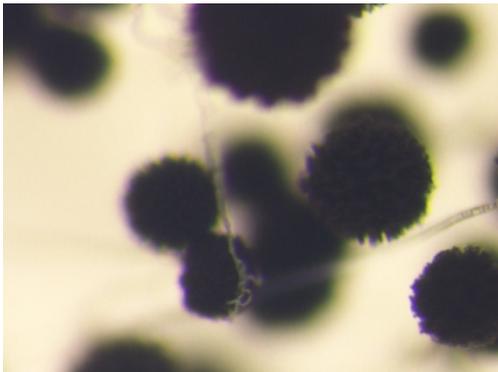


1. はじめに

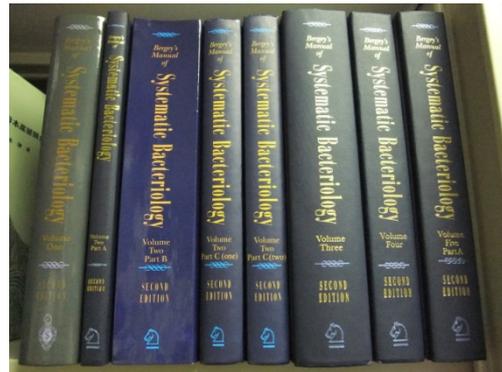
カビは抗生物質の生産などの医薬品への利用だけでなく、高い酵素生産能力から、消化剤のためのデンプン分解酵素（アミラーゼ）、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の生産等に用いられています。医工薬連環科学教育研究機構によるJSTサイエンスキャンプの初日では微生物を用いた物質生産について実験を通して酵素の特性分析を行います。3日目では、初日の酵素を電気泳動に分離後、活性染色を行います。また、カビおよびバクテリアの孢子を含めた細胞形態についての観察や、分子模型を用いてデンプンの構造と酵素の作用について考察します。

2. カビ、バクテリアの孢子とは

カビは真菌類に属する菌糸状の真核生物で孢子を形成します。一方、細菌（バクテリア）は外膜リポ多糖構造の有無に基づくグラム染色法によって大きくグラム陽性細菌とグラム陰性細菌に分類されます（詳しくは大阪薬科大学での2日目）。大腸菌や緑膿菌はグラム陰性細菌に属し、納豆菌の仲間である枯草菌や黄色ブドウ球菌はグラム陽性細菌に属します。菌株の同定には国際分類の指標であるBergey's Manualに従い、嫌気性、好気性、代謝の傾向、カタラーゼ活性の有無、16s rRNA配列の分子系統樹など様々な項目の調査結果から分類を行います。



黒カビの孢子と菌糸



Bergey's Manual

このグラム陽性細菌の中には飢餓条件下で栄養細胞内に孢子を形成する細菌がいます。これには納豆菌の仲間の枯草菌や、食中毒で問題になるセレウス菌や、2001年に米国でのバイオテロで使用された炭疽菌などがあります。また、孢子を形成する嫌気性細菌ではクロストディウム属の破傷風菌や、ボツリヌス菌が猛毒の食中毒細菌として有名です。カビや細菌孢子は同じ休眠状態の細胞ですが構造の違いだけでなく、細菌孢子の方が熱・圧力など物理処理や消毒剤など化学処理に対してはるかに高い耐性能を持つことから、食品製造分野や医療器具の殺滅処理などで常に問題となっています。こうした孢子を制御する主な手段として、物理的処理では、加熱殺菌（乾熱法、高圧湿熱殺菌法）、照射殺菌（ガンマ線、電子線、高周波）やろ過などの除菌操作があり、化学的処理では、過酸化水素蒸気、過酢酸、酸化エチレンガス、次亜塩素酸ナトリウム処理などがあります。

3. 微生物が利用される産業分野

現在までのカビ・酵母・細菌を利用した主な産業は以下のように区分できます。

酵素製剤	醸造・食品産業	有機酸発酵	医薬品	その他
デンプン分解酵素	味噌	クエン酸	抗生物質	各種ビタミン類
タンパク質分解酵素	醤油	イタコン酸	(ペニシリン等)	不飽和脂肪酸生産
油脂分解酵素	味醂	グルカン酸	生理活性ペプチド	環境浄化
セルラーゼ	清酒	フマル酸	・インスリン	細菌アリーチング
ペクチン分解酵素	焼酎	各種アミノ酸	・インターフェロン	バイオアッセイ
タンニン分解酵素	甘酒	各種核酸等	一本鎖抗体	
凝乳酵素	酢			
制限酵素等	熟脂			
	鯉節			
	エタノール製造			
	チーズ			
	ヨーグルト			
	漬物			
	パン			

4. カビと抗生物質

テレビドラマ「JIN-仁」(原作：村上もとか)では江戸時代にタイムスリップした現代の脳外科医(南方 仁)が江戸時代に手に入る材料や器具を用いて青カビを培養し、抗生物質ペニシリンの精製をフィクションとして描写しています。実際には1929年にイギリスのアレクサンダー・フレミングがブドウ球菌の培養実験中に混入した青カビ(*Penicillium notatum*)のコロニー周囲の阻止円(ブドウ球菌の生育が阻止される透明のゾーン)からペニシリンを発見しました(その他にもフレミングはクシャミをして鼻水で培養シャーレを汚染したことをきっかけに体液に含まれるリゾチームの溶菌活性も発見しています)。しかし、この発見は当初は注目を集めることはありませんでした。それから11年後の1940年にFlorey(フローリー)とChain(チェイン)によりペニシリンが単離精製され、その翌年の1941年に臨床実験により抗菌活性が確認され、感染症の治療薬として実用化されました。その後、ペニシリンの感染症治療への多大な貢献が認められ、フレミング、フローリー、チェインらに1945年度のノーベル医学・生理学賞が授与されています。一方、一般的にはあまり知られていませんが、日本ではフレミングの抗生物質の発見に先立って1907年に斎藤賢道が、麹カビ(*Aspergillus oryzae*)がコウジ酸を生産し、このコウジ酸が細菌やカビの増殖阻害効果を明らかにしており、1912年には藪田貞次郎がコウジ酸の構造を決定しています。ペニシリンをはじめ多くの抗生物質は培養後期に生産される二次代謝産物です。



アレクサンダー・フレミングの記念切手



ペニシリンによる阻止円の形成

フレミングの青カビのペニシリン生産量は、培養液 1ml あたり 0.2~2 単位でしたが、新規な生産株のスクリーニングや、その株にX線や紫外線照射して突然変異を繰り返すことで、1 万単位という 5,000~50,000 倍の優良生産株が分離されました。こうした人工突然変異は、その後、アミノ酸発酵、核酸発酵などの製造分野でも生産株の改良に応用され、多大な成果を上げました。さらに新規な天然抗生物質の探索が、カビだけでなく放線菌などに広がられていきました。また、天然のペニシリンを出発材料とし、それに化学修飾を施した半合成ペニシリンや、化学的に全合成された合成ペニシリンなども開発されています。これらの抗生物質はその劇的な効果と利便性から医療現場で多用されるようになりましたが、その反面、抗生物質の効かない薬剤耐性菌を生み出す結果となり、院内感染など現在の医療現場において深刻な問題となっています。なかでもバンコマイシン耐性菌の出現は、医療分野以外に養豚や養鶏など畜産分野で病気の予防以外の目的として早く太らせる（腸内細菌死滅によるアミノ酸放出による効果）ために食餌に抗生物質を添加したことが出現の原因になったと考えられています。

5. 微生物由来の酵素の利用

一方、カビ由来の分解酵素の中には、消化を助ける胃腸薬として使用されているものがあります。医薬品としての利用される主な消化酵素としてアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなどの酵素製剤があります。これらの酵素製剤は、細胞外に分泌するなど精製に適したものが好まれます。現在、一般に販売されている胃腸薬には酵素以外では過剰な胃酸を中和するための炭酸ナトリウムや生薬成分などが含まれているものもあります。

日本では古来より酒造において麹カビを利用して米や麦などの穀類やサツマイモに含まれるデンプンを糖化するために用いられてきました。魏志倭人伝まで遡ると倭国におけるクチカミの酒など唾液アミラーゼによる糖化の記述があります。日本をはじめとしたアジア諸国の温暖湿润気候下ではカビの糖化能力が主に用いられてきましたが、西洋のビール・ウィスキーなどでは麦芽に含まれるアミラーゼが利用され、世界的にはこれら二大系統に分類されます。こうしたデンプン分解と発酵によるエタノール生産は、バイオ燃料の分野でも現在脚光を浴びています。日本酒では米の糖化プロセスにおいて麹カビのアミラーゼだけでなく、プロテアーゼによる米のタンパク質成分の分解も同時行われます。カビ由来の特殊なプロテアーゼの利用としてはチーズの製造に用いられる凝乳酵素レンネットがあります。レンネットとは仔牛などの偶蹄類の第四胃に含まれる母乳消化のためのタンパク質分解酵素ですが、この酵素が乳カゼインを弱く分解することでタンパク質変性による凝集が起こり、チーズ製造に利用されます。このレンネットを得るために

仔牛を屠殺する必要があったのですが、有馬啓によりムコール属のカビから微生物レンネットが発見され、現在はムコールのレンネットや、これを微生物組換え体を用いて生産された微生物レンネットが、伝統製法のチーズ以外では広く使用されるようになりました。さらにプロテアーゼ利用の変った例では洗濯洗剤に含まれる好アルカリ性微生物由来のプロテアーゼ、セルラーゼ、リパーゼなどがあります。これらは少量で洗浄効果の向上をもたらしたことから、洗濯洗剤容器の小型軽量化などの流通革命を引き起こしました。

しかしこうした分解酵素は微生物だけでなく、日常の食材や人間自身も有しています。ヒトの唾液、胃液、膵液に含まれる消化酵素がそれですが、例えば納豆では大豆に付着した納豆菌が細胞外に分泌する細胞外酵素の中にアミラーゼやプロテアーゼが含まれています。また、大根にも消化酵素は含まれており、お餅やご飯に納豆やダイコンおろしをのせて食べるなど、日本の伝統食では知らず知らずのうちに外部からの消化酵素の補充による恩恵を受けていました。日本では古くからカビを有用物質の生産に用いてきました。代表的な発酵食品である日本酒では麹黴（コウジカビ）が、沖縄の蒸溜酒である泡盛などの焼酎では黒コウジカビが米のデンプンを分解する糖化のプロセスに使われています。世界一硬い食品とされる鯉節もカビにより熟成され、イノシン酸が増加します。また、豆腐の発酵食品である豆腐ようでは紅コウジカビが使われています。



ゴルゴンゾーラチーズ



テンペ



豆腐よう

一方、海外では中国の紹興酒やインドネシアの大豆の発酵食品テンペではクモノスカビなどが使われています。さらに西洋のゴルゴンゾーラなどのブルーチーズではペニシリウム属の青カビが、カモンベールチーズでは白カビがチーズの熟成に使用されています。伝統的な発酵食品は健康に良いと注目されていますが、伝統食品に用いられる安全なカビを材料にして人体に有用な機能性のある生理活性物質の探索が現在も進められています。このようにカビは抗生物質の生産や酵素製剤の生産、発酵食品などに広く有効利用されていますが反面、発がん性を持つカビ毒アフラトキシンの生産や真菌症などの感染症や住環境や文化財の汚染などの被害を与える株もあり、必ずしも人間に恩恵をもたらすだけの存在ではありません。微生物に対するバイオテクノロジーには、生産などの有効利用（ポジティブバイオテクノロジー）と制圧などの負の制御（ネガティブバイオテクノロジー）という2つ視点が必要です。

6. ヒトの消化について

6-1. 代謝と酵素

生物は生体外から必要な物質を取り入れ、不要となった物質を排出しています。その中では大きく二つの反応が行われており、それは、取り入れた物質を材料として新たな物質、つまり体を構成する化学的に複雑な物質を合成（同化）と取り入れた物質や合成した物質を分解（異化）の反応に分けられます。この反応を代謝とよび、代謝を触媒するものは全て酵素で行われています。代謝の過程では、化学反応の変化に伴ってエネルギーの出入りが起きています。これをエネルギー代謝と呼び、この代謝でエネルギー放出と吸収反応の仲立ちを行う重要な役割を果たしているのが ATP（アデノシン三リン酸）です。ATP は ATP を生成する際にエネルギーを蓄積することができ、ATP を ADP に分解する際にエネルギーを放出します。生体内において、グルコースは酸素を必要としない解糖系（EMP 経路）を経て分子のピルビン酸になり、2分子のピルビン酸は、クエン酸回路（TCA サイクル）を経て6分子の二酸化炭素に分解されます。この一連の生成物の一つは、電子伝達系にて ATP 生成に用いられ、グルコース1分子より、38分子の ATP を生成することになります。その後、生成された ATP はエネルギーとして利用されます。この一連の代謝を触媒しているのは全て酵素です。

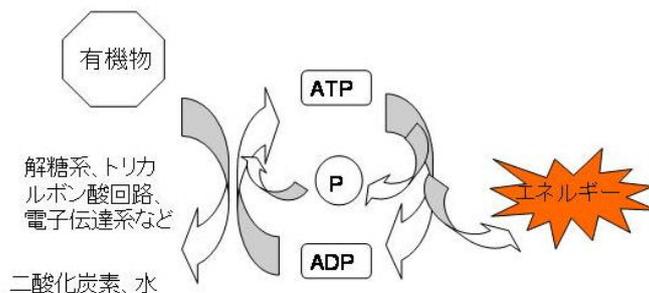


図1 生体内でのエネルギー変換とATP

6-2. ヒトの消化について

ヒトは他の動物と同じように、他の生物を食べて生きています。なぜなら、自分で栄養を作ることができない従属栄養生物だからです。他の生物は大きすぎてそのまま体の中に取り入れることができません。

食べ物は、主に炭水化物（デンプンなど）、タンパク質、脂肪でできています。これらの栄養は、炭水化物と脂肪は、ATP を生成するために主に利用され、タンパク質は筋肉や体の成分（皮膚、髪、骨など）の材料となっています。しかし、食べたそのまま利用できるのではなく、タンパク質は 20 種類のアミノ酸に分解され、デンプンなどの多糖は、グルコースなどに分解されて吸収されます。このように食べ物に含まれる栄養素を小さい分子に分解する作用を消化と呼んでいます。消化によって、炭水化物はグルコース、タンパク質はアミノ酸、脂肪は脂肪酸とグリセリンにまで分解され、吸収されます。

消化を行うのは口から肛門までのひとつながりとなった管で、消化管と呼ばれます。消化管は、口、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸、肛門などに分けられます。

食べ物が消化管に入ると、消化器官から消化液が分泌されます。消化器官ごとに異なる消化液（図2）が分泌され、それぞれの消化液の中には特定の消化酵素が含まれています。消化酵素は、タンパク質、脂肪、炭水化物を分解する働きをもっている。最終的に、消化器官は、消化器官を通り抜けるたびに、炭水化物、タンパク質や脂肪を次々に消化する。

	口腔、咽頭、食道（唾液）	胃（胃液）	小腸内腔（胆汁）	小腸上皮（腸液）	
炭水化物消化の消化	アミラーゼ 多糖類 (デンプン、グリコーゲン)		アミラーゼ 多糖類、小分子多糖類、 二糖類（マルトースなど）	マルターゼ スクラーゼ ラクターゼ 二糖類	単糖類（グルコース、 スクロースなど）
タンパク質の消化		ペプシノーゲン ↓ +HCl ペプシン タンパク質 ↓ 小分子ポリペプチド	カルボキシペプチダーゼ トリプシノーゲン ポリペプチド ↓ 小分子ポリペプチド	トリプシノーゲン ↓ ←エンテロキナーゼ トリプシン カルボキシペプチダーゼ シペプチダーゼ アミノペプチダーゼ 小分子ポリペプチド	アミノ酸
脂肪の消化			胆汁 リパーゼ 脂肪球	グリセロール、脂肪酸	
核酸の消化			ヌクレアーゼ DNA、RNA	ヌクレオチダーゼ ヌクレオシダーゼ、 ホスファターゼ ヌクチオチド ↓ ヌクレオシド	窒素塩基、糖、リン酸塩

図 2. 栄養源の消化酵素について

- 1) **口** 食べ物は最初に口の中で歯によって咀嚼され、細かく碎かれます。唾液腺から唾液が大量に分泌され、舌によって食べ物と唾液を十分に混ぜ合わせます。唾液の中には、アミラーゼという消化酵素（図 2）が含まれている。この作用によって、唾液中でデンプンは大まかに分解されて、麦芽糖（マルトース）になります。
- 2) **食道** 飲み込まれた食べ物（細くなったもの）は、食道に送られる。食道は柔らかな管で、ぜん動運動によって食べ物を胃まで送られます。
- 3) **胃** 胃から胃液が分泌されます。胃液にはペプシンという消化酵素であるプロテアーゼと塩酸が含まれています。ペプシンはタンパク質を分解する酵素で、肉などを表面から少しずつアミノ酸に分解します。塩酸は食べ物の組織を柔らかくし、食べ物に含まれる菌類や細菌を殺菌する作用を持っています。食べ物は、胃の中で 2,3 時間留まり、溶解されます。
- 4) **十二指腸** 胃と小腸を結ぶ約 30cm の管です。ここでは、膵臓から分泌されるすい液と、肝臓から分泌され、胆のうに蓄積された胆汁が分泌されます。すい液にはタンパク質を分解するトリプシン、デンプンを分解するアミラーゼ、マルトースを分解するマルターゼ、脂肪を分解するリパーゼなどの消化酵素が含まれています。胆汁には酵素は含まれませんが、脂肪を乳化して水溶化し、リパーゼの分解を助ける役目をしています。
- 5) **小腸** 小腸では消化と吸収が行われます。十二指腸で混合された各消化酵素を含んでいるすい液と分解途中の食べ物は、小腸でよくかき混ぜられ、さらに小さく分解され、消化が促進されます。最終的な消化を行う消化酵素は小腸の微柔毛についており、マルターゼ、サッカラーゼ（ショ糖をグルコースとフルクトースへ）ペプチダーゼなどがあります。完全に消化されて生じたグルコースなどの糖、アミノ酸、脂肪酸は毛細血管またはリンパ管を経由して吸収されます。

今回のサマーサイエンスキャンプの実験では、食品に用いられる安全なカビやバクテリアを生きた状態の出発材料として観察し、これらから直接粗酵素を抽出します。そして、精製品として販売されている酵素や、消化酵素が含まれた医薬品（消化薬）も用いて、その酵素活性の特性の比較を行います。対象物質は異なりますが、抗生物質の精製に取り組んだ初期の研究者を追体験するような気持ちで実験に取り組んでいただければ幸いです。

1 日目 (8月21日 (火))

1. カビ、バクテリア、葉からの消化酵素を抽出と酵素の特性

「目的」医薬品としても用いられる消化酵素を、カビまたはバクテリアという生物材料からの抽出を経験し、実際に医薬品に含まれる消化酵素と比較し、酵素に対しての理解を深めることを目的とする。本実験を通して生物材料からの酵素の粗精製と簡易活性評価の概要を理解し、製剤化された胃腸薬に含まれる酵素のまたその酵素活性の pH 反応特性から体内のどこで作用するのかを考察する。

「実験材料と方法」

供試菌

- ・ *Aspergillus oryzae* NBRC 30102 (酒造用の黄コウジカビ)
- ・ *Aspergillus awamori* NBRC 4033 (酒造用の黒コウジカビ)
- ・ *Bacillus subtilis natto* (市販納豆由来の分離株、グラム陽性の好気性芽胞形成細菌)

- ・ 滅菌済みコーヒーフィルタードロッパー
- ・ 滅菌済みフィルター
- ・ 10ml シリンジ
- ・ ゴムヘラ
- ・ 0.45 μ m フィルター
- ・ ディスポーザブル手袋
- ・ マスク (粉塵保護用)
- ・ ゴーグル (粉塵保護用)
- ・ アルミキャップ付き滅菌済み試験管 (480 本)
- ・ 1%可溶性デンプン含有リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 5 班 \times (10 本 \times 2 サンプル+ネガティブコントロール 1 本) =105 本 (500ml 耐熱瓶)
- ・ 1%可溶性デンプン含有各種 pH 緩衝液 9 本 \times 5 班 \times (2 サンプル+1 ネガティブコントロール) = (pH2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) 135 本 (50ml バイアル瓶 \times 2 本)

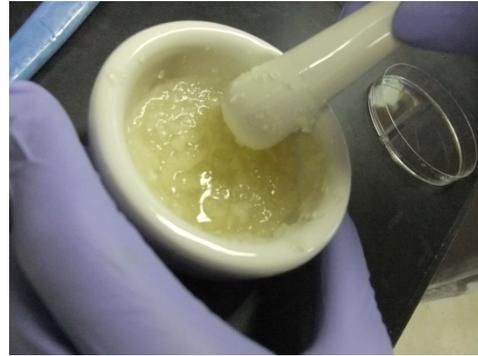
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. awamori</i>	<i>B. subtilis</i>
α -アミラーゼ	1 班	3 班	5 班
胃腸薬	2 班	4 班	

- ・ 活性測定用の塩酸含有ヨウ素溶液 (各 5ml が 240 本)
- ・ リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) (酵素希釈用、カビ、バクテリア懸濁用)
- ・ 吸光度計 5 台と・ 3ml ガラスキュベット (5つ)
- ・ ピペットマン 1000 μ l \times 5 本、200 μ l \times 5 本、20 μ l \times 5 本
- ・ ボルテックスミキサー各班 1 台 \times 5 台
- ・ チップ (1000 μ l、200 μ l)
- ・ ヨウ素-ヨウ化カリウム溶液
- ・ 乳鉢
- ・ スクリューキャップの遠心管 15ml (20 本)

- ・マイクロチューブ
- ・ α -アミラーゼ（酵素標品）
- ・タカジア錠
- ・強力わかもと
- ・水槽インキュベーター（5台）

方法

- ① マスク、保護メガネ、白衣を着用する。
- ② 菌体培養シャーレの寒天ゲルごとゴムヘラで掻きとり、乳鉢に集め、すりつぶす。20ml の PBS（ホスフェートバッファーサラリン）を添加し、さらにすりつぶす。



- ③ 滅菌済みピーカーの上に滅菌済みフィルターをセットした滅菌済みコーヒードリッパーを設置する。すりつぶした菌体液を濾過する。次にろ液を 0.45 μ m フィルターをセットしたシリンジで受け、フィルターろ過し、1.5ml マイクロチューブに集める（粗酵素液）。



- ④ 次にろ液を 0.45 μ m フィルターをセットしたシリンジで受け、フィルターろ過し、1.5ml マイクロチューブに集める（粗酵素液）。



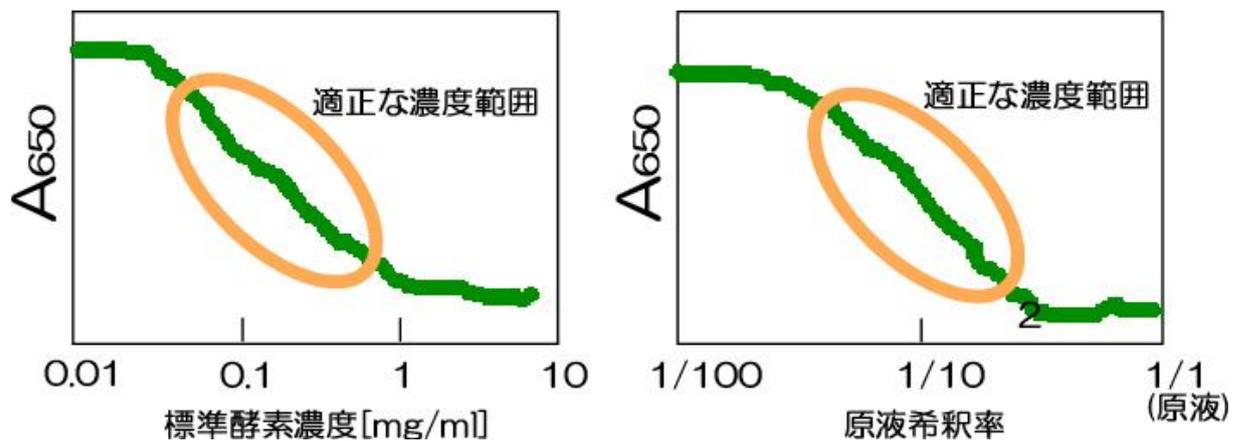
- ⑤ 酵素標品として α -アミラーゼ溶液（10mg/ml）をリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で下記のような希釈段階をつくる。同様に胃腸薬（10mg/ml）およびカビ抽出液（未知濃度）も原液および希釈段階をつくる（納豆菌は活性が高い。カビはかなり活性が低い）。酵素なしはネガティブコントロールとして PBS を 100 μ l 添加する。

原液 [mg/ml]	2 倍 希釈	5 倍 希釈	10 倍 希 釈	20 倍 希釈	50 倍 希釈	100 倍 希 釈	200 倍 希 釈	500 倍 希 釈	1000 倍 希 釈	酵素 なし 対照
10	5	2	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01	0

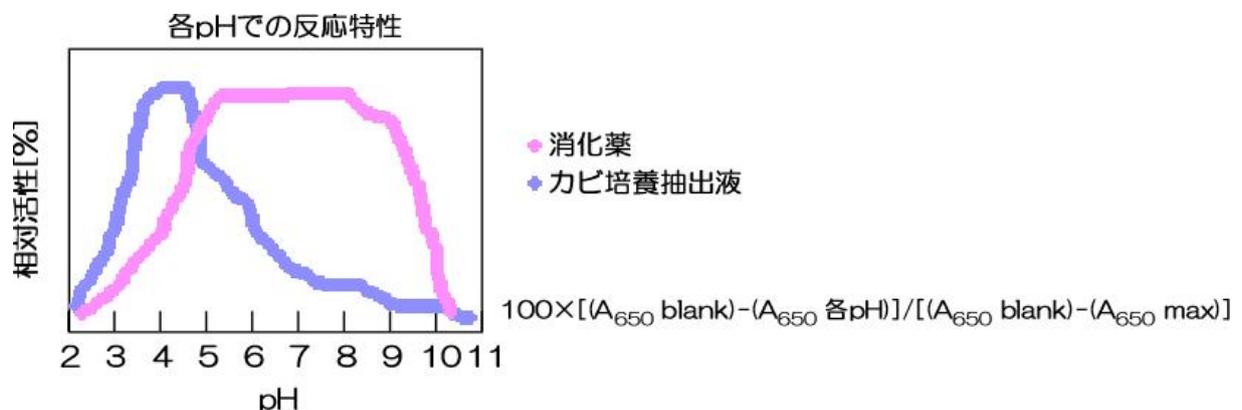
- ⑥ 2ml の 1%溶性デンプン含有 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) の入った試験管を 37℃で予備保温する。次に⑤の酵素液、胃腸薬溶液、微生物抽出液を 100 μ l 添加する。
- ⑦ ⑥の反応溶液を 5 分間反応後、50 μ l を分取し、5ml の塩酸含有ヨウ素溶液に添加し、反応を停止させる。
- ⑧ 吸光度計の吸収波長 650nm (A_{650}) に設定し、セルに Milli-Q 水を添加し、ゼロ点設定する。
- ⑨ ⑦の反応停止液を吸収波長 650nm (A_{650}) で測定する。

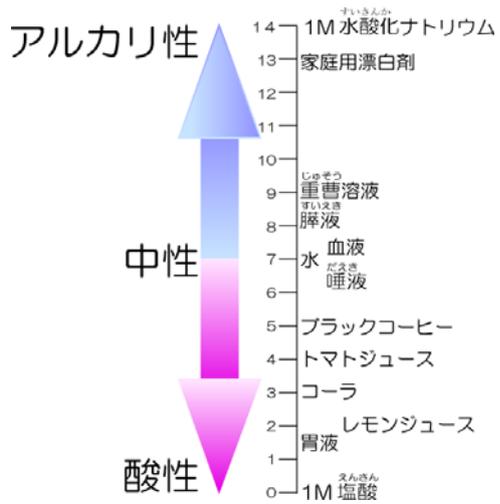
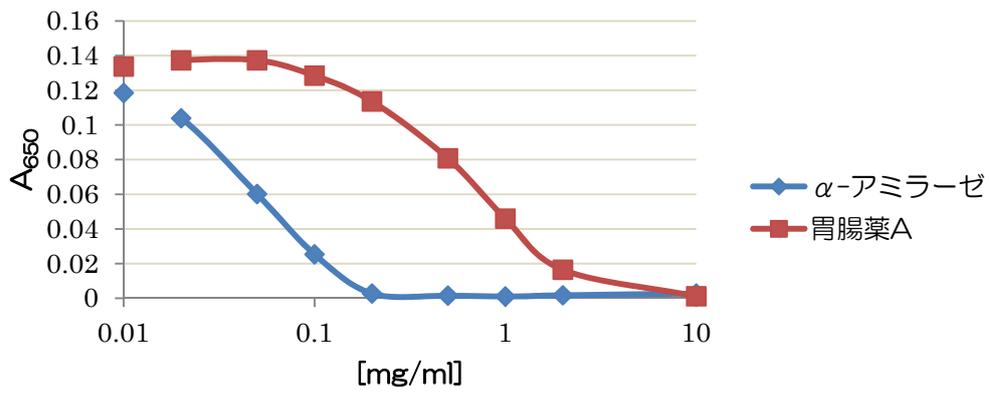


- ⑩ 横軸を酵素の濃度または希釈倍率、縦軸を A_{650} として通常のグラフ、片対数グラフでプロットする。
- ⑪ グラフから各酵素溶液の反応が完全に進みきらない条件と反応を検出可能条件の範囲を決定する (粗酵素液の濃度の活性と検出限界とエンドポイントの関係)



- ⑫ ⑪の上記の条件で α -アミラーゼ標品、胃腸薬、カビ抽出液の活性が同じになるよう、希釈倍率を決定し、次は各 pH の 1%デンプン含有反応緩衝液中で⑧~⑪と同様に処理してグラフにプロットし、pH 反応特性を調べる。





三日目（8月23日（木））

2. カビ、バクテリア、胃腸薬に含まれるデンプン分解酵素の活性染色による検出

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法はアクリルアミドゲルの分子のふるいにかけてタンパク質を分子量の大きさで分離する非常にポピュラーな手法です。大きなタンパク質は遅く移動し、小さなタンパク質ほど速く移動します。これにはタンパク質を負に帯電させる陰イオン系界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた SDS-PAGE 法が細胞のタンパク質の発現パターンや分子量の決定に頻繁に利用され、質量分析装置（タンパク質などの高分子を真空中でレーザー照射などでイオン化させ、その飛行時間や検出強度のマススペクトルを取得する方法で島津製作所の田中耕一氏はノーベル化学賞を受賞しています）と併用することでタンパク質の同定にも使用されています。

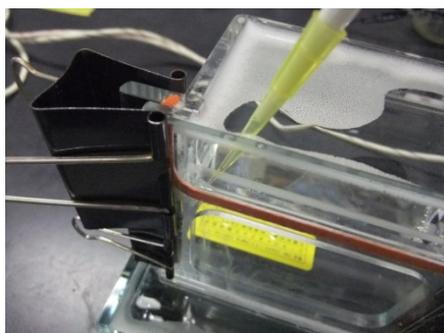
このPAGEには多くの変法があり、SDSなどの変性剤を用いないNative-PAGEや、一次元目に等電点電気泳動を用い、二次元目にSDS-PAGEを用いる分子量と等電点で分離する二次元電気泳動などがあります。その他にもタンパク質内のジスルフィド結合の有無を調査する対角線電気泳動法や、酵素活性を検出する活性染色法などがあります。この活性染色法には、対象とする酵素の基質をゲル内に封入するタイプと、泳動後に基質を後染して染色する方法があります。こうした方法は可視的な変化を追跡できる酵素に限られます。一方、酵素とその阻害剤の相互作用を利用して特定の酵素を検出するケースもあり、抗生物質ペニシリンの直接の作用機作の解明に用いられました。これは¹⁴Cの放射性同位体を含むペニシリンと細菌の細胞破砕液とを混合し、熱変性せずにSDS-PAGEにて泳動後、分離ゲルをX線フィルム感光させ、ペニシリンと結合した複数のタンパク質のバンドは、ペニシリン結合タンパク質 (PBP) と名付けられました。後にPBPの正体は細胞壁のペプチドグリカン合成する酵素で、ペニシリンはこれを阻害していたことが解明されました。ペニシリンは細胞壁合成の阻害剤で静菌作用を持ち、溶菌そのものは細胞分裂に働く自己のペプチドグリカン分解酵素が関与していました。このペプチドグリカン分解酵素も分離ゲルの基質のペプチドグリカン含有させることで酵素活性を検出することが可能です。

今回の実験では、カビ・バクテリアの生物由来の酵素や、胃腸薬に含まれる消化酵素のなかのデンプン分解酵素（アミラーゼ）の活性をについて活性染色法で分析します。

「目的」初日に酵素活性を調査したカビおよびバクテリア由来の粗酵素液と医薬品に含まれる消化酵素アミラーゼを活性染色ゲルで電気泳動により分離して、分子量を算出します。

「方法」

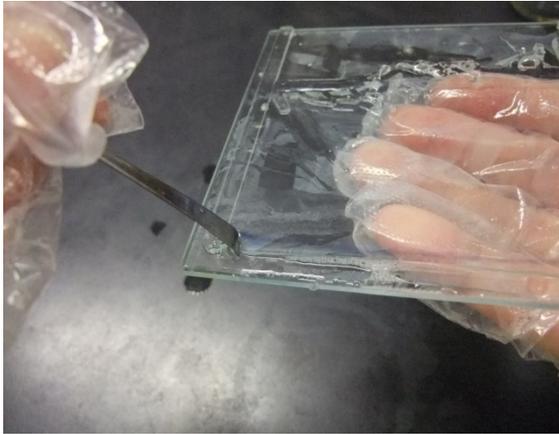
- ① 各サンプルを分離ゲルに0.5%デンプンを基質として含むNative-PAGE(分離ゲル7.5%アクリルアミド)のウェルに分子量マーカー、 α -アミラーゼ、胃腸薬、カビ抽出液を重ねる。



- ② 25mA一定、100V（開始時100Vで上限200V）で泳動を開始し、タンパク質を分離す

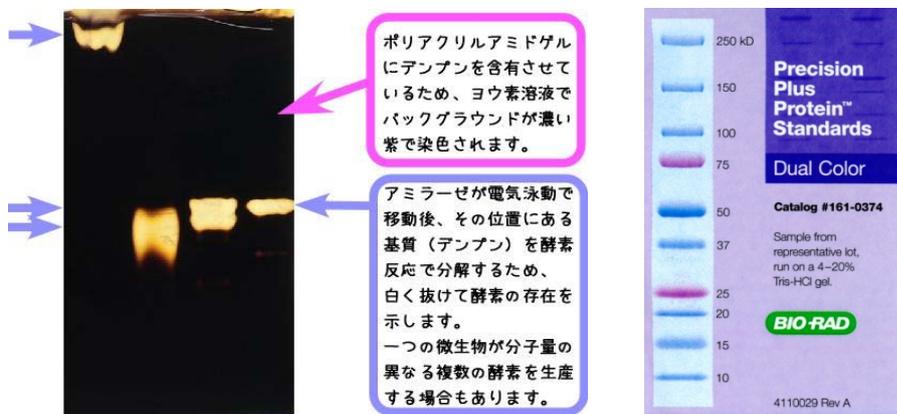
る。(待ち時間は約 1 時間 20 分)

- ③ プロモフェノールブルーのラインが下部に到達後に泳動終了する。染色済み分子量マーカースのバンドを含むゲル全体を写真撮影する(分子量マーカースの分子量と Rf 値で標準曲線を作成する)。
- ④ 泳動後のゲルの下部に上下と左右が分かるように目印の切れ込みを入れ、泳動ゲルを 50mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) で張ったタッパー内で 37°C、1 時間保温する。



- ⑤ 活性染色用のヨウ素溶液にて染色する。
- ⑥ ゲルを写真撮影し、活性バンドの Rf 値を求め、標準曲線から各活性バンドの分子量を求める。

次に行う 3.と 4.の実験は電気泳動の待ち時間に行う。3.を行う班と 4.を行う班に二手に別れ、適当な時間(40 分くらい)で実験内容を交代する。



3. カビとバクテリアの細胞形態の顕微鏡観察

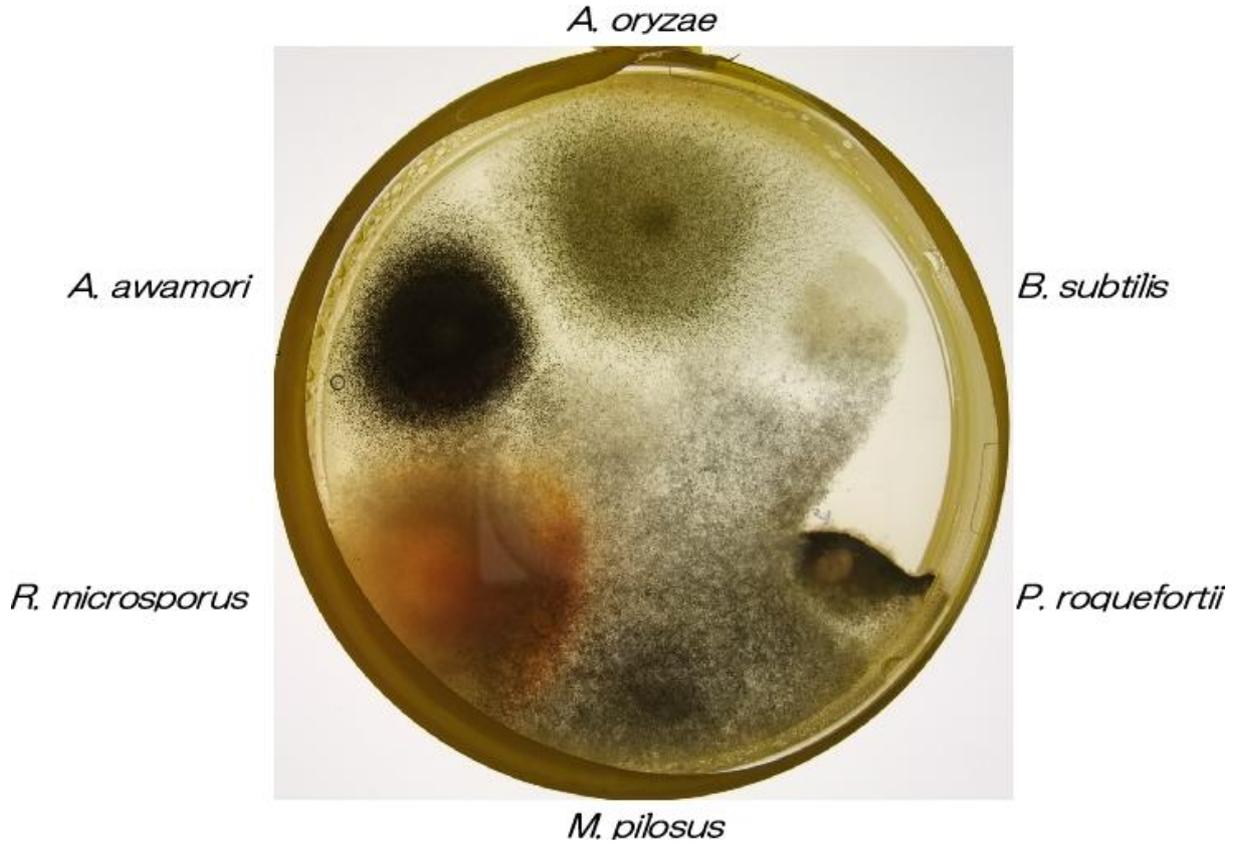
「目的」

カビやバクテリアの中には増殖期の栄養細胞以外にも孢子という形態をとることが知られています。バクテリアやカビの細胞や孢子を、光学顕微鏡や実体顕微鏡で観察比較して微生物の細胞構造への理解を深めることを目的とします。

「方法」

- ① カビ群はプレート上の菌体を実体顕微鏡にて観察し、写真撮影する(孢子や菌糸)。
- ② 納豆菌の栄養細胞および孢子は光学顕微鏡にて観察する。さらに納豆菌孢子には発芽誘導剤を添加した系でも光学顕微鏡観察し、発芽後孢子との違いを観察し、写真撮影する。

- *Aspergillus oryzae* NBRC 30102 (酒造用の黄コウジカビ)
- *Aspergillus awamori* NBRC 4033 (酒造用の黒コウジカビ)
- *Monascus pilosus* NBRC 4520 (豆腐よりの紅コウジカビ)
- *Rhizopus microsporus* NBRC 32003 (発酵食品テンペのクモノスカビ)
- *Penicillium roquefortii* NBRC 4622 (ブルーチーズの青カビ)
- *Bacillus subtilis natto* (市販納豆由来の分離株、グラム陽性の好気性芽胞形成細菌)



双眼実体顕微鏡



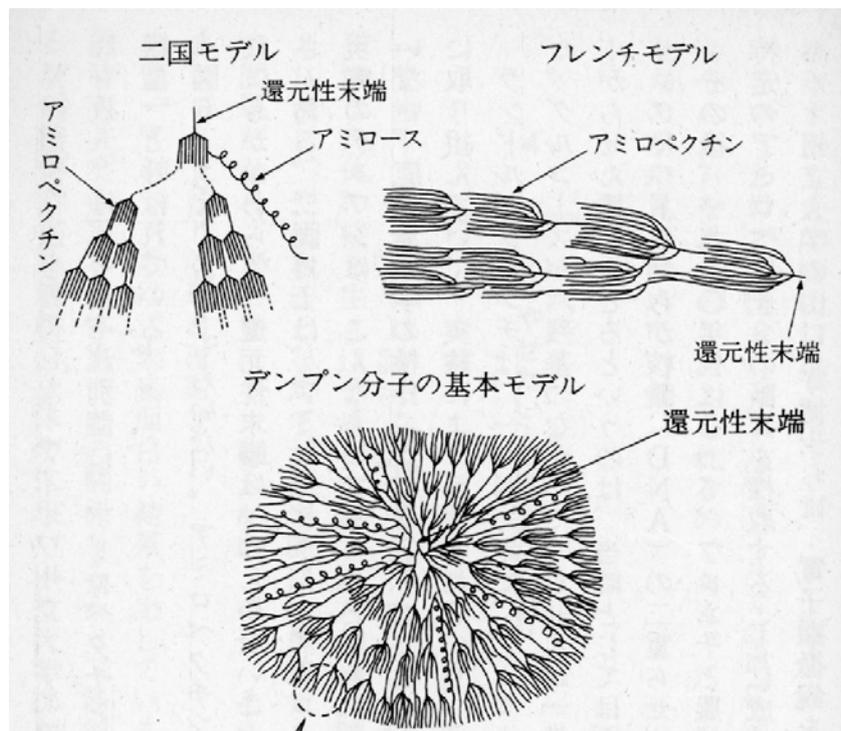
光学顕微鏡



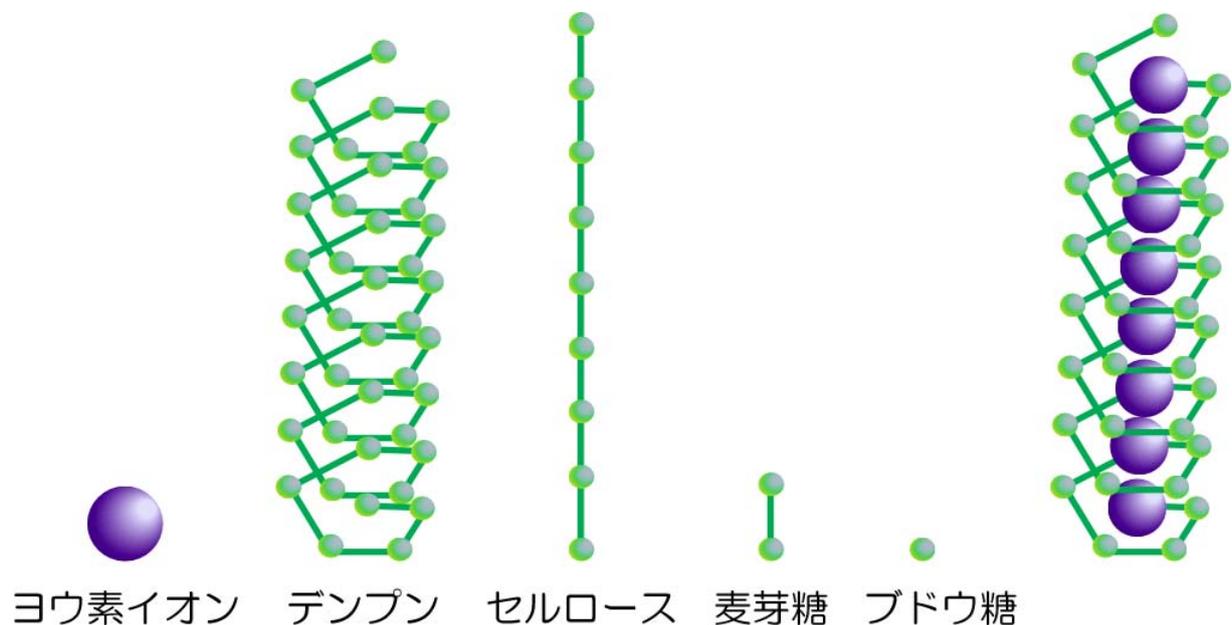
4. 分子模型を用いたデンプン構造のモデリング

「目的」分子模型を用いてヨウ素-デンプン反応や酵素の作用部位に対する分子レベルでの理解を深める。

デンプンはグルコース分子の α 1-4結合によるアミロース構造と、 α 1-6結合によって分岐したアミロペクチン構造からなる高次構造体を形成しています。 α 1-4結合の長い直鎖構造はグルコース分子6個で一回転する左巻きのらせん構造です。単独らせん構造や、二重らせん構造を形成し、ヨウ素-デンプン反応の紫色の呈色は、このアミロースのらせん構造にヨウ素イオンが入り込むためだと考えられています。 α -アミラーゼは α 1-4結合をランダムに切断する酵素として働き、オリゴ糖や麦芽糖を生成します。 α 1-6結合はグルコアミラーゼが切断します。

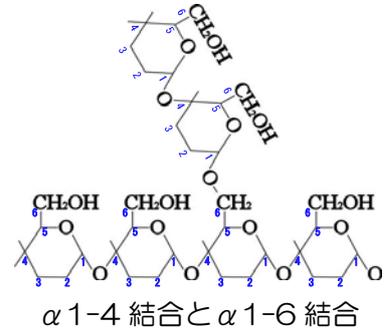
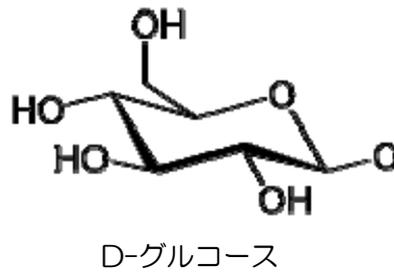
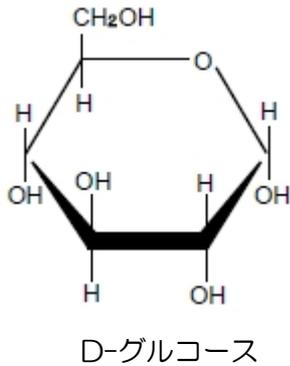


デンプン構造モデル (「生命にとって糖とは何か」大西正健(1992) p131 より)



「課題」

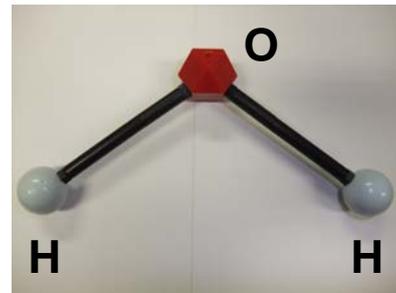
- ① HGS 分子模型で D-グルコース構造を構築して下さい。
- ② グルコース構造同士を、 α 1-4 結合および α 1-6 結合を構築して下さい。
- ③ 6 つのグルコースを α 1-4 結合し、デンプン分子のらせん構造によるヨウ素原子のトラップを立体構造で表現して下さい。
- ④ 上記の①、②、③で作成した分子模型構造を写真撮影する。



「実験材料」



炭素原子



水分子 (H₂O)

HGS 分子模型

デジタルカメラ

写真用小型プリンター

写真用光沢印字紙

「まとめ」

下記のデータの適当なものをピックアップしてストーリー性があるようにレイアウトしてポスターを作成して下さい。

写真 (カビとバクテリアのコロニー、細胞、胞子の違いの写真、電気泳動による活性染色、デンプン-ヨウ素反応の分子構造モデル)

グラフ (標準曲線からの活性、標準曲線からの分子量、反応 pH 特性グラフ、酵素間の活性の比較)、

表 (各酵素の性質まとめ)。

医薬品に含まれる酵素の特性は？

サイエンスキャンプ
各テーマのつながり

薬のシード発見から製品まで

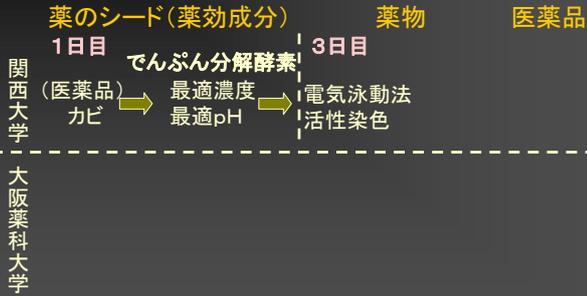
薬のシード(薬効成分)	薬物	医薬品
-------------	----	-----

薬のシード発見から製品まで

薬のシード(薬効成分)	薬物	医薬品
1日目 関西大学 (医薬品)カビ	でんぷん分解酵素 最適濃度 最適pH	

大阪薬科大学

薬のシード発見から製品まで



薬のシード発見から製品まで



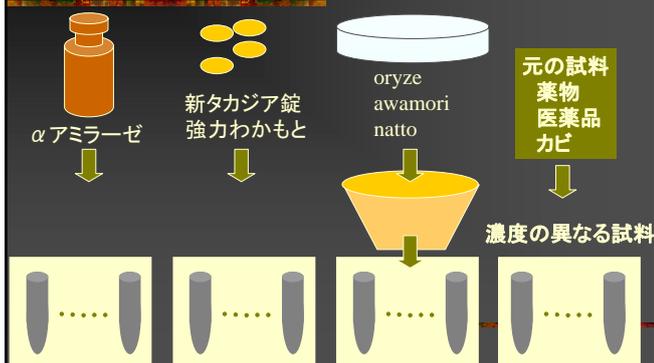
薬のシード発見から製品まで



1日目の実験 薬効成分を知る

- 薬効成分の抽出
(でんぷん分解酵素)
- 各試料のでんぷん分解作用が高い濃度は?
(3日目に活性を比較するための準備実験)
- 各試料のでんぷん分解作用を活かすpHは?
(体内へ吸収されるために必要な環境)

step1 試料の準備



step2 最適濃度は?



step3 最適反応pHは?(胃?腸?)

3種類の試料の持つ分解作用を最大にする環境のpHを観察

pH2~10の範囲

分解作用が強いと色は薄くなる

吸光度計で計測

活性の高いpHは??

1日目の実験結果のまとめ

	濃度	pH	参考値
α	$\frac{1}{50}$, $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{100}$		6~7
タカジア	$\frac{1}{50}$, $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{10}$		
わかもと	原液、原液		
A.oryze	$\frac{1}{5}$		
A.awamori	$\frac{1}{2}$		
B.sub	原液		
A.oryze胞子	原液		
A.awamori胞子	原液		

3日目の実験 薬効の素を知る

- 各試料に含まれる酵素(たんぱく質)を観察
- 各試料に含まれるでんぷん分解酵素は何種類ある?
(電気泳動法で酵素(たんぱく質)を分ける)
(酵素が分かれる考え方は、TLCと同じ)
- でんぷん分解酵素(アミラーゼ)には何種類があるので、どれが含まれるのか?
- 分子模型で作ってみる

step4 酵素を分ける(電気泳動法)

新タカジア錠or強力わかもと

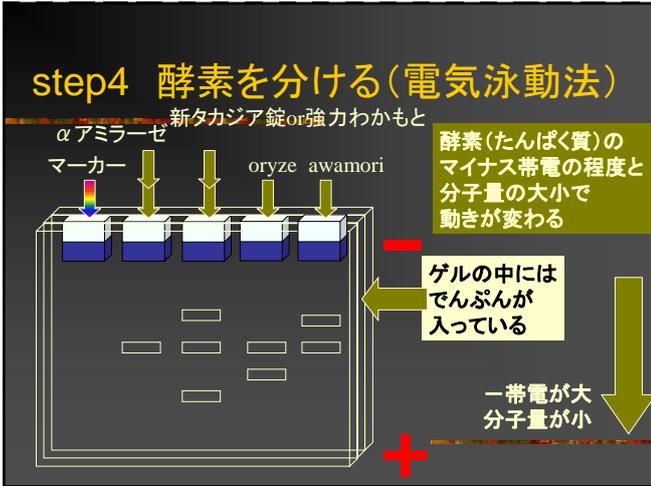
α アミラーゼ
マーカー

oryze awamori

酵素(たんぱく質)の
マイナス帯電の程度と
分子量の大小で
動きが変わる

ゲルの中には
でんぷんが
入っている

ー帯電が大
分子量が小



step5 酵素を特定(活性染色)

新タカジア錠or強力わかもと

α アミラーゼ
マーカー

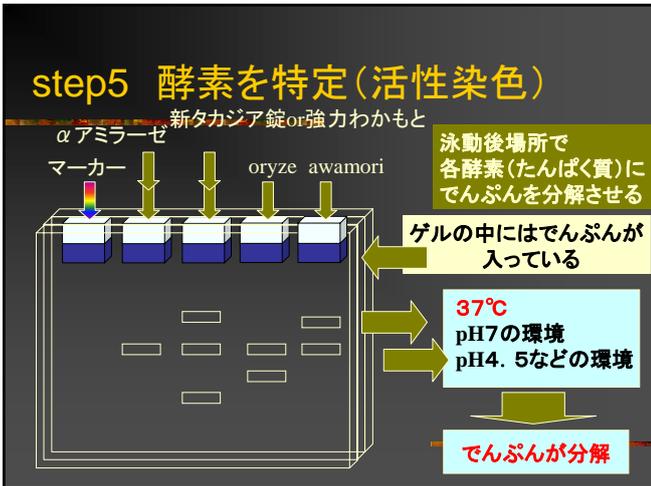
oryze awamori

泳動後場所で
各酵素(たんぱく質)に
でんぷんを分解させる

ゲルの中にはでんぷんが
入っている

37°C
pH7の環境
pH4.5などの環境

でんぷんが分解



step5 酵素を特定(活性染色)

新タカジア錠or強力わかもと

α アミラーゼ
マーカー

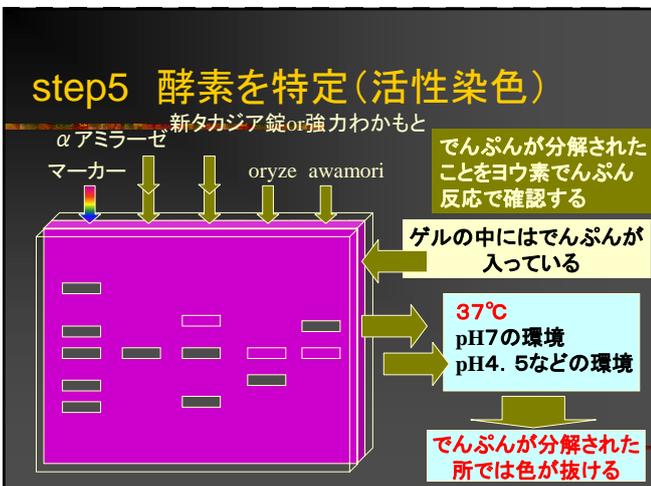
oryze awamori

でんぷんが分解された
ことをヨウ素でんぷん
反応で確認する

ゲルの中にはでんぷんが
入っている

37°C
pH7の環境
pH4.5などの環境

でんぷんが分解された
所では色が抜ける



サマーサイエンスキャンプ（大阪薬科大学：2日目）のスケジュール

平成24年 8月 22日（水）

第2日目（大阪薬科大学）

- 8：30～ 薬用植物の観察（大阪薬科大学・薬用植物園）
- 9：30～ 実習「薬用植物の成分をクロマトグラフィーで分離してみよう」
- 11：30～ 昼食
- 12：30～ 顕微鏡観察「ミクロな世界を覗いてみよう」
- 14：30～ 製剤実習「身近なくすりを創ってみよう」
- 17：30～ まとめ
- 18：00～ 交流会（大阪薬科大学・学生食堂）（19：30まで）



学習目標（カリキュラム概略）

人類は古来より、不老長寿を願い、病気と闘うために色々な手法を開発してきました。中でも、「くすり」は健康を維持し、病によって失った健康を取り戻すのに顕著な効果を奏したため、早くから人々の関心を集めてきました。現在使われている薬の多くは、これら先人たちの経験や知識を現代科学の力で解明し、さらに改良し、開発されてきた製品です。

今回のサマー・サイエンスキャンプ（2日目）においては、薬の誕生から出来上がりまでのプロセスを概観できるようにカリキュラムを作成いたしました。すなわち、まず、午前中は、医薬品シードとしての薬用植物とその成分について、生薬学担当教員の指導の下に「薬用植物園の見学」と「薬用植物の成分の分析法」を実習形式で体験して頂きます。薬用植物園の見学では、実際に薬用植物に触れ、その一部（比較的安全な植物）については、匂いや味も実際に体験して頂くつもりです。成分の分析では、シリカゲルを担体とするクロマトグラフィーを行い、薬理活性成分が一つひとつのスポットとして観察できる手法を経験します。

昼食をはさんで午後からは、生体機能解析学担当教員の指導の下で、**薬が吸収される消化管を中心に光学顕微鏡と電子顕微鏡による動物の組織の観察を行い**、さらに、薬が作用するメカニズムについて知識を広げて頂きます。最後に、薬理活性のある物質が医薬品として製品化される「製剤技術」について、実習を通して理解します。具体的には、薬剤・製剤学担当教員の指導の下、製剤実習室で打錠機を使って錠剤を作成したり、カプセルに粉薬を充填する操作を行います。また、これら製剤がしっかり薬として機能するためには、さまざまな基準を満たしていなければなりません。「溶解試験」、「摩損度試験」、「崩壊試験」と呼ばれる「製剤試験」についても体験し、薬がいかに厳しい基準を超えて製品になるかを知って頂きます。

本カリキュラムの終了時には、受講者の皆さんにとって、「薬の科学」が身近なものに感じて頂ければ良いと考えています。