

# 実習レポート 薬品代謝化学教室

10191043 鈴木健一

実習班：11 班

実験日：2019/6/18 ~ 2019/6/24

## 実験 1 薬物代謝反応

### 目的

代謝研究の基礎としてラット肝のミクロゾーム分画を用いた *in vitro* での代謝反応を中心に実験を行うことにより、代謝薬物について学ぶ。

### 1 日目 - 実験方法

#### 誘導、および肝ミクロゾーム調整 (ビデオ)

1. ラットに  $\beta$ -naphthoflavone を経口投与
2. 麻酔であるソムノペンチルを投与する
3. 腹膜を切開
4. 正中線を切開
5. 横に切り開く
6. 腸管をどかす
7. 脂肪成分を取り除くと下行大静脈が出てくるので 1.1
8. 肝臓が大きく膨らむので揉みほぐす。これを 4 回行う。
9. 肝臓を切除する
10. 肝臓を塩化カリウム溶液で洗浄する
11. 氷上に置く
12. 肝臓の 4 倍量のバッファーを加え、ホモジェナイザーですり潰す
13. 綺麗にすり潰せなかった組織を取り除くために遠心分離する
14. 超遠心装置で 80 分間遠心する
15. 上澄みを捨てるとミクロソームのペレットが得られる
16. 重量を測る
17. マイナス 80 度で保存する

## タンパク質含量の測定

1. 4% 硫酸銅水溶液 0.20 mL を BCA 溶液 10 mL に加え、vortex ミキサーを用いてすぐによくかき混ぜる。
2. BSA 200  $\mu$ g/mL 溶液を試験管中で順次希釈して、BSA 25,50,100,150  $\mu$ g/mL の各溶液 2.0 mL ずつを調整する。
3. 検量線測定用に、BSA 200  $\mu$ g/mL 溶液、(2) で作成した各濃度の BSA 溶液をそれぞれ 50  $\mu$ L ずつ別の試験管に加える。またブランクとして 50  $\mu$ L を別の試験管に加える。そして、これらと同様に、マイクロゾーム希釈液を別の試験管に加える。
4. 1. で調整した試薬 1 mL を各試験管に加えてよく混合する。
5. 口をアルミホイルで覆い、インキュベータで 37℃、30 分インキュベートする。
6. 混合液を室温まで冷やし、混合液全量に蒸留水 3.0 mL を加え、希釈する。
7. 吸光光度計にて各サンプル希釈液の 562 nm 吸収の吸光度を測定する。
8. BSA 溶液の吸光度から検量線を作成し、マイクロゾームのタンパク質含量を求める。肝マイクロゾームのタンパク質含量は 3 本作った試験管の平均をとって算出する。

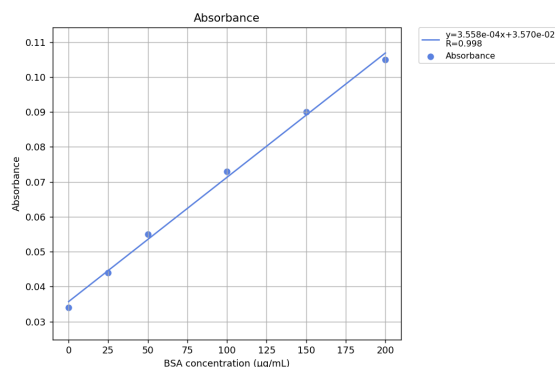
## cytochrome P450 含量の測定

1. 0.1 M Tris-HCl buffer 5.5 mL を 50 mL 三角コルベンに入れる。そこに、0.50 mL の肝マイクロゾーム希釈液を加えて混ぜる。
2. 溶液が均一になったら、分光セル 2 つにほぼ均一に分ける。
3. 2 つの分光セルを分光計の sample 側と reference 側にに入れベースライン補正を行う。この際サンプルが冷たいと曇りを生じてデータがぶれやすいので、サンプルは氷浴から出して室温近辺に戻してから測定を行う。
4. 両方のセルを取り出し、sample 側のセルに CO ガスを約 1 分間バブルする。その直後、両方のセルにミクロスパーテルで半分ほどの  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  を加える。パラフィルムでセルの口をふさぎ、数回ゆっくりと転倒混和を行った後、両方のセルを分光計に戻し、差スペクトルを測定する。
5.  $A_{450} - A_{490}$  から P450 のマイクロゾーム mg protein あたりの濃度を計算する。

## 結果

1. 吸光光度計にて各サンプル希釈液の 562 nm 吸収の吸光度を測定した結果

BSA concentration ( $\mu$ g/mL)	0	25	50	100	150	200
Absorbance	0.034	0.044	0.055	0.073	0.09	0.105



## 2. ミクロゾームのタンパク質含量

平均値	サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3
0.0727	0.073	0.073	0.072

検量線の傾きをもとに肝ミクロゾームのタンパク質含有量を求めると以下ようになる。

$$\frac{(7.27 \cdot 10^{-2} - 3.57 \cdot 10^{-2})}{3.56 \cdot 10^{-4}} \times 800 = 8.31 \cdot 10^4 [\text{g/g}] = 83.1 [\text{mg/mL}]$$

## 3. 差スペクトル $A_{450} - A_{490}$ から P450 のミクロゾーム mg protein あたりの濃度を計算する。

$\Delta A$	$\epsilon$	c/60 (mM)
0.136	91	$1.49 \cdot 10^{-3}$

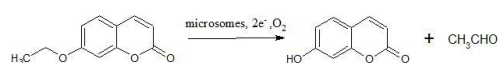
表より 60 倍に希釈された P450 の濃度が  $1.49 \cdot 10^{-3}$  であるから、P450 の肝ミクロゾーム mg protein あたりの濃度は以下のようにして求められる。このとき、上で求めた肝ミクロゾームのタンパク質濃度を用いる。

$$1.49 \cdot 10^{-3} \times 60 \times 10^3 \div 83.1 = 1.08 [\text{nmol/mg protein}]$$

## 2 日目 - 実験方法

### 7-Ethoxycoumarin の O-脱エチル化反応

non-treat 群 (non)、フェノバルビタール投与群 (PB)、 $\beta$ -ナフトフラボン投与群 (NF)、のラット肝ミクロゾームを用いて以下の反応を行う。



蛍光物質である生成物のウンベリフェロン (umbelliferone) の蛍光強度を測定する。PB 群については P450 特異的な阻害剤のシメチジンを添加したものの反応もあわせて行った。

反応に必要なすべての試薬を加える complete 系 (SM)、酵素を加えない Substrate Blank 系 (SB)、基質を入れずに反応を行い反応後、後処理前に生成物を添加する Standard 系 (ST)、阻害剤シメチジンを加える PB 群の IN 系で計 8 本の試験管について反応を行う。緩衝液、NADPH 生成系、マイクロゾーム希釈液を試験管で混合し、37℃、5 分間の pre-incubation ののち、基質の 50mM 7-エトキシマリニン MeOH 溶液を 10μL 加え、37℃、15 分 incubation し、10 分氷冷後、遠心分離 (3000rpm, 10min) し、上清 1.0mL をリン酸カリウム緩衝液で希釈し蛍光測定した。ST のウンベリフェロンはインキュベーション後に 0.5mM を 0.2 mL (100 nmol) 加えている。

## 結果

Ex. 380 nm、Em. 460 nm で測定された蛍光強度は以下の通りである。

種類	SB	IN(NF)	SM(non)	SM(PB)	SM(NF)	ST(non)	ST(PB)	ST(NF)
蛍光強度	60.45	4014	1065	836.9	4874	3558	3382	3227

またマイクロゾームのタンパク質濃度とタンパク質あたりの P450 含量の値は、以下のようになる。

	タンパク質含量 (mg protein/mL)	P450 含量 (nmol P450/mg protein)
non	51.0	0.818
PB	83.1	1.08
NF	67.1	0.798

この値と以下の式からタンパク質あたりの *O*-脱エチル化活性、および P450 あたりの *O*-脱エチル化活性が求まる。

$$\text{Activity} = \frac{F_{\text{SM}} - F_{\text{SB}}}{F_{\text{ST}} - F_{\text{SB}}} \times \frac{100}{15} \div \text{Amount of protein}$$

	タンパク質あたりの活性	P450 あたりの活性
non	0.6	0.703
PB	0.3	0.266
NF	2.3	2.902

## 課題

(1)

誘導、非誘導マイクロゾームによる 7-ethoxycoumarin の *O*-脱エチル化および aminopyrine の *N*-脱メチル化反応のそれぞれの反応効率の違いを比較し、パターンの相違および P450 分子種との関連について考察せよ。

実習書の参考実験によると、aminopyrine の *N*-脱メチル化活性は以下のような結果となる。

	タンパク質あたりの活性	P450 あたりの活性
non	4.61	5.54
PB	6.22	4.14
NF	4.82	5.63

マイクロゾームのタンパク質 1 mg あたりの代謝活性は non treat 群に比べてフェノバルビタール投与群では著しく上昇しているのに対し、 $\beta$ -ナフトフラボン投与群の上昇値は小さい。このことからフェノバルビタールが誘導する CYP2B はアミノピリン代謝に関わっているが、 $\beta$ -ナフトフラボンが誘導する CYP1A1 は代謝に関わっていないことが分かる。P450 あたりの活性ではフェノバルビタール投与群も  $\beta$ -ナフトフラボン投与群も共に non treat 群に比べて減少している。これはフェノバルビタールがアミノピリン代謝に有効な P450 分子種だけでなくアミノピリン代謝に関与しない P450 分子種も誘導するために、全体として P450 あたりのアミノピリン代謝活性が低くなっていると考えられる。

一方、実習の結果を元に 7-ethoxycoumarin のタンパク質あたりの *O*-脱エチル化活性について考察すると、non treat 群に比べてフェノバルビタール投与群は低下しているが、 $\beta$ -ナフトフラボン投与群は著しく上昇している。さらに、P450 あたりの活性でも同様に non treat 群に比べて、フェノバルビタール投与群では減少、 $\beta$ -ナフトフラボン投与群では著しく上昇している。このことから、フェノバルビタールが誘導する P450 分子種は 7-ethoxycoumarin の代謝には無関係であり、 $\beta$ -ナフトフラボンで誘導される CYP1A1 が 7-ethoxycoumarin の代謝に大きく寄与していることが分かる。

(2)

P450 含量の測定の際、450nm におけるスペクトルの差の吸光度から P450 含量が求められる理由を考察せよ。

P450 は CO 配位で 450 nm に特有の吸光を持っているが、P450 以外の肝マイクロゾームにもヘム中心の CO が配位することによって 450nm の光を吸光するタンパク質が存在する。その P450 以外の 450 nm の吸光の影響を排除するために、吸光に差がないとされる 490 nm での吸光を 450 nm での吸光度から引くことで P450 による吸光度を求めることができる。

(3)

P450 阻害作用のある薬物の一例として cimetidine を用いたが、この構造のどの部分が阻害作用に効率的であったか考察せよ。実習書の Figure6 での cimetidine 添加によるミクロゾームの吸光スペクトル変化との関連についても記すこと。また他の薬物でも構造上 P450 阻害が予想される例を一つあげよ。

P450 はアゾール環をもつ薬物によって阻害される。cimetidin もアゾール環をもつため P450W を阻害すると考えられる。これはアゾール環の N 上の非共有電子対が P450 中心のヘム鉄に競合的に配位結合を形成して、基質の 7-ethoxycoumarin との結合を阻害しているからである。

Figure 6. によると cimetidin 添加時の吸収差スペクトルは 428 nm 付近で最大となっている。これは cimetidin のアゾール環の N が cimetidin に配位することでヘム鉄の吸光スペクトルが変化したからだと考えられる。

cimetidin 以外で P450 を阻害する薬物としては、ケトコナゾールが挙げられる。これも同様にアゾール環をもつ。

## 実験 2 酵素反応解析法と蛍光プローブを用いた実験

### 目的

酵素反応の速度論的ファクターおよび各種プロットの質的意味を理解する。また、蛍光プローブの原理や操作について理解する。

### 実験方法および結果

#### 蛍光プローブを用いた実験の基礎

##### 各種 pH での 2-Me-4 OMe-TG のスペクトル測定

1mM 2-Me-4-OMe-TG の DMSO 溶液を pH 4.0,7.4,11.0 のナトリウムリン酸緩衝液で 1000 倍に希釈し、蛍光強度と吸光度を測定する。結果のスペクトル図はレポートに添付している。

#### 考察

吸光度についても蛍光強度についても pH4.0 のスペクトルは PH 7.4,pH11.0 のスペクトルと大きく異なる。

pH4.0 のスペクトルは 430 nm 付近で最大吸収波長を持ち、492 nm で最大蛍光波長を持つ。一方 pH7.4 と pH11.0 では 492 nm 付近に最大吸収波長を持ち、510 nm 付近に最大蛍光波長を持つ。また、pH によって最大蛍光波長の蛍光強度も大きく異なる。pH4.0 では 10 にも満たないのに対し、pH7.4 では 500、pH11.0 では 115 にもなる。よって pH4.0 でのスペクトルはレイリー散乱を表していると考えられる。このように pH によってスペクトルの形状が大きく異なるのは 2-Me-4-OMe-TG がアニオンの状態では

蛍光を持つが、pH が低くプロトン化された状態では蛍光を持たないからであると考えられる。2-Me-4 OMe-TG の蛍光団の-OH の pKa は 6.4 であることを元に計算すると、pH 4.0 では分子形がアニオンに比べて 102.4 倍ほど多くなる。一方、pH 7.4 ではアニオンが分子形の 10 倍ほど、pH 11.0 ではアニオンが分子形の 103.6 倍となる。しかし、理論値とは対照的に pH7.4 の方が pH11.0 よりも蛍光強度が強かった。これは共洗いなどで液が混ざってしまったことや、セル内の濃度が均一でなかったなどの要因が考えられる。

#### TG- $\beta$ Gal による $\beta$ -galactosidase 活性の検出

pH 7.4 ナトリウムリン酸緩衝液で 1mM TG- $\beta$  Gal の DMSO 溶液を 1000 倍に希釈したものを 2 本用意し、片方に  $\beta$ -galactosidase を入れて調整する。10 分経過後に両サンプルの吸収・蛍光スペクトルを計測する。計測結果のスペクトルはレポートに添付している。

#### 考察

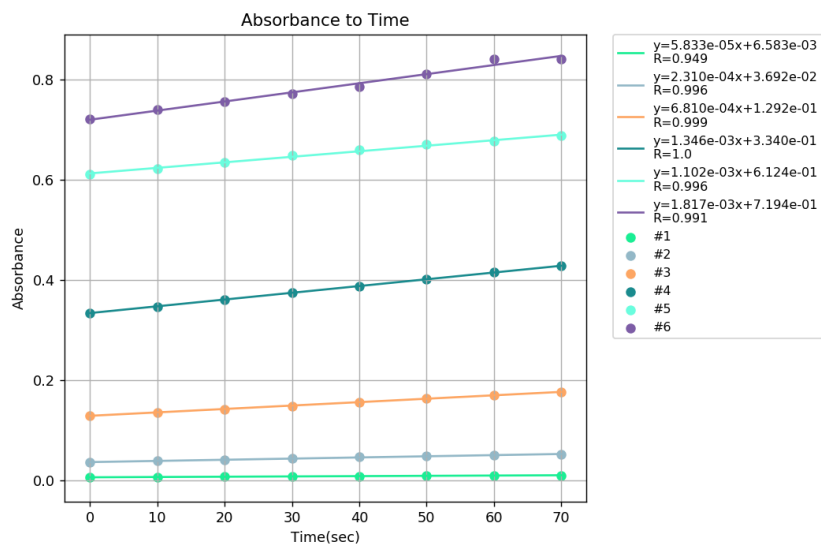
$\beta$ -galactosidase を入れた方のサンプルで 492 nm 付近に最大吸収波長が見られた。一方  $\beta$ -galactosidase を入れなかった方のサンプルでは TG- $\beta$  Gal によって 530 nm 付近に最大吸収波長が見られた。また、蛍光強度も  $\beta$ -galactosidase を入れた方のサンプルでは 2-Me-4-OMe-TG の pH7.4 や pH11 の時と同じようなスペクトルを得られた。 $\beta$ -galactosidase を入れなかった方では pH4.0 の時のようなスペクトルを得られた。これは実習書にもあるように TG- $\beta$  Gal に  $\beta$ -galactosidase が作用するとアニオンの状態の 2-Me-4-OMe-TG が得られるため、電子の励起状態が蛍光によって解消することが可能になるからである。

### 酵素反応速度論解析

#### 吸光度の計測

TG- $\beta$  Gal を基質として濃度が 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M になるよう緩衝液で調整し、 $\beta$ -galactosidase を  $4.0 \times 10^{-6}$   $\mu$ M となるように加えて、加えてから時刻 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 (sec) で吸光度を測る。測定結果は以下ようになった。

Time(sec)	0	10	20	30	40	50	60	70
#1	0.006	0.007	0.008	0.009	0.009	0.010	0.010	0.010
#2	0.037	0.039	0.041	0.044	0.047	0.049	0.050	0.053
#3	0.130	0.136	0.142	0.149	0.156	0.164	0.170	0.177
#4	0.334	0.347	0.361	0.375	0.388	0.401	0.415	0.428
#5	0.611	0.621	0.635	0.648	0.659	0.671	0.676	0.687
#6	0.721	0.739	0.756	0.771	0.785	0.810	0.841	0.841



これ以降の解析についてはコンピュータを用いて行う。実習で用意された Excel のプログラムとは別に、独自に開発したプログラム (<https://github.com/utp2018th/plot-graph/tree/finish-all>) でもプロットをしているので両者のデータを見ていきたいと思う。

グラフに表示されている検量線の傾き  $\Delta A$  を元に反応速度を求める。さらに反応速度と基質濃度のデータから

1. Michaelis-Menten (6 dots)
2. Michaelis-Menten (4 dots)
3. Lineweaver-Burk
4. Eadie-Hofstee

の 4 種類のプロットを行う。



## 1. Michaelis-Menten (6 dots)

以下の Michaelis-Menten 式に従うように最小二乗法で  $V_{max}$  と  $K_m$  をパラメータとして非線形最小二乗法プログラムで最適化した。

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

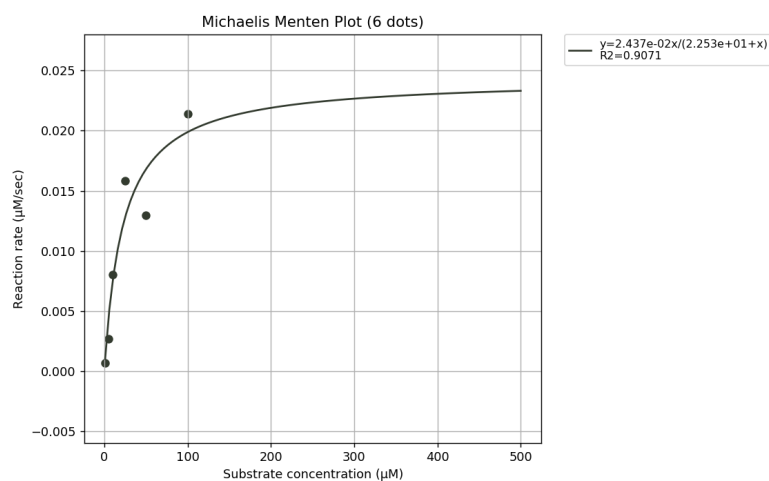


図1 M-M plot6 (自作)

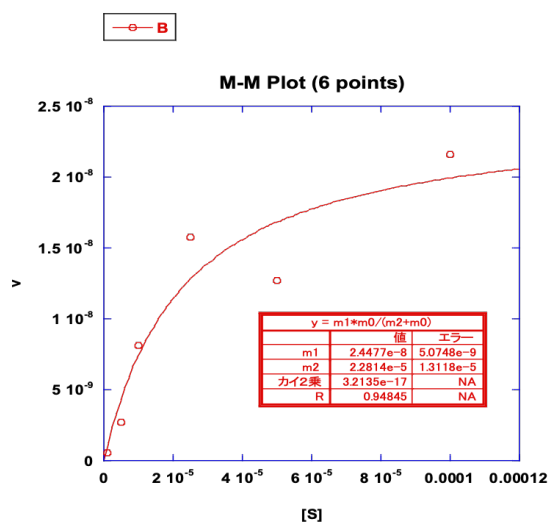


図2 M-M plot6 (実習)

## 2. Michaelis-Menten (4 dots)

1と同じように Michaelis-Menten 式に従うように最適化をしているが、基質濃度が酵素が飽和する状態に達してい無いデータで最適化をしているため、1 番のグラフと比べて高濃度領域での誤差が大きくなっていることが分かる。

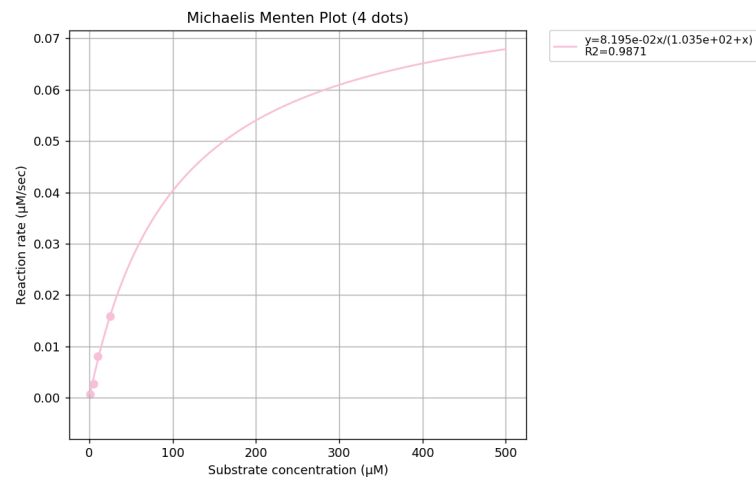


図3 M-M plot4 (自作)

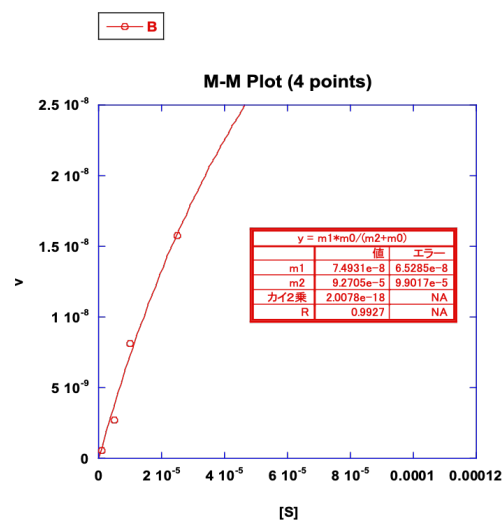


図4 M-M plot4 (実習)

### 3. Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} * [S]}$$

となるような逆数プロットである。

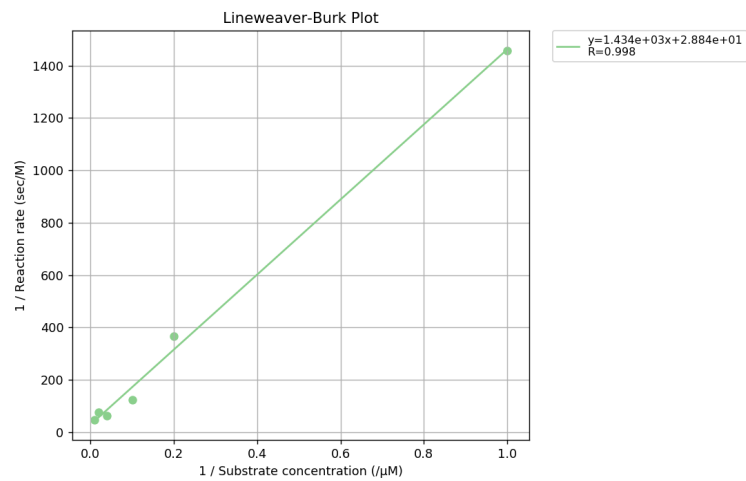


図5 L-B plot (自作)

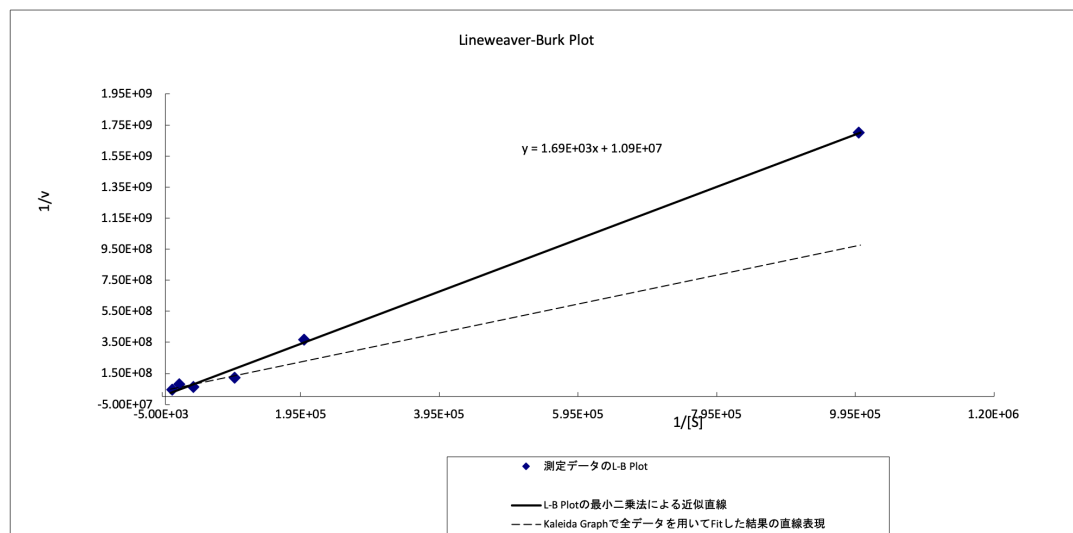


図6 L-B plot (実習)

#### 4. Eadie-Hofstee

Lineweaver-Burk の式を改良したものである。横軸に  $v/[S]$ 、縦軸に  $v$  をプロットする。

$$v = V_{max} - \frac{K_m * v}{[S]}$$

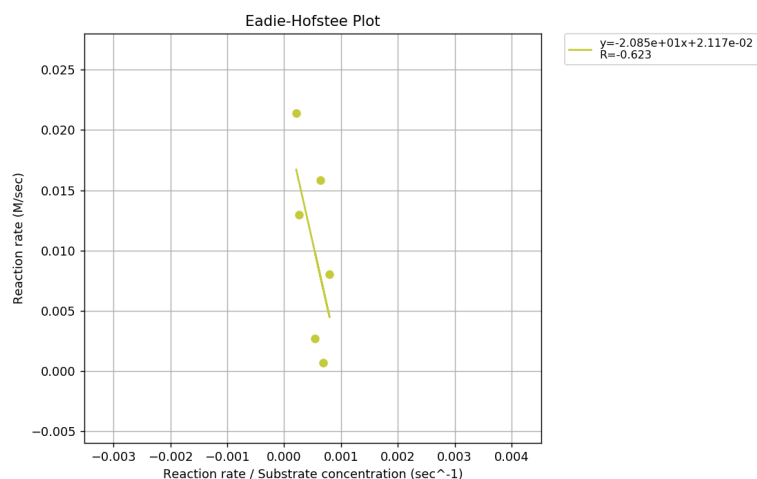


図7 E-H plot (自作)

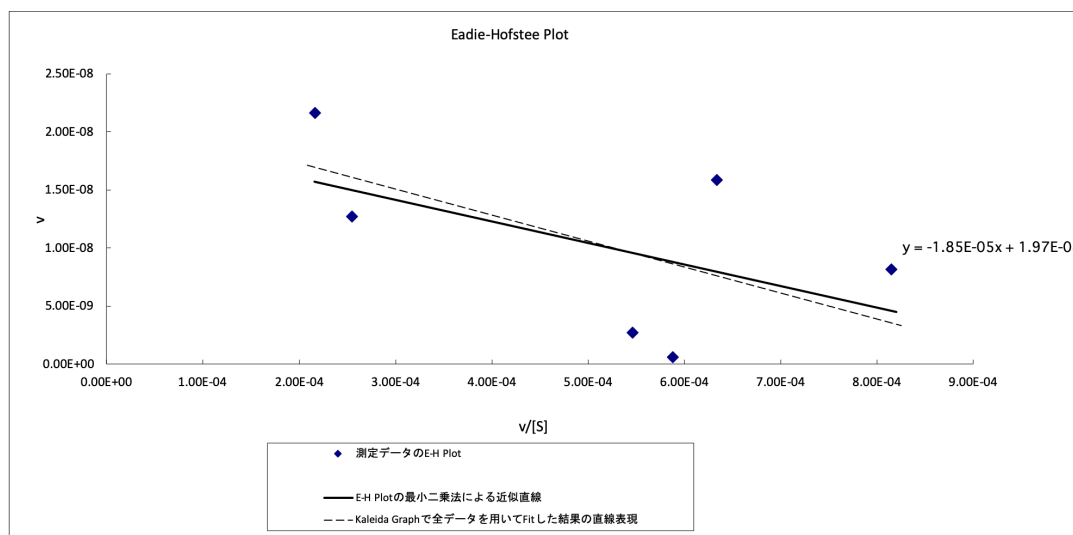


図8 L-B plot (実習)

#### 5. それぞれの値の比較

それぞれのプロットから算出された  $k_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$  について比較する。

	M-M 6	M-M 4	L-B	E-H
$k_{cat} [s^{-1}]$	6.125	18.725	23.025	4.925
$K_m [\mu M]$	22.53	103.5	49.71	20.85
$k_{cat}/K_m [s^{-1} \cdot \mu M^{-1}]$	0.2704	0.1979	0.1744	0.2538
$\Sigma \epsilon i^2$	$2.932 \times 10^{-5}$	-	$1.679 \times 10^{-4}$	$1.930 \times 10^{-4}$

表 1 自作プログラムで得られたパラメータ

	M-M 6	M-M 4	L-B	E-H
$k_{cat} [s^{-1}]$	6.091	20.49	8.668	5.293
$K_m [\mu M]$	22.8	92.7	155	18.5
$k_{cat}/K_m [s^{-1} \cdot \mu M^{-1}]$	0.267	0.221	0.0559	0.286
$\Sigma \epsilon i^2$	$3.23 \times 10^{-5}$	-	$3.18 \times 10^{-4}$	$5.20 \times 10^{-5}$

表 2 実習プログラムで得られたパラメータ

## 実験 3 細胞の状態に応じた酵素活性変化の測定

### 目的

細胞の状態に応じた酵素活性の変化を蛍光プローブを用いて検出する実験として、細胞のアポトーシスをとまなう caspase-3 の活性化の検出を試みる。

### 実験方法

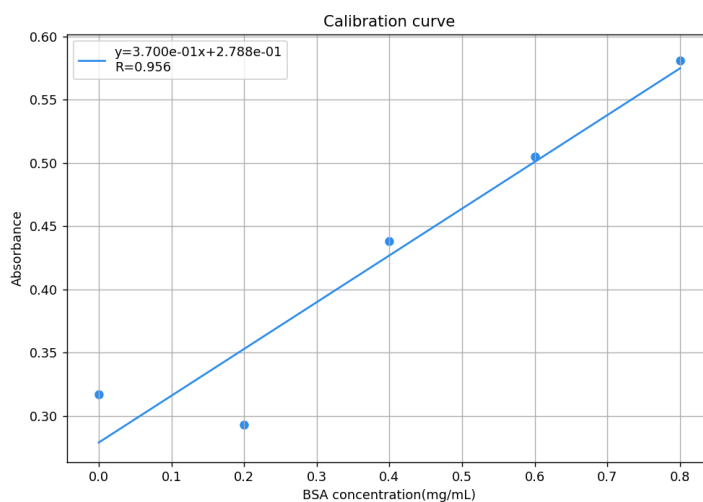
UV 照射によってアポトーシスを誘導した Juckat T 細胞 (アポトーシス群) と UV 照射しないコントロール群の細胞の培養液各 10 mL を遠心 (2000rpm, 5min) し、上清を除いて PBS 3 mL で洗浄し、PBS 300  $\mu$ L を加えて超音波破碎によって細胞膜を破壊し、細胞ライセートとする。

PBS を用いて検量線用の 0.2, 0.4 0.6 0.8 mg/mL の BSA の希釈系列を作成する。細胞ライセートを 5 倍希釈した試料を調整し、各サンプル (PBA のみ、BSA 希釈系列、細胞ライセート 5 倍希釈 (アポトーシス群、コントロール群)  $\times 3$ ) を 10  $\mu$ L ずつマルチウェルプレートに添加し、それぞれに bradford 試薬 200  $\mu$ L を添加して 5 分静置する。595 nm の吸収を測り、BSA 希釈系列から検量線を作成して細胞ライセートのタンパク質濃度を算出する。

### 結果

BSA 濃度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
吸光度	0.317	0.293	0.438	0.505	0.581

PBS のみの方が BSA 濃度が 0.2 mg/mL の時よりも吸光度が大きかったので単調増加なプロットにはならなかった。



また、細胞ライセートの吸光度は以下ようになった。

	1	2	3	Average
アポトーシス群 (mg/mL)	0.427	0.489	0.493	0.470
コントロール群 (mg/mL)	0.577	0.535	0.596	0.569

吸光度の平均値から各群の濃度を求めると以下ようになる。

$$\text{アポトーシス群} = 0.832 \text{ mg/mL}$$

$$\text{コントロール群} = 1.37 \text{ mg/mL}$$

また、さらに PBS で 0.5 mg/mL になるように細胞ライセートを調整し、各 200  $\mu\text{L}$  のアポトーシス群、コントロール群、PBS のみのサンプルに 2  $\mu\text{L}$  の蛍光プローブ溶液 (10mM) を加えて 30 分 37  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベーションし、蛍光スペクトルを測定する。( $\lambda_{ex.} = 355 \text{ nm}$  ,  $\lambda_{em.} = 460 \text{ nm}$ )

計測された蛍光強度は以下ようになった。

アポトーシス	コントロール	PBS
977.865	122.696	183.218

## 課題 (実験 2,3 共通)

1.

酵素反応の速度を議論する上での  $k_{cat}/K_m$  の意味を考えよ。

ミカエリス・メンテン式より

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

また、 $V_{max} = k_{cat}[E]_0$  より

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_m + [S]}$$

$k_{cat}$  は酵素 1 分子が単位時間にどれだけ触媒として働けるか、つまり酵素の回転効率を表すパラメータである。したがって、 $k_{cat}$  が大きいほど反応速度も大きくなる。

$K_m$  は基質との親和性を表すパラメータであり、値が小さいほど基質との親和性が大きくなるため、反応速度も大きくなる。

ミカエリス・メンテン式において、 $K_m \gg [S]$  が成り立つ条件では

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m}[E]_0[S]$$

このように近似される。すなわち  $k_{cat}/K_m$  は基質濃度が低い条件での酵素と基質の二次反応における反応速度定数に等しい。

$$v = \frac{k_{cat}}{K_m}$$

2.

TG- $\beta$ Gal と DAF の蛍光制御原理の共通点および違いについて説明せよ。

本来蛍光団の LUMO から HOMO に電子が戻るときには電磁波が発せられるが、蛍光団の HOMO と LUMO の間のエネルギー準位に電子供与体の HOMO が存在すると、そこから蛍光団の HOMO に電子が供給される緩和過程があるために蛍光を発さなくなる。このメカニズムによって蛍光を制御しているのが TG- $\beta$ Gal と DAF の共通点である。

TG- $\beta$ Gal は、蛍光を持たない TG- $\beta$ Gal の状態と蛍光を示す 2-Me-4OMe-TG の間で電子供与基に変化がない。TG- $\beta$ Gal の状態で電子供与基の HOMO は蛍光団の HOMO と LUMO の間にあるため蛍光を示さないが、 $\beta$ -galactosidase によって加水分解されて 2-Me-4-OMe-TG のアニオンの状態になると、蛍光団の HOMO のエネルギー準位が電子供与基の HOMO よりも高くなって蛍光を発するようになる。

それに対して、DAF は電子供与基が変化することで蛍光を制御している。電子供与基がジアミノベンゼンの状態の時は還元性が強く、HOMO のエネルギー準位が蛍光団の HOMO よりも高くないため蛍光を発さない。しかし、NO と反応してトリアゾール環構造となると電子供与基の HOMO のエネルギー準位が蛍光団の HOMO よりも低くなって蛍光を発するようになる。

### 3.

M-M Plot, L-B Plot, E-H Plot のずれはなぜ生じるのか。データ解析をする上でどのプロットが最も正確に実験結果を反映しているか。

パラメータをまとめた表は結果の項を参照して欲しい。

M-M plot は最小二乗法によって直接 Michaelis-Menten の式に最適化しているため誤差の二乗和の値が最も小さく、一番正確に実験結果を反映していると言える。L-B plot と E-H plot を比べると、自分の作ったプログラムの結果では L-B plot の方が誤差の二乗和が小さいが、実習で用いたプログラムの結果では E-H plot の方が誤差の二乗和の値が小さい。原理としては L-B plot では低濃度の逆数である  $1, 0.2, 0.1$  が他の値と大きく離れるために近似直線を引く上で大きなウェイトをもつが、逆に高濃度側では x 軸の値の差異が小さいため、近似直線に影響を与えにくい性質がある。そのため、高濃度部分で誤差が大きくなりやすい。E-H plot は x 軸に反応速度を基質濃度で割った値を用いることで、高濃度領域でも低濃度領域でも同じウェイトがかかるようになっている。そのためプロットの x 座標が極端に偏らずに万遍なく分布する。そのため算出されるパラメータの誤差は小さくなると考えられる。

### 4.

実習 1 で用いた BCA 法、実習 3 で用いた Bradford 法の 2 つのタンパク質定量法の原理について述べよ。

#### Bradford 法

Coomassie G-250 を用いた総蛋白定量法である。Coomassie G-250 は酸性条件下でタンパク質と結合して吸光が変化する。タンパク質と結合していない時としている時の吸光度の差が最も大きくなるのが 595 nm 付近であることから、一般的に 595 nm で吸光度を測定する。Bradford 法のメリットとしては反応時間が短いことや還元剤や塩との共存性が高いことが挙げられる。一方で検量線の直線性が低いことや界面活性剤により反応が阻害されるという欠点もある。

#### BCA 法

BCA 法は、アルカリ条件下でタンパク質によって  $\text{Cu}^{2+}$  が  $\text{Cu}^+$  に還元される原理と、 $\text{Cu}^+$  が 2 分子のピシンコニン酸と配位結合して紫色に呈色する原理を組み合わせた方法である。まずタンパク質と 2 価の銅イオン  $\text{Cu}^{2+}$  がキレート錯体を形成するビュレット反応を起こす。ビュレット反応はアミノ酸では起きないがペプチド鎖が 3 つ以上であれば反応が起こり、540 nm 付近に吸収のある複合体を形成する。その後  $\text{Cu}^{2+}$  がタンパク質によって  $\text{Cu}^+$  に還元される。この  $\text{Cu}^+$  が 2 分子の BCA 試薬と紫色の錯体を形成する。タンパク質の単位質量あたりに存在するペプチド結合の数はほぼ一定であるため、BCA/ $\text{Cu}^+$  複合体の発色はタンパク質濃度に比例する。したがって BCA 法では決定係数が 0.95 を超えるような非常に直線的な検量線が得られる。BCA 法は Bradford 法の弱点である界面活性剤との共存性が高いという利点があるが、逆に元剤や銅イオンのキレート剤により反応が阻害というデメリットがある。



5.

あなたが考える「蛍光プローブでしかできない実験」を簡単に述べよ。

蛍光プローブは被験体となる生物が生きている状態で観察できるので、様々な動物実験に応用できる可能性がある。例えば、乳酸などの筋疲労によって生じる物質に対して特異的に蛍光する物質があれば、筋トレや有酸素運動の効き具合が定量的に確認できるかもしれない。

6.

実習 1,2,3 を通じての感想

実習中は作業が多くて、今自分がしている作業の意味を理解していませんでしたが、実習を終えてレポートを書くことで、この作業はこういうことをしていたのかと再確認できました。それによって蛍光プローブの魅力が少しはわかったと思います。

それ以上に印象に残っているのがミカエリス・メンテン式などのプロットを行うプログラムを作成したことです。それぞれの関数、フィッティング方法を指定し、パラメーターの出力まで行うことで式の理解やパラメータのもつ意味を理解することができたと思います。