

【重要】 このページに書かれた作業を完了してから、次のページに進むこと

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、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✓を書き込むこと)。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分後以降の申し出については対応できないので注意すること。確認し次第、次のページに進んでよい。

- 細胞培養上清: A、Bと書かれた1.5 mLチューブ各1本、それぞれ120 μ Lが正確に入っている。
- 細胞を含まない培地: Mと書かれた1.5 mLチューブ1本、120 μ Lが正確に入っている。
- 酵素反応液: Eと書かれた1.5 mLチューブ1本、およそ1.2 mLが入っている。
- 10 mmol/L 乳酸標準液:Lと書かれた1.5 mLチューブ1本、10 μ L正確に入っている。
- 超純水: Wと書かれた2 mLチューブ2本。それぞれのチューブには全く同じ超純水がおおよそ1.8 mL入っている。
- 練習用チューブ(水入り): Pと書かれた1.5 mLチューブ1本
- マイクロピペットP-200 1本: このマイクロピペットは20 μ Lから200 μ Lを測定することができる。
- マイクロピペット用チップ 1箱
- ピペット、チューブを廃棄するビニール袋(机の袖に設置されている) 1枚
- 1.5 mLチューブ(10本)
- マジックペン 1本
- 透明96ウェルプレート 1枚 ※ウェルは穴の意味
- 手袋
- 保護眼鏡 1個
- 定規

【重要】 このページに書かれた作業を完了してから、次のページに進むこと

解答を進める上での注意事項

以下の注意事項をよく読み、理解すること(理解できた項目の□に✓を書き込むこと)。

最初に、本問題冊子全体を通して読み、全体の実験及び解答の計画を練ってから作業に移ること

最後に実験する時間がなくなっても救済措置はない

国際単位系の接頭語を以下に記した。必要に応じて参考にすること

接頭語の日本語名称	英語表記	単位	係数
ミリ	milli	m	10^{-3}
マイクロ	micro	μ	10^{-6}
ナノ	nano	n	10^{-9}
ピコ	pico	p	10^{-12}

各自の手元にある試薬の再配布は行わない。間違いのないよう実験を進めること

マイクロピペットは許容された範囲を超えて目盛りを回すと壊れる恐れがあるので注意すること

マイクロピペットは事前に正常に動作することを確認しており、実験中に壊してもマイクロピペットを交換しない

試験中に各自の実験サンプルを実験補助員に渡す段階が1箇所ある。その際、サンプルには自分の受験番号、氏名を書く必要がある。問題文中でも記載されているので、その指示に従うこと

はじめに

がんは日本人の死因の第一位となっており、およそ3.6人に1人ががんで亡くなっている。そのような背景もあり、がん研究が盛んに行われ、新しい治療法や治療薬の開発が試みられている。

細胞はアデノシン三リン酸(ATP)などのエネルギーを産生するために、グルコースを細胞内に取り入れ、そのグルコースを代謝している。グルコースの代謝経路は解糖系とクエン酸回路が知られており、解糖系ではグルコースからピルビン酸が産生される過程において、ATPが産生される。産生されたピルビン酸はクエン酸回路、電子伝達系を経由し、さらに多くのATPが産生される。がん細胞ではピルビン酸がクエン酸回路に利用されるのではなく、多くが乳酸に変化する。さらに、がん細胞内にて産生された乳酸は細胞外に放出されることが知られている。

iPS細胞(induced pluripotent stem cell)を作製するための転写因子の1つとしても知られるMYCは、大腸がん細胞においても発現量が多いことが知られている(高発現)。大腸がん細胞におけるMYCの高発現は大腸がん細胞の代謝を変化させる働きを有していることが報告されている(Sato et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017)。特に、MYCの発現が高い細胞では解糖系も亢進していることが知られている。

がん細胞に異常が認められる遺伝子の働きを調べるにはRNA干渉により調べたい遺伝子の発現を低下させる方法や、ゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9システムを用いて遺伝子を欠失させる方法などが用いられる。本実験ではRNA干渉を利用し、MYCタンパク質の発現量を低下させたがん細胞HT29細胞を用いて乳酸の産生量を定量する。HT29細胞は大腸がん患者から単離された大腸がん細胞株である。

以上を踏まえた上で、次ページからの実験問題に取り組みなさい。

実験『吸光度計を用いて培養上清中の乳酸量を測定する』

本実験では酵素活性を利用した乳酸測定を行う。以下に述べる原理をよく読み、理解すること。

(実験の原理)

本実験では乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase; LDH)の活性を利用し、 NAD^+ (酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)に還元する過程において水溶性のテトラゾリウム塩(WST)からWSTホルマザンが生成される(図3-1参照)。WSTホルマザンも水溶性であり、この化合物は450 nm近傍に吸収波長を持つため、吸光度450 nmを測定するとWSTホルマザンの相対量がわかる。Eと書かれた酵素反応液にLDH、 NAD^+ 、WSTが最適化された濃度で入っている。

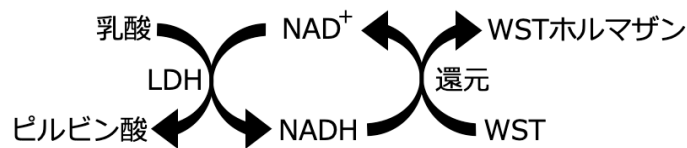


図3-1 NAD^+ と NADH の関係を示す模式図

(実際に行う作業)

①検量線用サンプルの作成

「L」と書かれたチューブには10 mmol/L 乳酸標準液が正確に10 μL 分注されている。このチューブに対して超純水を加えて10倍希釈し、1 mmol/L 乳酸標準液を調整する。これを更に順次2倍希釈していき、標準液(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0157, 0 mmol/L)とする。ただし、ここで述べた0 mmol/Lの標準液は超純水のみとする。それぞれの標準液は20 μL ずつ必要となる。

②測定用サンプルの調製

細胞A、細胞Bの培養上清がそれぞれ1.5 mLチューブに正確に120 μL 入っている(チューブAおよびB)。細胞Aの培養上清を測定試料Aとし、細胞Bの培養上清を測定試料Bとする。また、細胞を含まない培地(チューブM)が正確に120 μL 入っている。これらのチューブに対して直接、超純水を加えて5倍希釈した溶液を調整し、蓋をしっかりと閉めた後、転倒混和(チューブの上下を交互にひっくり返す)を10回以上行い、よく攪拌する。希釈した測定試料A、測定試料B、およびは培地それぞれ20 μL ずつ必要となる。図3-2も参照すること。

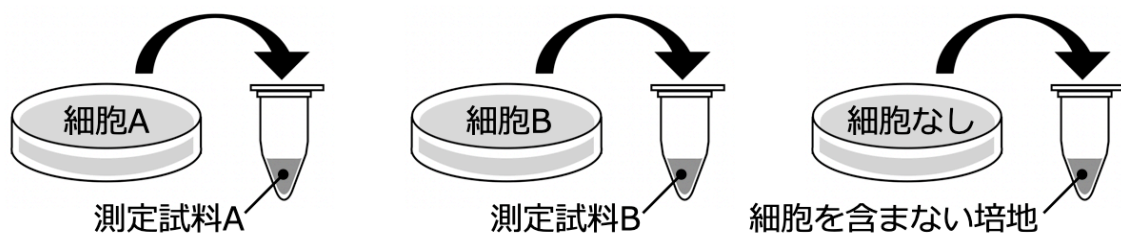


図3-2 測定試料の内容物を示す模式図

③酵素反応と吸光度測定

吸光度計を用いて測定を行う。本実験ではプレートリーダーを使用するため、透明96ウェルプレートへサンプルを移し測定する。どのウェル(穴)にどのサンプルを入れたかを記録するために、図3-3に示す透明96ウェルプレートの図を参考にする。今回の実験ではそれぞれのサンプルを1ウェルずつ入れて測定を行う。

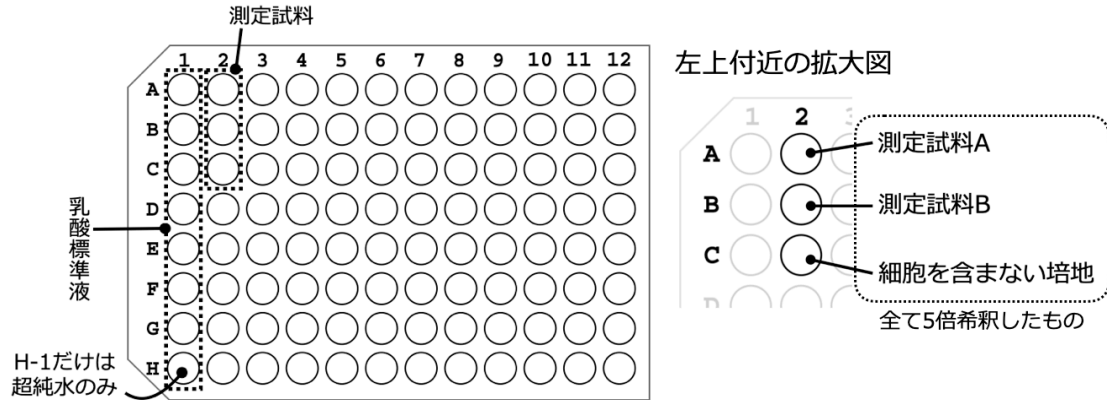


図3-3 測定試料の配置

A-1からH-1までのウェルには乳酸標準液を入れる。ただし、H-1は超純水のみとする。A-2からC-2までのウェルには測定試料を入れる。A-2、B-2、そしてC-2のウェルには、それぞれ5倍希釈した測定試料A、5倍希釈した測定試料B、そして5倍希釈した細胞を含まない培地を入れる。

なお、プレートリーダーは全てのウェルに対して吸光度を測定するため、操作を間違えるなど不測の事態が生じた場合には、これら囲み以外のウェルを用いても測定自体は可能である。その際はどのウェルに何を入れたかを記録しておくが良い。これらを全て把握した上で、次ページに示す a から j の作業に取り組み、それに続く問題に解答しなさい。

作業内容

- a プレートに溶液を分注する前に、プレートの側面に受験番号と名前をペンで**必ず記入する**。ここで記入が無いと他の生徒のプレートと見分けがつかなくなり、採点不可能となる可能性が生じる。また、分注後は非常に記入しづらい。図3-4を参照すること。

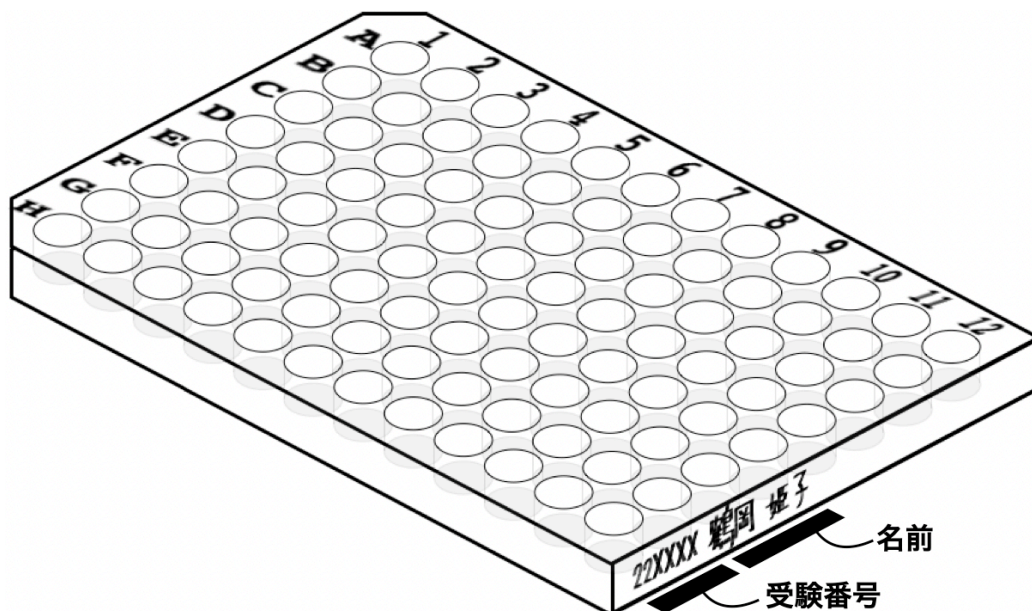


図3-4 透明96ウェルプレートにおける受験番号と名前を記述する場所

- b 希釈した一連の乳酸標準液、希釈した測定試料A、B、細胞を含まない培地を20 μL ずつ、各ウェルに入れる。
- c 酵素反応液を80 μL ずつ、各ウェルに入れる。
- d cが終了した時刻(何時何分か)を解答用紙3-1の所定の欄に記述する。
- e 30分間室温で放置する。
- f 30分経過したら、挙手して試験監督にプレートを渡す。なお、30分以上経過しても結果に影響しないことは確認しているので、落ち着いてプレートリーダーの順番を待つこと。
- g プレートを渡した時刻(何時何分か)を解答用紙3-1の所定の欄に記述する。
- h 試験監督がプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定する。
- i 試験監督から測定結果が印刷された紙を受け取る。
- j 測定結果が印刷された紙上のAbsorbance dataと記載されたところの数値を解答用紙3-1の所定の欄に記述する。

大問3-1

測定結果を用いて解答用紙に吸光度と標準液濃度の関係を解答用紙3-1にあるグラフ用紙上にプロットしなさい。さらに、定規を用いて解答用紙3-1にあるグラフ用紙上に検量線を作成しなさい。また、配布された測定試料AおよびBは既に12倍希釈されており、培地のみの吸光度のバックグラウンドを考慮した上で、作成した検量線を用いて測定試料Aおよび測定試料Bの乳酸濃度を求め、解答用紙3-2の所定の欄に記述しなさい。単位はmmol/Lとし、有効数字は2桁とする。また、計算過程がわかるように解答用紙3-2の所定の欄に記述しなさい。

大問3-2

今回は細胞を培養した培養皿から培地を回収し、乳酸測定の実験に使用した。一方でその培養皿から培地を回収した後の細胞Aと細胞Bをそれぞれ全て回収し、タンパク質の抽出を150 μL の抽出バッファーにて行ったところ、細胞Aからは5.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のタンパク質溶液、細胞Bからは9.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のタンパク質溶液が得られた。1細胞におけるタンパク質の総量が細胞Aと細胞Bにおいて等しく、かつ1細胞当たりのタンパク質の総量が285 pgと仮定したとき、今回の測定結果をもとに細胞Aと細胞Bの1細胞当たりの乳酸排出量を計算し、解答用紙3-2の所定の欄にその値を記述しなさい。なお、細胞Aと細胞Bを培養した培地の全量はそれぞれ3 mLとし、単位はpmol/cellとすること。途中の計算の過程についても、その意図が第三者に分かるような形で、解答用紙3-2に記述しなさい。

大問3-3

細胞Aと細胞Bは、そのどちらかがコントロールHT29細胞であり、どちらかがMYC発現低下HT29細胞である。ここでMYC発現低下細胞は細胞Aと細胞Bのどちらであると考えられるか？その選択内容と理由について、解答用紙3-3の所定の欄にあわせて100字程度で記述しなさい。

大問3-4

本実験ではLDHの酵素反応を利用して試料中の乳酸測定を行っている。LDHは乳酸からピルビン酸への変換を触媒しており、がん細胞でもLDHの発現が認められる(図3-1を参照)。今回の実験では吸光度計による測定を行うため発色試薬としてWSTが反応系に混ぜられている。本実験では細胞培養液における乳酸濃度を測定したが、細胞を溶解して細胞内の乳酸量を測定することも理論上可能である。細胞を回収して測定サンプルを調製する際に、細胞内の乳酸量を正確に測定するために注意して行うべき点を解答用紙3-3の所定の欄に100字程度で記述しなさい。

大問3-5

がん細胞は不均一な細胞集団であり、培養細胞の中には様々な遺伝子変異を複数有する細胞集団が混在して存在している。大腸がん細胞を4日間培養し続けると培地中の乳酸量の増加が認められた。引き続き培地の交換なしに4日間大腸がん細胞を培養した後では4日目の培地中乳酸量と比べて減少が認められた。また、培地乳酸量の増加が認められた培養4日目の大腸がん細胞と培養8日目の培地乳酸量の減少が認められた大腸がん細胞の NAD^+/NADH 値を比較した場合、培地乳酸量の減少が認められた大腸がん細胞では NAD^+/NADH 値が減少していた。LDHによる乳酸からピルビン酸への変換は NAD^+/NADH 値によって可逆的に変化する。

近年ではがん細胞から放出された乳酸は再び一部のがん細胞に取り込まれエネルギー源として利用されていることが報告されている(Hui et al., *Nature* 2017)。 NAD^+/NADH 値が低い細胞は低pH培養条件において増えやすく、培養期間の違いでがん細胞内のLDH活性に変化はなかったと仮定し、8日間の培養期間で個々のがん細胞の形質に変化が認められなかった場合、培地中の乳酸量が減少した理由として考えられる内容を解答用紙3-3の所定の欄に200字程度で記述しなさい。なお、文章中には以下のキーワードを必ず含めること(キーワードの箇所に下線を引くこと)。

キーワード:

ピルビン酸 乳酸 NAD^+/NADH 値 不均一な細胞集団 低pH培養条件