

コハク酸脱水素酵素反応系を用いたクエン酸回路を網羅的に理解する実験教材の開発

理科 船井裕由、疋田健人¹、青木真理奈¹、加藤淳太郎¹
¹ 愛知教育大学 教育学部

新学習指導要領における高校理科の生物では、生物学の概念や原理・法則の理解を深めることに加え、科学的に探究するために必要な観察や実験などに関する基本的な技能を身につけるようにすること、観察、実験などを行い科学的に探究する力を養うことなどが記されている（文部科学省 2019）。これまでの知識理解に偏った授業形態を改善することは必要であるが、授業時間内に生徒自身が容易に行うことができ、完結することができる観察や探究する力を養成するような実験教材の開発もまた求められている。

今回、酵素液として乾燥酵母を用いて行った場合の基質やメチレンブルーの濃度についての条件を再検討した。さらに乾燥酵母とクエン酸回路にある基質を組み合わせる実験を行った結果、コハク酸脱水素酵素の脱水素反応にかかる時間がクエン酸回路の基質の順序通りになることが確認できた。これにより、コハク酸脱水素酵素単独の実験としてだけではなく、今回の実験系は、ツンベルク管の扱い、脱水素酵素や補酵素のはたらき、さらにクエン酸回路を俯瞰的に眺めることができる、包括的な実験教材となりうる可能性がある。

<キーワード> コハク酸脱水素酵素・クエン酸回路・ツンベルク管

1. はじめに

高校生物の「異化」の分野で最もよく教科書に記載されている実験が、ツンベルク管を用いたコハク酸脱水素酵素の実験である。一般に、ニワトリの胸筋をすりつぶした液、納豆、もやしのしぼり汁などに含まれるコハク酸脱水素酵素、基質となるコハク酸と無酸素状態で反応し、コハク酸から水素を引き抜くことによりフマル酸となる。この時、コハク酸脱水素酵素により引き抜かれた水素は補酵素 FAD に受け渡され、FADH₂となり、電子伝達系に受け渡される。メチレンブルーは、この FADH₂ よりも水素と親和性があるため、酸化型メチレンブルー（青色）が還元型メチレンブルー（白色）になる。この過程は呈色反応として視認可能であり、酵素の働きが簡易に確認できるという点と、特殊な実験器具であるツンベルク管を使用することから、管の使用方法も指導できるという点から本実験はよく授業で行われている。しかし、この実験は、脱水素酵素のはたらきや補酵素である FAD のはたらきを理解させるためには有用であるが、異化のクエン酸回路の理解のためには回路一反応のみを取り上げているに過ぎない（図 1）。一方、クエン酸回路においてメチレンブルーに水素を奪取される補酵素 FAD が使われるのはコハク酸脱水素酵素のみであることから本研究では、コハク酸脱水素の実験系を、クエン酸回路全体を網羅的に理解させる実験系に拡大することを、酵母を基質とする方法で試みた。

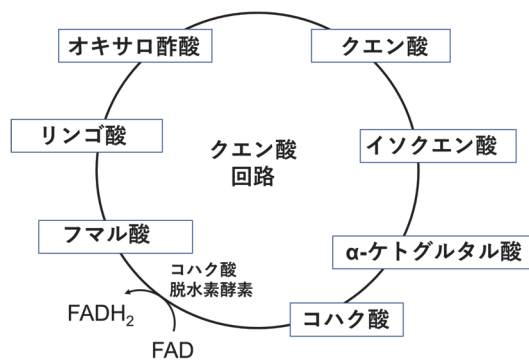


図 1 クエン酸回路の概略図

2. 実験および結果

(1) 脱水素反応を観察するために実験に必要なとなる溶液の濃度の再設定

酵素液、基質濃度、メチレンブルー濃度の記載は教科書毎に異なっていた(浅島ら 2017、吉里ら 2017、嶋田ら 2017、本川ら 2017、庄野ら 2017)。特に、メチレンブルーの添加については、数 mL 加えるものから、数滴加えるなどさまざまな表記であり網羅的に理化させる教材に発展させるためには、容量を決める必要があった。そこで、乾燥酵母の酵素液を 7mL、3% コハク酸水溶液を 2mL、0.003% から 0.010% に調整したメチレンブルー溶液 1mL の計 10mL として、メチレンブルーの脱色にかかる時間を計測した。また、コントロールとして基質の代わりに蒸留水を加え同様の実験を行った(表 1)。それぞれの実験は 3 回以上行い、データはその平均値である。

表 1 3%コハク酸二ナトリウムおよび蒸留水を加えた時のメチレンブルーの脱色時間の変化。脱色にかかった時間は全て分で示してある。

メチレンブルーの濃度(%)	0.003	0.005	0.006
3%コハク酸二ナトリウム	3.0	6.0	7.0
蒸留水	5.0	20.0	25.0
メチレンブルーの濃度(%)	0.007	0.008	0.010
3%コハク酸二ナトリウム	8.5	9.5	15.0
蒸留水	30.0	35.0	65.0

蒸留水を用いた実験においても、濃度に関わらず脱水素反応が見られた。これは、乾燥酵母中に基質となる物質が残っており、それを使った脱水素反応が起こったためと考えられた。高校の授業時間が 50 分であることを考えると、脱色が起こらない時間を対照実験とすれば、反応液中のメチレンブルーの濃度は 0.010% 以上が適当であると判断した。

(2) クエン酸回路内の基質を用いた脱水素酵素の実験

次に、酵素液 7mL、0.1%メチレンブルー溶液 1mL、クエン酸回路内の基質 2mL の計 10mL として脱水素酵素の実験を行った。各基質(クエン酸、 α -ケトグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸)は、3%コハク酸二ナトリウム溶液と同じモル濃度 0.20 mol/L になるように調整した。

しかし、いずれの基質においても、沈殿が生じ、脱色反応は見られなかった(図 2)。この沈殿は溶液が酸性になった結果、酵母が死滅したためだと判断した。そこで乾燥酵母を蒸留水に溶かすのではなく、0.1M-pH6.8 リン酸緩衝液に溶かした酵素液 7mL を使用して再度実験を行った。その結果を示す(表 2)。

表 2 pH6.8 リン酸緩衝液を用いた場合の各基質におけるメチレンブルーの脱色時間の変化。

基質	結果
コハク酸	脱色に30分かかった。
α -ケトグルタル酸	脱色反応は起こらず、沈殿が形成した。
フマル酸	脱色に70分かかった。
リンゴ酸	脱色に32分かかった。
オキサロ酢酸	脱色反応は起こらず、沈殿が形成した。

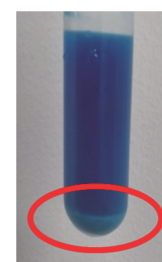


図 2 基質を蒸留水に溶かした場合に見られた沈殿。

クエン酸、フマル酸、リンゴ酸では脱色反応がみられたが、 α -ケトグルタル酸、オキサロ酢酸では先ほどの実験と同様に沈殿が形成し、脱色反応が見られなかった。また、フマル酸については、脱色にかかった時間が 70 分となり、50 分の授業では脱色反応が確認できない可能性が高いことがわかった。

これらの問題を解決するために、基質を酵素液同様 pH6.8 リン酸緩衝液に溶かすこと、基質の種類をナトリウム塩等に変更して再度実験を試みた。その結果、すべての基質で脱色反応を確認できた(図 3)。

3. 考察

本研究を通して、酵素液として乾燥酵母を用いた場合におけるコハク酸脱水素酵素の実験授業を行う時に必要な基質濃度とメチレンブルー濃度を再設定することができた。実際に、乾燥酵母とクエン酸回路上の5つの基質を組み合わせる実験を行った結果、脱色に要する時間は、クエン酸回路上の基質の並びとほぼ相関関係にあることが確認できた（図3、4）。

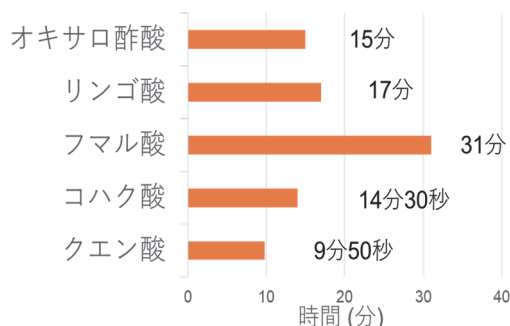


図3 各基質のナトリウム塩を用いた場合におけるメチレンブルーの脱色時間の変化。オキサロ酢酸のみリチウム塩を使用した。

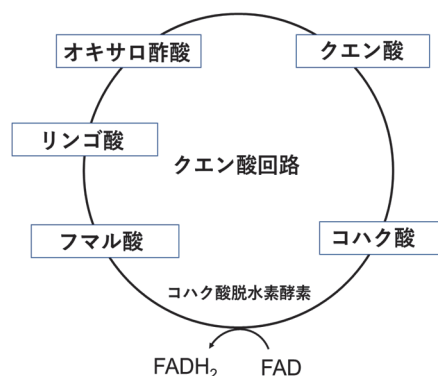


図4 本研究で用いた基質とコハク酸脱水素酵素との位置関係。

4. 授業実践

(1) 授業の流れおよび実験結果

次の方法で授業を実施した。生徒12名を2名1班の系6班に分けた。それぞれの班に基質（コハク酸、クエン酸、オキサロ酢酸、リンゴ酸、フマル酸、ピルビン酸）のいずれか一つを選ばせた。最初に、どのような順番で脱色反応が終了するかを予想させた。各々のツンベルク管毎に脱色を行い、反応開始から一定時間毎にツンベルク管内の色の変化の様子を確認させた（図5）。溶液の色が白色になった時点を反応の終点として、その時間をメモさせた。全ての班の脱色反応が終了した時点で（図6）、データを共有した（表3）。その結果からどのようなことがわかったか、クエン酸回路への理解が向上したかを記述させた。



図5 生徒が脱色反応を観察している様子。

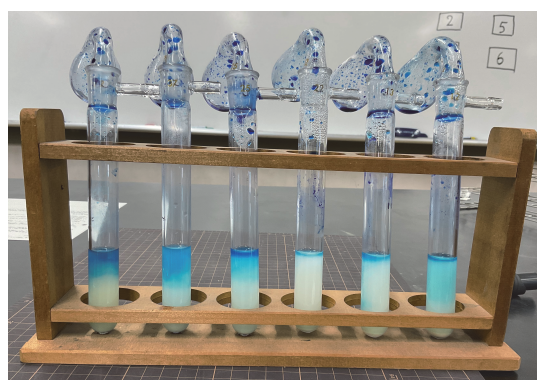


図6 授業で行った脱色反応の結果。

表3 授業で行った脱色反応の結果。

基質	コハク酸	クエン酸	オキサロ酢酸	リンゴ酸	フマル酸	ピルビン酸
時間(分)	24	21	29	32	35	28

(2) 授業実践後の考察 生徒のワークシートからわかったこと

まず初めに、どの基質から脱色反応が終了するか予想を立てさせた。この実験の鍵酵素であるコハク酸脱水素酵素がコハク酸からフマル酸に至る過程を触媒すること、クエン酸回路が回路状であることから考えて、コハク酸、クエン酸、オキサロ酢酸、リンゴ酸、フマル酸の順になるとほとんどの生徒が予想するであろうと考えていた。しかし実際はこの順番を無視した予想をたてた班の方が大半を占め、筆者らが意図した予想を最初からたてた班は6班中2班のみであった。これは、それぞれの基質でメチレンブルーの脱色にかかる時間がクエン酸回路上基質の並びと相関関係があることを生徒たちが直感的には見出すことができていなかったためではないかと予想された。

次に、実験終了後に各班のデータを共有した後で、脱色にかかった時間と今回用いた基質との関係性を改めて確認させた。「コハク酸脱水素酵素が触媒する反応にいたる過程が多いほど、反応時間が長いことがわかった。」と答えた班が6班中5班を占め、実験結果から相関関係を見出すことができたことが確認できた。今回の実験ではコハク酸とクエン酸の反応終了時間が、クエン酸回路上の基質の順番と逆転していたことに注目して、なぜクエン酸の方が反応終了時間が早かったのかを考えたり話し合う姿も見られた。予想や仮説通りの実験結果が得られなかったことに対して、その原因や再度実験を行う際に、どのような点に注目すれば良いかを生徒たち議論するよききっかけとなっていた。

最後に、本実験を通してクエン酸回路の理解が深まったか、という問いかけに対しては、すべての班で理解はより深まったと答えた。中には、「回路」とはどのようなものがはじめは理解できなかったが、この実験を通して「回路」とはどのような仕組みかを理解することができた、と答えた生徒もいたことから、この実験を通してクエン酸回路全体について理解を広げることができたと考えることができたことと評価した。コハク酸脱水素酵素の実験については実験を行った方が講義のみの学生よりも理解が深まるという報告されているが(武田と緩利 2019)、色々な基質で試すことにより、回路全体への理解へと発展させられることが本研究で示唆された。

5. まとめ

以上の結果および授業実践から、本研究はツンベルク管を用いて脱水素酵素や補酵素のはたらきを確認する実験としてだけでなく、クエン酸回路を包括的に理解・確認することが可能な実験教材になり得ることが示唆された。

6. 引用文献

- 文部科学省 (2019) 高等学校学習指導要領 (平成 30 年告示) 解説【理科編 理数編】
浅島誠 他 27 名 (2017) 改訂生物 東京書籍 p. 56
吉里勝利 他 20 名 (2017) 改訂生物 第一学習社 p. 91
嶋田正和 他 22 名 (2017) 改訂版生物 数研出版 p. 70
本川達雄、谷本英一 他 16 名 (2017) 生物改訂版 啓林館 p. 56
庄野邦彦、馬場昭次 他 18 名 (2017) 生物新訂版 実教出版 p. 114-117
武田 晃治、緩利 真奈美 (2019) FAD の色調変化に着目した実験教材の開発 教材研究学 第 30 巻 p. 19-26