慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	文系学生のためのマイタケのタンパク質分解酵素実験の開発
Sub Title	Development of an Educational Program for Students in Liberal Arts, Using Proteases Extracted from Grifola frondosa
Author	草間, さきく(Kusama, Sakiku) 小野, 裕剛(Ono, Hirotake)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2009
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of the natural science). No.46 (2009.) ,p.57- 70
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	研究ノート
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20090930-0057

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Hiyoshi Review of Natural Science
Keio University No. 46, 57–70（2009）

文系学生のためのマイタケのタンパク質分解酵素実験の開発

草間さきく・小野裕剛

Development of an Educational Program for Students in Liberal Arts, Using Proteases Extracted from *Grifola frondosa*

Sakiku Kusama and Hirotake Ono

はじめに

慶應義塾大学では，福沢諭吉の自然科学教育への理解をもとに1949年より文系学生に対して実験を重視した自然科学教育が行われてきた。生物学実験において，学生が様々な生物の種に向き合うことは，生物の多様性を理解する上でも非常に重要なことである。その観点から生物学の学生実験を考えると，植物や動物を材料にした実験は多数あるが，菌類を取り扱った実験は十分であるとは言えない。

そもそも菌類は，生態系において分解者という重要な地位を占めており，そのエネルギー獲得方法の特徴は酵素を菌糸から分泌することにより，環境中に存在する枯死体や排泄物から有機物を分解・吸収することである。高校の生物学を含む多くの教科書において，菌類についてのこのような生態学的な地位に関する記述が見られ，菌類に属する生物はいわゆるカビやキノコであると記載されている。キノコは，菌糸が集まって子実体を形成した食用部分であり，食物として身近な存在でもある。多くのキノコのうちマイタケ（*Grifola frondosa*）は，昔から食用キノコとして知られていたが，人工栽培ができるようになり，広く家庭の食卓に上るようになった。近年，マイタケ子実体は，強いタンパク質分解酵素活性を持ち，これを茶碗蒸しに入れると固まらないことが報告されている（大野ら，1995）（図１）。このような見近な着眼点から，我々はマイタケ入り茶碗蒸しとタンパク質分解酵素反応を関連させ，菌類には分解酵素が存在するのを示すことができる実験を開発するにいたった。実験手法としては，反応前後の基質量変化を呈色反応として検出し，検量線を用いて濃度に変換する作業を行わせる。文系学部に所属する学生にとって容易なことではないが，我々はこのような論理性を理解させること

慶應義塾大学生物学教室（〒223-8521　横浜市港北区日吉 4-1-1）：Dept. of Biology, Keio University, 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, 223-8521, Japan. [Received Apr. 13, 2009]

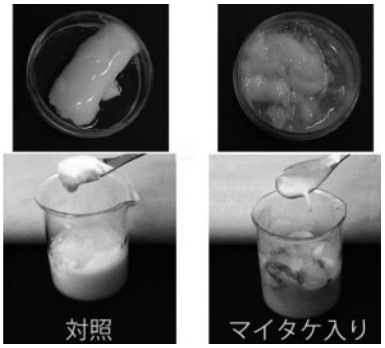


図１．マイタケ入りの茶碗蒸し
マイタケ子実体５ｇを卵液50ml（１％食塩入り）に入れ弱火で15分間蒸した。
左は卵液のみ（対照），右はマイタケ入りである。

は大変重要であろうと考えている。本稿では，180分の実験授業に合致するように検討した実験条件と課題を提案し，少人数クラスでの試行した状況について報告する。

１．実験材料のマイタケ

マイタケ（*Grifola frondosa*）は，担子菌類ヒダナシタケ目サルノコシカケ科マイタケ属に分類される。マイタケ子実体は，約90％が水分でできており，炭水化物，タンパク質，灰分，脂質などの成分が続く。また，マイタケ子実体には，セルラーゼなどの酵素も存在するが，それらに比べてタンパク質分解酵素の活性は検出しやすい。このことからも，学生実験においてマイタケ子実体のタンパク質分解酵素を取り上げた。

マイタケ子実体のタンパク質分解酵素活性については，橋本（1983），木元ら（1994），大野ら（1995）に詳しい。このタンパク質分解酵素には，酸性領域ではたらく１種（至適 pH3.0，至適温度65℃，分子量約44000Da，おそらくカルボキシプロテアーゼ）と中性領域ではたらく３種（A：至適 pH8.0，至適温度60℃，分子量約20000Da，B：至適 pH7.0，至適温度50℃，分子量約45000Da，C：至適 pH6.0，至適温度50℃，分子量約45000Da）が存在する。A は，ペプチドのリシン残基アミノ基側のペプチド結合を特異的に加水分解するメタロエンドペプチダーゼであり，EDTA で阻害され，カゼイン，アルブミンなどを基質として研究が行われている。いずれも至適温度が50℃～65℃と高く，耐熱性，広い pH 範囲での安定性がある。３種 A，B，C のタンパク質分解酵素は単独では卵白の凝固を完全には阻止できないが，３種を混合すると加熱凝固は阻止されるので，卵白の凝固阻止には，この３種が連携して関わっているらしい。

2．学生実験の概要

学生実験は，検量線の作成，マイタケ子実体から抽出した粗酵素液のタンパク質分解酵素活性の経時変化を調べることとマイタケ入り茶碗蒸しを作成することの３つに分けられる。検量線の作成は，既知濃度のタンパク質濃度と吸光度の値をグラフにプロットし，近似直線を引く作業であり，様々な計測に使用される検量線の概念を学ばせることを目的とした。タンパク質分解酵素反応の測定は，時間経過による基質濃度の変化を吸光度として測定し，作成した検量線から吸光度の値をタンパク質濃度に読み替えて，タンパク質濃度の経時変化のグラフを作成させる作業である。グラフを作成することにより，速度がグラフの傾きで表されることを再確認させることを狙った。さらに，マイタケとその他のキノコを入れた茶碗蒸しを実際に作成させ，タンパク質分解酵素活性との関連から，マイタケ入り茶碗蒸しを成功させるための方法について考察させることとした。

実験に先立って，検量線グラフの書き方と読み取り方を説明し，結果と考察について説明する。実習時間が180分であるため，粗酵素液は前日から用意し，検量線用の標準タンパク質溶液の希釈系列の作成とタンパク質分解酵素反応の測定，茶碗蒸しの作成の３つの内容について手順を説明し，取り組ませることとした（表１）。[1)]

表１　実験の流れ

経過時間	内容
30分	実験の説明 ３つの実験について 検量線について グラフの書き方について 結果と考察について
40分	実験１　マイタケ入り茶碗蒸しの準備
70分	実験２　検量線の標準タンパク質の調整
120分	実験３　タンパク質分解酵素活性の測定
145分	実験１の続き　マイタケ入り茶碗蒸しの作成とレポート作成
150分	後片付け

1）慶應義塾大学日吉キャンパス特色 GP「文系学生への実験を重視した自然科学教育」の WEB サイト：http://www.sci.keio.ac.jp/gp/ 内の生物学実験のページにおいて，学生実験の手順，方法などについて発信している。

3．実験条件の検討内容

タンパク質分解酵素活性の測定方法

タンパク質分解酵素活性の測定では，残存タンパク質濃度を分光光度計を用いて定量する紫外吸収法やLowry法が一般的である。しかし，学生実験においては多くの学生が調整したサンプルを短時間で読み取り処理をしなくてはならないため，タンパク質濃度の測定は，マイクロプレート測定装置（Bio-Radモデル680）（図2），マイクロプレート（16ウェルストリップ）（図3）を利用することとした。これに合わせ，プロテインアッセイ染色液（Bio-Rad）を使ったBradford法を使用することとした。Bradford法は，タンパク質が色素であるCoomassie Brilliant Blue G-250と結合すると，最大吸光波長が465nmから595nmに変化する性質を利用している比色定量方法である。Coomassie Brilliant Blue G-250がタンパク質と結合すると，茶褐色から青色に変化し，溶液中のタンパク質濃度が高いほど濃い青色となる。マイクロプレートのウェルの中で，試料10μlと5倍に希釈した上記の染色液200μlを混合し，測定するだけの簡便な操作方法で，限られた時間の学生実験において利用しやすいと思われた。この方法では分子量が3000～5000Da以上のタンパク質を測定することができるが，3000Da以下のペプチド，アミノ酸は反応しないので，基質のタンパク質がマイタケ中のタンパク質分解酵素で分解されなかった量を測定し，あらかじめ作成した検量線からタンパク質濃度を算出



図2　マイクロプレートリーダー（Bio-Rad Model 680）

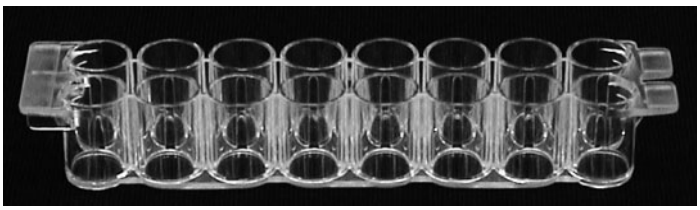


図3　マイクロプレート（16ウェルストリップ）

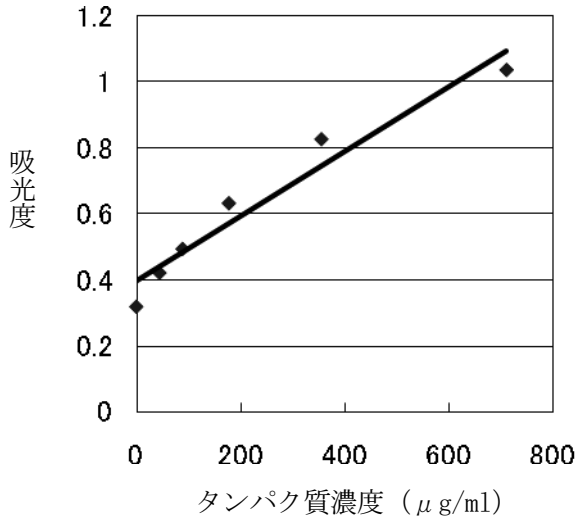


図４　プロテインアッセイ・スタンダードアッセイ法よる検量線

マイクロプレート（16ウェルストリップ）のウェルに５倍希釈のプロテインアッセイ染色液200μlを加えておく。タンパク質（BSA，720μg/ml）の２倍希釈系列を45μg/mlまで作成し，ウェルに10μlずつ添加して発色させる。最後の発色から５分後，595nmの吸光度を測定する。測定した吸光度の値から検量線を作成する。

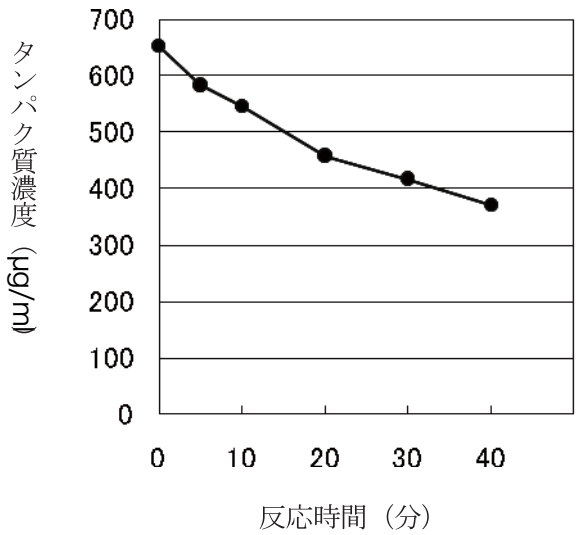


図５　反応時間とタンパク質濃度の変化

50℃におけるマイタケのタンパク質分解酵素によるタンパク質濃度の経時変化を測定した。反応直後，５分，10分，20分，30分，40分後の反応液の595nmにおける吸光度を測定した。測定方法は，図４の検量線と同様である。同時に測定した検量線からタンパク質濃度をそれぞれ読みとった値をグラフにした。

することにより，タンパク質分解酵素の活性を調べることができる。一般に，タンパク質濃度の定量は，濃度が既知の標準タンパク質溶液の吸光度を測定し検量線を作り，濃度未知のタンパク質溶液の吸光度を測定し，作成した検量線からタンパク質濃度を求める。学生実験では，このような検量線グラフを作成し（図４），検量線を読みとり，タンパク質分解酵素反応の時間経過における基質濃度の変化を測定する（図５）。

粗酵素液の抽出方法

マイタケ子実体からの粗酵素液の抽出方法は，マイタケ子実体を包丁で細かく刻み，蒸留水あるいは緩衝液に浸し，１時間ほど置いたものをろ過し，ろ液を粗酵素液とする方法（大野ら，1995）や，ミキサーで粉砕し30分スターラーで撹拌後，遠心分離により上澄み液を粗酵素液とする方法（木元ら，1994）がある。粗酵素液をあらかじめ用意する場合，１クラス分100ml が必要なので，簡単にできる緩衝液を用いた前述の方法とした（図６参照）。粗酵素液は，一晩37℃に置かなくても学生実験に使用することができるが，粗酵素液中に基質以外のタンパク質が含まれていると基質と酵素反応させた時に正確な基質の分解量が測定できなくなるので，内在のタンパク質を分解させたものを粗酵素液とした。

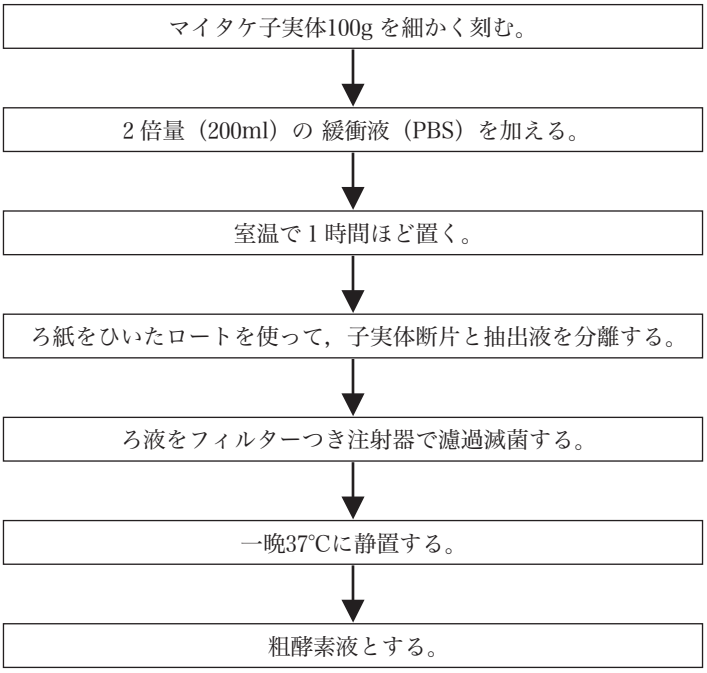


図６　マイタケ子実体からの粗酵素液の抽出方法

酵素反応の条件

抽出に用いる緩衝液は一般的なリン酸緩衝液（PBS）とし，pH は茶碗蒸しの pH が中性付近であることから pH7.0とした。

タンパク質分解酵素の基質は，検量線の標準タンパク質と同じものとするため，直線性の検量線が得られる基質を検討した。橋本（1983），木元ら（1994），大野ら（1995）は，基質にカゼインを用いている。緩衝液の PBS で希釈し，卵白アルブミン，スキムミルク，ゼラチン，カゼイン，ウシ血清アルブミン（BSA，分子量65000Da）を検討した。直線性の検量線が得られ，緩衝液に溶解してすぐ使えたため，広く標準タンパク質として用いられている BSA を基質とした（図４）。手順の詳細については，図７に示した。

酵素反応における基質と粗酵素液の量は，大野ら（1995）を参考に検量線の直線性の範囲に収まるように検討した。基質濃度は，検量線作成で使用した標準タンパク質濃度以下とした。学生のピペット操作を容易にするため粗酵素と基質の量は同量とした。粗酵素の量は，基質の量の1／10量でも同様の活性があり基質に対して十分な量であることを確かめた。手順の詳細については，図８に示した。

他のキノコを使った対照実験

シイタケ入りの茶碗蒸しは固まることから対照実験として，マイタケの代わりにシロマイタケ，シイタケ，ブナシメジ，ヤマブシタケやエノキタケを試した。その結果，シロマイタケは，マイタケと同様なタンパク質分解酵素活性がみられ，ブナシメジはマイタケに続いて高いタンパク質分解酵素活性がみられたが，それ以外のキノコはマイタケほどの活性はみられなかった。

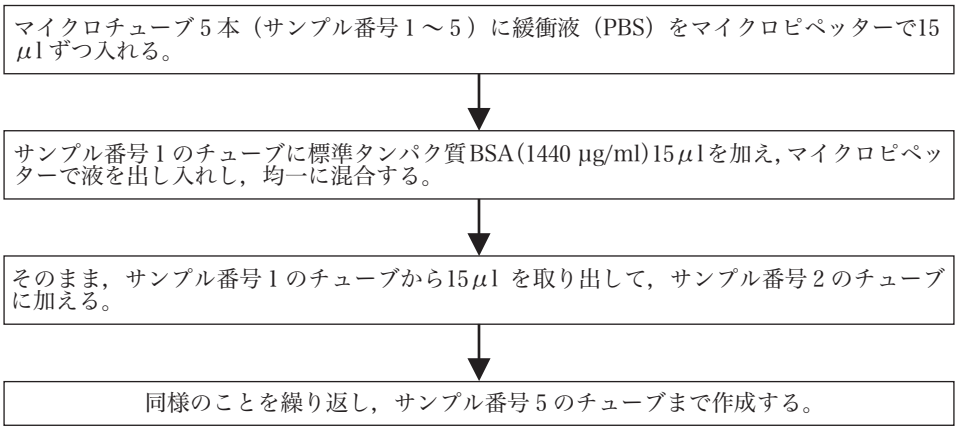


図７　検量線作成のための標準タンパク質の調整方法

２倍希釈系列の標準タンパク質BSAを770～45μg/mlまで５サンプル作成し，酵素活性の測定試料と同時にマイクロプレート測定装置で計測する。

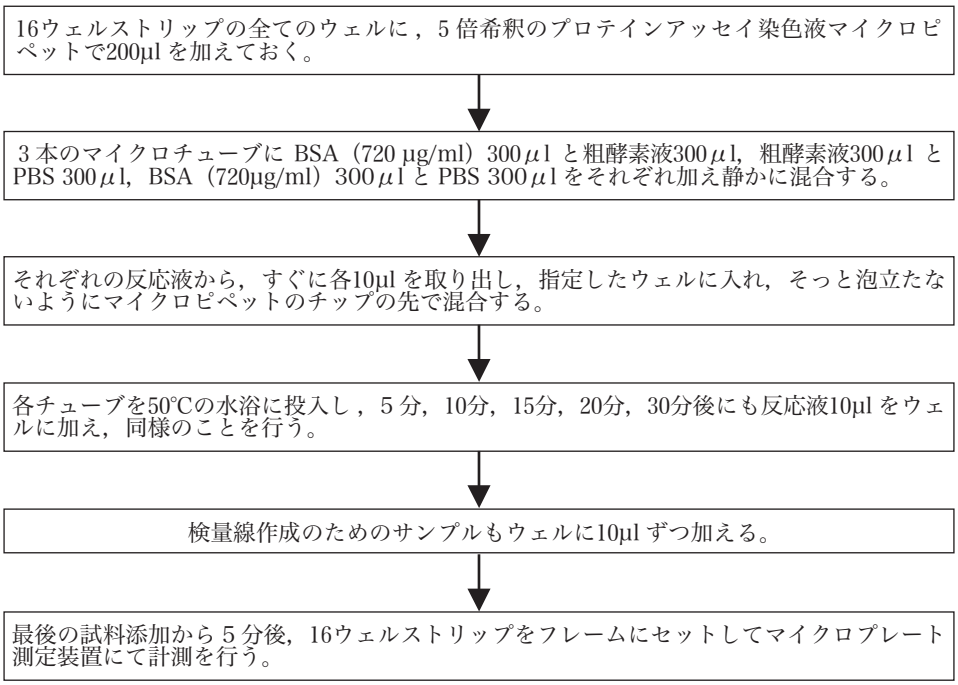


図8　タンパク質分解酵素活性の測定

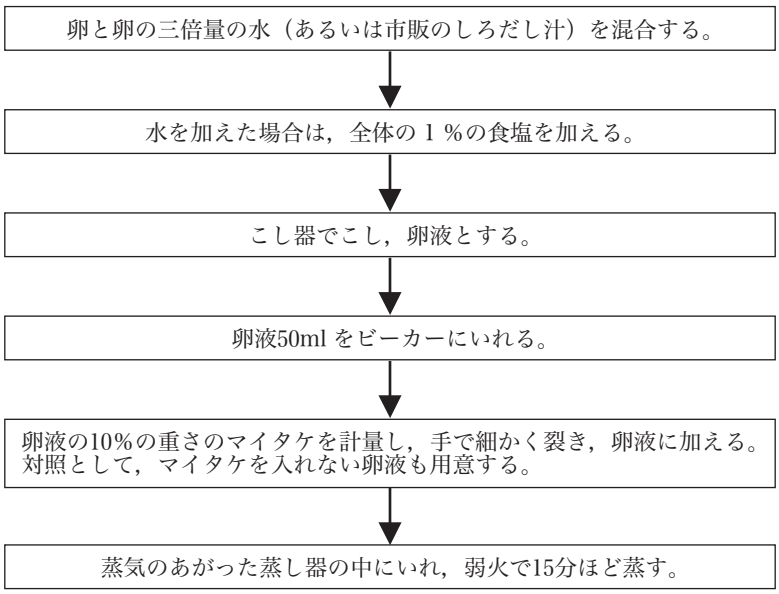


図9　マイタケ入り茶碗蒸しの作成方法

茶碗蒸しの調理方法

茶碗蒸しの調理方法に関しては，一般的な茶碗蒸しの調理方法を参考にした（図９参照）。水で希釈した卵液は，食塩を加えないと凝固の様子がはっきりしないため１％の食塩を加えた。

４．少人数クラスにおける試行からわかった改善点

文系学生18名に本実験を実施した。これらの学生は，通年，生物学実験を含む生物学を履修しており，唾液アミラーゼの酵素実験を経験済みである。180分の授業において，事前アンケート，菌類についての講義，実験の説明（学生配布プリント（資料）を参照）を行った後実験に入った。今回の実験では，コントロールとしてマイタケ以外の２種類のキノコ（シイタケとエノキタケかヤマブシタケのどちらかひとつ）についても同様の実験を行った。実験は，２人１組で行い，さらに６人で１グループとなり茶碗蒸しの実験は合同で行った。１グループにつき，スタッフ１人が指導にあたった。実験後には，レポートと事後アンケートを提出するように指示した。

事前アンケートは，学生が菌類とキノコに関する知識をどれくらいもっているかを探るために行った。これまで菌類に関する授業を受けたことがない（あるいは受けたかもしれないが覚えていない）学生は約78％であった。菌類は，高等学校の生物 II の内容において生物の分類と進化の中で取り上げられているので，高等学校において生物 II を履修しないと学ぶ機会がないことになる。2007年に本塾設置科目「生物学 II」を履修した200名のうち高等学校で生物 II を履修した学生は35.５％であった（小野ら，2008）。このことからも，本塾学生の生物学的な菌類の知識は少ないことが予想される。しかしながら，事前アンケートの中で食用キノコの名前を知っているだけ記述してもらったところ，平均約７個の記述があった。シイタケとマツタケが一番多く，エノキタケ，エリンギ，マイタケ，シメジと続いた。学生は，身近な食物としてのキノコは知っていることになる。真核生物の菌界に属する生物を選ぶ質問では，麹菌や酵母菌は，菌界に属すると答えられた学生が60％以上であった。しかし，納豆菌や酢酸菌を菌界に属すると答えてしまった学生が半数以上にのぼり，細菌との区別はできていないことが推察された。

実験中の問題点は，実験の流れをつかむのに時間がかかる学生や，マイクロプレートのウェルの位置に戸惑う学生もおり，その結果として，全体的に予想していたより時間がかかった。時間内にレポートが書けずに後日提出させた学生もいた。また，マイクロプレートのウェルに入れる酵素反応液と染色液の容量の比が１：20と大きく，混合するのに手間がかかり，泡の発生がみられた。この泡は，吸光度の測定値に大きな影響を与えなかったようだが，ウェルでの混合比も検討する必要がある。

提出された14名のレポートの結果と考察を分析した。検量線のグラフ作成について，２名は標準タンパク質の濃度が減少すると，吸光度の値も減少していくはずのところ，希釈系列が進んでも減少しなかったため，検量線について他の学生の値を使うように指導した。残りの12名

の検量線は作成できていたが，そのうち６名は期待される吸光度より値が低めであった。検量線の標準タンパク質の希釈系列を作成する操作において，マイクロピペッターの扱い方や溶液の混合がうまくいっていない可能性が考えられる。指導に反して，ウェルの中で酵素反応液を染色液と混合後，５分経たずに測定してしまった学生がいた事も原因として考えられる。反応時間による吸光度の実測値は，マイタケの減少が一番大きく，それに比べてシイタケ，ヤマブシタケ，エノキタケは変化が少ないという期待された結果が71％であった。30分後の測定値が，全体的に急に減少する例もあったが，実験終了時間が迫っていたため，あわてて吸光度を測定したのが原因とみられる。反応時間とタンパク質の分解量のグラフについて，７名は０分のタンパク質濃度を引いた値を計算した分解量が書けていたが，残りの５名は時間ごとのタンパク質濃度の残存量をグラフにプロットしていた。最初のガイダンスにおいて，タンパク質の分解量を計算するように指示してあったが，よく理解できていなかったと考えられる。考察のタンパク質の分解酵素活性の結果と茶碗蒸し実験の結果の関連性は，タンパク質分解活性の高いマイタケ入りの茶碗蒸しが固まらず，活性の低いシイタケなどでは，茶碗蒸しが固まるといった考察が書かれており，理解されていた。また，マイタケの茶碗蒸しの成功方法は，あらかじめマイタケを加熱するなどの正しい結論が導かれていたことから，酵素タンパク質の熱変性について正しい理解がなされていることが推察できた。

実験後のアンケートでは，１年間に行った他の実験と比較して今回の実験は，内容の理解，レポートの作成や手技が難しいという感想が多かったが，内容としては面白いという感想が多かった。茶碗蒸しの作成は，あった方が良いかどうかという質問に対し，有った方が良いという感想が多かった。時間的な問題から茶碗蒸しの作成を省略することも考えられたが，アンケート結果を踏まえて継続する方向で検討する予定である。授業の最初の菌類についての分類学，生態学は面白かったと感じた学生がほとんどであった。なお，授業後の感想・改善・希望を資料として添付した。

レポートの分析，アンケートの感想・要望，実験中の様子，所要時間などから明らかになった問題点は，マイタケ以外のキノコも２種類加えたため，作業内容が多くなってしまい，時間がかかったことがまず上げられる。多数のキノコを扱うなら，グループで分担することが考えられる。また，検量線の作成は，標準タンパク質の希釈系列を作成し，すぐに測定まで行い，いったんグラフを作成するほうが，本実験の理解につながると思われる。本実験の中で，反応時間とタンパク質濃度のグラフの作成が一番難しく，経時変化によるタンパク質濃度のグラフは，基質の分解量を計算するより基質の残存量をそのままプロットしたほうが，わかりやすいと思われる。検量線とタンパク質分解酵素活性のグラフに書き方について，事前に説明を行なったが，もっと十分な説明の必要性があると思われる。実験操作については，マイクロプレートへ試料を添加する操作などについて学生が戸惑うことなくできるよう改善をしたい。それに関連して今回の学生配布プリントでは，16ウェルの位置とそれに投入する酵素反応液の種類が書かれている表が，プリントの表裏にわかれてしまい見にくかったことや，実験の流れがつかみにくい手順の書き方であるという指摘もあった。学生が操作する時に一目でわかるような実

験プリントに工夫する必要がある。さらに実験誤差をどのように判断させるかは，難しい問題であり，誤差の範囲が少なくなるような改善をしていきたい。そのためには，マイクロピペッターの操作方法を十分に理解させることも挙げられる。

実験後の感想は難しいという意見が多かったが，グラフの書き方の指導を十分にすることと実験操作の量を少なくすることで解決できると思われる。今後は，さらに充実した実験内容にするため検討を重ね，多くの学生が興味を持ち，少し高いハードルを乗り越えていくような実験にしたい。本実験は，身近な食物としてのキノコを生物学的な視点でとらえ直し，グラフ作成を通して科学的素養の育成につながる実験プログラムであると考えられる。

5．謝辞

本実験の開発は，慶應義塾大学日吉キャンパス特色 GP「文系学生への実験を重視した自然科学教育」の事業：新しい実験テーマの開発の一環として行われました。本 GP 関係各位ならびに金子洋之教授をはじめとする生物学教室の先生方に，厚く御礼申し上げます。

また，慶應義塾大学日吉キャンパス特色 GP 生物発信担当の菊江佳世子特別研究教員には，本実験の写真撮影など数々の協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

6．参考文献

大野信子，仁平佳奈，小平了二（1995）マイタケ（Grifola frondosa (Fr.) S.F.Gray）子実体から溶出する加水分解酵素，和洋女子大学紀要，第35集（家政系編），11–19

小野裕剛，川崎陽久，萱嶋泰成（2008）リベラルアーツとしての統合的遺伝学・分子生物学教育：ショウジョウバエ分子遺伝学実験を中心にしたクラス運営の理念と実践検証，慶應義塾大学日吉紀要自然科学，43号，1–12

木元幸一，林あつみ，草間正夫，菅原龍幸，青柳康夫（1994）卵白の加熱凝固に対するマイタケ中のプロテアーゼの影響，日本栄養・食糧学会誌，47号，43–48

橋本洋一（1983）担子菌の蛋白分解酵素，蛋白質　核酸　酵素，28号，1220–1225

授業後の感想・改善・希望の一部抜粋

- 今回の菌の分解酵素の実験において，身近なキノコや卵を用いて茶碗蒸しを作ったことは，実験に興味が持ちやすく，とても楽しかったです。しかし一方で，実験全体としては時間がかかりすぎていたため，最終のガイダンスを簡単なものにして実験を進めつつ説明してゆく，又は検量線作成のためのサンプルを先に作成しておき，実験中にサンプルを作る必要をなくしておく等の時間短縮の工夫をしておいていただければなお良いと思いました。
- 実験を終えるのに時間がかかりすぎると思いました。時間節約のため，茶碗蒸しの実験を無くすこと，実験の対象であるキノコの数を３→２に減らし，各班で分担して行う方がよいと感じました。
- 染色液の表とマイクロチューブの溶液の表は，同じ面にのせた方が実験しやすかった。いちいち裏表をめくって確認するのが面倒だった。
- 茶碗蒸しの作成は負担が多く，すごい時間がかかってしまう。実験自体も，時間内に終わらないことを前提としていたのは厳しい。ただ内容自体はわかりやすく身近なもので，実験時間を改善すれば良いと思う。後，プラスチックのチーブュがかなり無駄に使われていると思った。具体的に，時間改善はガイダンスの短縮やあらかじめ検量線をつくるなどである。
- 一年通じて一番難しい実験でした。全く理解できなかった。
- 16ウェルストリップへの混合液の投入について，もっと作業上の説明があった方がよかったです。ミスもおこりやすそうでした。グラフに使う数値が多すぎて作業がつらいです。
- 茶碗蒸しの固まり具合に比較が，客観的なものではなく，主観的なものになってしまった。また，今回は先生方の人数がとても多く，いろいろサポートして頂いたが，先生方の助言なしでは難しい実験と感じた。そして，実験結果としては，誤差があり期待通りにはならなかった。感想としては，日常生活に密着したものであり，非常に興味深かった。
- 作業する時に台ふきなようなものが欲しい。時間内にレポートに終了が困難。入れ間違えしそうになった。最初の講義（実験の説明）を授業中にすれば，短縮できるのでは？結果が分かりやすく，実験がやりやすかったです。
- ウェルストリップに大量に入れるので，こぼしそうになったり，どこに入れるかわからなくなることがあった。最初からウェルストリップを入れる容器を用意しおけばミスを減らせると思う。茶碗蒸しが食べたかった。せっかく作ったのだから。
- グラフの書き方を詳しく教えてほしかった。
- 茶碗蒸しでキノコの種類によって出来上がり方に違いがあるというのを実際に目で見て酵素の分解量が分かるのはよいと思う。グラフの書き方をもう少し事前に説明してくれたら良かったと思いました。
- グラフの書き方をいまいち理解できませんでした。
- しいたけが入った茶碗蒸ししか食べたことがなかったので，キノコが変わることによって，かたまるかたまらないが決まることを知りませんでした。どのような具を入れても固まるものだと思っていました。いつもの実験とは違って，とても身近な小さい頃から食べてきたものを使っての実験だったので，とても興味深く，面白かったです。
- ウェルの位置と内容が書かれている表と基質液と酵素液を混合するマイクロチューブの図が表と裏に分かれてしまっていたのが少し見にくかったです。ただ最後の茶碗蒸しが固まっているかの確認で，酵素活性が明確に茶碗蒸しの完成具合に影響を与えることがわかったのは良かった。

学生配布プリント

キノコに含まれるタンパク質分解酵素活性を調べる

菌類は一般的に死体（枯れ木、落ち葉を含む）や排泄物を分解して生活のエネルギーを得る「分解者」である。このため、菌糸には様々な有機物を分解する酵素が含まれるが、その一部が子実体であるキノコ（食用部分）に含まれる場合もある。

今回の実験では数種類のキノコ子実体を用いて、タンパク質分解活性の強弱を比較する。また、その酵素活性の差が、茶碗蒸しを作るときにどのように影響するか実験的に確かめる。

タンパク質の定量方法には Bradford 法を用いる。この方法はタンパク質が Coomassie Brilliant Blue G-250 と結合することにより、吸光波長が 465nm から 596nm に変化する性質を利用している。分子量が 5 kDa 以上のタンパク質を測定できる。3 kDa 以下のペプチド、アミノ酸は反応しない。今回実験に使う BSA は、65 kDa なので、分解されなければ検出できる大きさである。

実験は以下の３つのパートからなる。時間を考えて効率よく進めること。

1. キノコ入り茶碗蒸しの模擬作成
2. 染色液と既知の濃度のタンパク質を使った検量線の作成
3. キノコ酵素液によるタンパク質の分解と定量

材料

シイタケ(*Lentinula edodes*)　マイタケ（*Grifola frondosa*）　本日のキノコ（キノコ X）

消耗器具（使い捨て）

マイクロチューブ　16 ウェルストリップ　イエローチップ　ブルーチップ

グラフ用紙（一人一枚・提出）

器具（テーブルごとに配布・使用後は元通りに）

試験管　マイクロピペッター（P20,P1000）　50℃恒温水槽　シャーレ　さじ

計測機械（全体で２台）

マイクロプレートリーダー　約 85℃の水浴

試薬

PBS（リン酸緩衝液, pH7.0）：反応液の pH を調製するために用いる

BSA（ウシ血清アルブミン, 1440 μg/ml）：分解される基質として用いる。

タンパク質定量用染色液：タンパク質量に会わせて発色濃度が変化する。

卵液：茶碗蒸しを作成するとどうなるかためす。

粗酵素液：今回の実験では、抽出に十分な時間がとれないので、教員が用意した粗酵素液を用いる。調製方法は以下の通りである。

1. それぞれの子実体 100g を細かく刻み、2 倍量（200 ml）の PBS を加え、室温で 1 時間ほど置く。
2. ろ紙をひいたロートを使って子実体断片と抽出液を分離する。抽出液をフィルターつき注射器で濾過滅菌する。一晩 37℃に静置して、内在の余分なタンパク質を分解させたものを粗酵素液とする。

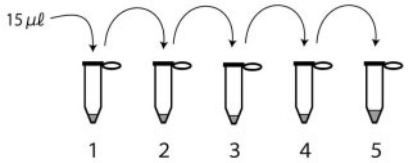
実際の実験手順

I. 茶碗蒸し実験の準備（４人一組で行う）

試験管 4 本それぞれに卵液 5 ml をとり、一本に一種類のキノコ断片を入れ（一本は卵液のみ）、他の実験が終了するまで放置して、酵素反応を行わせる。キノコ投入時間を記録しておくこと。

II. 検量線作成のためのサンプル調整（２人一組で行う）

マイクロチューブ 5 本（番号 1～5）に PBS を 15μl ずつ入れる。BSA 15μl を番号 1 のマイクロチューブ液内に加え、ゆっくり出し入れしてから、15μl を取り、次の番号 2 のマイクロチューブに加える。同様のことを繰り返し、2 倍希釈系列を 45 μg/ml まで作成する。発色と計測は分解実験と同時に行うので、その時まで保持しておくこと。



基準液の作成：順に二倍ずつに薄めていく

III. タンパク質分解酵素活性の測定（２人一組で行う）

1. 16 ウェルストリップを 2 人で 2 コ用意し、切り欠けがある側のタブを上にして、左から 1,2,3,4, と番号を振る。

下タブには顕微鏡番号を記入しておくこと。

各ウェルは上から下へ A から H の順になる。各ウェルには以下のものが入る予定である。

（いうまでもないことだが、第 2 列と第 3 列は“離れて”いる）

1A シイタケ直後	2A マイタケ直後	3A キノコ X 直後	4A 基準希釈 720 μg/ml
1B シイタケ 5 分後	2B マイタケ 5 分後	3B キノコ X 5 分後	4B 基準希釈 360 μg/ml
1C シイタケ 10 分後	2C マイタケ 10 分後	3C キノコ X 10 分後	4C 基準希釈 180 μg/ml
1D シイタケ 15 分後	2D マイタケ 15 分後	3D キノコ X 15 分後	4D 基準希釈 90 μg/ml
1E シイタケ 20 分後	2E マイタケ 20 分後	3E キノコ X 20 分後	4E 基準希釈 45 μg/ml
1F シイタケ 30 分後	2F マイタケ 30 分後	3F キノコ X 30 分後	4F PBS のみ 0.0 μg/ml
1G シイタケ基質無し 直後	2G マイタケ基質無し 直後	3G キノコ X 基質無し 直後	4G 酵素無し直後
1H シイタケ基質無し 30 分後	2H マイタケ基質無し 30 分後	3H キノコ X 基質無し 30 分後	4H 酵素無し 30 分後

2. 全てのウェルに、染色液 200μl を加えておく。

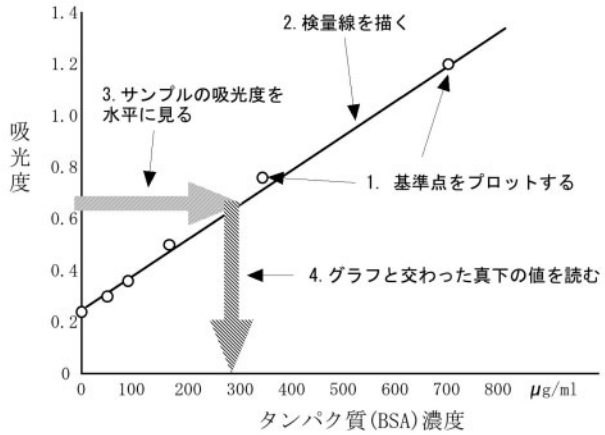
3. マイクロチューブを７本用意して以下の記号をつける。**溶液を混合する前に下の説明を読むこと。**

記号	説明	基質液	酵素液
ア	シイタケ	BSA 300 µl	シイタケ 300 µl
イ	シイタケ基質無し	PBS 300 µl	シイタケ 300 µl
ウ	マイタケ	BSA 300 µl	マイタケ 300 µl
エ	マイタケ基質無し	PBS 300 µl	マイタケ 300 µl
オ	キノコ X	BSA 300 µl	キノコ X 300 µl
カ	キノコ X 基質無し	PBS 300 µl	キノコ X 300 µl
キ	酵素無し	BSA 300 µl	PBS 300 µl

4. 記号アのマイクロチューブから順に基質液→酵素液の順に添加しよく攪拌する。すぐ、10 µl を「直後」のウェルに移したら、50℃の水浴に投入して時間を記録する。その後、記号イのチューブへ移り、順に記号キまでの実験をスタートする。なお、キノコのタンパク質分解酵素は 50℃近辺で活性が高まることが分かっている。このことは知られている事実として引用して良い。
5. 記号ア・ウ・オのチューブについては指示された時間が経過するごとに 10 µl を指定のウェルに移し、発色させる。
6. 記号イ・エ・カ・キについては 30 分経過後に 10 µl を指定されたウェルに移して発色させる。
7. II. 検量線作成のためのサンプル調整で作っておいた希釈液および PBS を指定のウェルに 10 µl ずつ添加して発色させる。
8. ２ペア（４名）分の実験が終了して５分経過したら、16 ウェルストリップをフレームにセットして計測を行う。実行にあたってはスタッフの指示に従うこと。

IV. 茶碗蒸しの作成（４人一組で行う）
　I. で作成したキノコ入り卵液を 10 分間 85℃水浴して、固まり具合を比較せよ。キノコを入れてから何分経過したかを明記すること。

結果のまとめ方
1. 検量線グラフを作成する
　横軸にタンパク質(BSA)濃度、縦軸に吸光度（マイクロプレートリーダーから得られた数値）をとり、「PBS のみ」と「基準希釈」の６点をプロットせよ。うまくいっていれば、ほぼ直線に乗るような基準線が得られるはずである。
2. 検量線グラフからタンパク質濃度を求める
　各実験の吸光度を水平にたどり、検量グラフと交わったところの真下の濃度を読み取る。
3. シイタケ、マイタケ、キノコ X について、横軸に反応時間、縦軸にタンパク質濃度を取ってプロットせよ。



検量線グラフの作成と読み方（実際の数値とは異なる）

レポートは以下の項目を含めて作成すること。

【目的】菌類の生態学的地位をのべ、分解酵素を多く持つことを示す。それが茶碗蒸し作成の障害になるかもしれないことを述べよ。

【方法】粗酵素液の抽出は既に教員が行っている。これを引用しながら、簡潔にまとめよ。

【結果】計測機器からのデータを読み取ってグラフを作成せよ。検量線グラフと反応時間と分解量の相関グラフの２つを描くこと。グラフ用紙を使って、結果の図として提出のこと。計測機器からのデータ（プリントしたもの）を「しかるべき場所」に添付せよ。

【考察】分解データと茶碗蒸し実験を比較し、どのキノコが茶碗蒸し作成に向いているか判定せよ。また、むいていないキノコを茶碗蒸しに入れたいときにはどうすべきか述べよ。