

平成17年度 長期研修の研修成果について

1 研究主題及び副題

「ヒトに視点をおいた新しい実験方法及び教具の開発」

～ 酵素活性を調べる方法についての検討 ～

2 研究の目的

高等学校生物における酵素実験は、カタラーゼ等を用いた酵素の基本的な働きを確認する定性的な実験にとどまっている。教科書では当たり前のように説明されている「酵素濃度と反応速度の関係」や「基質濃度と反応速度の関係」など酵素を定量的に扱う実験などは実施されていない。ところが、国際生物学オリンピック第15回大会において、酵素の定量実験が出題された。出題された問題を見ると、高校生でも知識としては理解できている内容であり、難しい問題でない。しかし、問題を解答するための実験を授業の中で行ったことがある生徒はいないであろうし、高校レベルでの教材もない。今後、このような科学分野での国際大会に一般の高校生が参加できるようにするためには、実験技能を向上させると共に新たな実験方法の教材開発が必要である。そこで、本研究は、中学校理科でも実施されている消化酵素実験をさらに発展させ、消化酵素を中心に高校現場でも実施できる酵素の定量実験の教材開発を目的にした。

3 研究の内容

- (1) 中学校理科からの発展として消化酵素の中で脂肪分解酵素 (リパーゼ) を用いた実験方法の検討
- (2) 市販の測定キットを用いた実験方法の検討

4 研究の方法

- (1) 中学校理科からの発展として消化酵素の中で脂肪分解酵素 (リパーゼ) を用いた実験方法の検討

身近にあるものから基質 (酵素と反応する物質) の調製を行い、リパーゼを含む洗剤、消化薬、酵素製剤との酵素反応を検討した。その結果、基質溶液として植物性油脂を原料にしたコーヒー用のクリームを緩衝液に溶かしたものを、酵素液として酵素製剤 (リパーゼ) を用いた。これらで反応を行わせると白濁の減少が見られ、分光光度計で吸光度の変化を測定することで簡易的な酵素反応速度を求めた。

- (2) 市販の測定キットを用いた実験方法の検討

醤油製造メーカーから市販されているL-グルタミン酸測定キットを活用する方法を検討した。具体的には、L-グルタミンを緩衝液に溶かした基質溶液を酵素製剤 (グルタミン酸生成酵素) と反応させ、反応生成物 (L-グルタミン酸) を測定キットで定量した。さらに、酵素反応速度を求めた。

5 研究結果及び成果

- (1) 中学校理科からの発展として消化酵素の中で脂肪分解酵素 (リパーゼ) を用いた実験方法の検討

3社から市販されているコーヒー用のクリームを蒸留水及び緩衝液に溶かし、リパーゼと反応させると濁度の減少が見られた。分光光度計で測定した結果 (図1-1～1-3)、緩衝液に溶かした溶液と反応させると吸光度の減少が見られた。さらに、熱変性させたリパーゼ (図2)、タンパク質が主成分であるスキムミルク (図3) を用いると見られなかった。これらの結果より、クリームの白濁の減少が酵素リパーゼによる可能性が考えられる。また、簡易的な酵素反応速度を求めることで「酵素の最適温度」 (図4、最適温度40℃は、文献値と一致した。) 「基質濃度と酵素の反応速度の関係」 (図5-1～5-3)、 「酵素濃度と酵素の反応速度の関係」 (図6) を表すことができた。基質がある濃度に達するまでは、反応速度は基質濃度にほぼ比例して増加し、最大速度になるとそれ以上、増加しなくなる。また、基質濃度が十分なときは、酵素の反応速度は酵素濃度に比例した。

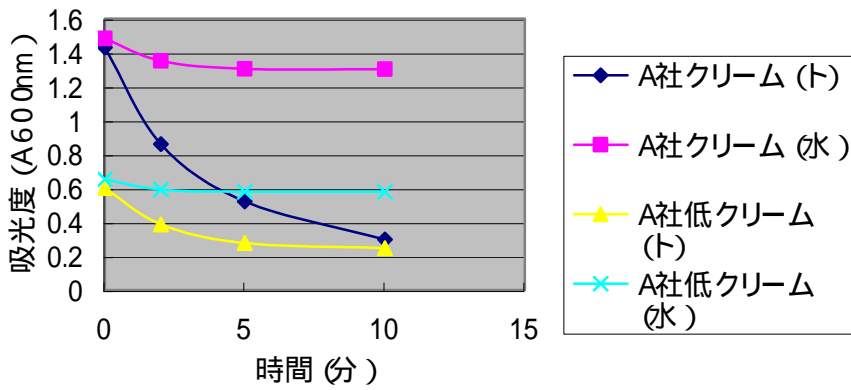
このことは、従来の定性的な酵素実験だけであったものを半定量実験まで発展させることができる可能性を示唆している。

酵素活性の測定について

酵素の反応速度は、反応開始から2分間の吸光度の減少を測定し、簡易的な反応速度を求めた。

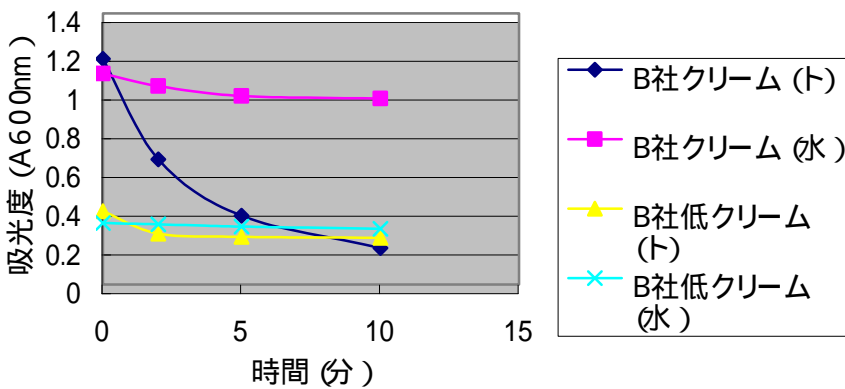
$$\text{反応速度} = (\text{反応はじめの吸光度}) - (\text{2分後の吸光度})$$

A社クリームとリパーゼの反応 (図1-1)

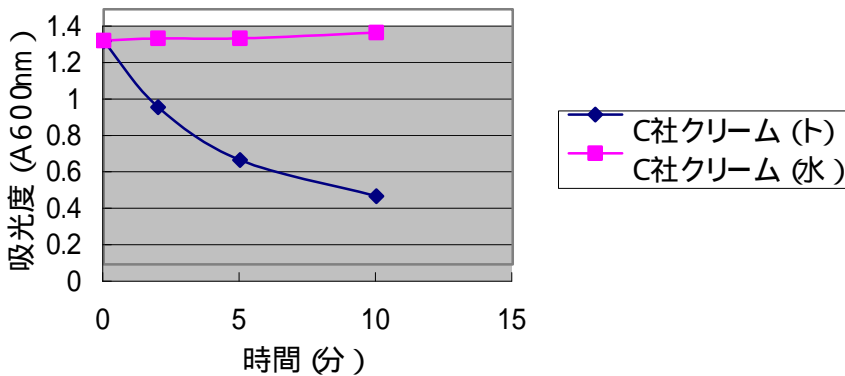


A社、B社から市販されているコーヒー用のクリームを用いた。また低クリームは、低脂肪と表示してあるものを用いた。
 クリーム (ト): クリームを緩衝液に溶かしたもの、
 クリーム (水): クリームを蒸留水に溶かしたもの

B社クリームとリパーゼの反応 (図1-2)



C社クリームとリパーゼの反応 (図1-3)

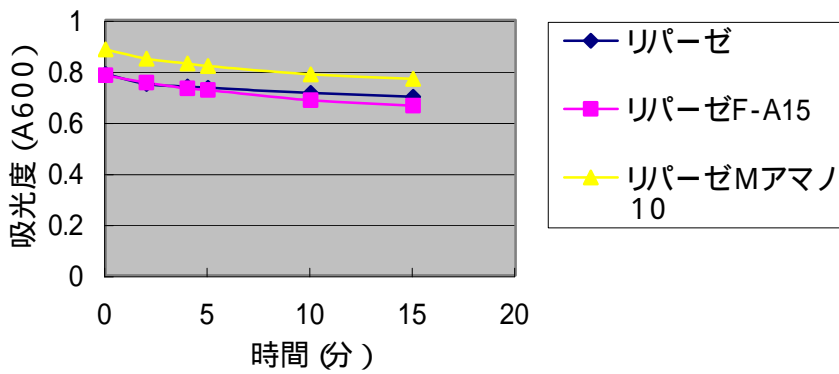


C社から市販されているコーヒー用のクリームを用いた。

クリーム (ト): クリームを緩衝液に溶かしたもの, クリーム (水): クリームを蒸留水に溶かしたもの

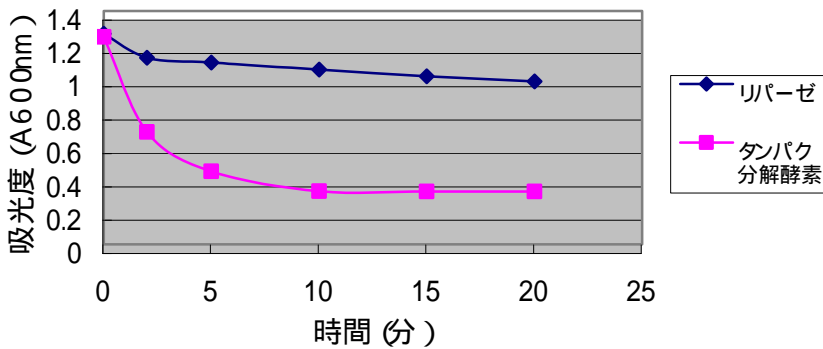
3社すべてのクリームをリパーゼと反応させると白濁の減少が見られ、透明になるので吸光度が減少する。

熱変性させた酵素の働きの時間依存性 (図 2)



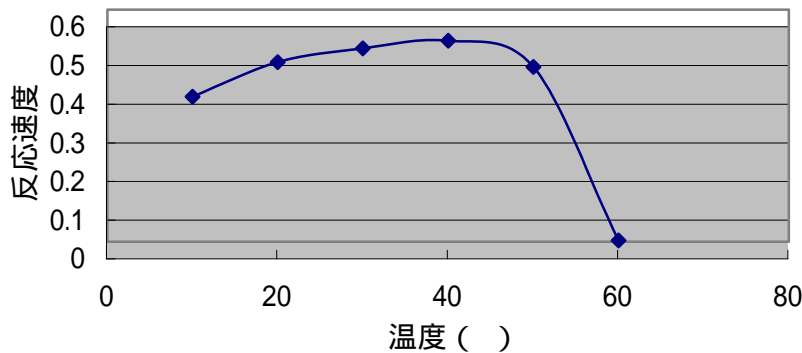
A社から市販されているコーヒー用のクリームを緩衝液に溶かし、熱変性させた3種類の酵素製剤と反応させた。

スキムミルクとリパーゼ及びタンパク分解酵素との反応 (図 3)



スキムミルクを緩衝液に溶かし、リパーゼとタンパク分解酵素と反応させた。その結果、タンパク質が主成分であるスキムミルクは、脂肪分解酵素であるリパーゼとは反応せず、タンパク分解酵素と反応した。

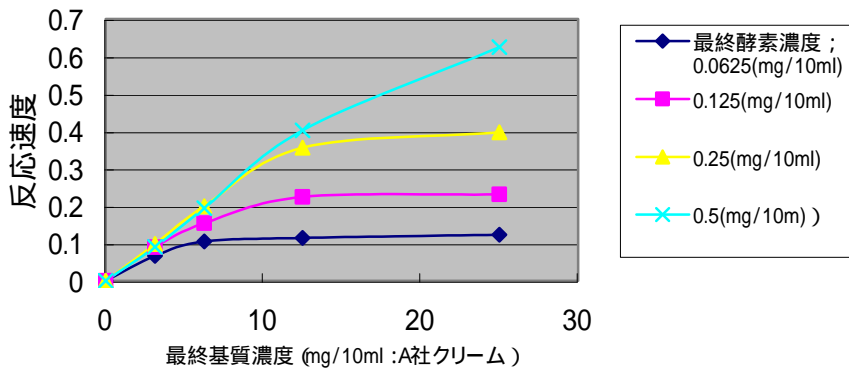
リパーゼの温度依存性(図 4)



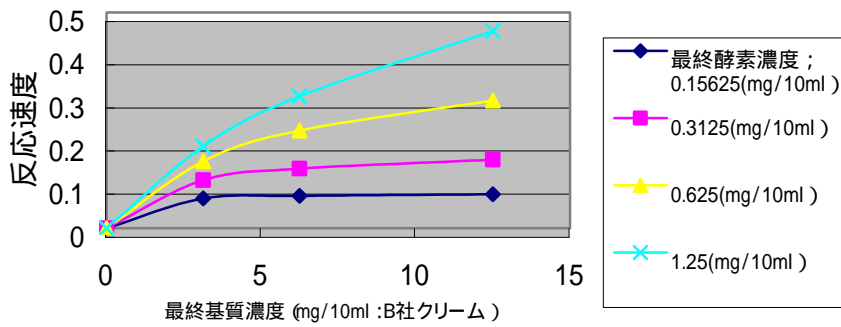
酵素の温度依存性を簡易的な反応速度で表した。

最適温度 40 は、文献の温度と一致した。

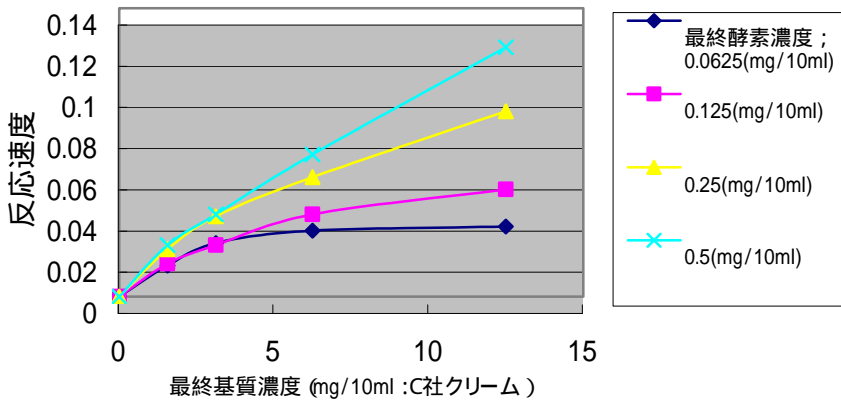
基質濃度と反応速度の関係 (図 5 - 1)



基質濃度と反応速度の関係 (図 5 - 2)

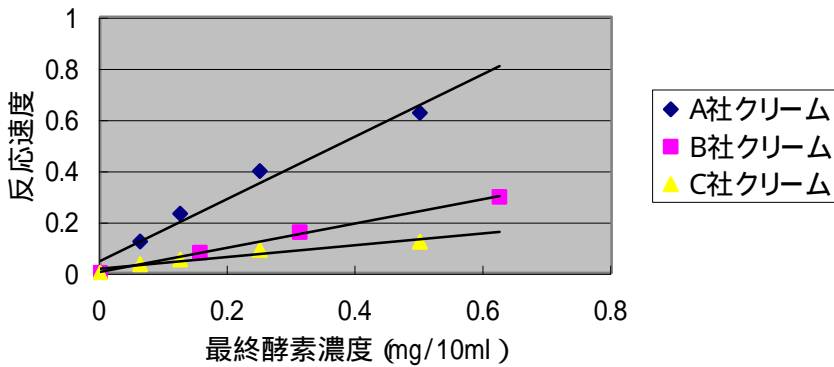


基質濃度と反応速度の関係 (図 5 - 3)



3社から市販されているコーヒー用クリームを緩衝液に溶かした各基質溶液に酵素製剤を蒸留水に溶かした各酵素液を2分間反応させ、煮沸し反応を止め、吸光度を測定した。

酵素濃度と反応速度の関係 (図6)



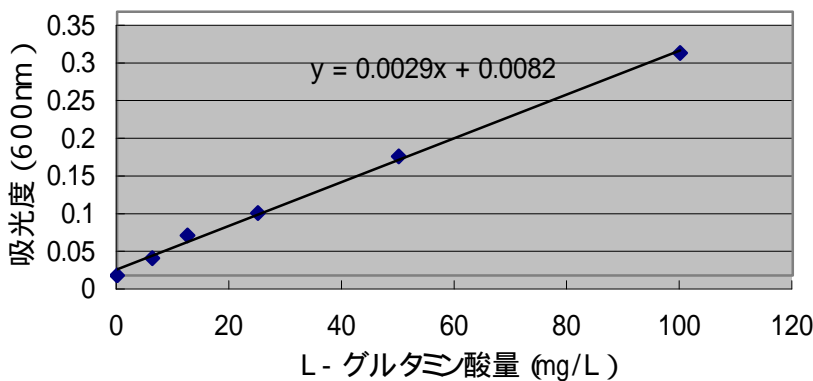
十分量の基質濃度で酵素濃度と反応速度の関係をグラフ化すると比例関係を求めることができた。

(2)市販の測定キットを用いた実験方法の検討

市販の測定キットと組み合わせることにより、酵素の定量実験を行うことができた。今回実施した方法は、緩衝液に溶かした基質 (L-グルタミン)を蒸留水に溶かした酵素製剤 (グルタミン酸生成酵素)と反応させ、反応生成物 (L-グルタミン酸)を測定キットで定量する。この測定キットは、青色に発色するので、正確な定量には分光光度計が必要であるが、グルタミン酸量に応じて発色に濃淡の違いがあるので肉眼でも確認できる (図7)。この方法を用いれば、正確な酵素の定量実験を高校でも実施できる。(図8~図11)

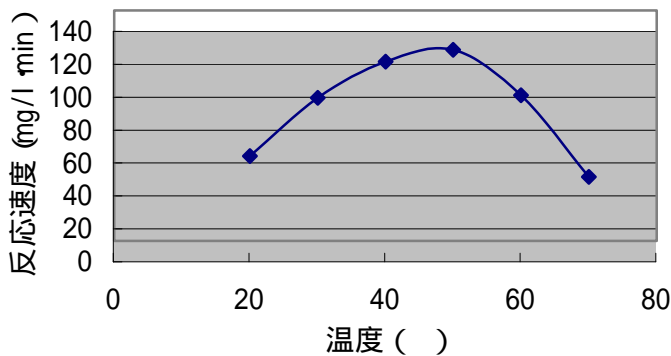


L-グルタミン酸の検量線 (図7)



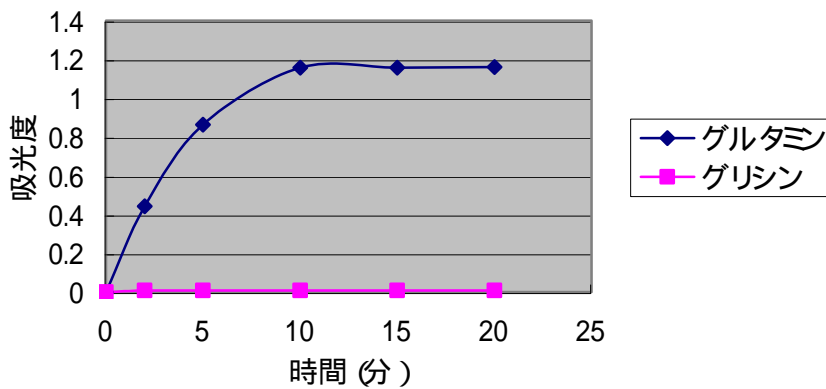
グルタミン酸測定キットを用いてL-グルタミン酸量と吸光度の関係を検量線調べた。

グルタミナーゼの温度依存性 (図8)



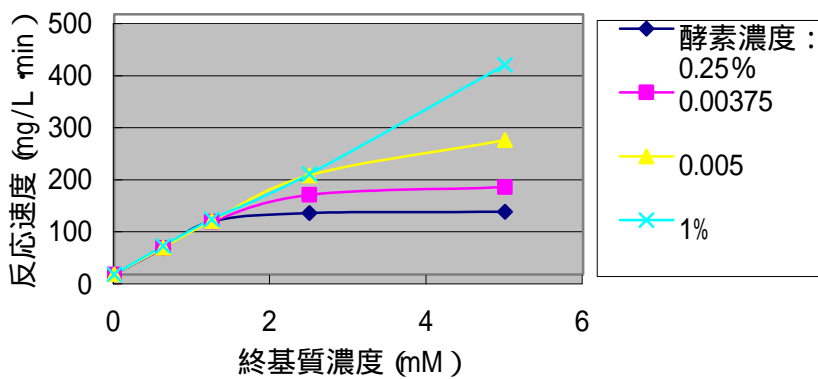
酵素グルタミナーゼの最適温度が50 前後であることがわかる。

グルタミナーゼの基質特異性 (図 9)



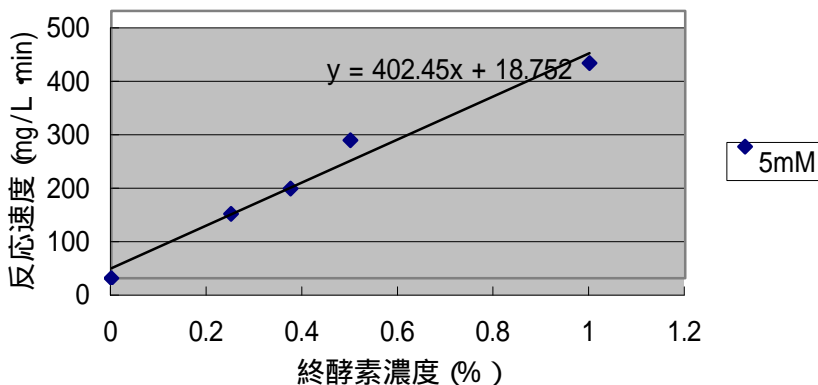
グルタミナーゼを40 で酵素反応を行わせた結果、基質特異性があることがわかる。(グルタミンのみに反応し、グリシンと反応しない。)

基質濃度と酵素反応速度 (図 10)



基質としてL- グルタミンを用い、酵素反応をおこさせ、生成物 (L- グルタミン酸) を定量し、反応速度を求めた。

酵素濃度と反応速度の関係 (図 11)



終基質濃度 5mM で反応させる酵素濃度と反応速度に比例関係が見られる。

3 課題

(1) 中学校理科からの発展として消化酵素の中で脂肪分解酵素 (リパーゼ) を用いた実験方法の検討

コーヒー用のクリームを基質として用いると不純物も多く含まれ、正確な定量実験はできなかった。また、この酵素反応での反応生成物が何かもおこなっていない。酵素反応の結果、白濁がなくなった理由については、不明である (コーヒー用のクリームを製造している各メーカーにこの件に

ついて問い合わせを行ったが、回答がなかった。)

(2)市販の測定キットを用いた実験方法の検討

(1)の方法に比べてかなり正確な定量実験ができた。問題点として、酵素製剤(グルタミン酸生成酵素)購入にある。この酵素は、食品加工用の添加剤であるために一般試薬としては販売されていない。今回は、教材開発用としてメーカーからサンプルを提供してもらった。

(1), (2)に共通した問題点として活性測定には分光光度計が必要である。研究用は、100万円程度するが、最近では、中・高校用で20万円程度の機器が販売されており、今回の実験は研究用と中・高校用の分光光度計の両方で行った。その結果、差はなく20万円程度のもので十分であることも確認した。

4 まとめ

本研究の成果は、まだ授業実践に不十分である。しかし、本研究の今までの成果と今後、授業実践の必要性があるかを外部評価をもとめるために科学研究費補助金(奨励研究)交付申請を行ったところ採択された。(課題番号 18916016)

5 引用文献

「食品工業酵素」リパーゼF-AP15,-001-,p2,010507
「食品工業酵素」リパーゼM「アマノ」10,-000-,p2,010507
「グルタミナーゼダイワ C100S」
遺伝 2005年 3月号 (59巻2号) p60 ~ p64