

日本生物学オリンピック 2025

本選 東京大会

実習試験 1(大問 1)

解答と解説

問題 1

問 1

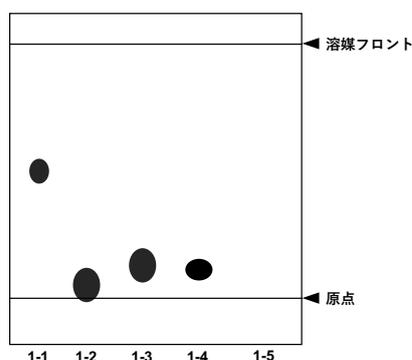
吸収された光の総エネルギーの方が高い。エネルギーの差分は熱に変換されたと考えられる。

解説

光エネルギーを吸収すると、分子は安定で低エネルギーの基底状態から、一時的に不安定で高エネルギーの励起状態に遷移する。吸収したエネルギーの一部が熱として放出され、その後、エネルギーを放出して基底状態に戻る。そのエネルギーが蛍光として観察される。

問 2

(A)



(B)

フラビン A: リボフラビン (RF), フラビン B: フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD),
フラビン C: フラビンモノヌクレオチド (FMN)

理由: 極性の低い分子ほど移動度が大きく、極性の高い分子ほど移動度が小さい。RF はリン酸基を持たず、極性が非常に低い。FMN はリン酸基が一つ、FAD はリン酸基が二つあるため、FAD の方が FMN よりも極性が高い。

(C)

タンパク質 A をスポットしたサンプルにおいて、FMN と同じ移動度で蛍光を放出する物質を確認できたが、タンパク質 B では確認できなかった。そのため、タンパク質 A に FMN が結合している。

解説

フラビン類は、ビタミン B2 と呼ばれる RF や、その誘導体である FMN や FAD を含む色素である。生体内において、酸化還元反応に関わる酵素の補酵素として広く利用されている。また、フラビン類が青色光を吸収するため、FMN や FAD は生体内で光を感知するための光受容体の発色団 (Chromophore) としても利用されている。本実験で使用した FMN を

結合する緑色蛍光タンパク質は、iLOV というもので、植物の青色光受容体・フォトトロピンの FMN 結合領域に対して、いくつかの変異を導入することで、光間知能が消失し、強い緑色蛍光を放出するようにデザインされた人工タンパク質である。一方、フラビンを結合していない緑色蛍光タンパク質は、下村博士によって発見された GFP を基に、変異が導入された人工タンパク質である。GFP の場合、自身もつ自己触媒活性により発色団が形成されるため、フラビン類を分離する薄層クロマトグラフィーでは、色素は検出されない。

問3

モル濃度： 4.0×10^{-5} (M)

質量濃度： 1.5×10^{-2} (g/L)

解説

ランベルト・ベールの法則から、モル濃度は、

$$c = \text{ABS} / (\epsilon \times l) = 0.5 / (12500 \times 1) = 4.0 \times 10^{-5} \text{ (M)}$$

分子量はモル質量と同値であり、モル質量の単位は g / mol であるため、モル濃度を質量濃度に変換するためには、

$$(4.0 \times 10^{-5}) \text{ (mol/L)} \times 375 \text{ (g/mol)} = 1.5 \times 10^{-2} \text{ (g/L)}$$

問4

(A) 泳いでいる時には Ca^{2+} が生殖腺の細胞質で高くなる。その結果イクオリンは青色に発光するが、この発光のエネルギーは全て GFP に吸収され、その結果 GFP は緑色の光を放出した。

(B)

(B)	発光		蛍光	
	青色	緑色	青色	緑色
(1)				○
(2)		○		○
(3)		○		○
(4)				○

解説

青ではなく、緑発光をするということは、GFP が UV または青色光を受けていることを示す。ここではイクオリンが青色発光できるので、青色光のソースはイクオリンであると考えられる。ということは、生殖腺の細胞は泳ぐと Ca^{2+} 濃度が上昇し、イクオリンが発光するこ

とが考えられる。ただし、青色光は全く観察されないので、青色光の全てのエネルギーは光として放出されず、GFPに吸収されたと考えられる。このようにある種の蛍光物質は、ある波長の光を吸収し、より波長の長い光を放出する機能がある。

もしイクオリン-GFPを細胞内に導入して、オワンクラゲのように働くとしたら、GFPがある限り励起光であるUVを当てれば緑の蛍光を発する。また神経が興奮して活動電位を生じると、電位依存性Ca²⁺チャネルが開き、細胞外のCa²⁺が細胞内に流入することで細胞内のCa²⁺が上がる。その結果、イクオリンが青色発光するエネルギーを得たGFPは励起光なしで、緑色に発光するはずである。細胞外にはNa⁺が元々多いのでさらに濃度を上げてても神経は興奮し、Ca²⁺が細胞内に流入する。しかし、細胞外のCa²⁺が低いと、Ca²⁺チャネルが開いても、Ca²⁺が細胞内に流入せず、イクオリンの青色発光がなくなることで、GFPの緑色発光もなくなる。

問題2

問1

(A)	処理1	処理2
1.5 mL チューブ 2-1	緑色蛍光が消失する。	緑色蛍光が回復する。
1.5 mL チューブ 2-2	赤色蛍光が消失する。	赤色蛍光が消失したままである。

(B)

2-1のタンパク質も、2-2のタンパク質もともに、塩酸の添加により蛍光が消失したことから、強酸の下でタンパク質が変性したと考えられる。その後、塩酸と等モルの水酸化ナトリウムを添加すると、2-1のタンパク質は蛍光が回復したのに対し、2-2のタンパク質は蛍光が回復しなかった。つまり、2-1のタンパク質の場合、溶液が中性状態に戻った際に、自発的に本来の構造にフォールディングすることができるのに対して、2-2のタンパク質はフォールディングすることができないと考えられる。問題文に記載されているシャペロンというタンパク質が2-2のタンパク質のフォールディングを助けていると考えられる。

解説

2-1のタンパク質は問題1の1-2と同様、GFPの改変体である。2-2のタンパク質はDsRedというイソギンチャク由来の天然の赤色蛍光タンパク質である。GFPの改変体は、1つのドメインで構成される小さなタンパク質で、かつ、単量体で存在している。DsRedもGFPと相同性のあるタンパク質であるが、四量体を形成しているため、複雑な構造をしている。そのため、GFP改変体は酸性条件下で変性した後に中和することで、自発的に本来の構造に

戻ることができるが、DsRedは本来の構造に戻ることができない。DsRedを基に変異を導入して開発された単量体の赤色蛍光タンパク質（mCherryなど）はGFP同様、酸性条件で変性した後に中和すると、自発的に本来の構造に戻ることができる。

問2

翻訳後、リソソーム内への運搬を指示するポリペプチドとGFPを融合させると、GFPはリソソームに局在するが、リソソーム内は酸性のため、GFPの立体構造が壊れ、蛍光を発することができない。

解説

他のそれぞれのGFPにポリペプチドを付加すると、以下のようになる。

- ・翻訳後、核移行を指示するポリペプチド

→核でGFPの蛍光が観察される

- ・小胞体上のリボソームで翻訳することを指示するポリペプチド(シグナルシーケンス)

→小胞体やゴルジ体でGFPの蛍光が観察される。ただし、分泌後、分子は拡散してしまい、GFPの蛍光が見えなくなることがあるので、この理由を書いた場合には、部分点を与える。

- ・翻訳後、細胞骨格のアクチンに結合するアミノ酸配列を持つポリペプチド

→アクチンでGFPの蛍光が観察される

問3

α ヘリックスも β シートも、タンパク質の主鎖を構成する原子同士が水素結合を形成することで、安定した構造を形成するため、アミノ酸配列にはあまり依存しない。また、 β シートに関しては、並列している β ストランド間で水素結合が形成されることで、安定した構造を形成するため、1本の β ストランドでは安定した構造を取ることができない。

解説

α ヘリックスは、 n 番目のアミノ酸のC=Oと $n+4$ 番目のアミノ酸のN-Hとの間で水素結合が形成されることにより、3.6アミノ酸で1回転する右巻きのらせん構造となる。 β シートは、1本の β ストランドのN-Hともう一本の β ストランドのC=Oの間で水素結合が形成されることにより、シート構造となる。二つのストランドの向きが同一となる並行 β シートと、向きが逆方向となる逆並行 β シートがある。 α ヘリックスも β シートも、あまりアミノ酸配列には依存せずに構造をとることができるが、例外もある。たとえば、グリシンやプロリンは α ヘリックスの形成を阻害することが知られている。

問4

実験1

DnaJ は DnaK よりも上流にあり、DnaK と変性タンパク質との複合体に GrpE と ATP が直接作用し、このサイクルが回る。

実験2

ATP-DnaK 自体も、ATP を分解して、ADP にするが、活性が低い。より早い反応には DnaJ—変性タンパク質複合体との結合または DnaJ に結合した変性タンパク質が ATP-DnaK に受け渡されることが必要である。

解説

実験1

DnaK と変性タンパク質が結合したあと、GrpE と ATP を加えるとルシフェラーゼの活性が戻ったのに対し、DnaJ と変性タンパク質が結合したあと、GrpE と ATP を加えてもルシフェラーゼの活性が戻らない。このことから DnaK と変性タンパク質が結合することが、DnaJ と変性タンパク質が結合することよりも下流にあり、GrpE と ATP が直接作用するのは DnaK と変性タンパク質の複合体であることがわかる。

実験2

ATP-DnaK だけでは、ATP の分解速度は遅い。DnaJ と結合した変性タンパク質を入れると反応が早くなることから、DnaJ—変性タンパク質複合体との結合自体か、DnaJ に結合した変性タンパク質が ATP-DnaK に受け渡されることで ATP-DnaK に変性タンパク質が結合し、サイクルが回ると考えられる。