

実験課題 P3. 酵素によるタンパク質の消化

生命の中心分子として、タンパク質はほとんど全ての生物学的プロセスに関与している。トリプシンは、多くの脊椎動物の消化器系に通常見られる主要なタンパク質分解酵素のひとつである。トリプシンはタンパク質の短鎖ペプチドやアミノ酸への加水分解を触媒し、人体が新しいタンパク質を合成するための原料を提供する。

本課題では、カゼイン($M_w = 24$ kDa, 分子量 24,000)をアミノ酸に加水分解する触媒として、トリプシン(trypsin, TYP)を用いる。アミノ酸の濃度はホルムアルデヒド滴定法によって決定する。続いて、ラインウィーバー・バークプロット(Lineweaver-Burk plot、二重逆数プロット)を用いて、与えられた実験条件における TYP の最大反応速度(V_{\max})とミカエリス定数(K_m)を求める。

ミカエリス・メンテン式 (Michaelis–Menten equation) は次のとおりである。

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

両辺の逆数を取ると、

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

ここで、

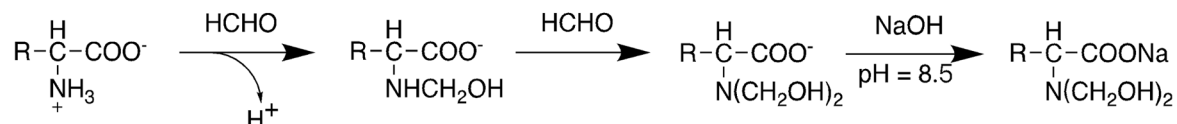
V : 反応速度

K_m : ミカエリス定数

V_{\max} : 最大反応速度

$[S]$: 基質濃度

ホルムアルデヒド滴定法は、ホルムアルデヒド共存下でアミノ酸を水酸化ナトリウムで滴定する方法である。反応スキームを以下に示す。



これらの化学反応によってアミノ酸の H^+ が遊離するため、水酸化ナトリウムで滴定することにより、溶液中のアミノ酸濃度を正確に決定することができる。

試薬

物質	名称	状態	GHS 危険有害性情報
H_2O	脱イオン水	液体	危険性なし
TYP	1 mg mL^{-1} TYP 溶液	水溶液	H315, H319, H334, H335
$\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$	ホルムアルデヒド-フェノールフタレイン混合溶液 (pH 7.0), 100 mL (詳細は指導教員向け実験手順に記載)	水溶液	H302, H315, H317, H318, H332, H341, H350, H371
カゼイン	三角フラスコに入った、濃度がそれぞれ異なるカゼイン溶液 (A-C) (下表参照)	水溶液	危険性なし
$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$	0.2%フェノールフタレインエタノール溶液 (PP)	エタノール溶液	H225, H319
NaOH	0.1 mol L^{-1} 水酸化ナトリウム水溶液	水溶液	H290, H314

カゼイン溶液(Casein, A-C)のタンパク質濃度は次のとおりである。

記号	A	B	C
カゼイン濃度 (g L^{-1})	10	20	30

ガラス器具と装置

三角フラスコ(150 mL)	3 個
三角フラスコ(50 mL)	9 個
ビュレット(50 mL)	1 個
ホールピペット(10 mL)	3 本
ピペッター	1 個
プラスチック製パストゥールピペット	20 本
水浴	1 個
「廃液」と記載された廃液入れ容器(1 L)	1 本

指導教員向け実験手順

ホルムアルデヒド-フェノールフタレイン混合溶液 (pH 7.0) は、実験前に指導教員が調製しておく必要がある。

1. 36% ホルムアルデヒド溶液の原液を脱イオン水で希釈して、10% (m/v, 質量/体積) ホルムアルデヒド溶液 100 mL を調製する。
2. 0.2% ホルムアルデヒド-フェノールフタレイン混合溶液 1 mL を 10%ホルムアルデヒド溶液に加える。
3. 2 で調製した溶液を、 0.1 mol L^{-1} 水酸化ナトリウム水溶液で滴定する。混合溶液の色が明るいピンク色へと変化するのが最初に認められた点を滴定の終点とする。
4. 溶液 100 mL をガラス瓶に移し、“ホルムアルデヒド-フェノールフタレイン混合溶液 (pH 7.0)”と表記する。

実験手順

I. トリプシンによるカゼインの触媒的加水分解

1. 50 mL の三角フラスコ 3 つに、それぞれホルムアルデヒド-フェノールフタレイン混合溶液を 5 mL ずつ加える。フラスコに 1 から 3 の番号を振る(フラスコ **1-3**)。
2. 150 mL の三角フラスコ 1 つに、カゼイン溶液 **A** 50 mL を加える。フラスコを 37 °C の水浴に入れて 10 分間静置する。
3. 手順 2 と同時に、トリプシン溶液の入ったボトルを 37 °C の水浴に入れて 10 分間静置する。
4. トリプシン溶液 5 mL を、先にカゼイン溶液 **A** を入れたフラスコに加える。よく混合し、タイマーをスタートさせる。
5. 2 分後、4 分後、6 分後に反応溶液 10 mL を採取し、それぞれ 1 から 3 の番号を振った 50 mL フラスコ(フラスコ **1-3**)に移す。
6. 実験を完結するために、手順 1-5 をカゼイン溶液 **B**、**C** についても同様に行う。

II. ホルムアルデヒド滴定法による、加水分解後のアミノ酸濃度の定量

7. 試料が入ったそれぞれの 50 mL 三角フラスコに、フェノールフタレイン エタノール溶液を 10 滴ずつ加える。

8. 50 mL 三角フラスコの内容物を 0.1 mol L^{-1} NaOH 水溶液で滴定する。溶液の色が最初に明るいピンク色に変化したところを滴定の終点とする。終点までに滴下した NaOH 水溶液の体積 (mL) を下の表に書き出す。

サンプルと フラスコ番号	カゼイン溶液 A			カゼイン溶液 B			カゼイン溶液 C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NaOH 水溶液の 体積/ mL									

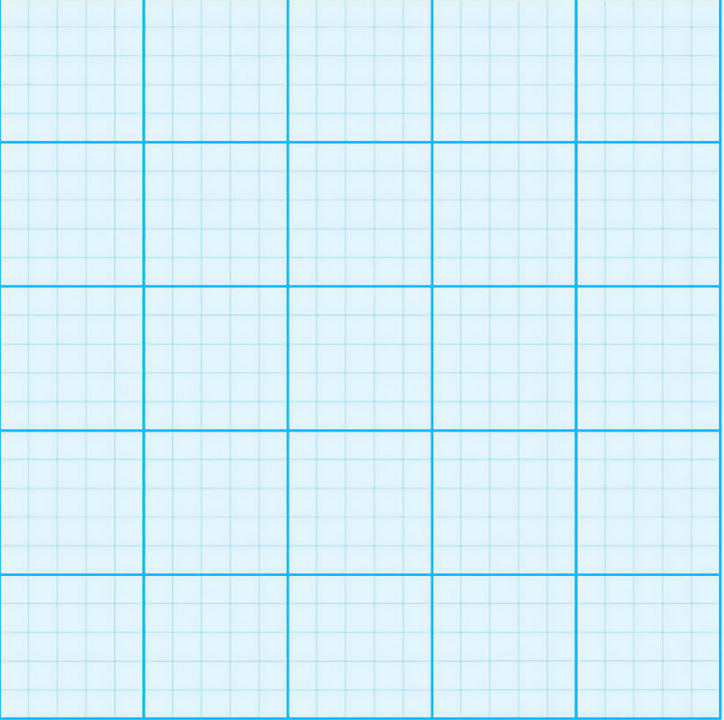
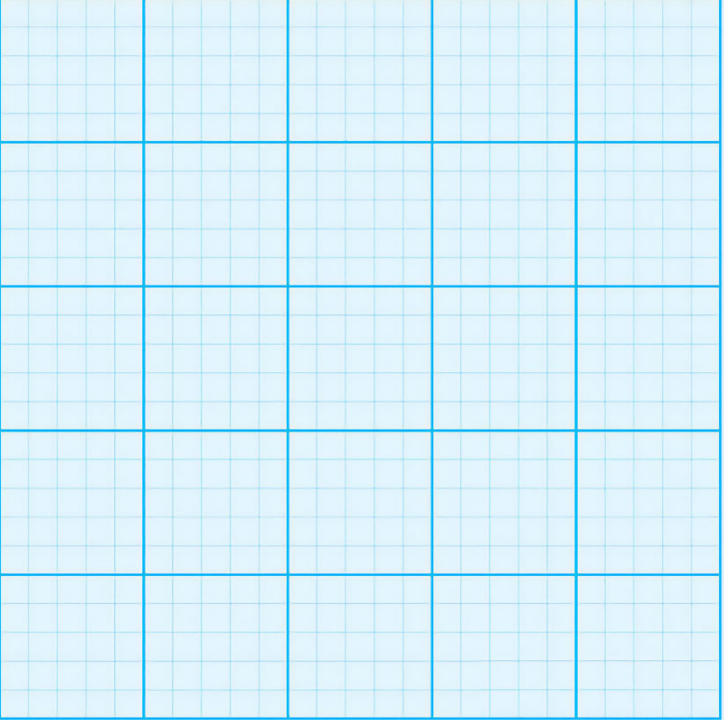
9. 50 mL と 150 mL の三角フラスコ中の全ての溶液を、「廃液」と記載された廃液入れ容器に入れる。

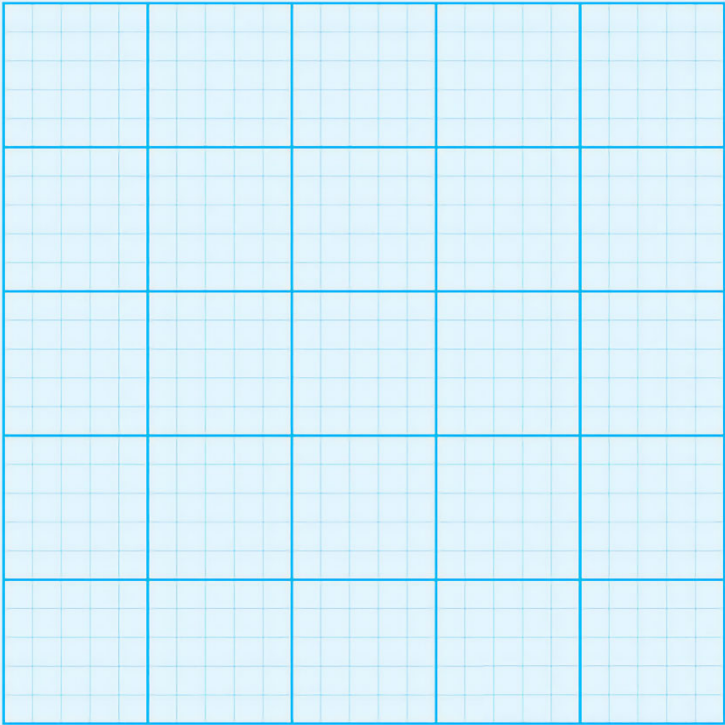
データ解析と問題

1. 滴定結果に基づいて、混合物中のアミノ酸の濃度を計算せよ。

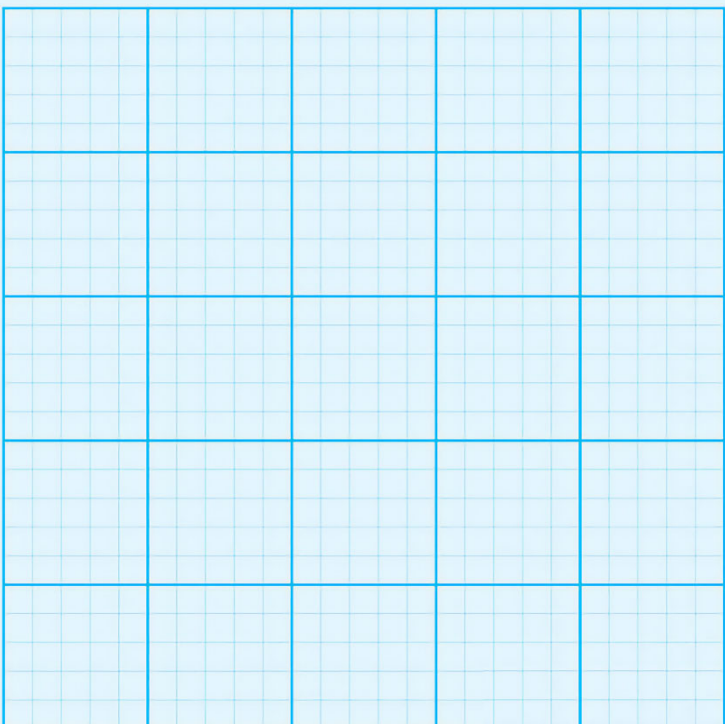
サンプルと フラスコ番号	カゼイン溶液 A			カゼイン溶液 B			カゼイン溶液 C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
アミノ酸の濃度 / mol L^{-1}									

2. 上の表のデータに基づいて、アミノ酸の濃度を時間に対してプロットし、酵素によるタンパク質加水分解反応の初速度 (v_{10} , v_{20} , v_{30}) を計算せよ。

	$v_{10} = \quad \text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$v_{20} = \quad \text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$

	$v_{30} = \quad \text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
--	---

3. ラインウィーバー・バークプロット（二重逆数プロット）を用いて、与えられた実験条件における TYP の最大反応速度 (V_{\max}) とミカエリス定数 (K_m) を求めよ。

	$K_m = \quad \text{mol L}^{-1}$
	$V_{\max} = \quad \text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$