

蜂蜜のタンパク質分解作用について

～熱ショックタンパクの可能性を探る～

2年3組 柴田 晃希 2年3組 那須 大起 2年3組 前田 桂汰
指導者 窪地 育哉

1 課題設定の理由

蜂蜜は、ミツバチが花から花の蜜を集めてきたものである。蜂は花の蜜をいったん体内に蓄え、巣まで戻ってくると、巣の中にいるハチに渡す。ハチからハチへ蜜のリレーが行なわれて、巣に貯蔵される過程で、花蜜から蜂蜜への精製が行なわれる。すなわち、水分を飛ばすこと、そして、スクロースの分解である。花の蜜の主成分であるスクロースはグルコースとフルクトースに分解される。これは、ミツバチの体内にある酵素によって行なわれるものである。ハチミツは、20%の水分と花の蜜、蜂の消化酵素から成り、消化酵素にはたんぱく質分解酵素であるプロテアーゼなどの約 80 種を含んでいる^[*1]。愛媛県宇和島市は、全国的にも有名なみかん畑で養蜂が行われ、宇和島産の蜂蜜も販売されている。

先輩方の研究^{[*2][*3]}により、蜂蜜にタンパク質を分解する働きがあることが示唆された。加藤らは、ニンヒドリン反応を用いてアミノ酸の定量を行った^[*3]。紫外吸光度測定により、ニンヒドリン反応の吸収スペクトルを調べることで、タンパク質が分解されたことを数値的に考察し、ヒートショックタンパク質の存在が示唆された。あらゆる細胞には、熱ショック応答というものが備わっており、それは、細胞が異常な高温にさらされると活動を始めるというものである。タンパク質の折りたたみの効率をよくしている特別のタンパク質をシャペロンというが、ある種のシャペロンは、高温の状況下でその量が大幅に増加することが知られており^[*4]、これもヒートショックタンパクの仲間である。

本研究は、ハチミツのタンパク質分解作用が、ヒートショックタンパクにより引き起こされるかどうかを明らかにすることを目的としている。

2 原理

ニンヒドリン反応とは、ニンヒドリンがアミノ酸と反応して、還元ニンヒドリンとアンモニアが生じ、生じた還元ニンヒドリンとアンモニアとニンヒドリンが反応しルーマン紫と呼ばれる紫色を呈色する反応である^[*4]。

また、スペクトルとは、光を波長ごとに分けたものであり、物質に光をあてると、一定波長域の光を吸収し、残りの光を反射する。その吸収された光を吸収スペクトルといい、私たちは反射された光をとらえて色を識別している。

今回は、ニンヒドリン反応の呈色の濃さを、吸収スペクトルを測定することにより、その定量的・定性的な考察に用いることとした。

3 実験・研究の方法

(1) 試料の調製

1.0、3.0、5.0%のゼラチン水溶液、2%ニンヒドリン溶液、75%蜂蜜水溶液を調整した。蜂蜜には市販のもの（@松次郎、水谷養蜂園株式会社製造）を用いた。

(2) 吸収スペクトルの測定

島津製作所の島津紫外可視分光光度計 UVmini-1240 を用いて、表 1 に示した各試料の吸収スペクトルを測定した。各溶液混合時から 10 分間、60～70℃で湯浴させた後、吸収スペクトルを測定した。

表 1 測定試料

試料 No	5%ゼラチン水溶液 / mL	ハチミツ水溶液 / mL	条件	ニンヒドリン溶液 / mL
①	3.0	7.0	25 %	2.0
②	3.0	7.0	50 %	2.0
③	3.0	7.0	75 %	2.0
④	0	7.0	---	2.0
⑤	3.0	7.0	加熱	2.0
⑥	3.0	7.0	---	2.0
⑦	3.0	3.0	100℃ 10分	2.0
⑧	3.0	3.0	100℃ 15分	2.0
⑨	3.0	3.0	滅菌	2.0
⑩	3.0	3.0	氷水 10分	2.0
⑪	3.0	3.0	常温 10分	2.0
⑫	3.0	3.0	100℃ 10分	2.0

4 結果と考察

図 1 に、試料 No①～③のニンヒドリン反応の吸収スペクトルを示した。ハチミツ水溶液の濃度を大きくするのに伴って 500nm～650nm 領域の吸収が大きくなっている。ゼラチン溶液を 5 %以下に薄めたもので同様の実験を行ったところ、ニンヒドリン反応の呈色が見られず、吸収スペクトルでも 500nm～650nm 領域の吸収はほとんど見られなかった。よって、以後の実験を 5%ゼラチン溶液、ハチミツの濃度を 75 %とした。

図 2 に、試料 No④～⑥のニンヒドリン反応の吸収スペクトルを示した。これは、75 %ハチミツ水溶液の条件を変えたものである。図 2 中⑥のグラフから、ゼラチン無しのハチミツ水溶液のみで実験を行った場合はニンヒドリン反応が出なかったこと、図 2 中④・⑤のグラフから、ハチミツ水溶液を加熱しても加熱しなくても、ニンヒドリン反応の呈色に影響が無いことが分かった。

図 3 に、試料⑦・⑧のニンヒドリン反応の吸収スペクトルを示した。これは、ハチミツ水溶液の加熱時間を変え

ニンヒドリン反応の吸収スペクトル

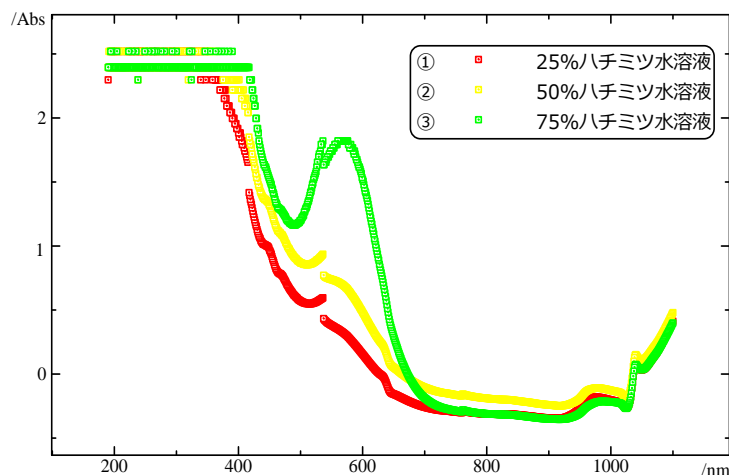


図 1 試料①～③のニンヒドリン反応

ニンヒドリン反応の吸収スペクトル

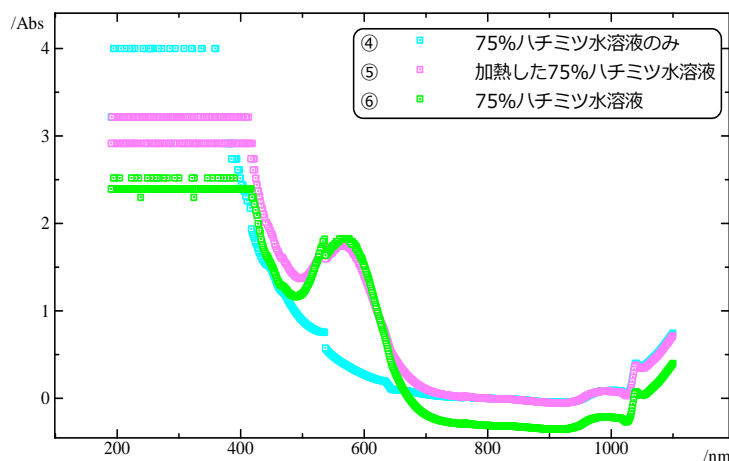


図 2 試料④～⑥のニンヒドリン反応

たものである。加熱時間を変えることによるニンヒドリン反応の呈色の変化はほとんど見られなかった。

ニンヒドリン反応の吸収スペクトル

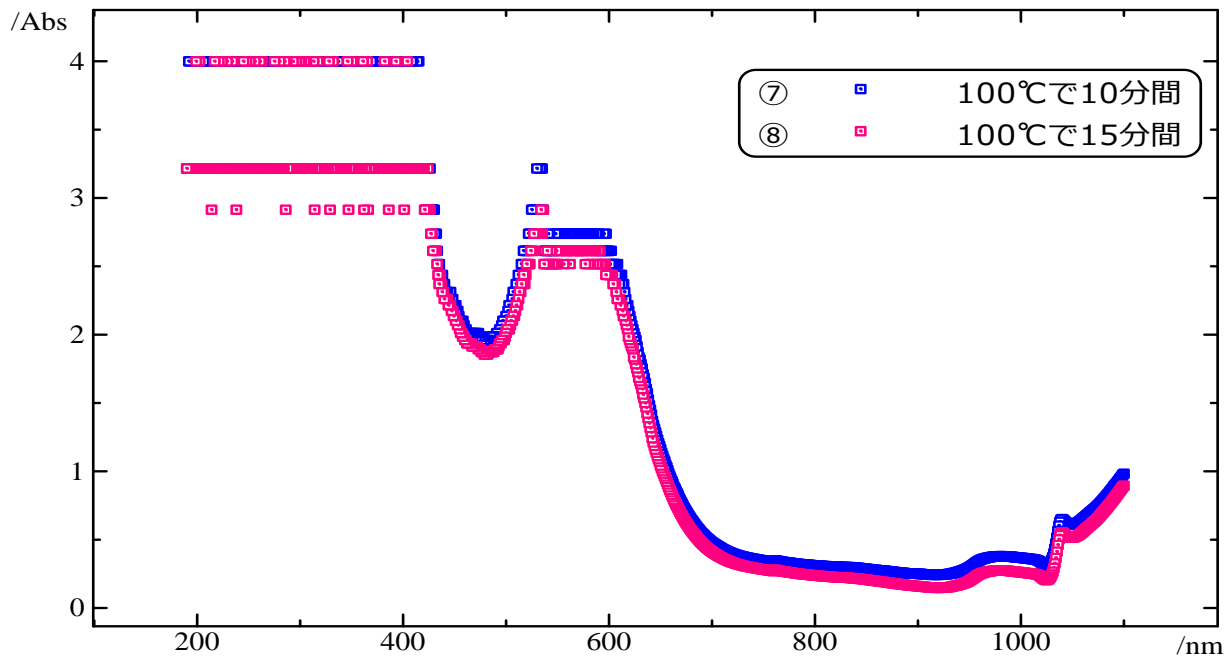


図3 試料⑦・⑧のニンヒドリン反応

図4は、ハチミツ水溶液を様々な条件下において、ニンヒドリン反応を行わせたものである。滅菌処理を行ったハチミツ水溶液⑨では、450nm～650nmでの吸収がほとんど見られなかった。低温や常温で保存されたハチミツ水溶液よりも、100℃という高温におかれたハチミツ水溶液で、500nm～650nmに吸収が見られるという結果となった。

以上の結果から、ハチミツのタンパク質分解用は、高温の条件下で促進されることが明らかとなった。中野らの研究において示唆された酵素によるもの[*2]というよりも、より複雑な機構によるものではないかと考えられる。すなわち、

- ① 酵素が、加熱により熱変成を起こし、そのことで働きを持つようになる。
- ② シャペロンのような、酵素を保護する物質が、含まれている。
- ③ ハチミツの保有する耐熱性の菌の作用によるものである。

の3つである。

①については、図4における⑨の結果で、ニンヒドリン反応陰性であることから、否定されるものと考えた。②および③の可能性が十分に考えられる。②では、酵素保護物質の存在が明らかになれば、高温にすることによる反応速度の促進という可能性は十分に考えられる。また、③についても、滅菌処理を行うことでニンヒドリン反応が陰性となることは、その可能性を否定しないものである。

ニンヒドリン反応の吸収スペクトル

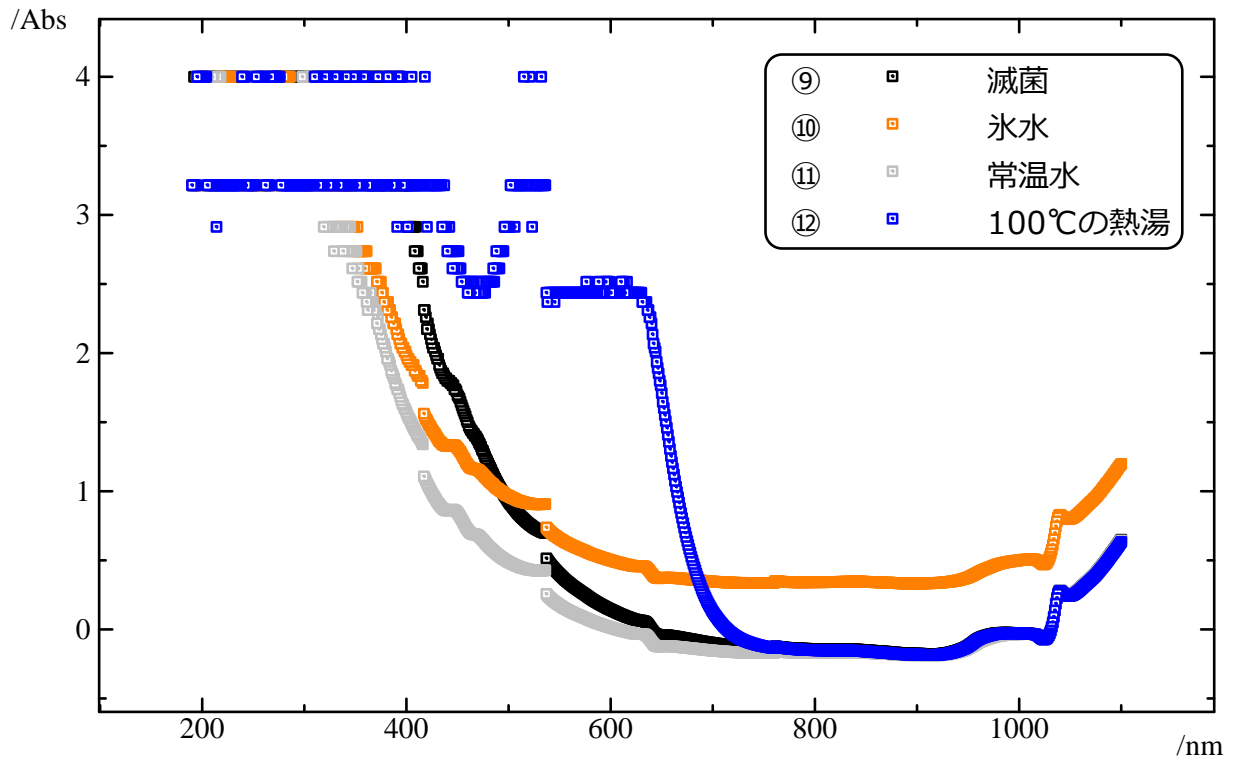


図4 試料⑨～⑫のニンヒドリン反応

5 まとめと今後の課題

本研究によって、ハチミツを 100℃に加熱することによって、ゼラチン中のタンパク質を分解する作用が強くなることが明らかとなった。しかし、その詳細な機構の特定には至らなかった。ヒートショックタンパク質の可能性、耐熱性の菌の存在の可能性があり、これらが明らかになることで、タンパク質分解の機構の解明につながるものと考えている。

参考文献

- [*1] ローワン＝ジェイブセン著、“ハチはなぜ大量死したのか”、株式会社 文藝春秋、2009年1月
- [*2] 平成25年度SSH生徒課題研究論文集、愛媛県立宇和島東高等学校、P11～14、113～115
- [*3] 平成26年度SSH生徒課題研究論文集、愛媛県立宇和島東高等学校、P97～99
- [*4] ト部吉庸著、“化学の新研究”、三省堂、2013年、東京
- [*5] Bruce Alberts 他著、“MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL 細胞の分子生物学 第4版”、株式会社ニュートンプレス、2004年第1刷、東京