

生物化学実験のスモールスケール化Ⅱ —コハク酸脱水素酵素による メチレンブルーの酸化反応—

巻本 彰一・長谷川 晋也*

A Scaled-Down Biological Chemistry Experiment II :
Oxidative Reaction of Methylene blue by Succinate Dehydrogenase

Shoichi MAKIMOTO and Shin-ya HASEGAWA *

Accepted June 16, 2020

抄録：コハク酸脱水素酵素はコハク酸を酸化してフマル酸にする酵素であり、この酵素はクエン酸回路を持つ全ての生物の代謝に関係している。それゆえ、この酵素に関する実験は、多くの高等学校生物の教科書に記載されている。しかし、この反応は酸化還元反応のため、空気中や溶液中の酸素を実験前に脱気する必要があり、また通常スケールで行われるので、多くの試料を消費する欠点があった。今回はコハク酸脱水素酵素の酸化還元反応を、酵母由来ではなく、身近なもやしを酵素源として使用し、かつスモールスケール化することで試料の消費量を減少するとともに、脱気方法の改良を行い酵素の働きを理解する教材を作成したので、高等学校および大学での授業の実施例を紹介する。

索引語：コハク酸脱水素酵素、スモールスケール、もやし、酵母、酵素反応

Abstract: Succinate dehydrogenase is the enzyme that oxidizes succinic acid and produces fumaric acid, and this enzyme is related to the metabolism of all creatures having a citric acid cycle. Therefore, the experiments related to this enzyme appear in the biology textbooks of many high schools. However, there was a problem with using many samples, as this reaction has to deaerate the oxygen of the air and solution ahead of any experiment for an oxidation-reduction reaction, which was usually performed on a large scale. To conduct the oxidation-reduction reaction, we used succinate dehydrogenase by using bean sprouts available nearby as an enzyme source, not succinate dehydrogenase derived from yeast. In addition, we decreased the consumption of the sample by performing the work on a small scale, and improving the deaeration method. This led to the creation of teaching materials that can explain the work of the enzyme, which can be used to introduce examples in high school and undergraduate classes.

Key Words: succinate dehydrogenase, small scale, mung bean sprouts, yeast, enzyme reaction

* 京都府立嵯峨野高等学校

1. はじめに

化学分野のみならず生物分野においても酸化還元反応は重要な反応であり，呼吸やアルコールの解毒，ATP 合成などの代謝反応等のエネルギー獲得等を担っている。その反応は，生体内では酸化還元酵素が触媒としているが，高等学校学習指導要領解説理科編¹⁾によると，酸化還元酵素のはたらきは「生物基礎」及び「生物」の中の各関連単元で扱われていて，「生物」の中の「(1) 生命現象と物質」の単元で詳しく取り上げられている。この単元の目標は，「生命現象を支える物質の働きについて観察，実験などを通して探究し，タンパク質や核酸などの物質の働きを理解させ，生命現象を分子レベルでとらえさせる。」と記載されている。

上記の学習指導要領¹⁾での流れは，「生物基礎」，「(1) 生物と遺伝子」の単元の中の「ア 生物の特徴 (イ) 細胞とエネルギー」の小単元で呼吸と光合成の反応が酵素の触媒作用によって進むことを学習した後，「生物」，「(1) 生命現象と物質」の単元において，「イ 代謝 (ア) 呼吸」の小単元で解糖系，クエン酸回路及び電子伝達系の各反応に関わる酵素のはたらきをより詳細に学習する。また，酵素の触媒作用については，「化学」の中の「(5) 高分子化合物の性質と利用」でも扱われている。ここでは，天然高分子の例として，穏和な条件下において生体内の化学反応を推進する生体触媒として酵素のはたらきを学習する。この範囲では，酵素タンパク質の特徴として基質特異性や最適温度，最適 pH など，酵素の構造やその活性条件について学習する。

酸化還元酵素が触媒としている反応についての実験例を高等学校生物の教科書 4 冊（第一学習社，東京書籍，啓林館，数研出版）で調べると，「細胞と分子」の単元ではカタラーゼの働きの実験例が 4 社とも取り扱われている。また，「代謝」の単元ではコハク酸脱水素酵素（SDH）の実験例が 3 社，グルタミン合成酵素の阻害実験が 1 社に実験例が掲載されている。しかし，実験の重要性からいえば，エネルギー獲得や生体機能維持のための重要な中間体を生成しているクエン酸回路の酵素であるコハク酸脱水素酵素の実験であろう。

図 1²⁾にクエン酸回路を示す。クエン酸回路は 8 種類の反応がサイクル状に進行する代謝経路であり，それぞれの反応には各反応に対応する酵素が関与している。SDH は，クエン酸回路でコハク酸をフ

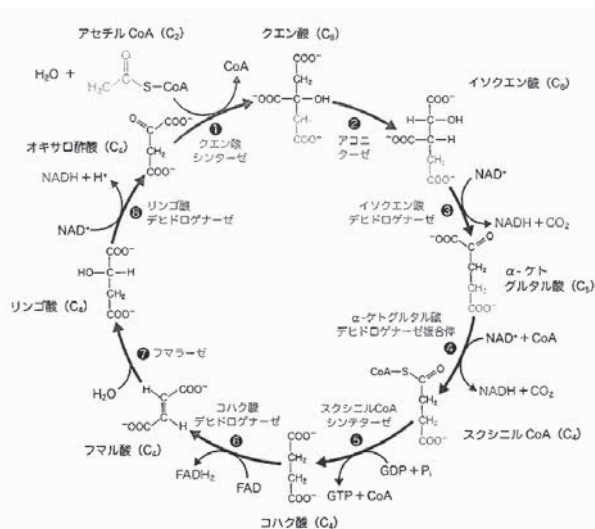


図 1 クエン酸回路²⁾

マル酸に酸化する反応を触媒するはたらきを担っていて、SDHはコハク酸から水素を抜き取ることによってフマル酸に酸化する反応を触媒する。抜き取られた水素原子は補酵素であるFADに移動して、FADH₂を生成する。クエン酸回路ではたらくイソクエン酸脱水素酵素やリンゴ酸脱水素酵素は同じ脱水素を行う酸化還元酵素であるが、補酵素としてNAD⁺を用いており、FADを用いているのはSDHだけである。従って、NADHは酸化還元反応の呈色色素であるメチレンブルーと反応しないので、生成したFADH₂をメチレンブルーの色の消失からSDHの反応を追うことができる。一方、脱気操作のために専用の器具であるツンベルク管や吸引するためのアスピレーターが実験室に必要となるなど問題点もある。

学習者に学習内容を理解させるためには積極的に観察、実験を取り入れていくことが重要であり、高等学校学習指導要領解説理科編¹⁾にも、各単元で代表的な実験例が紹介されているが、学校現場では十分に実験が行われているとは言い難い。科目・単元に関わらず、実験を敬遠する大きな要因として授業時間の不足がある³⁾。限られた時間の中で授業に実験を取り入れるためには、従来の実験方法と同等の教育的効果をもち、短時間で行える方法を開発することが必要であると考えられる。そこで本報告では、実験のスモールスケール化に着目した。実験のスケールダウンは化学分野だけでなく生物分野でも研究が進められていて、宮田ら⁴⁾は12ウェルプレートを用いてアミラーゼ活性と温度およびpHの関係を調べる実験教材を開発した。宮田らはニンジンから抽出したアミラーゼを用いて2人1組で8つの条件でアミラーゼの活性を調べさせた。授業実践の結果、少量の試薬量で試験管を用いた従来の実験方法と同等の結果を観察することができ、実験に対する生徒の積極的な姿勢について実践後のアンケートから分析している。現行の教科書⁵⁾でもウェルプレート(6穴細胞培養プレート)を用いた酵素反応速度と温度の関係を調べる探究活動の実験方法が記載されている。また、サンプル管ピンを用いた、ゴボウ由来のポリフェノールオキシダーゼによる緑茶の酸化反応から、酵素の働きを理解する教材も報告⁶⁾されている。ここで述べた先行研究以外にも多くの実験教材が開発されており、それらの教育的効果についても報告がなされている。

生徒に学習内容を理解させる授業展開として、実験を取り入れることが重要であり、さらに実験に用いる素材に身近な物質を用いることは意義がある。学習指導要領に記載されている理科の目標の中には、「自然の事物・現象に対する関心や探究心を高め」とある。そのために学習指導要領解説には、「改善の要点の一つである探究的な学習の充実へとつなげていくためにも、知的好奇心や探究心を喚起し、科学を学ぶ意義や楽しさを実感させながら、自然の事物・現象を主体的に学ぼうとする態度を育てることが大切である。」と記載され、そのための手段として、観察、実験を行う際には、生徒にとって身近な素材を用いることが有効であると同学習指導要領解説にも記載されている。

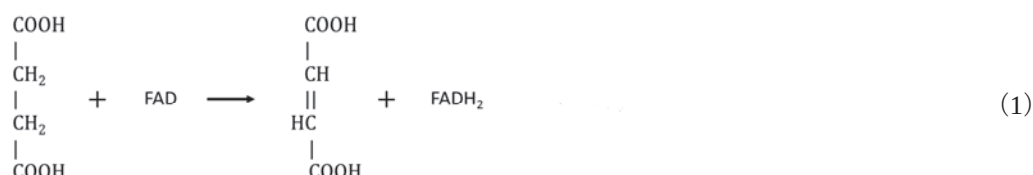
学校現場においてもこれまでに身近な素材を用いた実験が多く報告されている^{7~10)}。化学分野では、東海林ら⁹⁾が高校生を対象に身近な物質(カツオ削り節、緑茶など)を用いてニンヒドリン反応の検出実験を行った。その結果、さまざまな物質中のアミノ酸の存在やその濃度の違いを呈色反応から実感できたことで、日常生活の中の化学に興味をもたせるのに役立つと報告している。

生物分野では、加藤ら¹⁰⁾がパイナップルやメロンを用いたタンパク質の分解実験を報告している。加藤らは先行研究のなかで、身近な物質を実験材料として用いることの利点として、生徒にとってわかりやすい(実感しやすい)ことだけでなく、安価で簡便に準備できることも挙げている。すべての実験にあてはまることではないが、身近な物質を実験材料として用いることで、生徒の興味・関心の喚起をはじめとした学習効果の向上や実験準備やコスト面での利点があると考えられる。

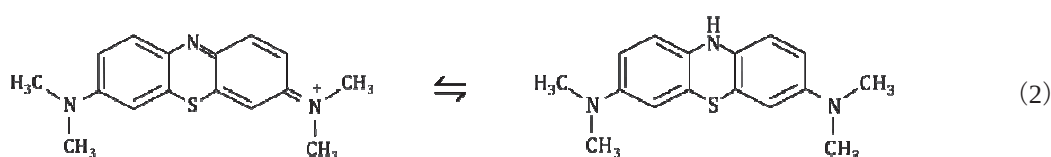
本報告は、学習者に学習内容への興味・関心を喚起させられる酸化還元酵素反応の実験教材の開発を、できるだけ身近な素材を使い、かつスモールスケール化することである。また脱気操作のための専用の器具をスモールスケールで開発することである。その結果、当初の目的を達したと考えられる実験方法および器具が開発できたので紹介する。

2. コハク酸脱水素酵素

SDH [EC 1.3.5.1] は、真核生物ではミトコンドリア内膜に、原核生物では細胞膜に固定されている酵素複合体であり¹¹⁾、反応式 1 に示すようにコハク酸をフマル酸に酸化する反応を触媒している。

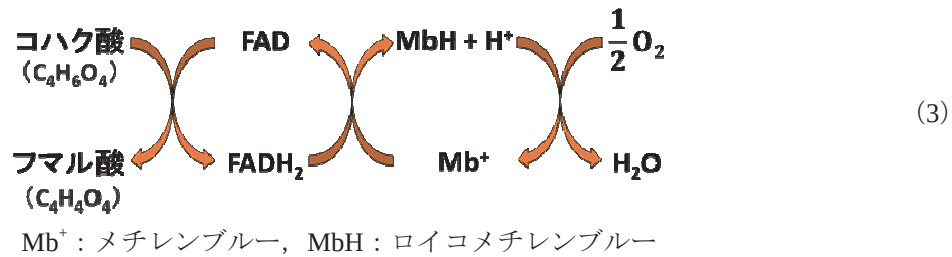


コハク酸から抜き取られた水素は補酵素の FAD に移った後、生体内では電子伝達によって最終的には酸素と結合し水を生成する。このとき生成される FADH₂ は紫外部に吸収を持つために視覚的な変化はない。しかし、反応溶液に青色色素のメチレンブルーが存在すると、FADH₂ からメチレンブルーに水素が移動し、還元型のロイコメチレンブルーが生成する。ロイコメチレンブルーは無色であるため、溶液の色が青色から無色に変化し、この溶液の色の変化から SDH のはたらきを観察することができる。反応式 2 はメチレンブルー (Mb⁺, 左辺) とロイコメチレンブルー (MbH, 右辺) の構造の変化を示している。



しかし、反応系に酸素が存在していると、ロイコメチレンブルーから酸素に水素が移動し、反応液が再び青色に着色する。このような酸素の影響を軽減するために、教科書の実験ではアスピレーターを用いて反応系に存在している空気（酸素）を除去している。酸素がメチレンブルーの再酸化に関与していることは脱色後、反応系を開放して空気中の酸素を取り入れて攪拌することで再び青色の着色が見られることから確認できる。以上の反応の流れを反応式 3 に示す。

反応式 3 で示されるような、生体内で行われている酸化還元酵素反応を理解する実験教材の開発を目指して、教科書に記載されている SDH によるメチレンブルーの脱色実験の実験方法を参考にスモールスケール化の検討を行った。



(1) 酵母を酵素源とした酸化還元反応の実験

実験のモジュール化を行う前に、教科書に記載されている通常スケールでの乾燥酵母を酵素源とした方法で実験を行った。実験手順は次の通りであるが、ここでのグルコース水溶液は、乾燥酵母が生物として通常の代謝を行えるようにするための栄養源である。

<実験手順 1¹²⁾>

- ① 乾燥酵母 10g を 10%グルコース水溶液 100mL に溶かし、30 分程度放置した溶液をツンベルク管の主室に 2/3 量 (約 20mL) 入れた。
- ② ツンベルク管の副室に 3%コハク酸二ナトリウム水溶液 1mL とメチレンブルー 5 滴を入れた。
- ③ 主室と副室を結合し、アスピレーターの吸気ゴムホースを管のノズルに結合し脱気した。
- ④ 十分に脱気した後、副室を主室に対して回転させた。
- ⑤ その後、ツンベルク管を傾けて副室内の液を主室に流し込み、よく攪拌した。
- ⑥ 攪拌後、ツンベルク管を 40℃の湯に漬けて保温した。反応が進むにつれて、主室の青色が退色していく様子を観察した。
- ⑦ 退色後、副室を主室より外し、外気を主室に入れ溶液がこぼれないように指で押さえた状態でよく攪拌して、このときの溶液の変色を観察した。

1) 結果および考察

この実験では、コハク酸二ナトリウム 1.9×10^{-4} mol を用い、メチレンブルー溶液は 0.03% (8.0×10^{-4} mol/L) で調製し使用している。この実験方法では約 30 秒程度でメチレンブルーの退色が確認できた。実験上の注意点としては、操作③では、アスピレーターでの脱気によりツンベルク管内の気圧が低下することで酵母液の突沸が生じるため、これが収まるまで 3～5 分間程度脱気操作を行った点である。

教科書の実験条件では乾燥酵母をグルコース溶液 50mL あたり 5.0g と多量に使用している。そこで、他の実験条件は変えずに、乾燥酵母の使用量を変えてメチレンブルーの脱色に要する時間を測定した。図 2、図 3 は使用した乾燥酵母量とそのときの脱色時間、および反応系開放後のメチレンブルーの着色に要する時間をそれぞれまとめたものである。ただし、乾燥酵母量は 10%グルコース溶液 50mL あたりに溶かした量に換算して図に示している。

図 2 から、酵母使用量の増加に伴い脱色時間が減少しているが、通常、酵素反応は酵素濃度の増加に伴い反応速度も増加するため、この結果は酵素濃度増加によるものと考えられる。

図 3 では、酵母使用量の増加に伴い着色時間が増加していることがわかる。この原因については、反応系を大気開放すると酸素によりロイコメチレンブルーはメチレンブルーに酸化されるが、その反応の間にも酵素は FADH₂ を連続して生成し続けるので、酵母の使用量が多いと、酸素による再酸化をより妨げるからである。

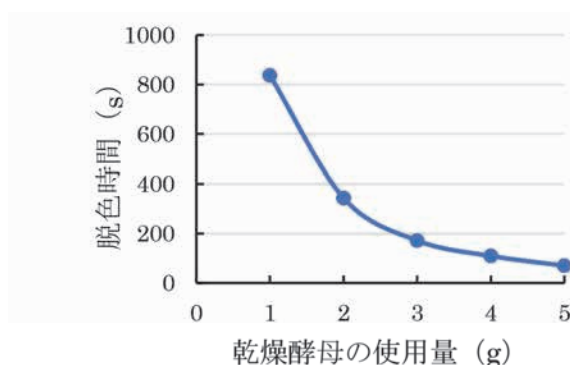


図2 各使用量での平均脱色時間

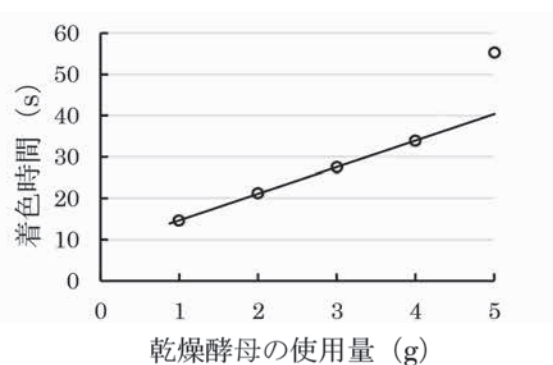


図3 各使用量での着色平均時間

教科書に記載されているツンベルク管を反応容器とした実験は操作の簡便性や結果の明瞭性に問題はないことがわかった。しかし、この酵母を使用した実験の問題点は、そもそも酵母液の白濁度合いである。図4に示すように、酵母液はグルコース溶液中では分散しており、白濁した状態になっている。使用する乾燥酵母量が増えると溶液の白濁も濃くなり、メチレンブルーの着色が確認しづらいのではないかと考えられる。また、使用する酵母量が1回あたり20mL必要であることやアスピレーターやツンベルク管といった特殊な器具を用いることなど、個別実験での実施は難しいのではないかと考えられる。それは、ツンベルク管については、1クラス10班とすると最低10個が必要になり、いくつかの条件下で実験を計画するとさらに多くの数が必要になる。ツンベルク管は1つあたり3000円程度であり、必要数準備するためにはかなりの費用がかかる。アスピレーターによる脱気操作は水流の勢いを利用して脱気を行うため水道に移動して操作することになる。また、一度に複数が脱気操作を行うと水流の勢いが弱くなり、十分に脱気操作が行えない可能性がある。

(2) 簡易脱気装置の作成

酸化還元反応を開放系で行うと、空気中や溶液に含まれる酸素が酸化剤として作用するために、



図4 懸濁状態の酵母溶液

酵素反応の生成物として還元型ができていてもそれを酸素が酸化してしまい、反応の観察がうまくいかない場合がある。試験管でも 10mL 以上ならうまく観察できるが、1 ～ 2mL で実験を行うと観察できないことがあり、試薬量が少なくと内容量に対して空気がふれる表面積が大きくなるからである。サンプル管ビン（スクリュー管ビン）を反応容器として用いたモジュール化は簡便^{6,13～15)}であるが、酸化還元反応を行うためには脱気操作が行えるように改良が必要である。

教科書ではコハク酸脱水素酵素によるメチレンブルーの脱色実験をツンベルク管（図 5）とアスピレーターを用いて行っている。小さな蛍光用小型ツンベルク管付きセル（図 6）も市販されているが、いずれも 2 種類の反応溶液を保持する部分とアスピレーターに接続し溶液を脱気する部分とに分かれている。その構造を踏襲した、スクリュー管ビン（1 個）、ルアーストップコック三方タイプ（2 個）、2mL テルモシリッジ（1 本）、10mL テルモシリッジ（1 本）を使用している。



図 5 ツンベルク管



図 6 蛍光用小型セル

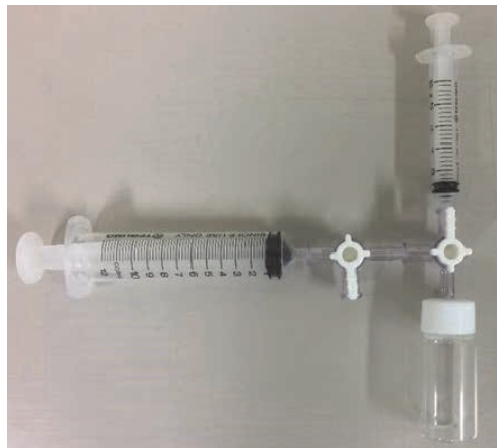


図 7 スクリュー管ビンの簡易脱気装置

サンプル管ビンでふたにゴム栓を用いると密閉には簡便だったが、最後に減圧状態でふたを開けて空気を入れるのが難しかった。そこで、スクリュー管ビンを用い、ふたの中央部に穴を開け、三方コックを直接ふたに接続した。三方コックの接続部のうち最も細くなっている部分の外径 4.0mm に対して 6.0mm の穴をふた中央部に開けている。また、スクリュー管ビンのふたには内蓋がついている。容器の密閉性を保つために内蓋は必要な部品である。そのため、パンチで内蓋中央部に穴を開けて、

スクリー管ビン（スクリーン管ビン）のふたに再び内蓋を装着させた。図 8、図 9 のようにスクリー管ビン（スクリーン管ビン）のふたを加工したものに三方コックを接続し、各シリンジ等の器具を図 7 のように組み立てた。



図 8 スクリー管ビンの蓋（左）と内蓋（右）



図 9 蓋の裏側

装置の特徴として、スクリー管ビンを用いた装置はふたの加工に手間がかかるが、ねじ切り式のふたであるため減圧状態でも取り外しが容易であり、装置内に残った基質溶液が反応液に入り込むことなく観察を行うことができる。

(3) 簡易型脱気装置の検証

前節での簡易脱気装置を用いて、酵母を酵素源とした SDH によるメチレンブルーの脱色実験を行った。簡易脱気装置が機能しているか確認するために次の手順で実験を行った。

<実験手順 2>

- ① 乾燥酵母 5.0g を 10% グルコース水溶液 50mL に溶かし 30 分放置して酵素液を得た。
- ② 10mL サンプル管ビンに酵母液 5.0mL を加え、ふたが付いた三方コックを取り付けた。
- ③ 1mL シリンジで基質溶液（3% コハク酸二ナトリウム水溶液 2.0mL に 0.03% メチレンブルー水溶液 5 滴混合）を 0.4mL 吸引し、その 1mL シリンジを三方コック上に取り付けた。
- ④ 三方コックの横に 10mL シリンジの簡易脱気装置を取り付けた。
- ⑤ 脱気用シリンジを引いて脱気を行った。
- ⑥ サンプル管ビンに基質溶液を注入した。
- ⑦ 40℃で湯浴し、脱色時間を測定した。
- ⑧ 脱色確認後、サンプル管ビンのふたを外し空気中の酸素を取り入れて攪拌した。このときの色の変化を観察した。

この実験条件では、約 3 分で脱色が確認できたので、今回作製した簡易脱気装置は正常に機能していると考えられる。また、酵母を酵素源とした SDH によるメチレンブルーの脱色実験をスケールアップすることができたと考えられる。

(4) 反応温度の影響

湯浴温度とメチレンブルーの脱色時間の関係を調べるために湯浴温度を 17, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80℃に設定して、それぞれの脱色時間を測定した。具体的な実験操作は、前述の実験手順 2 の⑦の操作のみ各温度に変更して行った。その結果は、50℃が最も短時間で脱色時間となり、それより温度の低下とともに脱色時間は増加する傾向があった。また 60℃以上の加温では、一気に 50℃の脱色時間の 10 倍以上の脱色時間になった。

一般的に酵素反応の多くは反応温度の上昇に伴って反応速度は大きくなる（脱色時間は減少する）

が、45～60℃を超えると急激に反応速度が低下する。これは高温条件下では、酵素タンパク質のコンフォメーション変化により酵素活性が大きく低下するためである。酵母 SDH は 50℃までは温度上昇に伴って速く脱色ができることがわかる。それ以上に湯浴温度を高くすると、逆に脱色するために長く時間がかかってしまう。一般に、酵母菌が最も活発にはたらく温度域は 25～30℃であり、40℃以上では生育ができない。今回の結果から、酵母の生物としての活性ではなく、酵母がもつ生体触媒物質としての SDH の最適温度は 50℃付近にあると考えられる。

本実験は、SDH によるメチレンブルーの脱色実験を通して、生物が生体内で行っている酸化還元酵素反応を理解させることを目的の 1 つとしている。この目的を達成するためには、実験の温度条件として生物体が活発に活動できるものが適切であると考えられる。よって、酵母 SDH の最適温度ではないが、一般に生物が生育できる温度域内である 40℃での湯浴を、酵母を酵素源とした実験の温度条件とするのがよいと思われる。また、25℃、40℃、60℃の 3 つの温度で実験を行うことにより、最適温度の存在や、高温での酵素活性の失活現象を理解させることができる。

3. もやしを酵素源とした酸化還元反応の実験

教科書での実験例は、酵母の SDH のはたらきをメチレンブルーの変色から確認する実験が記載されている。この実験は SDH を含む酵素液として乾燥酵母をグルコース溶液に分散させたものを用いている。乾燥酵母はドライイーストとして広く知られており、その名称を聞いたことがある生徒も多いが、すべての生徒が乾燥酵母の実物を目にしたことがあるとは考えにくく、多くは名称やそのはたらきの知識のみを有していると考えられる。

乾燥酵母は小さな粒状の形状をしているので、アルコール発酵などの実験を行えば、気泡の発生や生成したエタノールのおいなどから酵母がはたらいていることが確認できるが、粒状の乾燥酵母をみてもそれが生物であるという実感は得にくいのではないかと考えられる。そこで、より身近で、生物であることを実感できる酵素源としてもやしを用いることとした。もやしは食材として広く知られており、安価で、実際に食べたことがある生徒がほとんどであると考えられる。教科書では、生物の酸素消費と呼吸商の実験でもやしを用いられるなど、実験材料としてもやしは広く用いられている。先行研究では SDH によるメチレンブルーの脱色実験で、もよしの絞り汁を用いた実験例¹⁶⁾がある。この実験は試験管を反応容器としており、教科書のように脱気操作は行っていないので、反応液の上層は空気中の酸素の影響で青いままであり、液高を確保するために多量の酵素液を用いないと脱色を確認できない。学校現場での実験を考えると、必要量の絞り汁を得るためにはかなりのもやしを用意する必要があるし、脱色を確認できるまでに 15 分から 20 分程度時間がかかるため短時間で脱色を確認できる実験条件を検討する必要があると考えられる。

酵母を酵素源とした SDH によるメチレンブルーの脱色実験のスケールダウンに問題がなかったことから、酵素源に身近な食材であるもやしを用いた実験教材の検討を行った。もよしの SDH の採集方法は先行研究の方法を踏襲した。また脱気のために、スクリー管ビンを反応容器とした簡易脱気装置を用いているが、その実験方法を下記に示す。

<実験手順 3>

- ① もやしを乳鉢ですり潰し、ガーゼで濾して酵素液を得た。

- ② 10mL スクリュー管ビンに酵素液 6.0mL を加え、ふたが付いた三方コックを取り付けた。
- ③ 2mL シリンジで基質溶液 1.5mL を吸引し、三方コック上に取り付けた。
- ④ スクリュー管ビンに 10mL シリンジの簡易脱気装置を取り付けた。
- ⑤ 脱気用シリンジを引いて計 3 回脱気操作を行った (図 10)。
- ⑥ スクリュー管ビンに基質溶液を注入した。
- ⑦ 40℃で湯浴し、脱色時間を測定した (図 11)。
- ⑧ 脱色確認後、スクリュー管ビンのふたを開けて攪拌し (図 12), このときの色の变化を観察した。



図 10 脱気後の反応容器



図 11 湯浴中での脱色時間の観測

ここで、酵素溶液は、ガーゼで濾した原液を酵素溶液として希釈せずに用いた。また基質溶液は、3% コハク酸二ナトリウム水溶液 2.5mL に対して 0.03% メチレンブルー水溶液 1 滴混合で調製した。なお、実験では緑豆もやしを使用した。黒豆もやしでも脱色時間にほとんど変化はなく、両者とも脱色時間は約 120 秒前後であったので、どちらを使用しても問題はないと思われる。



図 12 再酸化の観測

(1) 酵素活性の経時変化

実験での注意点であるが、もやしから酵素液を得てから実験を行うまで長時間経過する場合がある。もやしにはタンパク質分解酵素など SDH 以外にも多くの酵素が含まれており、時間経過に伴って酵素活性が低下する恐れがある。そのため、もやしをすりつぶし、ガーゼで濾しとった時点をも 0 時間として、酵素活性の経時変化を調べた。実験方法は実験操作 3 に従い、脱気回数 3 回、酵素液 6.0mL、基質溶液 (3% コハク酸二ナトリウム水溶液 2.5mL に対して 0.03% メチレンブルー水溶液 1 滴混合) 1.5mL を用いているが、絞りとった酵素液は室温 (25℃)、アルミホイルで覆った状態で静置させて

いた。結果を図 13 に示す。

図 13 から、脱色時間は 2 時間経過時点で短くなっていることがわかる。3 時間以降はあまり大きな差は見られない。通常、試薬の酵素を用いて実験をする場合、水溶液にしてから安定化させるために 1 時間程度静置する。本実験方法では、もやしをすりつぶしているため、SDH や FAD が酵素液中で一時的に不安定な状態になっていると考えられる。そのため、時間の経過とともに、酵素液中で SDH や補酵素 FAD の安定化が考えられる。

一方、長時間保存した場合であるが、図 13 にデータは記載していないが、24 時間経過後の酵素液で実験した場合は 5 分程度の脱色時間が必要だったので、8 時間経過時点と比べて 3 分程長く脱色に時間を要していた。この結果については、酵素液中に含まれるタンパク質分解酵素による SDH の分解などが原因として考えられる。以上の結果より、長時間の実験を計画する際は酵素液活性の経時の変化を考慮すること、もしくは、もやしをすりつぶしてから 3 時間静置したものをを用いて実験を行うなどの対応が必要であると考えられる。

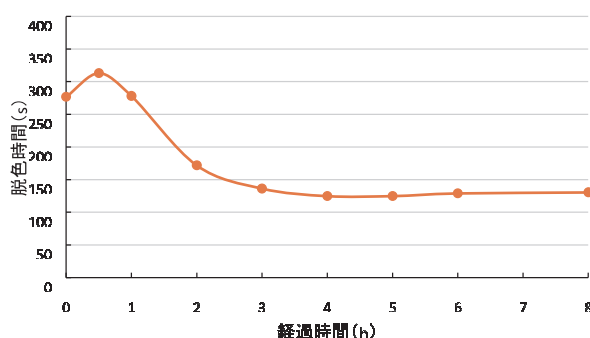


図 13 酵素活性の経時変化

(2) 脱気回数

先行研究¹⁶⁾では、もよしの絞り汁を酵素源とした場合、酵母に比べて脱色に時間がかかっている。シリンジによる脱気回数を増やすことで同じ酵素液量でも脱色時間を短縮できるか検証すると、脱気操作を 1 回から 3 回に増やすことで、15 分かかっていた脱色時間が 4～5 分となり、10 分程度の短縮化が確認できた。一方、3 回以上の脱気操作ではスクリー管ビン内の気圧が低く、シリンジのピストンを引きにくい。実際に、授業実践でも 3 回の脱気操作でも最後の 1 回は引きにくいという意見が出ている。これらより、もやしを用いた実験においては脱気回数を 3 回とするのが適当と考えられる。

4. 授業実践

SDH によるメチレンブルーの脱色実験における教材の操作性や教育的効果を検証するために、京都教育大学の学生を対象にした授業と京都府下の西城陽高等学校に通う高校生を対象にしたサイエンスプロジェクト事業で授業実践を行い、実験後にアンケートを行った。

(1) 有機・生物化学実験での授業実践

【日時】2016年6月9日(木)4限目

【場所】京都教育大学 化学共通実験室 A108

【対象】京都教育大学 理科領域専攻 3 回生 2 名, 4 回生 2 名

【実施内容】

酵素源としてもやしの絞り汁を用いて SDH によるメチレンブルーの脱色実験を行った。実験装置には簡易脱気装置を用いて、実験手順3の操作で行った。実験後、学習内容のまとめを行い、アンケートの記入時間を設けた。

大まかな時間配分は、説明 10 分、実験 20 分、まとめ 5 分、アンケート 10 分であった。実験の班分けは、1 班 2 人、全 2 班で行った。

1) アンケート項目と結果

質問 I : 実験操作について

※項目①～③は(簡単, 少し簡単, 普通, 少し難しい, 難しい)の5択, 項目④は(できる, できない)の2択, 項目⑤は自由記述

項目①: シリンジを使った脱気操作の難易度はどうでしたか。: 「少し簡単」3 名, 「普通」1 名

項目②: 三方コックの操作の難易度はどうでしたか。: 「少し簡単」4 名

項目③: 全体を通して、今回の実験操作の難易度はどうでしたか。: 「少し簡単」2 名, 「普通」2 名

項目④: 今回の実験は高校生でも行えると思いますか。: 「できる」4 名

項目⑤: 実験操作について①～③のように思った理由を書いてください。:

- ・シリンジでの脱気は 1 人では難しい。
- ・どこからどこへ空気が抜けるかなど考えるのは難しいが、やってみるとそんなに難しい作業というわけでもなかった。

2) 質問 I についての考察

実験操作に関しては、初めて使う器具が多く戸惑った学生がほとんどであったが、実際に操作すると問題なく行えていたと考える。項目④において高校生でも本実践方法で実験できると感じたという回答が得られた。しかし、項目⑤の記述にあるように脱気操作は 1 人では難しいと感じる学生が見られた。高校生においても 1 人での操作は困難であると予想されるため、2 人で協力して行わせるなどの対策が必要と考えられる。

(2) サイエンスプロジェクト事業での授業実践

【日時】2016年7月9日(土)14:40～15:30

【場所】京都教育大学第3共通実験室 A117

【対象】京都府下高等学校 2 年生 42 名

【実施内容】

実験に入る前に、実践対象が学習内容を未履修(「生物基礎」で酵素のはたらきは学習している)であったため、クエン酸回路および活性化エネルギーなど必要事項の説明を行った。酵素源としてもやしの絞り汁を用いて SDH によるメチレンブルーの脱色実験を行った。実験装置には簡易脱気装置を用いた。実験操作は先述した手順で行っている。また、前回の実践での意見を受けて脱気操作は 2 人で協力して行うように指示した。

実験後、学習内容のまとめ（色の変化に伴う各物質の構造変化）を行い、アンケートの記入時間を設けた。具体的な授業の流れと大まかな時間配分は、説明 15 分、実験 20 分、まとめ 5 分、アンケート 10 分であった。実験の班分けは、1 班 3 ～ 4 人、全 11 班で行った。また、班員の役割として、実験操作（2 名）・記録（1 名）・実験手順指示（1 名）を実践実施者が指定して実験を行った。



図 14 高校生を対象にした実践の様子

1) アンケート項目と結果

質問Ⅰ：実験操作について

※（簡単、少し簡単、普通、少し難しい、難しい）の 5 択、項目④は自由記述

項目①：シリンジを使った脱気操作の難易度はどうでしたか（図 15）。

項目②：三方コックの操作の難易度はどうでしたか（図 16）。

項目③：全体を通して、今回の実験操作の難易度はどうでしたか（図 17）。

項目④：実験操作について①～③のように思った理由を書いてください。

項目①～③で得られた回答を図 15 ～図 17 に、それぞれ上から時計まわりに円グラフで表した。

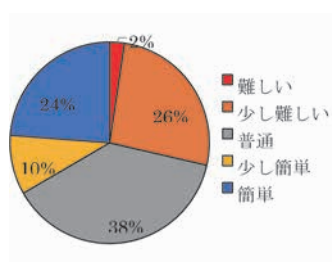


図 15 項目 1 の回答

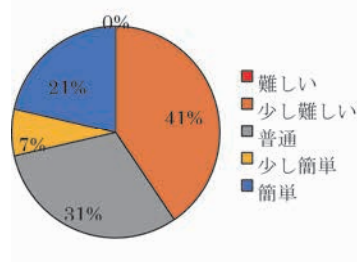


図 16 項目 2 の回答

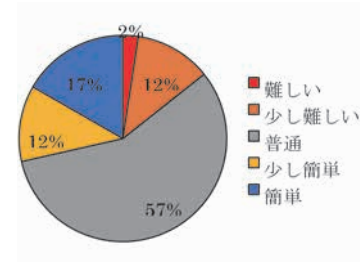


図 17 項目 3 の回答

アンケート結果をまとめると図 17 から、本研究で開発した簡易脱気装置を用いた操作全体の難易度について「簡単」または「少し簡単」と答えた生徒は全体の 29%であった。反対に、「難しい」または「少し難しい」と答えた生徒は 14%であった。ほとんどの生徒は「普通」と回答している。操作の内容別に見てみると、図 15 のシリンジによる脱気操作と図 16 の三方コックの操作性についての項目において「簡単」または「少し簡単」と答えた生徒はどちらも約 30%程度であったが、「少し難しい」と答えた生徒の割合は三方コックの操作性の項目の方が 15 ポイント高い。普段の実験では使用しない三方コックの操作はやはり難しいと感じる生徒が多い結果となった。三方コックを用いてい

る先行研究でも教材の操作性について検討を行っている。シリンジと活栓コックを用いてスケールダウンした実験教材を開発している中野ら¹⁷⁾は高校生を対象に授業実践した結果「慣れるまで難しいが慣れると簡単だった」という意見が多く、生徒実験上の問題はないと述べている。本実践でも同様の意見が得られている。次に項目④の自由記述で得られた意見の一部を記載する。

- (a) 三方コックの使い方が正しく理解できていなかった。二回目は正しくできた。
- (b) 最初は少し手こずったけど、今思ったら結構簡単だった。
- (c) 手順がわかりやすくてよかったから。
- (d) 1人ではできないと思ったから。
- (e) 協力できたからそこまで難しくなかった。

記述 a, b のように、何度か操作することで問題なく操作できると感じた生徒が見られた。本実践ではアンケート記入に 10 分間の時間を設けているが、学校現場での活用を考えると授業時間に若干の余裕ができる。この時間を使って実験前に操作の練習を行えば、実際の実験でも簡単に操作できるのではないかと考えられる。

また、記述 c のように配布資料が有効であったことがわかった。各班に実験手順が書かれたワークシートとは別に三方コックの操作方法をまとめたシートを配布した。三方コックのように普段使わない器具を用いる場合は、生徒の経験の有無や習得度に応じて補助資料を活用することで問題なく実験を進めることができると考えられる。

実験操作の人数に関しては、2人で実験操作を行った。記述 d のように 1人で脱気操作を行うことが難しいと感じる生徒が見られたが、記述 e のように 2人で協力することで実験を進めることができたと思われる。

5. まとめ

簡易に脱気操作を行うことができるスモールスケール実験教材を作製した。また、作製した簡易脱気装置を用いて、酵素源に酵母またはもやしを用いた SDH 触媒によるメチレンブルーの脱色反応をスモールスケール化した実験教材を開発した。簡易脱気装置（サンプル管ビン用・スクリー管ビン用）は問題なく機能しており、実験中に空気が小型ガラス管ビンに入り込む（または、漏れる）こともなかった。

従来の酵母を用いた実験では、酵母液の濃度をある程度自由に設定できるため、酵素濃度と酵素活性（脱色時間）を調べる実験を行うことができる利点がある。また、湯浴温度の検討で述べたように、温度と酵素活性の実験（最適温度の検証）も行うことができる。酵素の最適温度については「生物」だけでなく「化学」でも学習する。本実験を通して、生命現象を支える酵素反応を学習することに加えて、酵素のタンパク質としての物性も理解することが可能である。

身近な食材であるもやしを酵素源とした実験では、試薬濃度および使用量、実験操作などの条件を最適化することで授業時間内に SDH のはたらきを観察することができた。普段食材として扱っているもやしを用いることで、学習者の興味関心を引き出すことが期待できる。

実際に、SDH の授業実践から、もやしを実験材料に用いたことで実験に興味関心を持った生徒が多くいたことも確認できた。実験操作に関しては、簡単であるとは言い難いが、すべての班がメチレ

ンブルー色変化の観察を行えており、操作上の問題はないと考える。

また、ツンベルク管を用いる実験例では、器具を必要数準備する点や使用する酵素液量が多量になる点でさまざまな条件下で酵素反応を検証することは難しい。本研究で開発した簡易脱気装置を使用することで安価に必要な数の実験器具を確保することができ、1回の実験に必要な試薬量も少量であるため、個別実験や探究実験での活用が期待できる。

参考文献

- 1) 文部科学省『高等学校学習指導要領解説理科編・理数編』実教出版, 2010.
- 2) 成田央『基礎からしっかり学ぶ生化学』羊土社, 2014, pp.111-121.
- 3) 科学技術振興機構 理科教育支援センター『平成 20 年度 高等学校理科教員実態調査報告書』, 2010, p.80.
- 4) 宮田理恵ら「ウェルプレートを活用した酵素反応の教材開発と授業実践」『神戸女学院大学論集』第 62 巻, 第 2 号, 2015, pp.155-161.
- 5) 吉里勝利ら『生物』第一学習社, 2014, pp.68-71.
- 6) 巻本彰一, 四月朔日秀崇「生物化学実験のモジュール化ーポリフェノールオキシダーゼによる緑茶の酸化反応ー」『京都教育大学紀要』136, 2020, pp.1-15.
- 7) 椎葉昌美ら「マイクロスケール実験を用いたキウイに含まれるたんぱく質分解酵素の教材開発」『神戸女学院大学論集』, 第 58 巻, 第 2 号, 2011, pp.79-86.
- 8) 荻野和子「身近な題材を使ったマイクロスケールの学生実験ーソフトドリンクの鉄を調べるー」『化学と教育』第 43 巻, 第 2 号, 1995, pp.126-129.
- 9) 東海林恵子ら「身近な物質のニンヒドリン反応についてのマイクロスケール実験」『化学と教育』第 50 巻, 第 5 号, 2002, pp.374-375.
- 10) 加藤良一ら「タンパク質分解の教材研究」『山形大学紀要 (教育科学)』, 第 14 巻, 第 3 号, 2008, pp.283-293.
- 11) Oyedotun KS, Lemire BD “The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies” . J. Biol. Chem. 279 (10), 2004, pp. 9424-9431.
- 12) 浅島誠ら『生物』東京書籍, 2014, p.55.
- 13) 巻本彰一, 藤田義人「有機化学実験のモジュール化ーサンプル管ビンを反応容器とした脂肪族エステル合成ー」『京都教育大学紀要』133, 2018, pp.7-19.
- 14) 巻本彰一, 藤田義人「有機化学実験のモジュール化Ⅱーサンプル管ビンを反応容器とした芳香族エステル合成ー」『京都教育大学紀要』133, 2018, pp.21-33.
- 15) 巻本彰一ら「有機化学実験のモジュール化Ⅲーサンプル管ビンを反応容器としたニトロベンゼンとアニリン合成ー」『京都教育大学紀要』, 134, 2019, pp.1-12.
- 16) 「好気呼吸 (コハク酸脱水素酵素) の実験」, <http://www.makasaka.net/seibutu/kokyu/kokyu.html> (H28.6.14 閲覧).
- 17) 中野源大ら「高等学校化学における二酸化窒素を用いた化学平衡の移動実験ーマイクロスケール

実験による教材開発及び授業実践―』『理科教育学研究』, 54 (3), 2014, pp.393-401.