

# 高等学校生物科目において酵素の基質特異性を学ぶための 新しい実験方法に関する研究

## Studies on the Development of New Experimental Methods for Learning on the Substrate Specificity of Enzymes in Upper Secondary School Biology Class

西野 秀 昭

Hideaki NISHINO

福岡教育大学・理科教育ユニット (生物)

(令和2年9月14日受付, 令和2年12月10日受理)

### 要 約

本研究は, 高等学校生物科目において, 酵素の基質特異性を科学的に探究するのに役立つ新しい実験方法の提案を行うものである。酵素の基質特異性に関しては高校生物の教科書では, かなりおざっぱに記載され, 酵素の基質特異性がかなり厳密なものであることを高校生が実感をもって学ぶことができないのが現状である。そこで探究活動における新しい実験方法の確立が急務であるが, 本研究で開発した実験方法は高校では実施困難な内容も含まれる。そこで, 大学等高等教育機関との密接な連携をとりながら, 高校生でも探究活動において実施可能な実験方法及び大学等高等教育機関との密接な連携の在り方を新しく構築した。結果, 実験の環境が整っていない高校であっても, 大学等との連携によって高校生に科学的な研究を通じた学習で活用可能な実験方法を提案できたと考える。

キーワード 酵素, 基質特異性, 高等学校, 生物, 大学等高等教育機関, 連携

### 1 目 的

「酵素」は英語で「enzyme」と言う。これは元々ギリシャ語の ἐνζυμον, “leavened (パン種)” に由来していて, 「in yeast」の意味である (Kühne, 1877)。この enzyme は, Louis Pasteur が当初提唱した ferment という用語では広くその働きを表せないことから提唱され, 定着している (Manchester, 1995)。つまり酵素という名称は, 人類が有史以前から生活に活用してきた『酵母が, アルコール発酵を行う素 (もと)』を含んでいることから『』内の最初と最後の漢字をつなぐことで作り出された (猪飼, 1992)。

その名称からも分かるように, 酵素は有史以前から, そして現在も, これからの将来も生活に密着して利用されるとともに, 生き物の体内での様々な化学反応を触媒することからも, 大切な生命現象として高等学校の生物基礎 (2単位) や生物 (4単位) (以降, 「高校生物科目」と呼ぶ) で取り扱われている。高等学校学習指導要領解説理科編理数編 (平成21年12月) では「生命の構造と機能・生命の多様性と共通性・生命の連続性」(文部科学省, 2009) で, 高等学校学習指導要領 (平成30年告示) 解説理科理数編 (平成30年7月) (文部科学省, 2018) では「生物の構造と機能・生命の連続性」で, いずれでも採り上げられている。

しかし, その特徴的な働きを示すべき基質特異性に関する教科書での記述では, タンパク質分解酵素はタンパク質を分解する, デンプン加水分解酵素はデンプンを分解するというような漠然とした記述がなされて

いる。しかし酵素の基質に対する特異性は、実際はかなり厳密であることが知られている。例えば、James B. Sumner (1926) によってはじめて結晶化され、酵素がタンパク質であることを初めて証明された「記念碑的酵素」(八木達彦他4名, 2008)であるウレアーゼは、ウレア [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO] は二酸化炭素とアンモニアに分解するが、チオウレア [(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CS] は分解しない(中田・中田, 1991)。このように、基質の認識が非常に厳密な酵素が実際には多数知られている(八木他, 2008)。このようなことが高等学校の生物科目において教科書へ記述されていれば、生徒が生命現象への畏敬の念や驚きをもって酵素への興味・関心を抱き、学習への意欲を高め、自然の事物・現象を科学的に探究するために必要な資質・能力を生徒に育成する探究活動への積極的な取り組みにも資するものになると考えられる。

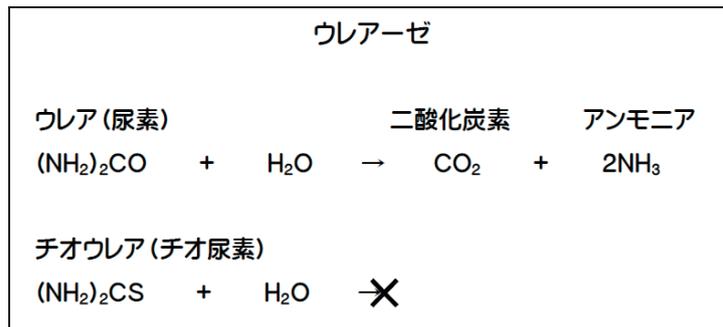


図1 ウレアーゼは、ウレア(尿素)は分解できるが、チオウレア(チオ尿素)は分解できない

このようにウレアーゼの基質の認識は非常に特異性が高いことから、酵素による基質の認識は非常に厳密なものもあることが分かる。ここから、では他の酵素でもこのように基質特性が高いのだろうか?という演繹的な疑問が湧いてくる。

本研究では、基質特異性が高いことを学べる素材として、高校生物科目の教科書に既に記載がある制限酵素の基質特異性、即ち特定の塩基配列のみを認識して切断する、に着目した。制限酵素の基質特異性の高さを、探究活動を通じて学ぶことができれば、教科書に加えて新たな内容や新たな実験を増やすこともないことから、年間の授業計画の中でも比較的スムーズに実施できると考えられる。また、酵素の働きの単元とバイオテクノロジーの単元の、互いの学びの効果も上がるものと考えられる。そこでこの制限酵素の認識配列を使って、酵素の基質特異性に興味・関心を持って学ぶことができる探究活動に通じる実験内容を提案する。即ち、部位特異的変異導入による塩基配列を一部変えた配列に対する酵素の認識の変化を観察する仮説検証の探究活動、そしてそのような実験準備のために行う大学等高等教育機関(研究所等含む)との連携を提案する。

## 2 材料と方法

**基質 DNA:** 形質転換された大腸菌(DH5α)の培養液から、の QIAprep Miniprep kit (QIAGEN 社) を用いて基質とする DNA は調製した。別の研究(Nishi 他, 2000)にてクローニングされ塩基配列決定等の解析も既に終わっているヒト sterolΔ7-reductase cDNA (*hDHCR7*) を組換えた pYES2 ベクター(大腸菌と酵母のシャトルベクター)を用いた(図1は cDNA 挿入前の pYES2 ベクターの構造図)。*DHCR7* の開始コドンから終止コドンまでの読み枠(1,377bp)が、この pYES2 ベクターのマルチプルクローニングサイト(MCS)に挿入されている。その読み枠のすぐ外側の5'側には *EcoR* I が特異的に認識する塩基配列、5'-GAATTC-3'、があり、3'側には *Not* I が特異的に認識する塩基配列、5'-GCGGCCGC-3'、がある。この組換えベクターを、以降は pEcoNot (ペコノット) と略称する。

**制限酵素:** *EcoR* I と *Not* I (いずれも、TaKaRa バイオ株式会社) を使用した。pEcoNot を両酵素で同時に切る(double-digestion) と、1.4kb ほどの DNA (*hDHCR7*) が切り出される。pYES2 は 5.9kb ほどなので、アガロースゲル電気泳動後の染色では 1.4kb の DNA とは区別が可能である(結果と考察の図4参照)。このことから、1.4kb の DNA が切り出されたことを指標に、制限酵素が両者とも働いたと判断できる。

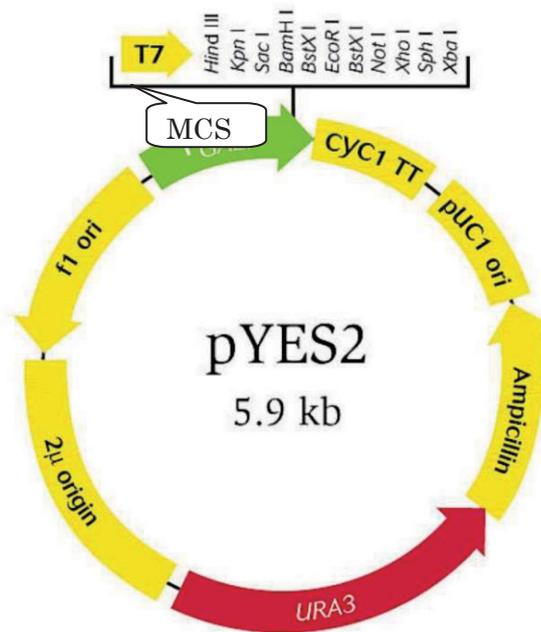


図2 pYES2 ベクター

MCS (multiple cloning site) の *EcoR I* と *Not I* の間に *hDHCR7* を組換えたものを本研究で用いた。〔Thermo Fisher Scientific 社のホームページ (HP) より引用〕

**アガロースゲル電気泳動**：アガロース濃度は 0.8% でミニゲルに作成し、 $0.5\times$ TBE 中でアガロースゲル末端から 2 cm ほどまで電気泳動を行った。染色は、電気泳動終了後、臭化エチジウム  $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$   $0.5\times$ TBE (Sambrook & Russell, 2001) で 10 分ほど染色し、トランスイルミネーター上で観察した。写真撮影は、ミニゲル全体にフードカバーをかけ、デジタルカメラのモノクローム様式で行った。

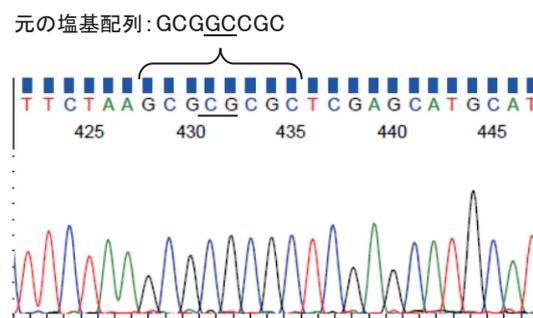


図3 *Not I* の認識配列への変異導入の確認

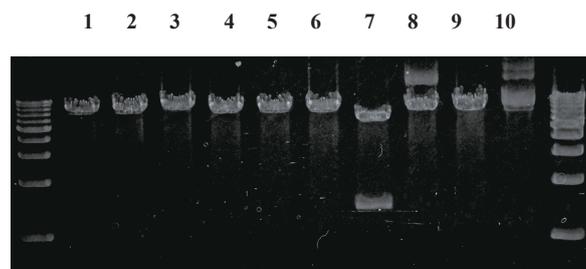
下線部が置き換えた塩基の部分。ジデオキシ法による塩基配列の決定は、業者に依頼した（北海道システム・サイエンスの「受託 DNA シーケンス解析サービス」）。経費は 8 連チューブ解析で 5,000 円ほどであった。

**変異の導入**：PrimeSTAR<sup>®</sup> Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa バイオ株式会社) を用いた。変異を導入するのは、*Not I* が認識して切断する塩基配列、5'-GC/GGCCGC-3' (「/」は *Not I* によって加水分解されるホスホジエステル結合の位置を示す。アンダーラインは変異を導入する予定の塩基を指す。) である。制限酵素が認識する塩基配列が回文 (palindrome) 構造を有するという特質を維持したまま、5'-GC/GCGCGC-3' (アンダーラインは変異を導入した塩基を指す) という塩基配列へ変更する。そのためのプライマー設計は、

同キットの説明書に倣って附録図1のように行った。プライマーの合成は、業者への外注として、北海道システム・サイエンス社 HP (<https://www.hssnet.co.jp/>) の「受託 DNA 合成」へ電子メールに注文書を添付して依頼した。合成スケール 25nmol (11~30mer)・ゲルろ過精製で塩基当たり 120 円である。本研究では、経費はプライマー 1 本当たり 3,000 円ほどであった。変異が導入されたかは、塩基配列決定を北海道システム・サイエンス社へ外注して行った。塩基配列決定を依頼した 8 サンプルいずれにも目的の変異が導入されていた。例として、図 3 に 6 サンプル分の結果を示す。Not I が認識する塩基配列に変異を導入した pEcoNot は、今後は「pEcomNot (ペコムノット)」と呼ぶ。

### 3 結果と考察

pEcoNot における Not I が認識する塩基配列に、回文構造という特質を残したまま、5'-GC/GGCCGC-3' (「/」は Not I によって加水分解されるホスホジエステル結合の位置を示す。アンダーラインは変異を導入する塩基を指す。) を、5'-GC/GCGCGC-3' (アンダーラインは変異を導入した塩基を指す) という塩基配列へ部位特異的変異導入によって導入した。変異が導入された後の pEcoNot は pEcomNot (ペコムノット) と呼んで pEcoNot とは区別する。変異が入っていない pEcoNot は、EcoR I と Not I の同時処理によって 1.4kb と 5.9kb の DNA が検出される (図 4, レーン 7)。



レーン		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
DNA	Std	pEcomNot						pEcoNot				Std
EcoR I	-	+						+	+	-	-	-
Not I	-	+						+	-	+	-	-

図 4 pEcoNot の Not I 認識塩基配列に変異を導入した pEcomNot からは 1.4kbDNA の切り出しは観察できない

両サイドは、1kb DNA ladder である。下から、1kb, 2kb, 3kb, …の大きさの DNA である。pEcomNot は 8 サンプルの内、6 サンプルをこの実験に用いた。「Std」は、1kb DNA ladder。

制限酵素反応液は後述の附録表 1 のように調製して、酵素反応は 37°C で 10 分間行った。アガロースゲル電気泳動の結果を図 4 に示す。予想通り、Not I の認識配列に変異を導入した pEcomNot ではいずれも切り出しは観察されなかった。一方、正常な pEcoNot では EcoR I と Not I の同時処理で切り出しが観察された。EcoR I 処理のみ、Not I 処理のみ、制限酵素無しでは切り出しは観察されなかった。

アガロースゲル電気泳動後の DNA の染色には、臭化エチジウムを用いた。臭化エチジウムなど DNA の染色液を使っていると必ず「発がん性があるのに生徒実験に使うのは問題だ」と言われる。製品安全情報データシート (MSDS) などのデータを調べると、臭化エチジウムは「発がん性」があると誤解されることが分かる。厳密には、「変異原性」という指標が、栄養要求性細菌を野生型へ戻すエイムス試験で、ある濃度で陽性を示すことで、生殖細胞でのデータはないが、一応、生殖細胞への変異原性を疑っておこう、という程度で、「発がん性」は確認されていない (記載がない) (各薬品会社の HP で、MSDS を参照)。また、遺伝性でない「発がん」は、多段階の感作によって引き起こされる (多段階発がん) (今堀・山川, 2007)。従って、問題になるとすれば、急性毒性で、その判断は LD<sub>50</sub> (半数致死量) と考えられる。DNA

の染色に使う臭化エチジウムの濃度は 0.5 $\mu$ g/mL で、100mL の染色液中には 50 $\mu$ g 含まれる。これは、臭化エチジウムの LD<sub>50</sub> が、ラット経口で 1.5g/kg 体重、即ち 50kg 体重の人が 75g 飲みこむ量に匹敵するのにはまったく遠く及ばない。ちなみに塩化ナトリウム（食塩）の MSDS によると、LD<sub>50</sub> は 4.0g/kg である。塩化ナトリウムの取り扱い時にはフェイスシールドが必要とも記載されている。また一方で、太陽の下で日々浴びる紫外線（UVA, UVB）には「発がん性」が認められている（巖佐他, 2013）のに、こちらは免じられ、室内でもブラックライトと名称を変えて使われている不思議がある。MSDS を確認せずに、即ち根拠も無く特定の薬品の使用を禁じるのでは、医薬品等の服用もできない事になる。即ち人が服用する医薬品等も、その毒性や副作用と期待する薬効との兼ね合いで利用している場合があることを認識し、MSDS などのデータを精査・比較して利用価値のある薬品の使用を判断して頂きたいと考える。

DNA の染色液の廃棄に関しても、大学等では適切に処理できるシステムがあることから、高等学校側からの廃棄依頼が可能になることが望ましいと考える。または、高価なため、予算との兼ね合いもあるが、MIDORI Green Direct（日本ジェネティクス社）等の安全性が高まった染色液の使用も、今後は考えられる。

#### 4 まとめ

本研究で示した実験内容を応用すると、酵素の基質特異性の高さを高校生が実感できる探究活動を組み上げる事が可能と考えられる。しかし、本研究の全てを高校生が行うのではなく、例えば変異の導入や塩基配列の決定等は、遺伝子組換え実験実施のための委員会を設置している大学等高等教育機関に委託し、制限酵素で DNA を切って、アガロースゲル電気泳動で切断状況を確認する実験のみを行うことも可能だろう。その結果、わずかな塩基配列の変化でも酵素は認識することができなくなることから、酵素の基質特異性の高さを再確認することができるだろう。今後、COVID-19 の状況が落ち着きを見せたら、高校生への実践研究を経てその有効性を確認していきたい。

#### 参考文献

- ・猪飼篤（1992），基礎の生化学，45，東京化学同人
- ・今堀和友・山川民夫，生化学辞典（第4版）（2007）「発がん（癌）」の項目，1022，東京化学同人
- ・巖佐庸・倉谷滋・斎藤成也・塚谷裕一，岩波生物学辞典（第5版）（2013），「紫外線」の項目，558
- ・Kühne, W., (1877). "Über das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente" [On the behavior of various organized and so-called unformed ferments]. Verhandlungen des Naturhistorisch-medizinischen Vereins zu Heidelberg. new series (in German). 1 (3), 190-193
- ・Manchester, K.L. (1995). "Louis Pasteur (1822-1895)-chance and the prepared mind", Trends in Biotechnology, 13 (12), 511-515
- ・文部科学省（2009），高等学校学習指導要領解説 理科編 理数編，実教出版
- ・文部科学省（2018），高等学校学習指導要領（平成30年告示）解説 理科編 理数編，実教出版
- ・中田福市・中田貴久子（1991），これでわかるマンガ生化学入門（改訂第2版），39，金原出版
- ・Nishi, S., Nishino, H., Ishibashi, T., (2000) Biochim. Biophys. Acta, 1490, 106-108
- ・Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001), Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL, 3<sup>rd</sup>. ed., 5.11
- ・八木達彦他4名（2008），酵素ハンドブック，第3版，Urease, 697

#### 附記

本研究成果の一部は、科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）（基盤研究（C）「次期改訂理科教科書の生命生物観察実験の再現性と科学性に資する根拠データベース構築」課題番号 16K01021）の交付、及び令和2年度福岡教育大学研究支援事業科研費獲得推進支援プロジェクトによる助成を受けて行えたものである。

本研究では、製品安全情報データシートを「安全データシート」とは言わず、またその略称を、「Safety Data Sheet, SDS」ではなく以前用いられていた「Material Safety Data Sheet, MSDS」とした。「MSDS」であれば、略称としては本研究で言う「製品安全情報データシート」のみ検索してもヒットするが、「安全データシート」の略称として現在頻用されている「SDS」では、他の特定の事象の略称と重複するからであ

る〔例えば、ドデシル（ラウリル）硫酸ナトリウムのみでなく、「新左翼学生運動組織」, 「Sounds」, 「特別割引販売」, 「ドイツ社会主義学生同盟」, 「ソフトウェア開発システム」, 「衛星データシステム」, 等多数〕。

#### 本研究内容に関する問合せ先

西野 秀昭（にしの ひであき）

〒 811-4192 福岡県宗像市赤間文教町 1 番 1 号 福岡教育大学・理科教育ユニット（生物）

e-mail: hideakin@fukuoka-edu.ac.jp Tel 0940-35-1385（研究室直通） Fax 0940-35-1716（生物事務室）

hDHCR7/pYES2 ベクターにおける MCS への部位特異的変異導入のための primer 設計

《NotI in hDHCR7/pYES2》

〈目的〉

NotI の認識部位 (5'-GC/GGCCGC-3') のセンス鎖の中央の「5'-GC-3'」を「5'-CG-3'」に置換する (アンチセンス鎖は「3'-CG-5'」を「3'-GC-5'」に置換する。) ただしプラスミドは hDHCR7/pYES2。Palindrome (回文) 構造は残す。

〈参考〉

製品コード R046A 研究用 TaKaRa PrimeSTAR<sup>®</sup>Mutagenesis Basal Kit  
説明書 v201601Da, p.6

〈方法〉

NotI の認識部位「GC/GGCCGC」のみ、大文字で記す (「/」は、加水分解するホスホジエステル結合の場所)。その 5' 側は hDHCR7 の 3' 側末端側

5'-ctgctgcctggaatcttctaaGCGGC<sup>□</sup>CGCtcgagcatgcatctagagggc-3'

3'-gacgacggaccttagaagattCGCG<sup>□</sup>GCGagctcgtacgtagatctcccg-5'

↓ 置換を行う

5'-ctgctgcctggaatcttctaaGCGGC<sup>□</sup>CGCtcgagcatgcatctagagggc-3'

3'-gacgacggaccttagaagattCGCG<sup>□</sup>GCGagctcgtacgtagatctcccg-5'

↓ オーバーラップ領域を 15base 選定する (変異部分をなるべく中心にする)

5'-ctgctgcctggaatcttctaaGCGGC<sup>□</sup>CGCtcgagcatgcatctagagggc-3'

3'-gacgacggaccttagaagattCGCG<sup>□</sup>GCGagctcgtacgtagatctcccg-5'

↓ 変異部分から 18base 3' 側に伸ばす。GC 含量を考慮し最長 30bases まで 5' や 3' 方向に伸ばす事も検討。

5'-ctgctgcctggaatcttctaaGCGGC<sup>□</sup>CGCtcgagcatgcatctagagggc-3'

3'-gacgacggaccttagaagattCGCG<sup>□</sup>GCGagctcgtacgtagatctcccg-5'

↓ 太字でない部分を削除して、primer 配列とする。

5'-ctaaGCGGC<sup>□</sup>CGCtcgagcatgcatcta-3' (27bases, GC=16/27)

3'-ggaccttagaagattCGCG<sup>□</sup>GCGagct-5' (27bases, GC=16/27)

〈結果〉

NotI/hDHCR7/pYES2 の NotI 部位に変異を導入する primer (HSS の OLIGOKIDS は最長 30mer)

name : sequence (27bases)

p\_NIhD\_4GC5\_4CG5: 5'-CTAAGCGCGCGCTCGAGCATGCATCTA-3'

p\_NIhD\_5CG4\_5GC4: 5'-TCGAGCGCGCGCTTAGAAGATTCCAGG-3'

附録図 1 制限酵素 Not I の認識塩基配列への部位特異的変異導入のためのプライマー設計 (説明書の p6 に倣った)

pEcoNot を pEcomNotp へ変異させる手順中で、pEcoNot と名称を変更する前の、hDHCR7/pYES2 の名称を用いている。

附録表 1 制限酵素処理の一覧表

	1~6	7	8	9	10
<i>EcoR</i> I	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	—	—
<i>Not</i> I	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	—	0.5 $\mu$ L	—
10 $\times$ H buffer <sup>#</sup>	2.0 $\mu$ L				
0.1% BSA	2.0 $\mu$ L				
0.1% Triton X-100	2.0 $\mu$ L				
pEcoNot*	—	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L
pEcomNot*	5.0 $\mu$ L	—	—	—	—
滅菌精製水	8.0 $\mu$ L	8.0 $\mu$ L	8.5 $\mu$ L	8.5 $\mu$ L	9.0 $\mu$ L
total	20 $\mu$ L				

全て、1.5mL ミクロチューブに調製した。0.1% BSA と 0.1% Triton X-100 は、*Not* I の活性を 100% 引き出すのに必要である。これらの添加物は、*EcoR* I の活性には影響しないことは確認している。制限酵素反応は 37°C で 10 分間行った。反応の停止は、制限酵素に添付されている 10 $\times$  Loading buffer (1% SDS, 50% Glycerol, 0.05% Bromophenol Blue) を 4 $\mu$ L 加えて行った。その後すぐにアガロースゲル (0.8%, 0.5 $\times$  TBE) 電気泳動を行った。#: *EcoR* I と *Not* I の働きを最大限にするは、この緩衝液が最適とされている。組成は、500 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dthiothreitol, 1000 mM NaCl (制限酵素の添付書類による)。\*: pEcoNot, pEcomNot とも、1 $\mu$ g ほどずつ使った。