

海洋生物科学技術論と実習 II

——有用成分抽出の試み——

2011. 8. 27-28

担当教官：豊原治彦、木下政人

TA：真鍋正彦

はじめに：

タンパク質の分解は、栄養素（タンパク質）の消化・吸収や細胞の機能調節など、生体に必須の働きである。しかし、この分解活性も正常な制御下では生体に有効であるが、その制御から外れると生体に有害となる。

例えば、創傷時に、フィブリノーゲン（繊維素原とよばれる）が、トロンビン（蛋白質分解酵素のひとつ）により限定分解を受けフィブリンとなり、これが互いに絡まり合い凝集塊を形成し、止血するという過程がある。ところが、この凝集塊がでたらめに血管内で形成されると、脳梗塞など重篤な疾患となってしまう。

トロンビンの酵素活性を押さえる（阻害する）物質があれば、不必要な血液の凝集を抑制する「薬」として利用できる。このような阻害剤（生理活性物質の一つ）が海洋生物中に潜んでいるかもしれない。

目的：海洋生物に存在する有用物質の探索方法を学ぶ。

今回は、海洋生物の熱水抽出物から、よく知られているタンパク質分解酵素のトリプシンを用いて、その阻害物質の探索を試みる。

準備：

試料の確保：舞鶴実験所近辺の海域から生物を採集、

または、凍結保存しておいた海洋生物試料の解凍

緩衝液 A（5 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl , pH 7.5）

トリプシン溶液：units/ml in 緩衝液 A

プロテアーゼ阻害剤カクテル in 緩衝液 A

合成基質溶液：25 μM Boc-Asp-Pro-Arg-MCA in 緩衝液 A

反応停止溶液：0.05 % SDS in 緩衝液 A

器具類の洗浄

操作：

【1日目】生物試料抽出液の調製（各人2種類調製する）

- 1) 各生物試料をハサミで十分に細かく切断する。
(骨、甲殻類の殻など固いものは除いておくこと)
- 2) 15 ml または、50 ml の遠沈管に海洋生物試料約 1～4 g に、4 倍容量の緩衝液 A（約 4～16 ml）を加え、ホモジナイザーで、十分に破砕する。
- 3) かるく蓋をして、ゆっくり混ぜながら、沸騰水中で 10 分間加熱する。
注意：内因性のプロテアーゼを失活させるため、**十分**に加熱すること。
- 4) キムワイプで濾過し、ろ液を 50 ml の遠沈管に集める。
- 5) ろ液 1 ml を 1.5 ml tube に移し、5 分間遠心分離する。
- 6) 上清 0.5 ml を新たな 1.5 ml tube に移す。
- 7) この抽出液を緩衝液 A を 0.5 ml 加え、合計 1 ml にする。これを生物試料抽出液とし、凍結保存する。

【2日目】トリプシン活性阻害の検討（酵素活性の測定）

- 1) 生物試料抽出液を解凍する。
- 2) トリプシン溶液 100 μ l に、生物試料抽出液、緩衝液 A、プロテアーゼ阻害剤カクテル溶液 200 μ l を加え軽く混ぜ、室温で 1 分間放置。（注意：各抽出液で 3 本ずつ行う。試験管は合計 12 本になる）
 - 2-1) これに合成基質溶液 500 μ l を加え、37℃で 30 分間加温。
 - 3-1) 試験管に 900 μ l の反応停止溶液を加え、反応を停止させる。
 - 2-2) 1) のトリプシン溶液の代わりに緩衝液 A を入れたものを作り、37℃で 30～60 分間加温。（合計 4 本）
 - 3-2) 900 μ l の反応停止溶液を加える。
(Blank ; negative control とする)
- 4) 蛍光光度計で活性測定。（励起波長 345nm ; 測定波長 445nm）

考察：

- 各生物試料抽出液のトリプシン活性阻害についてまとめる。
- 阻害の強さについて考察する。
- 他の人の結果と比較する。

後かたづけ：

- ・ 器具類の洗浄
- ・ 実験台と機械類の掃除と整頓

【結果】トリプシン活性阻害の検討

緩衝液 A （トリプシンの活性）

	A 445 nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B
緩衝液 A1	A1	C	D
緩衝液 A2	A2		
緩衝液 A3	A3		
緩衝液 A (トリプシンなし)	B		

生物試料 1 （試料名： ）

	A 445nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B	阻害率 $100 - (E/D \times 100)$
試料 1-1	A1	C	E	
試料 1-2	A2			
試料 1-3	A3			
試料 1 (トリプシンなし)	B			

生物試料 2 （試料名： ）

	A 445nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B	阻害率 $100 - (E/D \times 100)$
試料 2-1	A1	C	E	
試料 2-2	A2			
試料 2-3	A3			
試料 2 (トリプシンなし)	B			

プロテアーゼ阻害剤カクテル溶液

	A 445nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B	阻害率 $100 - (E/D \times 100)$
阻害 1-1	A1	C	E	
阻害 1-2	A2			
阻害 1-3	A3			
阻害 (トリプシンなし)	B			

【提出用】トリプシン活性阻害の検討 氏名：_____

緩衝液 A （トリプシンの活性）

	A 445 nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B
緩衝液 A1	A1	C	D
緩衝液 A2	A2		
緩衝液 A3	A3		
緩衝液 A（トリプシンなし）	B		

生物試料 1 （試料名：_____）

	A 445nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B	阻害率 100-(E/Dx100)
試料 1-1	A1	C	E	
試料 1-2	A2			
試料 1-3	A3			
試料 1（トリプシンなし）	B			

生物試料 2 （試料名：_____）

	A 445nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B	阻害率 100-(E/Dx100)
試料 2-1	A1	C	E	
試料 2-2	A2			
試料 2-3	A3			
試料 2（トリプシンなし）	B			

プロテアーゼ阻害剤カクテル溶液

	A 445nm	平均 (A1+A2+A3) /3	活性 C-B	阻害率 100-(E/Dx100)
阻害 1-1	A1	C	E	
阻害 1-2	A2			
阻害 1-3	A3			
阻害（トリプシンなし）	B			

【考察および感想】

準備

5 x 緩衝液 50 ml 作っておく、
1 x 緩衝液を 500ml 作っておく
反応停止溶液を 500 ml 作っておく

- 1) 緩衝液 各人 20 ml
- 2) 反応停止溶液 0.05% SDS in 1x 緩衝液 各人 20 ml
- 3) トリプシン溶液 (当日調製) 各人 3 ml (氷冷)

トリプシン (5000 units/mg) を 2mg を緩衝液 2ml に溶解し、これを緩衝液で 400 倍に希釈し、使用する。(氷上保存)

- 4) プロテアーゼ阻害剤カクテル 1 ml/人、 (20ml つくる)
当日、x100 カクテル 400 ul を緩衝液 20 ml で 50 倍に希釈。
- 5) 合成基質溶液 9 ml/人 (100ml つくる。参加人数に合わせて調整すること)
10 mM solution 100 μ l + 緩衝液 100ml
(無蛍光 DMSO に溶解)

持っていくもの (氷冷)

トリプシン (約 2mg : 5,000 units/mg)	プロテアーゼ阻害剤カクテル
5 x 緩衝液	1x 緩衝液
合成基質	反応停止溶液

(常温)

50 ml チューブ	20 本		
15 ml チューブ	60 本	1.5 ml tube	200 本
発砲スチロール箱	7 箱	テキスト	16 部

蛍光のセル

試験管 250 本

試験管立て	6 こ	50 ml チューブ立て	4 こ
1000 ul pipet man	8 本以上	ブルーチップ (箱入り)	7 箱
鍋	ロート 20 個以上	ポリトロン	1 台

蛍光分光光度計の使い方

- 1) 分光光度計のキセノンランプ (X e l a m p) のスイッチを“ON”にする。
(本体の右側面にある。)

キセノンランプの ON/OFF スイッチが、本体スイッチ

の上にあるのでこれを必ず ON にすること！！

- 2) パソコンを立ち上げる。指示通りにして、パスワードは入力せずに、リターン

- 3) 条件設定： 励起波長 **345 nm**,

測定波長 **445 nm**

バンド幅 励起 5 (活性に合わせ適宜変更する)

蛍光 5 (活性に合わせ適宜変更する)

感度 LOW (活性に合わせ適宜変更する)

濃度 (mg/ml) 0.000-100

レスポンス Auto

繰り返し 1 回

- 4) 測定：画面左側の“Int”の数字を記録する。

条件設定 (C)

→ (最下の) パラメーター読み込み (L)

→ 09kino.CFG

→ 読み込み