

公開講座に使えるテーマ (6) — 「タンパク質分解酵素を含む洗剤の働き」 —

胸組 虎胤*1

Experimental Themes for Extension Lectures (6) — “The Works of Detergents Containing Proteinases” —

Toratane MUNEGUMI

Amylases, lipases, cellulases, and proteinases (peptidases) have been used for the enzymes added in detergents. Activity of added enzymes in detergents is utilizable to lead new themes of extension lectures. This research describes proteinases added in detergents. Proteinases hydrolyze proteins to small proteins, peptides, or amino acids. The methods for detection of these compounds are important for success of experimental visualization of enzymatic reactions in the mixture of proteins by the proteases included in the detergents. The survey study suggests that the method using a kind of urine test paper impregnated with tetrabromophenol blue is superior to other methods of detection.

KEYWORDS: teaching device, detergent enzymes, protein, extension lecture

1. はじめに

酵素はタンパク質で構成される生体触媒であり、洗剤、スキンケア用品、歯磨き等、多くの生活用品に使われている。¹⁻³⁾ 酵素が利用される領域は主に化学と生物にわたり、化学と生物学を結ぶ科目複合的な教材として有用である^{4,5)} (図1)。酵素は物質を変化させるという化学的側面で見ることができるとともに、生体由来であるという生物学的側面で捉えることもできるからである。^{4,5)}

また、酵素を教材として使用する場合、入手方法によって、市販酵素、抽出酵素、添加酵素に分類できる。市販酵素は酵素を試薬としている場合であり、抽出酵素は生体試料から実験者が抽出して使用する場合、添加酵素は化成品に酵素が添加されている場合である。^{1,2)}

添加酵素を用いた教材の作成については、歯磨きに添加されている酵素(デキストラナーゼ)が、歯垢の成分であるデキストランの α (1 $\rightarrow$ 6)結合を切断する例を以前報告した。^{6,7)} 生成するイソマルトースの還元性をフェーリング試薬で検出でき

*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: munegumi@oyama-ct.ac.jp

るので、デキストラナーゼの作用を可視化できた。^{6,7)} また、洗濯洗剤や食器洗い機用洗剤に含まれるアミラーゼ系の酵素を用いた報告は前報で行った。⁵⁾ 本研究では、洗剤等に添加されたタンパク質加水分解酵素の働きを検出する方法について検討したので報告する。

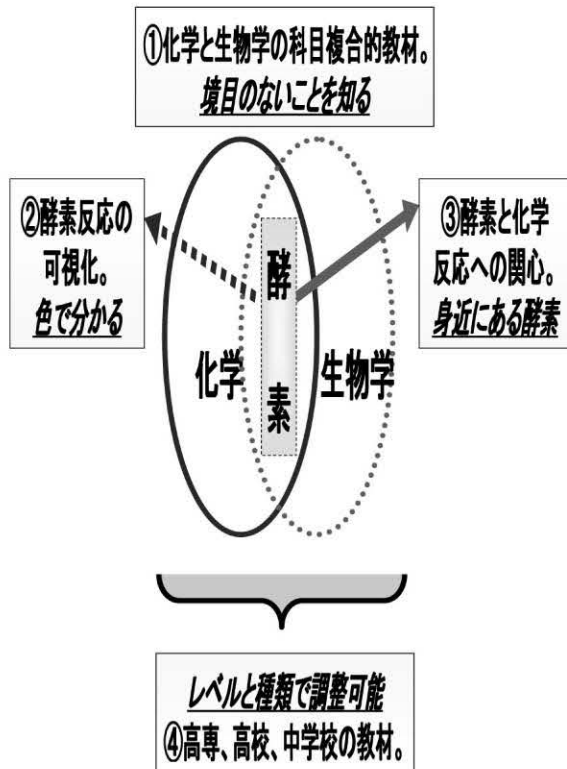


図1 酵素の教材としての特徴

2. 洗剤に添加されている酵素^{1-3, 5, 8)}

洗剤に酵素が添加されるようになった経緯、製品開発の歴史については前報に記載されている。現在洗剤（洗濯、食器洗い用、食器洗い機専用）に使用されている主な酵素は、①リパーゼ、②プロテアーゼ、③アミラーゼ、④セルラーゼの4種類である。

表1に洗剤に含まれる酵素の種類を示す。①は脂肪酸エステルを加水分解する。②はタンパク質を加水分解して可溶化する。③はデンプンを加水分解する作用をもつ。④はセルロース系繊維の先端の広がりや乱れた箇所を加水分解して、そこに取り込まれた汚れ成分といっしょに繊維から取り除き、整った形態の繊維を復活させている。¹⁾

表1 洗剤に含まれる酵素の種類⁵⁾

酵素名	酵素EC番号	反応基質 (切断される結合)	生成物
リパーゼ	3.1	脂肪酸エステル (脂肪酸エステル結合)	脂肪酸+アルコール
プロテアーゼ	3.4	タンパク質 (ペプチド結合)	ペプチド、アミノ酸
アミラーゼ	3.2	デンプン ($\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合)	オリゴ糖
セルラーゼ	3.2	セルロース ($\beta(1\rightarrow4)$ 結合)	オリゴ糖 (セロビオース)

3. プロテアーゼの種類^{9, 10)}

プロテアーゼには様々なものが知られているが、表2には活性中心の構造がある程度知られている代表的なものを示す。

表2 触媒基の違いによるプロテアーゼの種類

酵素名	酵素EC番号	活性中心の最も重要な触媒基	具体例
アミノペプチダーゼ (Aminopeptidases)	3.4.11	金属が働くこともあるが酵素で異なる	leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1)
金属カルボキシペプチダーゼ (Metallo-carboxypeptidases)	3.4.17	金属イオン	carboxypeptidase (EC 3.4.17.1)
セリンプロテアーゼ (Serine endopeptidases)	3.4.21	セリン(Ser)の側鎖	chymotrypsin (EC 3.4.21.1)
システインプロテアーゼ (Cysteine endopeptidases)	3.4.22	システイン(Cys)の側鎖	papain (EC 3.4.22.2)
アスパラギン酸プロテアーゼ (Aspartic endopeptidases)	3.4.23	アスパラギン酸(Asp)の側鎖	pepsin A (EC 3.4.23.1)
金属エンドペプチダーゼ (Metallo-endopeptidases)	3.4.24	金属イオン	thermolysin (EC 3.4.24.27)
スレオニンプロテアーゼ (Threonine endopeptidases)	3.4.25	スレオニン(Thr)の側鎖	proteasome endopeptidase complex (EC 3.4.25.1)

この表でプロテアーゼはタンパク質加水分解酵素の通称であり、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ等のアミノ酸残基を意味する接頭語は酵素中に存在する触媒基を意味する。正式名称は英語表記で示すように **peptidase** (ペプチダーゼ) であり、ペプチド結合を切断する活性を持つ酵素を意味している。

また、**Endopeptidase**, **Exopeptidase** という分類が可能である。⁹⁾ 図2に示すように、前者はタンパク質の中央部分(末端側でない)のペプチド結合を切断する特異性を持つ酵素であり、後者はアミノ末端側(**Aminopeptidase**)、またはカルボキシル末端側(**Carboxypeptidase**)のペプチド結合を切断することを意味する。

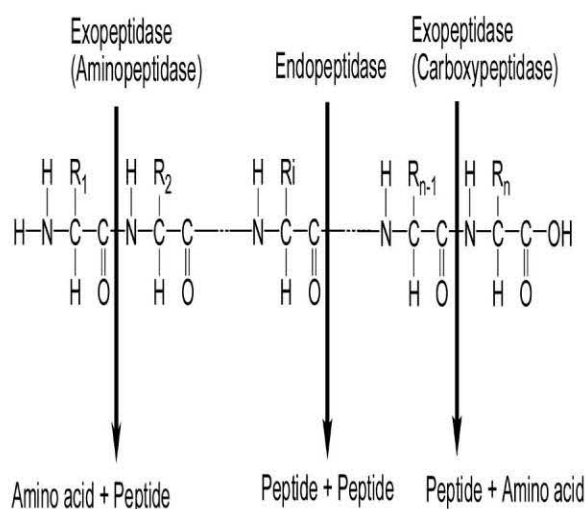


図2 プロテアーゼの作用点による分類

Endopeptidase はペプチド(**Peptide + Peptide**)を生成し、**Exopeptidase** はN末端側からアミノ酸とペプチド(**Amino acid + Peptide**)、またはペプチドとアミノ酸(**Peptide + Amino acid**)が代表的生成物として示されている。ただ、**Exopeptidase** はタンパク質のN末端またはC末端からペプチド結合を順次加水分解する酵素であり、ジペプチドなどのオリゴペプチドをN末端またはC末端から順次加水分解する酵素も含まれる。たとえば、**dipeptidyl-peptidase II** (EC 3.4.14.2)が知られており、この酵素はオリゴペプチドのN末端側からジペプチドを加水分解する。

多くの酵素が知られている中で、アルカリ性で

使用することが多い洗剤用としては好アルカリ性枯草菌(*Bacillus*)由来のタンパク質加水分解酵素が用いられることが多い。^{2,3)} たとえば、そのような酵素にはセリンプロテアーゼに分類される **subtilisin** (EC 3.4.21.62)がある。洗剤にはアルカリビルダー(界面活性剤の濃度が低くても、洗浄力が落ちないようにする補助剤)として炭酸塩やケイ酸塩が含まれているため、アルカリ性に最適pHを持つ酵素の方が都合がよい。また、食洗機中で高温使用できる耐熱性プロテアーゼが利用されている。²⁾

4. タンパク質性の汚れ

衣類の汚れには、汗や皮脂に含まれる脂質とタンパク質性汚れ、食品が付着したことによる汚れ、仕事の作業中に付着した様々な汚れなどが考えられる。また、食器の汚れは当然食品のタンパク質、脂質、糖質由来の汚れ等が考えられる。衣類や食品の上記の汚れを洗い落とす洗剤には、酵素が含まれていて、加水分解によって汚れの分子を低分子化して可溶化することによって、洗浄効率を上げている。

特に、ここではタンパク質性の汚れがどのような食品から来ているかを簡単に示し、公開講座や演習実験の教材に用いるのは、どのようなものが可能であるか探る。まず、タンパク質を含む食品(食材)を表3に示す。

表3 食品のタンパク質含有量 (g/食品 100g)¹¹⁾

食材名	小分類	タンパク質 (重量%)
肉類	豚ひれ肉	22.8
	鶏ささ身	23.0
	牛ヒレ肉	20.5
魚類	ふかひれ	83.9
	かつお節	77.1
	たたみいわし	75.1
	マグロ赤身	26.4
穀類	焼きふ	28.5
	強力粉	11.7
	上新粉	6.2
	マカロニ(乾燥)	13.0
豆類	高野豆腐	49.4
	きな粉	35.5
	あずき(乾燥)	20.3
	豆乳	3.6
乳製品	バルメザンチーズ	44.0
	脱脂粉乳	34.0
	プロセスチーズ	22.7
	牛乳	3.3
その他	ゼラチン	87.6
	マッシュポテト	26.6
	落花生	6.6
	抹茶(粉)	30.6
	焼き海苔	41.4

表3に示すのは食材に該当するものであるので、実際の食事としてとるのはこれらを適切な量混合し、加熱等して調理したものであるが、食材ごとの数値は参考になる。また、実際に公開講座や演習実験で使用する教材に使えるものには均質性が必要とされるため、調理したものを使用するより、食材の方が適切であるとも考えられる。

この表に示すタンパク質含量の多く、計量がしやすい等のことを考慮すると、ゼラチン¹²⁾などは一つの選択肢であろう。それ以外の食材について教材としての適切性を議論し、実験してみることが重要であると考えられる。しかし、系統的に行うのは次の機会に譲る。

5. タンパク質の検出法¹³⁾と酵素活性

タンパク質を定量する方法について次に述べる。酵素を用いてタンパク質を加水分解することによって、ペプチドやアミノ酸が生成することによって述べた。しかし、洗剤に添加されている酵素がセリンプロテアーゼの subtilisin (EC 3.4.21.62)や金属プロテアーゼの thermolysin (EC 3.4.24.27)であることを考慮すると、ペプチド結合の減少やアミノ酸の増加でその酵素活性を見ることが可能であると推測できる。

まず、タンパク質の定量法には主に次のものが知られている。

(1) UV 法

これは紫外線吸収(210, 254, 280nm 等)を測定する方法である。254および280nmの吸収帯はタンパク質を構成するアミノ酸の側鎖に由来するものであり、タンパク質が加水分解されてもアミノ酸側鎖が分解されない限り残存する。したがって、これらの波長はタンパク質の加水分解を調べるには適さない。ペプチド結合は210nm付近で紫外線を吸収するため、タンパク質の加水分解によるペプチド結合の減少を見るには、この波長における吸収の減少を測定する方法があると考えられる。ただ、芳香族を含むいくつかの官能基の吸収帯もこの領域のかかっているため、基質として利用できるタンパク質は限定される。

(2) Biuret 法

この方法は銅(Cu^{2+})とペプチド結合がアルカリ水溶液中で反応して生成する錯体 (Cu^{1+}) の紫外線吸収 (340nm) を測定するものである。原理的

にはペプチド結合の数に吸収強度が比例するため、タンパク質の種類による発色強度の差はない。

(3) Lowry 法

この方法はBiuret法の改良型で、Folin 試薬に含まれるリンモリブデン酸とタングステン酸の複合体と銅(Cu^{2+})との反応を利用したものであり、Biuret 法よりも検出感度は高いが、界面活性剤の影響を受けやすい。

(4) BCA(bicinchoninate)法

この方法はFolin 試薬の代わりにBCA (ビスンコニン酸) (図3) を使用しており、界面活性剤の影響を受けにくい。

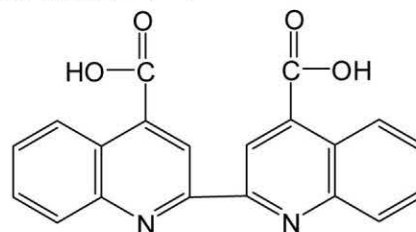


図3 ビシンコニン酸の構造

(5) Bradford 法

この方法はCoomassie brilliant blue G-250 (クマシーブリリアントブルーG-250) とタンパク質を構成するアミノ酸の側鎖のうち、芳香族と塩基性のものとの結合を利用したものであり、深青色の発色(595nm)を測定することで定量が可能である。

(図4)

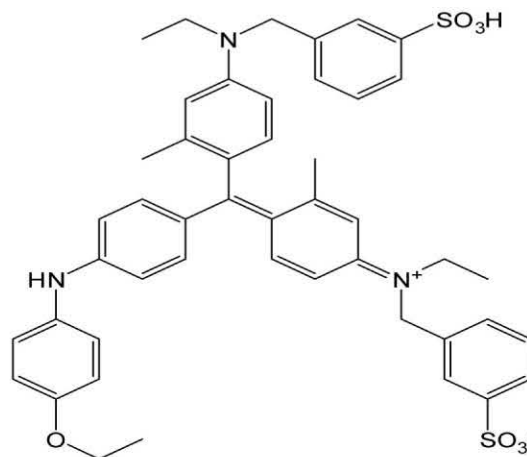


図4 クマシーブリリアントブルーG-250 の構造

(6) テトラブロモフェノールブルー方法¹⁴⁾

この方法はテトラブロモフェノールブルー (Tetrabromophenol Blue: HTBPB) (図5) とタンパク質との複合体との発色(625nm)を測定する方法であり、尿中に含まれるタンパク質の定量法とし

て開発された。界面活性剤 TX-100 の共存下で使用でき、発色も可視の領域であることから、量の変化を色の変化で見ることが可能である。

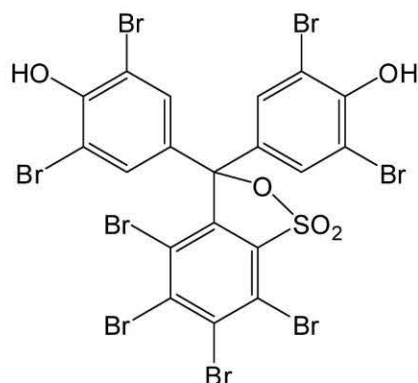


図5 テトラブロモフェノールブルーの構造

上記の方法は尿検査用のウロペーパーとして、タンパク質の定量に使用されている。以前、ウロペーパーを使用してタンパク質の加水分解を洗剤酵素を用いて行った例が報告されていたが、¹⁵⁾ 使用されたウロペーパーに含浸されていた試薬、および具体的な実験の詳細は不明なところが多い。おそらく、以前の報告で使用されていたウロペーパーはテトラブロモフェノールブルー以外のものを使用していたと考えられる。

6. おわりに

洗剤に含まれる酵素のうち主にタンパク質加水分解酵素の反応を可視化するための方法の選択肢について述べた。教材として使用するタンパク質の食材は様々であり、食材に毎の実験の可能性は無限にあると考えられる。しかし、実際にタンパク質を加水分解したことをうまく理解してもらうためには、妨害物質の反応を抑え、実験者にわかりやすい定量方法を具体的に工夫する必要がある。本研究では、文献からテトラブロモフェノールブルーを含浸させたウロペーパーの教材としての高い可能性について言及したが、この方法を実際の公開講座や演示実験で使える具体的な手順を検討することが必要と考える。

参考文献

- 1) 酵素利用技術体系, 小宮山眞監修, NTS (2009).
- 2) 産業用酵素, 上島孝之, 丸善 (1995).

- 3) 酵素の生産と利用技術の系統化, 中森茂, 国立科学博物館技術の系統化調査報告, 14 巻, pp. 141-183 (2009).
- 4) 公開講座に使えるテーマ(4) — 「市販酵素」, 「抽出酵素」, 「添加酵素」, 胸組虎胤, 小山工業高等専門学校紀要, 第 40 号, pp. 95-100 (2008).
- 5) 公開講座に使えるテーマ(5) — 「洗剤酵素の仕事を見る」, 胸組虎胤, 小山工業高等専門学校紀要, 第 43 号, pp. 141-150 (2010).
- 6) 公開講座に使えるテーマ(1) — 「ケナフを使った紙の作製」と「糖と反応する酵素」, 胸組虎胤, 小山工業高等専門学校紀要, 第 33 号, pp. 117-122 (2001).
- 7) 歯磨きを使って歯垢の成分を分解する, 胸組虎胤, 化学と教育, 第 51 巻, 4 号, pp. 238-239 (2003).
- 8) 藤原雅俊, 武石彰, 『花王 酵素入りコンパクト洗剤「アタック」の開発』, 一橋大学・文部科学省 COE プログラム「知識・企業・イノベーションのダイナミクス」大河内賞ケース研究プロジェクト (2004).
- 9) 酵素, 船津勝, 講談社 (1976).
- 10) Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd Ed, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, Elsevier (2004).
- 11) http://www.eiyoukeisan.com/calorie/nut_list/protein.html
- 12) 公開講座に使えるテーマ(3) — 「果汁を使ったタンパク質の加水分解」と「酵素と光学活性の関係」, 胸組虎胤, 小山工業高等専門学校紀要, 第 35 号, pp. 123-128 (2001).
- 13) タンパク質実験ノート(上) — 抽出と分離精製, 岡田雅人, 宮崎香編, 羊土社 (1996).
- 14) テトラブロモフェノールブルーを用いる尿タンパク質の吸光度定量及び目視定量, 橋本雅和, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 加藤周二, 分析化学, 54 巻, 9 号, pp. 783-788 (2005).
- 15) 山根平太郎, 酵素入り洗剤の中の酵素の働きを調べる, 化学と教育, 第 46 巻, 6 号, p. 380 (1998).

【受理年月日 2011年 9月30日】

