

酵素の反応速度の測定

理数科2年

岩見 綱助

川崎 友寛

吉田 陽祐

高橋 美帆

1 主題設定の理由

酵素とは、体内でおこる化学反応に必要なエネルギーを軽減させ、反応を促進する触媒である。酵素の触媒作用がある場合の反応速度は、酵素が存在しない場合に比べ、100万倍にもなるといわれている。高校の学習では、酵素についての一般的な働きや特性を学び、それを確認する実験も定性的なものしか行わない。しかし、さまざまな酵素の働きを認識するためには、実際にどれくらいの化学反応が進行しているのかを確かめる必要があると考えた。そこで我々は、デヒドロゲナーゼという酵素の脱水素反応を追跡し、その反応速度を定量的に測定することで、酵素のはたらきについてより深く理解することを試みた。

2 目的

今回の実験は次のことを目的とする。

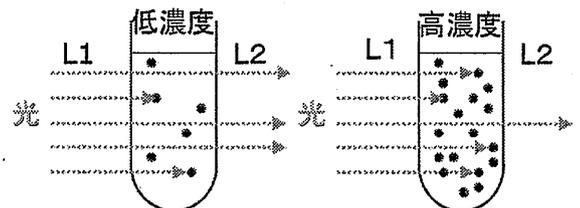
- (1) 反応速度を測定する方法と原理を学ぶ
- (2) 反応速度の測定方法を習得して正確なデータをとれるようにする。
- (3) 酵素反応の特性を反応速度によって確認する。

3 反応速度測定の実験

高校では、デヒドロゲナーゼの働きについて、次のような学習や実験を行う。

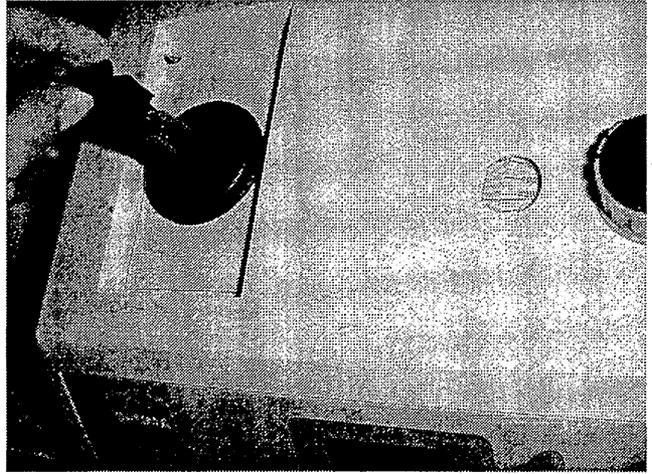
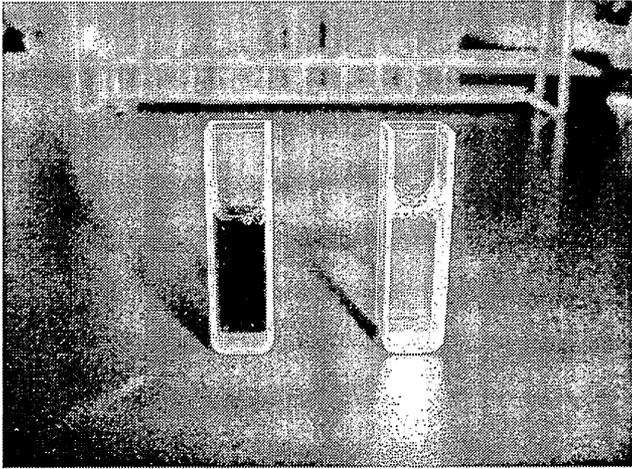
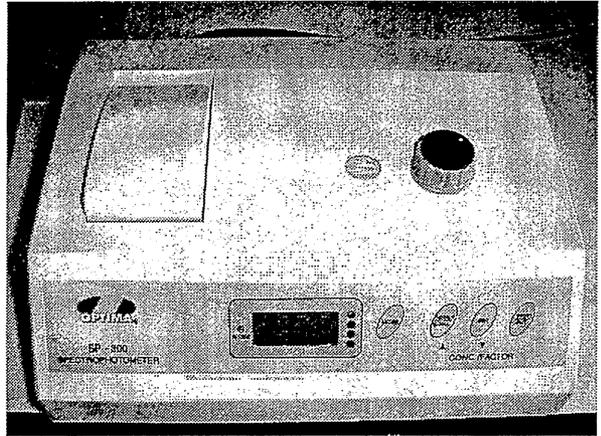
- (1) デヒドロゲナーゼとは、好気呼吸の過程で有機物から水素を奪う酸化反応を進行させる酵素である。
- (2) 細胞質基質やミトコンドリアのマトリクスに存在し、様々な有機物の基質から脱水素反応を起こす。
- (3) アスピレーターで空気を除いたツンベルク管の中で、酵素液(もやしの破碎液)と基質(コハク酸)とメチレンブルー(指示薬)を混ぜ合わせる。
- (4) このツンベルク管を40℃のお湯につけると、青色であったメチレンブルーがコハク酸から脱水素された水素で還元され、無色になる。
- (5) ツンベルク管内に空気を入れると、再びメチレンブルーが酸化され、青色に戻る。

この脱水素反応の反応速度を測定するためには、基質であるコハク酸($C_4H_6O_4$)や生成物であるフマル酸($C_4H_4O_4$)の濃度の変化を、時間を追って確認しなければならない。しかし、これらの物質は無色透明であり、その濃度を測定することは我々には困難である。そこで、指示薬として入れられているメチレンブルーの濃度変化を吸光度の測定によって求めることにした。右の図に、その濃度測定の実験原理を示したが、メチレンブルーの濃度が低い場合は吸光度も小さいが、高い濃度になれば吸光度も大きくなる。



また、吸光度の測定は、右に示した分光光度計で行うが、これは様々な波長の光について、光の吸収の度合い(吸光度)を見るためのものである。

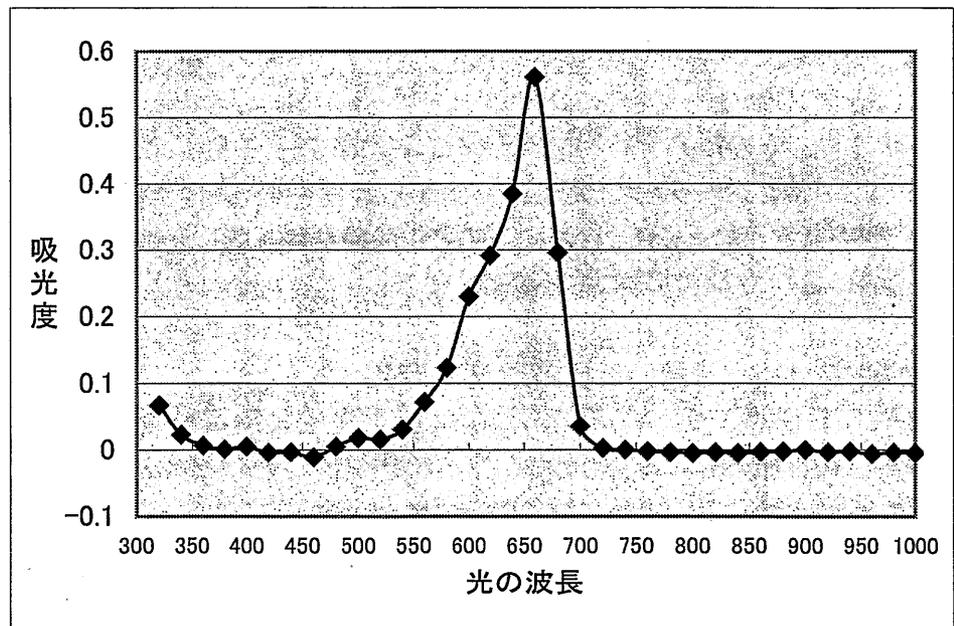
吸光度の測定の要領は、次の通りに行う。まず、吸光度の測定には、セルという透明な容器を用いる。色素を含まない対照区の吸光度を「0」とし、色素を入れた実験区の吸光度を測定する。写真は、実験区のセルと対照区のセル及び、その測定の様子を示している。



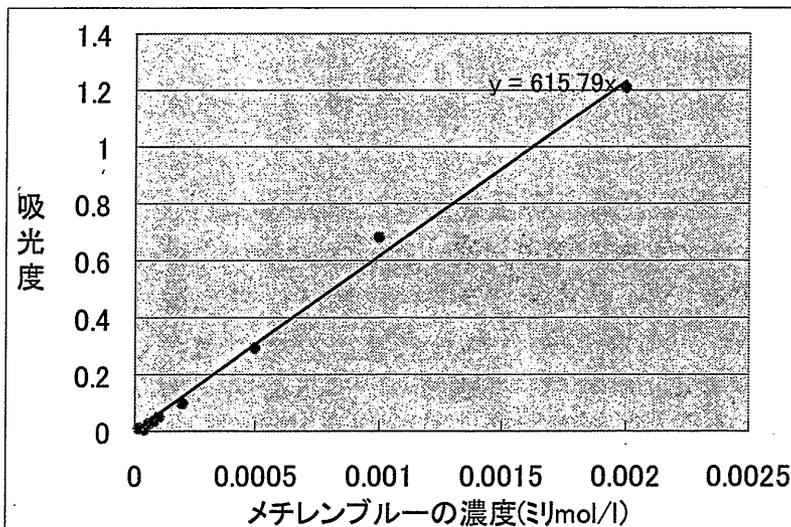
4 実験① Mbをつかった反応速度の測定

(1) 実験

脱水素酵素の反応速度を求めるため、メチレンブルーの吸光度の変化を測定する。そこで、メチレンブルーがどの波長の光を吸収するか調べた。メチレンブルーの吸光度を、20nm ごと分光光度計で測定した結果が右のグラフである。これにより、メチレンブルーは波長が660nmの光をよく吸収することがわかる。



次に様々な濃度のメチレンブルー溶液の吸光度を測定し、その関係を、標準曲線を作ることにした。右のグラフは横軸がメチレンブルーの濃度、縦軸は吸光度を示している。メチレンブルーの濃度がおよそ0.002ミリmol/lまでは、吸光度と比例することが分かった。これをもとに、吸光度の変化から濃度の変化や反応速度を調べることができる。

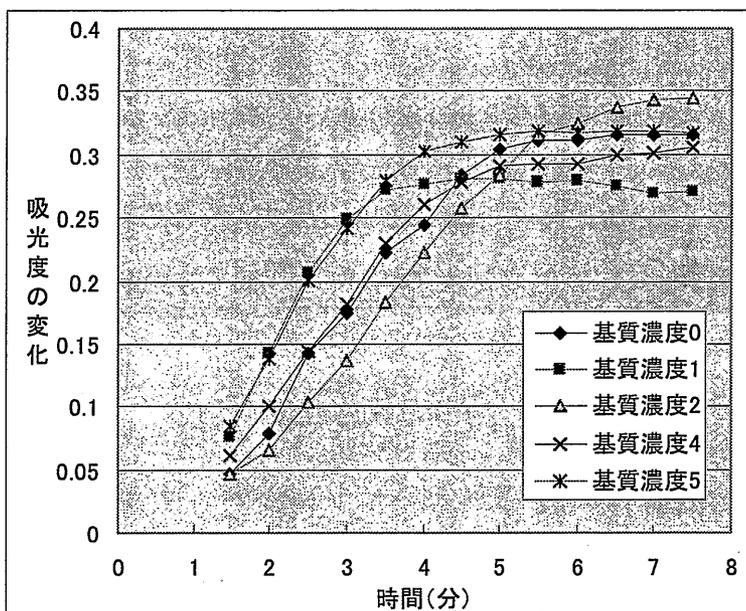


酵素はもやしの破碎液を使用し、基質とメチレンブルーの混合溶液に

酵素を含むもやしの破碎液を加え、酵素を加えた時刻から、30秒ごとに分光光度計で660nmの吸光度を測定した。また、この反応が酵素によるものであることを確認するため、いろいろな基質濃度で、同じ実験を繰り返し行った。

(2)結果

時間の経過に伴って吸光度が変化し、メチレンブルーが還元されていることがわかった。しかし、実験後半、吸光度の変化にブレが見られ、基質濃度と反応速度の関係も理論値とは違っていった。



(3)考察

この結果について我々は、実験中に酸素が混入し、メチレンブルーが酸化され、結果に影響しているのではないかと考えた。そのため、できるだけ空気中の酸素を遮断して実験を行うように工夫してみた。その方法は、アスピレーターで減圧し溶液から酸素を取り除くことや、吸光度測定用のセルをパラフィルムで封印するなどした。しかし、何度も実験を繰り返したが、思うような結果は出なかった。残念であるが、この方法では酸素を遮断することができなかつたと考えられる。

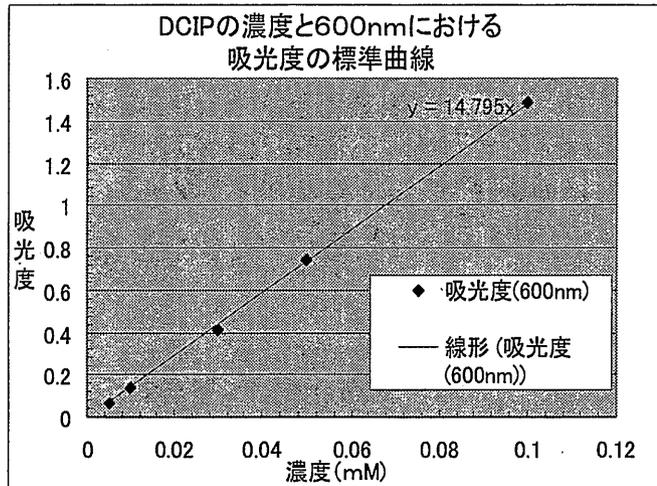
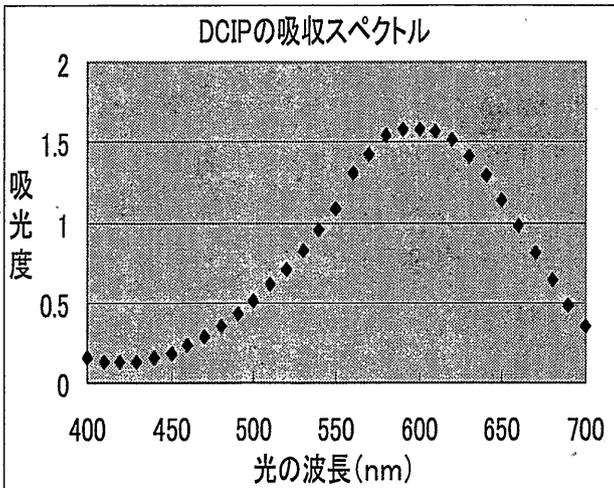
その方法は、アスピレーターで減圧し溶液から酸素を取り除くことや、吸光度測定用のセルをパラフィルムで封印するなどした。しかし、何度も実験を繰り返したが、思うような結果は出なかった。残念であるが、この方法では酸素を遮断することができなかつたと考えられる。

5 実験② DCIP を用いた反応速度の測定

実験に行き詰まったところで、私達は板東先生の助言を頂き、メチレンブルーに代わり DCIP という指示薬を使用してみることにした。DCIP とは、メチレンブルーと同じように酵素反応によって発生した水素と反応し、無色になる性質をもった青色の色素である。そこで、DCIP は空気中の酸素と反応しないため、理論値に近い結果を得ることができると考え、再度実験を行った。

(1) 実験

そこで、DCIP の吸収スペクトルから測定し直し、標準曲線を作成し、再度、反応速度の計測実験を行った。次に示したグラフは、DCIP の吸収スペクトルと DCIP の濃度と吸光度の標準曲線である。



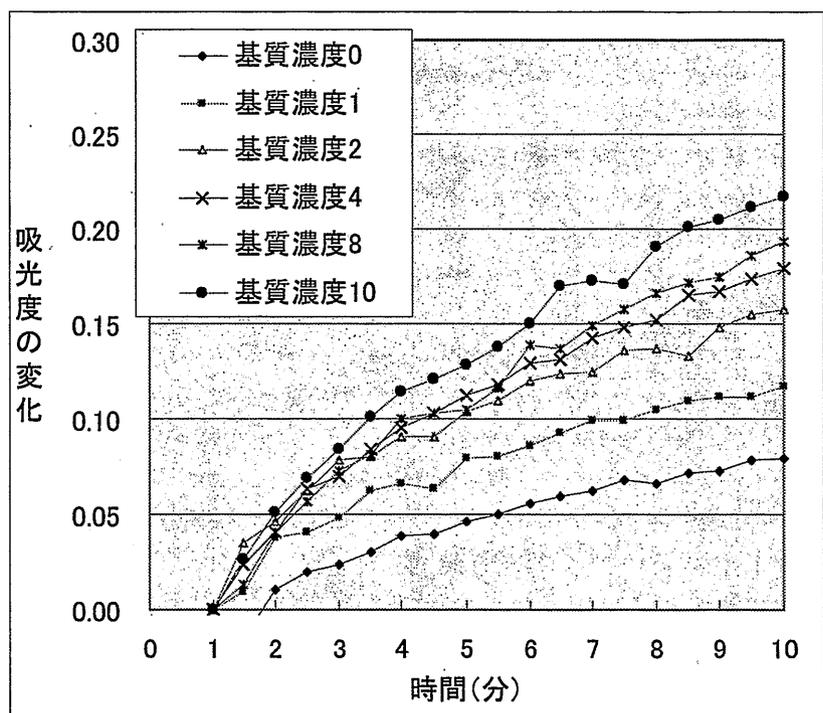
右に、この実験で用いた各溶液の調整した量を示している。酵素の量は一定とし、コハク酸や水の量を調節し基質濃度を変えて、全量が4mlとなるようにした。このような試料を準備し、30秒ごとに600nmの吸光度の変化を確認した。また、1つの試料の実験は30秒ごとに20回計測するため、計測だけで10分かかる。溶液を準備し、6つの試料について調べるには2時間を費やし、土曜セミナーの時間だけでは足りなかった。そこで、15秒ずらして2つの試料を同時に計測するなど工夫したが、大変あわただしい操作と正確さを求められる実験のため、緊張した日々が続いた。

fraction mixture		単位はml			
fraction	0.01M コハク酸Na	酵素 原液	1mM DCIP	H ₂ O	total vol.
基質濃度0	0.0	0.4	0.2	3.4	4.0
基質濃度1	0.1	0.4	0.2	3.3	4.0
基質濃度2	0.2	0.4	0.2	3.2	4.0
基質濃度4	0.4	0.4	0.2	3.0	4.0
基質濃度8	0.8	0.4	0.2	2.6	4.0
基質濃度10	1.0	0.4	0.2	2.4	4.0

(2) 結果

実験を繰り返す中で実験の手際も良くなり、測定時間のずれや溶液の配合の仕方など間違えることもなくなった。その結果として、次のような実験結果を出せるようになった。

右のグラフは、時間の経過に伴



って、非常に安定して吸光度が変化している。また、基質濃度に応じて反応速度も変わっている様子も確認できた。

(3) 考察

以上の測定より、今回使用したもやしの脱水素酵素の反応速度を求める。基質濃度10の場合、実験に用いられた溶液の中には $2.5 \times 10^{-3} \text{mol/l}$ の基質が含まれていた。9分間で吸光度が0.217減少したことより、標準曲線から DCIP が $1.47 \times 10^{-5} \text{mol/l}$ 減少したことがわかる。これより、1分あたり濃度が $1.03 \times 10^{-6} \text{mol/l}$ 減少したことになる。実験の total volume が4mlであることから、この容器の中で1分当たり還元された DCIP は $6.52 \times 10^{-9} \text{mol}$ となり、その分子の数は 3.92×10^{15} 個、およそ392兆個の分子が脱水素されていることがわかる。

7 感想

最初のころは手際が悪く、なかなか実験がうまくいかなかった。

しかし、実験を繰り返していくうちに、てきぱきと実験ができるようになり、正確なデータが取れるようにもなった。

また、実際に酵素の反応速度などを具体的な数値にしてみることで、我々の目に見えない世界で働いている酵素のすごさを実感するとともに、私たちの体の中でもこのような酵素がはたらいてくれることで、生きることができるということを痛感した。

8 個人の感想

岩見: 酵素という目に見えないものを実験の題材とすることにより、さまざまな困難が生じたが、先生方の助力や班員の協力により課題研究を成功させることができたととてもよかった。また、日ごろ私たちの知らない世界で働いている酵素について触れる事により生命の神秘を肌で感じる事ができた。

川崎: 最初は実験がうまくいかず苦労したが、最後にうまくいき、何とか発表できてよかった。

吉田: 最初に実験の説明を受けたときは、こんな難しい実験ができるだろうかと心配だったが、実験をしているうちに内容もわかってきたので楽しかった。

高橋: 先生の提案で難しい実験をするようになって、なかなか成功しなくてどうなるかとおもったが、半年間続けてきて、成功できてよかった。