

## 令和4年度 大学院博士前期課程入学試験問題

## 生物工学 I

基礎生物化学，生物化学工学から1科目選択しなさい。

ただし，内部受験生は生物化学工学を必ず選択すること。

解答には，問題ごとに1枚の解答用紙を使用しなさい。

問題用紙ならびに余った解答用紙にも受験番号を記載しなさい。

試験終了時に回収します。

受験番号	
------	--

## 基礎生物化学

### 問題1 (配点率 34/100)

生化学研究においてタンパク質の精製は重要な技術である。以下の a)~d)の精製方法について原理を 50 字~100 字で簡潔に説明せよ。

- a) 塩析
- b) イオン交換クロマトグラフィー (イオンクロマトグラフィー)
- c) 疎水性クロマトグラフィー
- d) ゲルろ過クロマトグラフィー (サイズ排除クロマトグラフィー)
- e) アフィニティークロマトグラフィー

## 問題 2 (配点率 33/100)

酸化リン酸化に関する以下の文章を読み、設問に答えなさい。

ミトコンドリアで ADP と Pi から ATP を合成するのは ATP シンターゼ (ATP 合成酵素) である。①複合体 I から IV への電子伝達で遊離するギブズ自由エネルギーは ATP 合成酵素が利用できる形で保存される。電子伝達のギブズ自由エネルギーは、ミトコンドリアのマトリックスから膜間部へのプロトンのくみ出しによって生じる内膜の電子化学的プロトン濃度勾配という形で蓄えられる。こうして生じた電気化学勾配を [ア] といい、これに蓄えられたギブズ自由エネルギーが ATP 合成を駆動する。

プロトンの内側から外側に移すときのギブズ自由エネルギー変化  $\Delta G$  は電気的成分と化学成分からなり、pH をつかって次式のように表される。

$$\Delta G = 2.3RT [\text{pH}(\text{内側}) - \text{pH}(\text{外側})] + ZF\Delta\Psi$$

$Z$  はプロトンの電荷、 $F$  はファラデー定数、 $\Delta\Psi$  は [イ] で、負電位側から正電位側にプロトンが動くときの符号を正とする。pH(内側) > pH(外側) なので、マトリックスからのプロトンの汲み出しはプロトン濃度勾配に逆らう [ウ] 反応である。

肝ミトコンドリア内膜の [イ] を測ると 168mV で、マトリックス内外の pH 差は 0.75 である。この場合の  $\Delta G$  は上式より  $20.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  と計算される。生理条件で ATP 1 分子の合成に必要なギブズ自由エネルギー変化は  $+40 \sim 50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  なので、プロトン 1 個をマトリックスに戻して得られるエネルギーだけでは ATP 合成には不十分であることがわかる。

プロトン輸送で得られるギブズ自由エネルギーを ATP 合成に用いる仕組みは何か? Boyer は ATP 合成酵素の②触媒活性を持つ  $F_1$  と呼ばれる  $\alpha_3\beta_3$  サブユニットが  $F_0$  と呼ばれる膜貫通領域に対して回転することで駆動されると提案した。種々の生物の  $F_0$  を比べるとリングを構成する  $c$  サブユニットは 8~15 個と幅がある。FoF1-ATP 合成酵素は  $F_1$  が 1 回回転し [エ] 個の ATP を合成する。大腸菌では  $F_0$  の  $c$  リングは 12 個の  $c$  サブユニットから構成されるので、③1 プロトンが膜外から内に入るごとに [オ] 個相当の ATP を生産することになる。

- 1) 空欄 [ア] ~ [エ] に適当な語句または数字を埋めよ。
- 2) 下線部(a)が示すエネルギー保存のことを何というか答えよ。

- 3) 2,4-ジニトロフェノール (DNP) を作用させると下線部(a)が示すエネルギー保存が解消する。DNP のような試薬の名前を記し, DNP の作用する仕組みを 30 字程度で説明せよ。
- 4) 下線部(b)に関して,  $F_1$  が実際に回転することは実験的にどのように確認されたか。実験系を図示し観測手法と実験条件について 50 字程度で説明せよ。
- 5) 下線部(c)の中にある空欄  の数値を計算した計算式と答えを記せ。

### 問題 3 (配点率 33/100)

1) 以下はコラーゲンについての説明である。空欄に当てはまる言葉を記載せよ。

コラーゲンは全ての多細胞動物にあり、脊椎動物では最も大量に存在するタンパク質であり、細胞外にあり、張力に対し非常に強い不溶性繊維をなす。

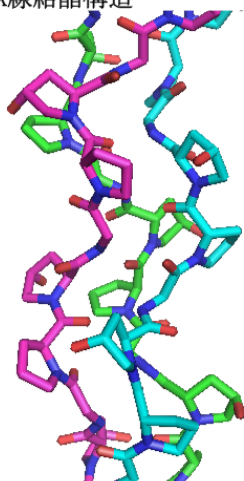
I 型コラーゲンは ( ① ) 本のポリペプチド鎖からなり、1 分子は全体で分子量約 285kDa の棒状、長さ約 3000Å、太さ約 14Å である。コラーゲンのアミノ酸組成は特別で、1/3 は ( ② )、15~30% は ( ③ ) と ( ③ ) の一部が ( ④ ) 化された 4-ヒドロキシプロリンである。体内で ( ③ ) を 4-ヒドロキシプロリンに変換する際に必要な酵素は活性に ( ⑤ ) を必要とする。

コラーゲンは ( ⑥ ) 構造を形成するが、コラーゲンのポリペプチド鎖の一つ一つはポリ ( ③ ) に似た ( ⑦ ) 巻きの構造であり、それが ( ① ) 本集まり ( ⑧ ) 巻きの多重コイル構造をつくる。

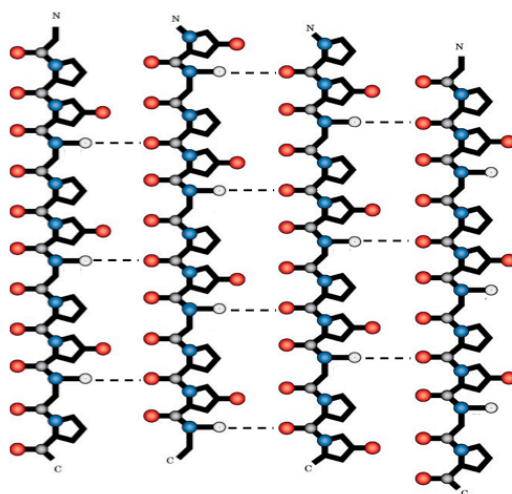
2) 1)の②, ③, および4-ヒドロキシプロリンの構造式を記載せよ。

3) 以下はコラーゲンのモデルペプチドの X 線結晶構造 (左) と各ペプチド間の結合の模式図 (右) である。このような立体構造が形成可能な理由を、各アミノ酸の構造に注目しながら、200 字以内で説明せよ。

コラーゲンのモデルペプチドの X 線結晶構造



コラーゲンのモデルペプチドの鎖間水素結合



## 生物化学工学

### 問題 1. (配点率 33/100)

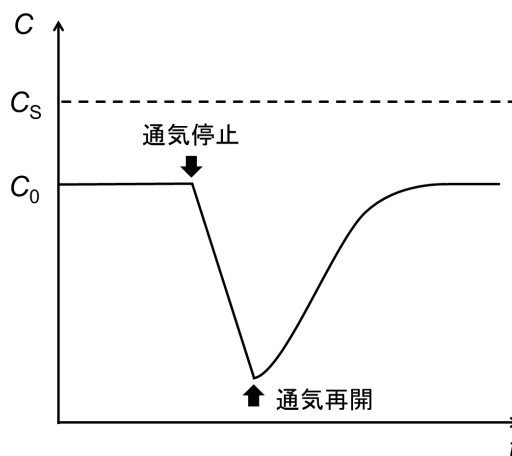
通常は回分培養が終了した時点で細胞と一緒に生産物が回収される。しかし、全ての培地を回収するのではなく、一部を残し、抜き取った量に相当する新鮮培地を仕込みなおして、再度培養する操作を反復回分操作という。以下の問いに解答せよ。

- (1) 反復回分操作の利点を 3 つ挙げて、それぞれ 2 行程度で説明せよ。
- (2) 回分培養における細胞の増殖は通常、誘導期、加速期、対数増殖期、減速期、停止期、死滅期にわけることができる。反復回分操作を行う場合は、対数増殖期が終了した時点で、細胞を回収し、次の回分操作の準備を行い、回分培養を開始する。  
今、誘導期の時間を  $t_1(\text{h})$ 、初発菌体濃度を  $X_0(\text{g L}^{-1})$ 、最終到達菌体濃度を  $X_F(\text{g L}^{-1})$ 、最大比増殖速度を  $\mu_m(\text{h}^{-1})$ 、初発制限基質濃度  $S_0(\text{g L}^{-1})$ 、最終制限基質濃度を  $S_F(\text{g L}^{-1})$ 、加速期、減速期はなく、生産物回収にかかる時間を  $t_r(\text{h})$ 、次の回分培養の準備にかかる時間を  $t_p(\text{h})$  とする。
  - (2-1) 反復回分操作を  $n$  回繰り返した場合の総時間  $t_b^n(\text{h})$  を求めよ。なお、制限基質以外の栄養源は十分にあり、初発制限基質濃度  $S_0$  は十分に高く、 $S_F$  はほぼゼロ、加速期、減速期は非常に短く無視でき、繰り返すたび初発菌体濃度  $X_0$  にて反復操作を行うものとする。計算の過程も示すこと。
  - (2-2) (2-1) に示す反復回分操作を  $n$  回繰り返した場合の、培養容積当たりの平均菌体生産速度を求めよ。計算の過程も示すこと。
  - (2-3) (2-1) に示す反復回分操作を  $n$  回繰り返す場合の、初発培養液量を  $V_0(\text{L})$ 、培養終了時に抜き出して残った培養液量を  $V_F(\text{L})$  とする。添加する新鮮培地中の制限基質濃度  $S_A(\text{g L}^{-1})$  および対制限基質収率  $Y_{X/S}$  を求めよ。計算の過程も示すこと。

## 問題 2. (配点率 33/100)

微生物を利用した動的測定法（ダイナミック法）による酸素移動容量係数の測定を考える。図のように溶存酸素濃度が定常状態にある培養槽への通気を一時的に停止し、その後、通気を再開した。以下の問いに答えよ。解答には以下の記号を適宜用いること。

- $C$  : 培養液中の溶存酸素濃度  
 $C_s$  : 飽和溶存酸素濃度  
 $C_0$  : 定常状態における培養液中の溶存酸素濃度  
 $X$  : 培養液中の細胞濃度  
 $Q_{O_2}$  : 単位細胞量あたりの酸素消費速度  
 $k_{La}$  : 酸素移動容量係数  
 $t$  : 培養時間



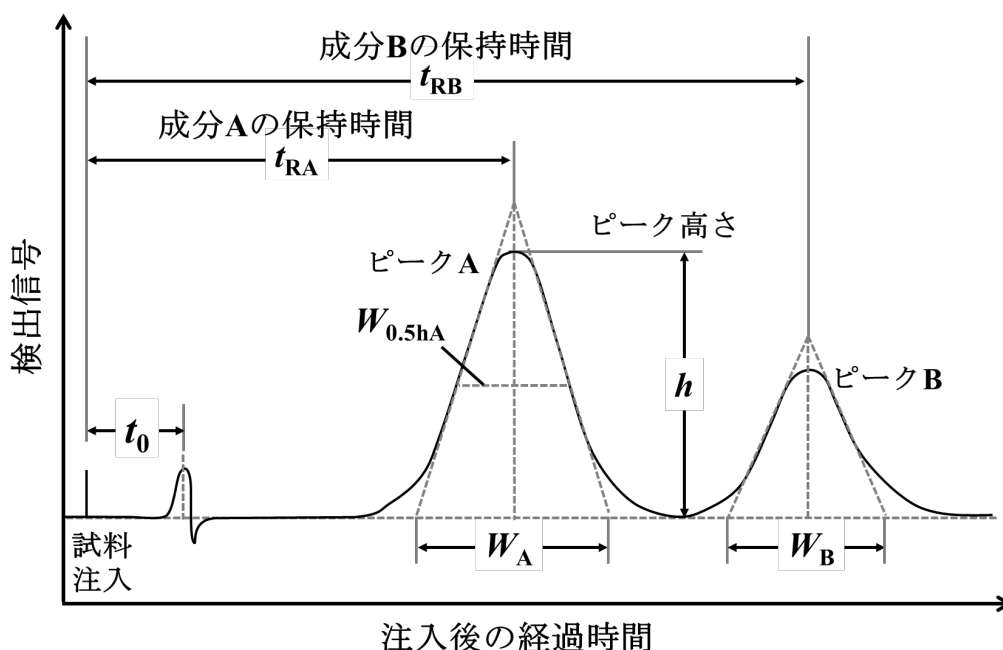
- (1) 培養中、一時的に通気を停止すると図のように  $C$  は直線的に低下し、その後、通気を再開すると再び上昇する。この操作を行ったときの  $C$  の測定値の変化より、 $Q_{O_2}$  と  $k_{La}$  を求める方法を説明せよ。
- (2) 通気停止後、 $C$  は  $0.050 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  の速度で  $0.010 \text{ mmol L}^{-1}$  まで直線的に低下した。また通気再開後に  $C$  が  $0.15 \text{ mmol L}^{-1}$  まで回復したとき、 $C$  の増加速度は  $0.020 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$  であった。これらのデータを使用して、このときの  $k_{La}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) を求めよ。ただし、 $C_s$  は  $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$  とする。
- (3) この培養における  $C_0$  の値 ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) を求めよ。また通気ガス中の酸素分圧を 2.0 倍にしたときの  $C_0$  の値 ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) がいくらかになるか求めよ。

## 問題 3. (配点率 34/100)

クロマトグラフィーは、混合試料を成分ごとに分離する技術の一種である。固定相または担体と呼ばれる物質の表面あるいは内部を、移動相（溶媒）が通り抜ける過程で、固定相の物質と移動相内の物質（溶質）の相互作用により、移動相内の物質ごとに固定相を通り抜ける時間に違いが生じ、混合試料中の物質が分離される。

クロマトグラフィーに関する下記の問いに答えよ。解答には計算の過程も示すこと。なお、温度、圧力、流量はそれぞれ一定と仮定する。

- (1) カラムクロマトグラフィーを使って溶質の成分 A と成分 B を分離したクロマトグラムの結果を下図に示す。ここで、 $t_R$  は保持時間であり、 $t_{RA}$  と  $t_{RB}$  は、それぞれ成分 A と成分 B の保持時間を示す。 $t_0$  は移動相がカラムから出てくるまでの時間を示す。 $W$  はピーク幅であり、 $W_A$  と  $W_B$  は成分 A と成分 B のピーク幅、 $W_{0.5hA}$  は成分 A のピークの半値幅を表す。



- (1-1) 分配係数  $K$  は、溶質の成分が移動相に存在する成分の量と固定相に存在する成分の量との比を表す。成分 A の分配係数  $K_A$  を  $t_0$  を含む式で表せ。
- (1-2) 成分 A と成分 B で固定相との親和性はどちらが高いか、理由とともに答えよ。
- (2) カラムの性能を表す理論段高さ ( $H$ ) と分離度 ( $R$ ) を用いて、使用中のカラムの分離性能を確認したい。理論段数モデルでは、長さ  $L$  のカラムを流れの方向に等容積の  $N$  段に分け、各段では移動相と固定相の間で溶質の分配平衡が成立する理論段と仮定している。試料負荷量が少なく段数が多いとき、各成分の溶出曲線は (1) の図に示すようなガウス分布となる。その変曲点を通る 2 本の接点のベースラインとの交点の幅  $W$  は  $4\sigma$  ( $\sigma$  はガウス分布の標準偏差) となるので、理論段高さ (1 段に相当するカラム長さ) と溶出ピークの関係は次式で表される。

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16(t_R/W)^2}$$

また、クロマトグラフィー溶出ピークの分離度 ( $R$ ) は、ピーク間の時間間隔 ( $t_{RB} - t_{RA}$ ) と



それぞれのピーク幅  $W$  を用いて次式で表される。

$$R = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{(W_A + W_B)/2}$$

- (2-1) 長さ  $L = 5.00 \times 10^2$  mm のカラムクロマトグラフィーを用いて、溶質の成分Aと成分Bを分離したい。溶質の成分Aと成分Bの保持時間は、それぞれ  $t_{RA} = 2.500$  min、 $t_{RB} = 3.100$  min であり、ピークの間幅は、それぞれ  $W_A = 0.240$  min、 $W_B = 0.300$  min であった。理論段数  $N$  ならびに理論段高さ  $H$  を求めよ。
- (2-2) 上記と同じ条件下にて、分離度  $R$  を求め、その意味から成分Aと成分Bがどの程度分離できているか説明せよ。