

名札番号		名前	
------	--	----	--

## 実験試験（動物）問題冊子

（平成 25 年 8 月 17 日 16 時 00 分～18 時 00 分）

1. 机には、問題冊子（17 ページ）、解答用紙（5 枚）および解答用ケント紙（2 枚）が配付されている。
2. 説明が始まるまでは、問題冊子を開かずに、このページをよく読んでおくこと。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と名前を記入しなさい。また、このページにも名札番号と名前を記入すること。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は、挙手をする事。
5. 試験の途中で、気分が悪くなったり、用便のために外に出たりする場合は、挙手をする事。
6. 実験中は、必ず白衣を着用すること。また、実験用手袋、保護メガネ、マスクについては、指示のある場合は必ず、指示のない場合は必要に応じて着用し、試料等が眼、口、皮膚などに直接触れないよう注意すること。手袋等のサイズが合わないとき、また数が足りないときは、挙手をする事。
7. 問題冊子にメモを取ってもかまわない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
8. 実験机の上および引き出しの中の文具や実験道具は自由に使ってかまわない。実験中は位置も自由に動かしてかまわない。実験終了後はなるべく元の位置に戻しておくこと。
9. 実験は、実験 1, 2, 3 の順に行うこと。
10. 実験机の上には、すでに準備されているものの他、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないこと。

## 【実験に必要なもの】

実験 1, 2, 3 では下に示した材料, 器具および試薬を使う。□に✓をつけて確認し, 足りないものがあったら挙手すること。

### 各実験共通

<input type="checkbox"/> 実験用手袋	3 組
<input type="checkbox"/> 実験用ティッシュ (キムワイプ)	1 箱
<input type="checkbox"/> ペーパータオル	1 袋
<input type="checkbox"/> 手拭き (個包装されている)	1 袋
<input type="checkbox"/> 保護メガネ	1 個
<input type="checkbox"/> 可燃ゴミ回収用プラスチック容器	1 個
<input type="checkbox"/> ガラス回収用プラスチック容器	1 個

### 実験 1

<input type="checkbox"/> シャコ <i>Oratosquilla oratoria</i>	1 個体
<input type="checkbox"/> ハサミ	1 本
<input type="checkbox"/> ピンセット	1 本

ピンセットは実験 3 でも使用する。

<input type="checkbox"/> 解剖バット	1 個
<input type="checkbox"/> 色鉛筆 (赤色, 青色, 黄色)	各 1 本 (引き出しの中)
<input type="checkbox"/> 黒鉛筆	2 本 (引き出しの中)
<input type="checkbox"/> 消しゴム	1 個 (引き出しの中)
<input type="checkbox"/> セロテープ	1 個 (引き出しの中)
<input type="checkbox"/> クリアファイル	1 枚 (引き出しの中)

### 実験 2

<input type="checkbox"/> ヒツジ血液入り 1.5 mL 容チューブ	1 本
<input type="checkbox"/> 角型カバーガラス	3 枚
<input type="checkbox"/> 丸型カバーガラス (格子入り)	2 枚
<input type="checkbox"/> スライドガラス (裏面に○印あり)	3 枚
<input type="checkbox"/> 固定液	1 本
<input type="checkbox"/> 染色液 A	1 本

- |   |     |
|---|-----|
| <input type="checkbox"/> 染色液B               | 1 本 |
| <input type="checkbox"/> 封入剤入り 1.5 mL 容チューブ | 1 本 |
| <input type="checkbox"/> つまようじ              | 2 本 |
| <input type="checkbox"/> カウンター              | 1 台 |
| <input type="checkbox"/> 洗浄液入りプラスチックコップ     | 1 個 |
| 水道水（スライドガラス洗浄用）                             |     |
| <input type="checkbox"/> 透明プラスチック製の箱（提出箱）   | 1 個 |
| 提出箱は実験 3 でも使用する                             |     |
| <input type="checkbox"/> 生物顕微鏡              | 1 台 |
| 生物顕微鏡は実験 3 でも使用する                           |     |

### 実験 3

- |   |     |
|---|-----|
| <input type="checkbox"/> ゼブラフィッシュ <i>Danio rerio</i> （白色変異個体） | 2 尾 |
| <input type="checkbox"/> スライドガラス（無印）                          | 2 枚 |
| <input type="checkbox"/> 麻酔液入りプラスチックコップ                       | 1 個 |
| 2-フェノキシエタノール 0.06%  |     |
| <input type="checkbox"/> 魚すくいネット                              | 1 本 |
| <input type="checkbox"/> スポイト（先端を切断したもの）                      | 1 本 |
| <input type="checkbox"/> 粘土（提出箱の中）                            | 1 個 |

※ マスクが必要な者は，試験補助者に申し出ること。

※ 手袋が破損して足りなくなった場合は追加配付するので，試験補助者に申し出ること。

※ 実験台の引き出しは適宜使用して構わない。

## 生物顕微鏡使用法

- 1) 光量を適当な明るさに調整する。
  - 2) 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
  - 3) レボルバーを回して対物レンズを4倍（最低倍率）にする。
  - 4) 標本をセットし、照明光の位置に観察したい部位を移動させる。
  - 5) ステージを一番上まで上げる。
  - 6) 接眼レンズを覗きつつ、粗動ハンドルを用いてピントが合う位置までステージを下げる。
  - 7) 微動ハンドルを回してピントを微調整する。
  - 8) コンデンサー絞りをを使って、コントラスト、焦点深度を調整する。
- ※ 眼幅や視度には個人差があるので、各人の違いに合わせて補正すること。
- ※ この実験では、100倍の対物レンズは使用しない。
- ※ 使用中、レンズが汚れた場合には試験補助者に申し出ること。



<このページは白紙である>

## 実験 1 シャコの解剖と形態観察

### 【はじめに】

シャコは節足動物門・甲殻亜門・口脚目に属する種の総称である。口脚目はこれまでに世界で約 450 種が知られている。シャコは食用として利用され、世界で最もシャコを食べているのは日本人であると言われている。このようにシャコは水産資源として重要な分類群である。日本国内では、瀬戸内海が主要な産地の一つとなっている。

シャコは大きな鎌状の付属肢である捕脚をもつことで、他の甲殻亜門の分類群と容易に区別できる。捕脚の破壊力は大きく、アサリの殻をたたき割ることもできる。シャコは外見的にはエビ類（十脚目）に似ているが、体節の癒合の程度や付属肢の形態および機能などがエビとは大きく異なる。

この実験は以下の手順に従って行い、問 1 から問 4 の設問に答えること。

**手順 1** シャコはとげが鋭く怪我をする恐れがあるため、実験用手袋を着用して注意深く扱うこと。シャコを解剖バットに移し、付属肢などに欠損がないか確認しなさい。標本が破損している場合は交換するので申し出ること。

**手順 2** 体節構造に注意して外部形態を観察し、次の問に答えなさい。

**【問 1】** シャコの頭部が上になるように解剖バットの上に置き、体節構造が分かるように、頭部が上になる向きで背面から見たところを黒鉛筆でケント紙にスケッチしなさい。次にスケッチの頭部を赤色、胸部を青色、腹部を黄色の色鉛筆で塗り分けなさい。頭部・胸部・腹部の境界が節の癒合により外見にあらわれない場合は、境界を点線（黒鉛筆）で示しなさい。なお、付属肢を描く必要はない。

**手順 3** シャコは 19 対の付属肢を備える。ピンセットあるいはハサミを用いて、からだの右側の付属肢をすべてはずし、以下の問に答えなさい。付属肢はていねいに基部からはずすこと。

【問 2】 はずしたすべての付属肢を，からだの前方から順番に，「付属肢シート」中の対応する付属肢番号 1～19 の欄にセロテープを用いて貼り付けなさい。付属肢を貼付した付属肢シートはクリアファイルに入れて試験終了時に提出すること。なお，解剖の失敗等によりからだの右側の付属肢がすべてそろわない場合は，一部左側の付属肢を使ってもよい。

【問 3】 付属肢の形態をよく観察し，付属肢 8～10 と付属肢 11～13 の形態的特徴と機能について 100 字以内（句読点を含む）で述べなさい。

【問 4】 ザリガニやカニの「<sup>はさみ</sup>鋏」はシャコの捕脚の「鎌」と相同か否か。理由とともに 50 字以内（句読点を含む）であなたの考えを述べなさい。

## 実験2 ヒツジの血球観察

### 【はじめに】

魚類や哺乳類の血液中には、さまざまな血球細胞が含まれている。そのほとんどは酸素の運搬に使われる赤血球である。その他の主な血球として、好中球やリンパ球などを含む白血球があり、これらは生体防御に関わっている。

この実験では、ヒツジの血液を用いて血液塗抹標本作製し、血球染色を施して赤血球と白血球とを区別しつつ観察する。以下の手順に従って実験を行い、14 ページにある問5と問6の設問に答えること。8 ページから 13 ページまでは手順を記述しているので、十分に手順を理解してから実験操作を始めること。

※ 以下の操作は、実験用手袋と保護メガネを着用して行うこと。

※ 塗抹標本は3枚まで作製してよい。

**手順1** 予備体験で行った要領で、1.5 mL 容チューブに入ったヒツジの血液を用いて血液塗抹標本作製する。標本作製手順の詳細は以下のとおりである。

- 1) スライドガラスやカバーガラス等、必要な器具類を使いやすい位置に配置する。
  - ・スライドガラスは、一方が白く塗ってある側が表で、これが右側になるようにおく。
  - ・スライドガラス裏側の中心付近に○印が描いてある。
  - ・以下の操作2)～5)は、手際よく進める必要があるので、十分に手順を理解し、操作を練習した上で始めること。
  - ・スライドガラスと角型カバーガラスはそれぞれ3枚ずつあるので、それらをすべて使って良い。
- 2) チューブ内の血液を軽くかくはんした後、つまようじ（後端側）をチューブ内に入れ、血液をつける。
- 3) 血液のついたつまようじを、ペーパータオルの上にのせたスライドガラスの表側中央付近（裏側に○印が描いてある）に接触させ、血液をスライドガラス上につける。
  - ・必要に応じてこの操作を繰り返し、血液の滴下量を調整する。



- 4) 角型カバーガラスを図 1 のように持って、滴下した血液の少し左側に図 2 のようにつけ、このまま右側にわずかにずらして血液に接触させる(図 3, ①②)。すると、血液はカバーガラスとスライドガラスの境界部に広がるので、次にカバーガラスをスライドガラスの左端まで素早くなめらかにすべらせる(図 3, ③④)。
- ・カバーガラスの持ち方は各自工夫して良い。
- 5) スライドガラスをしっかりと手で持って振り、風を当てて血液をよく乾燥させる。

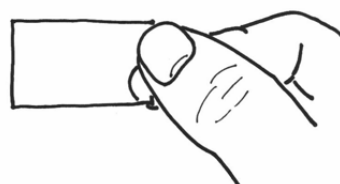


図 1. 角型カバーガラスの持ち方

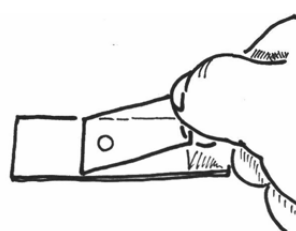


図 2. カバーガラスは血液の少し左側につけてから右にずらす

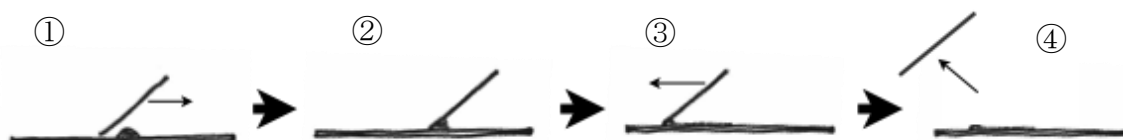


図 3. カバーガラスの動かし方（側面図）

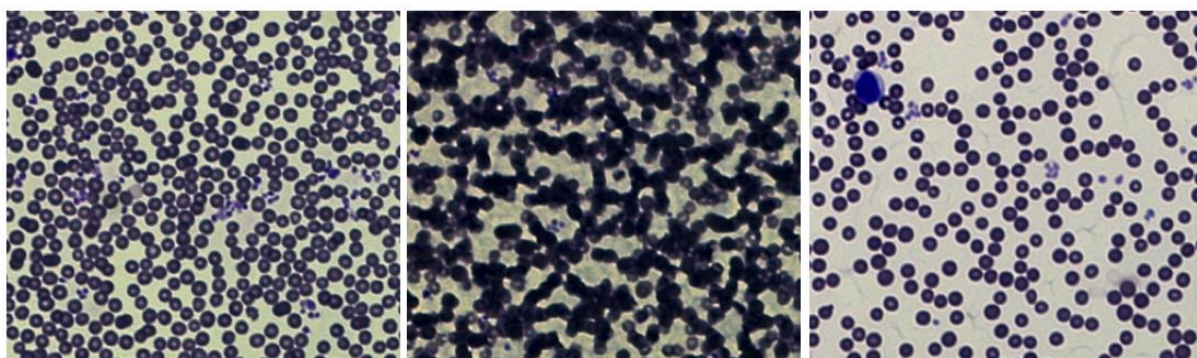
注意： 塗抹後、カバーガラスはスライドガラスにかけない

手順 2 以下の要領で、標本を固定・染色する。

- 1) 血液を塗布したスライドガラスを固定液につけ、ゆっくりと 10 回上下する。
- 2) スライドガラスの端をキムワイプにつけ、余分な固定液を吸い取る。
- 3) 次いで、上記 1), 2) の操作を染色液 A, B の順に行う。
- 4) 洗淨水の入ったプラスチックコップ中で、スライドガラスで水をゆっくりとかき回すようにして、約 10 秒間標本を洗う。

- 5) スライドガラスの裏側についた水をキムワイプで拭き取る。スライドガラスの表裏を間違えないように注意する。
- 6) スライドガラスをしっかりと手で持って振り，よく乾燥させる。血液を塗抹した部分以外は，キムワイプで水を吸い取ってもよい。
- 7) 血球が薄紫色に染まっているのが肉眼で観察される。全体に均一に塗布されているのが理想だが，塗布ムラがあっても部分的に使用可能であり，観察には支障がないことが多い。

**手順 3** 染色・乾燥した標本を顕微鏡で観察し，できるだけ血球が均一に塗布されている場所を探す（図 4 参照）。



適当な塗布状態

観察に適さない例 1  
(血球が多数重なりあっている)

観察に適さない例 2  
(血球密度が低すぎる)

図 4. 血液の塗布状態

**手順 4** スライドガラスを顕微鏡から取り出し，手順 3 で特定した場所（大体で良い）に，新しいつまようじを使って封入剤を少量たらす。

- ・つまようじの後端を封入剤につけて少量をとる。
- ・つまようじが直接スライドガラスに触れないように注意する。

**手順 5** 次の注意に従って，封入剤をたらした場所に封入用の丸型カバーガラス（格子入り）を載せ， 約 5 分間放置してなじませる。

- ・スライドガラスの白く塗ってある側を右にする。
- ・丸型カバーガラスの向きに注意すること（図 5 を参照）。
- ・丸型カバーガラスを保持する際は，ピンセットを使っても良い。

- ・はみ出した封入剤は拭き取らない。
- ・一度封入に使用した丸型カバーガラスは再利用できないので，スライドガラスからはがさないこと。
- ・封入に失敗した場合，別に作製した標本と 2 枚目の丸型カバーガラスを使用しても良いが，解答に用いるのはどちらか一方のみとする。

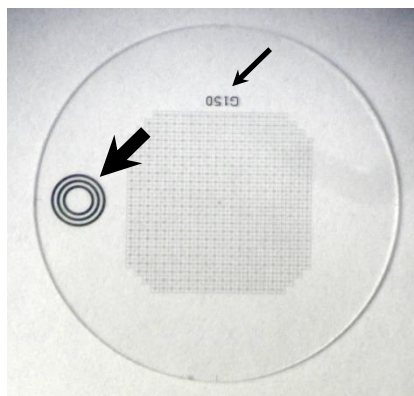


図 5. 丸型カバーガラス（格子入り）の向き  
カバーガラス（丸型）は，太矢印で示した◎印が左に，細矢印で示した小さな文字が上になるようにしてスライドガラスに載せる。

**手順 6** 封入した標本を顕微鏡で観察する。次の注意に従って，4 倍もしくは 10 倍の対物レンズを用いて，染色された血球とスライドガラスの格子を確認する（図 6）。

- ・スライドガラスの白く塗ってある方を右側にして顕微鏡にセットする。
- ・血球にピントが合った状態だと格子や記号がぼやける（図 6 左）が，少しピントを変えるとはっきり見える（図 6 右）。
- ・観察時は血球にピントを合わせ，位置を調べるときには視野を変えずに格子と記号にピントを合わせるとよい。

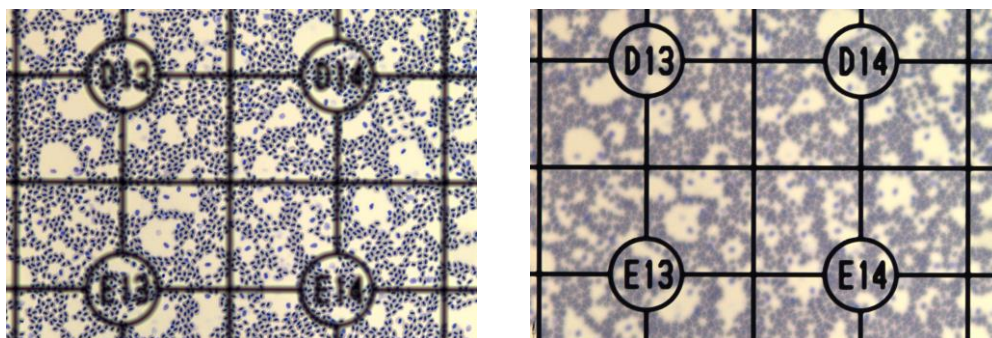


図 6. 丸型カバーガラスの格子と血球の見え方

- ・丸型カバーガラス上の記号は、左がアルファベット、右が数字である。なお、次のものは間違いやすいので気をつけること。

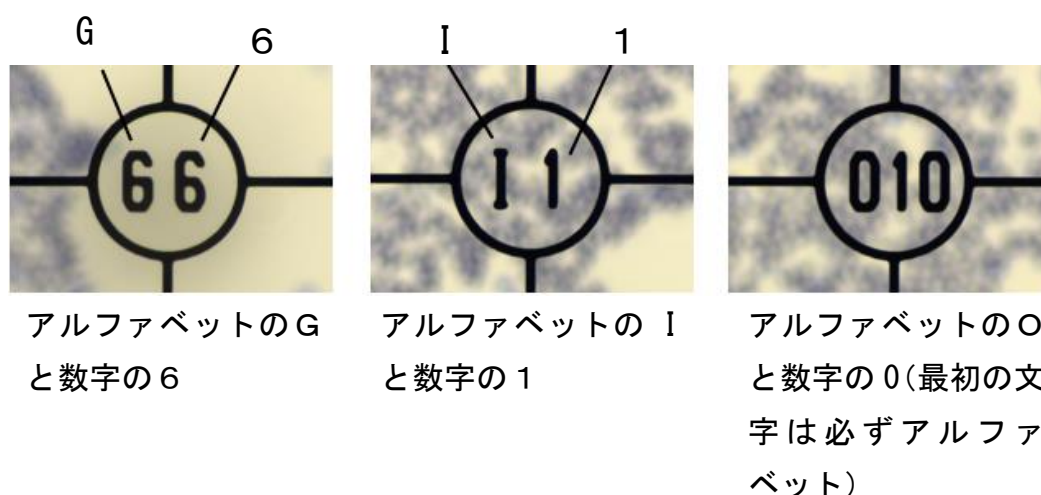


図 7. 間違いやすい記号例

- ・個々の血球を観察するには、40 倍の対物レンズを用いる。顕微鏡の光源とコンデンサー絞りを最も観察しやすいように調整する。

※この実験では 100 倍の対物レンズは使用しない。

### <血球の説明>

赤血球：最も多数観察される血球が赤血球である。赤紫色に染色される（図 8 に多数認められる小型の血球）。哺乳類の赤血球は核を欠くことが特徴である。

白血球：様々なタイプがあり、そのうち以下のものは図 8 のように染色される。

好酸球：細胞質は濃いピンク色あるいは赤紫色に染色される。核は濃い青色もしくは青紫色に染まり、複数にくびれる。直径は赤血球の 2 倍以上。

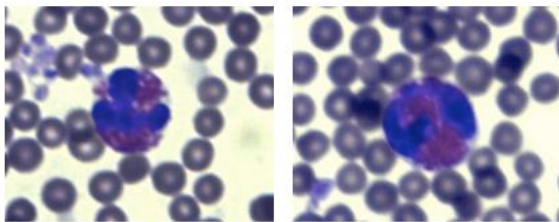
好中球：細胞質は非常に薄い青紫色あるいは赤紫色に染色される。核は濃い青色もしくは青紫色に染まり、形状は複雑で、コブのあるひも状に見えることもある。直径は赤血球の 2 倍以上。



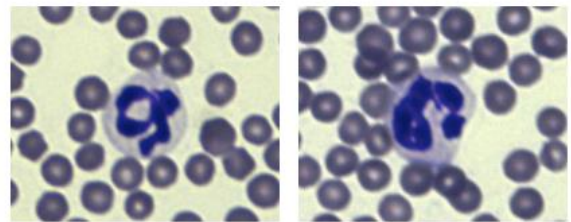
リンパ球：細胞は球形もしくはややゆがんだ球形で，大部分を核が占める。  
核は濃い青色もしくは青紫色に染まる。他の白血球よりもやや小さい。

単球：細胞質は好中球よりもやや濃い青紫色に染色される。核は大きく，  
濃い青色もしくは青紫色に染まり，くびれがある。直径は赤血球の  
2倍以上。

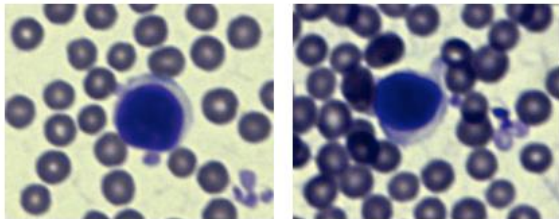
好酸球



好中球



リンパ球



単球

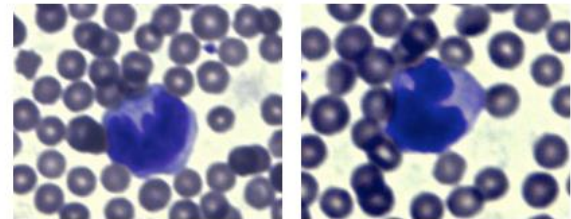


図 8. 白血球の顕微鏡像

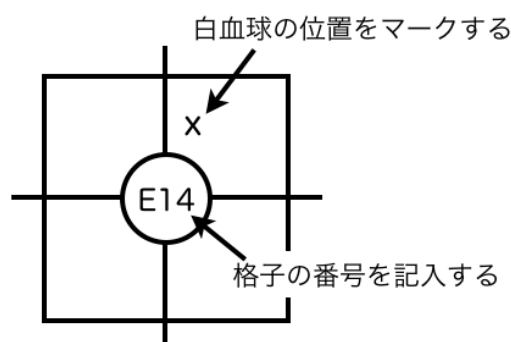
各図中の大きい細胞が白血球，それ以外の小さい細胞が赤血球である。

【問 5】 前ページで例にあげた 4 種類の白血球のうち 3 種類（どの種類を選んでもよい）を同定し、それぞれについて 1 つの血球細胞を選び、塗抹標本上の位置を以下の要領で解答用紙に記入しなさい。なお、カバーガラスの格子模様の外側は観察対象にしないこと。

＜解答の方法＞

- ・ 解答として選んだ白血球の種類を記せ。
- ・ その白血球が位置する格子の番号とその格子内のおおまかな位置を下の例にしたがって解答用紙に記入せよ。
- ・ 白血球が 3 種類見つからなかった場合には、解答用紙の「白血球の種類」欄に“見つからなかった”と記すこと。

白血球位置の解答例



【問 6】 ヒツジの血液に含まれる白血球と赤血球の数の大まかな比を算出するとともに、その比を算出した方法をできるだけ詳しく述べなさい。なお、白血球数と赤血球数の比は、白血球 1 個に対する赤血球の数を記入しなさい。血球の計数にはカウンターを使用してもよい。

※解答のために用いた血液塗抹標本は、スライドガラスの白い部分に鉛筆で氏名と名札番号を記入し、提出箱に入れて試験終了時に提出すること。

※提出箱にも氏名・名札番号を記入すること。

※解答欄が足りない場合は試験補助者に申し出ること。

<このページは白紙である>

### 実験3 ゼブラフィッシュ尾ビレ血管内の血球観察

#### 【はじめに】

メダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類の尾ビレはとても薄い器官であるが、その中には多くの血管が走行している。血液中には多数の赤血球が含まれており、顕微鏡を用いて容易に確認できる。これらの理由から、小型魚類の尾ビレは生きた動物の血流を観察する材料として適している。

この実験では、ゼブラフィッシュ（白色変異個体）の尾ビレにある血管中を流れる赤血球を観察し、そのかたちを立体的にとらえるとともに、赤血球の形態的特徴がその機能にどのように影響しているかを考察する。ゼブラフィッシュは、飼育・繁殖の容易さなどから、近年様々な研究に用いられている魚種である。野生型は明瞭な縦じま模様を呈するが、様々な変異体も作出されており、本実験で用いる白色変異個体もそのひとつである。

この実験は以下の手順に従って行い、問7と問8の設問に答えること。十分に手順を理解してから実験操作を始めること。

※ ゼブラフィッシュは2尾とも実験に用いてよい。

**手順1** 魚すくいネットを用いて、ゼブラフィッシュ1尾を麻酔液の入ったプラスチックコップに入れ、魚が麻酔によって横転するまで待つ（約2～5分間）。

**手順2** 魚を載せるスライドガラスを準備する。スライドガラスをペーパータオル上に置き、8分の1枚程度に切ったキムワイプをスライドガラスの上に載せておく。

**手順3** 横転した魚をスポイトに頭から吸い込み、スライドガラスに載せたキムワイプの上に水ごと魚を出して移す。次いで、尾ビレだけが見えるように魚体をキムワイプで包んで置く（図9）。



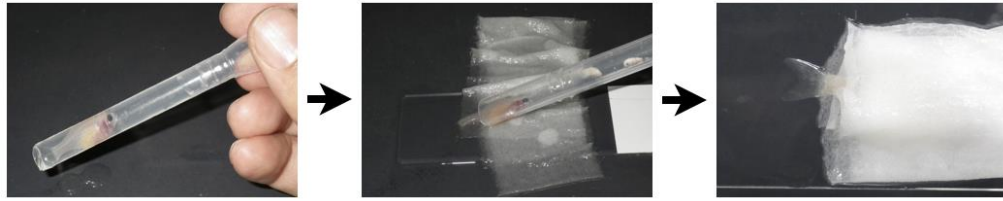


図 9. 尾ビレの血流観察標本の作製手順

手順 4 スライドガラス裏側の水滴を拭き取り，生物顕微鏡のステージに設置する。

- ・この状態で約 5 分以上経過すると，徐々に血流が弱くなって来る。血流が完全に止まると観察が難しくなるので，手早く以下の観察，解答を行うこと。

手順 5 4 倍の対物レンズを使用して尾ビレを観察する。多数の血管とその中を流れる粒子が観察される。この粒子が赤血球である。

手順 6 適当な血管を選び，10 倍の対物レンズを用いてより詳しく観察する。

- ・対物レンズが魚体やキムワイプにつかないように注意すること。
- もし対物レンズに水や汚れが付着し，観察しづらくなったら，試験補助者に申し出てレンズを掃除してもらうこと。

【問 7】 観察した赤血球の外形を，粘土を用いて立体的に成形し再現しなさい。

- ・すべての粘土を使って 1 個の赤血球をつくること。
- ・成形の終わった粘土は提出箱に入れて，試験終了時に提出すること。
- ・観察が終わった魚は速やかに水槽に戻すこと。

【問 8】 魚類の赤血球の形態は，哺乳類の赤血球とどのように異なっているか，80 字以内（句読点を含む）で答えなさい。またそれは赤血球の機能にどのような違いをもたらしているか，150 字以内（句読点を含む）で答えなさい。

## 動物問題解答のポイント

### 問 1 (配点10点)

節足動物に特徴的な体節構造に関する理解力と観察力を問う問題である。シャコは頭部 5 節および胸部の前方 4 節が癒合して頭胸甲を形成する。一方、胸部の後方 4 節と腹部 6 節は独立した節として観察される。尾節は一見体節のように見えるが、付属肢を備えることは無く、真の体節ではないと考えられている点に注意が必要である。

### 問 2 (配点10点)

節足動物の付属肢に関する理解力と観察力、および解剖技能を問う問題である。特に口のまわりの付属肢は小型で観察が難しいため、注意深い観察と解剖の正確さが求められる。

### 問 3 (配点10点)

付属肢の機能と形態の関係を問う問題である。節足動物は付属肢の形態を多様に変化させることで、捕食、歩行、遊泳などのための機能を獲得したことを考察する。

### 問 4 (配点10点)

相同性について、進化的連続性と発生学的共通性に基づいて理解していることを問う問題である。ザリガニやカニの鋏は胸部第 4 番目の付属肢であるのに対し、シャコの捕脚の鎌は胸部第 2 番目の付属肢であり、両者は相同ではないと考えられる。

### 問5 (配点15点)

問題中の解説文をもとに適切に白血球を同定するには、顕微鏡の操作および顕微鏡像の観察に習熟している必要がある。白血球のうち、リンパ球は見つけやすいが、好酸球や好中球、単球はやや見つけにくい。見つからない場合には、「みつからなかった」と解答するが、作成した塗抹標本も提出しているので、それが十分に観察した結果であるかどうかを確認できる。

### 問6 (配点20点)

観察結果に基づき、次の点をふまえて、論理的に解説できるかどうかを問う問題である。

1. 均一に塗抹された区画を算出に用いているか
2. 赤血球数の算定が妥当か
3. 均一に塗抹された区画が少ない場合、赤血球密度の違いを勘案した計数を行なっているか
4. 白血球が無い区画も算定に加味しているか
5. 白血球が見つからない場合、赤血球数を適正に計数し、白血球:赤血球比はこれよりも小さい旨記

載しているか

問7（配点10点）

尾ビレの血管中で、赤血球は転がるようにして流れていく。この顕微鏡像から立体的なイメージを持てるかどうかを問う問題である。「赤血球は中心がへこんだ円盤形である」という哺乳類の例を先入観として強くもっていると、見たままの形状を再現できないかもしれない。

問8（配点15点）

形態と機能との関連を問う問題である。哺乳類の赤血球は中心がへこんだ円盤形であるのに対し、魚類の赤血球は長円形で核を持ち、中心がへこんでいない。哺乳類の赤血球は核を失うことにより、相対的に多くのヘモグロビンを持つことができ、また中心がへこんでいるために表面積が大きくなり、酸素の取り込み効率が低い。

名札番号		名前	
------	--	----	--

## 実験試験（生化学）問題冊子

（平成 25 年 8 月 18 日 12 時 30 分～14 時 30 分，15 時 20 分～17 時 20 分）

1. 机には，問題冊子（13 ページ）および解答用紙（6 枚）が配付されている。
2. 説明が始まるまでは，問題冊子を開かずに，このページをよく読んでおくこと。
3. 解答開始の合図の後，すべての解答用紙に名札番号と名前を記入しなさい。また，このページにも名札番号と名前を記入すること。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自，適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は，挙手をする事。
5. 試験の途中で，気分が悪くなったり，用便のために外に出たりする場合は，挙手をする事。
6. 実験中は，必ず白衣を着用すること。また，実験用手袋，保護メガネについては必要に応じて着用し，試料等が眼，口，皮膚などに直接触れないよう注意すること。手袋等のサイズが合わないとき，また数が足りないときは，挙手をする事。
7. 問題冊子にメモを取ってもかまわない。3，13 ページは計算用紙として使ってもかまわない。試験終了後，問題冊子は持ち帰ること。
8. 机に置ける各自の持ち物は，第 1 日目に配付された保護メガネ，本日午前中の実験試験予備体験で配付された実験用手袋とマイクロピペット用チップラック 3 箱，および各自持参した筆記用具，時計，ハンカチ，ティッシュ，目薬である。その他のものはバッグにしまうこと。
9. 実験中にチューブ，チップがなくなった場合は，挙手をする事。

### 【実験に必要なもの】

この実験では、下に示した器具および試薬を使う。□に✓をつけながらすべて揃っているか確認し、足りないものがあったら挙手をする。

#### 実験 1 と実験 2 共通

<input type="checkbox"/> マイクロピペット 20	1 本
<input type="checkbox"/> マイクロピペット 200	1 本
<input type="checkbox"/> マイクロピペット 1000	1 本
<input type="checkbox"/> 油性ペン	1 本
<input type="checkbox"/> ストップウォッチ	1 個
<input type="checkbox"/> 電卓	1 個
<input type="checkbox"/> 定規	1 個
<input type="checkbox"/> セロテープ	1 個
<input type="checkbox"/> 廃チップ回収用プラスチック容器	1 個
<input type="checkbox"/> 保護メガネ	1 個
<input type="checkbox"/> 実験用手袋	1 個
<input type="checkbox"/> 1.5 mL 容チューブ (30 本入り)	1 袋
<input type="checkbox"/> 15 mL 容チューブ	1 本
<input type="checkbox"/> マイクロピペット 20 用フィルター付チップ	1 箱
<input type="checkbox"/> マイクロピペット 200 用フィルター付チップ	1 箱
<input type="checkbox"/> マイクロピペット 1000 用フィルター付チップ	1 箱
<input type="checkbox"/> 96 穴マイクロプレート	1 個
<input type="checkbox"/> 供試 BAP 溶液 (濃度未知) (1.5 mL 容チューブ)	1 本

#### 実験 1

<input type="checkbox"/> 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) (15 mL 容チューブ)	1 本
<input type="checkbox"/> 活性測定用溶液 (15 mL 容チューブ)	1 本
<input type="checkbox"/> 酵素反応停止液 (15 mL 容チューブ)	1 本
<input type="checkbox"/> 10 mM <i>p</i> -ニトロフェノール水溶液 (1.5 mL 容チューブ)	1 本

#### 実験 2

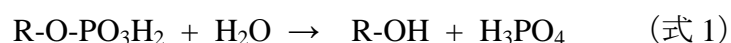
<input type="checkbox"/> タンパク質標準液 (100 µg/mL) (1.5 mL 容チューブ)	1 本
<input type="checkbox"/> タンパク質発色試薬 (15 mL 容チューブ)	1 本
<input type="checkbox"/> 脱塩水 (15 mL 容チューブ)	1 本

計算用紙

## 【はじめに】

タンパク質は、大部分の細胞で乾燥重量の 50%以上を占めていて、生命活動で重要な役割を担っている。その中で、もっとも重要なタイプのタンパク質が酵素である。酵素には、触媒として生物の代謝を調節し、細胞内で起こる化学反応の速度を選択的に高める役割がある。様々な酵素の性質を調べることで、生命の仕組みを明らかにすることができる。

アルカリ性フォスファターゼは、細菌から高等動物まで幅広く存在する酵素であり、リン酸エステルを加水分解して、アルコール（またはフェノール）と無機リン酸を生成させる（式 1）。このとき分解される化合物を基質と呼ぶ。（式 1）では、リン酸エステル（ $\text{R-O-PO}_3\text{H}_2$ ）がアルカリ性フォスファターゼの基質である。



本実験試験では、細菌由来のアルカリ性フォスファターゼ（Bacterial Alkaline Phosphatase; 以下 BAP と略す）の生化学的性質を調べる。各選手には濃度未知の BAP 溶液 1 mL が試料として与えられる（以下「供試 BAP 溶液」と呼ぶ）。それを用いて実験 1 と実験 2 を実施し、問 1～問 9 に答えなさい。また、実験 3 は仮想実験であるので、実験の概要をよく読んでから問 10 に答えなさい。

なお、実験がうまくいってないと判断できる場合、あるいは良いデータが得られなかった場合は、実験を最初からやり直しても良い。

## 実験 1 供試 BAP 溶液の酵素活性の測定

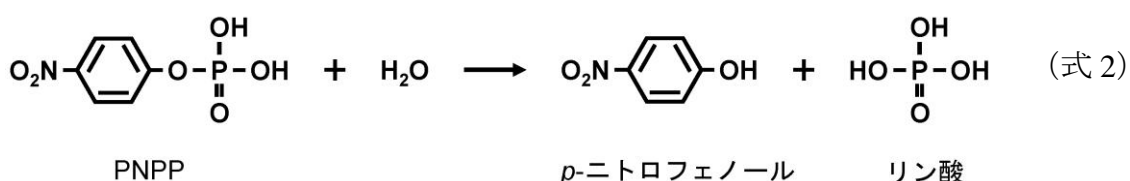
### 【実験の概要】

6～8 ページの【実験操作】に従って、供試 BAP 溶液の酵素活性を測定し、供試 BAP 溶液 1 mL 中に含まれる酵素活性量を算出する。実験操作に入る前に、下記の【BAP の活性測定法の原理】をよく読んで理解しておくこと。

### 【BAP の活性測定法の原理】

基質としてリン酸 *p*-ニトロフェニル (*p*-nitrophenyl phosphate; 以下 PNPP と略す) を用いると、酵素的加水分解によって *p*-ニトロフェノールが生成する (式 2)。*p*-ニトロフェノールはアルカリ性溶液中では黄色に呈色し、吸収スペクトルを測定すると 405 nm の波長の可視光をよく吸収することが分かっている。一方、基質の PNPP は無色透明で、405 nm の光を吸収しない。このことを利用すれば、酵素反応によって生成する *p*-ニトロフェノール量の経時変化を、405 nm での吸光度 (吸収の強さ) を測定することによって追跡できる。

一般に BAP の活性測定は、PNPP を基質として用い、1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中 25℃で酵素反応をおこなう。この反応条件下で、1 分間に 1 μmol (10<sup>-6</sup> mol) の *p*-ニトロフェノールを生成させる酵素活性量を 1 U (ユニット) と定義する。実際の活性測定および酵素活性量の算出は次のようにしておこなう。まず、PNPP を基質として酵素反応を開始し、一定時間後に反応を停止させて 405 nm での吸光度を測定する。吸光度と *p*-ニトロフェノールのモル濃度が比例関係にあることから、反応液に含まれる *p*-ニトロフェノール、すなわち酵素反応によって生成した *p*-ニトロフェノールのモル濃度を知ることができる。モル濃度と反応液の容積から反応液中の *p*-ニトロフェノールのモル数が求められ、さらに反応時間で割ることによって 1 分間の酵素反応によって生成した *p*-ニトロフェノールのモル数を算出できる。最後に、上記の定義に従って酵素活性量 (単位; U) を決定する。





## 【実験操作】

実験 1 では強アルカリ性の劇物である水酸化ナトリウム (NaOH) を含む溶液を扱うため、全ての実験操作で実験用手袋と保護メガネを必ず着用すること。

1) 以下の①～⑤に従って、供試 BAP 溶液およびブランク (BAP を含まない対照実験) の 2 つの試料について酵素反応をおこなう。

① 酵素反応には以下の試薬類を使用する。

- ・ 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
- ・ 供試 BAP 溶液 : BAP (濃度未知) を含む 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
- ・ 活性測定用溶液 : 2 mM PNPP を含む 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
- ・ 酵素反応停止液 : 10 M NaOH 水溶液 [劇物]

② 2 本の 1.5 mL 容チューブに、それぞれ BAP, ブランクと書く。各チューブに活性測定用溶液を 490  $\mu$ L 加える。これに供試 BAP 溶液または 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を 10  $\mu$ L 加え、素早くチューブのフタを閉めて 3, 4 回逆さまにして液を混ぜ (転倒混和), 反応を開始する (組成については表 1 を参照)。

[注意] BAP とブランクの反応は同時に開始する必要はない。一方が終わってからもう一方を開始してもよいし、何秒かずらして開始してもよい。

表 1 反応液の組成

チューブ	BAP	ブランク
活性測定用溶液	490	490
供試 BAP 溶液	10	0
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	0	10

(単位 :  $\mu$ L)

- ③ 室温 (25°C) で 3 分間静置する (酵素反応)。
- ④ 酵素反応停止液を 500  $\mu$ L 加え、素早く転倒混和する (反応停止)。
- ⑤ 次の操作 2) が終わるまで、④の反応液は室温で静置しておく。

2) 酵素の活性量の算出において、酵素反応によって生成した *p*-ニトロフェノールのモル数を知る必要がある。本実験では、濃度既知の *p*-ニトロフェノール標準液の吸光度を測定して、モル濃度－吸光度の標準直線を作成し、それを利用して酵素

反応液中の *p*-ニトロフェノールのモル濃度を求め、モル数を算出する。そのために、以下の①～⑤に従って、0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  の6種類のモル濃度の標準液を調製する。なお、1  $\mu\text{M}$  = 1  $\mu\text{mol/L}$  である。

① 標準液の調製には以下の試薬類を使用する。

- ・ 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)
- ・ 酵素反応停止液 [劇物]
- ・ 10 mM *p*-ニトロフェノール水溶液

② 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) と酵素反応停止液を 1:1 (容積比) で混合した溶液 (以下「希釈用溶液」と呼ぶ) を 15 mL 容チューブに 10 mL 調製する。

③ 6本の 1.5 mL 容チューブに、それぞれ 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 と書く (数字は *p*-ニトロフェノールのモル濃度を意味する)。「100」のチューブに 990  $\mu\text{L}$  の希釈用溶液を加え、これに 10 mM *p*-ニトロフェノール水溶液を 10  $\mu\text{L}$  加え、転倒混和する。これを 100  $\mu\text{M}$  標準液とする。

④ 以下の要領で、*p*-ニトロフェノールの希釈系列の溶液を調製する。「50」「25」「12.5」「6.25」の 1.5 mL 容チューブそれぞれに 500  $\mu\text{L}$  の希釈用溶液を加える。上記③で調製した 100  $\mu\text{M}$  標準液を 500  $\mu\text{L}$  取り、「50」のチューブに移し、よく転倒混和する。これを 50  $\mu\text{M}$  標準液とする。次に、50  $\mu\text{M}$  標準液 500  $\mu\text{L}$  を「25」のチューブに移して混和し、これを 25  $\mu\text{M}$  標準液とする。同様の操作を繰り返し、12.5, 6.25  $\mu\text{M}$  標準液も調製する。

⑤ 「0」の 1.5 mL 容チューブには、希釈用溶液のみを 500  $\mu\text{L}$  加え、これを 0  $\mu\text{M}$  標準液とする。

3) 次ページの表 2 に従って、操作 1) で調製した反応液および操作 2) で調製した *p*-ニトロフェノール標準液を各 200  $\mu\text{L}$  ずつ 96 穴マイクロプレートへ移す (1 つの溶液につき 2 穴ずつ)。マイクロプレートの右上の角に自分の名札番号を書いた後、挙手して試験補助者に測定の用意ができたことを知らせる。試験補助者がプレートリーダーで吸光度 (405 nm) を測定するので、その測定結果がプリントされた紙を受け取る。

表 2 溶液の配置 (96 穴マイクロプレートの一部)

BAP	BAP	ブランク	ブランク			操作 1) 【反応液】
0 $\mu\text{M}$	6.25 $\mu\text{M}$	12.5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	操作 2) 【標準液】
0 $\mu\text{M}$	6.25 $\mu\text{M}$	12.5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	

【注意】実験 1 で用いるプレートリーダーの測定条件では、真の吸光度よりも高い測定値を与えてしまう。そのため、吸光度を持たないはずの試料であっても、0 よりもわずかに高い測定値になる。各溶液の正確な吸光度を知るためには、高くなった分を差し引いてゼロ点補正をおこなう必要がある。ここでは、0  $\mu\text{M}$  *p*-ニトロフェノール標準液の真の吸光度が 0 になると考えて、各溶液の吸光度の測定値から 0  $\mu\text{M}$  *p*-ニトロフェノール標準液の吸光度の測定値を引いた値を「ゼロ点補正した吸光度」とする。以下の問では、全てゼロ点補正した吸光度を用いて考えること。

【問 1】 *p*-ニトロフェノール標準液の吸光度測定の結果を用いて、モル濃度－吸光度（ゼロ点補正した値）の標準直線を解答用紙のグラフ用紙に描きなさい。また、標準直線を一次関数の数式で表しなさい。横軸，縦軸にはそれぞれ何の数値をとったらよいか，また軸の名称はどのように付けるかを考えて描くこと。吸光度は無次元の値であるので，単位をつける必要はない。なお，本問で使用した吸光度測定結果のプリント紙は，解答用紙（1 ページ）に貼付して提出しなさい（セロテープを使用）。

【問 2】 実験操作 1) で調製したブランクの反応液の吸光度は，ゼロ点補正した後も正の値になる。その理由として考えられる可能性を述べなさい。

【問 3】 反応液の吸光度の値と問 1 で作成したモル濃度－吸光度の標準直線の式を用いて，実験操作 1) の酵素反応によって生成した *p*-ニトロフェノールのモル濃度（単位;  $\mu\text{M}$ ）を求めなさい（小数点第二位を四捨五入）。計算過程も書くこと。

【問 4】 供試 BAP 溶液（原液）1 mL 中に含まれる酵素活性量（単位; U）を計算しなさい（小数点第三位を四捨五入）。計算過程も書くこと。

## 実験 2 供試 BAP 溶液のタンパク質の定量と比活性の算出

### 【実験の概要】

9, 10 ページの【実験操作】に従って、供試 BAP 溶液のタンパク質濃度を測定し、得られた測定値から BAP の比活性を算出する。実験操作に入る前に、【酵素の比活性】、【タンパク質の比色定量の原理ーブラッドフォード法ー】をよく読んで理解すること。

### 【酵素の比活性】

酵素のタンパク質あるいは触媒としての性質を正しく理解するためには、その酵素の精製が必要である。この精製の度合いの指標として、「比活性」がしばしば用いられる。比活性とは、酵素が含まれる試料中のタンパク質 1 mg 当たりの酵素活性であり、これを求めるためには、試料中の酵素活性（実験 1 で算出済み）とタンパク質量を測定する必要がある。

### 【タンパク質の比色定量の原理ーブラッドフォード法ー】

クマシーブリリアントブルー G250 という色素は、タンパク質中の塩基性アミノ酸や芳香族アミノ酸の側鎖と結合した時、可視光の吸収のピークが 465 nm から 595 nm へシフトし、茶色から青色へ呈色する。このとき、タンパク質濃度と 595 nm の吸光度は比例関係にあるため、既知濃度のタンパク質標準液を用いて標準直線を作成することにより、溶液中のタンパク質濃度を決定することができる。これを利用したタンパク質定量法は、ブラッドフォード法と呼ばれる。また、本実験試験ではタンパク質標準液として、ウシ血清アルブミン溶液を使用する。

### 【実験操作】

- 1) 標準直線を作成するため、タンパク質標準液の希釈系列の溶液を調製する。5 本の 1.5 mL 容チューブに、これから調製するタンパク質溶液の濃度 0, 6.25, 12.5, 25, 50 を書き、それぞれに 0.5 mL の脱塩水を移す。次に、100  $\mu\text{g/mL}$  標準液の 0.5 mL を「50」のチューブに移し、転倒混和する。これを 50  $\mu\text{g/mL}$  標準液とする。同様に、50  $\mu\text{g/mL}$  標準液の 0.5 mL を「25」のチューブに移し、これを 25  $\mu\text{g/mL}$  標準液とする。同様の操作を繰り返し、12.5, 6.25  $\mu\text{g/mL}$  標準液も調製する（「0」のチ

ューブには、脱塩水のみが入っている)。

- 2) 7本の1.5 mL容チューブに、0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, およびBAPと書く。1)で調製した各標準液(0~100  $\mu\text{g/mL}$ )の50  $\mu\text{L}$ を、対応するラベルのチューブに移す。「BAP」のチューブには、50  $\mu\text{L}$ の供試BAP溶液を移す。続いて、これらすべてのチューブに、0.5 mLのタンパク質発色試薬を加える。転倒混和した後、3分間、室温で静置する。
- 3) 表3のように、2)の反応液の各200  $\mu\text{L}$ を96穴マイクロプレートへ移し(1つの反応液につき、2穴ずつ)、挙手によって速やかに試験補助者に知らせる。試験補助者がプレートリーダーで吸光度(595 nm)を測定するので、その測定結果がプリントされた紙を受け取る。

表3 反応液の配置(96穴マイクロプレートの一部)

0	6.25	12.5	25	50	100	BAP
0	6.25	12.5	25	50	100	BAP

【問5】標準液の測定結果を元に、解答用紙のグラフ用紙に標準直線を描きなさい。さらにその標準直線を一次関数の数式で表しなさい。横軸、縦軸にはそれぞれ何の数値をとったらよいか、また軸の名称はどのように付けるかを考えて解答用紙に記入しなさい。なお、本問で使用した吸光度測定結果のプリント紙は、解答用紙(3ページ)に貼付して提出しなさい(セロテープを使用)。

【問6】問5で作成した標準直線の式、供試BAP溶液の吸光度測定結果を用いて、供試BAP溶液中のタンパク質濃度を計算しなさい。タンパク質濃度の単位は $\mu\text{g/mL}$ とし、小数点第二位を四捨五入すること。計算過程も書くこと。

【問7】問4で求めた供試BAP溶液中の酵素活性量から、供試BAP溶液に含まれるBAPの比活性を計算しなさい。比活性の単位はU/mgとし、小数点第二位を四捨五入すること。計算過程も書くこと。

【問 8】BAP は、2 つの同一のタンパク質が結合したホモ二量体として機能している。それぞれのタンパク質は 450 個のアミノ酸で構成されており、アミノ酸組成は表 4 に示した通りである。また、表 4 には各アミノ酸の分子量も示してある。これらの情報から、BAP（二量体）の分子量を求めなさい（百の位を四捨五入すること）。計算過程も書くこと。[注意] 表 4 のアミノ酸分子量は遊離型のアミノ酸（図 1，R はアミノ酸の側鎖）としての分子量を示し、各元素の原子量を，H = 1，C = 12，N = 14，O = 16，S = 32 として計算した値である。

表 4 BAP のアミノ酸組成

アミノ酸	アミノ酸組成 (%)	アミノ酸分子量
アラニン	14.4	89
アルギニン	3.1	174
アスパラギン	4.4	132
アスパラギン酸	6.4	133
システイン	0.9	121
グルタミン	5.1	146
グルタミン酸	4.9	147
グリシン	10.0	75
ヒスチジン	2.2	155
イソロイシン	3.6	131
ロイシン	8.4	131
リシン	6.4	146
メチオニン	1.8	149
フェニルアラニン	1.8	165
プロリン	4.7	115
セリン	4.9	105
トレオニン	8.7	119
トリプトファン	0.7	204
チロシン	2.4	181
バリン	5.1	117

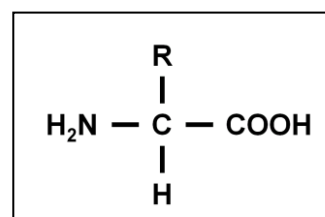


図 1 遊離型のアミノ酸

【問 9】 これまでの解答結果を用いて、BAP（二量体）1 個が 1 秒間に生成する *p*-ニトロフェノールの分子数を計算しなさい。小数点第一位を四捨五入すること。なお、供試 BAP 溶液は純品であるので、BAP 以外の夾雑タンパク質は含まれていないものとして答えること。計算過程も書くこと。

### 実験 3（仮想）カルボキシペプチダーゼ Y による BAP の一次構造の推定

#### 【実験の概要】

カルボキシペプチダーゼ Y (Carboxypeptidase Y; 以下 CPY と略す) は、タンパク質の加水分解を触媒する酵素である。CPY はタンパク質中のカルボキシ末端のアミノ酸を一つずつ切断する。切断されたアミノ酸はタンパク質本体から遊離する。タンパク質から本来のカルボキシ末端のアミノ酸が遊離した残りのタンパク質には、新たなカルボキシ末端が生じる。新たなカルボキシ末端のアミノ酸は、本来のカルボキシ末端のひとつ前のアミノ酸ということになる。こうして新たにカルボキシ末端となったアミノ酸は、さらに CPY の作用を受けて最初のアミノ酸に遅れてタンパク質本体から遊離する。CPY の働きによって遊離したアミノ酸の種類と量の時間変化を追うことで、タンパク質のカルボキシ末端付近のアミノ酸の配列順序を知ることができる。

【問 10】 図 2 は、 $1 \times 10^{-9}$  mol の BAP を CPY で分解し始めてから遊離するアミノ酸の種類と量の経時変化を示している。図 2 の実験結果から、BAP の本来のカルボキシ末端のアミノ酸を含めて 4 個のアミノ酸の配列順序を推定できる。推定した配列順序を本来のカルボキシ末端のアミノ酸が一番右側になるようにして答えなさい。

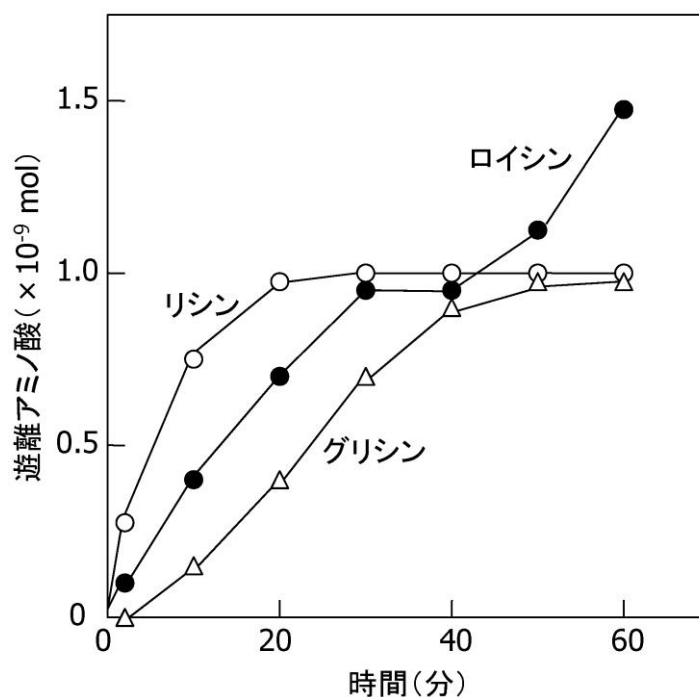


図 2 遊離アミノ酸の経時変化

計算用紙



2013年8月18日

# 実験試験(生化学)解答例

生物学オリンピック本選

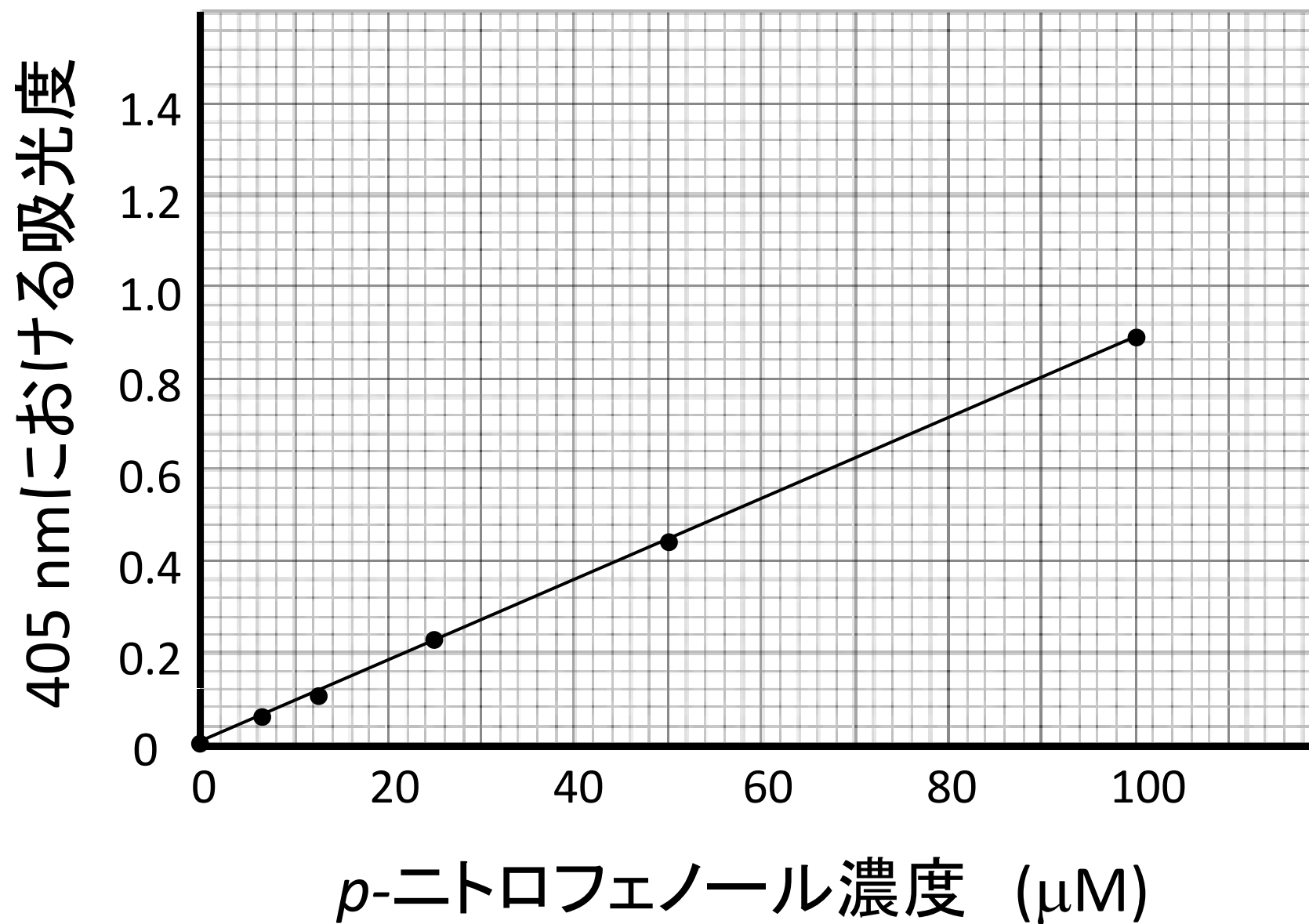
# 問1

モル濃度 ( $\mu\text{M}$ )	吸光度(実測値)		平均値	ゼロ点補正 した値(注)
0	0.044	0.045	0.0445	0
6.25	0.102	0.104	0.1030	0.0585
12.5	0.160	0.162	0.1610	0.1165
25	0.274	0.278	0.2760	0.2315
50	0.486	0.492	0.4890	0.4445
100	0.933	0.936	0.9345	0.8900

(注)  $0\ \mu\text{M}$ 標準液の吸光度を0としてゼロ点補正した値

(ゼロ点補正した値) = (各試料の吸光度の平均値) - ( $0\ \mu\text{M}$ 標準液の吸光度の平均値)

# 問1



# 問1

(解答例)

吸光度と*p*-ニトロフェノールのモル濃度が比例関係にあることを利用して、各濃度における吸光度のデータから比例係数を計算する。

(比例係数) = (ゼロ点補正した吸光度) ÷ (モル濃度)

モル濃度 (μM)	ゼロ点補正 した 吸光度	比例係数
6.25	0.0585	0.00936
12.5	0.1165	0.00932
25	0.2315	0.00926
50	0.4445	0.00889
100	0.8900	0.00890

各濃度における比例係数の平均値を計算すると

(比例係数の平均値) =  $0.009146 \div 0.00915$

$$[\text{吸光度}] = 0.00915 \times [\text{モル濃度}(\mu\text{M})]$$

【参考】 最小二乗法で計算した一次式

$$[\text{吸光度}] = 0.0089 \times [\text{モル濃度}(\mu\text{M})] + 0.0039 \quad (R^2 = 0.9999)$$

## 問2

試料	吸光度(実測値)		平均値	ゼロ点補正した値(注)
0 $\mu$ M標準液	0.044	0.045	0.0445	0
ブランク	0.080	0.078	0.079	0.0345

(ゼロ点補正した値) = (各試料の吸光度の平均値) - (0  $\mu$ M標準液の吸光度の平均値)

(解答例)

基質に用いたリン酸

-

ニトロフェニル(PNPP) が、BAPが存在しない場合でも、少ないながら非酵素的に加水分解されるという可能性が考えられる。

【参考】

酵素反応停止液(10 M NaOH水溶液)を加えた後、溶液は強アルカリ性になる。  
PNPPのリン酸エステル結合は、アルカリ条件下で少しずつ加水分解されるため、  
ブランクの試料でも

-

ニトロフェノールが少量ながら生成してしまう。

# 問3

試料	吸光度(実測値)		平均値	ゼロ点補正した値(注)
0 μM標準液	0.044	0.045	0.0445	0
BAP	0.655	0.647	0.651	0.6065
ブランク	0.080	0.078	0.079	0.0345

(ゼロ点補正した値) = (各試料の吸光度の平均値) - (0 μM標準液の吸光度の平均値)

(解答例)

問2で考察した通り、非酵素的な分解によって生成した*p*-ニトロフェノールは、「BAP」の反応液中にも含まれていると考えられる。  
したがって、BAPによって生成した*p*-ニトロフェノールの量を求めるには、「BAP」の反応液の吸光度から「ブランク」の反応液の吸光度を差し引く必要がある。

$$(\text{BAPによって生成した}p\text{-ニトロフェノールの吸光度}) = 0.6065 - 0.0345 = 0.5720$$

問1より、 $[\text{吸光度}] = 0.00915 \times [\text{モル濃度}(\mu\text{M})]$   
よって、 $[\text{モル濃度}(\mu\text{M})] = [\text{吸光度}] \div 0.00915 = 62.51 \div 62.5$

答 62.5 μM

# 問4

(解答例)

問3より、BAPによって生成した*p*-ニトロフェノールの反応液中の濃度は62.5 μMである。

反応液の容積が1 mLであるので、

BAPによって生成した*p*-ニトロフェノールのモル数は、

$$62.5 \mu\text{M} \times 1 \text{ mL} = 62.5 \mu\text{mol/L} \times 0.001 \text{ L} = 0.0625 \mu\text{mol}$$

反応時間は3分間であったので、1分あたりに生成した*p*-ニトロフェノールのモル数は、

$$0.0625 \mu\text{mol} \div 3 = 0.02083 \mu\text{mol}$$

1分間に1 μmol の*p*-ニトロフェノールを生成させる酵素活性量を1 Uと定義するので、「BAP」の反応液中に存在した酵素活性量は 0.02083 Uである。

ところで、「BAP」の反応液には、供試BAP溶液 10 μL が含まれている。

一方、問題では、供試BAP溶液 1 mL 中に含まれる酵素活性量が問われている。

1 mL = 1000 μL であるので、1 mL 中に含まれる酵素活性量を求めるためには、

10 μL の酵素活性量を100倍しなければならない。

よって、

$$(\text{供試BAP溶液 1 mL 中に含まれる酵素活性量}) = 0.020833 \text{ U} \times 100 = 2.083 \text{ U} \doteq 2.08 \text{ U}$$

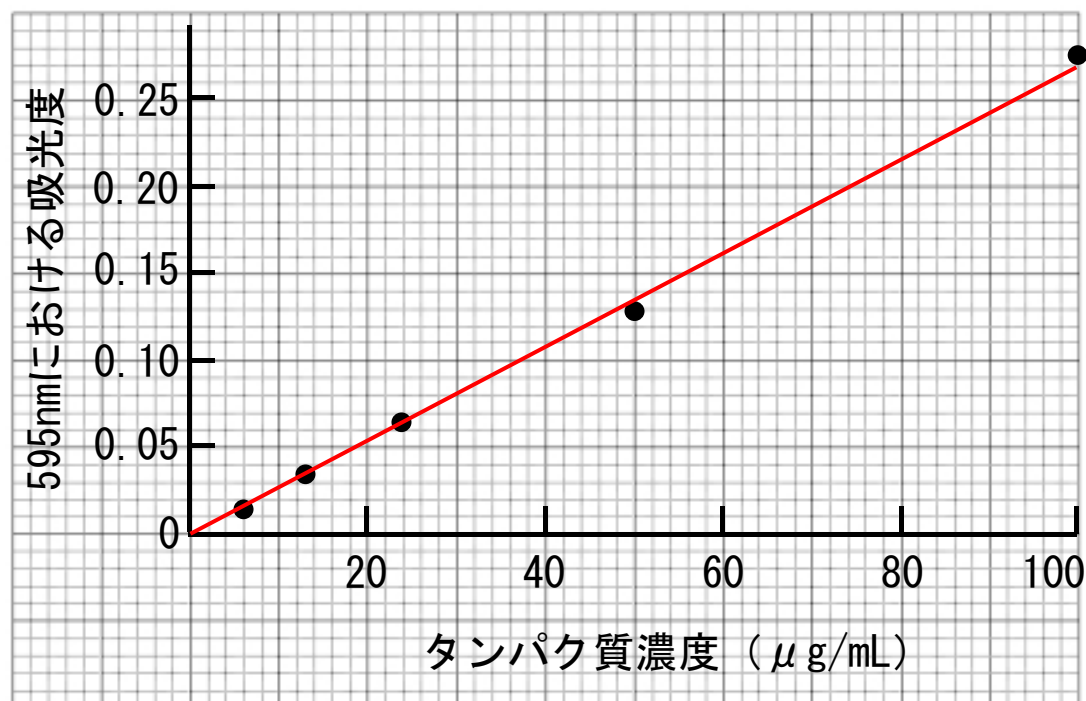
答 2.08 U

# 問5

標準液の吸光度測定結果

	吸光度①	吸光度②	吸光度(平均)	差引いた値 ゼロ点を
0	0.305	0.311	0.308	
6.25	0.322	0.320	0.321	0.013
12.5	0.341	0.345	0.343	0.035
25	0.375	0.371	0.373	0.065
50	0.441	0.432	0.4365	0.1285
100	0.583	0.579	0.581	0.273

タンパク質濃度と吸光度（ゼロ点を差し引いた値）をプロットし、標準直線（一次の近似直線）を描く



Y : 吸光度、X : タンパク質濃度 のとき、標準直線の一次関数の式は、次のようになる。

$$Y = 0.0027 X$$



# 問6

供試BAP溶液の吸光度測定結果

	吸光度 ①	吸光度 ②	吸光度 (平均値)	ゼロ点を 差引いた値
0	0.378	0.380	0.379	0.071・・・①

標準直線の一次関数の式（問5より）

$$Y = 0.0027 X \quad \dots \textcircled{2}$$

(Y : 吸光度、X : タンパク質濃度)

①を②式に代入し、計算する。

$$0.071 = 0.00273 X$$

$$X = 26.29\dots$$

小数点第二位を四捨五入すると、26.3となる。

よって、供試BAP溶液中のタンパク質濃度は、 $26.3 \mu\text{g/mL}$ となる。

**答  $26.3 \mu\text{g/mL}$**

## 問7

供試BAP溶液 1 mL中の酵素活性量（問4より）	2.03U
試BAP溶液のタンパク質濃度（問6より）	26.3 $\mu\text{g/mL}$

(26.3  $\mu\text{g}$  = 0.0263 mg)

この2つの数値から、比活性（タンパク質 1 mg当たりの酵素活性量）を計算する。

$$\begin{aligned}\text{比活性} &= 2.03 \text{ (U)} \div 0.0263 \text{ (mg)} \\ &= 77.18\end{aligned}$$

小数点第二位を四捨五入すると、77.2となる

よって、供試BAP溶液中のBAPの比活性は、77.2 U/mgとなる。

**答 77.2 U/mg**

# 問8

アミノ酸	アミノ酸組成 (%)	アミノ酸分子量	個数	分子量
アラニン	14.4	89	65	5785
アルギニン	3.1	174	14	2436
アスパラギン	4.4	132	20	2640
アスパラギン酸	6.4	133	29	3857
システイン	0.9	121	4	484
グルタミン	5.1	146	23	3358
グルタミン酸	4.9	147	22	3234
グリシン	10.0	75	45	3375
ヒスチジン	2.2	155	10	1550
イソロイシン	3.6	131	16	2096
ロイシン	8.4	131	38	4978
リシン	6.4	146	29	4234
メチオニン	1.8	149	8	1192
フェニルアラニン	1.8	165	8	1320
プロリン	4.7	115	21	2415
セリン	4.9	105	22	2310
トレオニン	8.7	119	39	4641
トリプトファン	0.7	204	3	612
チロシン	2.4	181	11	1991
バリン	5.1	117	23	2691

合計 55199

$$55199 - 18 \times 449 = 47117$$

$$47117 \times 2 = 94234$$

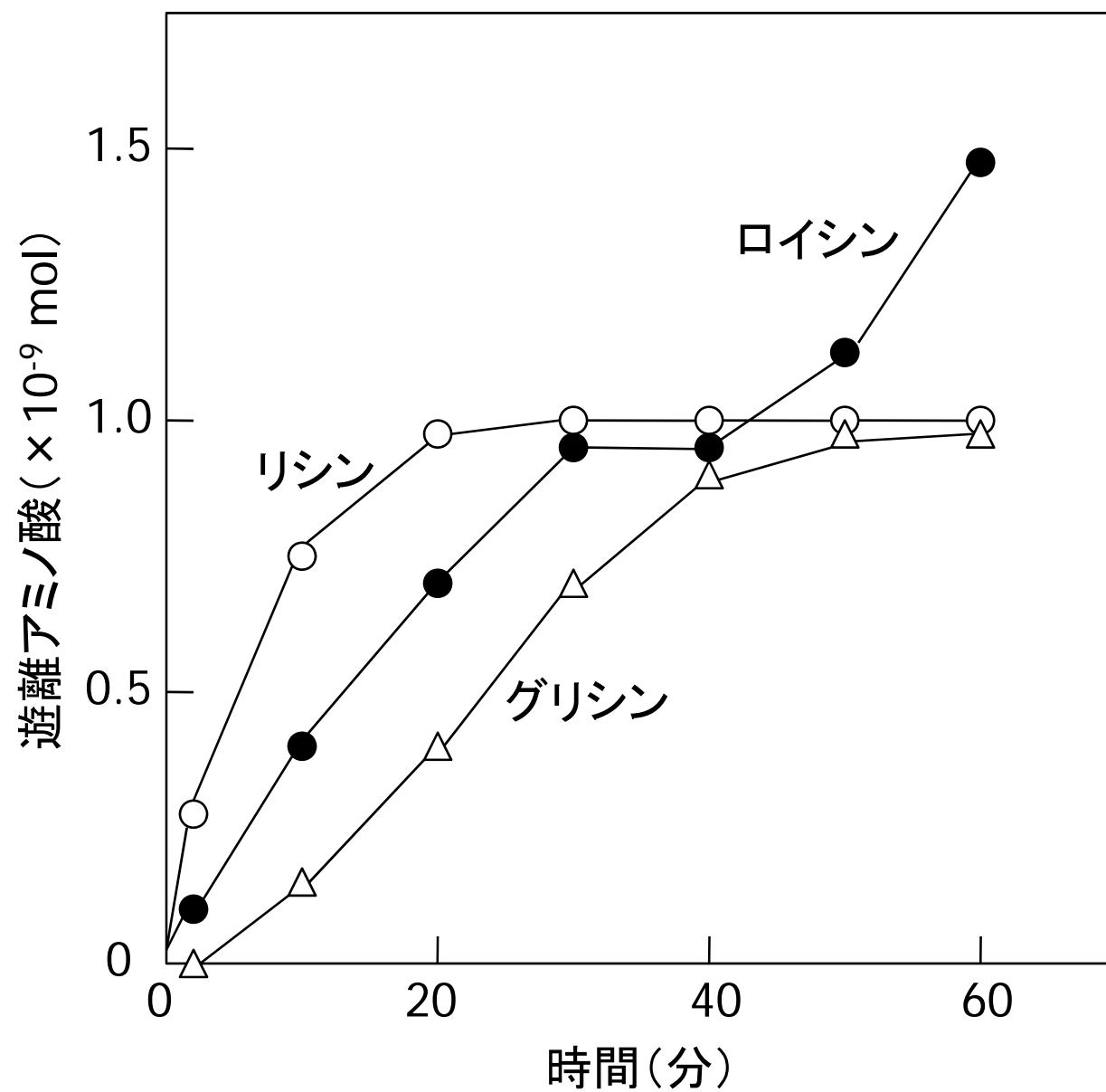
答 94000

## 問9

問7よりBAP比活性は	77.2 U/mg $U = \mu\text{mol}/\text{min}$
すなわち比活性は	1.287 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{mg}$
問8よりBAP分子量は	94000 1 mg は 0.0106 $\mu\text{mol}$
BAP1分子が1秒当たりに生成する <i>p</i> -ニトロフェノールの分子数は	$1.287 \div 0.0106 = 121.4$

答 121 個

## 問10



答 ロイシン・グリシン・ロイシン・リシン

生化学の問題の配点は 問 1 から問 1 0 まで それぞれ 1 0 点でした。

名札番号		名前	
------	--	----	--

## 実験試験（植物）問題冊子

（平成 25 年 8 月 18 日 12 時 30 分～14 時 30 分，15 時 20 分～17 時 20 分）

1. 机には，問題冊子（10 ページ）および解答用紙（4 枚）が配付されている。
2. 説明が始まるまでは，問題冊子を開かずに，このページをよく読んでおくこと。
3. 解答開始の合図の後，すべての解答用紙に名札番号と名前を記入しなさい。また，このページにも名札番号と名前を記入すること。
4. 椅子の高さはレバーで調整できる。各自，適切な位置に調整しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は，挙手をすること。
5. 試験の途中で，気分が悪くなったり，用便のために外に出たりする場合は，挙手をすること。
6. 実験中は，必ず白衣を着用すること。また，実験用手袋，あるいは保護メガネが必要な人は挙手をすること。
7. この実験試験は大問 2 問からなっており，どちらから開始しても構わない。一つの大問の解答に要する時間はおよそ 50 分程度である。
8. 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。
9. 実験机の上の文具や実験道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。実験終了後はなるべく元の位置に戻しておくこと。

### 【実験に必要なもの】

この実験では、下に示した材料と器具を使用する。□に✓を入れながら、すべてそろっているかを確認すること。足りないものがあったら挙手をする。また、マイクロピペット用フィルター付チップの残数が10本以下の場合も挙手をする。

#### 実験1 イネの観察

<input type="checkbox"/> イネの穂（花序）	1本
<input type="checkbox"/> イネのもみ	10個
<input type="checkbox"/> プラスチックシャーレ	2枚
<input type="checkbox"/> ゴムマット	1枚
<input type="checkbox"/> 柄付針	1本
<input type="checkbox"/> メス	1本
<input type="checkbox"/> ピンセット	2本
<input type="checkbox"/> 鉛筆	3本
<input type="checkbox"/> 消しゴム	1個
<input type="checkbox"/> 実体顕微鏡	1台
<input type="checkbox"/> 実験用ティッシュ（キムワイプ）	1箱
<input type="checkbox"/> ペーパータオル	1袋

#### 実験2 植物性多糖類の分析

<input type="checkbox"/> 試料粉末（A, B, C）（15 mL 容チューブ）	各2本
<input type="checkbox"/> 試料粉末（A, B, C）（1.5 mL 容チューブ）	各1本
<input type="checkbox"/> グルカナーゼ I 溶液, グルカナーゼ II 溶液	各1本
<input type="checkbox"/> 糖検出試薬	1本
<input type="checkbox"/> ヨウ素ヨウ化カリウム溶液	1本
<input type="checkbox"/> 蒸留水	1本
<input type="checkbox"/> スポイト付コマゴメピペット	2本
<input type="checkbox"/> 1.5 mL 容チューブ	6本
<input type="checkbox"/> チューブ用キャップロック	6個
<input type="checkbox"/> フロート	1個
<input type="checkbox"/> 油性ペン	1本
<input type="checkbox"/> 実験サンプル提出用小箱	1個
<input type="checkbox"/> ストップウォッチ	1個



- |  |     |
|--|-----|
| <input type="checkbox"/> マイクロピペット 1000   | 1 本 |
| <input type="checkbox"/> マイクロピペット 20     | 1 本 |
| <input type="checkbox"/> 廃液回収用プラスチック容器   | 1 個 |
| <input type="checkbox"/> 廃チップ回収用プラスチック容器 | 1 個 |

## 実体顕微鏡使用マニュアル（図 1 を参照）

1. 実体顕微鏡下で解剖するときは、ステージに直接試料を置かずに、プラスチックシャーレまたはゴムマットを敷いて、その上で解剖すること。
2. 背筋を伸ばして観察できるようにイスの高さを調整すること。
3. 接眼レンズの眼幅、視度調整をすること。眼鏡をかけて検鏡するときは、アイシェードのゴムを折り返して短くすること。
4. 観察のときは、落射照明（左側の調整つまみ）を必要に応じて使用すること。落射照明は角度を調整して、試料に光が十分当たるようにすること。
5. ズームハンドルを回して、適当な大きさに拡大して観察すること。

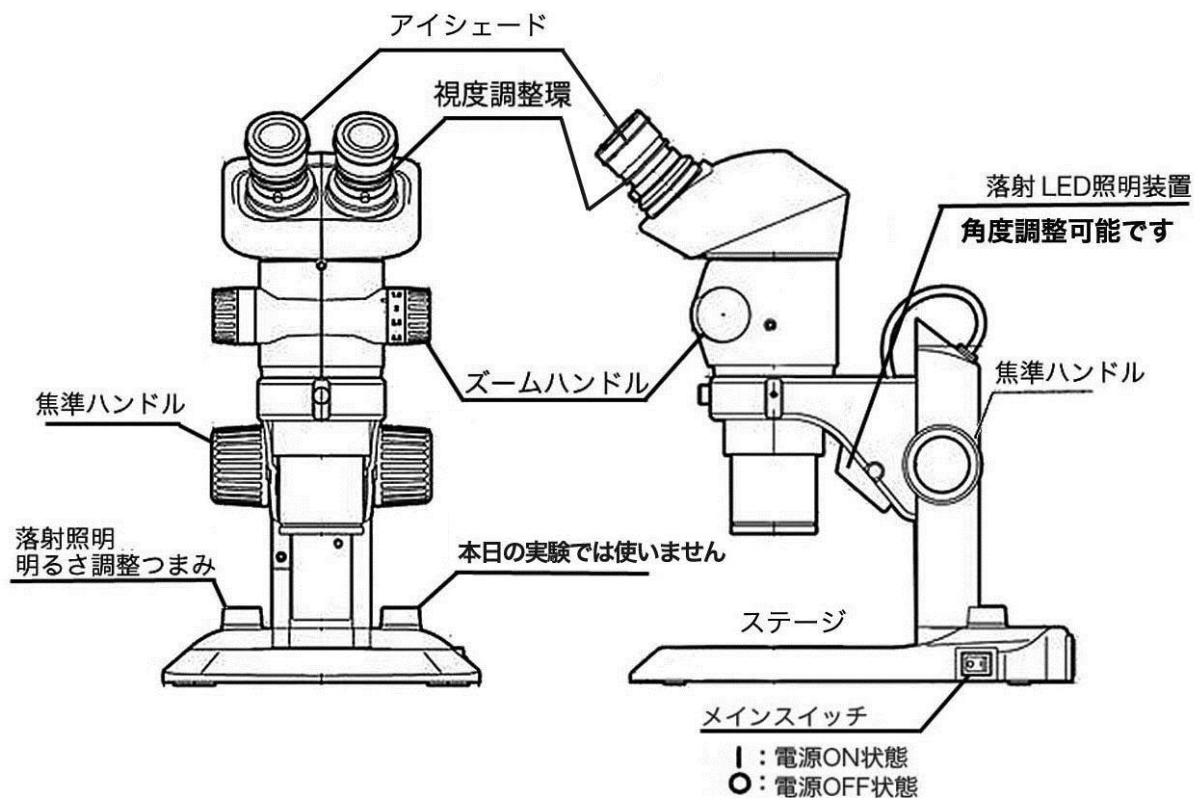


図 1. 実体顕微鏡各部の名称

## 実験1 イネの観察

### 【はじめに】

イネ科は約1万種からなる大きな分類群で、イネ、コムギ、トウモロコシなどの主要な穀物となるほか、家畜の飼料や芝生、砂糖の原料（サトウキビ）など様々な用途に利用されている。イネ科植物は、ほかの単子葉類と同様に、花の構造は3数性（おしべや花被が3の倍数になる）であるが、多様に分化する過程で花の様々な部分が退化して痕跡的になったり、消失している場合がある。

下の図2は、イネ科の基本的な花のつくりを示している。イネ科では、いくつかのしょうか小花が集まって小穂しょうすいをつくっている。小穂の最も外側に第1苞穎ほうえいがあり、その内側に第2苞穎がある。第1苞穎と第2苞穎に包まれるようにして、いくつかの小花がある。一つの小花は外側から順に外花穎かえい、内花穎りんび、鱗皮、おしべ、めしべからなっている。

この実験ではイネの花を詳しく観察し、イネ科の花の形態進化を考察する。

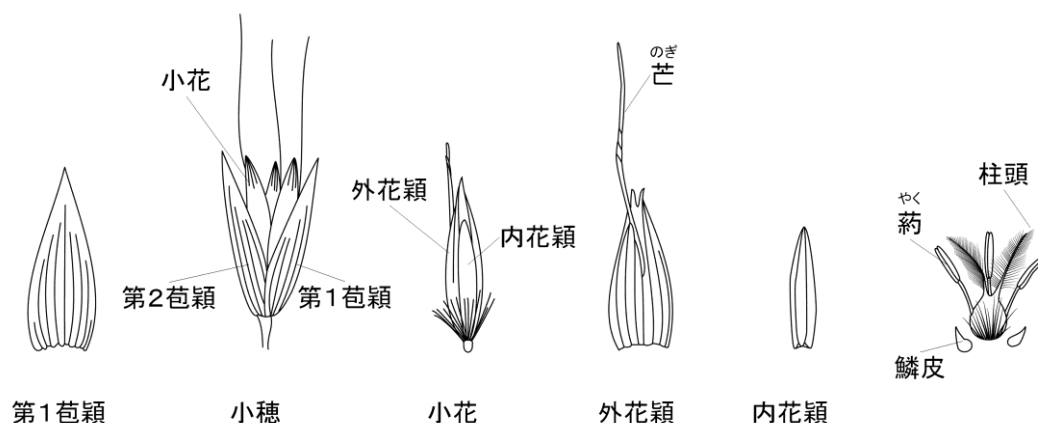


図2. カラスムギの小穂と小花の全形図，および小花解剖図

【問1】 上の図2はカラスムギの花を示しているが、この実験ではイネの花を観察する。図2にならって、イネの①小穂の全形図，②小花の全形図，③小花の解剖図を解答用紙に描きなさい。また、上の【はじめに】の文章と図2を参考にして、各部の名称を記しなさい。そして、小穂と小花の観察結果を解答欄に文章で記述しなさい。

小穂や小花は、実体顕微鏡下でズーム機能を使って詳しく観察しなさい。実体顕微鏡の使用方法是マニュアル（4ページ）を参考にしなさい。小穂や小花を解剖する際には、ゴムマットあるいはプラスチックシャーレの上に小穂や小花を置き、ピンセット、メス、柄付針を使って、小穂の葉的器官を1枚ずつ慎重に取り外すようにしなさい。

【問2】 単子葉類のグラジオラス（アヤメ科）の花序と花のつくりは、右の図3のようになっている。単子葉類の形態進化から考えて、グラジオラスの苞、小苞、花被は、それぞれ図2のカスミギのどの部分に相当するか答えなさい。

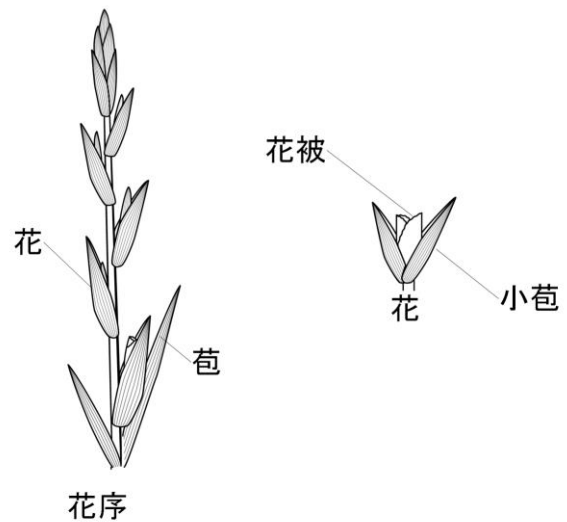


図3. グラジオラスの花序と花のつくり

【問3】 下の図4はコオニユリの花と花式図を示している。この花式図にならって、イネの花式図を解答欄に描きなさい。ただし、子房の内部構造までは描かなくてもよい。花式図には、【問1】で答えた各部の名称を記すこと。

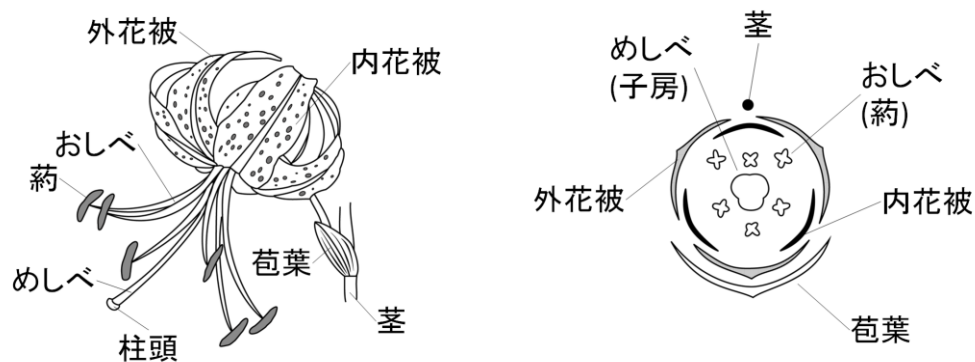


図4. コオニユリの花と花式図

【問4】 もみはイネの小花が受粉・受精の後に成熟してできたものである。もみの殻の中には、玄米と呼ばれる米粒が入っている。玄米はイネの種子か。それとも果実か。解答欄の指示にしたがって適当な語句を○で囲みなさい。また、そのように判断した理由を解答欄に文章で記述しなさい。

## 実験 2 植物性多糖類の分析

### 【はじめに】

デンプンは細胞のエネルギー源であるグルコース（ブドウ糖）からなる多糖類であり、エネルギー貯蔵物質として機能している。デンプンは直鎖状構造を持つアミロースと分枝構造を持つアミロペクチンから構成されており、米では胚乳細胞内に多く含まれている。米の種類には、デンプンがほぼすべてアミロペクチンで構成されているもち米や 20～30% のアミロースを含むうるち米がある。一方、植物細胞壁の繊維成分であるセルロースもグルコースからなる多糖類であるが、グルコースの構造や結合様式がデンプンと異なっている。

### 【多糖類の定性分析】

デンプンやセルロースなどの多糖類は、グルカナーゼによって加水分解することができる。グルカナーゼには、多糖類中の  $\alpha$  グルコースの 1→4 結合を切断するもの（グルカナーゼ I）や  $\beta$  グルコースの 1→4 結合を加水分解するグルカナーゼ（グルカナーゼ II）などがある。この実験では配付された試料にどのような多糖類が含まれているのかを実験結果より推察する。多糖類をグルカナーゼで加水分解した後、得られた還元糖（グルコースやマルトースなどの、塩基性溶液中でアルデヒド基を形成する糖のこと）を糖検出試薬と反応させ、生成する赤色沈殿を確認する。

また多糖類をヨウ素デンプン反応によって呈色させる。ヨウ素デンプン反応とは、デンプン中のグルコース直鎖部分が形成するらせん構造の中にヨウ素が取り込まれることによって呈色を示す反応であり、グルコース直鎖部分が形成するらせん長が長い場合には青色を呈し、らせん長が短くなるにつれて青紫色、赤紫色、赤褐色を呈する。一方、らせん長が極めて短い場合やない場合には無色を呈する。多糖類の加水分解と呈色の反応結果をもとにデンプンとセルロースの性質について考察する。

## 操作1 デンプンとセルロースの加水分解

- 1) 15 mL 容チューブに入った3種類の試料粉末 A, B, C はそれぞれ2本ずつ、計6本、配付されている。まず、試料粉末 A が入った1本の15 mL 容チューブにグルカナーゼ I 溶液を10 mL 加え、よく<sup>かくはん</sup>攪拌する（試料粉末は完全には溶解しないので、チューブを激しく振って懸濁させる）。次いで、試料粉末 B と試料粉末 C が入った15 mL 容チューブそれぞれにもグルカナーゼ I 溶液を10 mL 加え、よく攪拌する。1本ずつ残った試料粉末 A, B, C の各15 mL 容チューブには、グルカナーゼ II 溶液をそれぞれ10 mL ずつ加え、よく攪拌する。なお、グルカナーゼ溶液10 mL はコマゴメピペットを用いて計量し（計量はコマゴメピペットの目盛りを参考にする）、試料粉末に加える。
- 2) 全ての試料粉末にグルカナーゼ溶液を加え、15 秒間しっかりと懸濁した後、室温で5 分間静置する。
- 3) マイクロピペット1000 を用い、上清500  $\mu$ L を新たな1.5 mL 容チューブに回収する。この時、なるべく沈殿物や浮遊物を吸い込まないように注意すること。どのチューブがどの試料粉末とグルカナーゼ溶液の組み合わせなのかを示すために、以下の例にならってチューブのふたに油性ペンで明瞭にサンプル名を記すこと。また、名札番号についても記入すること（図5）。

（例）試料粉末 A とグルカナーゼ I の組み合わせの場合 → A-I

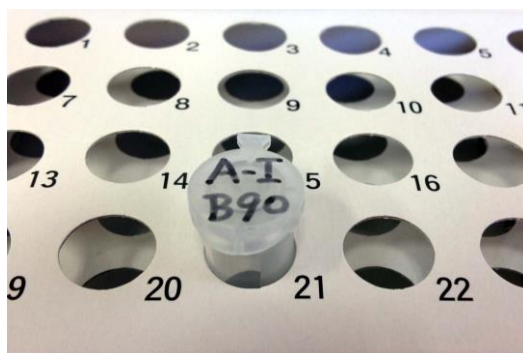


図5. 名札番号がB90の選手のA-Iサンプルの表記例

- 4) 1.5 mL 容チューブに回収した上清 500  $\mu$ L に糖検出試薬 500  $\mu$ L を加え, 1.5 mL 容チューブを数回逆さまに反転させることで内容物をよく混合する (以降, この操作を転倒混和と呼ぶ)。その液を 5 分間, 湯煎した後、遠心分離 (2,000 g, 室温, 10 秒間) を行う。湯煎と遠心分離は試験補助者が行うため, それぞれの 1.5 mL 容チューブにキャップロックを取り付け, フロートに差し込んだ後 (図 6 を参照), 準備ができたことを挙手により知らせること (湯煎と遠心分離の待ち時間中に次の操作 2 に取り組むこと)。

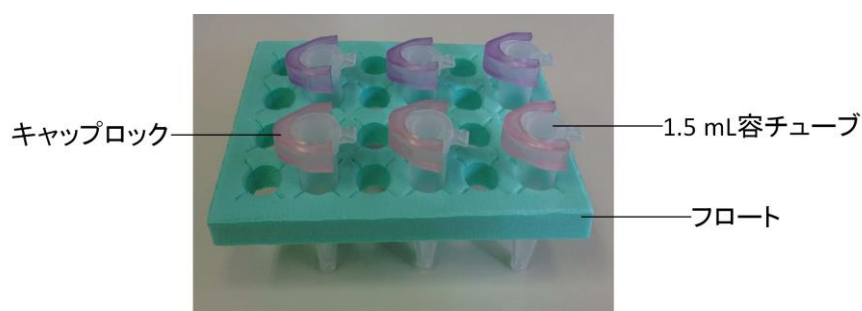


図 6. キャップロックとフロートの使用方法

- 5) 5 分間の湯煎と遠心分離が終わった 1.5 mL 容チューブを受け取った後, 各サンプルについて赤色沈殿を目視にて確認する。

【問 5】 グルカナーゼ I や II と反応させてどの試料粉末が加水分解されたかを, グルカナーゼごとにそれぞれ答えなさい。また糖検出を行った各 1.5 mL 容チューブは実験サンプル提出用小箱に入れて提出すること。

## 操作 2 ヨウ素デンプン反応

- 1) 配付された試料粉末 A, B, C が入った 1.5 mL 容チューブそれぞれに蒸留水を 1 mL 加え, さらにヨウ素ヨウ化カリウム溶液 20  $\mu$ L を加えて転倒混和する。
- 2) 1.5 mL 容チューブは 1 分間程度チューブ立てに静置し, 呈色反応をよく観察する。

【問 6】 配付された 3 種類の試料粉末 A, B, C はヨウ素デンプン反応でそれぞれどのような色を呈したか、答えなさい。なお、ヨウ素デンプン反応を行った各 1.5 mL 容チューブは実験サンプル提出用小箱に入れて提出すること。

【問 7】 配付された試料粉末 A, B, C は、うるち米、もち米およびセルロースのいずれかである。では、試料粉末 A, B, C は上記のいずれであるか、そのように考えた根拠を、加水分解反応（操作 1）とヨウ素デンプン反応（操作 2）の結果を含めて簡潔に答えなさい。

【問 8】 グルコースを主体としたエネルギー貯蔵物質は、動物細胞にもグリコーゲンとして存在する。グリコーゲンの構造はデンプンよりもさらにグルコース鎖の分枝構造が多いと考えられている。このグリコーゲンを使ってヨウ素デンプン反応を行ったときにはどのような呈色を示すのか、その理由とともに答えなさい。

【問 9】 植物細胞内のグルコースは主に  $\alpha$  グルコースあるいは  $\beta$  グルコースとして存在している（図 7）。グルコース分子を 5 分子使用してアミロースとセルロースの構造を描きなさい。

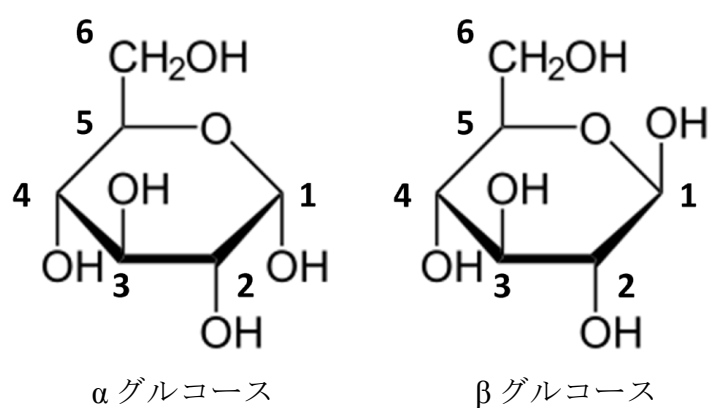


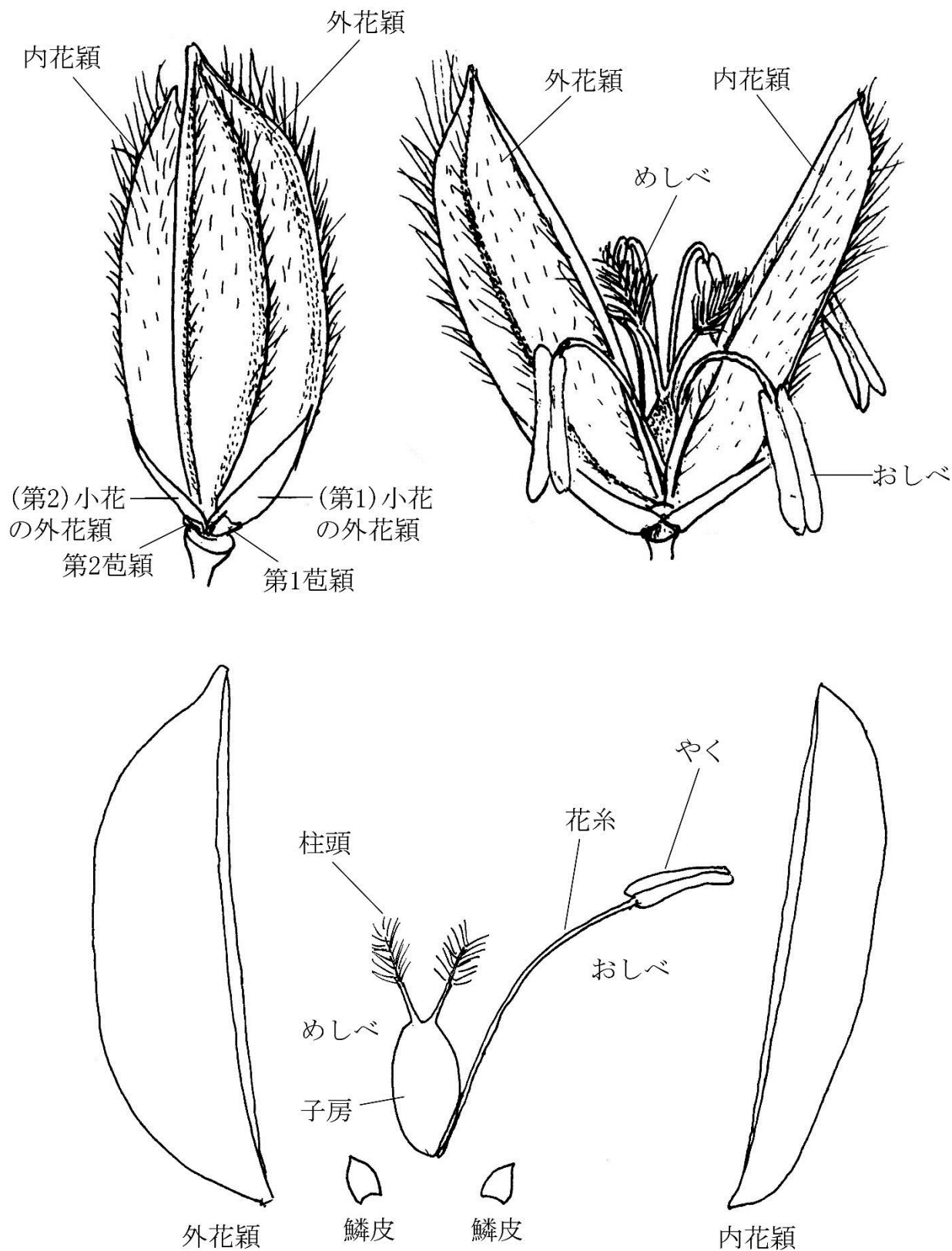
図 7. グルコースの構造



問 1 （スケッチ）

（10 点）

第 1 苞穎，第 2 苞穎のミス -3 点  
その他の名称のミス 1 か所につき -1 点  
明らかな描画のミス 1 か所につき -1 点



名札番号		名前	
------	--	----	--

問 1 (5 点)	<p>(小穂と小花の観察結果)</p> <p>記述のポイント (各 1 点)</p> <p>① 苞穎と 2 つの小花が痕跡的であること</p> <p>② 第 1 花穎, 第 2 花穎は左右から扁平で背部は竜骨状になること</p> <p>③ 鱗皮は柔らかく白色透明で 2 枚であること</p> <p>④ おしべの花糸は透明で柔らかく 6 本であること</p> <p>⑤ めしべの子房は緑色で先端に 2 本の羽毛状の柱頭があること</p> <div>その他の記述については, 内容の正確さを判断し, 適宜追加点を与える.</div>		
問 2 (6 点)	苞 第 1 苞穎 (または第 2 苞穎)	小苞 外花穎 (または内花穎)	花被 鱗皮
問 3 (10 点)	<p>(花式図)</p> <div>各部位の位置関係を正しく示した図で あれば+7 点 各部の名称が正しく記入されていれば +3 点  図のミス 1 か所につき -1 点 名称のミス 1 か所につき -1 点</div> <div><p>内花穎</p><p>やく</p><p>柱頭</p><p>外花穎</p><p>子房</p><p>鱗皮</p></div>		
問 4 (9 点)	<p>(語句の選択) 種子または果実のうち, 適当な語句を○で囲む</p> <p>玄米はイネの ( 種子 <u>果実</u> ) である。 4 点</p> <p>(理由)</p> <p>花から粳となる過程で鱗皮とおしべは消失し, 粳は外側を外花穎と内花穎に包まれ, 内側には子房が発達した玄米が入っている. 玄米の外側は子房が発達した果皮からなり, 内側には受精後に胚珠から成長した種子が入っている. このように玄米は子房からできたものであるから果実である.</p> <div>種子 (種皮) と果実 (果皮) の発生を含めた記述であれば 5 点 生物学的に誤った記述 1 か所ごとに -1 点</div>		

名札番号		名前	
------	--	----	--

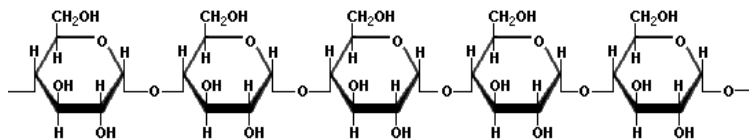
<p>問 5 (15 点) 各 3 点</p>	<p>(グルカナーゼ I) A, B (C を記述した場合は減点、-3 点)</p>		
	<p>(グルカナーゼ II) A, B, C</p>		
<p>問 6 (6 点) 各 2 点</p>	<p>(試料粉末 A) 青紫色</p>	<p>(試料粉末 B) 赤紫色</p>	<p>(試料粉末 C) 無色  (黄色は不可。粉末の呈色を見る。)</p>
<p>問 7 (18 点)</p>	<p>(試料粉末 A) 2 点 うるち米</p>	<p>(根拠) 4 点、一項目抜けて－2 点</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・グルカナーゼ I によって加水分解できたので、<math>\alpha</math> グルコースの 1→4 結合を持つ多糖類（デンプン）が含まれる。</li> <li>・ヨウ素デンプン反応で青紫色を呈したことから、3 つの試料粉末中、最も多くヨウ素が取り込まれており、直鎖状構造を持つアミロースを含むうるち米であると考えられる。</li> <li>・グルカナーゼ II によっても加水分解できたのは、うるち米（白米）を構成する細胞壁由来の <math>\beta</math> グルコースの 1→4 結合からなるセルロースが分解されたため。</li> </ul>	
	<p>(試料粉末 B) 2 点 もち米</p>	<p>(根拠) 4 点、一項目抜けて－2 点</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・グルカナーゼ I によって加水分解できたので、<math>\alpha</math> グルコースの 1→4 結合からなる多糖類（デンプン）が含まれる</li> <li>・ヨウ素デンプン反応で赤紫色を呈したことから、そのデンプン構造は分枝構造に富むアミロペクチンを持つ、つまりもち米と考えられる。</li> <li>・グルカナーゼ II によっても加水分解できたのは、もち米（白米）を構成する細胞壁由来の <math>\beta</math> グルコースの 1→4 結合からなるセルロースが分解されたため。</li> </ul>	
	<p>(試料粉末 C) 2 点 セルロース</p>	<p>(根拠) 4 点、一項目抜けて－2 点</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・グルカナーゼ II によって加水分解できたので、<math>\beta</math> グルコースの 1→4 結合からなるセルロースである。</li> <li>・ヨウ素デンプン反応で呈色しないことと、グルカナーゼ I によって加水分解できなかったため、デンプン（つまりうるち米、もち米）ではない。</li> </ul>	
<p>問 8 (4 点)</p>	<p>(呈色) 2 点 赤褐色</p>	<p>(理由) 2 点、各 1 点</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・デンプンよりもグルコース鎖の分枝が多いために直鎖部分が短くなり、らせん構造中に取り込まれるヨウ素の量が減ることが予想されるため。</li> <li>・アミロペクチンが豊富なもち米が示す赤紫色よりもさらに呈色感度が下がることが予想されるため、赤褐色を呈する。</li> </ul>	

## 問 9

(17 点)

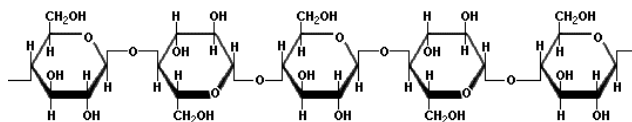
(アミロース) 7 点

- ・ 5 分子の  $\alpha$  グルコースを使用すること (3 点)
- ・ 直鎖状、1-4 結合 (2 点)
- ・ 脱水重合 ( $-H_2O$ ) (2 点)
- ・ その他、ミスは -1 点 (6 番目の  $CH_2OH$  と  $OH$  の位置 ; 上下、グリコシド結合の  $O$  の位置 ; 下)
- ・  $\beta$  グルコースの混在は 0 点
- ・ 両端の構造は採点対象外



(セルロース) 10 点

- ・ 5 分子の  $\beta$  グルコースを使用すること (3 点)
- ・ 直鎖状、1-4 結合 (2 点)
- ・ 脱水重合 ( $-H_2O$ ) (2 点)
- ・ グルコースがひっくり返る（もしくは描き方（図の 2 つ目））(3 点)
- ・ その他、ミスは -1 点 (グリコシド結合の  $O$  の位置 ; 上下,  $OH$  の位置 ; 上下)
- ・  $\alpha$  グルコースの混在は 0 点
- ・ 両端の構造は採点対象外



- ・ セルロースの別の描き方

