

マイクロスケール実験を用いた キウイに含まれるタンパク質分解酵素の教材開発

椎 葉 昌 美* 土 師 麻里奈** 久 野 香 月**
水 野 暢 子** 中 川 徹 夫***

The Development of Teaching Materials using Microscale Experiments to Examine Protease Contained in Kiwifruits

SHIIBA Masami* HAZE Marina** HISANO Kaduki**
MIZUNO Nobuko** NAKAGAWA Tetsuo***

Abstract

Various physicochemical properties of enzymes such as structures, reactions, thermodynamics, kinetics, and so forth appear in Japanese high school biology and chemistry textbooks. Glass petri dishes and pudding cups are usually used in traditional high school experiments concerning enzymes. However, the traditional methods need many reagents and extended experiment time. In this paper, alternative microscale methods using 6-well plates are proposed, and the temperature effect and substrate specificity of proteases contained in Kiwifruits, which are mainly composed of actinidin, have been investigated. Both the amount of samples or reagents and the experiment time in our methods are drastically reduced in comparison with those in the traditional approaches. Moreover, our microscale methods enable each student to perform the experiments by him/herself. Therefore, it has been shown that they are very useful as teaching materials for high school biology and chemistry.

キーワード：マイクロスケール実験、タンパク質分解酵素、教材、高校生物、高校化学

Key words: microscale experiment, protease, teaching materials, high school biology,
high school chemistry

*本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科嘱託教学職員

**本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科卒業生

***本学人間科学部環境・バイオサイエンス学科教授

連絡先：中川徹夫 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
nakagawa@mail.kobe-c.ac.jp

1 はじめに

高校生物、高校化学において取り上げられる数々の実験教材の中で、どこの家庭にもある身近な素材や食品を使用して観察できる酵素について着目した。武田は¹⁾、タンパク質の消化実験においてパイナップル、キウイ、ゼラチン、プリンカップまたは、アルミ容器を用いて紹介している。近年の理科離れを防ぐために、実験教材は重要な役割を果たすと考え、タンパク質分解酵素の教材開発に取り組んだ。タンパク質分解酵素の働きを持つ食品として、パイナップル²⁾、パパイヤ²⁾、キウイ²⁾、マンゴー²⁾、メロン²⁾、そしてイチジク³⁾などが知られている。この中から、身近で手に入りやすく、安価で、季節を問わず購入可能であり、芯や種を取らず皮のみ取り除けば使用でき、また、果肉が軟らかく加工しやすいといった長所を持つキウイを選んだ。キウイには、アクチニジンと呼ばれるタンパク質分解酵素が含まれている。1959年にアクチニジンという名前が提唱された⁴⁾のち、1978年にはアミノ酸配列と分子量が明らかにされた⁵⁾、現在もアクチニジンについての研究^{6),7),8)}が報告されている。

人類が将来にわたって持続していけるような開発・発展 (Sustainable Development) の実現をめざして、国際連合は、2005年から2014年までの10年間を「国連持続可能な開発のための教育の10年 (United Nations Decade of Education for Sustainable Development : UNDESD)」と定め各国政府に多様な教育への取り組みを推進するよう働きかけている。研究・教育現場でも環境に配慮することが求められ、グリーンケミストリー^{9),10)}が提唱されている。マイクロスケール実験はグリーンケミストリーの一つであるとされ、①試薬の節減、②実験廃棄物の少量化、③省資源、省エネルギー、④安全性の向上、⑤実験環境の改善のような特徴を持つ¹¹⁾。現行の高校生物や高校化学の授業では、酵素について扱われる。酵素の働きや性質、そして基質特異性を調べる実験が取り上げられる。ここでは、主としてガラスシャーレ¹²⁾やプリンカップ¹³⁾等が用いられている (図1参照)。先行の井口ら¹⁴⁾の研究では、教科書で取り上げられている内容である、パイナップルに含まれる酵素についての実験¹²⁾をより具体的に示した。その方法とは、ゼラチン溶液濃度5%、寒天溶液濃度5%を調製しシャーレに流し固め、パイナップル片を上部にのせ、室温で一晩静置しゼラチンと寒天の変化の違いを比較したものであ

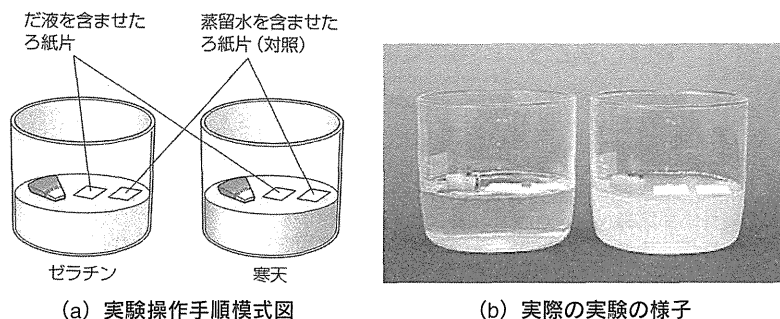


図1 現行の実験方法¹³⁾

た。これを受け本研究では、高校の授業現場でも使用できるようマイクロスケール実験を用いて試薬使用量の削減、実験時間の短縮を試みた。

2 実験

2-1 試薬と器具

蒸留水は、蒸留水製造装置 (ADVATEC, RED240NA) で調製したものを使用した。試薬は、粉末ゼラチン (ゼライス株式会社)、粉末寒天 (岐阜県寒天水産工業組合) を使用した。キウイは市販のグリーンキウイ (Zespri) を使用した。

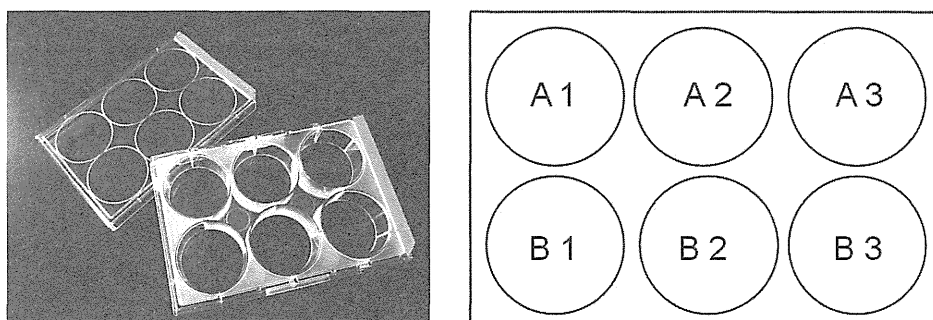
器具は、ホットスターラー (Masuda, SM-2H)、茶漉し、虫ピン (KOKUYO, ヒン-1)、濾紙 (Whatman, 40)、市販のエッグカッター、デジタル温度計 (CUSTOM, CT-220)、冷蔵庫 (HOSHIZAKI, RS-180S-60形)、恒温乾燥器 (SANYO, MOV-112F(U)) を使用した。本研究ではシャーレやプリンカップのかわりに、6穴の細胞培養用プレート (セルプレート, TPP, 92406) を用いた (図2 参照)。これを用いることで、液量 5mL 程度で最大6つの操作を同時に行うことが可能である。

2-2 方法

本研究では、タンパク質分解酵素の共存下におけるゼラチンの固化に対する、酵素の熱処理の影響を調べる実験 (実験 A) と、固化したゼラチンおよび寒天が酵素の基質特異性によりどのような影響が見られるのかを観察する実験 (実験 B) を、マイクロスケール実験の手法により実施した。

予備実験：細胞培養用プレート (セルプレート) を用い、恒温乾燥器の温度を変動させ (20℃ ~ 40℃)、ゼラチン溶液濃度を 5% ~ 20%、寒天溶液濃度を 5% ~ 10% と、変化させ観察したところ温度 30℃、ゼラチン溶液濃度 10%、寒天溶液濃度 5% という、最適条件を得た。以下これを実験条件として用いた。

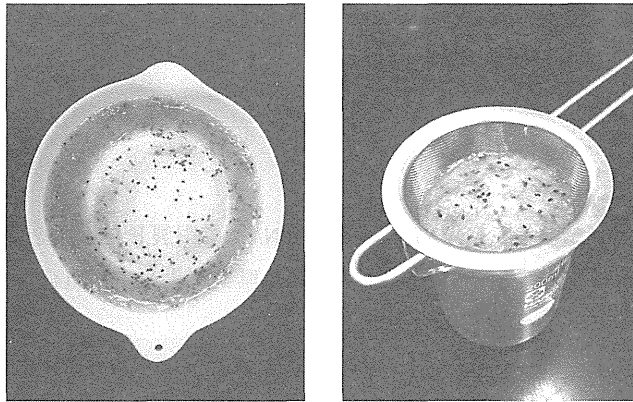
実験 A：キウイ果汁に含まれるタンパク質分解酵素 (アクチニジン) に及ぼす熱処理の影響
・ 酵素の調製



(a) 本研究で使用した細胞培養用プレート (セルプレート)

(b) 各ウェルの名称

図2 セルプレート



(a) すりおろしたキウイ

(b) キウイ果汁を回収

図3 キウイ果汁回収手順

- ①キウイは皮を剥きすりおろした（図3-(a) 参照）。さらに茶漉しを用いて濾した液をキウイ果汁とした（図3-(b) 参照）。キウイ1個から約60mLの果汁の回収が可能であった。
- ②キウイ果汁を2つに分け、その一方を、ホットスターラーを用いて熱処理（98℃，10秒）した。これをキウイ果汁煮沸溶液とした。

・ゼラチン固化実験

- ①粉末ゼラチンを4g秤量し、ホットスターラーを用いて10%ゼラチン溶液を85.0℃になるまで加熱し、さらに30秒間保温し調製した。
- ②セルプレート上のA1, A2, B1, B2に10%ゼラチン溶液を2.5mLずつ加えた。次に、蒸留水（コントロール）をA1, B1に2.5mL、キウイ果汁をA2に2.5mL、キウイ果汁煮沸溶液をB2に2.5mLを加え混和した（図4参照）。
- ③冷蔵庫（4℃）で冷やし、固化の程度を5分毎に30分間観察した。
- ④固化の程度は表面に虫ピンをのせて、その沈み具合により判断した。虫ピンが沈んだ場合にはピンセットで取り出した。

実験B：タンパク質を含むゼラチンおよび、繊維質からなる寒天の機械的強度におよぼす、唾液（アミラーゼ：デンプン分解酵素を含む）、キウイ果汁（アクチニジン：タンパク質分解酵素を含む）の影響

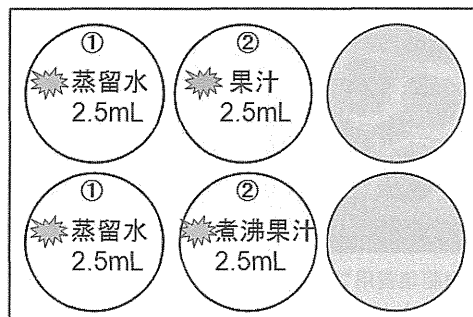


図4 実験Aの操作模式図

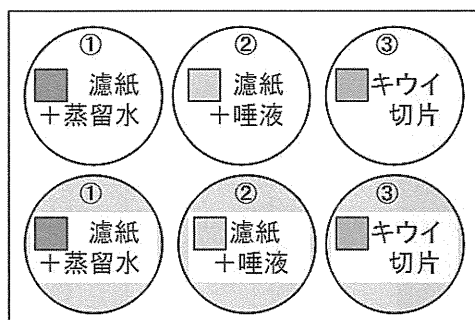


図5 実験Bの操作模式図

・酵素の調製

タンパク質分解酵素（アクチニジン）を含むものとして、市販のキウイを用いた。エッグカッターを使用し厚さを6.5mmに揃え切断した。そして、タンパク質分解酵素の活性が低いとされる果心部^{15),16)}のみにならないように1.5cm四方に切断した。この方法でキウイ1個から28枚の試料が調製できた。また、デンプン分解酵素（アミラーゼ）を含むものとして、濾紙をキウイと同じく1.5cm四方に切断して唾液を含ませた。

・ゼラチン溶解実験

- ①ホットスターラーを用いて10%ゼラチン溶液を40mL調製した。
- ②粉末寒天を2g秤量し、ホットスターラーを用いて5%寒天溶液40mLを95.0℃になるまで加熱し、さらに30秒間保温し調製した。
- ③セルプレートのA1～A3にゼラチン溶液、B1～B3に寒天溶液を入れ、冷却固化させた。
- ④A1, B1に蒸留水を含ませた濾紙、A2, B2に唾液を含ませた濾紙、A3, B3にキウイ切片をのせた（図5参照）。
- ⑤恒温乾燥器（30℃）に入れ、それぞれの変化を5分ごとに30分間観察した。

3 結果および考察

実験A：

固化の程度を虫ピンが沈むか沈まないかで判定した。10分後に虫ピンを置いたときの様子を図6に示した。A2のキウイ果汁入りのみ虫ピンが沈んだ。一方、A1, B1のコントロール、B2のキウイ果汁煮沸溶液を添加したものは虫ピンが沈まなかった。これによりA2は固化しておらず、A1, B1, B2は固化していたことが明らかになった。

表1は冷蔵庫で静置したゼラチンの5分毎の観察結果を表に示したものである。固化せずにピンが沈むものを×、固化しピンが沈まないものを○で表した。冷蔵庫に入れ5分後には、すべてのウェルで固化していなかった。しかし、10分後には違いが明確に観察できた。

キウイ果汁を添加したもの（A2）はゼラチン溶液が固化しなかった。また、キウイ果汁煮沸溶液を添加したもの（B2）は固化した。これは、キウイ果汁を添加したものは、ゼラチンのタンパク質が酵素により分解され固まらなかったことを示している。また、キウイ果汁煮沸

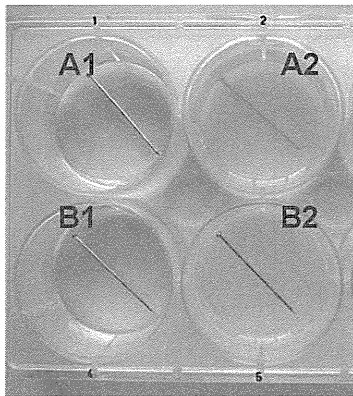


図6 10分後の様子 (上から)

表1 5分ごとの観察結果

	A1 蒸留水 (control)	B1 蒸留水 (control)	A2 キウイ果汁	B2 キウイ果汁 煮沸溶液
5分	×	×	×	×
10分	○	○	×	○
15分	○	○	×	○
20分	○	○	×	○
25分	○	○	×	○
30分	○	○	×	○

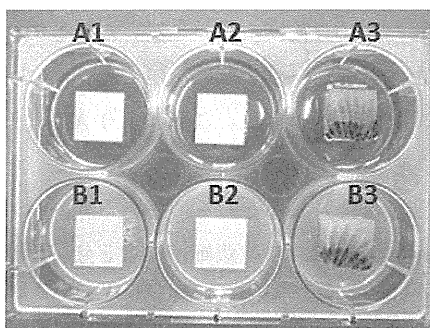
○：固化した，×：固化しなかった

溶液を添加したものは、酵素が失活しておりゼラチンが固化したといえる。この方法より、酵素の働きや性質、さらに酵素の失活についてマイクロスケールで学ぶことが可能であることがわかった。そして、武田¹⁾の実験に比べ、マイクロスケール化によって使用する試薬量を100mLから20mLへ約1/5に減らすことができ、冷蔵庫へ入れることで、最短10分で観察可能であることが示された。

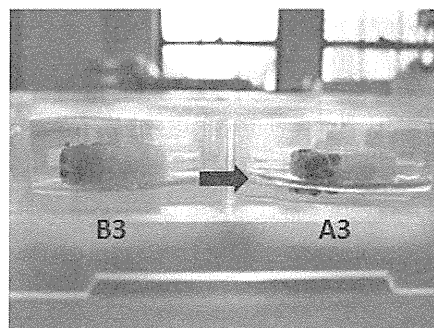
実験B：

図7-(a)は、恒温乾燥器30℃で30分間反応させたときの写真である。ゼラチンにキウイ切片をのせた、A3のみキウイ切片の周りから水分が滲み出ている。他のウェルには特に変化がみられなかった。図7-(b)に示すように、セルプレートを横から見ると、A3のウェルだけキウイ切片が1/3ほど沈んでいるのがよく分かる。

ゼラチンにキウイ切片をのせたもの(A3)のみ時間の経過とともにキウイ切片の周りから溶解が進行した。表2は、恒温乾燥器で静置したゼラチンの5分毎の観察結果を示したものである。0～5の数字で示し値が小さくなるにつれ、溶解が進むことを表している。「5」は変化のない状態。「4」とは、うっすらとキウイの周りに水分が滲み出始めた状態。15分後の「3」は、水分量が増えたがキウイ切片は滑らない状態。20分後の「2」とは、セルプレート



(a) セルプレート上からの様子



(b) セルプレート横からの様子

図7 30分後の様子

A3では、矢印の部分において水分が浮きキウイが1/3沈んでいる様子が分かる。

表2 5分ごとの観察結果

	A1 蒸留水 ゼラチン	A2 唾液 ゼラチン	A3 キウイ ゼラチン	B1 蒸留水 寒天	B2 唾液 寒天	B3 キウイ 寒天
5分	5	5	5	5	5	5
10分	5	5	4	5	5	5
15分	5	5	3	5	5	5
20分	5	5	2	5	5	5
25分	5	5	1	5	5	5
30分	5	5	0	5	5	5

5：変化なし，4：うっすらとキウイの周りに水分が滲み出始める，3：キウイの周りの水分量が増える，2：キウイの周りの水分でキウイ切片が滑り動く，1：キウイが沈み始める，0：キウイが沈み込む

を揺らすと、キウイの周りの水分でキウイ切片が滑り動く状態。30分後の「0」は、約1/3キウイが沈み込んだ状態であった。このことから、20分後には、ゼラチン、寒天、蒸留水、キウイ切片、唾液の働きの違いを明確に観察できたといえる。ゼラチンは唾液に含まれるアミラーゼでは分解されないが、キウイに含まれるタンパク質分解酵素（アクチニジン）によっては分解されるという、酵素の基質特異性について観察することができた。

石川ら¹³⁾の実験に比べ、マイクロスケール化によって試薬量をプリンカップ約150mLから30mLへ約1/5に減らすことができ、観察時間は3時間から20分間へ約1/9短縮し実験できることが明らかになった。

なお、参考資料として本研究の内容を高校理科（生物、化学）の授業で実践する際に用いる実験シートを図8に示す。

マイクロスケール実験シート(酵素の働きと性質・基質特異性)

実施日時： 年 月 日 神戸女学院大学 植原 昌典作成

担当： 植原 昌典

◆酵素の働きと性質について理解する。
キウイに含まれるタンパク質分解酵素に及ぼす熱処理の影響を観察する。

◆酵素の基質特異性について理解する。
タンパク質を含むゼラチン、寒天からなる寒天の凝縮的強度が、唾液、キウイ果汁によってどのような影響を受けるのか、違いを観察する。

1. 準備
実験器具・材料：
①ウェルセルプレート、マイクロピペット、虫ピン、練瓦(Whatman, 40)、ホットスタワー、冷蔵庫、恒温乾燥機

試薬：
キウイ、蒸留水、10%ゼラチン溶液、5%寒天溶液、唾液

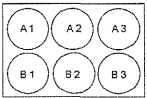


図1 セルプレートウェルの名称

2. 方法

○実験1：
・酵素の調製
キウイは皮を剥きすりおろし、蒸餾水を用いて攪拌。これをキウイ果汁とする。
キウイ果汁を、ホットスタワーを用いて熱処理(90℃, 10秒)したものをキウイ果汁煮沸液とする。

①10%ゼラチン溶液を、ホットスタワーを用いて調整する。
②6ウェルセルプレートに10%ゼラチン溶液をA1, A2, B1, B2, 各wellに2.5mLずつ加える。そしてさらに、コントロールとして蒸留水をA1, B1に2.5mL、サンプルとしてキウイ果汁をA2に2.5mL、キウイ果汁煮沸液をB2に2.5mLを加え混和する。
③冷蔵庫(4℃)で冷やし、10分後に虫ピンを置いたときの様子を観察し記録する。

○実験2：
・酵素の調製
キウイをスライスし1.5cm四方にカットした。また、練瓦(Whatman, 40)をキウイと同じく

1.5cm四方にカットして塩紙を含ませた。これらを、酵素を含むものとして用いる。
①10%ゼラチン溶液をホットスタワーを用いて調整する。
②5%寒天溶液を、ホットスタワーを用いて調整する。
③セルプレート上にゼラチン溶液(A1~A3)、下段に寒天溶液(B1~B3)を流し、冷蔵庫で冷やし固める。
④各ウェルに練瓦+蒸留水(A1, B1)、唾液+唾液(A2, B2)、キウイ切片(A3, B3)、をのせる。
⑤恒温乾燥機に入れ、それぞれの変化の違いを5分毎に30分間観察する。

3. 結果と考察

○結果1
10分後に虫ピンを置いたときの様子を観察し記録する。

	1	2	3
A			X
B			X

○考察1
・ゼラチンの固化するものは何であるのか。
・熱処理の前と後では、何が起きているのか。

○結果2
上段：恒温乾燥機に入れる前の様子を観察し記録する。
下段：20分後の様子を観察し記録する。

	練瓦 + 蒸留水	練瓦 + 唾液	キウイ切片
10%ゼラチン溶液	→	→	→
5%寒天溶液	→	→	→

○考察2
・ゼラチンと寒天の生成は何か。
・唾液に含まれている酵素は何の、また、どのような働きをするか。
・キウイに含まれている酵素は何の、また、どのような働きをするか。

4. 参考文献
・井口 智文他 (2003) 「バイオチップ上に含まれるプロテアーゼを利用した実験教材の開発」, 京都大学教育年報誌 第2期, Vol. 53, pp.15-22.

図8 実験シート (酵素の働きと性質・基質特異性)

4 まとめ

本研究のマイクロスケール実験において、現行の方法と同じ実験結果が得られた。また、従来の方法に比べ試薬類は約 1/5 まで縮小させることができた。試薬を減らすことで生徒一人一つの実験器具と試薬を渡すことが可能である。そして、実験時間においては約 1/9 に短縮でき、授業時間内の観察を可能にした。本マイクロスケール実験は、高校生物や高校化学で扱われる、酵素の働きと性質、基質特異性の実験教材として有効であることが示された。

参考文献

- 1) 武田一美 (1992) 「おもしろい化学の実験」, 東洋館出版社, pp. 29-30.
- 2) 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研究」, 山形大学紀要 (教育科学), 14(3), pp. 111-121.
- 3) 孫成春, 泉本勝利, 宮本拓, 宮瀬こころ, (2003) 「食肉タンパク質におよぼすイチジク果実プロテアーゼの基本的性状」, 岡山大学農学部学術報告, 92, pp. 53-56.
- 4) A. C. Arcus (1959) "Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*," *Biochimica et biophysica acta*, 33(1), pp. 242-244.
- 5) A. Carne and C. H. Moore (1978) "The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*," *The Biochemical journal*, 173, pp. 73-83.
- 6) M. Aminlari, S. S. Shekarforoush, H.R. Gheisari and L. Golestan (2009) "Effect of Actinidin on the Protein Solubility, Water Holding Capacity, Texture, Electrophoretic Pattern of Beef, and on the Quality Attributes of a Sausage Product," *Journal of Food Science*, 74(3), pp. C221-C226.
- 7) 宮崎秀夫 (2010) 「口臭予防舌苔除去食品—プロテアーゼ (キウイフルーツ由来アクチニジン) による除去 (特集口腔と機能性食品)」, *Functional food*, 4(2), pp. 140-144.
- 8) 岡田昌己, 西山一朗 (2010) 「キウイフルーツ果実に含まれるアクチニジンの簡易測定法」, 駒沢女子大学研究紀要, 17, pp. 361-366.
- 9) 荻野和子 (1998) 「スモールスケール化学実験のすすめ」, *化学と教育*, 46(8), pp. 516-517.
- 10) 荻野和子, 竹内茂彌, 柘植秀樹 (2009) 「環境と化学」, 東京化学同人, pp. 1-6.
- 11) 荻野和子 (2008) 「マイクロスケール化学実験は楽しい」, *化学と工業*, 61(4), pp. 448-449.
- 12) 川島誠一郎, 河野重行, 塩川光一郎, 吉田邦久, 大森茂樹, 大橋洋一, 中村厚彦, ほか 1 名 (2004) 「高等学校生物 I」, 数研出版, p. 39.
- 13) 石川純, 伊藤元己, 可知直毅, 新免輝男, 宮下直, 久力誠, 小林秀明, 小林裕光, 小笠原昇一, 木崎原祥文, 倉光浩二, 深川治, ほか 1 名 (2004) 「高等学校生物 II」, 東京書籍, pp. 14-15.
- 14) 井口智文, 松本英子, 角屋堯英 (2003) 「パイナップルに含まれるプロテアーゼを利用した実験教材の開発」, 宇都宮大学教育学部紀要第 2 部, 53, pp. 15-22.
- 15) 橋永文男, 福留哲朗, 伊藤三郎 (1986) 「キウイフルーツ果実の追熟中のプロテアーゼ活性とその分布」, 鹿大農学術報告, (36), pp. 65-69.
- 16) キウイフルーツ研究室 (駒沢女子大学西山一朗管理) : <http://www1.ttv.ne.jp/~kiwi/index.html> (2011年 8 月アクセス)

(原稿受理 2011年 9 月20日)