



第3回

# 科学の甲子園 全国大会

実技競技①

## 実技競技① 「ポリペプチド」

⌘ 問題 ⌘

本競技では2つの課題に取り組んでもらう。課題1では試料に溶けているアミノ酸を決定し、課題2ではポリペプチドを構成するアミノ酸の配列を決定する。なお、同時に2つの課題に取り組んでもよい。

**課題1** 薄層クロマトグラフィーは、試料を付着させた薄層プレート<sup>注1)</sup>の一端を溶媒（展開液）に浸し、溶媒に溶けた試料の移動距離のちがいによって混合物を分離し、同定<sup>注2)</sup>する方法である。

以下の1～3に示した試料、実験用具、試薬を用いて、4の実験操作を行い、薄層クロマトグラフィーによって試料Iに含まれる未知のアミノ酸を同定し、5の問題に答えよ。

なお、課題1は5の問題の解答を60点満点で採点し、得点とする。

注1) 薄層プレート：アルミニウムやガラスの板にヒドロキシ基（-OH）を多く持つシリカゲルなどを薄く塗布したもの。

注2) 同定：目的の物質が何であるかを決定すること。

## 1. 試料

試料I … 未知のアミノ酸の水溶液。ただし、未知のアミノ酸は試料II（標準試料）に含まれているアミノ酸のいずれか1種類である。

試料II … 標準試料。5種類のアミノ酸（アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、メチオニン）の混合水溶液である。

※ アミノ酸については5ページを参照のこと。

※ 試料の調製について

試料Iは未知のアミノ酸0.10 gを純水50 mLに、試料IIは各アミノ酸0.10 gを純水100 mLに、それぞれ溶解してある。

## 2. 実験用具

- シリカゲル薄層プレート（50 mm × 100 mm）2枚、1枚は予備
- キャピラリー（ガラス細管、内径0.29 mm）3本、1本は予備
- 展開槽（広口サンプルびん、中栓付）1個
- アルミホイル 1枚
- 駒込ピペット（5mL、展開液を展開槽に入れるときに使用する）1本
- ピンセット
- 30cm直定規 1本
- 温度計 1本
- 鉛筆（2B）2本
- 電卓 1台
- ドライヤー 1台（電源は机上のコンセントからとる）
- キムワイプ 1箱
- キムタオル 2枚
- セロハンテープ 1巻
- その他 安全メガネ、デスポ白衣、実験用手袋

## 3. 試薬

展開液（フェノール／水，質量比 4：1 の混合溶液。ポリ広口びんに入れてある。）

発色剤（ニンヒドリン試薬。アミノ酸と反応して発色する。スプレーボトルに入れてある。）

## 4. 実験操作

- ① 展開液を駒込ピペットで 10～15mL とり，展開槽に約 5 mm の深さになるように入れ，容器内が展開液の蒸気で満たされるように，ふたをしっかりと閉めておく。
- ② 薄層プレートをアルミホイルの上に，シリカゲルが塗ってある白い方の面を上にして置く。
- ③ 薄層プレートの一端から約 1 cm のところに鉛筆で，薄層を傷つけないように，薄く線を引く。これが試料を付着させる位置（原線）となる。
- ④ キャピラリーで試料Ⅰを毛細管現象により適量吸い上げ，③の原線上に試料をできるだけ小さなスポット状に，ドライヤーで乾かしながら何回か付着させる。なお，付着量が 1～5  $\mu$ g になるように，付着させる回数を調整するとよい。
- ⑤ 試料Ⅱについても，④と同様に，試料Ⅰと重ならないように付着させる。
- ⑥ 2つのスポットが乾いたら，展開槽のふたを手早く開け，スポットが展開液に浸らないように注意しながら，薄層プレートの下端を展開液に浸し，再びふたを閉める。
- ⑦ 展開液の浸透が薄層プレートの上端から 2～3cm 程度まで進んだところで，展開槽のふたをあけて手早く薄層プレートを取り出し，展開液が到達した上端（溶媒前線）に鉛筆で印をつける。
- ⑧ 薄層プレートはドライヤーの温風で乾燥させたのち，用意されているスプレーボトルで，発色剤をプレート全体に均一に吹きかける。
- ⑨ ⑧の薄層プレートをドライヤーの温風で約 50～60℃に加熱して発色させる。
- ⑩ 発色した各色素について，図3に示すように， $A$ （原線から溶媒前線までの距離）， $B$ （原線から色素の中央部までの距離）を求め， $R_f$  値 =  $\frac{B}{A}$  を計算する。
- ⑪ 表 1 を参考にして，試料Ⅰに溶けていた未知のアミノ酸を同定する。

## ※ 実験操作上の注意：

1. 実験中は安全メガネ，デスポ白衣，実験用手袋を必ず着用すること。
2. 薄層プレートはシリカゲル塗布面に指や手が触れないように扱うこと。
3. フェノールは毒性，腐食性があり劇物に指定されている。展開液の取り扱いには十分注意し，問題が発生した場合には直ちに競技支援員に知らせ，水道水で洗浄すること。
4. 発色剤を噴霧する際に，試薬を吸い込んだりしないように注意すること。その他の試薬類の取り扱いについても十分注意すること。
5. ガラス器具を破損しないように取り扱いに注意すること。
6. ドライヤーは熱くなるので，やけどに注意すること。

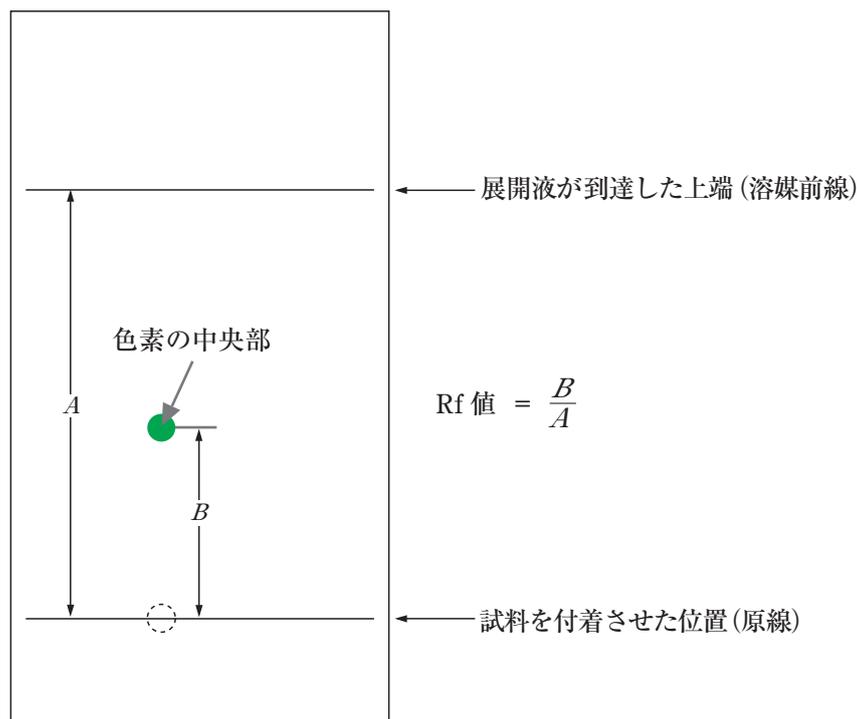


図1 Rf 値の測定

表1 試料Ⅱに含まれるアミノ酸の Rf 値 注3)

アミノ酸の名称 (記号)	Rf 値
アラニン (A)	0.28 ~ 0.33
アスパラギン酸 (D)	0.06 ~ 0.10
グルタミン酸 (E)	0.11 ~ 0.15
グリシン (G)	0.20 ~ 0.24
メチオニン (M)	0.49 ~ 0.54

注3) Rf 値は展開液がフェノール/水 (質量比 4:1) の場合であり、温度、湿度等の微妙な条件に影響を受けるため、およその範囲を示している。

5. 問題 (解答用紙に解答すること)

問1 実験で使用した薄層プレートをセロハンテープで解答用紙の所定の位置に貼付し、同定したアミノ酸の Rf 値と名称を答えよ。(Rf 値を求める計算式を示すこと。)

問2 試料Ⅱに含まれるアミノ酸が「4. 実験操作」(3 ページ)によって分離できる理由を説明せよ。

次のペプチドやポリペプチドについての説明を読み、課題 2 に答えよ。

アミノ酸がつながってできた分子にはペプチドやポリペプチド、タンパク質があり、いずれも生体を構成する重要な物質である。

アミノ酸は、図 2 に示す構造をしており、1つの炭素原子(C)に水素(-H)、アミノ基(-NH<sub>2</sub>)、カルボキシ基(-COOH)と、アミノ酸の種類によって異なる側鎖(-Rあるいは-R<sub>1</sub>や-R<sub>2</sub>などで表す)がそれぞれ1つずつ結合している。タンパク質を構成するアミノ酸は表 2 に示すように 20 種類あり、どのようなアミノ酸がどのような順番でつながっているかによって、さまざまなタンパク質ができる。

アミノ酸はペプチド結合と呼ばれる結合でつながる。図 3 のように、ペプチド結合ができるときには、一方のアミノ酸のカルボキシ基と他方のアミノ酸のアミノ基から水分子(H<sub>2</sub>O)がとれるため、この反応は脱水縮合と呼ばれる。また、ペプチド結合が切断されるときには、水分子が加わるため、加水分解と呼ばれる。

アミノ酸がペプチド結合で2個以上つながってできた分子はペプチドという。2個のアミノ酸がペプチド結合で結合したペプチドはジペプチド、3個のアミノ酸のペプチドはトリペプチド、4個のアミノ酸のペプチドはテトラペプチド、多数のアミノ酸のペプチドはポリペプチドなどという。

ペプチドの一端にはアミノ基、他端にはカルボキシ基が、それぞれまだ結合できる状態で残っており、ペプチドのアミノ基側の末端をN末端、カルボキシ基側の末端をC末端と呼ぶ。

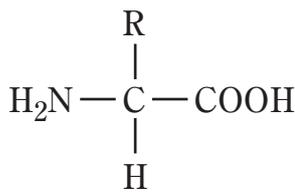


図 2 アミノ酸の構造

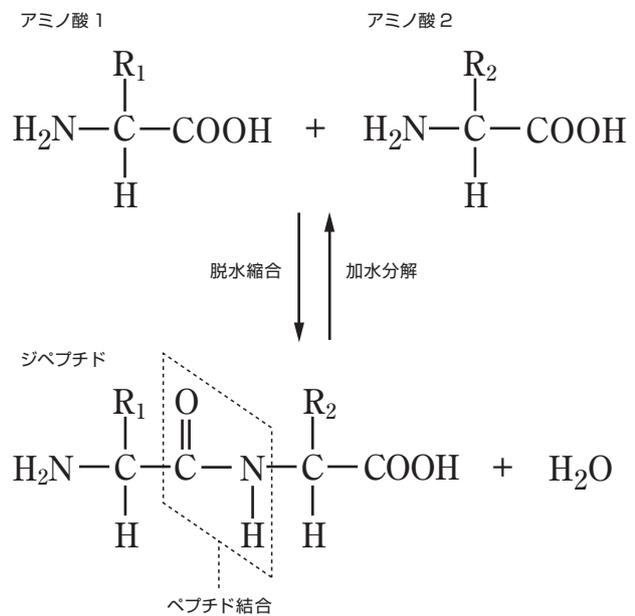


図 3 ペプチド結合

表2 アミノ酸の名称と記号

名称	記号	名称	記号
アラニン	A	メチオニン	M
システイン	C	アスパラギン	N
アスパラギン酸	D	プロリン	P
グルタミン酸	E	グルタミン	Q
フェニルアラニン	F	アルギニン	R
グリシン	G	セリン	S
ヒスチジン	H	トレオニン	T
イソロイシン	I	バリン	V
リシン	K	トリプトファン	W
ロイシン	L	チロシン	Y

ペプチドは、20種類のアミノ酸のうちのいくつかは、そのペプチドに特有の順番で結合してきている。一般的に、このアミノ酸の配列をN末端から順番に表した構造は一次構造と呼ばれ、最も基本的な構造である。

本問題でもこの記述方式に従い、例えば、アラニン(A)、システイン(C)、グルタミン酸(E)、グリシン(G)、アスパラギン酸(D)、フェニルアラニン(F)、アスパラギン酸(D)、グリシン(G)、アラニン(A)、アラニン(A)の10個のアミノ酸がN末端側からこの順番に結合したペプチドは、次のように表すこととする。

(N末端側) A-C-E-G-D-F-D-G-A-A (C末端側)

課題2では、テトラペプチドの一部とアミノ酸が5個以上のペプチドの構成については、まずペプチドに含まれるアミノ酸の種類をアルファベット順に記し、さらにペプチド1分子中に含まれる各アミノ酸の個数をアミノ酸の記号の直後に括弧でくくって示す。例えば、上に示したペプチドの構成は、

A(3)C(1)D(2)E(1)F(1)G(2)

と表すこととする。課題2では、この表現を「ペプチド構成式(以下、構成式)」と呼ぶことにする。

ペプチドのペプチド結合を加水分解によって切断する酵素は、ペプチダーゼと総称される。ペプチダーゼには、ペプチドの末端にあるアミノ酸を1つずつ取り除くようにしてペプチドを切断するエキソペプチダーゼ(exopeptidase)と、2つ以上のペプチドを生じるようにペプチド結合を切断するエンドペプチダーゼ(endopeptidase)とがある。

未知のポリペプチドの一次構造を生化学的な手法で決定するときには、カルボキシエキソペプチダーゼ(アミノ酸をカルボキシ基端から1つずつ切り離していく酵素)とアミノエキソペプチダーゼ(アミノ酸をアミノ基端から1つずつ切り離していく酵素)を用いて、遊離したアミノ酸を質量分析装置によって同定していく。しかし、この手法だけでは、アミノ酸数の多いポリペプチドでは、次々に遊離してくるアミノ酸の混合液が生じるので、きわめて不正確になる。そこで、まずエンドペプチダーゼを用いてトリペプチドやテトラペプチドなどの短めのペプチド断片をつくり、それらの一

次構造を決定して、これらをつなぎ合わせるような手法で全体の一次構造を解明する。ジペプチドの場合は、例えばアミノ基側のアミノ酸を化学的に修飾してからジペプチダーゼで切断するなどの操作により、一次構造を決めることができる。

**課題2 【操作方法とルール】**(8 ページ) によってペプチド結合を切断(加水分解)し、次の構成式で表されるペプチドX(アミノ酸数 21)の一次構造を決定せよ。

ペプチド X: A(1)C(4)E(2)G(1)I(1)L(2)N(2)Q(2)S(2)V(2)Y(2)

- ただし、
1. アミノ酸を表す記号は表 2 によるものとする。
  2. ペプチド X を構成しているアミノ酸 C の S-S 結合はあらかじめ切断し、他と結合しないように化学的修飾を施してあるものとする。
  3. ペプチド X の N 末端のアミノ酸は課題 1 で同定したアミノ酸である。
  4. 一次構造の決定手順については【操作と手順の例】(10 ページ)を参考にしてよい。
  5. 課題 2 は、次の事項により、180 点満点で得点を与える。
    - ・一次構造(アミノ酸の配列)の正答数。
    - ・操作回数の少なさ。

【操作方法とルール】

1. ペプチド結合の切断（加水分解）に使用するペプチダーゼはエンドペプチダーゼのみとし、使用できるエンドペプチダーゼと基質特異性は表3によるものとする。

表3 エンドペプチダーゼと基質特異性 注4)

該当するアミノ酸のC末端側にあるペプチド結合を切断するもの	
名称	該当するアミノ酸
エラスターゼ	A, G, S, V のうちのいずれか
キモトリプシン	F, W, Y のうちのいずれか
トリプシン	K, R のうちのいずれか
V8プロテアーゼ	D, E のうちのいずれか
該当するアミノ酸のN末端側にあるペプチド結合を切断するもの	
名称	該当するアミノ酸
サーモリシン	F, I, M, V, W, Y のうちのいずれか
ペプシン	F, L, W, Y のうちのいずれか

注4) 基質特異性は生化学事典（第4版，東京化学同人）などによる。

2. ペプチド結合の切断（加水分解）は、次の例のように、「マトリックスシート」で切断したいペプチドと切断に使用するエンドペプチダーゼの組み合わせを選び、該当する箇所の「シール」をはがすことによって行うこととする。

マトリックスシート

切断するペプチド	エンドペプチダーゼ	エラスターゼ A, G, S, V の右側で切断	キモトリプシン F, W, Y の右側で切断	トリプシン K, R の右側で切断
X	A(1)C(4)E(2)G(1)I(1)L(2)N(2)Q(2)S(2)V(2)Y(2)			①
A	A(1)C(2)E(1)Q(1)			
B	A(1)C(2)E(1)Q(1)S(1)		②	

例1 ペプチドXをトリプシンで切断する場合は、①の「シール」をはがす。

例2 生成したペプチドBをキモトリプシンで切断する場合は②の「シール」をはがす。

3. 上記2の操作の結果は、「シール」をはがした台紙の部分に、次の3通りで記載されている。

操作の結果	生成したペプチドの種類	記載内容
新たなペプチドが生成したとき	ジペプチド	一次構造
	トリペプチド	
	テトラペプチド	一次構造または構成式
	アミノ酸5個以上のペプチド	構成式
新たなペプチドは生成しなかったとき		ペプチドは切断できなかった

操作結果の記載例は次のとおりである。

例1

ペプチド $\alpha$ をトリプシンで切断すると、次の5つのペプチドが生成した。

一次構造 A-K のジペプチド

一次構造 A-C-R のトリペプチド

一次構造 A-C-C-K のテトラペプチド

構成式 E(1)F(1)L(1)Y(1) のペプチド $\beta$

構成式 E(4)F(2)G(3)R(1) のペプチド $\gamma$

例2

ペプチド $\alpha$  はペプシンで切断できなかった。

4. 上記2, 3の操作を繰り返すことにより、ペプチドXの一次構造を決定する。

5. はがした「シール」は、競技終了後、輪ゴムでまとめて提出すること。

6. 操作結果を分析したり考察する際には、適宜、別紙「作業用紙」を用いてよい。なお、作業用紙は採点の対象としない。

【操作と手順の例】

課題：構成式 A(5)C(1)D(1)F(1)G(1)Y(1) のペプチドZ (アミノ酸数 10) の一次構造を決定せよ。

操作例：

生徒1「V8プロテアーゼを使えば、ペプチドZには含まれるターゲットがD 1つだけだから、Dの位置は決まりそうだ。切れないかもしれないけど試してみようよ。」

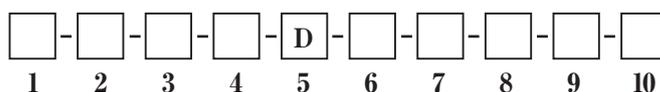
**操作 No.1** (マトリックスシートで) ペプチドZとV8プロテアーゼの組み合わせを選んでシールをはがす。

(結果) 次の2つのペプチドが生成した。

A(3)C(1)D(1) のペプチドV

A(2)F(1)G(1)Y(1) のペプチドW

生徒2「よし! Dの位置がN末端から5番目と決まったね。忘れないうちに書き込んでおこう」



生徒3「ペプチドVはエラスターゼで切るしかないでしょ。これだけAがあればきっと切れないってことはないでしょ。」

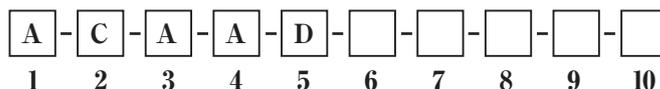
**操作 No.2** (マトリックスシートで) ペプチドVとエラスターゼを組み合わせる。

(結果) 次の2つのペプチドが生成した。

ジペプチド A-D

トリペプチド A-C-A

生徒2「Dの位置から考えて、ジペプチドA-DはN末端から4-5番目だね。これでトリペプチドの位置も決まるね。解答欄に書き込んでおこう。」



生徒1「ペプチドWもエラスターゼで切ってみよう。」

**操作 No.3** (マトリックスシートで) ペプチドWとエラスターゼを組み合わせる。

(結果) 次の2つのペプチドが生成した。

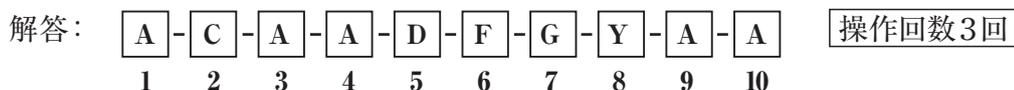
ジペプチド F-G

トリペプチド Y-A-A

生徒3「F-G-Y-A-AかY-A-A-F-Gのどちらだろう。」

生徒2「F-G-Y-A-Aでしょ。Y-A-A-F-Gであれば、ジペプチドY-Aが生じたはずだよ。」

生徒1「やったー!これで、ペプチドZの一次構造が決定できたね。」



これで問題は終わりです。