

試験管で簡単にできる

## 脱水素酵素の実験方法について\*

三 尾 隆 弥

### はじめに

細胞内で行なわれている各種の化学変化のうち脱水素という反応は、細胞が生活エネルギーを引き出す糸口である。

この説明のために、ツンベルグ管<sup>1,2)</sup>を用いての実験がよく行なわれている。しかしこの方法は、

- (1) ツンベルグ管が高価である。
- (2) 減圧に時間と装置に費用がかかる。
- (3) 解糖、呼吸、電子伝達各系との関連性に乏しい。

など実施上の問題点があると考えられます。これらについて

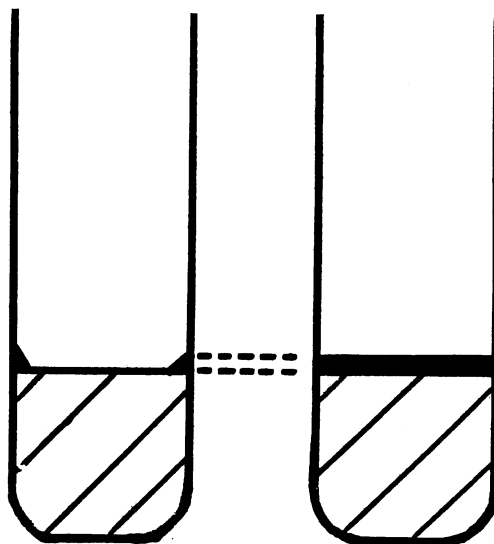
- (1)は、ツンベルグ管の代りに試験管を用いる。
- (2)は、減圧をせずに常圧下空气中で実験をする。
- (3)は、解糖、TCA回路、電子伝達、酸化的リン酸化各系の阻害剤を用いて脱水素反応への影響を比較考察する。

以上3つの条件をつけて検討を加えてみたので、その結果を報告する。

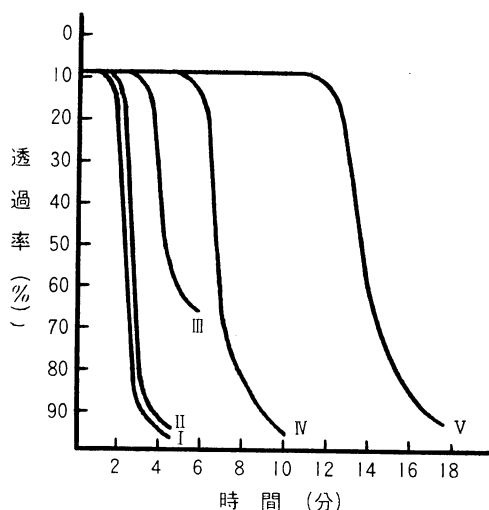
### I 実験装置・実施

- 1) 恒温水槽か市販熱帯魚飼育用アクアリウム、ヒーター、レギュレーターを用いる。アクアリウムの場合は、モーター付攪拌装置<sup>かくはん</sup>を工夫用意する。水温は30°Cに調節する。
- 2) プラスチック製透明試験管立てを水槽中に沈めた台の上に乗せる。水量を調節して水槽水の液面を試験管に水2ml入れた液面に合せる。試験管が深く水中に浸かると管内の変化が観察しにくい。
- 3) 攪拌速度は、メチレン青脱色のとき、脱色面と青色面が攪拌の振動で波状にならない程度に調節する。
- 4) 反応観察用として、蛍光灯は少なくとも2個、2面より照明する。
- 5) メチレン青脱色時の判断について

図Iに示すように、試験管液面壁の青色の環は、常に青いため脱色される部分から除外して観察する。また、参考のために脱色状態を光電分光光度計を用いて調べた結果を、図II、IIIにまとめる。

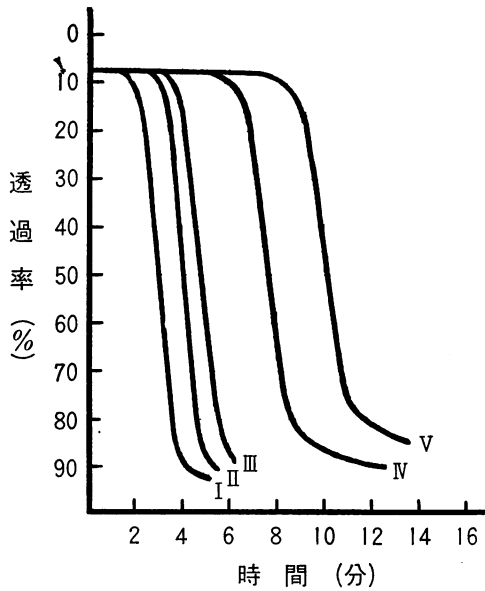


図I 試験管内反応区  
斜線部は脱色される部分 黒色部は脱色されない部分



図II 温度による影響  
I : 30°C II : 40°C III : 50°C IV : 20°C V : 10°C  
反応液組成: 菌懸濁液 6 ml, 0.01%メチレン青液1.6ml,  
脱イオン水0.4ml  
比色波長: 610mu

\* 本報告の要旨は兵庫県生物学会第20回総会(1966年5月28日)において発表した。(受付昭和41年5月28日)



図Ⅲ 阻害剤による影響

I : M/15リン酸緩衝液 II : 水 III : M/10NaF  
 IV : M/1000KCN V : M/100CH<sub>2</sub>ICOOH  
 反応液組成 : 菌懸濁液 6 ml, 0.01%メチレン青液1.2ml,  
 阻害剤0.8ml  
 比色波長 : 610mu 反応温度 : 30°C

これらの結果からも、肉眼観察でも着色、脱色中、脱色終了などの判定は容易である。

## II 実験材料

パン酵母、好気性細菌、エンドウの種子、モヤシなどを材料として脱水素酵素を含んだ各細胞懸濁液を作り、その2mlが0.01%メチレン青水溶液0.5mlを30°Cで脱色する状態を調べた。その結果を表Iにまとめる。

表I 材料の反応状態比較

	パン酵母		好気性細菌					エンドウ	モヤシ
	1	2	1	2	②	3	0	0	
30°C 培養時間 (日)	1	2	1	2	②	3	0	0	
メチレン青脱色時間 (分)	3	10	5	3	1	7	30	45	
試験管振とうによる泡立ち	++	++	-	+	+++	++	++	++	
メチレン青脱色の不均一性	++	+	-	-	-	-	+	-	
実験中の沈降物	++	++	-	-	-	-	++	+	

② : ツンベルグ管実験。

- : 泡立ちがないこと、脱色が均一に行なわれること、沈降物がないことを示す。
- + : 泡立ちがあること、脱色が均一に行なわれないこと、沈降物があることを示す。

パン酵母 : M/15リン酸緩衝液 pH=7.0に1%になるようブドウ糖を加えたものに、10%になるよう市販パン酵母(压榨酵母)を懸濁した。

好気性細菌 : あとで述べるように、空気中より分離した好気性細菌を30ml培養液に1白金耳接種培養した。エンドウの種子<sup>3)</sup> : 種子を3昼夜水に漬け、同量のM/15リン酸緩衝液 pH=7.0を加えて乳鉢ですりつぶした。その吸引ろ液。

モヤシ : 市販モヤシを乳鉢ですりつぶした。その吸引ろ液。ろ液は1N NaOHでpH=7.0に調整する。

この結果から、好気性細菌は脱水素酵素の実験材料として適切であることがわかる。

## III 好気性細菌の分離

### 1) 培養基の作り方<sup>4)</sup>

市販の鯨肉500gを細かく切り、50°C 1ℓの温水で60分間加熱、のち30分間煮沸する。これが少し冷えてからろ過し、ろ液にペプトン10g、食塩2.5gを加え加熱溶解する。放冷後1ℓになるよう水をおぎない、1N NaOHでpH=7.0に調整し、1ℓの三角ビンに移し綿栓をする。これをシュンメルブッシュ、蒸し器、コッホ蒸気殺菌釜、高圧殺菌釜のいずれかで殺菌し、放冷後冷蔵庫に保存する。

使用量に応じて、液体培養の場合には、これに1%になるようブドウ糖を加える。また、寒天培養の場合は、液体培養基のうえに2%になるよう粉末寒天を加え加熱溶解する。

### 2) 空中細菌の採集

100mlの寒天培養液を作り、試験管に10mlづつ分け、綿栓、殺菌後それぞれ殺菌シャーレに移し放冷する。この寒天培地をいろいろな場所で30分間シャーレの蓋を取り空気中の細菌を採集し、後30°C定温器中で2~3日培養する。

### 3) 実験用細菌の選定

空中細菌は1日ごとにそのコロニーを双眼実体顕微鏡で、ガラス越しに観察する。コロニーは日ごとにその数も量も増加する。このコロニーのうち、菌糸のあるもの(カビ)、着色性のもの、寒天内部のもの(嫌気性)を避け、記しをつけながら釣菌し、予め用意した2ml液培養液に入れ、綿栓、殺菌済み試験管培地に接種していく。この試験管培地は50本ほど用意しておくことよい。接種した試験管には記しをつけ1日培養する。このとき、1つの細菌コロニーより2本の試験管培地に接種するのが望ましい。その1本は脱水素酵素実験用に、他の1本は菌株保存用に用いる。1日30°C培養が終ると、試験管内培養液表面に白色、薄膜状に菌が繁殖しているのが観察出来る。これは好気性細菌であるため、培養液底面に繁殖しているものは嫌気性のものである。

好気性のもものみ取り出し、実験用30°C恒温水槽の試験管立てに入れ、綿栓を取り、0.01%メチレン青水溶

液 0.5 ml を加える。3 分後試験管を取り出し、空気中でよく振ってから水槽にもどし、ストップウォッチでメチレン青の脱色時間を計る。この方法で 2~3 回脱色時間を計りその平均値を出す。

メチレン青脱色時間は短かければ短いほど都合がよいのではあるが、培養条件により可成りの変動があるので、まず 10 分以内のものを残して他は捨てる。また 2~3 回脱色を繰り返すうち、空気中の酸素によりメチレン

青の色がもとに戻らないもの、泡立ちの激しいもの、脱色に尾を引くようなものなどは捨てる。最後に実験用菌として可能性のあるものについては、もう 1 度新し試験管培地に接種し、1 日培養後、同じ方法で脱色時間を計ってのち最も適当なものを残し、実験用菌株として冷蔵庫に保存する。必要に応じて、培養、実験に使用する。

表Ⅱ 実験順序と結果

実験区	試験管記号	菌懸濁液 (ml)	メチレン青液 (ml)	脱色時間 (秒)	混合物とその濃度	混合量 (ml)	脱色時間 (秒)	結果の説明
I	1	1.5	0.3	170	80°C 5 分加熱		∞	熱変性。標準青色として他との対照とする
	2	1.5	0.3	170	80°C 5 分加熱後 Zn の小片と硫酸	0.2		H <sub>2</sub> の発生あり、脱色あり。H <sub>2</sub> による還元
	3	1.5	0.3	170	80°C 5 分加熱後 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 1 M	0.2		混合すれば直ちに脱色。Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> による還元
	4	1.5	0.3	170	脱色後 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	0.2		静かに管壁にそって加える、青色になる
	5	1.5	0.3	170		0.2		O <sub>2</sub> の発生あり、青色になる。O <sub>2</sub> による酸化
	6	1.5	0.3	170	H <sub>2</sub> O	0.2	170	脱色状態のままにして他との脱色状態の対照とする
II	7	1.5	0.3	170	H <sub>2</sub> O	0.2	170	8 以下の試験管と共に酸化還元の実験をする
	8	1.5	0.3	170	リン酸緩衝液 M/15	0.2	130	pH の影響
	9	1.5	0.3	170	NaF M/10	0.2	220	フォスホグルコムターゼ・エノラーゼの阻害
	10	1.5	0.3	170	CH <sub>2</sub> ICOOH M/100	0.2	250	三炭糖リン酸脱水素酵素、コハク酸脱水素酵素の阻害
	11	1.5	0.3	170	KCN M/1000	0.2	220	チトクローム・コハク酸脱水素酵素の阻害
	12	1.5	0.3	170	DNP M/1000	0.2	200	アンカプラー <sup>6)</sup>

(注) DNP: 2, 4-ジニトロフェノール。

また NaF, KCN は、カタラーゼの阻害剤でもあるので、実験終了後(7)~(12) の試験管に 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 ml を加える。(9) と (11) の試験管は O<sub>2</sub> の発生が少ない。

#### Ⅳ 実験方法

##### 1) 試薬

表Ⅱ にあげた試薬は、あらかじめ 100~200 ml 作り細口試薬ビンに入れて置く。特に、阻害剤はいずれも 1~2 N NaOH で pH=7.0 に調整する。また H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KCN の水溶液は着色ビンに入れる。

##### 2) 実験菌の多量培養

液体培養液 30 ml を作り 100 ml 三角ビンに入れ、綿栓、殺菌、放冷する。この培養基に実験菌を 5 白金耳接種し、30°C で 1 日培養する。接種菌量はメチレン青脱色時間が 2~4 分であるように白金耳の大きさ、回数を加減し調節する。

実験直前にこの三角ビンを取り出し、細菌懸濁液を 2 ml 駒込ピペットで吸い上げ強く押し出すことを繰り返して、三角ビン内の細菌懸濁液が均一になるようにする。

この操作によって、少し大きい菌塊でも容易に均一に分散する。その後表Ⅱ に示す記号を付けた試験管に 1.5 ml づつ同じピペットで分け入れる。この試験管を全部恒温水槽に漬けて表Ⅱ に示すとおり、実験 1 区より順次試験していく。

##### 3) 実験順序と結果

実験順序、結果、説明を表Ⅱ にまとめて示す。実験 I 区と II 区とに区分けしたのは、その目的が異なるためである。また、試験管 1 本づつ実験するのは時間がかかるので 3 本づつ 1 組で 1 度に、他の組を 1 分づつ遅らせて実験して、あとで脱色時間を算出する。

表Ⅱ のメチレン青脱色に要する時間の平均値は、筆者が空気中より分離した好気性杆菌で実験した結果である。この値は、細菌の種類、培養条件等により多少差異があるだろう。

#### 4) 実験例

実験Ⅱ区の(7), (8), (9)の試験管について述べると、まず、それぞれの試験管に0.01%メチレン青水溶液0.3mlを0.5ml駒込ピペットで加える。この試験管を3本とも取り出し、片手に持ち空気中で40秒間振り同じ青色とする。これを水槽に入れストップウォッチで脱色時間を計る。脱色が終ると、また3本とも取り出し空気中で振り青色にし、脱色時間を計りその平均値を出す。3本とも同じ結果となることが確認出来れば、他の試験管でのこの操作を省略する。

つぎに、(7)の試験管には0.2mlの水、(8)には、M/15リン酸緩衝液(pH=7.0)0.2ml、(9)には、M/10 NaF0.2mlをそれぞれ1ml駒込ピペットで加え振とう3分後にまえと同じ操作で脱色時間を計る。2回の脱色時間の平均値を算出する。

#### V 実験上の注意

- 1) 細菌を使用する実験上の諸注意を守り、手の汚染部等はその都度オスバン液でよく洗滌、消毒する。
- 2) 実験に慣れるまでは、実験試験管にゴム栓をして振とうする。
- 3) 細菌、阻害剤を捨てる時は、殺菌後多量の水とともに薄めて捨てる。

#### ま と め

この実験方法は、つぎの(1), (2)の難点があるも、(3), (4), (5)の良い点は、問題点解消策のみにとどまるものではない。

- (1) 脱水素酵素の実験に、細菌細胞懸濁液を粗酵素液として用いる。
- (2) 細菌の分離、殺菌が少し困難で時間がかかる。
- (3) 常圧のもと試験管を用いて、ツンベルグ管を用いる実験と同一目的がより簡単に充分果せる。
- (4) 特別な材料、装置、薬品等を必要とせず、短時間で反応の結果が明瞭である。
- (5) 同じ試験管で、何回も繰り返し、酸化還元が出来、細胞内反応の重要なしくみを理解する上に適切である。

#### 参 考 文 献

- 1) 北大理学部植物生理学教室編：植物生理学実習、75 (1951) 養賢堂
- 2) 石田・佐藤編：生物の実験法、304 (1962) 裳華房
- 3) 三輪・丘・三坂・藤井共著：生物学実験指導書、240 (1964) 産業図書
- 4) 宮地憲三：応用菌学、30 (1963) 岩波書店
- 5) 赤堀四郎編：酵素研究法、2、508 (1958) 朝倉書店
- 6) 小林・田川：蛋白質核酸酵素、10、1596 (1965)