



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)

問題冊子

- ・ 問題冊子, 解答用紙 4 枚, 注意事項が配布されているかを確認しなさい。
- ・ 問題冊子の表紙, 解答用紙(4 枚とも)の所定欄に受験番号, 氏名を記入しなさい。
- ・ 注意事項をよく読むこと

問題冊子は, 試験開始の合図があるまでは開けてはいけません。

受験番号	氏名

【重要】 このページに書かれた作業を完了してから、次のページへ進むこと

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、教卓から自分の手のサイズに合った手袋を1セット持っていく。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分後以降の申し付けについては対応できない。確認が終わり次第、次のページに進んでよい。

また、実験をする際には、必ず手袋、保護メガネを装着すること。

展開槽はガラスでできていて、少し欠けている場合があるので、怪我に注意して扱うこと。

試料

☐ 溶液が入った 1.5 mL チューブ 7 本（1-1 から 1-5, 2-1, 2-2 と蓋に書かれている）

器具

- ☐ 保護メガネ
- ☐ 1.5 mL チューブ立て
- ☐ マイクロピペット（ギルソン P-20）1 本
- ☐ マイクロピペット用のチップ 数本
- ☐ 使用済みチップを入れるカップ
- ☐ 展開溶液の入った展開槽（黄色のテープが貼ってある）
- ☐ 薄層プレート
- ☐ 紫外光源
- ☐ 遮蔽用の段ボール箱
- ☐ 定規
- ☐ 紙タオル

試薬

- ☐ 1N HCl（蓋に HCl と書かれた 1.5 mL チューブ）
- ☐ 1N NaOH（蓋に NaOH と書かれた 1.5 mL チューブ）

試料

- ☐ 1.5 mL チューブ 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5
- ☐ 1.5 mL チューブ 2-1, 2-2

問題 1 次の文章を読み、問 1 から問 4 に答えなさい。

みなさんは蛍光タンパク質を知っているだろうか。蛍光タンパク質は紫外光や可視光を吸収して、違う波長の光（蛍光）を放出するタンパク質である。蛍光タンパク質はそれ自身がクラゲやサンゴで使われているだけでなく、細胞中に導入することで、細胞を生かしたまま、様々な生命現象を観察することを可能にしたため、生命科学の多くの実験に使われてきた。この功績を讃えて、2008 年のノーベル化学賞は「緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, GFP）の発見と応用」の功績で、下村脩、マーチン・シャルフィー、ロジャー・Y・チェンの 3 氏に贈られた。

この蛍光タンパク質は、どのようにして、光を吸収しているのだろうか。タンパク質は、多数のアミノ酸が鎖状につながった構造をしている。タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸は、側鎖の構造がそれぞれ異なっている。トリプトファンやチロシンなどの芳香族アミノ酸は紫外光を吸収することができるが、可視光を吸収することができない。そのため、可視光を吸収して蛍光を放出するタンパク質（蛍光タンパク質）は、可視光を吸収するための発色団(Chromophore)をもつ。蛍光タンパク質の発色団は二種類に大別され、一方では特定の色素がタンパク質に結合し発色団として機能するのに対し、もう一方ではタンパク質自身の複数のアミノ酸残基をもとに、自己触媒活性により発色団が形成される。青色光（もしくは紫外光）を吸収し、緑色蛍光を放出する、緑色蛍光タンパク質にも、これら二種類のもの知られ、前者に相当するタンパク質はフラビンという色素を結合する。

問題 1 でつかう試料は以下の通りである。

1.5 mL チューブ 1-1：フラビン A

1.5 mL チューブ 1-2：フラビン B

1.5 mL チューブ 1-3：フラビン C

1.5 mL チューブ 1-4：蛍光タンパク質 A

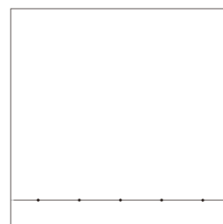
1.5 mL チューブ 1-5：蛍光タンパク質 B

問 1：1.5 mL チューブ 1-4, 1-5 を段ボールの中に入れて紫外光を照射し、それぞれが蛍光を放出する様子を確認せよ。このとき、それぞれの物質に吸収された光の総エネルギーと蛍光として放出されている光の総エネルギーではどちらのエネルギーが高いか答えよ。そして、それらのエネルギーの差分がどうなったか考察せよ。

問2: 薄層クロマトグラフィーはガラスの板の上に極性分子であるシリカゲルが薄く塗られたプレートを利用し、非極性の有機溶媒中で展開、移動させることで、試料中の成分を分離させることができる。この時、試料中の成分は、薄層プレートに塗布されたシリカゲルと、溶媒の間で吸着と脱離を繰り返す。そのため、シリカゲルと吸着しやすい極性の高い物質は、移動が遅くなる。また、タンパク質は有機溶媒中で変性し溶解しないため、展開できない。1.5 mL チューブ 1-1 から 1-5 の試料を用いて、以下の実験1を行い、(A)から(C)の問いに答えよ。

実験1

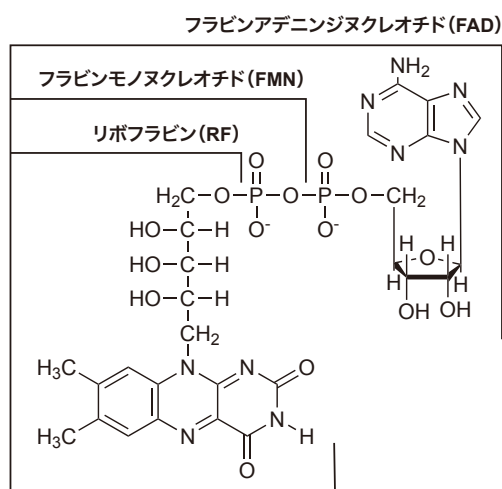
- (1) 右図のように展開プレート（8 cm×8 cm）の下から 1 cm のところに鉛筆で直線を引き、試料を染み込ませる（スポットする）目安のために、1 cm 毎に点で印をつける。



- (2) フラビン A, ブラビン B, フラビン C, タンパク質 A, タンパク質 B それぞれについて、マイクロピペットを用いて(1)で印をつけた場所に、2 μ l ずつ液を落としてスポットする。できるだけスポットした部分が小さくなりように液を落とす。スポット後、展開プレートを 1 分ほど置いておき、乾燥させる。
- (3) スポットした側を下になるように展開槽に展開プレートを入れる。展開槽に蓋をして 30 分程度、放置し、展開させる。プレート全体の 7 割近くまで溶媒が届いたところで（溶媒が最終的に到達した位置を「溶媒フロント」という）、展開プレートを展開槽から取り出し、溶媒フロントのところに鉛筆で目印をつけ、紙タオルの上で触っても濡れない程度まで乾かす。
- (4) 展開プレートを段ボール箱の中に入れて、紫外光を照射して、どこが蛍光を示すか確認する。

(A) 展開結果の簡易スケッチを解答用紙に記入しなさい。一つの試料について、複数の展開位置に蛍光が確認できた場合、濃淡もスケッチに反映させること。

(B) 使用したフラビンは下図の3種のどれかである。実験結果からフラビン A, B, C がそれぞれのフラビン種であるか同定し、理由とともに答えよ。一つの試料について、複数の展開位置に蛍光が確認できた場合、最も強い蛍光が確認できた展開位置に着目して、フラビン種を同定すること。



(C) 実験結果から、タンパク質 A とタンパク質 B のどちらにどのフラビンが結合していたか、理由とともに答えよ。

実験後の薄層プレートは評価の対象とするため、溶媒フロントよりも上の右端に受験番号を書き、遮蔽用の段ボール箱の中に残して退室すること。

問3：光を吸収する物質は、その物質特有の光を吸収する際の定数・ ε （モル吸光係数）をもつ。リボフラビンの場合、紫外光から青色光までの領域の光を吸収することができ、445 nm のモル吸光係数は 12,500 である。ある濃度に希釈したリボフラビンの 445 nm の吸光度（ABS）を測定したところ、0.5 であった。吸光度、モル吸光係数、光を吸収する物質のモル濃度、光路長の間には、ランベルト・ベールの法則により、以下の数式が成立する。この数式と上述の情報から、吸光度を測定したリボフラビンのモル濃度を算出せよ。また、リボフラビンの分子量を 375 として、質量濃度も算出せよ。

$$\text{ABS} = \varepsilon \times c \times l$$

ε ：モル吸光係数 ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

c ：光を吸収する物質のモル濃度 (M)

l ：光路長（この場合は 1 cm）

問4：次の文章を読み、(A)と(B)に答えよ

有名な蛍光物質である緑色蛍光タンパク質 GFP はオワンクラゲから発見された。GFP はタンパク質中の特定のアミノ酸の結合によってできる発色団を持つ。オワンクラゲにはそのほかに蛍光物質(光を当てなくても光を放出する物質)であるイクオリンが発現している。イクオリンはカルシウムイオンに反応して、青色に発光する。

(A) オワンクラゲは泳いでいる時、イクオリンと GFP の両方を持つ細胞で、青色の発光はなく、緑色の発光のみが観察される。なぜこのような現象がおきるのか仮説を述べなさい。

(B) 培養神経細胞にイクオリンと GFP の両方を発現させ、オワンクラゲの細胞内と同じ局在をさせた。この神経細胞に様々な処理を加えた時、発光、または蛍光はどのようになると予想されるか。解答用紙に、発光または蛍光が観察されると予想できるときに○を入れなさい。

ただし、発光は暗所で何も当てずに、蛍光は暗所で UV 光を当てて観察したとする。神経細胞への処理は以下の通りである。

- (1) なにもしない
- (2) 細胞体に電気刺激を与え、活動電位を生じさせる
- (3) 細胞外液の Na^+ 濃度を高くし、(2)と同じ刺激を与える。
- (4) 細胞外液の Ca^{2+} 濃度を低くし、(2)と同じ刺激を与える。

問題2 次の文章を読み、問1から問4に答えなさい。

DNA上の遺伝子の配列は、その遺伝子に対応するタンパク質のアミノ酸一次配列を指定している。DNAから転写・翻訳を経て合成されたタンパク質は、その初期構造においては多様な構造を取っているが、最終的には安定した一つの構造に収束すると考えられている。このようにタンパク質が正しい形に折り畳まれることをフォールディングという。また、一部のタンパク質では、シャペロンというタンパク質がフォールディングを助けることが知られている。

問1：1.5 mL チューブ 2-1 と 2-2 の試料を用いて、以下の実験2を行い、(A)・(B)の問いに答えよ。

1.5 mL チューブには以下の物質のみが入っている。

1.5 mL チューブ 2-1：GFP

1.5 mL チューブ 2-2：Red Fluorescent Protein (RFP)

GFP および RFP：タンパク質のみで発色団をつくる蛍光タンパク質

実験2

- (1) 段ボールの中で1.5 mL チューブ 2-1, 2-2 に紫外光を照射し、蛍光を発していることを確認する。
- (2) 処理1：1.5 mL チューブ 2-1, 2-2 に、マイクロピペットを用いて5 μ l の1 N HCl 溶液を添加し、タッピングにより、よく混合する。その時の様子を観察する。その後、段ボールの中でそれぞれのチューブに紫外光を照射し、その時の様子を観察する。
- (3) 処理2：つづいてそれぞれのチューブに、マイクロピペットを用いて5 μ l の1 N NaOH 溶液を添加し、タッピングにより、よく混合する。その時の様子を観察する。その後、段ボールの中でそれぞれのチューブに紫外光を照射し、その時の様子を観察する。

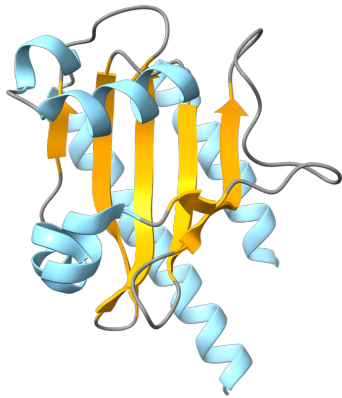
(A) それぞれの処理をした際の観察の結果を記せ。

(B) 1.5 mL チューブ 2-1, 2-2 のタンパク質の違いはなにか。結果に基づいて考察しなさい。

問 2：GFP タンパク質は細胞に導入すると細胞質に安定にとどまり，蛍光を発する。一方 GFP にさまざまなポリペプチドを付加して細胞に導入すると，蛍光を発する性質は保持したまま，細胞内の様々な場所に運搬され，局在する。以下の 4 種のポリペプチドをつけた GFP をそれぞれ導入した細胞で，GFP の蛍光が検出されないものがある。それはどの GFP を導入した場合か，理由とともに答えなさい。

- ・翻訳後，核移行を指示するポリペプチド
- ・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）
- ・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
- ・翻訳後，リソソーム内への運搬を指示するポリペプチド

問3：タンパク質はそれぞれ独自の三次構造をとるが，主鎖の構造に着目すると， α ヘリックスや β シートなどの局所的な構造要素とそれらをつなぐループで構成されている。これらの主鎖構造を模式的に表した描写方法があり，リボンダイアグラムという（下図）。 α ヘリックスと β シートはアミノ酸配列にあまり依存せずに組み上げられる。なぜ，アミノ酸配列にあまり依存せずにそれぞれの構造を取ることができるか考察せよ。また， β シートの1本ずつの要素を β ストランドというが，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。なぜ安定した構造を取ることができないか考察せよ。

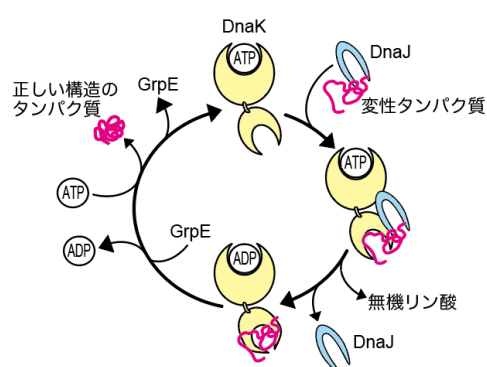


あるタンパク質の構造をリボンダイアグラムで描写した図。 α ヘリックス， β シート，ループをそれぞれ水色，橙色，灰色で色づけている。

問4：大腸菌のシャペロンである DnaK は DnaJ, GrpE とともに、下の図のようなサイクルで変性したタンパク質を正しいフォールディング構造を持つタンパク質に変えることができる。これは、変性したタンパク質をつかって、試験管内に DnaK, DnaJ, GrpE などの因子を加えて実験した研究から分かったことである。このような実験では、変性タンパク質として、ルシフェラーゼがよく使われる。ルシフェラーゼはルシフェリンという発光物質を酸化させて光を出す反応を触媒する酵素である。この酵素は熱などで変性させると酵素活性を失う。これを室温で置いておいても酵素活性はもどらないが、試験管に変性したルシフェラーゼ、DnaK, DnaJ, GrpE, ATP を適量加えて室温に置くと、酵素活性を取り戻し、ルシフェリンを加えると発光が観察される。

変性したルシフェラーゼを使った、実験1と実験2がある。それぞれの実験結果はこのシャペロンサイクルの一部を明らかにしたものである。それぞれの実験はサイクルのどの部分を明らかにしたのかを説明しなさい。ただし、この実験だけでは他の可能性を否定できないが、それは無視していい。

大腸菌のシャペロンによるタンパク質のサイクル



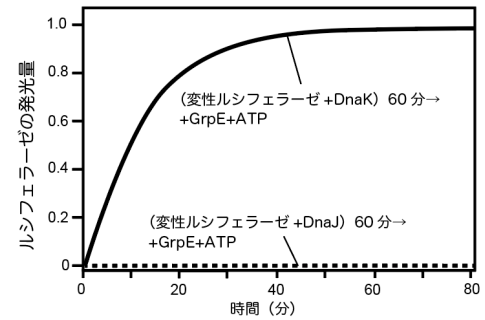
変性したタンパク質はまず DnaJ と結合する。この DnaJ-変性タンパク質複合体は、ATP が結合した DnaK (以下 ATP-DnaK) と結合し、DnaK に変性タンパク質を引き渡す。その後、ATP は加水分解され、DnaK に結合した ATP は ADP になる。その際に DnaK と DnaJ の結合は外れる。その後、GrpE の働きにより、DnaK に結合した ADP は外れ、ATP に置き換わる。その際に変性したタンパク質もリリースされ、正しい構造に折りたたまれる。

実験 1

DnaK または DnaJ は変性したタンパク質と一緒に試験管に入れ 60 分室温に置くとそれぞれが変性したタンパク質と結合することが知られている。

変性したルシフェラーゼを DnaK, または DnaJ と一緒に試験管に入れ, 室温で 60 分おいた後, GrpE と ATP を加えた。これを室温に置き, 時間ごとにルシフェリンを加えて発光量を調べた。結果のグラフの発光量は変性したルシフェラーゼを DnaK と一緒に試験管に入れ, 60 分おいた後, GrpE と ATP を加えたものを 80 分室温に置いた時を 1 とした相対値で示す。

実験 1 の結果

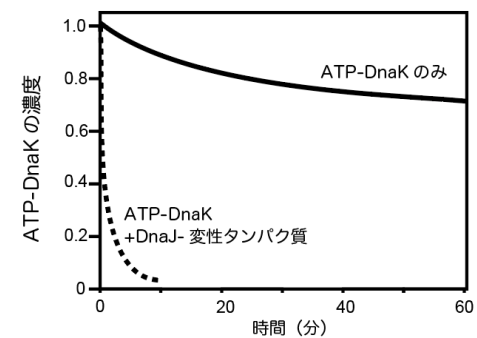


実験 2

ATP-DnaK のみ, ATP-DnaK に DnaJ に結合した変性したルシフェラーゼを加えた液を用意し, 室温に置いた。時間ごとに ATP-DnaK の濃度を調べた。

結果のグラフの ATP-DnaK の濃度は, 最初に加えた濃度を 1 とした相対値で示す。

実験 2 の結果



問題は以上です。退室の指示があるまで静かに待っててください。