

第3回研究会 (1994年2月5日)

## 新しい試薬を利用した脱水素酵素の実験

神奈川県立津久井浜高等学校 築 瀬 公 成

### はじめに

神奈川県高等学校教科研究会理科部会, 生物実験実習委員会では, 脱水素酵素を検出する実験に適した試薬として, INTという色素を紹介した(理科部会報, 1992). この試薬は, 補酵素のNADと反応しやすいために, 水素受容体としては鋭敏すぎ, 酵素反応速度の比較には不向きであるという欠点がある.

その後検討を重ねた結果, 適度な水素受容活性をもつ試薬の知見を得, 実験内容にも改良を加えたので紹介したい.

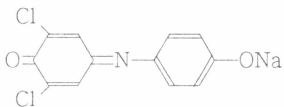
### 実験方法

#### 1) 試薬について

DCIP 0.1%水溶液とPMS 0.1%水溶液を1:1の割合で混合した液を, 脱水素酵素の検出色素液として用いた.

#### ● DCIP

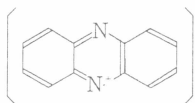
(2,6-ジクロロインドフェノールナトリウム水和物)  
2,6-Dichloroindophenol Sodium, Hydrate  
 $C_{12}H_6Cl_2NNaO_2$



(株)関東化学  
特級 (1g)

#### ● PMS (フェナジンメトスルフェート)

5-Methylphenazinium Methyl Sulfate  
 $C_{14}H_{14}N_2O_4S$



$CH_3SO_3^-$  (株)関東化学  
鹿1級 (1g)

この混合した色素液は濃青色をしていて, 水素受容体としてはたつき, 還元されると退色する. したがって, 生物細胞を用いたときに, 色素液が退色す

れば, 脱水素酵素の働きにより基質から水素が取りだされたことの証拠になる.

この色素液は, 生徒実験に用いることを考えると, 次のような条件を満たす試薬として有用である.

- ①自動酸化されないため, ツンベルグ管やアスピレーターを使わずに, 試験管だけを用いて行えるので, 一度に何本でも実験できる.
- ②反応時間が数分で終了する.
- ③酵素反応の最適温度が調べられる.
- ④酵素反応の最適pHが調べられる.

実験を始める前に多少時間がかかっても, ハイドロサルファイトナトリウムなどの還元剤を, 色素液の中に加えてみて, 実際に色素が退色していく様子を見せておきたい. こうすることにより, 生徒は, 色素液 (DCIP) が水素を受容すると還元され, それにより退色するという現象をよく理解できる.

PMSは光分解性があるので, 水溶液は冷暗所で保存する. また, 混合液は反応活性が低下しやすいので使用直前に混合する. 混合色素液は青色だが, 酵素反応がなくとも, 強酸性や強アルカリ性下では赤色などに変色してしまう. しかし, pH 5~9の範囲では酵素反応を見るのには支障がない.

#### 2) 材料について

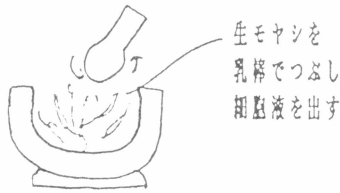
生物の細胞内の酵素を検出していることを生徒が実感できるためには, どのような材料であっても, 実験の当初に粗酵素液を抽出することから始めさせたい. 今回は実験材料として, 市販の無漂白モヤシを用いた. モヤシは無漂白であれば, 安価なものでよい. ただし, モヤシの品質によって, 抽出液量や酵素活性が異なるので, あらかじめ予備実験をして, 適当な粗酵素液量を確認することが必要である.

トリのササミからの抽出液では, 時間を要するが

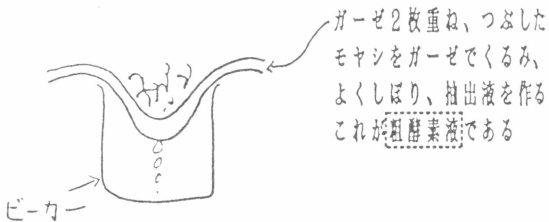
濾過すれば使える。また市販のドライイーストでは添加物のビタミンCが、それ自体還元剤となるため、酵素反応の有無にかかわらずDCIPが変色してしまうので本実験には適さない。しかし、「ホシノ天然酵母パン種」は添加物が含まれていないので、この実験には適している。

3) 手順

- ①モヤシを乳鉢でつぶして細胞液を出し、ガーゼでしぼり抽出液をつくる(粗酵素液)。



乳鉢



- ②基質として、コハク酸ナトリウム0.01mol/l水溶液を用意する。
- ③4本の試験管(A~D)を用意し、そのうちのA~Cには次の薬品などを入れ、各温度のビーカーに10分くらいつけておく(温度を一定に保つ)。(ビーカーは各班に用意してもよいが、実験室の前後に数個置くだけで十分である)

(単位はml)

	A	B	C
コハク酸ナトリウム液	2	2	2
純水	2	—	—
モヤシの粗酵素液	—	2	2
水温	35~40℃	35~40℃	10℃以下

- ④Dの試験管にはモヤシ粗酵素液を2ml加え、アルコールランプで少し沸騰する程度に加熱し、その中に、コハク酸ナトリウム液を2ml加える。
- ⑤A~Cについては10分経過し、ほぼ所定の温度になった後、Dについても10分程放置して冷めた

後、各試験管に色素液を1mlずつ加え、さらに、5分ほど、それぞれの温度のビーカーにつけた後(Dについてはそのままでもよい)、色の変化の様子を観察する。

4) 結果と考察

脱水素酵素がはたらいてコハク酸から水素がとれ、それを水素受容体であるDCIPが受けとると、青色から緑色、黄色へと変色していく。最適温度のものに比べ、氷水につけておいたものは色の変化がみられない。しかし、低温でも時間が経過するにつれて徐々に変化していくため、比較するタイミングが遅くならないようにしたい。

また、熱による変性を確認するために、直接アルコールランプで粗酵素液を加熱するという方法をとった。この理由はあらかじめ酵素活性を低下させてしまわないと、反応が鋭敏なために、期待したような結果がでないからである。

5) 発展

- ①マロン酸による阻害

マロン酸ナトリウム水溶液を加えることにより、阻害剤のはたらきを確認することができる。しかし、マロン酸水溶液はpHがおよそ1~2という強酸性であるため、酵素反応の有無にかかわらずDCIPが変色してしまう。これを防ぐには、あらかじめNaOH水溶液を加え中和しておく必要がある。

- ②pHによる影響

リン酸緩衝液を用いてpHを調製し(pH=5.3, 6.2, 7.0, 8.3)、それぞれについて変色の様子を観察する。これにより、コハク酸脱水素酵素の最適pHを求めることができる。

おわりに

生徒の提出したレポートをみると、生物の細胞の中には呼吸に関与する脱水素酵素が必ず存在し、また、それはタンパク質からできた酵素の一種であるということが、十分理解できていたようである。今後も探究活動のひとつとして、対照実験の工夫や、実験の組み立て方も含めて、生徒に考えさせていければよいと考える。