

マイタケに含まれるタンパク質分解酵素についての研究 ～視覚的变化による分解速度の数値化～

武生高校 探究理科

abstract

In our study, we focused on a component unique to Maitake mushrooms: proteolytic enzymes. This material breaks down proteins. So we got interested in this behavior and tried numerical conversion of the materials' behavior by observing the change in appearance. As a method of quantification, the phenomenon that the white turbidity (casein micelle) of skim milk powder is decomposed by protease and becomes transparent is quantified by the change of turbidity using the smartphone application "Color Analyzer".

はじめに

マイタケは普段から私たちの食卓に並ぶ身近に感じられる食品の一つである。この身近さゆえに「マイタケダイエット」や「マイタケを茶碗蒸しに入れると固まらない」といったマイタケにまつわる話が日ごろから散見される。そこで今回私たちはマイタケに含まれるタンパク質分解酵素であるプロテアーゼに着目することにした。

目的

私達はこのタンパク質分解酵素に着目し、マイタケを用いて酵素がタンパク質を分解する反応の速度を数値化し、反応の過程をより鮮明かつ正確に読み取れるのではないかと考えた。

事前実験 実験方法

まず初めに実際にマイタケに含まれるタンパク質分解酵素プロテアーゼの効果を見るために事前の簡易実験として以下の実験を行った。以下の実験を実験①とする。

実験①

この実験ではまずタンパク質を分解する反応の様子や時間経過による変化を調べるためにゼラチンを用いて実験を行った。ゼラチンの特徴として「コラーゲンを長時間熱水処理した際に得られる水溶性たんぱく質の総称で、多くの場合は2本または3本のペプチド結合したものが一部に生じる」という特徴がある。そのためペプチド結合の加水分解を触媒とする酵素であるプロテアーゼとの反応を見ることでマイタケのタンパク質分解酵素の分解を観察できる。

実験対象

- ①ゼラチンのみのもの
 - ②ゼラチンの上にマイタケの個体をのせたもの
 - ③ゼラチンの中に初めからマイタケの個体を入れたもの
 - ④ゼラチンにマイタケの汁を入れたもの
- の4つの試験管を用意して分解過程を調べた。

実験結果 ①と②③④との比較

実験開始直後は、①と④との違いが明らかにみられ、①に対して④は液化していて分解反応が進行していることが伺えた。②③に関しては直後は変化がなかったが、1週間程時間をあけ再び観察をすると固体であったゼラチンは分解され、こちらにも反応が伺えた。以下の表が結果である。

実験①における結果

	①	②	③	④
実験直後	反応なし	反応なし	反応なし	分解反応が見られた
1週間後	反応なし	分解反応がみられた	分解反応が見られた	分解反応がみられた

考察と次の実験へ

実験によりマイタケのタンパク質分解反応が起こることが示された。ここでマイタケを固体として扱うと時間を多く要することがわかった。反応速度を見る上で、このことは実験の記録をとるうえで不都合であるため、汁、すなわち液体にしたものを今後の実験で利用する方が適していると考えられる。

実験② 反応速度の可視化について

丸山虎徹氏、富岡寛顕氏の「プロテアーゼの作用を短時間で視覚的に示す実験法の開発」の論文を参考に実験を行うことにした。この実験では脱脂粉乳を用いてタンパク質分解反応を観察する。この反応では、脱脂粉乳はカゼインミセルによってのみ白色を呈しており、プロテアーゼ処理によってカゼインが分解されるとミセル形成能が低下し、脱脂粉乳溶液が透明化するため、これを用いて反応の進行を判断する。

実験方法②

脱脂粉乳水溶液にそれぞれ消化酵素剤水溶液、マイタケ水溶液(黒、白)を加える。その後、それぞれの反応を観察した。

実験② 写真

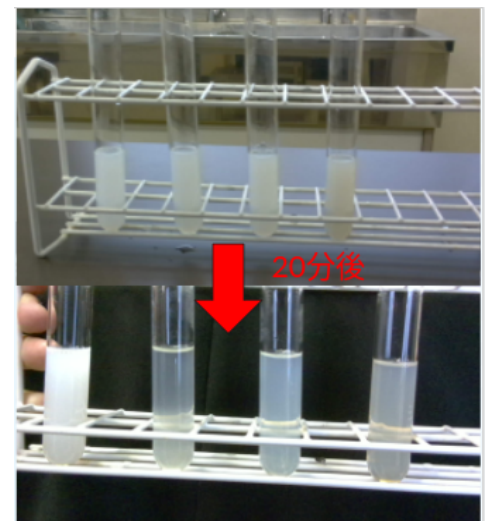
右の写真(実験② 写真)で左から順に

- ①何も加えなかったもの
 - ②消化酵素剤を加えたもの
 - ③マイタケ(白)を加えたもの
 - ④マイタケ(黒)を加えたもの
- とする

実験結果②

マイタケ水溶液、消化酵素剤水溶液のどちらも20分程度で透明度が高くなり、タンパク質の分解反応が起こることがわかった。

「実験② 写真」が実験の様子である。



実験③ 分解反応の速度測定

この実験では、プロテアーゼによる脱脂粉乳の濁度の変化を利用する。そこで実験③では脱脂粉乳にマイタケ水溶液と消化酵素剤をそれぞれ入れて反応を調べた。消化酵素剤を利用した理由については、生物は個体差が激しいので基準値を設けるために利用した。濁度の変化を数値化するにあたり、スマートフォン向けアプリである「Color analyzer」を使用して、溶液の色をカラーコード化し、その数値を追いながら、分解速度を測定していく。

※カラーコード:光の三原色である、赤、青、緑をそれぞれ0からFの16進数で表した数値

実験装置について

実験を行うにあたって、右のような実験装置を作成した。光源とカメラの間に実験対象物を挟むことで、実験対象物が白濁である時は光を通しづらくなるのに対し、透明化するにつれて光を通しやすくなるという仕組みになっている。右図は実験装置を図としたものである。

装置について (参考図)



使用した溶液

溶液名	材料
マイタケ水溶液	蒸留水50mLにマイタケ粉末1.0g
消化酵素剤水溶液	蒸留水20mLにタカチア錠 4錠
脱脂粉乳	蒸留水100mLに脱脂粉乳0.5g

実験結果と考察

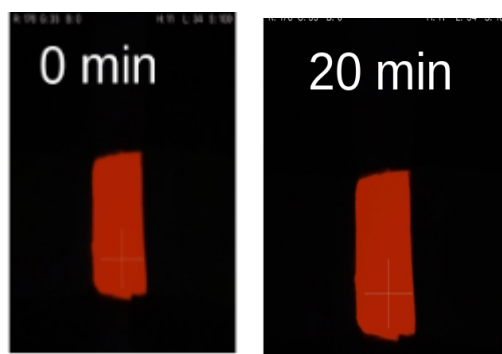
実験の前後で、カラーコードの数値は変化しなかった。原因を考えると、次の2つのことが挙げられる。

- ①使用した脱脂粉乳の濃度が低かったために、最初の段階から光を十分に通してしまい、色の変化を見れなかったこと。
- ②光源の明るさが強すぎたために、白濁時にも十分に光を通してしまったこと。

下の左の表は、時間変化におけるカラーコードの変化の数値化したもの、右の写真ではカメラが捉えていた実際の実験対象物である。

実験③結果 (表と写真)

	0min	20 min later
Red	176	176
Green	35	35
Blue	0	0

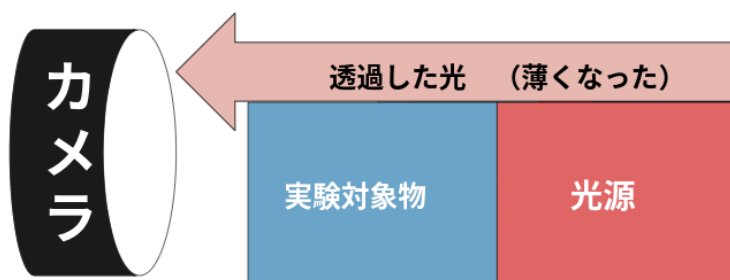


実験④ (実験③の改良版)

前実験の変更と考察

実験④では以下の2つの点を改善した。1つ目は脱脂粉乳溶液の濃度を濃くすることである。実験③では白濁状態の時とミセルが分解されて透明になっているときとで、光の透過の違いを見出すことができなかった。そこ

実験 4



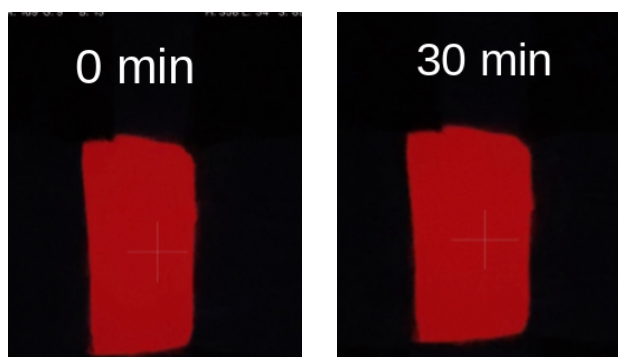
で初期濃度を濃くすることで、反応前の光の透過を抑えることができるのではないかと考えた。2つ目は光源の強さを弱くすることである。理由は1つ目と同様に反応前後で光の透過の仕方に変化を持たせるためである。実験装置の概略図は右図に示してある。これによって実験④では反応前後で透過する光の違いを識別できるようになるのではないかと考えた。

結果

下図が実験における数値変化を示した。実験④でも各色における数値の変化がほとんどなかった。

実験④結果（表と写真）

	0min	30 min later
Red	169	171
Green	9	15
Blue	13	18



結果からの考察

実験④から2つの考察を考えた。1つ目は、はじめの脱脂粉乳濃度が高すぎたため、分解に時間がかかりすぎたことだ。そのため、30分の観察時間内に変化を読み取ることができなかった。2つ目は、赤色の光を使って測定したことが実験に適していないということだ。赤は波長が長く白濁した溶液も透過しやすく、それゆえ白濁時と透明時とで視覚的变化を見出すことができなくなる。

簡易実験（2つ目の考察より）

溶液の後ろから光をあて、透明時と白濁時とでの光の通過のしやすさを比較する。このとき使用する光の色は白色を用いる。理由としては、白色は可視光線を含む波長がまんべんなく含まれているためである。また溶液に関して、透明時は水、白濁時は牛乳を用いて実験を行った。水を通させたものは白色の光をそのまま通しているのに対して、白濁（牛乳）を通したものは、波長の短い光が分散して、波長が長い赤系の色だけが通過していることがわかる。下に示した写真は簡易実験における変化を示している。

簡易実験（参考写真）



水を通したら



白濁を通したら



今後の展望

今回の実験では、実際に数値化することはできなかった。しかし実験を通して視覚的変化を数値化する過程における条件を絞り出すことができた。今後の展望としては、今回絞り出した条件を実際に実験装置に反映させて数値化を行うことである。また実験の試行時間に関しては、今回は限られた時間内のみでの観察となったため、時間的制約も数値化において支障となったが、今後実験方法の改善を重ねることで、実験の試行時間も拡大することができるだろう。

参考文献

「プロテアーゼの作用を短時間で視覚的に示す実験法の開発」 丸山虎徹氏、富岡寛顕氏

「化学辞典（第2版）」 森北出版