

学生実習「薬品生物化学実習 I」内容の検討について

技術センター 医学部等部門
総合薬学科技術班 濁川 清美

1. はじめに

広島大学医学部総合薬学科・生理化学研究室では、11月の10日間（午後のみ）、学部2年生（60余名）を対象とした学生実習を行っている。この実習は、「薬品生物化学実習 I」と題し、生物化学研究等で用いられる基礎的な実験手法の取得を目的としている。報告者は約10年前よりこの実習に携わってきた。この間、該当分野における研究手法は変化し、「基礎的手法」と呼ばれるべきものも変化している。これに対応し、実習内容を変更したいとの担当教員の意向を受け、一昨年より報告者は、実習の新しい構成を担当教員と共に検討してきた。本報告では、この経緯の一端を述べる。

2. 変更点について

実習は3つのテーマから構成されていたが、このうちの1つ、「酵素反応の速度論的解析」について大きく変更した。このテーマでは、酵素反応の速度パラメーターである K_m 値、 V_{max} 値を Lineweaver-burk 解析によって決定することを目的として実験を進める。以前の実習では、ラット肝臓 post nuclear supernatant (PNS) 中の酸性ホスファターゼ (ACP) を酵素とし、p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) 脱リン酸化反応を End Point 法にて測定していた。また、実験は次の順で進めていた。(1) 酵素溶液の調製。(2) 蛋白質定量。(3) 酵素反応の酵素濃度依存性測定。(4) pH 依存性測定。(5) 時間依存性測定。(6) 基質濃度依存性の測定と Lineweaver-burk 解析。このうち、主に (1) と (6) の段階を変更した。

なお、以前の実習では、学生を30班に分け、15班ずつの2グループについて異なるスケジ

ュールで行っていた。しかし、変更後に必要となった機器類の数量が少ないため、1グループの班数を減らし、全体を22~3班に分け、7~8班から成る3グループとした。

3. 「酵素溶液の調製」の変更について

以下に変更前後の酵素溶液調製手順を示す。

<変更前>

- (1) ラット麻酔
- (2) 脱血死
- (3) 肝臓摘出
- (4) ホモジナイズ
- (5) 遠心分離
- (6) PNS (ACP を含む) を得る

<変更後>

- (1) 大腸菌培養液（対数増殖期）を用意
- (2) 発現誘導
- (3) 大腸菌回収
- (4) 超音波破砕
- (5) 遠心分離
- (6) 可溶性画分 (PTP1B を含む) を得る

以前は、1班(2~3名)が1匹のラットより肝臓を取り出し、そのPNSを調製し、酵素溶液としていた。近年、酵素機能を研究するための標品は、生体組織から得るのではなく、遺伝子組み換え蛋白質として大腸菌、酵母、昆虫細胞等に大量に作らせることが多くなっている。そこで、酵素は大腸菌を利用した大量発現系にて調製することにした。このためには酵素遺伝子が必要となるが、研究室にて単離したヒト protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 遺伝子を用いることにし

た。PTP1B は、インスリンレセプター サブユニット中のリン酸化されたチロシン残基を、脱リン酸化する酵素である。PTP1B の酵素活性は、ACP と同様に pNPP を基質とした測定法により評価できるため、従来の実習と同様の解析が出来ると思った。

酵素の調製は、実習時間が限られているため、PTP1B 遺伝子発現ベクター (pQE30,キアゲン社) を導入した大腸菌の発現誘導から開始することにした。対数増殖期の培養液は研究室で用意し、これを各班に 10 mL ずつ渡し、発現誘導のための isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) を加えてもらうことにした。発現の誘導は 3 時間程度行いたいというため、IPTG の添加作業は午前中の休憩時間に行ってもらい、午後の実習開始時まで 2 時間半程度誘導することにした。午後の実習では、培養液から大腸菌を回収・破碎し、遠心分離により可溶性画分を得るまでの操作を行ってもらうことにした。より正確な酵素活性測定のため、また蛋白質精製法の学習のため、可能ならば、PTP1B 蛋白質に付加させてある 6xHis タグを利用してアフィニティー精製を行いたいところであった。しかし、(1) アフィニティー樹脂が高価であること、(2) 操作時間が長くなることから、精製は行わず、可溶性画分の状態で、酵素活性測定することが出来ないかと考えた。

報告者による予備検討では、可溶性画分の状態でも、酵素濃度依存性や時間依存性など問題なく測定出来た。このため、可溶性画分を用いた解析を行う内容の実習書を作製し、実習のスケジュール等も決定した。しかしながらこの後、研究室の院生さんに、新しく作製した実習書通りの設定 (器具・試薬量等) にて実験を行ってもらったところ、反応時間依存の直線性が 10 分も持続しないという結果が得られた。この原因の一つとして、「大腸菌可溶性画分中の PTP1B」は熱に不安定であることが考えられた。報告者の予備検討ではピペットマンを使用したのだが、実習ではメスピペットを使用してもらう。メスピペットの扱いに慣れていなければ、溶液はメスピペット中で温まり、酵素の失活を招くと考えられた。

学生実習では、使用器具が限られており、実験者は操作に慣れていない。これらの点を考慮すると、End Point 法で酵素反応を測定し、速度論的解析を行うためには、10 分以上の直線的な反応が必要であると考えていた。従って、「大腸菌可溶性画分中の PTP1B」について速度論的解析を学生実習で行うことは、非常に困難であると思われた。以前の実習において ACP 酵素反応の速度論的解析が可能であったのは、「ラット肝臓 PNS 中の ACP」が非常に安定であったためと考えられた。以前の実習が、限られた器具で行えるよう、よく考えられた内容となっていたことを改めて実感した。

4. SDS-PAGE の導入について

上記の通り、「大腸菌可溶性画分中の PTP1B」について速度論的解析を行うことは難しいため、取り止めることにした。しかしながら、遺伝子組み換え蛋白質の調製法は、学生実習に導入したい手法であるため、これを「酵素反応の速度論解析」とは独立したテーマとすることにした。

このテーマには、大腸菌の可溶性画分を調製した後、PTP1B の発現を確認するための 2 つの測定法を組み入れた。一つは、上記の pNPP ホスファターゼ活性測定を、IPTG 添加の有無による違いを確認するという形で残すことにした。さらにもう一つは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による解析を導入することにした。SDS-PAGE は蛋白質解析の基本的な手法であるが、これまで、機器等の問題もあり、導入出来なかった。

SDS-PAGE は、以下の手順で進めた。

- (1) ゲル板の組み立て
- (2) ポリアクリルアミドゲルの作製
- (3) 泳動サンプルの調製
- (4) 泳動装置の組み立てとサンプルの泳動
- (5) CBB 染色
- (6) 染色結果の解析 (分子量を求める)

各段階とも、デモンストレーションの見学後、実施してもらうようにした。7~8 班が一斉に煩

雑な作業をするため、2 班に 1 名の教員か院生が付いて指導をした。円滑にかつ事故のないよう進行させるため、ゲル原液は研究室で準備し、その他試薬は各班に配布出来るよう、チューブに分注した。また、前もって細々とした器具も各班の実験台に配置した。これにより、ゲル原液をこぼす、装置が急に故障するなどの小さなトラブルはあったものの、対処することが出来、無事に全班の泳動結果が得られている。このように SDS-PAGE 実習は準備等の研究室側の負担が大きい、学生には好評であった。

5. 「基質濃度依存性測定と Lineweaver-burk 解析」の変更について

「酵素反応の速度論的解析」のテーマでは、「酵素溶液の調製」を省略し、市販の ACP を使用することにした。そして、2 項で述べた様に、「基質濃度依存性測定と Lineweaver-burk 解析」の内容を若干変更した。

以前まで講義でのみ取り扱っていた「阻害剤存在下での酵素反応」についての解析を新しく加えたいとの担当教員の意向に従い、変更を行った。具体的には、阻害剤存在下、非存在下で同時に、基質濃度依存性の測定を行い、Lineweaver-burk 解析を行う内容にした。阻害剤には、拮抗阻害剤として働くリン酸を用い、リン酸存在下と非存在下での K_m 値より、リン酸の ACP に対する K_i 値を求めてもらうことにした。

Lineweaver-burk 解析では、ピペット操作を正確にし、かつ酵素反応を適切に行わなければ、良い結果が得られない。解析値のプロットは直線となるはずだが、学生実習の結果では、大きくばらつくか、曲線となることが多い。この難しい実験を、従来よりも 2 倍多いサンプル数について行うことになったため、実習では、正確な操作を行うよう、以前にも増して注意を喚起した。また、測定

値の解析では、電卓を用いて面倒な計算を行う。この作業も 2 倍量以上に増えたため、実習時間が長引く結果となってしまった。この対策として、穴埋め式の解析ワークシート*を用意し、使用してもらった。多少は学生の負担が軽くなり、実習時間は短縮したのだが、それでも電卓での解析作業は面倒であり、苦勞して解析した結果が不可解なものであった班は徒勞感を覚えたようであった。

「基質濃度依存性測定と Lineweaver-burk 解析」の変更は、(面倒なことが増えた為) 学生には歓迎されなかったようだ。しかし、ここで行う解析は、酵素の阻害薬研究に欠かせないものであり、よく理解し行ってもらえるよう、今後改良していきたいと考えている。

表 1 に、本年度の実習での結果を示す。班間でかなりばらつきがあるが、その平均値をみると、リン酸により K_m 値が増加する一方、 V_{max} 値はあまり変化していない。つまり、リン酸による拮抗阻害を示唆する値となっている。中でも、A-1、A-7、B-3、C-2 班は、模範的な結果を出しており、メスピペットを正確に使用し、酵素を適切に扱っていたことが窺える。

6. 最後に

報告者の研究室では、より時代に即した内容の実習を行うため、変更を行ってきた。今後もさらに改良や新規手法の導入を考えている。しかし、共通実習室の器具・機器の老朽化のため、思うように出来ない現状がある。これを改善して頂きたいと願っている。

*解析ワークシートと実習書を、研究室ホームページ上で公開しています。

<<http://home.hiroshima-u.ac.jp/phazeki/jisshu.htm>>

表1 ACPのpNPPホスファターゼ活性に与えるリン酸の影響

- 学生実習での解析結果 -

group	Km (μM)		Vmax (nmol/min)		specific activity (nmol/min.mg)	Ki (μM)
	phosphate +	phosphate +	phosphate +	phosphate +		
A 1	76	140	7.9	6.5	390	210
A 2	91	220	7.8	8.2	310	120
A 3	170	240	9.1	7.7	360	410
A 4	64	180	7.3	8.0	290	92
A 5	111	170	11.0	9.0	430	310
A 6	58	200	9.3	7.3	390	150
A 7	81	160	8.8	8.5	350	180
A 8	57	78	6.9	5.1	270	440
B 1	63	110	7.3	6.8	290	230
B 2	97	331	3.2	4.0	260	70
B 3	98	190	8.6	8.8	350	180
B 4	108	209	9.3	8.3	374	180
B 5	88	190	6.9	8.0	280	150
B 6	120	190	9.6	8.7	385	290
B 7	82	180	8.8	8.3	352	140
C 1	88	210	8.1	8.1	352	120
C 2	91	170	8.3	8.3	332	190
C 3	77	148	8.5	7.4	341	180
C 4	50	100	6.3	3.2	250	170
C 5	59	160	6.9	7.6	270	97
C 6	70	170	8.5	8.3	340	120
C 7	40	56	6.3	4.6	250	420
average	84	173	7.9	7.3	328	202

反応条件: 133 mM sodium acetate, pH4.5, 1 mM DTT, 25 μg ACP, 50~500 μM pNPP,
166 μM sodium phosphate (\pm) 反応液量3mL; 反応時間15 min