

酵素反応実験の定量化

ルシフェラーゼ実験キットを使った反応速度の測定

遠藤 孝一

これまで、高校の生物実験で酵素反応を定量的に扱うことは、適当な教材がないために難しかった。本研究は生徒実験で酵素の反応速度を測定することを目指したものである。「ホタライト」というルシフェラーゼ実験キットを活用し、反応をデジタルカメラで撮影した後、コンピュータ上で発光の明るさを測ることによって反応速度を求めた。この方法によって、比較的簡単に反応の様子をグラフ化できることが明らかになったので報告する。

[キーワード] 酵素 反応速度 ルシフェラーゼ ホタライト 高等学校生物

はじめに

生物における「生物体内の化学反応と酵素」の単元では、各種条件による酵素反応の速度の違いについて学習する。しかし、生徒実験で反応速度を測定することは難しい。

近年、キッコーマン(株)が「ホタライト」というルシフェラーゼ実験キットを販売している。遺伝子組換え技術を使って生産したルシフェラーゼ粉末と、ルシフェリンにATPを加えた粉末で構成されており、水に溶かして混ぜると酵素反応により発光する。この際に発光強度を測定することができれば、酵素の反応速度を求めることができる。

しかし、ルシフェリンの弱い発光強度を測るには感度が高く高価なセンサーを使わなくてはならない。そこで、デジタルカメラで撮影し、コンピュータに取り込んだ画像の明るさを調べることで発光強度の測定を試みた。

さらに、酵素反応の授業において、どのように活用できるかを考察した。

1 材料と方法

(1) ホタライト

A粉末とB粉末からなり、それぞれの水溶液を混合すると発光する。説明書¹⁾では各50 μ lの水に溶かす指示がある。

A粉末：ルシフェラーゼ(酵素)

B粉末：ルシフェリン(基質), ATP, 硫酸マグネシウム7水塩, グリシン緩衝剤



図1 ホタライトの粉末容器と溶液
(2) 反応の撮影

反応は光が漏れないようにした段ボール箱の中で行った。あらかじめ試験管に2 μ lの基質溶液を入れ、これに酵素溶液2 μ lを加えた。その後、段ボール箱に開けた穴からデジタルカメラで撮影した。撮影画像の明るさを比較するために、一定の絞りやシャッタースピードで撮影できるようマニュアルモードが使えるカメラを使用した。露出の過不足を防ぐために、撮影の前には適正な露出を決める予備実験を行った(図2)。



図2 撮影の様子

(3) 明るさの測定

デジタルカメラの写真をコンピュータに取り込み、カラー情報を破棄して白黒にした上で、画像の濃さを測ることで発光部分の明るさを求めた。測定には「AT-Image」²⁾というフリーソフトを用いた。「AT-Image」はボタン1つで白黒写真にすることができる上、指定範囲の明る

さの平均値を簡単に表示できる。明るさの数値は0～255の256段階で表される(図3)。

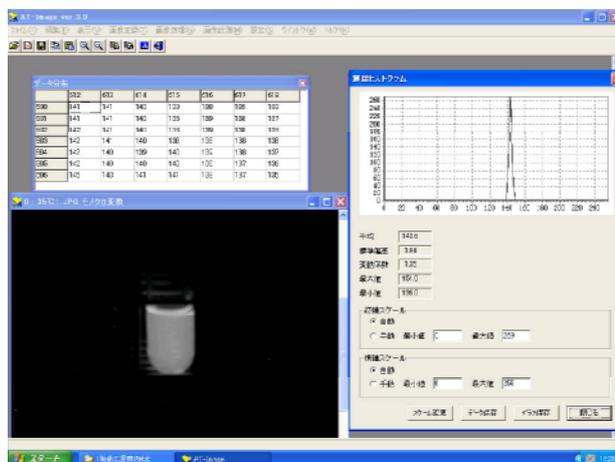


図3 AT-Imageで明るさを測定

(4) 撮影のタイミング

発光強度は混合直後が最も明るく、次第に暗くなっていく。発光強度の変化が激しいときに撮影すると、僅かなタイミングのずれが大きな差となって現れるため、撮影は発光強度が安定してから行うとよい。図4に反応直後からの発光強度の変化を示した。反応開始後1分以内は発光強度の変化が大きいため、以後の測定は反応開始1分後に行うこととした。

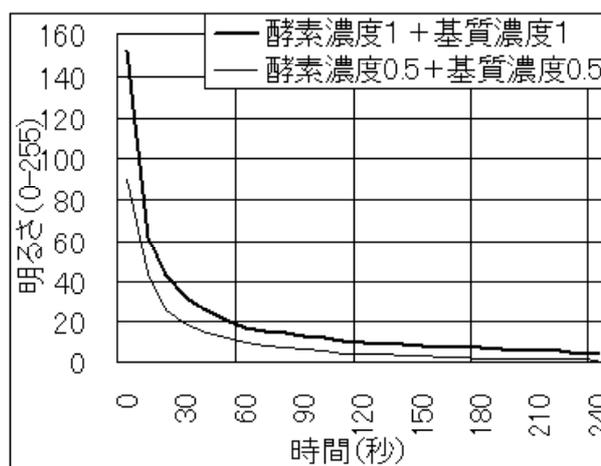


図4 発光強度の変化

(5) 溶液濃度

図4が示すように、反応溶液の濃度を半分にするると、発光強度は低下するが、グラフの形に

差は見られない。反応開始数分後にもある程度の明るさを保持していることから、実験のコストダウンのために、反応溶液濃度は説明書に指示された半分の濃度とした。

2 各種条件による測定

(1) 最適温度の測定

温度を設定した水に酵素溶液の入った試験管を5分間入れ、水温を保ったまま基質溶液と反応させて発光強度を測定した(図5)。45以上では著しく反応速度が低下し、50以上では完全に失活した。高温の酵素溶液を室温(25)に冷ましてから基質溶液と反応させても結果が変わらないことから、不可逆的な変化であることが確認できる。最適温度は30~35前後であった(図6)。

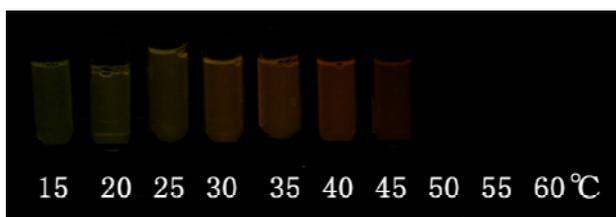


図5 温度ごとの発光の様子

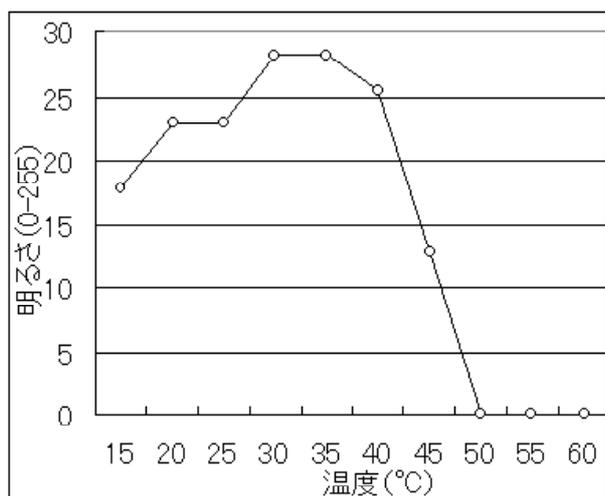


図6 酵素の最適温度

(2) 最適pHの測定

酵素溶液の入った試験管に、0.1MのHClまたはNaOH溶液を加えてpHを調整する。その後基質

溶液と反応させて発光強度を測定した(図7)。最も活性の高いpHはおよそ7であった(図8)。

本実験においては、基質溶液のpH調整を行っていない。また、基質溶液にはグリシン緩衝剤が含まれており¹⁾、作用の詳細が不明なために、反応時のpHがずれている可能性がある。これを避けるためには、より強力で反応を阻害しない緩衝液が必要だが、適切なものが現在見つかっていない。

あまり正確ではないものの、pHによる活性の違いを示すには有効な方法である。

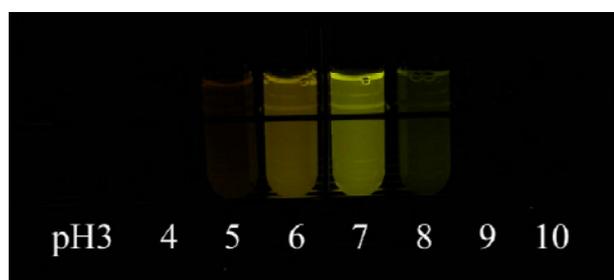


図7 各pHの発光の様子

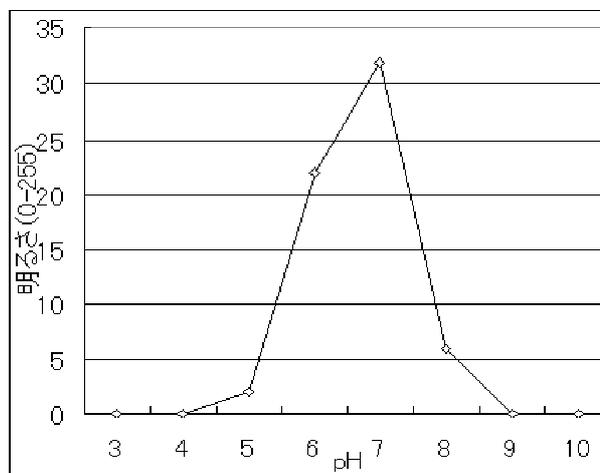


図8 酵素の最適pH

(3) 酵素濃度と反応速度の関係

酵素溶液を説明書に示された2分の1~250分の1の範囲で希釈し、基質溶液と反応させた結果を図9に示した。酵素濃度と反応速度の関係を明確にとらえることができた。

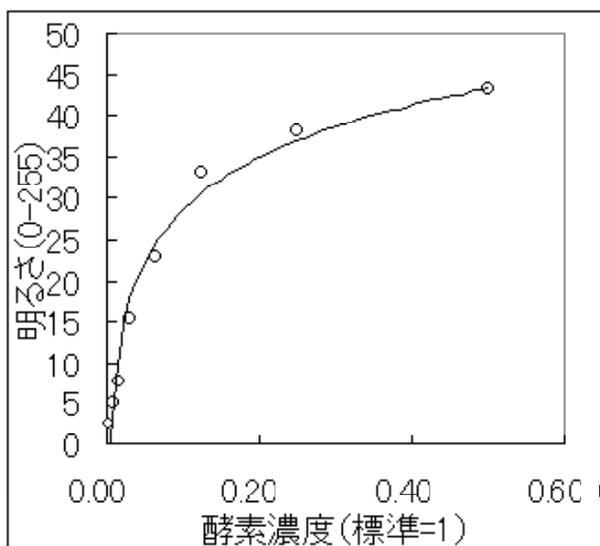


図9 酵素濃度と発光強度

(4) 基質濃度と反応速度の関係

基質溶液を説明書に示された2分の1～10分の1の範囲で希釈し、酵素溶液と反応させると、反応速度と基質濃度、酵素濃度の関係が確認できる(図10)。

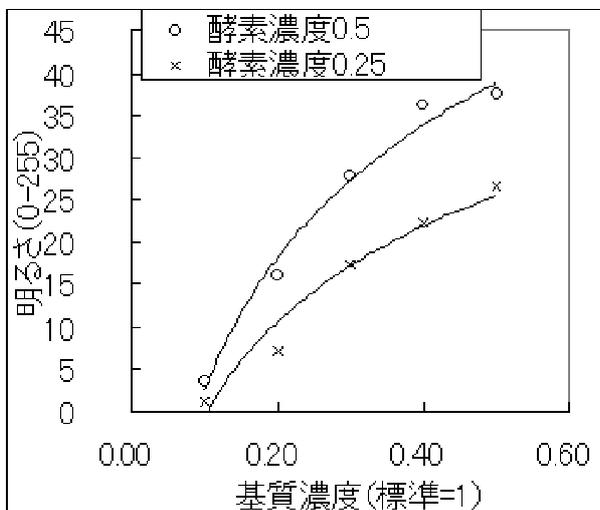


図10 基質濃度と反応速度の関係

考察

ホタライトの発光を肉眼で観察して、明るさの程度を細かく見分けることは難しい。しかし、撮影した写真上の明るさとして測定すると、明確な差となって現れるので、本研究で試みた方法は簡単に反応速度を測定する方法として有効

である。特に温度と反応速度の関係、酵素や基質の濃度と反応速度の関係については、定量的な酵素反応実験として活用しやすい。

生徒実験を行う際には、以下の3点に配慮することが必要である。

ウミホタルなどを使い、ルシフェラーゼとルシフェリンの反応について事前に学習しておく。

撮影した写真の取り込みや「AT-Image」の使い方等、コンピュータの操作について簡単な事前学習をしておく。

得られたデータからグラフを作成し、そのグラフが示す意味を考察する時間を十分に確保する。

また、必要に応じて、次のような展開も可能である。

操作を簡略化するために、あらかじめ撮影した写真を用いてデータを得る。

コンピュータの操作を回避するために、あらかじめ明るさが分かっている写真(図11)を準備し、それを基準にして発光強度を求める。

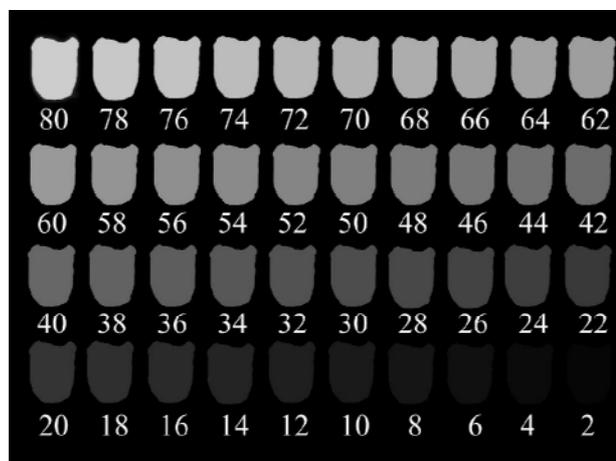


図11 発光強度比較シート

参考文献

- 1) ホタライト取扱説明書および製品安全データシート 中村理工工業株式会社
- 2) AT-Image <http://ubitmap.sourceforge.jp/readme/b.html>

(えんどう こういち 平成18年度理科課題研修員 北海道北広島西高等学校)