

酵素特性を理解するための実験法の開発と高校生物教育への実践¹
**Development of an experimental method for students
to comprehend the properties of enzyme
and the application to biology class in upper secondary school.**

佐々本康平 摂南大学大学院理工学研究科生命科学専攻

下澤勇弥 摂南大学大学院理工学研究科生命科学専攻

北田広明 常翔啓光学園高校

花本圭史 常翔学園高校

清水太一 八尾市立高美中学校

松尾康光 摂南大学理工学部生命科学科

西矢芳昭² 摂南大学理工学部生命科学科

SASAMOTO, Kohei Division of Life Science, Setsunan University

SHIMOZAWA, Yuya Division of Life Science, Setsunan University

KITADA, Hiroaki Josho Keiko Gakuen Senior High School

HANAMOTO, Keishi Josho Gakuen Senior High School

SHIMIZU, Taichi Yao City Takami Junior High School

MATSUO, Yasumitsu Department of Life Science, Setsunan University

NISHIYA, Yoshiaki Department of Life Science, Setsunan University

Abstract

Several educational experiments with enzymes, such as catalase, amylase, succinate dehydrogenase, and luciferase, are described in the high school textbooks. In particular, the experiment with catalase is familiar as a teaching material. It is simple and easy to understand visually. However, it is desired to be improved in terms of quantification of rate of the enzymatic reaction and the understanding of the enzyme catalyzed chemical reaction. Therefore, we focused on peroxidase (EC 1.11.1.7), which is one of the oxidoreductases similar to catalase, and developed an educational experiment to understand the enzymatic reaction using an inexpensive tubed spice (kneading horseradish) as an enzyme source. In the peroxidase reaction, hydrogen peroxide was reduced to water and another substrate was simultaneously oxidized. Therefore, it was easy to understand the oxidation–reduction reaction. The enzymatic reaction could be quantified by the green coloration originated by the oxidation of the 2,2'-azinobis(3-

¹【原稿受付】2019年9月4日、【掲載決定】2019年12月25日

²【主著者連絡先】西矢 芳昭 摂南大学、教授 e-mail: nishiya@lif.setsunan.ac.jp
〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17-8、摂南大学理工学部 生命科学科

ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) substrate. This experimental method clearly demonstrated and deepened the understanding of various enzymatic properties, such as the effects of enzyme concentrations, temperature profiles, and thermal denaturation. As a part of high school collaborative lessons, we recommend this experiment in academic institutions.

キーワード： 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸), 酵素反応, 実験法, ペルオキシダーゼ, 定量化

Keywords : 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), enzyme reaction, experimental method, peroxidase, quantification

1. はじめに

細胞を構成する物質としては、水を除いてタンパク質がもっとも大きな割合を占めている。その中で、化学反応を特異的に触媒する様々な酵素が、生命現象を支える役割を果たしている。高等学校新学習指導要領 [生物] (平成 30 年 3 月告示)⁽¹⁾には、「生命現象を分子レベルで捉えるために必要な最小限の化学の知識にも触れること」を配慮するとあり、そのためには酵素反応の理解が役立つ。例えば、指導要領における代謝の 2 項目 (呼吸, 光合成) を理解するには、関係する様々な酵素の特性を理解することが重要と考えられる。また、分子生物学に基づくバイオテクノロジーも酵素反応の応用の側面がある。さらに、それぞれの酵素のアミノ酸配列 (一次構造) に基づく立体構造 (三次, 四次構造) が基質特異性, 反応温度依存性, 反応 pH 依存性, 熱安定性などの特性と密接に関連し、ひいては生物の系統や進化的役割とも関係する。

指導要領の目標には、「観察, 実験などを行い, 科学的に探究する力を養う」とも記載されている。座学だけではなく実験を行うことは、生物学の本質的な理解に重要である。現行の高校生物教科書には、カタラーゼ, アミラーゼ, コハク酸脱水素酵素, ルシフェラーゼなどの酵素反応実験が記載されている (表 1)。特にカタラーゼはもっともポピュラーで、身近な素材を教材としており、実験が簡便で視覚的にも反応の有無がわかりやすい (表 1)。しかしながら、酵素反応進行の定量化ができない。したがって、教科書に必ず記載されている酵素特性, すなわち最適反応温度, 最適反応 pH, 反応初速度の基質濃度依存性を理解するための実験を組むことができない。また、触媒する酸化還元反応の化学的理解についても、過酸化水素 1 基質のため、同時に起こる酸化と還元を分けて捉えにくい (図 1A)。その他の酵素についても、素材, コスト, 安全性, そして定量性などに課題があり、より効率的に酵素特性を理解するための新たな実験法の開発が役立つと考えられた (表 1)。

そこで本研究では、カタラーゼ同様に身近な酸化還元酵素の一種であるペルオキシダーゼ⁽²⁾に着目し、酵素給源として安価なチューブ入り香辛料を使用した酵素特性を理解するための教育実験の開発を試みた。ペルオキシダーゼ反応は、過酸化水素が水に還元され、同時に別基質の酸化が進行するため、酸化還元反応の理解が容易である (図 1B)。すでに酸化発色する基質が知られており、ペルオキシダーゼ反応の進行を視覚的に確認できると共に、標準呈色見本を作成することで酵素反応の程度を定量的に測定できる可能性が考えられる。反応温度依存性や熱変性による酵素失活などを通じ、酵素反応の理解を深める教育実験を

開発できると考えた。ペルオキシダーゼは酸化ストレス低減のため生体に重要な酵素であると共に、一次構造や立体構造が解明されており（図 1D, E）⁽³⁾、酵素の機能にタンパク質の立体構造が関わっていることの理解にも役立つ。また、ペルオキシダーゼは医療分野や食品分野での様々な分析に役立てられており⁽⁴⁻⁶⁾、消臭効果をもたらすガム成分としても実用化されている⁽⁷⁾。したがって、酵素の応用面からの理解を促すにも、良い教材と思われる。

表 1 教科書掲載の酵素反応教育実験

| 教科書 | 酵素 | 材料調達 | 定量性 | 実験操作 | 費用 | 安全性 |
|-------|-----------|------|-----|------|------|-----|
| 数研出版 | カタラーゼ | 易 | 無 | 容易 | 安価 | ○ |
| | アミラーゼ | 易 | 有*2 | 容易 | 安価 | ○ |
| 実教出版 | ルシフェラーゼ | 難*1 | 有 | 容易 | 高価 | ○ |
| | コハク酸脱水素酵素 | 易 | 有*2 | 煩雑*3 | 高価*3 | ○ |
| 啓林館 | カタラーゼ | 易 | 無 | 容易 | 安価 | ○ |
| | コハク酸脱水素酵素 | 易 | 有*2 | 煩雑*3 | 高価*3 | ○ |
| 第一学習社 | カタラーゼ | 易 | 無 | 容易 | 安価 | ○ |
| | アミラーゼ | 易 | 有*2 | 容易 | 安価 | ○ |
| 東京書籍 | カタラーゼ | 易 | 無 | 容易 | 安価 | ○ |
| | グルタミン合成酵素 | 易 | 有*2 | 煩雑*4 | 安価 | ○*5 |

*1. 身近なものから酵素を調達できないため「難」とした。*2. 色素の退色を観察するため、目視での定量化は難しい。*3. ツンベルク管への初期投資が必要であり、操作に時間がかかる。*4. 実験操作が長時間である。*5. 希塩酸を用いるため、実験操作に注意が必要である。

2. 実験材料と方法

(1) 実験材料

分析用に実用化されているペルオキシダーゼは、セイヨウワサビ（ホースラディッシュ）由来（EC 1.11.1.7）である。そこで、市販のチューブ入り香辛料（練りホースラディッシュ）をそのままペルオキシダーゼ給源として用いることを発案した。練りホースラディッシュは製造中に熱処理されていないため、ペルオキシダーゼ活性の残存が期待された。ペルオキシダーゼ反応は、過酸化水素および 2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) を基質とし（図 1C）⁽⁸⁾、酵素反応進行は、ABTS の酸化型が緑色発色することにより確認することとした（図 2）。過酸化水素は、市販のオキシドール（3%過酸化水素水）をそのまま用い、ABTS は試薬を蒸留水（または精製水）で 0.55 mg/mL（1 mmol/L）となるよう溶解して用いた。それぞれの価格は、練りホースラディッシュ（ハウス食品、40 g）が約 200 円、オキシドール（健栄製薬、500 mL）が約 500 円、そして ABTS（アンモニウム塩、富士フィルム和光純薬、1 g）が 5,600 円であった。練りホースラディッシュ、オキシドール、および ABTS の使用量は、1 実験当たりそれぞれ 1 g、6 mL、および 3.3 mg 程度であつ

た (すなわち 1 実験当たり約 30 円)。

(2) 実験器具および装置

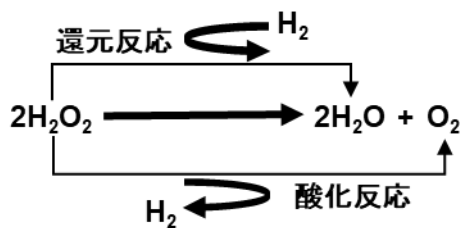
本実験法の開発には秤量用天秤, 恒温槽, 氷入れ容器, タイマー, および分光光度計 (日立ハイテクノロジーズ, U-2910) を使用した。実験器具は試験管, ビーカー, メスシリンダー, 薬さじ, ピペット, スポイト (またはマイクロピペッターおよびチップ) を必要とした。

(3) 実験手順の検討

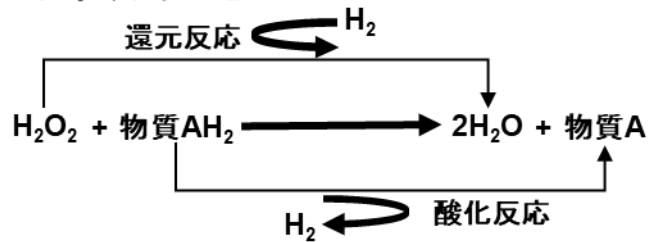
まず, 練りホースラディッシュ 1 g を秤量し, 20 mL の蒸留水 (または精製水) に薬さじで懸濁することにより酵素液を調製した (図 3)。次に, 1 mmol/L の ABTS およびオキソドールをそれぞれ 1 mL ずつ試験管に分注し, 合計 2 mL を軽く攪拌して基質液を調製した。基質液は, 使用するまで水中にて保存した。

ペルオキシダーゼ酵素反応は, 基質液に酵素液約 0.04~0.32 mL (使い捨てスポイトで 1~8 滴) を添加, 軽く攪拌することにより開始した。タイマーで正確に 30 秒~5 分間静置し, 呈色の有無および色の濃さを確認した。

(A) カタラーゼ



(B) ペルオキシダーゼ



(C) ABTSを用いたペルオキシダーゼの酸化還元反応



(D) ペルオキシダーゼの一次構造

QLTPTFYDNSCPNSNIVRDTIVNELRSD
 PRIAASILRLHFHDCFVNGCDASILLDNT
 TSFRTEKDAFGNANSARGFPVIDRMKAAV
 ESACPRTVSCADLLTIAAQQSVTLAGGPS
 WRVPLGRRDSLQAFLLDLANANLPAPFFTL
 PQLKDSFRNVGLNRSSDLVALSGGHTFGK
 NQCRFIMDRLYNFSNTGLPDPTLNNTTYLQ
 TLRGLCPLNGNLSALVDFDLRTPITFDNK
 YVNLLEEQKGLIQSDQELFSSPNATDTIP
 LVRSFANSTQTFNFAFVEAMDRMGNITPL
 TGTQGQIRLNCRVVNSNS

(E) ペルオキシダーゼの立体構造

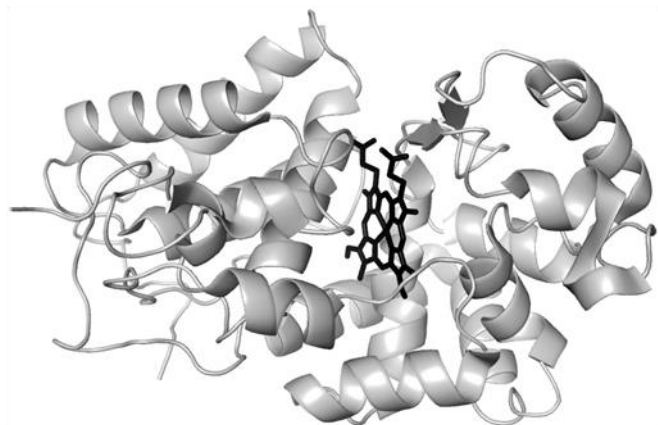


図 1 酵素の化学情報

- (A) カタラーゼの反応. (B) ペルオキシダーゼの反応. (C) ABTS を電子受容体に用いたペルオキシダーゼの反応. (D) ペルオキシダーゼの一次構造. (UniProtKB : P00433, PDB ID : 1H58) (E) ペルオキシダーゼの立体構造. 分子量 33.9 kDa, 全長 308 残基から構成される (UniProtKB : P00433, PDB ID : 1H58). 主鎖はグレーで示し, 補因子ヘムは黒で示した. UniProt Knowledgebase (UniProtKB) : タンパク質のアミノ酸配列データベース, Protein Data Bank (PDB) : タンパク質の立体構造データベース

3. 結果と考察

(1) 実験法の開発

室温 (21°C) にて酵素反応開始後, 徐々に緑色の呈色が進むことを確認した (図 4). ワサビにはペルオキシダーゼが含まれており, 他の練り香辛料 (本ワサビ, 生ワサビ) を用いて同様の実験を行った (図 4). しかし, 色は見られるものの練りホースラディッシュと比較すると呈色に時間がかかった. ペルオキシダーゼの実験材料としては, 調べた限りで授業時間内に実験結果が得られるという観点から練りホースラディッシュが最適であった.

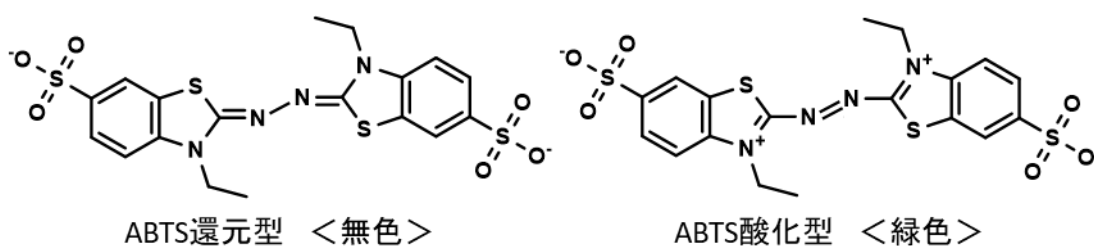


図 2 ABTS の化学式

ChemDraw を利用して作成した.

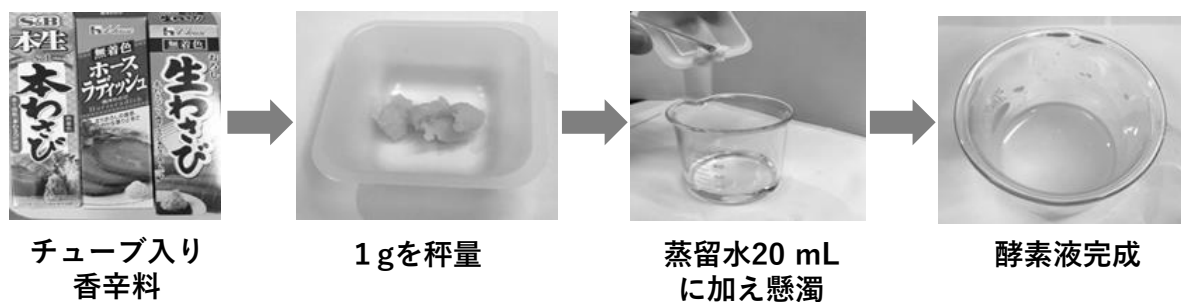


図 3 酵素液の調製方法

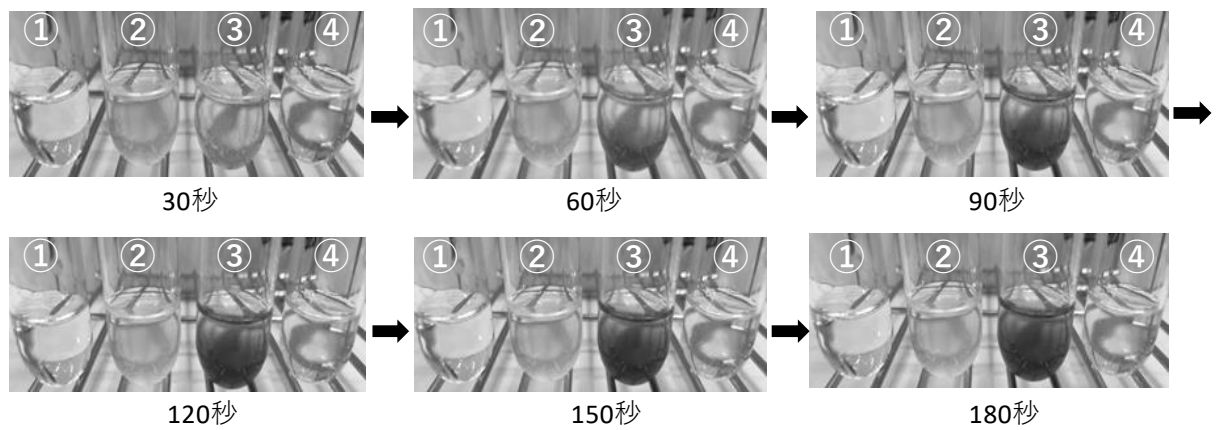


図4 酵素反応による呈色

基質液に酵素液を使い捨てスポイトで4滴（約0.16 mL）添加し，室温（21℃）にて各時間反応させた．①対照（酵素液の代わりに蒸留水使用）．②練り本わさびを用いた酵素液．③練りホースラディッシュを用いた酵素液．④練り生わさびを用いた酵素液．

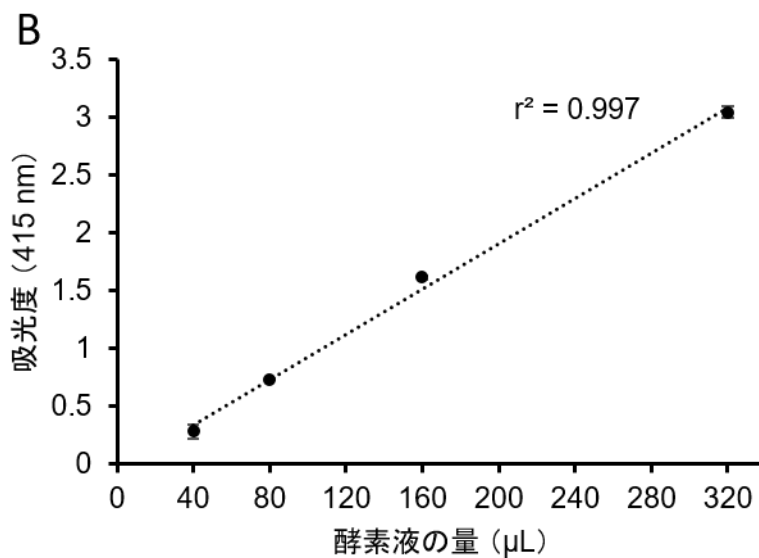
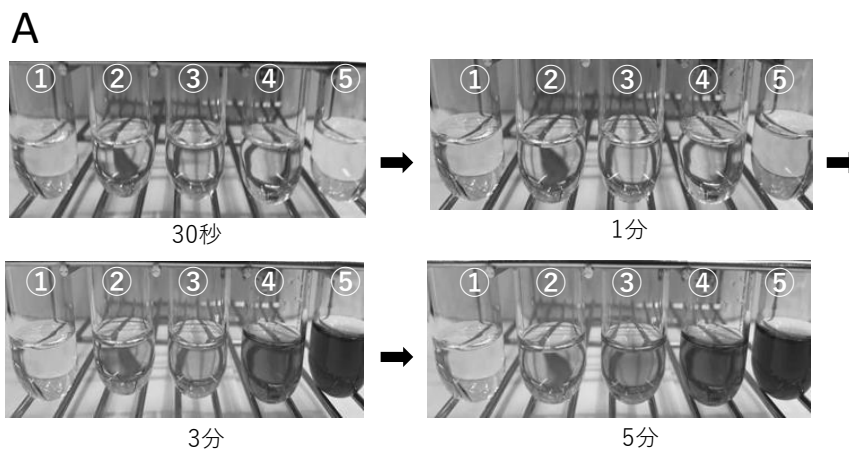


図5 呈色反応の酵素濃度依存性

(A) 基質液に酵素液を使い捨てスポイトで1~8滴(約0.04~0.32 mL)添加し、室温(21℃)にて各時間反応させた。①対照(酵素液の代わりに蒸留水をスポイト1滴使用)。②~⑤酵素液をそれぞれスポイト1, 2, 4, 8滴使用。(B) 酵素濃度と活性の直線性。室温(21℃)にて15分間反応させた各反応液の吸光度を分光光度計にて測定し、液量補正した値でグラフを作成した。計算式： $\text{吸光度} \times (\text{基質液量} + \text{酵素液量}) / \text{基質液量}$

次に室温にて、最適な酵素液量と反応時間を検討した。結果として、図5Aに示すように酵素液量約0.04~0.16 mL(使い捨てスポイトで1~4滴)、反応時間5分間が、酵素反応の時間変化(酵素活性)を観察する上で最適と考えられた。また、分光光度計にて呈色による実際の吸光度の増加(ABTS参加型は415 nmに吸収有り)が酵素液量の増加と比例することを確認した(図5B)。さらに、ペルオキシダーゼ反応液を0~80℃で5分間静置することにより、温度依存性が観察された(図6)。それぞれの温度で反応後に室温にて5分間静置反応させることにより、高温での酵素失活や、0℃では反応が微弱だが酵素は失活していないことも観察できた。

本実験法による酵素反応の分析に定量性を持たせるため、種々の濃度のABTSを本酵素反応に用いて標準呈色見本を作成した(図7A)。そして、酵素反応による呈色の濃さと分光光度計にて測定した実際の吸光度の増加を比較したところ、相関関係を明確に確認できた(図7B)。



図6 酵素反応の温度依存性および高温での酵素失活

基質液に酵素液を使い捨てスポイトで4滴(約0.16 mL)添加し、各温度条件にて5分間反応させた。その後、各反応液を室温にて5分間反応させた。①対照・室温(21℃)。②水中(0℃)。③室温(21℃)。④体温(37℃)。⑤高温(80℃)。

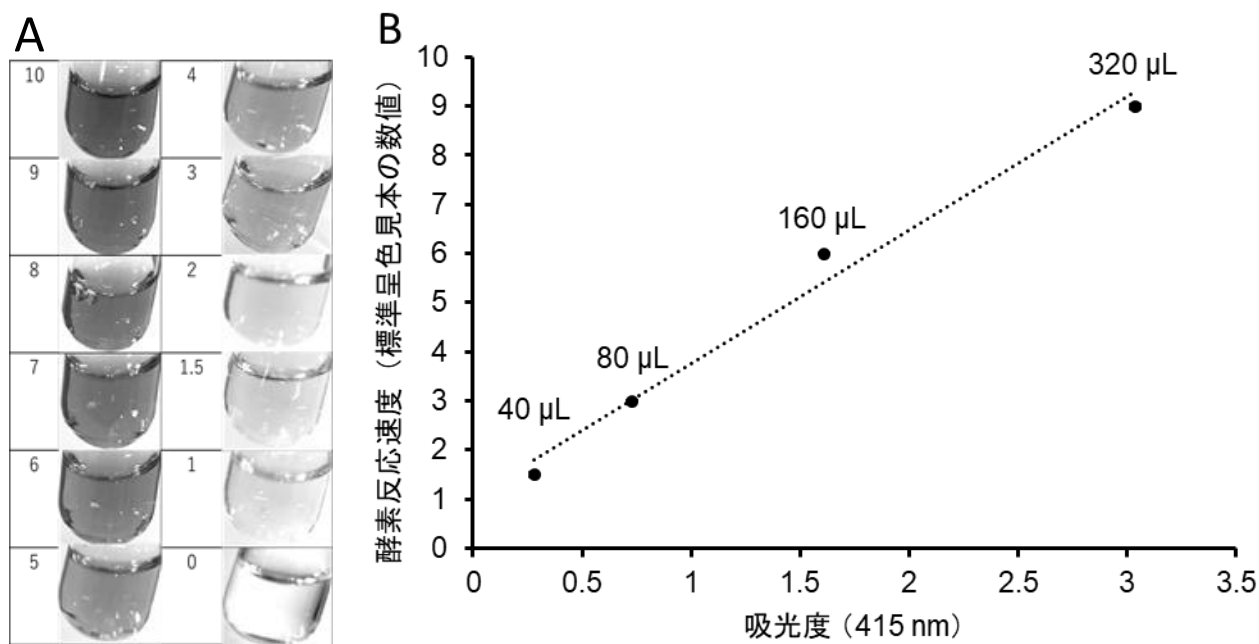


図7 標準呈色見本の作成と定量性の確認

(A) 標準呈色見本. ABTS の終濃度が 0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 mmol/L の反応液 (計 12 種類) を調製し, 市販セイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ (POD-302, 東洋紡製) により室温で ABTS を完全に反応させることにより作製した. 授業では生徒の記録間違いを防ぐ目的で, ABTS の濃度を 12 段階の数字に置き換えた標準呈色見本を使用した. 以降の実験では置き換えた数字を用いてグラフを作成している.

(B) 標準呈色見本による定量性. 酵素反応速度, すなわち活性を標準呈色見本で求めた値と, 吸光度の値との直線性を確認した.

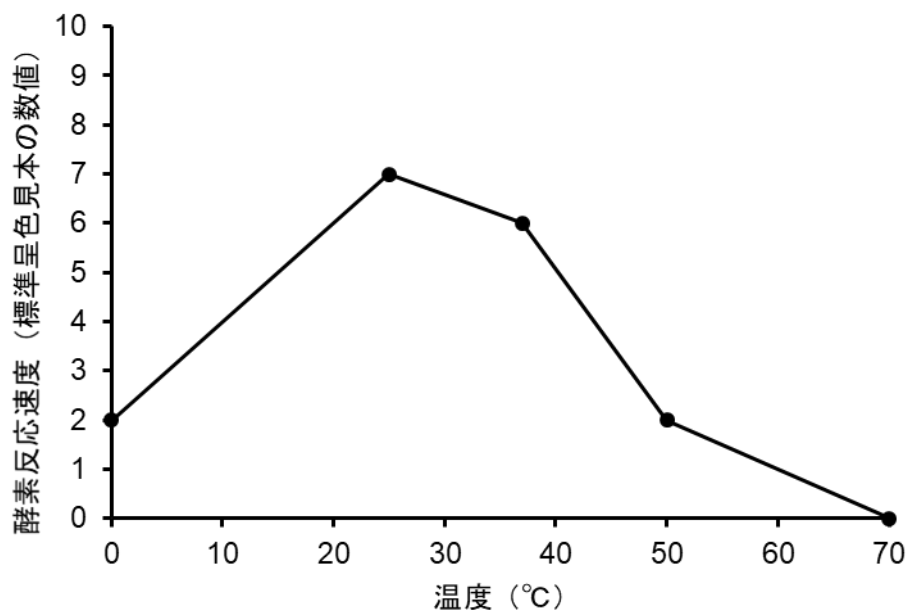


図8 本教育実験法にて測定したペルオキシダーゼの温度依存性

そこで、本実験において氷中～70℃の5段階の温度での酵素反応温度依存性を、標準呈色見本で定量的に分析できるか試行した。図8に示すように、最適温度の観察が可能となり、酵素反応を視覚的、定量的に理解できると考えられた。

酵素は、化学反応の活性化エネルギーを低下させる働きを持つ。酵素が化学反応の触媒であることを適切に捉えさせるため、酵素無添加反応も行った。基質液のみを37℃で1週間静置したところ、若干の呈色が見られたが5分間の酵素反応にも全く及ばず、酵素が触媒として化学反応を促進する性質を考察できるものと考えられた(図9)。

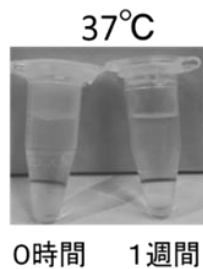


図9 酵素無添加反応

(2) 実験法に関する考察

本研究にて、市販のチューブ入り香辛料を酵素給源としたペルオキシダーゼ反応実験法が、実験条件の検討を種々実施された結果、高等学校の授業での実践を可能とする実験条件を付して提案された。実験操作は高校生にとって簡便になるよう設定されると共に、酵素反応時間も数分であることから、高校の授業時間内に充分収まることが期待される。実験にかかる費用は安価で、使用器具も特殊なものはない。酵素給源および基質に身近なものを用いるので、酵素や化学反応(酸化還元)に対し親近感が持てるのではないかと思われる。また、酵素無添加反応の結果は、酵素の触媒としての作用を示す良い比較例となるだろう。

高校生物教科書では酵素反応の特徴として、最適温度、最適 pH、および酵素-基質複合体に関して記載している。それらの説明図として、反応温度依存性、反応 pH 依存性、および基質濃度-反応曲線を示すそれぞれのグラフを必ず載せている。本研究では反応温度依存性を検討したが、酵素の他の特徴を、本研究で提案された酵素実験を通じて高校生が学ぶことも可能と考えられる。さらに、酵素反応阻害・促進実験や酵素安定性評価実験など、より発展的な検討への応用も可能と考える。

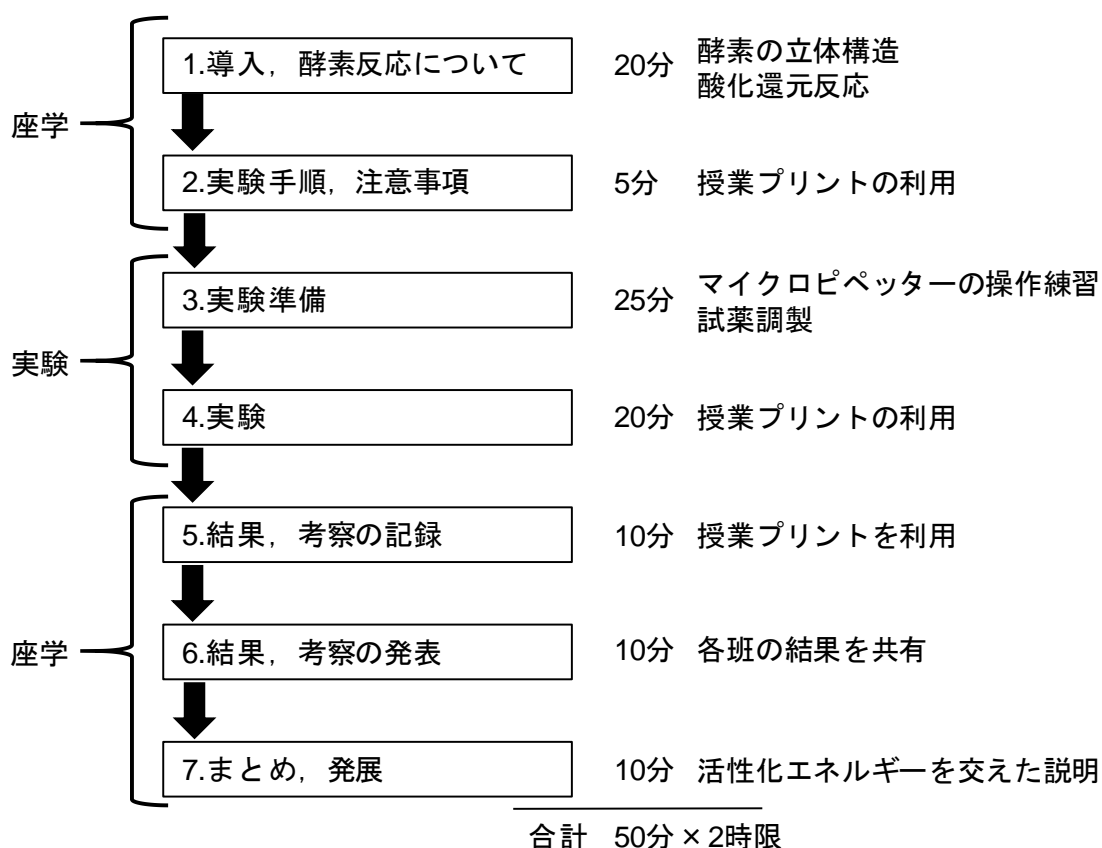


図10 授業スケジュール

(3) 授業実践

以下に示す高大連携授業にて、本研究で開発した教育実験法を高等学校の授業で実践した。対象は、「生物」授業にて酵素に関する座学を終了している2高校の2年生(合計51名)とした。授業は酵素に関する講義と実験とし、図10に示す2時限連続のスケジュールにて、合計3回(常翔啓光学園高校にて2回、常翔学園高校にて1回)実施した。実験は3~4人1班の班別にて行い、班内で作業を分担させた。生徒には、あらかじめ実験目的や手順、結果や考察などをまとめるための授業プリント(最終ページに添付)を配布し、理解の助けとした。また、この機にマイクロピペッターの使用方法も教育したいという高校側の要望があり、マイクロピペッターの使用練習の時間を組み入れた。以下に、実験材料、実験器具、実験装置と実験方法をまとめる。

<実験材料>

練りホースラディッシュ(ハウス食品, 40g), オキシドール(健栄製薬, 500mL), ABTS(アンモニウム塩, 富士フィルム和光純薬, 1g)。

<実験器具>

試験管6本, 試験管立て, ビーカー, メスシリンダー, 薬さじ, ピペット2本(または最大容量1mLのマイクロピペッターおよびチップ), スポイト(または最大容量0.1~0.2mLマイクロピペッターおよびチップ)。

<実験装置>

秤量用天秤, 50℃および 70℃設定可能なウォーターバス (無ければ実験直前に熱湯と水で湯浴を調製), 発泡スチロール製の氷入れ容器, タイマー.

<実験方法>

- ① 練りホースラディッシュをビーカーに 1 g 秤量し, メスシリンダーで測った 20 mL 蒸留水を入れて薬さじにて懸濁し, 酵素液を調製する.
- ② 6 本の試験管それぞれに 1 mL の ABTS 水溶液 (0.5 mmol/L 水溶液をあらかじめ作成) と 1 mL オキシドールを入れて混合, 基質液を調製し, 氷中に置く.
- ③ 酵素液 0.08 mL (または使い捨てスポイト 2 滴) を基質液に入れ, よく混ぜた後に各温度 [0℃, 室温 (20~25℃), 体温 (37℃), 50℃, 70℃] にて 5 分間反応させる. 対照 (酵素無し) として, 酵素液の代わりに蒸留水 0.08 mL を入れ, 室温にて 5 分間反応させる.
- ④ 反応後, 各試験管を氷中に置き, 呈色を標準呈色見本と対比して色番号を記録する.
- ⑤ 各試験管を室温に置き, 呈色の変化を観察する.

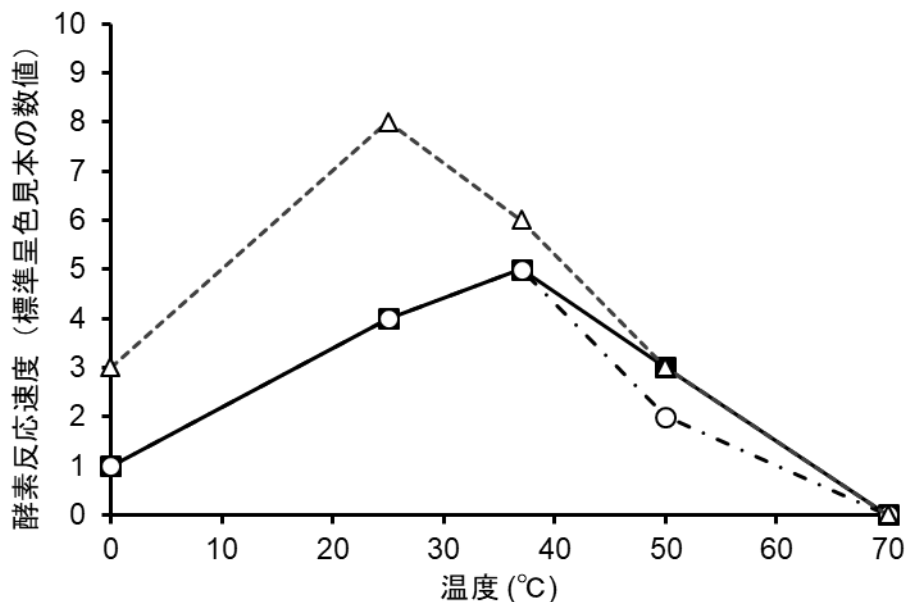


図 1 1 授業における酵素反応の温度依存性測定記録のグラフ

指導要領では「酵素については, その働きとタンパク質の立体構造との関係を扱うこと」とあり, 講義には酵素活性部位のアニメーションによる説明, 酵素の立体構造グラフィクスなどを取り入れた. また, 「生命現象を分子レベルで捉えるために必要な最小限の化学の知識」を重視し, ペルオキシダーゼの反応を例に酸化還元反応の基本についても説明した. さらに, 実験結果と酵素無添加反応を比較し, 化学反応における活性化エネルギーについて考察した.

各回共, 生徒達は酵素反応の進行や強弱が視認できることに興味を示し, 積極的に実験に取り組んでいた. 主な実験結果として, 各班の温度依存性検討記録をグラフ化し比較したところ, 予想通りの典型的な曲線が約半数の班で得られた (図 11). 一方, 予想外の結果を出

した班も存在した。主な理由は、0℃での酵素反応が室温での反応と同レベル観察されたためであった。これは、酵素反応開始後に試験管をすばやく0℃に移動せず、酵素反応液の温度低下に時間がかかったためと考えられた。

酵素反応をより定量的に分析するために、その呈色を標準呈色見本との対比で確認後、室温にて試験管を静置することで、70℃反応液は呈色が進まないことが確認できた。この結果より、タンパク質の熱変性と酵素失活についての議論を通じて考察を進めることができた。

授業の最後に、今後の改善の参考とするためアンケートを実施した。結果を図12に示す。実験の難易度については、問題無いものと思われた。酵素反応に関する知識・理解を深めるための仕掛けを、如何に増やしていくかが今後の課題と考えられた。酵素の利用分野については、食品分野に偏っており、ファインケミカルなど他分野の応用例⁹⁾を講義で例示することも一考すべきかもしれない。

(4) 授業実践に関する考察

本研究では、高大連携教育の場で、安価な練りホースラディッシュやオキシドールなどを使用した酵素反応を理解するための教育実験、および酵素反応に関する分子レベルでの理解のための講義を採り入れた高校授業を行った。結果として、酵素特性を理解するための効率的な取り組みであることが実践的に示せたと考える。ホースラディッシュ由来ペルオキシダーゼを対象とした本授業は、高等学校学習指導要領にも指摘されている以下の重要な要素を含んでいる。

- ・タンパク質が生命現象を支えている例として、生体触媒である酵素をとり上げる。
- ・酵素の機能に、タンパク質の立体構造が関わっている。
- ・タンパク質の機能を生命現象と関連付けるには、酵素に関する実験を行い、生命現象に酵素の働きが関わっていることに気付かせる。

現在は酵素実験として、ルシフェラーゼによる生物発光の実験や、解毒作用に関連するカタラーゼによる過酸化水素の分解の実験などが例示されている。ペルオキシダーゼによる酵素反応定量化実験は、既存の酵素実験と比較してメリットが大きい。具体的には、ルシフェラーゼ実験で確認し得る反応の定量性を、カタラーゼ実験同様に簡便・安価で特別な装置が無くても実現できる。

水中での酵素反応や反応の停止は温度低下に時間がかかってしまうため、実験操作に手間取ると冷却不十分による反応進行が生じた。冷却に食塩添加氷水を用いることで冷却時間の短縮が可能となると思われる。また、マイクロピペッター使用の技術的課題として、酵素液中の練りホースラディッシュに由来する繊維がチップの先に詰まり、不正確な分注作業となる場合があった。これについては、酵素液調製後少し時間をおいて繊維を沈澱させればよいことを指導すべきであった。

学生実験では、予想外の結果に対して原因を考えさせることも重要である。本授業においても、実験後に各班の結果を共有し、予想外の点について議論した。例えば、各温度での反応確認後、室温にて再度反応させることにより、酵素の熱失活について議論できた。今後は、各温度の制御がより厳密であればどうなるだろうか、本酵素反応の最適 pH や基質濃度依存性はどうかなど、時間内では確認が困難な事象についても議論できる場を設けたいと考えている。

本授業において、ペルオキシダーゼが植物に存在する生理的意義については簡単にしか触れなかった。ペルオキシダーゼは植物において様々な役割を担うことが知られており、生体内での酵素の働きを知るためにも、一例の紹介や生徒間で考察する場を設けるべきだったと考えている。ペルオキシダーゼの機能の一例として、特定分子の酸化もしくは活性酸素種レベルの制御により、木化、生長、ストレス防御機構、発芽などへの寄与が挙げられる⁽¹⁰⁾。しかし現時点では、一部の植物種の限られたペルオキシダーゼの役割しか分かっていない。

最後に、アンケートでは酵素の産業応用について医薬や検査などの医療・ヘルスケア分野⁽¹¹⁾、環境分野や繊維産業⁽¹²⁾などの身近な例をほとんど知らないことがわかった。今後の授業では、身近な酵素の応用例や大学における各種研究事例なども紹介したい。

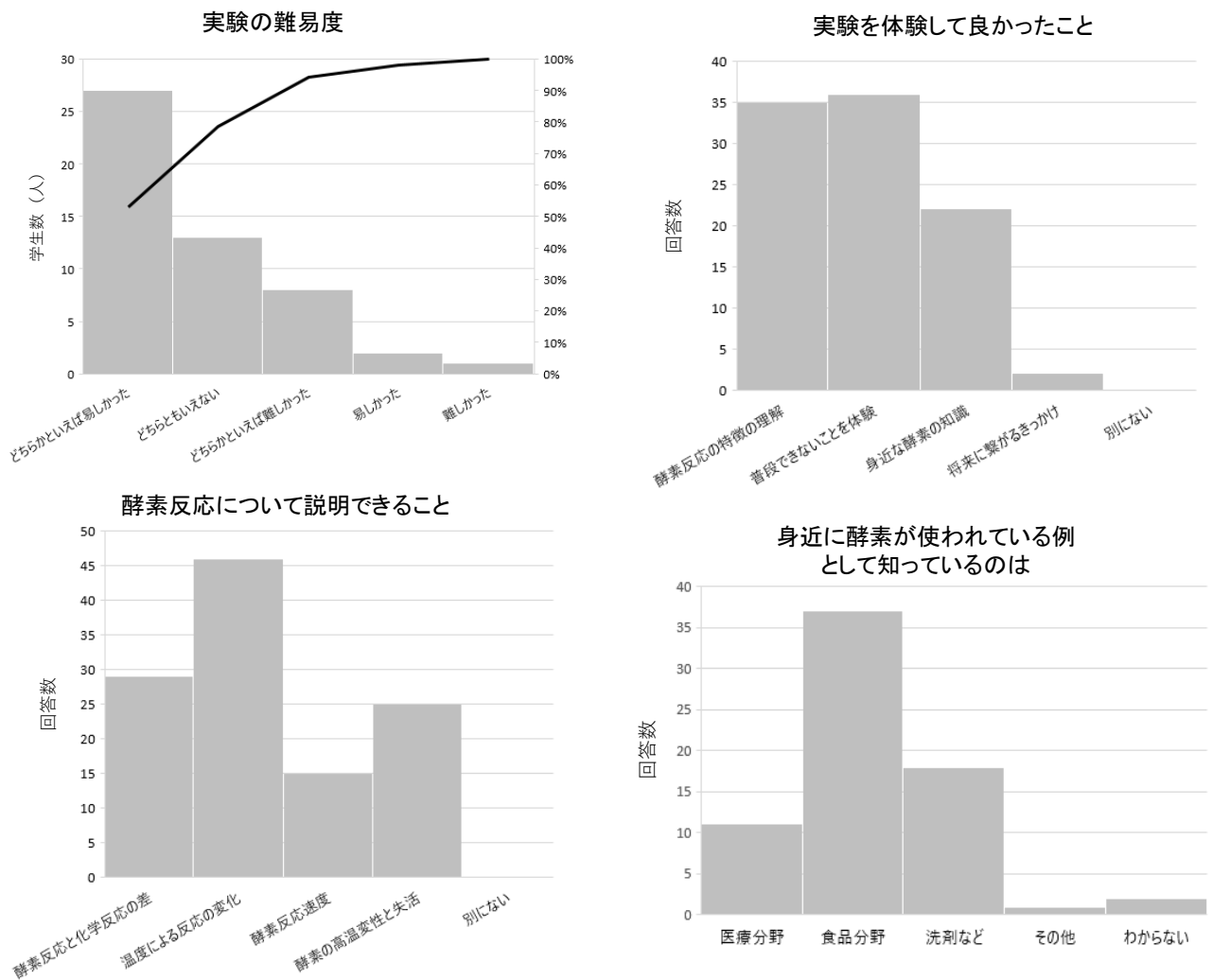


図 1 2 学生アンケートの集計結果

謝辞

授業実践を行うにあたり、学校法人常翔学園連携教育推進機構・濱田徹也様に高大連携教育としての実施を御調整頂きました。深謝致します。また、高校実験では摂南大学大学院・理工学研究科・生命科学専攻の福田光さん、岩本朱里さんに御手伝い頂き、感謝致します。

参考文献

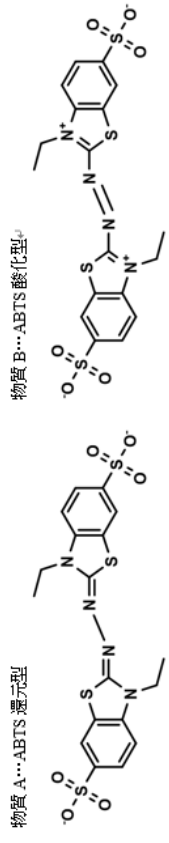
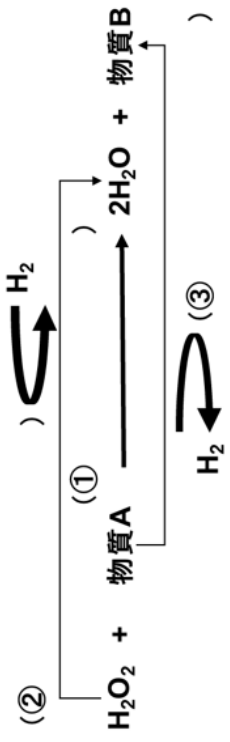
- (1) 文部科学省 2018 高等学校新学習指導要領. http://www.mext.go.jp/component/a_menu/education/micro_detail/_icsFiles/afieldfile/2018/07/11/1384661_6_1_2.pdf (アクセス 2019.1.29)
- (2) Veitch, N. C., “Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme.” *Phytochemistry* 65 (2004), pp.249-259.
- (3) Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szoke, H., Henriksen, A., Hajdu, J., “The Catalytic Pathway of Horseradish Peroxidase at High Resolution” *Nature*, 417 (2002), pp.463-468.
- (4) 手嶋眞一, 山本和巳, 西矢芳昭, 「臨床検査用遺伝子組み換え酵素」 バイオ検査薬と機器・装置, シーエムシー, (2001) pp.96-105.
- (5) 西矢芳昭, 山本和巳, 川村良久, 愛水重典, 「臨床検査用酵素の実用化技術の展開: クレアチニン分解酵素群の開発」 日本農芸化学会誌, 75 (2001), pp.857-862.
- (6) 西矢芳昭, 川上文清, 「コレステロール測定試薬とコレステロールオキシダーゼ」 酵素利用技術体系 (監修: 小宮山眞), エヌ・ティー・エス, (2010), pp.593-596.
- (7) 高垣奈保, 児玉悠史, 森田大紀, 徳本匠, 桜井孝治, 荒川勉, 大澤謙二, 「甜茶抽出物とペルオキシダーゼの組合せによる酵素的消臭効果」 日本食品科学工学会誌, 62 (2015), pp.409-416.
- (8) Gallati, H., “Horseradish peroxidase: a study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as substrates.” [in German] *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 17 (1979), pp.1-7.
- (9) 廣瀬芳彦, 「生体触媒を利用するプロセスケミストリーへの挑戦」, 有機合成化学協会誌, 69 (2011), pp.506-516.
- (10) 重藤潤, 堤祐司, 「細胞壁形成および修飾における植物ペルオキシダーゼの役割」 木材学会誌, 62 (2016), pp.91-100.
- (11) 西矢芳昭, 「酵素の開発と実用化」 医療と検査機器・試薬, 41 (2018), pp.229-233.
- (12) 佐伯勝久, 「洗剤用セリンプロテアーゼ」 化学と教育, 59 (2011), pp.120-123.

本論文で参照した教科書 (表 1 中の引用は著者名ではなく出版社名とした)

嶋田正和他 (2014) 生物 数研出版 平成 24 年検定, 庄野邦彦・馬場昭次他 (2015) 生物 実教出版 平成 26 年検定, 本川達雄・谷本英一他 (2015) 生物 啓林館 平成 24 年検定, 吉里勝利他 (2014) 生物 第一学習社 平成 24 年検定, 浅島誠他 (2016) 生物 東京書籍 平成 24 年検定

目標： を理解する。

(①) … 西洋わさびに多く含まれる酸化還元酵素。



- << 考察に使えるキーワード >>
- (④) … 高温により、タンパク質の形が変化すること。
- (⑤) … 酵素本来の機能を失うこと。
- (⑥) … 酵素が基質と反応するために最も適した温度。

<< 実験手順 >>

実験道具：わさび、オキシドール、ABTS水溶液、試験管、ビーカー、葉さじ、はかり、マイクロピペット

実験準備：

- ① わさび1gをビーカーに測り、メスシリンダーで測った蒸留水20mLを加えよく溶かす。(酵素液完成)
- ② 試験管を6本用意し、ラベリングをして条件と班番号を書く。(酵素無し、0°C、室温、体温、50°C、70°C)

③ 6本の試験管にABTS水溶液とオキシドールを1mLずつ加えよく混ぜ、氷上で保存する。

実験操作：

- ① 酵素無しの試験管を用いて、班全員で手順を確認する。蒸留水を80μL入れた時間を記録し、室温で静置する。5分後水でよく冷やし、標準呈色見本と試験管の色を比較し、素早く記録する。記録後試験管は次から出し、室温で静置する。
- ② 試験管に酵素液を80μLずつ加えよく混ぜ、各反応温度で5分間静置する。(0°Cの試験管は次に入れる。体温の試験管は試験管の下部を軽く握る。※試験管はガラスです！力の入れすぎで割れないよう注意！！50°C70°Cの試験管は恒温槽に入れる。※やけどに注意)
- ③ 5分後全ての試験管を氷でよく冷やし、氷から1本ずつ取り出し、標準呈色見本と試験管の色を比較し記録する。記録後試験管は次から出し、室温で静置する。

<< 結果 >>

6種類 (酵素無し、0°C、室温、0°C、体温37°C、50°C、70°C)

① 標準呈色見本の番号(酵素反応速度)を表に記入する。

| 班 | 酵素無し | 0°C | 室温 | 体温37°C | 50°C | 70°C |
|---|------|-----|----|--------|------|------|
| | | | | | | |

② 実験から分かったペルオキシダーゼの最適温度は？

③ 試験管を氷から出した後、最も変化した温度は？また、最後までで色の変化が無かった温度は？

<< 考察 >>

① 温度による色の違いは何故生じるのか？

② 結果③のようになったのは何故か？

③ なぜ酵素を入れると、化学反応を促進して色が変化するのか？

<< 発問問題 >>

結果①を用いて、縦軸は標準呈色見本の番号(酵素反応速度)、横軸は酵素反応温度のグラフを作成する。

