

大学の化学実験における生命科学分野導入の試み —電気泳動による卵白タンパク質の分離と 生体関連化合物の定性反応—

船山 智代*・松岡 多恵子**

An Attempt to Introduce Life Sciences in College Chemistry Experiments: Separation of Egg White Proteins Using Electrophoresis, and Qualitative Reactions of Organism-Related Substances.

Tomoyo FUNAYAMA, Taeko MATSUOKA

要旨 生体を構成する物質であり、生命活動を支える中心的役割を担うタンパク質に着目した実験プログラムを作成し、文教大学教育学部学校教育課程の理科専修の選択必修科目（化学実験Ⅲ）の授業内容に導入し、実施した。本稿では、本プログラムにおいて行う実験の条件の検討、プログラムの構成、授業を実施した結果と今後の課題について報告する。プログラムは、「分子の視点から物質を捉えその性質を理解する力」と「生命現象を理解する科学的知識基盤」の育成をねらいとしている。実験は、鶏卵から取り出した卵白タンパク質を、電気泳動を用いて分離して構成分子の帰属を行う内容と、生体関連化合物（タンパク質、アミノ酸、糖類）の定性分析を行う内容の2テーマで構成した。授業において学生らは、卵白タンパク質に興味を持って実験に取り組み、卵白タンパク質の主要な構成分子の分離と帰属を行うことは出来たが、沈殿形成、呈色などの化学現象の原因について、分子の性質に基づき、化学的かつ論理的に説明することは出来ておらず、不足があった。学生が持つ物質への興味を、物質の持つ本質の興味へと深め、本質の理解に結び付けることが、化学教育の質の向上には必須であり、科学的知識基盤の育成と共に今後の重点課題であると考えられた。

キーワード：卵白タンパク質 電気泳動 生体関連化合物 生命科学 化学実験

1. はじめに

化学は、自然科学分野に位置し、現在、「物理化学・理論化学」、「無機化学・分析化学」、「有機化学」、「生物化学」などの基幹分野と、その応用分野である「環境科学」、「ナノテクノロジー」、「機能材料科学」、「生命科学」などから構成されている学問である¹⁾。近年これらの基幹分野がさらに細分化し、より専門的に発展するだけにな

く、学問分野を横断し、他分野の科学と融合し生まれた「学際」、「境界」と呼ばれる領域の科学の発展が目覚ましい。化学は一言で言い表すと、「物質の科学」であると言え、「物質」を対象とする特性を生かし、従来の体系での分野のみならず、学際・境界と呼ばれる新領域の分野においても活躍し、それらの発展に寄与している。

文教大学教育学部学校教育課程の理科専修の専門教育科目における化学の授業は「物理化学」、「無機化学」、「分析化学」、「有機化学」分野の内容を含んでいるが、「生物化学」の内容を系統立てて扱った科目は開設していない。これは、開設出来る理科の専門科目の時間数に限りがある為、

*ふなやま ともよ 文教大学教育学部学校教育課程理科専修

**まつおか たえこ 文教大学教育学部学校教育課程理科専修
化学研究室

必然的に化学の開設コマ数にも制限が有り、その為、量子化学や熱力学といった化学の基礎の内容を優先して行わざるを得ない為である。今後も基礎が重要である事に変わりはない為、授業の内容構成に大きな変更は無いと思われる。それであっても、化学の一領域を形成する生物化学が生命科学として大きく発展して来たこと、化学の生命科学分野における役割についてなど、理科の教員免許を取得し、将来、初等中等教育に携わる教員となる学生らには自然科学について幅広く知って貰いたいと考えた。そこで、「生物化学」の応用分野であり、学際領域にも関連する「生命科学」分野の内容を、理科の専門教育科目の化学実験の授業に導入することにした。化学実験は、必修科目である「化学実験Ⅰ・Ⅱ」と選択必修科目である「化学実験Ⅲ」の2科目ある。ともに3年次に開設され、化学実験Ⅰ・Ⅱは半期で合わせて2単位あり、化学実験Ⅲは秋学期の隔週で1単位の授業である。化学実験Ⅰ・Ⅱは、基幹分野の「無機化学」、「分析化学」、「有機化学」で構成され、「化学実験Ⅲ」は、基幹分野の「物理化学」と応用科学分野の「環境科学」から構成されている。新しい実験プログラムは、応用科学として「化学実験Ⅲ」の中に組み入れた。

実験プログラムは、「生命を化学の言葉で語り理解しよう。」をキャッチフレーズに、生体を構成し、生命活動を支える中心的存在であるタンパク質に着目し、「分子の視点から物質を捉えその性質を理解する力」と「生命現象を理解する科学的知識基盤」の育成をねらいとしている。実験に用いる物質（試料）は、学生らの身近にあり、品質が安定していること等、満たすべき条件を挙げて検討した結果、鶏卵を用いることにした。そこで実験は、鶏卵から取り出した卵白タンパク質を、電気泳動を用いて分離して構成分子の帰属を行う内容と、生体関連化合物（タンパク質、アミノ酸、糖類）を呈色反応の違いで分析する内容の2テーマで構成した。本プログラムは実験から、「卵白（物質）が、等電点や分子量の異なる複数

の卵白タンパク質分子から成り立っていること」と、「タンパク質、アミノ酸、糖類の構造に含まれる官能基の反応性の違いの比較から、タンパク質分子の特徴を明らかにすること」を目的としている。

本プログラムが「分子」に着目した理由は、化学現象の本質を捉える際に、分子が重要な役割を果たす為である。物性や自然現象の本質を理解するにはまず、その性質や現象を定性的に捉えることが必要であり、それには現象をよく反映している「指標」を見出すことが有用である。化学分野において頻繁に用いられる指標が「分子」である。例えば物理化学分野では、ある化学現象を説明する際に、実験結果を理論（モデル）に基づき解析し、実験結果を最もよく説明出来た理論がその現象の本質を最も良く説明していると考え、物質を構成する分子は、それ自身が研究対象と成り得るが、この様に、物質が関わる自然現象を理解する際にも非常に役立つ。その為、「分子」を理解することは、物質が関わる他の分野や領域についての理解や取り組みを可能とし、分子の視点を持ち対象を捉え理解することで、科学の知識基盤が広がることを学生らに知って貰いたいと考え、分子の視点の育成に重点をおいてプログラムを作成した。

2. 実験プログラム「電気泳動による卵白タンパク質の分離と生体関連化合物の定性反応」の作成

プログラムの概要とねらい

本プログラムはタイトルを「電気泳動による卵白タンパク質の分離と生体関連化合物の定性反応」とし、2テーマの構成とした。「分子の視点から物質を捉えその性質を理解する力」と「生命現象を理解する科学的知識基盤」の育成をねらいとしている。1回2コマの授業で1テーマに取り組むことを目安に、2テーマを2週4コマの授業で行うよう構成した。各テーマのタイトルを次に

示した。

・テーマ1：電気泳動による卵白タンパク質の分離

・テーマ2：生体関連化合物の定性反応

テーマ1の実験では、電気泳動を用いて、卵白が等電点や分子量の異なる複数の卵白タンパク質分子から成り立っていること(表1)を調べ、テーマ2の実験では、構造中に含まれる官能基の反応性を呈色反応を用いて調べ、タンパク質の構造由来の性質をアミノ酸、糖類と比較し、タンパク質の持つ特徴を理解する内容とした。

実験は、1週目に卵白タンパク質の沈殿形成を行い、2週目は1週目で沈殿を形成させた卵白タンパク質を電気泳動を用いて分離している間に、生体関連化合物の未知検液の定性分析に取り組むことにした。実験の形態は、テーマ1、2ともに個人実験として行った。

プログラムの内容と化学の授業内容との関連

本学理科専修の学生は、生命化学分野に関し、系統的な講義を受けていない為、テーマ1の内容に関する化学的知識はほとんどないと言える。その為、テーマ1は鶏卵から卵白タンパク質を実験で取り出すことを中心にした体験型の内容とした。テーマ1において定量に関連する部分は、卵白タンパク質溶液の濃度の決定である。テーマ2は、化学実験I・IIの内容に関連している。無機化学実験で「ビウレット反応」と「フェーリング反応」を取り上げているので²⁾、学生らはタンパク質や糖類の反応性に関して事前に学習している。また、反応に関連し、牛乳、カゼイン(牛乳の約80%を占める主要成分)、グラニュー糖、100%果汁のリンゴジュースといった生体関連化合物、天然物化合物の試料の取り扱いの経験もある。牛乳とカゼインの関係は、本実験の卵白とアルブミン(卵由来)の関連と類似している。リンゴジュース、グラニュー糖の主成分はスクロースである。学生らは、アミノ酸を実験で取り扱うのは今回が初めてであるが、タンパク質の構成要素

がアミノ酸であることは学んでいる為、知識が活用出来れば問題はないと考えられた。

表1 卵白タンパク質の種類と性質
(タンパク質の事典³⁾より部分抜粋して引用した。)

	組成 (%)	等電点	分子量	糖含量 (%)
オボアルブミン	54	4.6	43800	3
オボトランスフェリン	12	6.05	76600	2
オボムコイド	11	4.1	28000	25
オボムチン	3.5	4.5-5.0	210000 (α -) 720000 (β -)	15 (α -) 50 (β -)
リゾチーム	3.4	10.7	14300	0
オボインヒビター	1.5	5.1	49000	6
オボグリコプロテイン	1.0	3.9	24400	16
オボフラボプロテイン	0.8	4.0	320000	14
オボマクログロブリン	0.5	4.5	720000	9
アビジン	0.5	10	68300	8
シスタチン	0.05	5.1	12700	0
オボグロブリン G2	4.0	5.5	30000- 45000	
オボグロブリン G3	4.0	4.8	30000- 45000	

2-1 テーマ1「電気泳動による卵白タンパク質の分離」のプログラムの作成

2-1-1 実験条件の検討

1) 試料の選定

まず最初に、新規プログラムで取り上げる生体関連化合物を何にするか検討を行った。学生実験で用いることから、試料は次に示した条件を満たすものとした。①品質が安定しており、常時、容易に安価に多量に入手出来る身近な物質で、保存が容易であること。②目的分子、および試料ともに物性についての基本情報があること。③取り扱いに法的規制が無く、毒性が無いこと。④容易に分子が分離出来、収量が多いこと。⑤成分無調整の状態の試料が入手出来ること。⑥目的分子が水系の溶媒に溶け、その濃度を簡便な方法で測定出来ること。⑦試料(成分)を構成する分子が複数種類あり、その性質や分子量が多様であること。以上、7項目である。候補試料(目的成分)とし

て、牛乳（タンパク質）、鶏卵（タンパク質）、デンプン（糖）、鶏レバー（核酸）を選択し、成分を分離する予備実験を行い7項目について検討した結果、牛乳は項目④と⑤、デンプンは項目④、鶏レバーは項目⑦に試料として用いる難しさがあつた。検討の結果、①～⑦全ての条件を満たしたのは鶏卵だった。中でも鶏卵の白身は、項目④、⑦の条件を満たし優れている。試料の卵白溶液（図1左）に、飽和硫酸アンモニウム（硫安）溶液を加えると、容易に卵白タンパク質を沈殿させることが出来た（図1右）。



図1 硫安溶液の添加前後での卵白溶液の変化
左：卵白溶液（溶液中の白い物体は撈拌子）
右：硫安溶液添加後、卵白タンパク質の白色沈殿が生じた卵白溶液

また卵白は、等電点や分子量の異なる複数の卵白タンパク質から構成されている為（表1）³⁾、実験条件にバリエーションを持たせることが出来るので、自由度が高い教材になると判断した。これらの検討の結果、卵白を本実験プログラムの試料に用いることにした。他の化学の実験書でも生体物質の分離・分析の実験に卵白を用いているテキストがあるが、本実験とは沈殿形成の条件が異なつた⁴⁾。

2) 卵白溶液の作成

鶏卵の構造は、大別すると卵黄部、卵白部、卵殻部から成っている。卵白部は、外水様卵白、濃厚卵白、内水様卵白、カラザ状卵白層、カラザからなる⁵⁾。外水様卵白、濃厚卵白、内水様卵白の構成比は、約1：2：1である。水様卵白と濃厚卵白の形状の違いは、構成タンパク質であるオボムチンの違いによる。水様卵白は、可溶型のオボム

チンから、濃厚卵白は、可溶型と不溶型のオボムチンから構成されている⁶⁾。卵白部の成分の構成は、水分88.4%、タンパク質10.5%、灰分0.7%、炭水化物0.4%、その他は無機物、ビタミン等から成り、脂質は微量である⁷⁾。本実験の目的分子はタンパク質である。卵白タンパク質の組成を表1に示した。

試料は、鶏卵から卵黄、卵殻部を除いて取り出した卵白部のうち、カラザのみ取り除き、その他の成分は全て一緒に実験に用いた。卵白は、氷浴上で、はさみを用いて泡立てないように20分程度、均一溶液になるように静かに刻んだ後、3枚重ねのガーゼで濾して卵白溶液を作成した。卵白は、泡立てるとタンパク質が変性してしまうので注意が必要である。

3) 卵白タンパク質の沈殿形成の方法

タンパク質を沈殿させる方法には、塩析、有機溶媒使用、酸性沈殿、等電点沈殿、水溶性ポリマーの利用などがあるが、本実験は、「酸性沈殿」と「塩析（硫安法）」を併用して卵白タンパク質の沈殿を形成させた。どちらの実験方法も簡便で、学生らが行うのに適した方法である（図2）。酸性沈殿は、タンパク質がタンパク質自身の等電点pIを持ち、その値と等しいpHにおいてほとんどのタンパク質の総電荷がゼロになり、溶解度が下がり、沈殿が生成することを利用して行う方法である。注意点は、酸性にすると失活したり変性したりするタンパク質があること、沈殿形成に時間を要することなどがあるが、本実験はタンパク質の機能解析を行うことを目的としておらず、また収量を問題としていないので今回用いた。また、タンパク質の水溶液中での溶解度は、塩濃度が低い時には増加するが（塩溶）、塩濃度が高くなると逆に低下すること（塩析）が知られている。一般に、大きいタンパク質ほど塩析しやすいとされ、この性質を利用してタンパク質溶液に、塩析剤として飽和硫酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液を加えて可溶性タンパク質を沈殿させてタンパク質を分画する方法を硫酸アンモニウム沈殿法（硫安

法) という^{8),9)}。硫酸アンモニウムは、タンパク質の変性を起こしにくいとされる事も、本法がよく用いられる理由と考えられた。これらの理由から、硫酸法を用いた。



図2 卵白タンパク質の沈殿形成に取り組んでいる様子

4) 卵白タンパク質の分画方法

卵白タンパク質は、その組成 (%) (表1) から、オボアルブミン、オボトランスフェリン、オボムコイド、オボムチン、リゾチームなどが比較的分画し易いタンパク質だと予想された。なお、オボアルブミンは、リン酸基の結合の有無により3種類³⁾存在するが、本実験でそれらを分離することは困難と判断し、まとめてオボアルブミンとして扱った。

今回、卵白タンパク質分画を得る際に、条件として検討の必要な因子は、「卵白の量 (タンパク質濃度)」、「pH」、「硫酸溶液の添加量」であった。学生らが授業時間内に確実に分画が行えるように、沈殿形成の際に、以下に示した一定の制限を設けることにし、同時に、その制限内で自由度を持たせることにした。今回、出発の卵白の溶液量 (25 mL) は固定とし、「pH」と「硫酸溶液の添加量」を変化させた。pHは、pH 8.8 (卵白)、および pH 6.1 (オボトランスフェリン)～pH 4.6 (オボアルブミン) の範囲内で変化させ、硫酸溶液の添加量は、溶液の添加に伴う沈殿形成の様子を観察しながら各自の判断で添加量を決め、沈殿を形成させることにした。分画は次の a)～c) の

方法を適宜組み合わせて行った。

a) 酸性沈殿による方法：

卵白溶液 (pH 8.8) に 0.10 M 硫酸 H_2SO_4 を添加して目的タンパク質の等電点 pI に pH をあわせ、生じた沈殿を遠心分離で上清と沈殿に分けた。

b) 酸性沈殿と硫酸法の組合せによる方法：

上記の a) の上清に飽和硫酸アンモニウム溶液を適量加え、可溶性タンパク質を沈殿させた。最終的には試料のタンパク質溶液と等量加えた。生じた沈殿は、遠心分離で上清を取り除き得た。

c) 硫酸法による方法：

卵白溶液 (pH 8.8) に飽和硫酸アンモニウム溶液を等量加え、生じた沈殿を遠心分離で上清を取り除き得た。

沈殿させた卵白タンパク質は、保存料として 0.1 % アジ化ナトリウム NaN_3 を含んだ超純水に溶解させた。(図3)

5) 卵白タンパク質溶液の濃度測定

卵白タンパク質溶液の濃度測定は、タンパク質を分離する為に電気泳動を行う際、用いるゲルの1ウェルに対してアプライ出来る溶液量と分離可能なタンパク質の量が決まっている為、行う必要があった。タンパク質の定量法には、代表的なものとして、UV法、Biuret法、Lowry法、Bradford法などがあるが、本実験は、色素結合法であるBradford法を用いて卵白タンパク質溶液の濃度を概算した。これは、紫外可視分光光度計 (Shimadzu UV-3100PC) を用い、Coomassie Brilliant Blue (CCB) G-250 色素が、タンパク質の塩基性および芳香族アミノ酸の側鎖と結合することでその吸収極大波長が 480 nm 付近 (図4の1, 図5の1) から 595 nm 付近 (図4の6, 図5の6) にレッドシフトすることを利用した測定方法である⁹⁾。安定した発色を示すBradford試薬の調整が必要で、井熊らの報告¹⁰⁾にあった方法で調整した試薬 (reagent 10) が非常に安定していたので、これを用い、文献に従ってタンパク質溶液

(0 - 9 μg protein)を0.8 mL, reagent 10 を0.2 mL の割合で混合し, 595 nm の吸光度の測定を行い検量線を作成した. 標準試料には, 濃度既知の牛血清アルブミンの標準溶液 (Thermo Fisher Scientific K. K. (Prod #23209)) を用いた. 作成した検量線の精度の検証の為, 鶏卵由来のアルブミン粉末 (和光純薬工業株式会社 (010-17071)) を用いて調整した溶液の濃度をこの検量線から求めたところ, 設定した濃度より3割程度低く算出される事がわかった (T. Funayama, personal observation). これは, 牛 (ACCESSION No.AAA 51411) と鶏 (ACCESSION No.NP_990592) のアルブミンではそのアミノ酸配列に違いがあるので, 両者の間には色素分子との結合に違いがあり, その為, 発色が異なると考えられた. よって, 牛血清アルブミンを用いて作成した検量線から求めた卵白タンパク質の濃度は, 補正して使用した (T. Funayama, personal observation).



図3 遠心分離後, タンパク質の沈殿を保存溶液中に移している様子. このサンプルを用いて濃度測定, 電気泳動を行った.

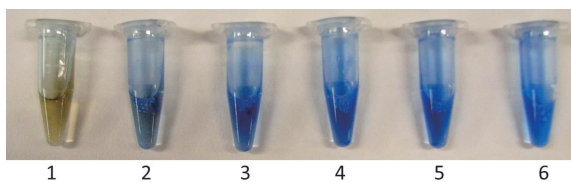


図4 CCB 試薬とタンパク質 (牛血清アルブミン) との結合の様子. 1 (タンパク質濃度0) から6へと順にタンパク質濃度が高くなる.

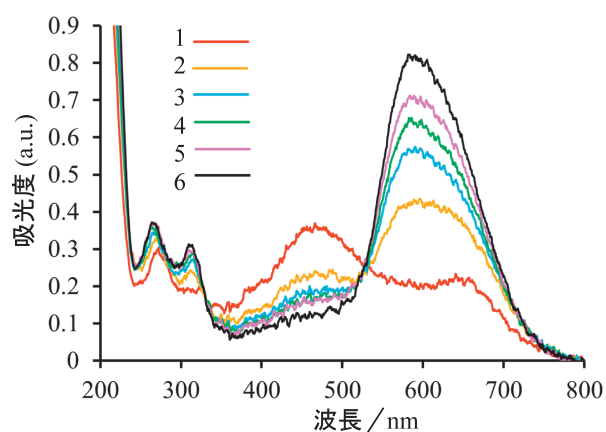


図5 図4 と同一溶液で測定した吸収スペクトル. スペクトル1 (タンパク質濃度0) から6へとタンパク質濃度が高くなる.

6) 電気泳動による卵白タンパク質分子の分離

電気泳動は, 電場内に置かれた荷電粒子 (タンパク質) が, 粒子の電荷により移動する現象を呼ぶ. 電気泳動は, 粒子に応じて「担体 (溶質),

「媒体 (溶媒) の種類と濃度」, また駆動力を制御するために「媒体の pH」などを選ぶ必要がある. タンパク質の電気泳動における移動度は, その分子量, 高次構造, 電荷の3つの因子に依存する. これらの条件を変えることで, 様々な電気泳動を行うことが出来る¹¹⁾.

本実験では, 卵白タンパク質はジチオトレイトール (DTT) で還元処理し S-S 結合を切断後, 分子量の違いにより分離した. 電気泳動は Life technologies 社製の XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System を用いて, ゲルは同社の NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel 1.0 mm × 10 well と 12 well (Cat No.NP0321BOX, Cat No. NP0322BOX), 泳動溶媒は, 2-メルホリノエタンソルホン酸 (MES) 緩衝液を用いて行った. 泳動条件は, Life technologies 社発行の XCell SureLock MiniCell Product Manual¹²⁾ に基づき設定した. (図6)

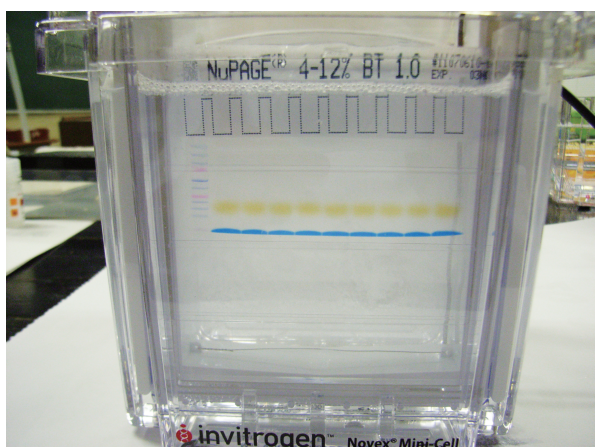


図6 卵白タンパク質溶液の電気泳動（泳動後、約20分）

2-1-2 テーマ1の構成

2-1-1で行った実験の検討結果を基に、本プログラムを構成した。本稿は、授業で配布した実験方法の詳細な記載は省略し、実験の流れ（方法）を手順で示し、結果と考察、および課題について示した。以下がテーマ1の実験プログラムの構成である。文中の検討番号は2-1-1に対応する。

〈実験の流れ（方法）〉

・1週目

- ① 鶏卵から卵白部を取り出した。（検討1, 2）
- ② 氷浴中で卵白部をはさみで切り混ぜ、3枚重ねのガーゼで濾して均一な卵白溶液（25 mL）を作成した。（検討2）
- ③ 0.10 M 硫酸と飽和硫酸アンモニウム溶液を用いて、検討4)のa)～c)の方法を適宜組み合わせ、各自4条件ずつ設定させ、卵白タンパク質沈殿A～Dを得た。沈殿A～Dは、遠心分離により上清と分けて取り出した。（検討3, 4）
- ④ 卵白タンパク質の沈殿は、0.1%（wt%）アジ化ナトリウム水溶液に溶解させた。（検討4）

・2週目

- ⑤ Bradford法を用いて作成した検量線から、卵白タンパク質溶液の濃度を概算し、求めた濃度を用いて、電気泳動に用いる溶液量を算出した。（検討5）

- ⑥ 卵白タンパク質は還元処理後、Bis-Trisゲルを用いて電気泳動を行い、分子の大きさ（分子量）により分離した。（検討6）
- ⑦ 分離したゲル上のタンパク質は、CCB試薬を用いて染色し、その後水洗し脱色し、ゲルの写真を撮影した。（図7：2013年1月実施の結果）

〈結果〉

ゲル上の卵白タンパク質分子のバンドの位置と、一緒に電気泳動した分子量マーカー（Bio Rad（プレジジョンPlusプロテイン2色スタンダード（161-0374））、標品とした卵白アルブミンの粗精製物（和光純薬工業株式会社（012-09885））、および卵白由来のリゾチーム（和光純薬工業株式会社（126-02671））のバンドの位置を比較して、各卵白タンパク質の分子量を決定した（図7参照）。

〈考察〉

- 1) 電気泳動後のゲルの写真（図7）の結果と表1を比較して、分離出来たタンパク質分子が何か考察し、帰属する。
- 2) A～Dの沈殿条件により、溶液内で分子にどのような変化が起きたと考えられるか説明する。
- 3) 電気泳動で用いるサンプルを、還元処理しないで泳動すると、どのような結果が得られるか推測し説明する。

〈課題〉

本実験で分離出来たタンパク質分子の化学的性質とその生物学的機能について調べ答える。

2-1-3 テーマ1の実施結果

授業時間の関係上、本プログラム実施の際には、授業のねらいにあわせ、学生が行う実験内容を取捨選択して行うことが必要であった。今回、学生らは、方法①～④（卵白タンパク質分子の沈殿形成）、方法⑤（検量線からタンパク質溶液の濃度の算出）、および方法⑥（電気泳動）に取り組んだ。検量線の作成とゲルの染色・脱色操作は時間を要するので、検量線の作成は、教員が当日

授業前に行い、ゲルの染色・脱色操作および、電気泳動後のゲルの写真の撮影も教員が行い、結果は後日学生らに配付した。

学生らの電気泳動の結果の一部を図7に示した。標品との位置関係から3成分を帰属出来た。それらの分子量はおよそ r1: 14 kDa (リゾチーム), r2: 44 kDa (オボアルブミン), r3: 77 kDa (オボトランスフェリン) であると考えられた。学生らはこれらの主要バンドの帰属は行っていた。その他, a, b: 50 kDa~70 kDa に2本, c: 200 kDa, d: 300 kDa 付近に1本ずつバンドが観察された。300 kDa 付近のバンドは、オボフラボプロテインでないかと推測しているが、その他のバンドは位置関係のみでは帰属出来ず、抗原抗体反応等での確認が必要であった。図8に、リゾチーム、オボアルブミン、オボトランスフェリンの3成分を主要成分(混合物有り)として得ることが出来る分画方法の例を、フローチャートにして示した。

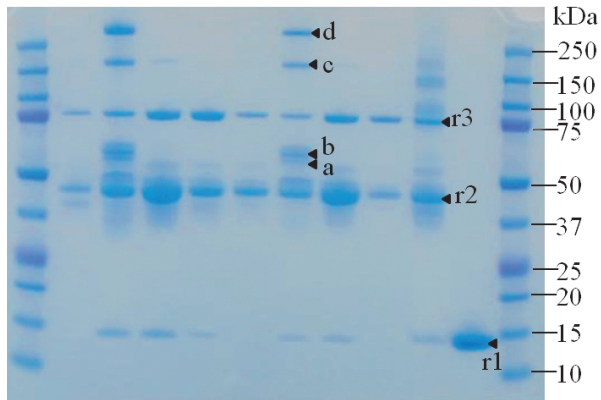


図7 学生らが沈殿形成させた卵白タンパク質を電気泳動した結果
 1,12. 分子量マーカー, 2~5. 左から沈殿 A,B,C,D (学生1), 6~9. 左から沈殿 A,B,C,D (学生2), 10. 卵白アルブミンの粗精製物(卵由来, 市販品), 11. リゾチーム(鶏卵由来, 市販品)

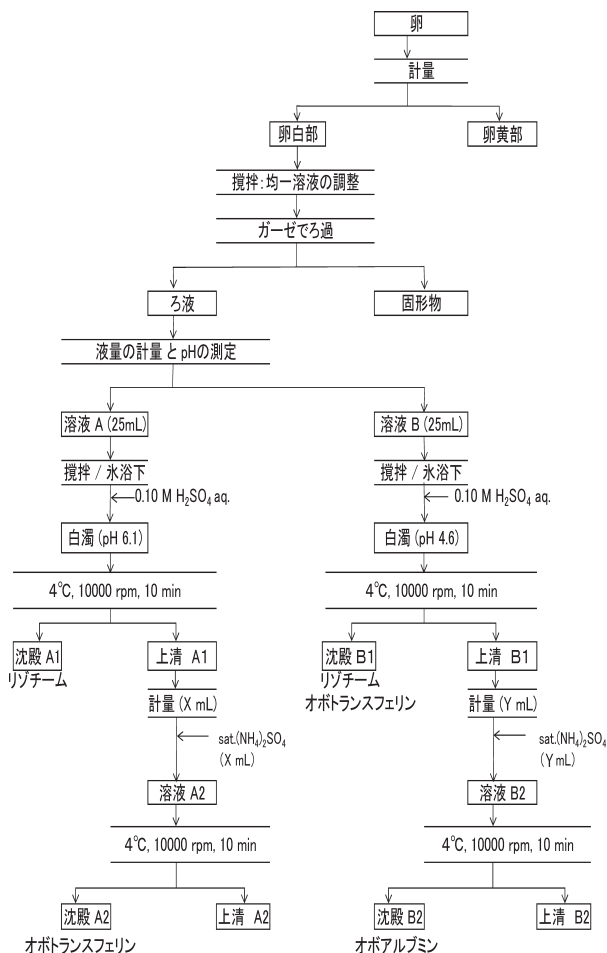


図8 卵白タンパク質(リゾチーム, オボアルブミン, オボトランスフェリン)の分画方法のフローチャート

2-2 テーマ2「生体関連化合物の定性反応」のプログラムの作成

2-2-1 実験条件の検討

1) 試料の選定

既報^{4),13)}を基に、呈色反応によりタンパク質、アミノ酸、糖類の性質の違いが明確に現れ、かつ水に溶解する試料を計6種類選択した。各溶液の様子は図9に示した。溶液の状態や色から、デンプン、ゼラチン、卵白アルブミン(オボアルブミン)溶液は大よそ判別出来た。以下に、用いた試料と試料溶液(検液)の濃度(wt%), および選択理由を示した。

①タンパク質

- ・オボアルブミン，卵由来（＜5％）：（和光純薬工業株式会社（012-09885））

卵白タンパク質の54％を占める分子量45000の糖たんぱく質，一般には慣例上，卵白アルブミンに分類されている．鶏の卵白は，乾燥重量で82.8％のタンパク質を含むが，ここで用いたオボアルブミンは64.9％含んでいるものである．その生理機能については未だ明らかになっていない³⁾．テーマ1との関連で選んだ．

- ・ゼラチン（精製粉末）（3％）：（ナカライテスク株式会社（16631-92））

動物性タンパク質であり，トリプトファン以外の全てのアミノ酸を含む．芳香族アミノ酸の含有率が低い．コラーゲンの α 鎖が3本集まり形成した螺旋構造が熱変性し，ほどけた構造を持ち，一度熱変性すると再生繊維を形成する能力はない¹⁴⁾．水に易溶．トリプトファンが無いことから選んだ．

②アミノ酸

- ・Lグルタミン酸1ナトリウム1水和物（1％）：（東京化成工業株式会社（G0188））
HOOCCH(NH₂)CH₂CH₂COO

アミノ酸系のうま味成分であり，昆布から抽出されている．水に易溶．身近な味覚物質であることから選んだ．

③糖類

- ・デンプン（0.4％）：（市販の片栗粉）(C₆H₁₀O₅)_n
- ・スクロース（1％）：（市販のグラニュー糖）
C₁₂H₂₂O₁₁
- ・グルコース（ブドウ糖，無水）（1％）：（国産化学株式会社）C₆H₁₂O₆

それぞれ多糖類，二単糖，単糖の代表的な分子であることから選んだ．デンプンは，アミロースとアミロペクチンの2種の成分から成り，その量的割合は原料により異なる¹⁵⁾．

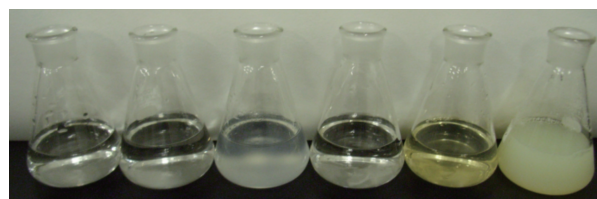


図9 未知検液：左から右に順にグルコース，スクロース，デンプン，Lグルタミン酸1ナトリウム1水和物，ゼラチン，卵白アルブミンの各溶液

2) 定性反応に用いた呈色反応

次に，既報^{4),13)}を基に選んだ呈色反応の要因について簡単にまとめた．6検液を用いて全9反応を試みたが，呈色反応はいずれも明確でわかりやすいものであった．タンパク質やアミノ酸の反応は，大部分が一次構造上の官能基の反応性を利用したものである．糖類の定性反応も，一次構造上の官能基の反応性を利用したものが多い⁴⁾．反応名に続く（ ）内には，反応に関わる官能基を持つ化合物，官能基を示した．

- ①ホプキンスコール反応，別名アダムキュービッツ反応：（トリプトファン）

グリオキシル酸 CHOCOOH・H₂O がトリプトファン側鎖のインドール環の2位の炭素と結合して濃い紫色を呈する反応．

- ②ビウレット反応：（ペプチドやタンパク質）

タンパク質中のペプチド結合やビウレットと言った2つ以上のアミド基（-CONH-）を含む化合物と，銅イオン Cu²⁺との反応による銅錯体の形成により赤紫～青紫色を呈する反応．

- ③キサントプロテイン反応：（芳香族アミノ酸）

チロシン，トリプトファンなどのベンゼン環を持つアミノ酸（芳香族アミノ酸）がニトロ化され，黄色を呈する反応．

- ④ニンヒドリン反応：（アミノ酸）

ニンヒドリンと α -アミノ酸の反応により生じた還元型ニンヒドリンが，ニンヒドリンとアンモニアをはさんで脱水縮合し，濃紫色（Ruhemann パープル）を呈する反応．

- ⑤リンモリブデン酸反応：(リン酸イオン)
リン酸イオンが酸性溶液中でモリブデン酸と反応して黄色のモリブデン酸錯体 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$ が生じる反応。
- ⑥フェーリング反応：(還元性を持つ官能基)
フェーリング液に、還元性を持つアルデヒド基 (-CHO) や還元性を持つ糖類を加えて熱することにより、銅 Cu^{2+} イオンが還元されて酸化銅 Cu_2O の赤色沈殿が生じる反応。
- ⑦硫化鉛反応：(含硫黄アミノ酸)
システインなどの含硫黄アミノ酸がアルカリ条件下で分解して硫黄 S^{2-} を遊離し、酢酸鉛中の鉛イオン Pb^{2+} との反応により、黒色(茶褐色)の硫化鉛 PbS 沈殿が生成する反応。
- ⑧坂口反応：(グアニジル基)
L-アルギニンのようなグアニジル基 (-NHC(=NH)NH₂) を有する化合物に特有な反応で黄色～朱色を示す呈色反応。
- ⑨ヨウ素でんぷん反応：(デンプン)
直鎖状の α -グルコースのらせん構造の中に、ヨウ素分 I_3^- が入り結合し、デンプンとヨウ素の複合体を形成することで紫色に呈色する反応。アミロースでは青色、アミロペクチンでは紫色を示す。主鎖の長さで呈色が異なる。

2-2-2 テーマ2の構成

テーマ2は、次に示した方法で、卵白アルブミン、ゼラチン、Lグルタミン酸1ナトリウム1水和物、デンプン、スクロース、グルコースの6種の生体関連化合物(タンパク質、アミノ酸、糖質)の未知検液の呈色反応を行うこととした。各自、分析方針を立てた上で実験に取り組むように指導した。

〈呈色反応の方法〉

- ①ホプキンスコール反応：試料溶液1 mLに、1%グリオキシム試薬1 mLを加えよく混合した後、試験管を傾け、器壁にそって濃硫酸を2 mL 静かに注いで静置した。

- ②ビウレット反応：試料溶液1 mLに、1 Mの水酸化ナトリウム溶液を1 mL加えよく振り混ぜた後、0.1 M硫酸銅(II)溶液を2~3滴加えた。
- ③キサントプロテイン反応：試料溶液1 mLに、濃硝酸を0.5 mLを加え5~6分間加熱する。その後、6 Mの水酸化ナトリウム溶液を色の変化が見られるまで加えた。
- ④ニンヒドリン反応：試料溶液1 mLに、0.2%ニンヒドリン溶液を2~3 mL加え、湯浴中で穏やかに加熱した。
- ⑤リンモリブデン酸反応：試料溶液2 mLに1 Mの水酸化ナトリウム溶液を3 mL加えよく振り混ぜた後、モリブデン酸アンモニウム溶液を1 mL加えた。(15 cm程度のサイズの試験管で反応させるとよい。)
- ⑥フェーリング反応：試料溶液1 mLに、フェーリング溶液(溶液1:0.3 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液と、溶液2: $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.2 M) と NaOH (25 M) を含む溶液を試料に加える直前に等量ずつ混合したもの)を1 mL加え、湯浴中で加熱した。
- ⑦硫化鉛反応：試料溶液1 mLに、1 Mの酢酸鉛溶液を2滴、2 Mの水酸化ナトリウム溶液を2 mL加え、生成した沈殿が溶解した後に湯浴中で加熱した。
- ⑧坂口反応：試料溶液1 mLに、2 Mの水酸化ナトリウム溶液1滴と α -ナフトール溶液を2~3滴加えてよく振り混ぜ、そこへ5%次亜塩素酸ナトリウム溶液を5滴ほど加えて様子を見た。
- ⑨ヨウ素デンプン反応：ヨウ素ヨウ化カリウム溶液を1~数滴加えた。

〈結果と考察〉

- 1) 定性反応を行った際の方針、および呈色反応の結果を明記する。
- 2) 各未知検液が何であったか呈色反応の結果に基づき同定する。またその理由も併せて答える。

- 3) 各反応について、化学反応式、化学構造式を併記し、説明する。

〈課題〉

分析結果から、これら6種の化合物を、効率的に正確に分析する為のフローチャートを作成する。

3. まとめと今後の課題

- 1) 本プログラムの実験条件および内容についての今後の課題

〈テーマ1〉

- ・タンパク質溶液の濃度測定は、今回、色素結合法を用いたBradford法により行ったが、検量線の作成に高純度の鶏アルブミンを用いるなど、測定条件を更に最適化する必要がある。
- ・学生自身で検量線を作成する時間を確保する為、プログラムの構成、内容、時間配分を見直し、検討する必要がある。
- ・分離した卵白タンパク質分子のバンドのうち、帰属出来なかったバンドについて、卵白タンパク質関連の抗体を用いて調べる必要がある。

〈テーマ2〉

- ・未知試料の定性反応については、今回用いた試料以外で、生体内の反応をよく表す物質の取り入れについて検討する。

- 2) 本プログラムを授業で実施した結果のまとめと今後の課題

本実験では、化学の基礎的操作の一つである「分離」が、卵白タンパク質分子を得る為の実験操作の中心となっており、今回は、「塩析」と「電気泳動」を用いた。学生らは、物質の性質に合わせて、様々な「分離」の方法があることを学ぶことが出来た。

テーマ1の実験結果である、電気泳動後のゲルの写真(図7)から、学生らは卵白タンパク質の

分画操作を比較的良く行えていたことがわかった。また、電気泳動の結果から、主要成分の分子量をほぼ正確に読み取る事が出来ており、バンドの帰属の結果から、電気泳動を用いて、分子をその大きさの違いで分離したこと、複数の分子が卵白タンパク質に含まれていたことは理解出来たと判断した。

テーマ2の未知検液の定性分析は、検液の成分の同定という観点のみで評価すれば、学生らは良好な成績であった。しかし、呈色反応が起こる原因といった分子自身に由来する性質の考察はなく、分子の性質の化学的な理解という観点から評価すると不十分な結果であった。また、化学実験I・IIの学習が生かされていないことがわかった。

実験後に行ったアンケートの回答には、学生らはごく身近な卵を試料に用いた意外性から、卵白への興味が喚起され、電気泳動の結果から、卵白が複数のタンパク質分子から構成されていることを知ることが出来たと書いており、実験結果をあわせて考えるに、本プログラムの物質とその構成分子について知るといった目的は達成出来た。しかし、「実験後に、物質に対する見方が変わったか?」という設問には「物質を見ても分子の視点は生まれなく、これまでと全く変化は無い。」と答えている者がおり、本授業では「分子」という視点で物質を捉え理解する発想を定着させるには至らなかった。学生が持つ物質への興味を、物質の持つ本質の興味へと深め、理解に結び付けることが、化学教育の質の向上には必須であり、科学的知識基盤の育成と共に今後の重点課題であると考えられた。

「分子」を認識することは、「分子」の性質を理解する第一歩となり、それが物質の性質や自然現象、生命現象について理解していく出発点になる、との考えのもとに、今後も本プログラムの改良を進めて行きたいと思う。また、物質と生命の関連について、どのような実験を行い、何を持って示すことが適当なのかについても併せて考えて

行きたいと思う。

付記

本実験プログラムは、船山が平成23年度と24年度に学長調整金による教育改善支援（A）および（B）に申請し採択され、助成を受けて作成、実施したものである。学長調整金の申請課題名は、平成23年度は『大学の化学実験に用いる生体高分子の教材化の検討と実験プログラムの作成』であり、平成24年度は『実験プログラム「大学の化学実験に用いる生体高分子の教材化の検討と実験プログラムの作成」の最適化による化学教育の質の向上の試み』であった。平成23年から平成24年の間に実験プログラムを検討・作成・最適化し、実際の授業は平成25年1月と同年10月の計2回実施した。なお10月実施分の結果は、10月31日時点で受講学生からのレポート及び感想が未提出である為、本稿に掲載した結果および学生の感想は、1月実施分のものである。

謝辞

今回、学長調整金への申請を採択して頂いたおかげで、本実験プログラムを立ち上げる事が出来ました。申請を採択して下さいだった前学長の大橋ゆか子先生に深謝申し上げます。今後、学生らに本プログラムをより良質なものとして提供できるように、工夫を重ねて行きたいと思えます。

引用・参考文献

- 1) 廣田 襄, 梶本興亜編, 現代化学への招待, 朝倉書店, 2001年, 2, 3ページ.
- 2) 文教大学教育学部化学研究室編, 化学実験Ⅰ・Ⅱ (2013年度秋学期版), 文教大学教育学部化学研究室, 2013年, 15, 16ページ.
- 3) 猪飼 篤ら編, タンパク質の事典, 朝倉書店, 2008年, 824, 825ページ.
- 4) 高橋知義他, 生命科学のための化学実験, 東京化学社, 2007年, 108-111, 114-115, 181-191ページ.

ジ.

- 5) 酒井仙吉, ブルーバックス B-1814 牛乳とタマゴの科学 完全栄養食品の秘密, 講談社, 2013年, 156, 157ページ.
- 6) 瀬口正晴, 八田一著, 食品学各論 食べ物と健康 ② 食品素材と加工学の基礎を学ぶ, 化学同人, 2003年, 49ページ.
- 7) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会, 日本食品標準成分表2010, 全国官報販売協同組合, 2010. 208, 209ページ.
- 8) 泉 美治他共編, 生物化学実験のてびき2 タンパク質の分離・分析法, 化学同人, 1990年, 2ページ.
- 9) 岡田雅人, 宮崎香編, タンパク質実験ノート 上 タンパク質をとり出そう (抽出・精製・発現編), 羊土社, 2011年, 29-34, 79-81ページ.
- 10) 井熊武志他, Coomassie brilliant blue G250 色素結合法による高感度タンパク質定量法, 帯大研報告, 23, 2002年, 18-26ページ.
- 11) 澤田清, 大森大二郎, 緩衝液 その原理と選び方・作り方, 講談社サイエンティフィック, 2011年, 117-142ページ.
- 12) XCell SureLock® Mini-Cell For leak-free electrophoresis of mini-gels, life technologies, 2012, 1-18p.
- 13) 糖類・アミノ酸・タンパク質の識別, 日本化学会, 15 (1), 2003年, 32-34ページ.
- 14) 服部俊治, 特集〈天然高分子Ⅱ〉動物由来繊維分子コラーゲンの性質と応用, 繊維と工業, 65 (12), 2009年, 453-461ページ.
- 15) 大木道則ら編, 化学大辞典, 東京化学同人, 1989年, 1553ページ.