイオン強度の上昇と共に見かけの酵素活性は減少（阻害活性は増加）したが、それぞれの対照値との相対比は一定であった。したがって本実験の場合は対照の取り方が結果の判断に重大な影響を与えるものと考えら

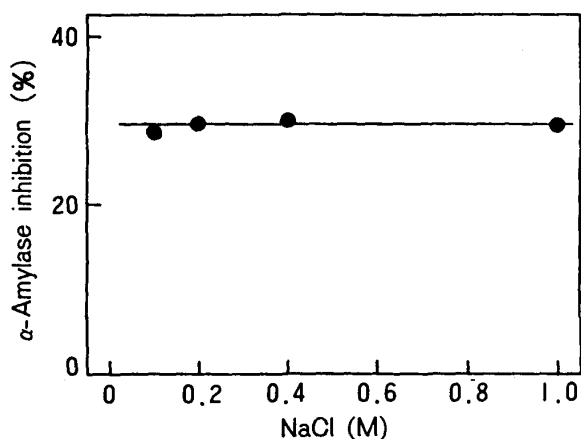


Fig. 8. Effect of ionic strength on the interaction between porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase and foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor.

れる。なお、イオン強度の上昇による見かけの酵素活性の低下は、実際の酵素活性低下によるものか、あるいはヨウ素反応の変化によるものかについては検討しなかった。

イオン強度の影響に関しては、黒インゲン豆の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターがイオン強度の上昇と共にそのブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼの阻害を増していくことが報告されている<sup>16)</sup>一方、小麦の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターではそのような効果は認められておらず<sup>17)</sup>本インヒビターの場合も結果は小麦のインヒビターと同様であった。したがって、本インヒビターと酵素との相互作用においては分子内あるいは分子間の荷電基の関与は無いものと想定できよう。

#### 6) pH 安定性

Fig. 9 に粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターの pH 安定性を示す。本インヒビターは pH 7~8 の中性 pH 付近で最も安定であり、酸性及びアルカリ pH 域ではかなり不安定であった。

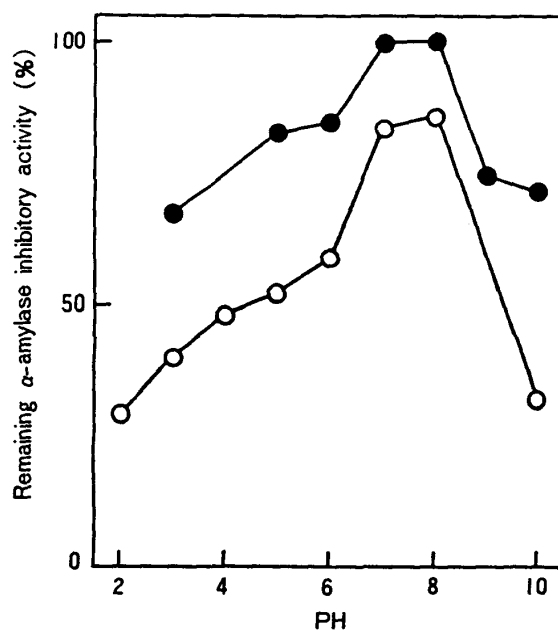


Fig. 9. Effect of pH on the stability of foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor.

●—●, 2hr-incubation; ○—○, 24hr incubation.

#### 7) 各種 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害活性

精製粟 $\alpha$ -アミラーゼインヒビターのブタ膵臓、ヒト唾液、及び *Bacillus subtilis* 由来 $\alpha$ -アミラーゼに対する阻害作用を調べた結果がFig. 10である。なお、*Bacillus subtilis*  $\alpha$ -アミラーゼは本インヒビターにより全く阻害を受けなかったため図には示

していない。いずれの酵素もインヒビターと30分間及び2時間のプレインキュベーション後、その残存酵素活性を測定された。先の実験結果から明らかなように、ブタと同様ヒトの $\alpha$ -アミラーゼもインヒビターとの2時間のプレインキュベーションでより阻害された。本実験で用いられたブタ膵臓 $\alpha$ -アミラーゼの反応時

また pH7~8 で安定であり、ブタ膵臓とヒト唾液の $\alpha$ -アミラーゼに対し強力な阻害作用を示した。一方 *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -アミラーゼは本インヒビターによって全く阻害を受けなかった。

本研究を進めるに当り数々の御協力をいただきました高橋弘子氏、松田(旧姓 齊藤)理英氏に深く感謝いたします。  
(1986年8月15日受理)

#### 引用文献

- 1) E. Kneen and R.M. Sandstedt : *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 1247 (1943).
- 2) D.E. Bowman : *Science*, **102**, 358 (1945).
- 3) A. Hernandez and W.G. Jaffé : *Acta Cient. Venez.*, **19**, 183 (1968).
- 4) W.G. Jaffé and C.L.V. Lette : *J. Nutr.*, **94**, 203 (1968).
- 5) 中谷 博 : 蛋白質・核酸・酵素, **29**, 241 (1984).
- 6) 長弘美智子 : 栄養と食糧, **34**, 341 (1981).
- 7) M.D. O'Donnel, G.O. Fitz and K. F. McGeeney : *Clin. Chem.*, **23**, 560 (1977).
- 8) S. Murao, A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1980).
- 9) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 10) R.A. Reisfeld, U.J. Lewis and D. E. Williams : *Nature*, **195**, 281 (1962).
- 11) P. Andrews : *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
- 12) 日本生化学会編 : 生化学データブック [I], pp. 705-711 (1979), 東京化学同人(東京).
- 13) K.H. Pick and G. Wöber : *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1371 (1978).
- 14) K. Maeda, T. Hase and H. Matsubara : *Biochim. Biophys. Acta*, **743**, 52 (1983).
- 15) J. Hejgaard, I. Svendsen and J. Mundy : *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 91 (1983).
- 16) J.M. Frels and J.H. Rupnow : *J. Food Sci.*, **50**, 72 (1985).
- 17) P.E. Granum and J.R. Whitaker : *J. Food Biochem.*, **1**, 385 (1977).

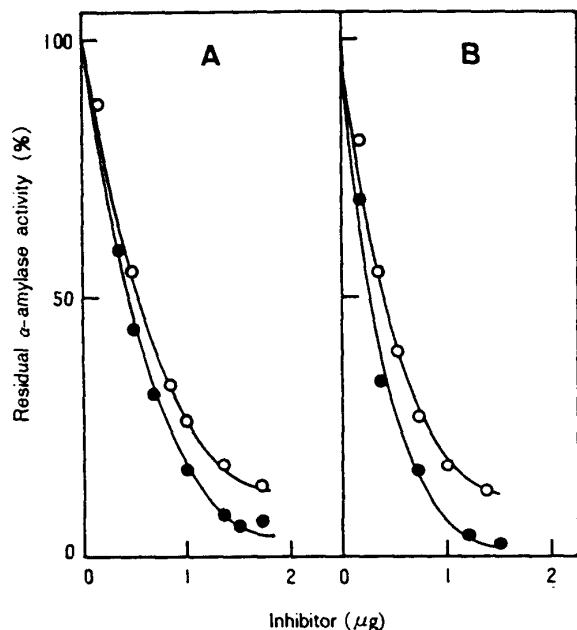


Fig. 10. Inhibitory activities of foxtail millet  $\alpha$ -amylase inhibitor against porcine pancreatic and human salivary  $\alpha$ -amylases. A, porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase; B, human salivary  $\alpha$ -amylase; ●—●, 2hr-preincubation; ○—○, 30min-preincubation.

での初濃度は  $3.0 \times 10^{-9}$  M であり、ヒト唾液 $\alpha$ -アミラーゼの濃度もほぼそれと同程度と仮定すると、本インヒビターは両酵素に対して同じような阻害能力を有していると言える。

#### IV 要 約

粟穀粒アセトンパウダーより、食塩水抽出、硫安塩析、DEAE-Sephrose CL-6B イオン交換クロマトグラフィー、 $\alpha$ -アミラーゼ-Sepharose 4Bアフィニティークロマトグラフィー、CM-Sephadex C-25 イオン交換クロマトグラフィーにて蛋白質性の $\alpha$ -アミラーゼインヒビターを精製した。最終精製品は比活性で最初の抽出液の600倍以上となったがディスク電気泳動の結果では未だ均一ではなかった。本インヒビターは焦点電気泳動より等電点10, Sephadex G-75 のゲル濾過より分子量19000を有すると示された。