

購入したタンパク質定量試薬を用いての ペプシンの酵素反応の教材化

加 藤 良 一

地域教育文化学部 地域教育文化学科

木 村 孝 真

教育実践研究科 教職実践専攻

土 井 正 路

山形大学 附属中学校

長 根 智 洋

北海道教育大学 教育学部 釧路校

鈴 木 拓 史

地域教育文化学部 地域教育文化学科

山形大学紀要（教育科学）第16巻第4号別刷

平成29年（2017）2月

リサイクル適性 

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。

購入したタンパク質定量試薬を用いての ペプシンの酵素反応の教材化

加藤 良一

地域教育文化学部 地域教育文化学科

木村 孝真

教育実践研究科 教職実践専攻

土井 正路

山形大学 附属中学校

長根 智洋

北海道教育大学 教育学部 釧路校

鈴木 拓史

地域教育文化学部 地域教育文化学科

(平成28年11月15日受理)

要 旨

80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1:10000 (和光純薬工業(株) Catalog No: 161-24482) および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) を、39°Cで10分間酵素反応させた。そして、その反応液をバイオ・ラッド ラボラトリーズ社製のタンパク質定量試薬で発色させると、反応後に青色が薄くなることを肉眼でも確認でき、ペプシンによるウシ血清アルブミンの分解を示すことができた。さらに、この反応条件下で、ペプシンの活性に及ぼすpHの影響も確かめることができた。また、120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1:10000および1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ γ グロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) を、39°Cで10分間酵素反応させた。そして、その反応液をこのタンパク質定量試薬で発色させると、同様にペプシンによるウシ γ グロブリンの分解も示すことができた。

I はじめに

酵素反応は、生命を維持するために必要不可欠なものである。中学校理科で酵素を教材として取り上げているのは、デンプンを糖に変えるヒトの唾液アミラーゼを用いた実験¹⁾²⁾³⁾⁴⁾のみであり、高等学校「生物基礎」・「生物」の教科書では、過酸化水素を分解するカタラーゼの実験⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、コハク酸脱水素酵素の実験¹²⁾¹³⁾、またはルシフェラーゼの実験¹⁴⁾が紹介されていて、いずれもタンパク質分解の実験は載せられていない。筆者らは、はんぺんの切片上にパイナップルまたはメロンを乗せて反応させる方法と、はんぺんまたは牛肉の切片をパイナップルの搾り汁の中に入れて反応させる方法の2つのタンパク質分解の酵素反応の教材を提唱した¹⁵⁾。また、タンパク質分解酵素であるトリプシンまた

はパパインと卵白をセルロースチューブに入れて反応した後の分解物を透析させる実験¹⁶⁾、タンパク質分解酵素によるゼラチンの分解を試作の落下式粘度計を用いて測定する実験¹⁷⁾、固めたゼラチンの上にタンパク質分解酵素を含むキュウイフルーツを乗せて反応させる実験¹⁸⁾、および写真用フィルムのゼラチン層をキュウイフルーツの搾り汁で溶かす実験¹⁹⁾などが、タンパク質分解の酵素反応の教材としてすでに紹介されてきた。しかし、これらのタンパク質分解の全ての教材では、現場の授業の1校時(45分または50分)以内にその酵素反応が終了して、その実験結果が得られるものはなかった。

Bradford法²⁰⁾によるタンパク質定量試薬はバイオ・ラッド ラボラトリーズ社から販売されていて、この試薬は取扱い上ほとんど危険性がなく、さらにこの試薬を一度添加するだけで瞬時にタンパク質が定量できる。そこで筆者らは、このタンパク質定量試薬を用いて、タンパク質分解酵素であるトリプシンの酵素反応を安全に短時間で行える実験教材を開発した²¹⁾。これに引き続いて、本研究では、同じタンパク質分解酵素であるペプシンの酵素反応を、このタンパク質定量試薬を用いて実験教材化した。

II 研究方法

1. 試薬

タンパク質分解酵素のペプシン 1:100 (ブタ胃粘膜由来、25g、和光純薬工業(株) Catalog No: 163-00642)、同酵素のペプシン 1:10000 (ブタ胃粘膜由来、生化学用、25g、和光純薬工業(株) Catalog No: 161-24482)、基質のウシ血清アルブミン (100g、Sigma Chemical Co. 製品番号: A-8022)、基質のウシγグロブリン (2 mg/mlの水溶液、Prod #23212, Thermo Scientific, USA)、およびタンパク質定量試薬 (プロテインアッセイ染色液、450ml、バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株) Catalog No: 500-0006) は購入した。なお、ペプシンの「1:100」または「1:10000」は、この酵素1gで100gまたは10000gの卵白アルブミンを、50℃下2時間で完全に分解できる酵素活性を示している。

2. 事前の準備

200mM ホウ酸Na Buffer (pH9.0)、200mM K-リン酸 Buffer (pH6.0)、および200mM クエン酸 Na Buffer (pH3.0) を作製した。ペプシンを400 μg/mlの濃度で、ウシ血清アルブミンを4 mg/mlの濃度で、それぞれ蒸留水に溶かした。なお、酵素および基質が変性しないように、ペプシン水溶液およびウシ血清アルブミン水溶液は実験当日に準備した。また、実験当日に、タンパク質定量試薬の原液は、蒸留水で5倍に希釈した。

3. 酵素反応

200mM Bufferを200 μl、4 mg/mlウシ血清アルブミンを400 μl、400 μg/mlペプシンを400 μl、100 μl、または25 μl、および全量が2 mlになるように蒸留水を適量、これらを試験管(長さ:103mm、直径:14mm)の中に入れた。または、200mM クエン酸 Na Buffer (pH3.0) を60 μl、2 mg/mlウシγグロブリンを360 μl、400 μg/mlペプシン1:10000を180 μlまたは45 μl、および全量が600 μlになるように蒸留水を適量、これらを同試験管の中に入れた。そして、これらを試験管攪拌機 (アズワン(株)、Automatic Labo-Mixer

NS-9)を用いて攪拌した。つぎに、この試験管を、0℃の水中、39℃の水温に調整したインキュベーター(大洋科学工業株、Mini-80/Personal-10、振とう:76回/分)、65℃、75℃、85℃、または93℃の水温に調整したウォーターバス(アドバンテック東洋株、TBS181SA)に入れて、酵素反応を適時間行った。そして、この試験管の中から反応液を80μl取り出して別の試験管に入れ、そこに希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、試験管攪拌機を用いて攪拌した。5分間が過ぎたら、595nmの波長に設定した分光光度計(紫外可視分光光度計、島津製作所、UV mini-1240)を用いて、その吸光度を測定した。また、そのときに発色した青色の濃さを肉眼でも確認した。ここで用いられたペプシンはブタ胃粘膜由来なので、この酵素の基本的な反応温度はブタの正常体温と同じ39℃とした。なお、実験終了後には、このタンパク質定量試薬によってガラス器具に付着した青色の色素は、少量の100%エチルアルコールで洗浄して取り除いた。

タンパク質分解酵素の活性について、基質タンパク質の水溶液にこのタンパク質定量試薬を添加して発色させた青色の濃さ(または595nmの波長の吸光度)と、基質タンパク質の水溶液にタンパク質分解酵素を加えて反応をさせた後にタンパク質定量試薬をそこに添加して発色させた青色の濃さ(または595nmの波長の吸光度)とを比較し、その両者の差がこの酵素活性を示すことになる。

Ⅲ 結果

1. ペプシン 1 : 100 による分解

①80μg/mlペプシン1:100および800μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)を酵素反応液として、39℃で120分間、ウシ血清アルブミンをペプシン1:100で分解させた。このとき、30分おきに酵素反応液をそれぞれ取り出し、そこに希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、①の酵素反応液では短時間でその吸光度はなかなか下がらなかった(図1)。

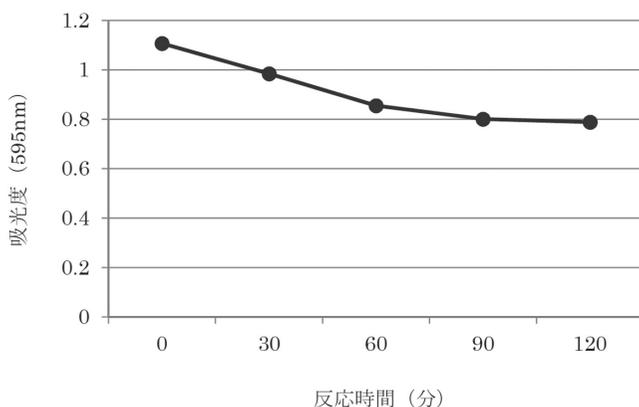


図1 ペプシン1:100によるウシ血清アルブミンの分解

①80μg/mlペプシン1:100(和光純薬工業株Catalog No:16300642)および800μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer(pH3.0)2mlを、39℃で120分間インキュベートし、ペプシン1:100の酵素反応をさせた。このとき、30分おきに酵素反応液を80μlそれぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

2. ペプシン 1 : 10000 による分解

②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)、③20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)、または④5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)を酵素反応液として、39°Cで20分間、ウシ血清アルブミンをペプシン 1 : 10000で分解させた。このとき、5分おきに酵素反応液をそれぞれ取り出し、そこに希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、②の酵素反応液では、短時間でその吸光度が低下し(図2)、10分間反応させると、発色した青色が薄くなり、それが肉眼でも明確に確認できた(図3)。③の酵素反応液でもその吸光度は低下したが、②の結果と比較するとその低下は緩やかだった(図2)。また、④の酵素反応液では、吸光度はなかなか下がらなかった(図2)。

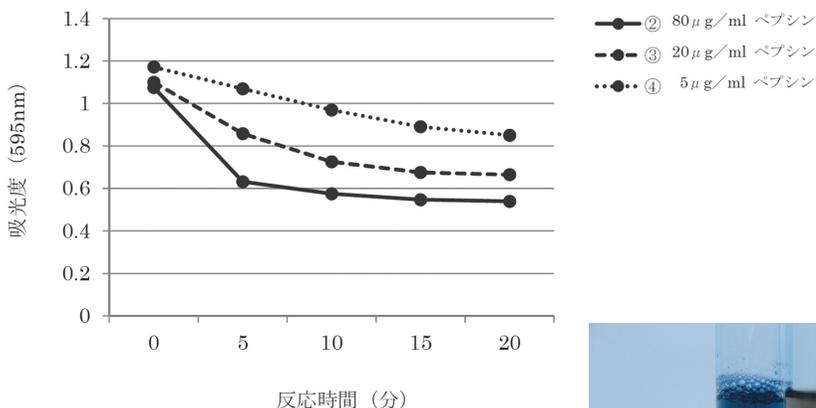


図2 ウシ血清アルブミンの分解におけるペプシン 1:10000の濃度

②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1:10000 (和光純薬工業㈱ Catalog No: 161-24482) および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2ml、③20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1:10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2ml、または④5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1:10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2mlを、39°Cで20分間それぞれインキュベートし、ペプシン 1:10000の酵素反応をさせた。このとき、5分おきに酵素反応液を80 μl それぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッド ラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

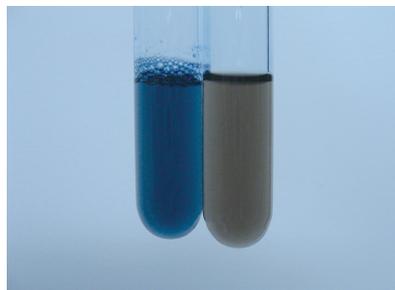


図3 ペプシン1:10000によるウシ血清アルブミンの分解

左: 酵素反応前、右: 10分間の酵素反応後

⑤120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ γ グロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)、または⑥30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ γ グロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)を酵素反応液として、39°Cで20分間、ウシ γ グロブリンをペプシン 1 : 10000で分解させた。このとき、5分おきに酵素反応液をそれぞれ取り出し、そこに希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、⑤の酵素反応液では短時間でその吸光度が低下したが(図4)、⑥の酵素反応液では吸光度はなかなか下がらなかった(図4)。

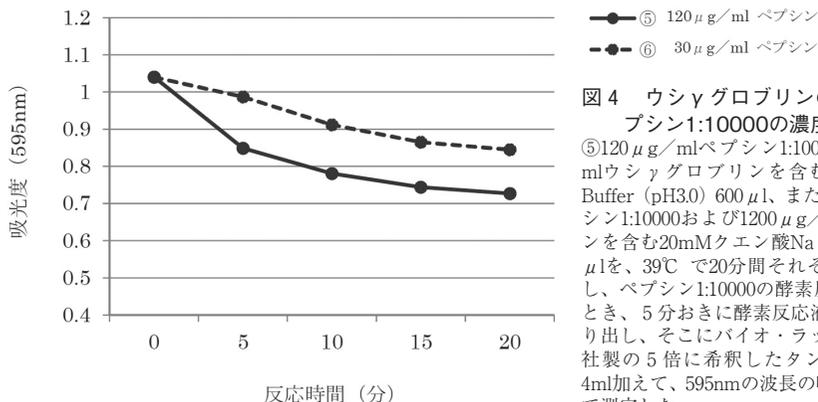


図4 ウシγグロブリンの分解におけるペプシン1:10000の濃度

⑤120 μg/mlペプシン1:10000および1200 μg/mlウシγグロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 600 μl、または⑥30 μg/mlペプシン1:10000および1200 μg/mlウシγグロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 600 μlを、39℃で20分間それぞれインキュベートし、ペプシン1:10000の酵素反応をさせた。このとき、5分おきに酵素反応液を80 μlそれぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

3. pHの影響

②80 μg/mlペプシン1:10000および800 μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0)、⑦80 μg/mlペプシン1:10000および800 μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mM K-リン酸 Buffer (pH6.0)、または⑧80 μg/mlペプシン1:10000および800 μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0)を酵素反応液として、39℃で10分間、ウシ血清アルブミンをペプシン1:10000で分解させた。そして、各酵素反応液に希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、pH3で反応させるとその吸光度は低かったが(図5)、pH6およびpH9で反応させてもその吸光度は高いままだった(図5)。なお、この結果は、青色の違いとして肉眼でも確認できた(図6)。

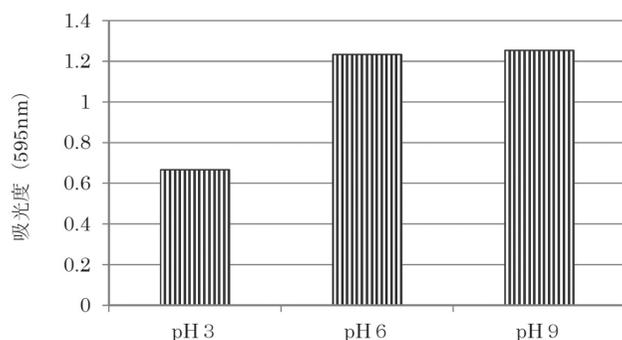


図5 ウシ血清アルブミンの分解におけるペプシン1:10000の活性に及ぼすpHの影響

②80 μg/mlペプシン1:10000および800 μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2ml、⑦80 μg/mlペプシン1:10000および800 μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mM K-リン酸 Buffer (pH6.0) 2ml、または⑧80 μg/mlペプシン1:10000および800 μg/mlウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2mlを、39℃で10分間それぞれインキュベートし、ペプシン1:10000の酵素反応をさせた。その後、これらの酵素反応液の中から80 μlをそれぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。



図6 ペプシン1:10000の活性に及ぼすpHの影響

左: pH3のBuffer中で酵素反応、
中: pH6のBuffer中で酵素反応、
右: pH9のBuffer中で酵素反応

4. 温度の影響

②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) を酵素反応液として、0 $^{\circ}\text{C}$ 、39 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 、85 $^{\circ}\text{C}$ 、または93 $^{\circ}\text{C}$ で10分間、ウシ血清アルブミンをペプシン 1 : 10000で分解させた。そして、各酵素反応液に希釈したタンパク質定量試薬を加えてその吸光度を測定した。その結果、65 $^{\circ}\text{C}$ で反応させるとその吸光度は最も低くなった (図7)。

20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) に含まれる800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カゼイン (乳由来、化学用、500g、和光純薬工業(株) Catalog No : 030-01505) の基質に対して、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000を39 $^{\circ}\text{C}$ で60分間作用させても、このタンパク質定量試薬による595nmの波長の吸光度は全く下がらなかった (データは示さない)。なお、この原因は不明である。

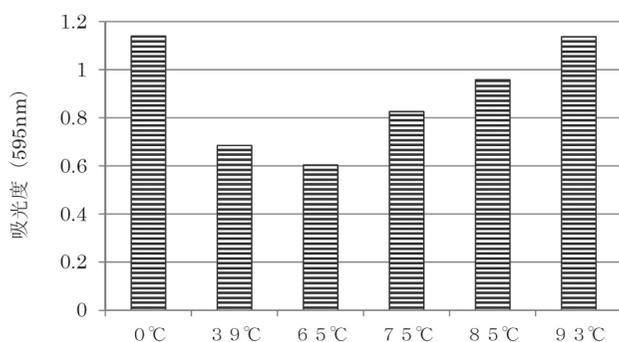


図7 ウシ血清アルブミンの分解におけるペプシン1:10000の活性に及ぼす温度の影響

②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン1:10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2mlを、0 $^{\circ}\text{C}$ 、39 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 、85 $^{\circ}\text{C}$ 、または93 $^{\circ}\text{C}$ で10分間それぞれインキュベートし、ペプシン1:10000の酵素反応をさせた。その後、これらの酵素反応液の中から80 μl をそれぞれ取り出し、そこにバイオ・ラッドラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。

IV 考察

酵素を教材として取り上げる中学校の現場では、ヒトの唾液とデンプン溶液を混ぜ合わせて反応させ、そこにヨウ素液やベネジクト液を加えて、デンプンが糖に変わったことを確かめる実験¹⁾²⁾³⁾⁴⁾が行われていて、このような唾液アミラーゼによるデンプン分解の実験が全てで、タンパク質分解の実験は行われていない。高等学校では、すりおろしたダイコン⁵⁾⁶⁾、すりおろしたジャガイモ⁷⁾、動物の肝臓の小片⁵⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾、または動物のすりつぶした肝臓¹¹⁾で過酸化水素を分解するカタラーゼの実験、酵母液とコハク酸ナトリウム水溶液を混ぜ合わせて反応させメチレンブルーの色の変化で観察するコハク酸脱水素酵素の実験¹²⁾¹³⁾、またはルシフェリンを分解するルシフェラーゼの実験¹⁴⁾が行われているが、タンパク質分解の実験は「生物基礎」・「生物」の教科書では取り上げられていない。ところで、今までに報告されてきたタンパク質分解の教材¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾では、理科や生物の授業の1校時以内にその酵素反応が終了して、その実験結果が得られるものはなかった。そこで筆者らは、バイオ・ラッドラボラトリーズ社製のタンパク質定量試薬を用いて、タンパク質分解酵素であるトリプシンの酵素反応を短時間で行える教材を開発した²¹⁾。本研究では、同様にこのタンパク質定量試薬を用いて、タンパク質分解酵素であるペプシンの酵素反応を実験教材として使用できるようにすることが目的である。

筆者らがすでに報告したように、トリプシンは基質であるウシ血清アルブミンを分解

し、このタンパク質定量試薬を用いてそれが容易に確認できた²¹⁾。そこで、ペプシンも同様にウシ血清アルブミンを分解し、それが確認できるのか調べた。800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウシ血清アルブミンに対して①80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシン 1 : 100を作用させた結果、この酵素で分解するには時間がかかり(図1)、この条件では現場の授業の1校時以内に実験が終了しないことが分かった。そこで、より酵素活性が高いペプシン 1 : 10000をつぎに用いることにし、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウシ血清アルブミンに対して、ペプシン 1 : 10000の濃度を②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、③20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または④5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としてそれぞれ作用させた。その結果、②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシン 1 : 10000は短時間でこの基質を分解でき(図2)、この条件ならば教材化できることが明らかとなった。なお、この条件下で10分間酵素反応させると、肉眼でもウシ血清アルブミンの分解が明確に確認できた(図3)。さらに、ペプシンは別の基質であるウシ γ グロブリンを分解し、それが確認できるのかも調べた。1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウシ γ グロブリンに対して、⑤120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシン 1 : 10000または⑥30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシン 1 : 10000をそれぞれ作用させた結果、⑤120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプシン 1 : 10000は15分程度でこの基質の分解を確認できることが分かった(図4)。しかし、ウシ γ グロブリンはウシ血清アルブミンと比較してかなり高価な試薬であるので、中学校や高等学校の授業でウシ γ グロブリンを使うのは予算的に難しいかもしれない。

高等学校「生物」の教科書には、カタラーゼ^{7) 8) 11)} またはルシフェラーゼ¹⁴⁾ の活性に及ぼすpHの影響が載っている。また、トリプシンの活性に及ぼすpHの影響の教材を、筆者は報告した²¹⁾。そこで、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む②pH3.0、⑦pH6.0、または⑧pH9.0のBufferを、39℃で10分間インキュベートさせた。その結果、ペプシンの活性はpH3で最も高いことを示すことができた(図5、図6)。

カタラーゼ^{7) 10)}、ルシフェラーゼ¹⁴⁾、またはトリプシン²¹⁾ の活性に及ぼす温度の影響も、教材として紹介されている。そこで、②80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トリプシン 1 : 10000および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含むBuffer (pH9.0) を、0℃、39℃、65℃、75℃、85℃、または93℃で10分間インキュベートさせた結果、ペプシンの活性は65℃で最も高かった(図7)。すなわち、ブタの体温の39℃の温度条件よりも、より高い温度でこの酵素は活性が高かった。ここで、哺乳類が持っている酵素の最適温度は、その動物の正常体温と必ずしも一致していないことを明らかにした。

以上の結果から、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製のタンパク質定量試薬を用い、ウシ血清アルブミンを基質として、ペプシンの酵素反応が安全に短時間で行え、加えて、この酵素活性に及ぼすpHの影響の結果も得やすい、タンパク質分解酵素の新たな教材をここに提唱することができた。実際には、上記のⅢの2を中学校理科2年生の授業で、上記Ⅲの2および3を高等学校「生物」の授業で、それぞれ行うことができると考える。

V まとめ

①80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプシン 1 : 100 (和光純薬工業(株) Catalog No : 163-00642) および800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2 mlを、39℃で120分間インキュベートし、ペプシン 1 : 100の酵素反応をさせた。このとき、30分おきに酵素反

応液を80 μ l取り出し、そこにバイオ・ラッド ラボラトリーズ社製の5倍に希釈したタンパク質定量試薬を4ml加えて、595nmの波長の吸光度を分光光度計で測定した。その結果、短時間ではその吸光度は下がらなかった。つぎに、②80 μ g/mlペプシン1:10000(和光純薬工業株式会社 Catalog No:161-24482) および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2ml、③20 μ g/mlペプシン1:10000および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2ml、または④5 μ g/mlペプシン1:10000および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2mlを、39 $^{\circ}$ Cで20分間それぞれ酵素反応させ、同様に希釈したタンパク質定量試薬を加えて同様に吸光度を測定すると、②80 μ g/mlの酵素濃度が適量で、さらにこの条件下で39 $^{\circ}$ Cで10分間酵素反応させると、肉眼でもウシ血清アルブミンの分解が明確に確認できた。また、⑤120 μ g/mlペプシン1:10000および1200 μ g/mlウシ γ グロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 600 μ l、または⑥30 μ g/mlペプシン1:10000および1200 μ g/mlウシ γ グロブリンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 600 μ lを、39 $^{\circ}$ Cで20分間それぞれ酵素反応させ、同様に希釈したタンパク質定量試薬を加えて同様に吸光度を測定すると、⑤120 μ g/mlの酵素濃度で、ウシ γ グロブリンの分解が明確に確認できた。さらに、②80 μ g/mlペプシン1:10000および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2ml、⑦80 μ g/mlペプシン1:10000および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mM K-リン酸 Buffer (pH6.0) 2ml、または⑧80 μ g/mlペプシン1:10000および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMホウ酸Na Buffer (pH9.0) 2mlを、39 $^{\circ}$ Cで10分間それぞれ酵素反応させ、同様に希釈したタンパク質定量試薬を加えて同様に吸光度を測定すると、ペプシンの活性はpH3で最も高く、このことは青色の濃さの違いとして肉眼でも確認できた。加えて、②80 μ g/mlペプシン1:10000および800 μ g/mlウシ血清アルブミンを含む20mMクエン酸Na Buffer (pH3.0) 2mlを、0 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、85 $^{\circ}$ C、または93 $^{\circ}$ Cで10分間それぞれ酵素反応させ、同様に希釈したタンパク質定量試薬を加えて同様に吸光度を測定すると、ペプシンの活性は65 $^{\circ}$ Cで最も高かった。よって、中学校理科2年生の授業または高等学校「生物」の授業において、以上をタンパク質分解酵素の新たな教材として提唱できた。

なお、本研究は、一般財団法人日本文具財団の平成27年度助成金を用いて行われた。筆者らは、この一般財団法人日本文具財団にここで深く感謝申し上げる。また、本研究の一部は、山形大学大学院教育実践研究科の大学院生を対象とした授業科目「教職実践プレゼンテーションⅠ(教科教育高度化分野・理科)」の中で、生物教育の教材開発研究として行ったものである。

引用・参考文献

- 1) 岡村定矩、藤嶋昭、ほか49名(2012)「文部科学省検定済教科書 新しい科学2年」東京書籍pp. 85-86.
- 2) 有馬郎人、ほか57名(2012)「文部科学省検定済教科書 理科の世界2年」大日本図書 pp. 101-102.

- 3) 霜田光一、ほか25名 (2012) 「文部科学省検定済教科書 中学校科学2」学校図書 pp. 130-131.
- 4) 細矢治夫、養老孟司、下野洋、福岡敏行、ほか25名 (2012) 「文部科学省検定済教科書 自然の探求 中学校理科2」教育出版pp. 131-132.
- 5) 本川達雄、谷本英一、ほか16名 (2013) 「文部科学省検定済教科書 生物基礎」新興出版社啓林館 pp. 43
- 6) 吉里勝利、ほか17名 (2014) 「文部科学省検定済教科書 高等学校生物基礎」第一学習社 pp. 102
- 7) 本川達雄、谷本英一、ほか16名 (2013) 「文部科学省検定済教科書 生物」新興出版社啓林館 pp. 29
- 8) 吉里勝利、ほか16名 (2014) 「文部科学省検定済教科書 高等学校生物」第一学習社 pp. 46
- 9) 嶋田正和、ほか11名 (2013) 「文部科学省検定済教科書 生物基礎」数研出版 pp. 39
- 10) 浅島誠、ほか20名 (2014) 「文部科学省検定済教科書 生物」東京書籍 pp. 35
- 11) 嶋田正和、ほか21名 (2013) 「文部科学省検定済教科書 生物」数研出版 pp. 25
- 12) 浅島誠、ほか20名 (2014) 「文部科学省検定済教科書 生物」東京書籍 pp. 50-51.
- 13) 本川達雄、谷本英一、ほか16名 (2013) 「文部科学省検定済教科書 生物」新興出版社啓林館 pp. 56
- 14) 庄野邦彦、馬場昭次、ほか12名 (2015) 「文部科学省検定済教科書 生物」実教出版 pp. 32-33.
- 15) 加藤良一、大岩悠子、小川馨慧、高橋大輔、原田隆人、吉田貴行、鈴木隆 (2008) 「タンパク質分解の教材化」山形大学紀要 (教育科学) 14 : 283-293.
- 16) 大鹿聖公、池田秀雄 (1991) 「タンパク質の消化に関する実験」生物教育31 (1) : 66-67.
- 17) 高木幸子、所康子、藤原康晴、山下伸典 (2001) 「生活環境における酵素の働きを考える家庭科教材の開発 —落下式粘度計による食品中のタンパク質分解酵素の活性の測定およびその活性と食生活との関係—」科学教育研究 25 (1) : 35-43.
- 18) 石川統、ほか12名 (2006) 「文部科学省検定済教科書 高等学校生物Ⅱ」東京書籍 pp. 14-15.
- 19) 石川統、ほか12名 (2006) 「文部科学省検定済教科書 高等学校生物Ⅱ」東京書籍 pp. 16-17.
- 20) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 : 248-254.
- 21) 加藤良一、荒川弘子、土井正路、長根智洋、鈴木拓史 (2016) 「購入したタンパク質定量試薬を用いてのトリプシンの酵素反応の教材化」山形大学紀要 (教育科学) 16 : 181-189.

Summary

Ryoichi Kato¹⁾, Takamasa Kimura²⁾, Masamichi Doi³⁾,
Tomohiro Nagane⁴⁾, Takuji Suzuki¹⁾

Teaching materials of enzymatic reaction of pepsin using the protein assay dye reagent purchased

Pepsin reacted by an incubation in 20 mM citric acid Na buffer (pH3.0) containing 80 μ g/ml of pepsin 1:10000 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Catalog No: 161-24482) and 800 μ g/ml of bovine serum albumin at 39 °C for ten minutes. The blue developed by an addition of the protein assay dye reagent of Bio-Rad Laboratories, Inc, into the buffer, it was recognized by the naked eye that the blue became light after the trypsin reaction, and the result was able to show the decomposability of bovine serum albumin with pepsin. The effects of pH on pepsin activity was recognized under the same enzyme reaction. Pepsin reacted by an incubation in 20 mM citric acid Na buffer (pH3.0) containing 120 μ g/ml of pepsin 1:10000 and 1200 μ g/ml of bovine gamma globulin at 39 °C for ten minutes. It was similarly showed that pepsin was able to decompose the bovine gamma globulin using the protein assay dye reagent.

- 1) Food and Nutrition, Faculty of Education, Art and Science, Yamagata University
- 2) Professional School of Education, Graduate School of Teacher Training, Yamagata University
- 3) Yamagata University Junior High School
- 4) Hokkaido University of Education, Kushiro Campus