

目的

原理

1. コハク酸 フマル酸 水素

$$\begin{array}{c}
 \text{COOH} \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{COOH}
 \end{array}
 \xrightarrow{\text{脱水素酵素}}
 \begin{array}{c}
 \text{COOH} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C} \\
 || \\
 \text{C}-\text{H} \\
 | \\
 \text{COOH}
 \end{array}
 + 2 [\text{H}]$$

2. 酸化型 還元型

メチレンブルー メチレンブルー
(青色) (無色)

Mb + 2 [H] Mb H₂

準備

薬品 5%コハク酸ナトリウム溶液, 0.04%メチレンブルー溶液, ワセリン

方 法

-

- | 試験管 | 酵母菌
浮遊液 | 煮沸した
酵母菌 | コハク酸
ナトリウム | 水 | メチレンブルー溶液 |
|---------|------------|-------------|---------------|-----|-----------|
| ツンベルグ管A | 5mL | | 2mL | | 5 滴 |
| 試 験 管 B | 5mL | | 2mL | | 5 滴 |
| 試 験 管 C | | 5mL | 2mL | | 5 滴 |
| 試 験 管 D | 5mL | | | 2mL | 5 滴 |

- ## 結果

- | 試験管 | ツンベルグ管
A | 試験管
B | 試験管
C | 試験管
D |
|-------|-------------|----------|----------|----------|
| 管内の変化 | | | | |

- ## 考 察

5. 試験管Dには基質がないので反応が起こらないはずだが、液の色が少し薄くなった。その理由を考えよ。

実験の反省・感想

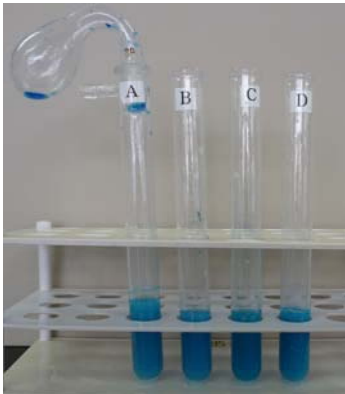
--

クラス	番 号	氏 名
-----	-----	-----

◆◇◆ 脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）の働きについて ◆◇◆

実験結果

実験開始時の水温39℃で実験を行った結果、ツンベルグ管Aでは2分後に液が白くなり、3分後には試験管Bも液が白くなった。3分後の結果は次の通りである。実験後の水温は37℃であった。



実験後の様子



実験前

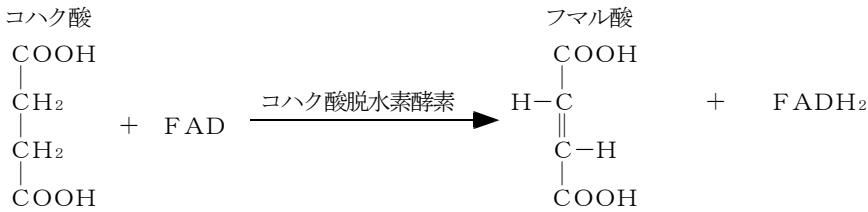
試験管	ツンベルグ管 A	試験管 B	試験管 C	試験管 D
管内の変化	全体的に白くなった。	白くなったが、液の表面が青い。	青いままである。	かすかに色が薄くなった。

7月から9月に実施するときは、室温が高いのでお湯で暖めなくても、実験は可能である。室温が26℃で実施した結果、ツンベルグ管Aでは3～4分後に液が白くなり、試験管Bでは4～5分後に液が白くなった。

解説および考察

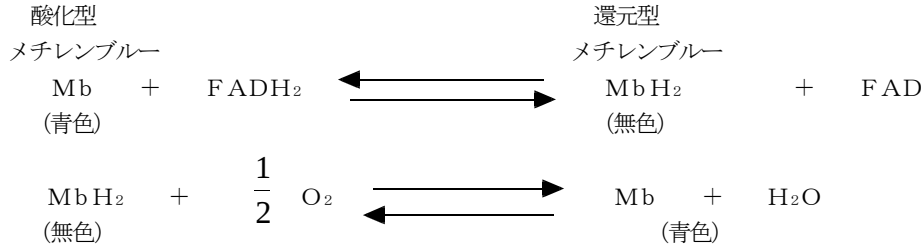
1. 脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）は、基質から水素をとって、NADやFADのような水素受容体に渡す脱水素反応を触媒する酸化還元酵素である。この酵素は、クエン酸回路などに存在するので、ミトコンドリアを多く含む好気呼吸が盛んに行われている組織が実験材料として適している。ニワトリの胸筋（ささみ）やブタの心筋、アサリやシジミなどをすりつぶして酵素液を抽出してもよいが、水に溶かすだけで酵素液を簡単に作成できることから、ここでは市販のドライイースト（日清製粉製スーパーカメリア）を使用した。生酵母を使用する場合には、パンを製造・販売している店に注文すればよい。冷蔵庫に保存すれば1週間程度使用することができる。実験には10%濃度にして使用する。

生体内では様々な脱水素酵素があるが、基質特異性がみられるので、この実験ではFADを水素受容体とするコハク酸脱水素酵素を用いている。ミトコンドリア内で行われるクエン酸回路では、コハク酸がコハク酸脱水素酵素の働きで脱水素されてフマル酸に変わる。このとき外された水素は水素受容体のFADに受け渡され電子伝達系に送られる。



メチレンブルーは、FADのように水素受容体として働き、酸化型で青色、還元型で無色になる。この性質を利用して、脱水素反応の進行を確認することができる。ツンベルグ管を用いて、排気してから主室の酵素液と副室の基質、メチレンブルーを混合するのは、反応を最初から無酸素状態で行うためである。酸素があると、脱水素酵素

で遊離した水素は、直接酸素と反応して水となり、メチレンブルーを還元する働きがなくなるので、色の消失が起こりにくくなる。また、実験終了後、ツンベルグ管に空気を入れると液が青くなるのは、還元されて無色になったメチレンブルー（MbH₂）が、再び空気中の酸素によって酸化されるからである。



2. 試験管Bでは、液の表面が空気中の酸素と接するために、還元されて無色になったメチレンブルー（MbH₂）が、再び空気中の酸素によって酸化されるために青くなったままである。
3. 試験管Cでは、煮沸により脱水素酵素が変性し、失活したために色が変化しなかったと考えられる。
4. 試験管Dでは基質（コハク酸）がないにもかかわらず、実際には液の色が少し薄くなった。これは、酵母の細胞内に含まれていた呼吸基質に脱水素酵素が反応したためと考えられる。

発展

1. 実験終了後、ツンベルグ管Aと試験管Bを振らせ、それぞれの液の変化を観察させる。ツンベルグ管の液の色は変わらないが、試験管の液の色が青くなる理由を考えさせる。さらに、ツンベルグ管の主室と副室の穴の位置を合わせ、管内に空気を入れた後、振ったらどうなるか観察させ、その理由を考察させる。
2. ツンベルグ管を各班に3本ずつ用意できる場合は、A、C、Dの組み合わせで実験を行い、結果を比較し、考察させる。
3. ツンベルグ管を用意できない場合は、Aの試験管に各溶液を入れた後、流動パラフィンを1mL加え、表面に浮かせて実験を行ってもよい。ただし、試験管を洗うのが面倒である。
4. ストップウォッチを用いて、脱色に要する時間を測定して比較してもよい。