

ウェルプレートを活用した酵素反応の教材開発と授業実践

宮田理恵^{*1} 中川徹夫^{*2}

Developing Teaching Materials and Educational Practice for Enzymatic Reactions with a Well Plate

MIYATA Rie^{*1} NAKAGAWA Tetsuo^{*2}

*1 神戸女学院中学部・高等学部 教諭

*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

連絡先：中川徹夫 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科
nakagawa@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

高校生物の教科書は、酵素反応の実験として、試験管などの実験器具を多用するものを紹介している。このような実験は、複数名の生徒が共同で行うため、内容の理解度や器具の操作習得などの点において、生徒にもたらす教育的効果に差を生じると考えられる。そこで、酵素反応のうち、アミラーゼ活性と温度および pH の関係を調べる実験教材を、12ウェルプレートを用いてマイクロスケール化し、2人1組で実験を行う授業実践を行った。本教材は、通常実験と遜色のない結果を示し、また、反復実験を容易にした。授業実践を通して、マイクロスケール実験が生徒にとって有意義であることも示された。よって、高校の生物実験において本教材は有用であると考えられる。

キーワード：アミラーゼ、高校生物、生化学、マイクロスケール実験

Summary

Enzymatic reactions are usually introduced using much laboratory glassware in high school biology textbooks, which results in a set of experimental equipment for each group with many students. These are presumed to cause a large gap among students in their comprehension of enzymatic functions and experimental techniques. Therefore, we have developed microscale teaching material to evaluate the dependence of amylase activity on temperature and pH environments with a 12-well plate that enables us to repeat experiments easily. The result of this experiment coincided with that of the ordinary one. Based on our practical lessons, we have shown that this experiment is more meaningful for students in their activities and understanding than the ordinary one. Consequently, we have confirmed that this material is useful for high school biology classes.

Keywords: amylase, high school biology, biochemistry, microscale experiment

1 はじめに

高校生物の大目標の一つに、「生命活動の共通性の理解」がある。生命活動の共通性として細胞の特徴、代謝のメカニズム、遺伝子の機能、生物体の恒常性、免疫機能などを履修する¹⁾。それぞれの分野の理解を促すために、身近な材料と器具を用いた様々な実験教材が開発されている。その中の一つに酵素反応に関する教材がある。高校の生物や生物基礎の教科書は、カタラーゼや二酸化マンガンを触媒として過酸化水素水を分解させる実験を紹介していることが多い²⁾⁻⁷⁾。一方、普段の生活で用いられる身近な野菜類、果物類、魚肉類から抽出した酵素を使った実験教材も開発されている⁸⁾⁻¹⁰⁾。

これらの実験では試験管などのガラス器具を多用するため、複数名の生徒が共同で実験を行う。このような実験形式では、作業に従事する生徒と作業を傍観するだけの生徒に分かれることが多い。そのため、実験内容の理解や考察の深さ、そして器具の使い方や作業の進め方の習得という点において、生徒にもたらす教育的効果に差が生じると考えられる。マイクロスケール実験は、近年、化学分野で普及しつつあり、これらの問題を克服する上で有用な手法である¹¹⁾⁻¹⁴⁾。その利点として、マイクロスケール実験では個々の生徒が責任を持って実験を行い、個別に結果を観察できることが挙げられる。また、試薬や廃棄物の節減、省エネルギー化、実験の安全化などの利点もある。化学のマイクロスケール実験の多くは、安価で多用しやすいウェルプレートを用いており、それによってこれらの利点をもたらされている。

生物分野においても多くの試薬や動植物材料を用いるため、マイクロスケール実験を活用した教材の開発および実践は重要な課題であるが、研究例は僅少である。椎葉らによるキウイ由来のタンパク質分解酵素の機能を調べるマイクロスケール実験教材は、この課題に取り組んだ一例である¹⁵⁾。酵素の機能については高校生物だけでなく高校化学でも学ぶため、酵素反応に関する実験教材をマイクロスケール化することや応用例を増やすことは、両科目にとって有意義である。過酸化水素水を用いる実験は、泡が発生するため、容積が小さいウェルプレートを利用する実験には不向きである。しかし、野菜や果物などから抽出した酵素を対象とした実験をマイクロスケール化することは実現性が高い。

本研究は、酵素反応のうち、身近な野菜に含まれるアミラーゼを対象とし、酵素活性の温度および pH 環境依存性を調べる実験教材をマイクロスケール化することを目的とした。また、生徒自身が実験によって内容を深く理解し、考察できる教材にするため、実践により教材の有用性についても検討した。

2 実験

2-1 試薬と器具

アミラーゼの抽出源として市販のニンジンを用いた。試薬として、可溶性デンプン（和光純薬）、水酸化ナトリウム（和光純薬）、塩酸（和光純薬）、0.05 mol/L ヨウ素ヨウ化カリウム水

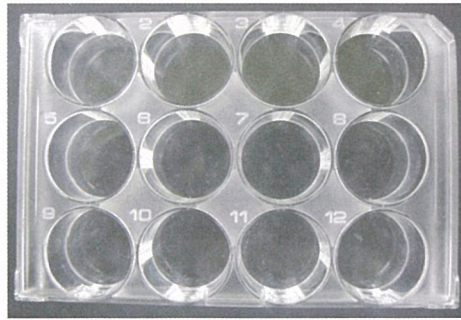


図1 12ウェルプレート

溶液（よう素溶液、和光純薬）を使用した。蒸留水は、蒸留水製造装置（Yamato、WG221）により調製した。

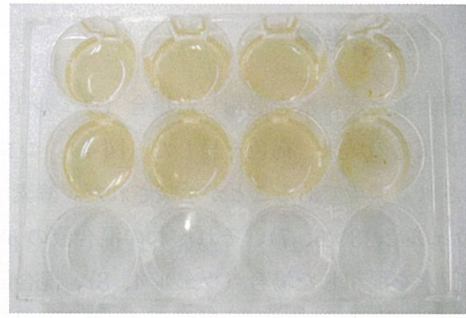
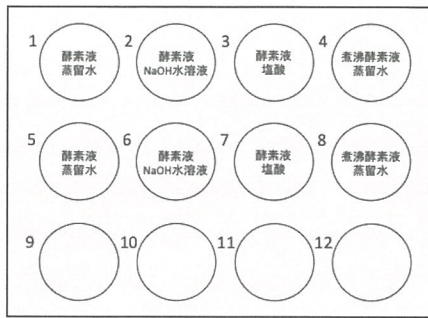
器具として、ミキサー（DOSHISHA Cop.、DJM-1401）、皮むき器、包丁、漏斗、漏斗台、濾紙（ADVANTEC、No. 2、250 mm）、遠沈管（アズワン、ECK-15ML）、遠心分離機（TOMY、LC120）、12ウェルプレート（アズワン、353043、図1）、点眼容器、pH 試験紙（ADVANTEC、UNIV）を用いた。本研究では、酵素反応を行う器具として試験管を用いる代わりに、ウェルプレートを用いることで、1枚のウェルプレートで、最大3反復の実験を可能にした。

2-2 方法

ニンジンからアミラーゼを抽出するために、皮むき器で皮を除去し、可食部200 gを包丁で約1 cm 幅に切断した。ニンジン蒸留水400 mLとともにミキサーで破碎し（図2）、絞り汁を濾過した。その濾液を遠沈管に入れ、遠心分離を行った（3000 rpm、30分）後、上澄み液を酵素液とした。遠心分離を行う前の濾液を酵素液として用いた場合、ヨウ素デンプン反応による呈色が阻害されやすい⁸⁾。一方、上澄み液を用いた場合は、反応から20分程経過するまでは



図2 ニンジンの破碎液



(a)

(b)

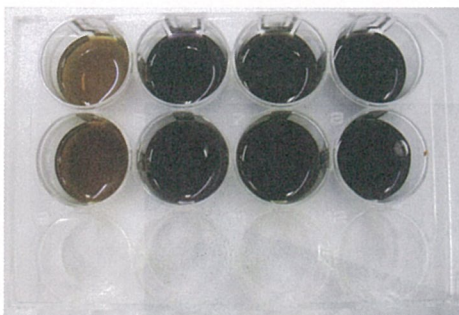
図3 各ウェル内の溶液の種類(a)と混和後の様子(b)

呈色が確認できるため、本研究では濾液の遠心分離を行った。約5分間煮沸させた酵素液を、煮沸酵素とした。

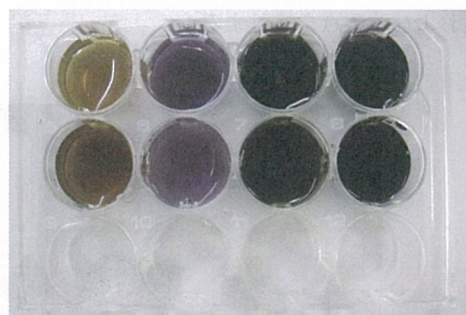
可溶性デンプン溶液の濃度を0.05%とし、蒸留水に溶解させて調製した（以下、デンプン溶液とよぶ）。水酸化ナトリウム水溶液および塩酸の濃度はいずれも0.1 mol/Lとし、蒸留水に溶解させて調製した。ヨウ素ヨウ化カリウム水溶液（よう素溶液）は、市販のものをそのまま点眼容器に入れ、使用した。

実験の再現性を確認するため、ウェルプレートのウェル1-4と同様の操作を、それぞれウェル5-8でも行った。ウェルプレートのウェル1-3、5-7に酵素液1.0 mL、ウェル4、8に煮沸酵素液1.0 mLを入れた（図3）。次に、ウェル1、4、5、8に蒸留水0.1 mL、ウェル2、6に水酸化ナトリウム水溶液0.1 mL、ウェル3、7に塩酸0.1 mLを加えた（図3）。ウェル内の溶液を混和させるため、ウェルプレートを軽く揺すった。ウェル1-8の溶液のpHをpH試験紙で確認した。

ウェル1-8にデンプン溶液0.1 mLを加え、ウェルプレートを軽く揺すった後、20分静置した。続いて、ヨウ素ヨウ化カリウム水溶液を約0.08 mL加え、ウェルプレートを軽く揺すった後、各ウェルの深さの半分程まで蒸留水を加えた。ウェルプレートを白紙の上に置き、各ウェルの溶液の色を比較した（図4）。



(a)



(b)

図4 ヨウ素デンプン反応による呈色結果

ヨウ素ヨウ化カリウム水溶液を加えた直後(a)、蒸留水を加えて、10分静置後(b)。

3 結果と考察

酵素液と蒸留水を混和した場合（ウェル1、5）、混合液のpHは6弱であった。ヨウ素デンプン反応の結果、褐色を呈した（図4）。つまり、植物性のアミラーゼによってデンプンが分解される環境であることが示唆された。酵素液に水酸化ナトリウム水溶液や塩酸を加えた場合（ウェル2、3、6、7）、それぞれの混合液のpHはそれぞれおよそ12、1、また、煮沸酵素液と蒸留水を混和した場合（ウェル4、8）、混合液のpHはおよそ7であった。これらの溶液はすべて、ヨウ素デンプン反応の結果、青紫色を呈した（図4）。つまり、水酸化ナトリウム水溶液や塩酸の添加によって酵素のpH変性が、酵素の煮沸によって酵素の熱変性が起こり、デンプンが未分解の状態であったと考えられる。なお、水酸化ナトリウム水溶液を加えた場合、ヨウ素ヨウ化カリウム水溶液を加えて約5-15分経過すると、青紫色が薄い赤紫色に変化した。これは、ヨウ素-デンプン複合体の分解によるものである。

以上の結果は、多くの教科書や図説などの結果と同様で、差がなかった。換言すれば、試験管の代わりにウェルプレートを用いた場合でも、遜色ない結果が得られた。また、ウェルプレートを用いることで、少量の試薬で、容易に反復実験を行うことが可能となった。これより、本研究で開発した酵素反応に関するマイクロスケール実験の手法は、高校生物教材として極めて有用であると考えられる。

4 授業実践

4-1 授業実践の概要

本学院高等学部1年の生物基礎選択者（3クラス、135名）を対象に、著者のひとりである宮田が、本教材を用いて2015年6月に授業実践を行った（図5）。対象者は、本実習以前に、化学実験においてウェルプレートを用いた経験があるが、生物実験でマイクロスケール実験を行うのは初めてである。酵素の性質と機能については、履修済みである。実験手順、注意事項に関しては、レポート用紙を兼ねた実験プリントを用いて説明し、それに基づいて準備を行った。授業は45分2コマで実施し、本教材以外の教材も実践した。実験は2人1組で実施した。ここでは、マイクロスケール実験と一般的な実験に対する生徒の意見を整理し、本教材の有用性および改善点を検討する。



図5 実験の様子

4-2 実験に関するアンケートの内容と結果

マイクロスケール実験が、複数名による実験よりも楽しいものであったか、教材内容の理解を深めるために有意義であったかを検証するためのアンケートを作成した。なお、授業時間内にアンケートを実施できなかったため、実験参加者を対象に後日実施した。質問項目によるが、参加者のうち約7割から回答を得た。事後アンケートの内容を表1に、アンケート結果を表2に示した。なお、質問項目によっては未回答もあった。質問3-5では回答理由を自由記入とした。

質問1において、約81%の生徒がマイクロスケール実験を楽しみ感じたことがわかった(表2)。

質問2において、マイクロスケール実験による実験内容の理解度については、約58%の生徒が大体理解していたが、約38%の生徒が半分程しか理解していなかった(表2)。

質問3において①や②を選択した生徒は、約66%であった(表2)。その理由として「多くの実験操作を担えるため、実験を楽しめる」、「実験操作に対する混乱が少ない」、「実験過程や結果を観察しやすい」、「実験器具の使い方を覚えやすい」などが挙げられた。

質問4において①や②を選択した生徒は、約49%であり(表2)、これらの生徒の大半は質問3で①や②と答えていた。その理由として、上記の理由とともに、「実験の手順や結果を丁寧に話し合えるため、内容をよく理解できる」、「実験を進めるために、2人でしっかり理解しようとした」が挙げられた。③を選択した生徒は約28%で(表2)、その多くは「どちらの実験方法であっても、実験プリントをよく読み、実施すれば、よく理解できる」という理由を挙げた。一方、④を選んだ理由として、「実験の進め方や結果に対する多くの意見を聞ける」、「2人の場合、考察過程で行き詰まってしまうことがある」が挙げられた。

質問5で①や②を選択した生徒は約72%であった(表2)。これらの多くの生徒が、「実験を自分の手で行っているという実感がある」、「理解を深めたい」、「実験方法や結果が記憶に残りやすい」、「知識が定着し、自分の言葉で理解できる」などの理由を挙げた。一方、③を選択した理由として、「実験を得意としていないため、操作に不安を感じる」が挙げられた。

マイクロスケール実験を面白いと感じ、酵素活性と温度およびpH環境の関係を理解できた生徒が多いことがわかった。化学分野において示されてきたマイクロスケール実験の有用性を、生物分野においても示した結果と言える。また、実験結果を観察しやすい、器具を扱う機会が多い、手順や結果を理解しやすいなど、実験に対する生徒の積極的な姿勢に基づいた結果とも言える。

4-3 教材の有用性と改善点

通常の生徒実験は、5-6名で行う。その際、積極性を持った生徒であっても、生徒達の活動は制約されることが多い。そのため、実験やレポート作成において、積極性を十分に引き出せず、科学的思考を深める機会を制限してきたと考えられる。生物分野に興味薄い生徒の場合は、さらに課題は深刻であった。しかし、今回のマイクロスケール実験は、主体的に実験を行う機会、または、実験を行わざるをえない機会を生徒に与えた。その結果、深い理解と考察に

表1 事後アンケートの内容

質問項目	回答選択肢
1. マイクロスケール実験は楽しかったか	①とても楽しかった、②楽しかった、③普通、④あまり楽しかった、⑤全く楽しなかった
2. マイクロスケール実験によって内容を理解できたか	①よく理解できた、②大体理解できた、③半分程理解できた、④ほとんど理解できなかった、⑤全く理解できなかった
3. 今までの実験(5-6人で一緒に行う実験)とマイクロスケール実験のどちらが楽しかったか	①マイクロスケール実験の方がとても楽しかった、②マイクロスケール実験の方が楽しかった、③どちらとも言えない、④今までの実験の方が楽しかった、⑤今までの実験の方がとても楽しかった
4. 今までの実験とマイクロスケール実験のどちらが内容を理解しやすかったか	①マイクロスケール実験の方がよく理解できた、②マイクロスケール実験の方が理解できた、③どちらとも言えない、④今までの実験の方が理解できた、⑤今までの実験の方がよく理解できた
5. これからもマイクロスケール実験をやりたいか	①ぜひやってみたい、②やってみたい、③どちらでもない、④あまりやりたくない、⑤やりたくない

表2 事後アンケートの結果

質問項目	回答 (%)				
	①	②	③	④	⑤
1	46.8	34.0	14.9	2.1	0.0
2	12.8	44.7	38.3	2.1	0.0
3	25.5	40.4	12.8	8.5	0.0
4	19.1	29.8	27.7	8.5	0.0
5	40.4	31.9	8.5	4.3	0.0

到達する。

十分に実験を楽しむ、生徒自身が科学に対して興味を抱き始めるなど、非常に有意義な実践となった。したがって、酵素反応に関するマイクロスケール実験の手法は、生徒にもたらす教育的効果の観点から、高校生物教材として有用であると考えられる。

扱う試薬が少量であったため、操作が難しく、予想通りの結果が出ない組もあった。しかし、再実験においては、正確に、かつ、効率良く操作を行えるようになり、結果に対して確信を持った組が多かった。人数が普段よりも少なく、操作に不安を感じた組もあった。実験前に、基本的な器具の操作方法を説明するだけでなく、十分な操作練習を行う必要がある。また、試薬量に多少の誤差が生じた場合でも、予想通りの結果を観察できるよう、試薬の混合比について検討・改善を重ねる必要もある。

5 おわりに

本教材を開発するにあたり、最も苦心した点は、酵素液とデンプン溶液の混合比を決定することであった。生野菜由来のアミラーゼは、添加量が多いほどヨウ素-デンプン複合体の形成阻害が顕著である¹²⁾。しかし、アミラーゼ添加量が少ない場合、デンプン分解は進みにくい。そのため、体積が小さいセルに、可能な限り酵素液を入れることを目指した。また、授業時間

内に酵素反応を飽和させ、ヨウ素デンプン反応の結果を観察するために、酵素液とデンプン溶液をあらゆる混合比で反応させ、適した混合比を見出した。

酵素液内の酵素濃度を調べ、それに応じた基質濃度を算出すれば、より高精度の酵素反応実験教材を開発できるだろう。ただ、一般の中学校や高等学校にある実験器具を用いることで、生徒実験に適した混合比を見出すことは可能であり、挑戦しがいのある課題であった。ウェルプレートを用いたマイクロスケール実験教材の開発には、通常の教材開発よりも困難な点もある。しかし、個々の生徒が責任を持って実験に取り組み、手元で結果を観察し、そして、科学的な理解を深められる実験教材としての利点がある。それゆえ、高校生物に関するマイクロスケール実験教材の開発・改良を継続したいと考えている。

謝 辞

本実験教材を開発するにあたり、本学院中学部・高等学部の宍戸紗香氏と三木真帆氏には、実験の準備にご尽力頂いた。また、本学人間科学部の高岡素子教授には、遠心分離機をお貸し頂いた。さらに、本学院高等学部135回生の生物基礎選択者には、実験に関する貴重なコメントを頂いた。以上の方々に深く感謝する。

本研究の一部は、JSPS 科研費24501072の助成を受けたものである。

文献と註

- 1) 文部科学省, 高等学校学習指導要領解説理科編理数編, pp. 75-78 (2009).
- 2) 浅島誠 他, 生物, 東京書籍, p. 35 (2013).
- 3) 本川達雄 他, 生物, 新興出版社啓林館, p. 29 (2013).
- 4) 本川達雄 他, 生物基礎, 新興出版社啓林館, p. 43 (2013).
- 5) 嶋田正和 他, 生物, 数研出版, p. 25 (2013).
- 6) 嶋田正和 他, 生物基礎, 数研出版, p. 39 (2013).
- 7) 吉里勝利 他, 生物, 第一学習社, p. 46 (2013).
- 8) 加藤陽治, 照井誉子, 羽賀敏雄, 小山セイ, 日景弥生, 盛玲子, 「生食野菜類のアミラーゼ活性」, 弘前大学教育学部教科教育研究紀要, 17, pp. 49-57 (1993).
- 9) 加藤良一, 大岩悠子, 小川馨慧, 高橋大輔, 原田隆人, 吉田貴行, 鈴木隆, 「タンパク質分解」, 山形大学紀要 (教育科学), 14(3), pp. 111-121 (2008).
- 10) 井口智文, 松本英子, 角屋柘英, 「パイナップルに含まれるプロテアーゼを利用した実験教材の開発」, 宇都宮大学教育学部紀要第2部, 53, pp. 15-22 (2003).
- 11) J. Skinner, "Microscale Chemistry", The Royal Society of Chemistry, London (1997).
- 12) 日本化学会編, 「マイクロスケール化学実験」, 日本化学会 (2003).
- 13) 荻野和子, 竹内茂彌, 堯植秀樹, 「環境と化学」, 東京化学同人, pp. 1-6 (2009).
- 14) 芝原寛泰, 佐藤美子, 「マイクロスケール実験」, オーム社 (2011).
- 15) 椎葉昌美, 土師麻里奈, 久野香月, 水野暢子, 中川徹夫, 「マイクロスケール実験を用いたキウイに含まれるタンパク質分解酵素の教材開発」, 神戸女学院大学論集, 58(2), pp. 79-86 (2011).

(原稿受理日 2015年9月25日)