

蜂蜜のタンパク質分解作用 2016

2年4組 木下 芽生 2年4組 山下 晴風 2年4組 山田菜々美
指導者 窪地 育哉

1 課題設定の理由

本校SSH事業開始以来、先輩方が代々ハチミツのタンパク質分解についての研究を行ってきた。石本ら(2014)、山口ら(2014)により、ハチミツにタンパク質を分解する働きがあることが示唆された。大野ら(2015)は、ニンヒドリン反応を用いてアミノ酸の定量を行った。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(柴田ら,2016)。

しかし、一方で、データの測定のばらつきも指摘され、結果の再現性の危うさも危惧された。酵素反応であるなら、時間を ∞ とすることですべてのタンパク質を分解できるのではないかという疑問も大いに残る。本研究はハチミツのタンパク質分解作用について多面的に検証しながら、分解作用の謎に迫ることを目的として行われた。

2 原理

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合してできたポリペプチドを基本構造としている。ペプチド結合による鎖状構造を一次構造という。高次構造を持つタンパク質では、鎖状ポリペプチドが、ペプチド結合部位で水素結合することによりらせん構造やシート構造をとり(二次構造)、二次構造のポリペプチドが複雑に折れ曲がり立体構造をとり(三次構造)、三次構造を持つポリペプチド(サブユニット)同士が一定の配置で一体となる四次構造をとるようになる。「タンパク質を分解する」とはこれらの構造をばらばらにすることである。すなわち、ペプチド結合を切断し、最も基本的な単位であるアミノ酸に分解することである。

石本ら(2014)を始めとして今までの研究でタンパク質分解の根拠とされていきた反応はニンヒドリン反応である。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(卜部,2013)。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。非常に鋭敏な反応で、タンパク質中の塩基性アミノ酸中の残アミノ基が反応してしまうという欠点も持っている。

我々はこの方法に加え、アミノ酸の電気泳動、陽イオン交換樹脂などの手法を用いたアミノ酸の検出に挑戦した。

アミノ酸の電気泳動および陽イオン交換樹脂への吸着は、アミノ酸がpHにより陽イオン・双性イオン・陰イオンの形をとることから現れる挙動である。

3 実験・研究の方法

(1) 試料の調製

5.0%のゼラチン水溶液、1.0%ニンヒドリン溶液、75%ハチミツ水溶液を調整した。ハチミツには市販のものを用いた。

(2) ニンヒドリン反応による検証

(2)ーア グリシン溶液を用いた検量線の作成

島津製作所の島津紫外可視分光光度計 UVmini-1240 を用いて、各濃度のグリシン水溶液の吸収スペクトルを測定した。グリシン水溶液とニンヒドリン溶液を混合時から10分間、55℃で湯浴させ、吸収スペクトルを測定した。この結果より、アミノ酸の量

についての検量線を作成した。

(2)ーイ ハチミツによるゼラチンの分解

ゼラチン溶液とハチミツ溶液を混合時から 15 分・30 分・45 分・60 分間 100℃で湯浴した。湯浴を終えてからニンヒドリン溶液を加え、10 分間 55℃で湯浴させ、吸収スペクトルを測定した。

(2) 電気泳動による検証

ろ紙の中央に 0.10 mol/L グリシン水溶液およびゼラチン溶液にハチミツ溶液を加えて 1 週間放置した溶液をそれぞれ約 0.5 mL スポットし、pH3.7 の緩衝溶液をろ紙にしみこませ、直流電圧をかけた。12V で約 60 分放置後、ニンヒドリン溶液をかけて、アミノ酸の場所を追跡した。

(3) 陽イオン交換樹脂の吸着による検証

0.10mol/L グリシン溶液およびゼラチン溶液にハチミツ溶液を加えて 1 週間放置した溶液それぞれ 5 mL に、pH3.7 の緩衝溶液を 10mL 混ぜ、陽イオン交換樹脂を入れて、攪拌。その後吸引ろ過によりろ液を取り、ろ液および樹脂それぞれにニンヒドリン溶液を加えて呈色を観察した。

4 結果と考察

(1) ニンヒドリン反応による検証

(1)ーア グリシン溶液を用いたニンヒドリン呈色の検量線作成

グリシン水溶液のニンヒドリン反応の吸収スペクトルを図 1 に示す。特に吸収の強い 400nm および 566nm の吸光度 Abs の値を読み、濃度との関係を示したものが、図 2 であり、それぞれ近似曲線を算出し、検量線とした。これにより、400nm での吸収を y_{400} 、566nm での吸光度を y_{566} とすると、

$$y_{400} = 0.0015e^{510 \times x} + 0.100 \quad \dots \text{式 1}$$

$$y_{566} = 0.0080e^{549 \times x} + 0.025 \quad \dots \text{式 2}$$

の式が得られた。

(1)ーイ ハチミツによるゼラチンの分解

ゼラチン溶液にハチミツを加えてニンヒドリン反応を行った結果を図 3 に、ゼラチン溶液に滅菌処理をしたハチミツを加えてニンヒドリン反応を行った結果を図 4 に示した。図 3・図 4 において、400nm および 566nm の吸光度を読み、式 1 および式 2 に代入することにより算出したアミノ酸の濃度は表 1 の通りである。

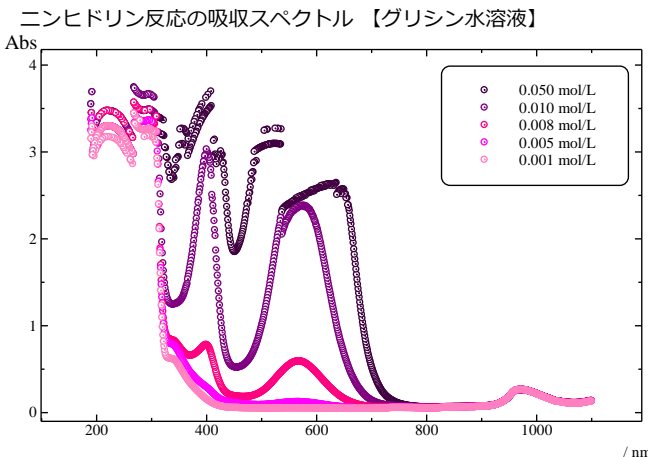


図 1 各濃度のグリシン溶液のニンヒドリン反応

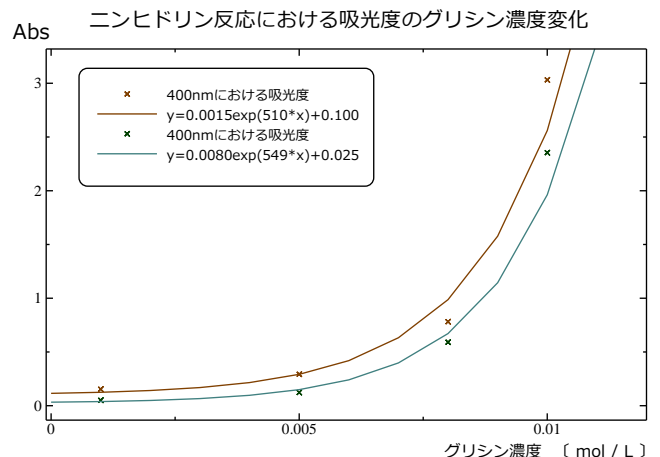


図 2 グリシン濃度とニンヒドリン反応の呈色の強さの関係

ニンヒドリン反応の吸収スペクトル 【5%ゼラチン/ハチミツで分解】

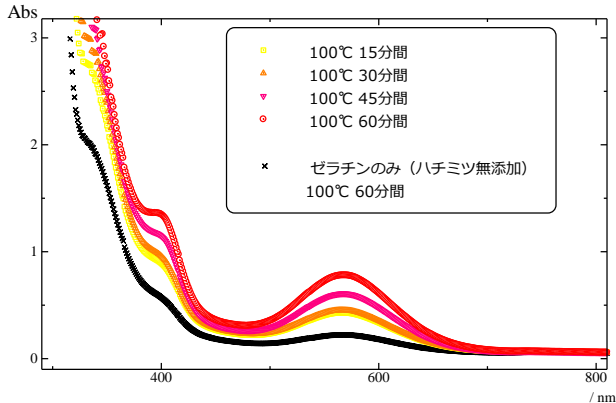


図3 ゼラチン溶液のニンヒドリン反応
(ハチミツで分解)

ニンヒドリン反応の吸収スペクトル 【5%ゼラチン/滅菌ハチミツで分解】

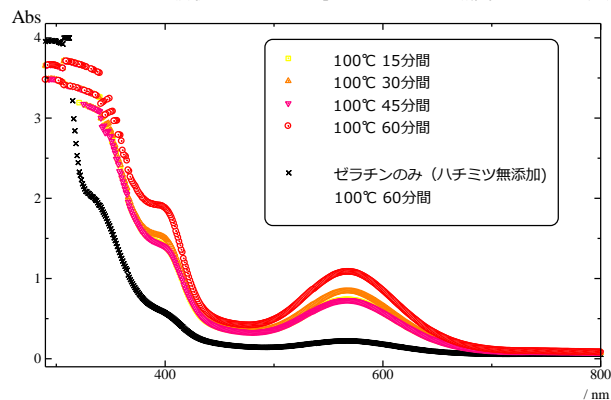


図4 ゼラチン溶液のニンヒドリン反応
(滅菌ハチミツで分解)

表1 400nm および 566nm の吸光度から見積もったアミノ酸濃度 (単位は mol/L)

湯浴時間	ハチミツ添加		滅菌ハチミツ添加	
	400nm 吸収	566 nm 吸収	400nm 吸収	566 nm 吸収
15 分	0.0106	0.00917	0.0118	0.0101
30 分	0.0107	0.00933	0.0122	0.0102
45 分	0.0114	0.00971	0.0118	0.0101
60 分	0.0120	0.01003	0.0127	0.0107

(2) 電気泳動による検証

図5に装置図を、図6にろ紙の様子を示す。図6において、ろ紙中央に溶液をスポットをし左が陽極側、右が陰極がである。写真上は何もつけず緩衝液でろ紙を濡らした後ニンヒドリン溶液を加えたもの、中は0.1mol/L グリシン水溶液、下はゼラチン+ハチミツ溶液である。

緩衝液の pH は 3.7 であることから、ほとんどのアミノ酸が陽イオンとなっており、陰極側への移動が期待されたが、電気泳動には、数百ボルトの電圧が必要であるとされており、うまく移動させることができなかった。ただし、上の緩衝液のみのろ紙の左上が紫色に呈色しているのは、実験者が指で持っていた部分である。指先のアミノ酸が反応したものである。中央のグリシン水溶液の電気泳動において、スポット少し右側に紫色の強く呈色した部分がある。ゼラチン+ハチミツ溶液では、一様に紫色に呈色したという結果となった。



図5 装置図

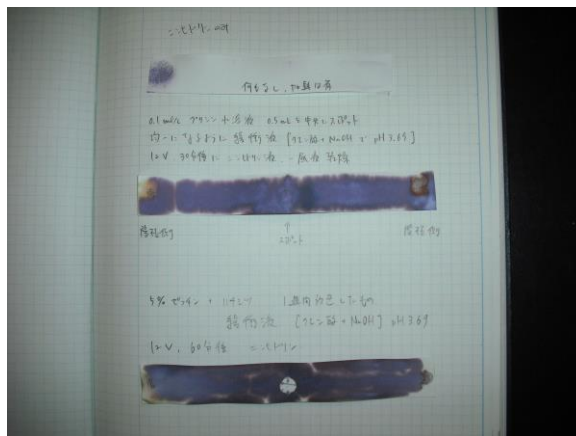


図6 ろ紙の様子
(上; 何ものなし, 中; グリシン,

(3) 陽イオン交換樹脂の吸着による検証

図7に、結果の様子を示す。緩衝溶液のpHが3.7であることから、特にグリシンの場合ほとんどが陽イオンとして存在していると考えられる。したがってすべて陽イオン交換樹脂に吸着されると期待されたが、ろ液にかなりの量落ちてきているという結果となった。また、樹脂上にもいくらか残っているという結果であった。

一方でゼラチン+ハチミツ溶液では、グリシンよりも呈色が薄いものの、同様な結果となった。



図7 イオン交換樹脂の吸着による検証結果
左2本；グリシン溶液
右2本；ゼラチン+ハチミツ溶液

5 まとめと今後の課題

ゼラチンがハチミツの作用を受けて、ニンヒドリン反応陽性を示すようになることが改めて明らかになった。検証(1)では、その濃度をグリシンに換算した値で算出することができた。一方で、アミノ酸の電気的な挙動をもとにアミノ酸の確認をすることは難しく、電気泳動、湯イオン交換樹脂への吸着とも、狙ったような結果は得られなかった。今後、ホルモール滴定や、ビウレット反応、あるいはより精密な測定で、タンパク質分解の詳細に迫ることができるものと期待している。

参考文献

- ・石本朝寛・山口智大・行定康大・渡邊健人（2014）「ハチミツに含まれるたんぱく質分解物質の大豆のたんぱく質に対する効果」『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 p11-12
- ・ト部吉庸（2013）『化学の新研究』三省堂
- ・大野徳仁・中村亮太・武内聖佑・加藤博大・利根大河・兵頭慎一郎（2015）「蜂蜜のタンパク質分解作用について」『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
- ・柴田晃希・那須大起・前田桂太（2016）「蜂蜜のタンパク質分解作用についてー熱ショックタンパク質の可能性を探る」『平成27年度SSH生徒課題研究論文集』愛媛県立宇和島東高等学校 p97-100
- ・山口開・長岡優斗・田中巧実・西川晴海（2014）「ハチミツに含まれるたんぱく質分解物質の肉のたんぱく質に対する効果」『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 p13-14