

日本生物学オリンピック本選2023

静岡大会(静岡)

大問 2



2023年8月18日(金)

制限時間 110分

## 諸注意

1. 机には問題冊子 1 部(14 ページ)と解答用紙 4 枚が配布されている。
2. 指示があるまでこのページの内容をよく読んでおくこと。試験開始の合図があるまで机の上の機材には触れないこと。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に本選受験番号と氏名を記入すること。
4. 試験の途中で体調が悪くなった場合、トイレに行きたい場合、水分補給をしたい場合、その他やむを得ず途中退出を希望する場合は挙手をして試験監督に知らせること。
5. 試験中は白衣、保護めがね、手袋を着用すること。本実験では毒性はないが刺激性のある試料を一部使用する。試料等が目、口、皮膚などに直接触れないように注意すること。実験終了後、白衣と保護めがねは席に置いて行くこと。
6. 問題冊子にメモを取っても構わない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
7. 実験机の上の実験器具は自由に使って構わない。実験中は位置も自由に動かして構わない。ただし解答終了後はなるべく元の位置に戻しておくこと。
8. 最初に問題冊子の全てのページに目を通した後、「実験器具・試薬についての確認」に書かれた確認事項、続く「解答を進める上での注意事項」に書かれた確認事項について順番に□に✓を入れながら確認し、全ての□に✓を確実に入れた上で実験操作並びに解答を始めること。その際にもし足りない器具や試薬がある場合、及び問題冊子に不備がある場合は手をあげて試験監督に知らせること。
9. 実験机の上は既に準備されているものの他に、ペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ以外のものはおかないこと。
10. 試料に対して重度のアレルギーを持っていることがわかっている場合、実験を始める前に試験監督に申し出ること。

ここから先は試験開始の合図があるまで  
めくってはいけません

「解答始め」の合図の後、すべての解答用  
紙に受験番号と名前を記入して下さい

**【重要】 このページに書かれた作業を完了してから、次のページに進むこと**

### 実験器具・試薬についての確認（5分以内に完了させること）

最初に、以下の実験器具や試薬が全て揃っているかを確認すること（確認できた項目の□に印を付けること）。揃っていない場合は、挙手にて試験監督に知らせること。なお、試験開始から5分後以降の申し出については対応できないので注意すること。確認し次第、次のページに進んでよい。

#### 試料

- ワサビ 根 1本（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅰ（ワサビ） 花 1袋（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅱ 花 1袋（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅲ 花 1袋（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅳ 花 1袋（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅴ 花 1袋（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅵ 花 1袋（持ち帰ってよい）
- 植物Ⅶ 花 1袋（持ち帰ってよい）

#### 試薬

- 50 mM HEPES 緩衝液 pH 7.0 (in 50 mL 容チューブ) 30 mL 1本
- 2 mM シニグリン (in 1.5 mL 容チューブ) 1.4 mL 1本
- グルコーステスト (in 15 mL 容チューブ) 6 mL 1本
- 2 mM アスコルビン酸ナトリウム溶液 (in 1.5 mL 容チューブ) 0.5 mL 1本
- 2 mM 酢酸ナトリウム溶液 (in 1.5 mL 容チューブ) 0.5 mL 1本
- 2 mM リン酸ナトリウム溶液 (in 1.5 mL 容チューブ) 0.5 mL 1本
- 3.2 mM グルコース液 (in 1.5 mL 容チューブ) 0.5 mL 1本
- イオン交換水 (in 15 mL 容チューブ) 10 mL 1本

#### 実験器具

- 計量用秤 1個（持ち帰ってよい）
- すりおろし器 1個（持ち帰ってよい）
- スプーン 1本（持ち帰ってよい）
- 計量用ティッシュ 1つ
- ルーペ 1個（持ち帰ってよい）

- |                          |                        |                        |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| <input type="checkbox"/> | ニトリル手袋(S, M, L)        | 各 1 組 (各自合うものを選んで使用する) |
| <input type="checkbox"/> | 注射器とピストン               | 1 組                    |
| <input type="checkbox"/> | キムワイプ                  | 1 枚                    |
| <input type="checkbox"/> | NAP-10 カラム             | 1 個                    |
| <input type="checkbox"/> | 空の 15 mL 容チューブ         | 5 本                    |
| <input type="checkbox"/> | 15 mL 容チューブ立て          | 1 台                    |
| <input type="checkbox"/> | 1 mL 容スポイト             | 1 本                    |
| <input type="checkbox"/> | 3 mL 容スポイト             | 1 本                    |
| <input type="checkbox"/> | 5 mL 容スポイト             | 1 本                    |
| <input type="checkbox"/> | 200 $\mu$ L 容マイクロピペッター | 1 本                    |
| <input type="checkbox"/> | マイクロピペッター用チップ          | 1 箱                    |
| <input type="checkbox"/> | 空の 1.5 mL 容マイクロチューブ    | 6 本                    |
| <input type="checkbox"/> | マイクロチューブ立て             | 1 台                    |
| <input type="checkbox"/> | 96 ウェルプレート             | 1 枚                    |
| <input type="checkbox"/> | 廃液ビーカー                 | 1 つ                    |
| <input type="checkbox"/> | ウエットティッシュ              | 1 箱                    |
| <input type="checkbox"/> | 受験番号シール                | 1 枚                    |
| <input type="checkbox"/> | 96 ウェルプレートシール          | 1 枚                    |



#### 補助的な器具

- |                          |         |                    |
|--------------------------|---------|--------------------|
| <input type="checkbox"/> | ペーパータオル | 1 組                |
| <input type="checkbox"/> | 油性マーカー  | 1 本                |
| <input type="checkbox"/> | ゴミ袋     | 1 個 (テーブルに固定されている) |

チューブには、必要に応じて、試料名などを油性マーカーで記入してもよい。パソコン、スマートフォン、電卓の使用は禁止。計量用秤、すりおろし器、スプーン、ルーペは試験終了後持ち帰ってもよい。

#### 解答を進める上での注意事項

- ・最初に、本問題冊子全体を通して読み、全体の計画を練ってから作業に移ること
- ・試験中、許可なく退室することはできない
- ・試料、試薬、実験器具の追加の配布は行わない

- 反応後の96穴プレートは証拠として保存するため実験終了後プレートシールと受験番号シールを貼り机上に保管しておくこと

### 問題中の単位表記について

M：モル濃度 (mole/L)

国際単位系の接頭語を以下に記した。必要に応じて参考にすること

接頭語	単位	$10^n$
ミリ (milli)	m	$10^{-3}$
マイクロ (micro)	$\mu$	$10^{-6}$

## 実験1 『ワサビに含まれるミロシナーゼ活性の計測と比較』

### はじめに

ワサビは私たちの生活に根付いた植物であり、そのペーストは寿司や刺身など様々な料理に重要なスパイスとして用いられている。特に本ワサビの栽培は、静岡から始まったとされ、その歴史は江戸時代にまで遡る。

ワサビはアブラナ科に分類されており、辛味の元となっている物質はイソチオシアネートである。植物体内でイソチオシアネートはグルコースと S-グリコシド結合で繋がった配糖体(グルコシノレート)として柔細胞に蓄積されている。代表的なグルコシノレートの一つはシニグリンと呼ばれ、アリルイソチオシアネートの前駆体である。

多くのアブラナ科の植物は、グルコシノレートを自らの防御反応に用いている。アブラナ科植物は篩部(しぶ)にミロシン細胞という特殊な細胞をもち、その内部にチオグリコシドを加水分解するミロシナーゼという酵素を蓄積している。すなわち通常は、基質であるグルコシノレートとその分解酵素であるミロシナーゼは空間的に隔離されている。しかし昆虫などによる食害で細胞が傷つくと2つが混合され、イソチオシアネートが生成されることで身を守るシステムとなっている。

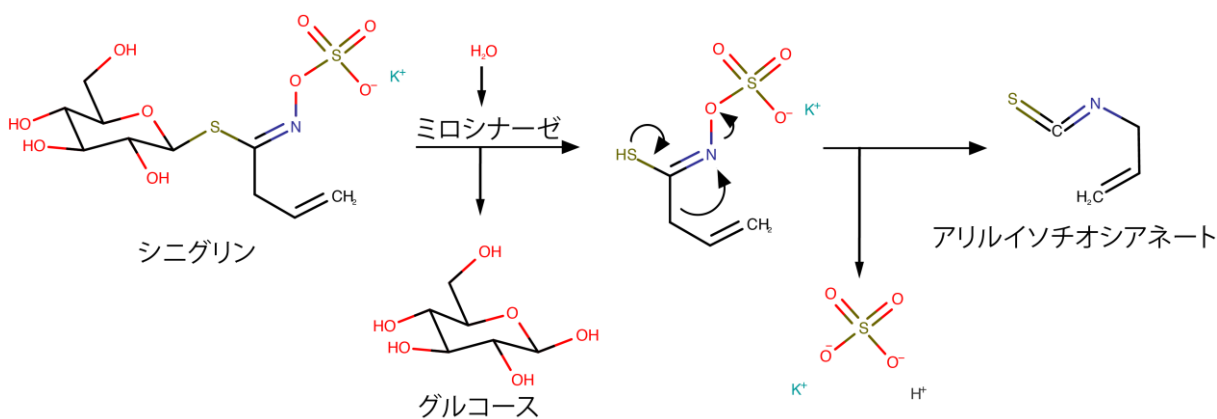
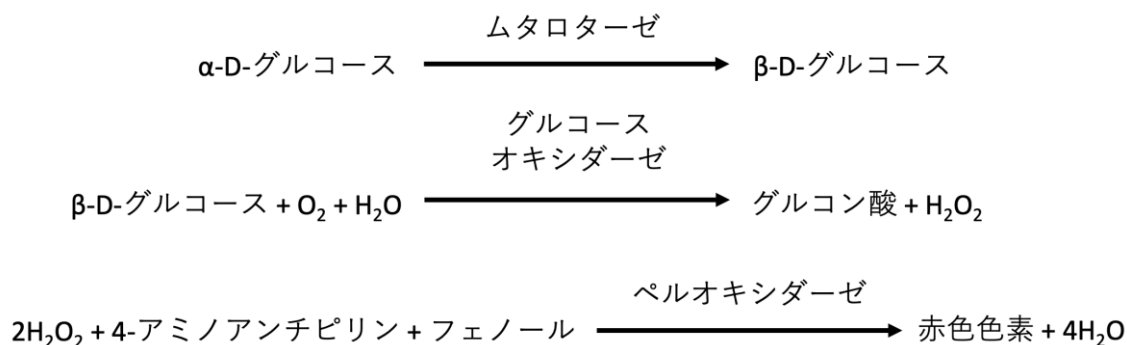


図1 ミロシナーゼによるシニグリンからのアリルイソチオシアネートの生成反応

他の糖加水分解酵素と比較して、ミロシナーゼは特殊な活性中心を持っており、酵素単体では活性が低い。高い活性を示すためには補酵素を必要とする。よって辛みの強さは、基質であるグルコシノレートと酵素(ミロシナーゼ)の量だけでなく、ミロシナーゼ活性を補助する物質の量にも依存する。

本実験では NAP-10 カラムを用いてワサビ抽出液を分画し、それぞれの画分のミロシナーゼ活性を測定・比較する。また、ミロシナーゼ活性に必要な化学物質が何であるかを調べる。ミロシナーゼは基質

であるグルコシノレートからイソチオシアネートとグルコースを生成する。そこで生じたグルコースを、図 2 の反応の通りグルコース定量キットを用いて赤紫色の呈色として検出することでミロシナーゼ活性を比較する。



ラボアッセイ™ グルコース取扱説明書より改変

図 2 グルコース検出原理

なお、各受験者に配られる試薬および器具の追加配布は行わないため、手順及び必要量をよく考えながら使用すること。

### 1. 植物体破碎抽出液の作成

ミロシナーゼを抽出するためにおろし器でワサビをすりおろす。また続くカラム精製の邪魔とならないように大きな固形分は濾過して取り除く。

- ① 注射器内にキムワイプ一枚を詰めて、シリンジ部分を押し下図の様なフィルターユニットを作る。作成後、シリンジは引き抜いておく。

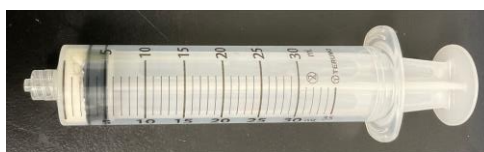


図 3 シリンジフィルターユニットの作成例

- ② 手袋を着用して、ワサビ 1/4 本弱をおろし器ですりおろす。すり下ろしたワサビをスプーンで皿に移し重さを計測する。
- ③ 15 mL 容チューブに移し、サンプル 1 g に対して、5 mL の割合で HEPES 緩衝液 (pH 7.0) を加え、蓋をして懸濁する。懸濁液は 5 mL 以上作成する。
- ④ キムワイプを詰めた注射器に懸濁液を移した後、外しておいたシリンジを挿入して固形分を濾過し、「ワサビ濾液」を新しい 15 mL 容チューブに回収する。ただし液が濁っていても問題はない。



## 2. NAP-10 カラムを用いた濾液の粗分画

NAP-10 カラムはゲルろ過クロマトグラフィーの原理により、試料を分画できるカラムである。例えばタンパク質と低分子化合物を分離することが可能である。

- ① 上部と下部の栓を外し、保存液をビーカーに廃棄する。15 mL 容チューブに優しく乗せた後、NAP-10 カラム上部に 3 mL の HEPES 緩衝液を入れる。液体が完全に溶出してから、3 mL の HEPES 緩衝液を再び入れる。もう一度緩衝液を 3 mL 入れ、内部を平衡化する。15 mL 容チューブにカラムを固くはめ込むと、空気の出口がなくなり液が溶出されないので注意する。
- ② 1 mL の濾液を入れる。この際、濾液中の細かい沈殿物はカラムに入れても問題ない。出てくる液体は①と同じチューブに受ける。
- ③ 新しい 15mL 容チューブに NAP-10 カラムをセットし、1 mL の緩衝液を加えて溶出される画分 A を回収する。
- ④ 新しい 15mL 容チューブに NAP-10 カラムをセットし、2 mL の緩衝液を加えて溶出される画分 B を回収する。

\*各画分中で沈殿物が発生しても活性計測に影響しない

## 3. ミロシナーゼ活性の測定

NAP-10 から溶出した画分 A と B について、それぞれ各種補酵素候補の有無及び基質の有無という対照を設定して酵素反応を行う。混合する組み合わせに注意する。

### <グルコース標準液の作成>

- ① 配布された 3.2 mM グルコース液と 50 mM HEPES 緩衝液 pH 7.0 を適宜混合して、1.5 mL 容マイクロチューブに 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mM の標準グルコース系列液を作成する。

### <精製画分のグルコシノレート分解反応>

- ② 96 ウェルプレートに画分 A、画分 B または陰性対照の緩衝液 50  $\mu$ L を分注する。
- ③ ウェルに各種補酵素候補溶液またはイオン交換水 50  $\mu$ L を添加する。
- ④ 更にグリコシノレートまたはイオン交換水 100  $\mu$ L を添加して、室温で 20 分間静置し反応させる。反応開始時間と終了時間を解答用紙に記入する。

### <グルコース検出反応>

- ⑤ 酵素反応液またはグルコース標準液 20  $\mu$ L を別のウェルに移し、そこにグルコーステストを 180  $\mu$ L 添加して、更に 10 分待つ。反応開始時間と終了時間を解答用紙に記入する。

- ⑥ グルコースの濃度に応じて、赤紫色の呈色反応が起こる。グルコース標準液の位置を解答用紙に記入したのち、ミロシナーゼの反応液について、対照反応およびグルコース標準液と色の濃さを比較して定量を行う。
- ⑦ 実験終了後、96 ウェルプレートをプレートシールで封をしたのち、呈色結果を確認する上で邪魔にならない位置に受験番号シールを貼り付けて机上に保管しておく。

\* 呈色は室温で少なくとも 3 時間安定であり、試験時間中は変化ないことを確認済みである

以上の実験結果を基に、以下の問いに答えなさい。

#### 問 1 - 1

各条件について基質(グルコシノレート)の有無、各活性補助候補物質の有無での呈色の度合いをグルコース標準液の呈色と比較し、最も近いグルコース濃度の値を選びなさい。

#### 問 1 - 2

ワサビ抽出液から得られたミロシナーゼの NAP-10 カラム内における挙動の説明として最も適切なものを、以下の4つの選択肢から選びなさい。

- ① ミロシナーゼは高分子であるため、カラム内を早く流れ、画分 A に溶出した
- ② ミロシナーゼは高分子であるため、カラム内をゆっくり流れ、画分 A に溶出した
- ③ ミロシナーゼは高分子であるため、カラム内を早く流れ、画分 B に溶出した
- ④ ミロシナーゼは高分子であるため、カラム内をゆっくり流れ、画分 B に溶出した

#### 問 1 - 3

本実験でワサビのミロシナーゼ活性を測定するには、NAP-10 で画分 A と画分 B に分ける必要があった。実験結果から考えて、この理由として最も適切なものを以下の4つの選択肢から選びなさい。

- ① 抽出液中には、元々グルコースが多量に含まれているため
- ② ミロシナーゼを他のタンパク質から分離する必要があったため
- ③ ワサビに含まれるグルコシノレートを分解せずに抽出する必要があったため
- ④ グルコーステストの反応を阻害する物質を取り除くため

#### 問 1 - 4

ワサビのミロシナーゼ活性を高める物質はどれか？ 下記から選びなさい。

- ① 酢酸、② アスコルビン酸、③ リン酸、④ 全て、⑤ この中にはない

#### 問 1 - 5

問 1 - 4 で選択した物質はミロシナーゼ活性を何倍に高めているか、以下から選びなさい。

- ① 2 倍以上 4 倍未満、② 2 倍以上 8 倍未満、③ 8 倍以上 16 倍未満、④ 16 倍以上

問 1 - 6

ワサビ 1 g に含まれるミロシナーゼ活性(U/g)を、計算過程を示しながら算出なさい。ただし 1U は 1 分間にグルコースを 1  $\mu\text{mol}$  遊離する活性とする。1 mM = 1 mmol/L であり、酵素反応は 20 分で飽和していないものとする。濾過及び NAP-10 で 100%酵素が回収できていると仮定し、生成物の濃度は検量線の発色と比較して最も近いと思われる値を使用する。またワサビ本体中には活性補助物質が十分に含まれていると考える。

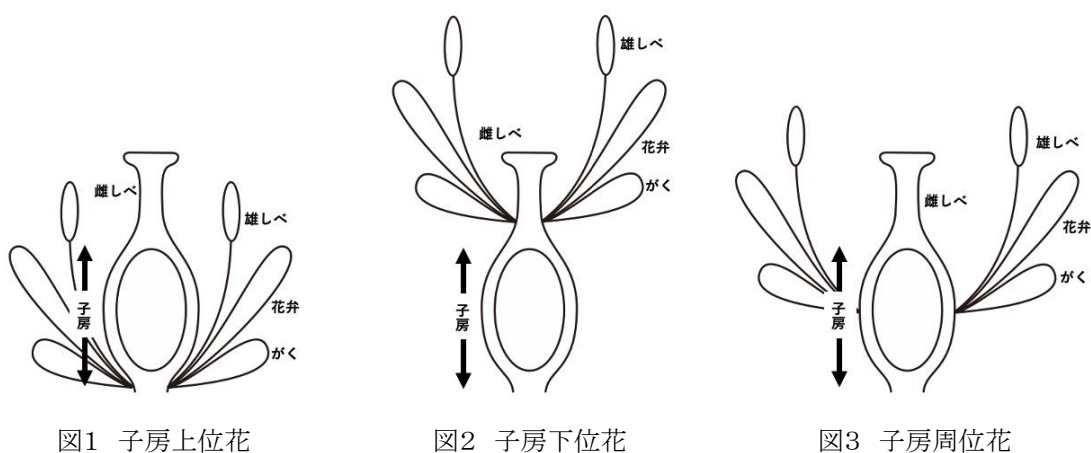
問 1 - 7

ワサビの辛味を引き出すためには、荒いおろし器と細かいおろし器のどちらが良いか選りなさい。また選んだ理由について説明なさい。

## 実験 2 『花の形態の観察』

### はじめに

現代の生物の系統はDNAの塩基配列によって推定されているが、生物の分類には依然として、それぞれの生物のもつ形態情報が有用である。被子植物の分類には、その生殖器官である「花」の形態情報が重要である。花の構造は、中心に雌しべ(雌蕊)があり、その外側に雄しべ(雄蕊)、花弁、がく(萼)が順に配列し(図1)、その順序はほぼ全ての被子植物で保存されている。しかし、雌しべ、雄しべ、花弁、がくの数やその形は多様であり、被子植物の系統分類に重要である。また、子房ががく、花弁、雄しべの付着点よりも上に位置する子房上位花(図1)、子房が付着点の下に位置する子房下位花(図2)やその中間的な子房周位花(図3)も被子植物の分類には重要な形態である。



### 観察手順

配布した植物I～VIIの花を観察し、がくの数、花弁の数、雄しべの数、子房の位置を調べる。配布した植物I～VIIは表1のように分類されている。

表1 配布した植物とその分類

植物 I(ワサビ)	アブラナ科、アブラナ目
植物 II	フウチョウソウ科、アブラナ目
植物 III	アオイ科、アオイ目
植物 IV	アカバナ科、フトモモ目
植物 V	ノボタン科、フトモモ目
植物 VI	アジサイ科、ミズキ目
植物 VII	キンポウゲ科、キンポウゲ目

### 観察の注意

- ・植物I～VIIの花が1つの袋にそれぞれ2つずつ(ただし、植物VIは大きいため1つ)、70%エタノール液に漬けて、入れられている
- ・花をビニール袋から取り出さなくて、観察すること
- ・付属のルーペを使用して観察してよい
- ・ビニール袋の中の花を押しつぶさないように、袋の縁をもつようにすること
- ・観察しにくい花は赤色に染色されている

### 問 2 - 1

植物I～VIIの花を観察し、下の表の空欄を埋め、解答用紙に記入しなさい。

	植物 I (ワサビ)	植物 II	植物 III	植物 IV	植物 V	植物 VI	植物 VII
がくの数			5		5		
花弁の数			5		5		
雄しべの数			20 以上 多数	8	10		20 以上 多数
子房の位置	上位	上位	上位	下位	下位	周位	上位

### 問 2 - 2

観察した植物I～VIIのDNA配列情報を用いて、分子系統解析を行ったところ図4の系統樹が得られた。得られた系統樹をもとに、子房の位置の進化を考える。植物I～VIIの子房の位置は系統樹の末端となる7つの枝の□に示されている。また、それ以外の6つの枝である、それぞれの共通祖先の子房の位置は、それぞれの枝の□のように推定される。この系統樹から、植物IVと植物Vの共通祖先がもつ子房下位花は植物I～Vの共通祖先がもつ子房上位花から進化したと推定できる。

次に花弁の数の進化を推定したい。得られた分子系統樹のそれぞれの共通祖先と植物I～VIIの花弁の数を解答用紙の系統樹に記入しなさい。

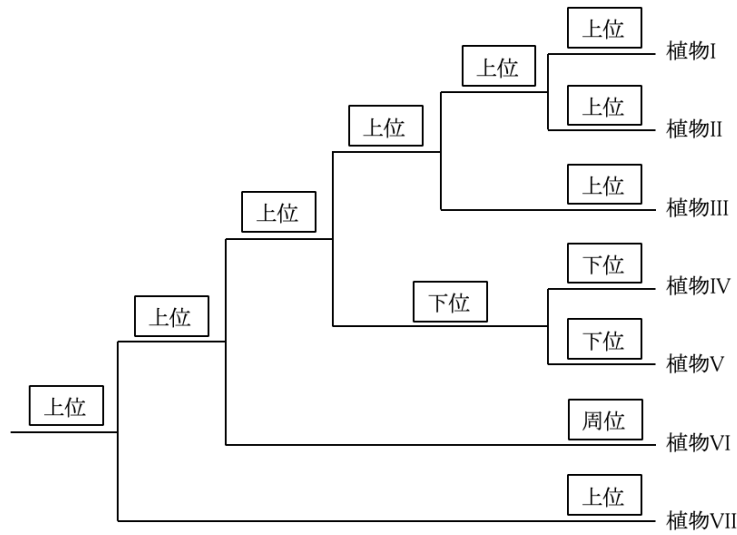


図4 得られた分子系統樹と子房の位置の進化

問2 - 3

グルコシノレートの獲得はアブラナ科を含むアブラナ目の共有派生形質であることが知られている。植物II～VIIのうちミロシナーゼ活性がある植物はどれか答えなさい。

これで問題は終了です