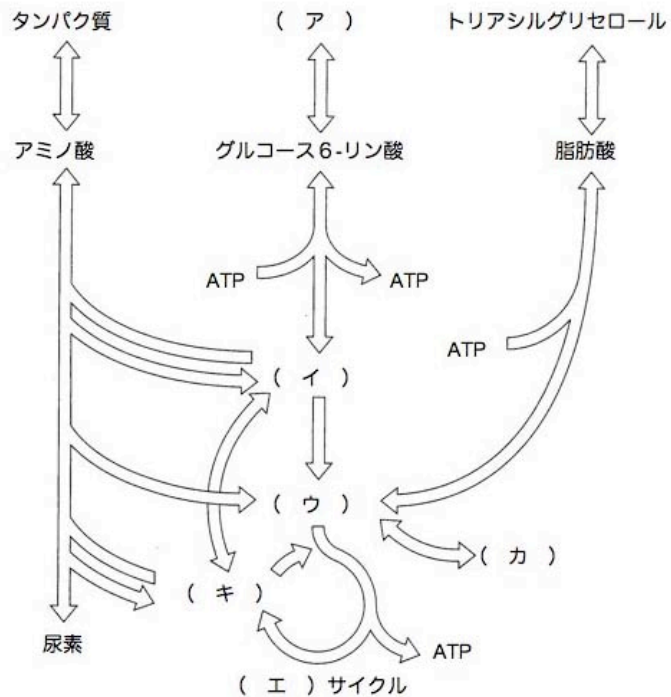


問題 1

問 1) 右の図はほ乳類における燃料分子の主要代謝経路を示している。図を参考にしながら以下の文章を読み、問に答えよ。

タンパク質、(ア)、トリアシルグリセロールはそれぞれ、アミノ酸、グルコース 6-リン酸 (G6P)、脂肪酸といった小分子単位から合成され、またこれらの小分子単位に分解される。これら小分子単位は酸化により ATP を生産し、これが代謝エネルギーを供給する。アミノ酸やグルコースの分解



産物である (イ) はさらに (ウ) に代謝された後、(エ) サイクルに入る。(ウ) は脂肪酸の (オ) によっても生じる。(ウ) は多くの末梢組織、特に心臓や骨格筋の重要なエネルギー源である (カ) にも変換される。(エ) サイクルの中間代謝物である (キ) は、ある種のアミノ酸や (イ) からも生成する。図中の双方向性の矢印はその経路がどちらの方向にも進みうることを表し、その方向は生成物の需要で決まる。しかし、この図に示す経路のほとんど全てを備えた器官は肝臓などに限られ、他の組織では一部の経路が働くにすぎない^(a)。従って、代謝物の生産は組織間で分業化されており、ある組織で生産できない代謝物は他組織から血液を介して賄われる。空腹時、血液にグルコースを供給するのは肝臓であり、そのグルコースは (ア) から生産される他、解糖生成物やアミノ酸などから (ク) と呼ばれる経路でも合成される。筋肉も (ア) を備蓄しているが、分解で生じた G6P をグルコースに変換できないため、それを血液中に放出できない^(b)。絶食で燃料分子が不足すると、筋タンパク質はアミノ酸に分解され燃料として消費される一方、肝臓に輸出されグルコースの合成に使われる。

(1) 文章中の (ア) ~ (ク) に最も適当と思われる語を入れよ。

(2) 下線部 (a) について、その理由を 50 字以内で述べよ。

(3) 下線部 (b) について、G6P はグルコースに変換されないと血液中に放

出できない理由を 50 字以内で述べよ。

(4) (エ) サイクルでは、生じるエネルギーの大半は 2 種類の還元型補酵素に蓄えられる。その化合物の名称と 1 サイクル(ウの 1 分子当たり)で生じるそれぞれの数を答えよ。

(5) トリアシルグリセロールの構造式をエステル結合がわかるように示せ。アルキル基は R で表すこと。

問 2) アミノ酸の性質に関連した以下の問に答えよ。

(1) 文中の (ア) ~ (エ) に適切な語句を入れよ。

正負両電荷をもつ化合物の電荷の総和が 0 となる pH を (ア) という。タンパク質は、(ア) より低い pH では (イ) に帯電し、高い pH では (ウ) に帯電している。特定の pH におけるタンパク質の静電的性質を利用して、細胞抽出液などから特定のタンパク質を精製する方法の一つに (エ) クロマトグラフィーがある。

(2) あるペプチドをトリプシンまたはブロモシアン (BrCN) で処理し完全に切断した。得られた断片のアミノ酸配列を決定したところ、次の結果を得た。以下の (a) ~ (d) に答えよ。

トリプシン処理で得られた断片の配列

断片 1 : Leu-His-Lys、断片 2 : Met-Tyr-Lys、断片 3 : Asp-Ala、
断片 4 : Pro-Trp-Met-Tyr-Lys

ブロモシアン処理で得られた断片の配列

断片 5 : Tyr-Lys-Asp-Ala、断片 6 : Pro-Trp-Met、
断片 7 : Tyr-Lys-Leu-His-Lys-Met

(a) 元のペプチドのアミノ酸配列を求めよ。

(b) 断片 7 の pH 7.4 と pH 5.0 それぞれにおける正味の電荷を計算し、最も近いと思われる整数値で答えよ。ただし、このペプチド中の各解離基の pK 値は次のとおりである。

N 末端 9.0、Lys 側鎖 10.5、His 側鎖 6.0、Tyr 側鎖 10.5、C 末端 3.5。

(c) 断片 1~7 の中で、280 nm のモル吸光度が最も大きいものはどれか。

(d) 断片 1~7 の中で、280 nm の吸収がほとんど見られないものはどれか。複数ある場合には全てを答えよ。

(3) DNA に結合するタンパク質であるヒストンには、どのようなアミノ酸が多く含まれるか。理由とともに 100 字程度で答えよ。

問題 2

問 1) 核酸に関する次の文章を読み、以下の問に答えよ。

核酸は、五炭糖、リン酸および塩基からなる。五炭糖には (ア) と (イ) の 2 種があり、リボ核酸 (RNA) には (ア)、デオキシリボ核酸 (DNA) には (イ) が含まれる。塩基には、プリン塩基である (ウ) と (エ)、ピリミジン塩基である (オ)、(カ) および (キ) があるが、(カ) は RNA にのみ使われ、(キ) は DNA にのみ使われる。五炭糖に塩基が結合した化合物を (ク) といい、(ク) にリン酸がエステル結合した化合物を (ケ) という。(ケ) どうしがリン酸基を介してポリヌクレオチド鎖をつくる。

DNA の最も重要な特徴は、2 本のポリヌクレオチド鎖が二重らせんの形に巻き合っていることである。二重らせんは、2 本のポリヌクレオチド鎖の塩基対の間に生じる (コ) によって結びついている。一方の鎖の (ウ) はつねに他方の鎖の (キ) と対をつくり、同様に (エ) はつねに (オ) とのみ対をつくり、これを相補的塩基対と呼ぶ。

DNA は、生体内で (サ) と呼ばれる酵素により、DNA そのものを鋳型にして複製される。このとき、リーディング鎖と (シ) 鎖で DNA を伸長する方法が異なることが知られている。

- (1) (ア) ~ (シ) にあてはまる語句を書きなさい。
- (2) 下線部の反応について、具体的にどこがどう異なるのか述べよ。
- (3) 複製によって倍加した後も、DNAは2重らせん構造を形成している。このとき、鋳型となったDNAと新しく合成されたDNAとの関係はどうなっているか説明せよ。

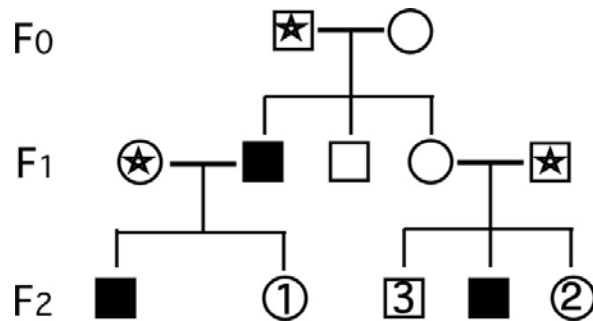
問 2) 下の (1) ~ (10) の文の内容について、正しい場合には○をつけ、間違っている場合には X をつけた上で下線部をどのように書き直せば正しくなるか答えよ。

[解答例 : (1) ○ (2) X、おおきくなる]

- (1) 減数第一分裂において、姉妹染色体は別々の方向に分配される。
- (2) ヒトの正常細胞では、細胞分裂の回数によらずテロメアの長さは一定に保たれている。
- (3) ヘテロクロマチンと呼ばれる染色体領域では、転写が活発に行われている。
- (4) アセチル化やウリジル化などのヒストンの化学修飾は、転写制御に非常に重要である。
- (5) 真核生物のtRNA遺伝子のほとんどは、RNAポリメラーゼIによって転写される。
- (6) ヒトのエキシソンの平均の長さは、イントロンの平均の長さより長い。

- (7) 真核生物のmRNAの普遍的な修飾であるキャップ構造は、mRNAが細胞質に輸送された後に3'末端に付加される。
- (8) ほとんどの生物種において、センスコドンの数はtRNAの種類の数と同じである。
- (9) 翻訳終結において、tRNAからポリペプチド鎖が解離する反応にはATPの加水分解が必須である。
- (10) miRNAによる発現抑制は、標的 mRNA の ORF に相補的な配列に依存する 場合がほとんどである。

問3) 右の図はある既知遺伝子 A の変異 a が引き起こす表現型 α について、ある家系で3代にわたって調べたものであるとする(四角は男性、丸は女性、白色は正常、黒色は表現型 α が現れたことを示す)。



変異 a があるかどうかを調べる分子生物学的解析に必要なサンプルの提供をお願いしたところ、星印のついた3人からそれぞれ提供を受け、解析の結果いずれの提供者も変異 a をもたないことが判明した。

なお、表現型 α は変異 a が無いときに現れることはなく、また現れる場合には 100%現れるものとする。さらに表現型 α に影響を与えるような別の変異は存在せず、F1 および F2 世代で新たな変異が生じることもなかったとする。以下の問に答えよ。

- (1) 下線部の方法についてどのようなものが考えられるか。具体的に述べよ。
- (2) 個人 1、2、3 が変異 a を持っている確率をそれぞれ予想せよ。
- (3) 今、個人 1 と個人 3 が結婚し、その子供として双子 (1 男 1 女) が生まれたとする。この子供たちが表現型 α を示す確率について予想せよ。
- (4) 変異 a の遺伝学的特徴および表現型 α との関係について推測せよ。

問題 3

- ・ 種子植物の体は、胚形成と後胚形成という二つの過程を経て形成される。ここではシロイヌナズナの形態形成を念頭において、以下の設問に答えよ。

問1) 植物の成熟胚は種子中で休眠している。植物の胚形成と動物(脊椎動物)の胚形成について、成体の形態形成という観点からそれらの違いについて述べよ(100字以内)。

問2) 上記のような種子の休眠と、発芽時における休眠の打破とに関わっている植物ホルモンの名称をそれぞれ述べよ。また、発芽に必要なもっとも重要な環境要因を一つあげよ。

問3) 胚形成過程では、茎頂端分裂組織(茎頂メリステム)と呼ばれている組織が分化するが、その形成や維持に関わっているシロイヌナズナの遺伝子の名称を二つあげよ。

問4) 上記のそれぞれの遺伝子が欠損した変異体は、発芽後どのような表現型を示すか、簡潔に述べよ。(70字以内)

問5) 子葉と葉は組織学的・形態学的には類似しているが、それらの形成は異なる仕組みによるという考え方がある。このような考え方の根拠となる生物学的知見を二つ述べよ。(150字以内)

問題 4

約 30 年前、ゼブラフィッシュは、短い世代交代時期と多産であることを重視され、脊椎動物で遺伝学的研究が可能なモデル動物として使い始められた。また、A 初期胚が透明で、発生の全期間にわたり組織・器官形成が観察でき、受精後 2,3 日でほとんどの器官形成が完了することも注目された。1990 年代に入り、変異原 B ethylnitrosourea (ENU) を用いた大規模変異体スクリーニングが行われ、胚葉形成・体軸形成など初期発生過程に異常を示す変異体が多数単離された。現在では、その変異体の責任遺伝子が C ポジショナルクローニング法 などによって明らかにされ、D 初期発生を制御する遺伝子カスケード が明らかになりつつある。

問 1) 下線 A のように、胚が透明であることからゼブラフィッシュは細胞系譜の解析に多く使われている。細胞系譜の解析方法について説明せよ。

問 2) 下線 B の ENU は DNA に点変異を導入するアルキル化剤であり、雄魚を ENU で処理すると精子の染色体 DNA に点変異が導入されることが知られている。劣性接合遺伝子及び劣性母性遺伝子変異体をスクリーニングする図式を作成せよ。

問 3) 劣性接合遺伝子変異体から責任遺伝子を同定するポジショナルクローニング法 (下線 C) について、簡潔に説明せよ。

問 4) 初期発生過程に異常を示す変異体 (下線 D) として、目が一つしかできない劣性接合遺伝子変異体 *cyclops*, *squint*, *one-eyed pinhead* が報告されている。*cyclops*, *squint* 遺伝子座は TGF- β ファミリーサイトカインである Nodal をコードする。*one-eyed pinhead* 遺伝子座は Nodal 受容体の構成タンパク質をコードしており、Nodal シグナルの伝達に必須である。Nodal の無い *cyclops*; *squint* の二重変異体では、一つ目であるとともに内胚葉全部及び体幹部の中胚葉が消失している。*cyclops*, *squint*, *one-eyed pinhead* の単独変異体では、中胚葉全体の大きな異常を伴わない。この三つの変異体においては、それぞれの遺伝子座がコードするタンパク質の機能は完全に欠損している。

(1) 初期発生における Nodal シグナルの役割を記載せよ。また、*cyclops*, *squint* の単独と二重変異体の表現型の違いを生み出すメカニズムを説明せよ。

(2) 上記のように、*one-eyed pinhead* 変異体と *cyclops*; *squint* 二重変異体の表現型には違いが見られる。その理由を説明するとともに、それを検証する方法を述べよ。

問題 5

脊椎動物の主な骨格筋は、脊髄に存在する運動神経細胞から伝えられる信号を受けて収縮する。その過程は以下の①から⑦の順に起こる。

- ① 運動神経細胞の細胞体近くで発生した(a)電位という電気信号が(b)を伝わって神経終末に達する(図1)。
- ② (a)電位は主に電位依存性の(c)チャネルや(d)チャネルの働きで発生するが、神経終末では(e)チャネルも開き、(e)イオンが神経終末に流入する。
- ③ その結果、伝達物質(f)を貯蔵していた(g)が細胞膜と融合して、伝達物質が神経終末から放出される。
- ④ 放出された伝達物質が筋細胞のシナプス部(神経筋接合部)に存在する受容体に結合すると、受容体のチャネルが開いて、陽イオンが細胞内に流入する。
- ⑤ その結果、筋細胞が脱分極し閾値を越えると(a)電位が発生する。
- ⑥ その電氣的興奮は細胞膜が内部に入り込んだ(h)に伝わり、筋原繊維を網タイツのように包んでいる(i)という構造に伝えられ、そこから大量の(j)イオンが細胞質に放出される。
- ⑦ このようにして筋細胞の中の(j)イオン濃度が上昇すると、筋原繊維を構成する「細いフィラメント」と「太いフィラメント」の間に相互作用が起こり、筋は収縮する。

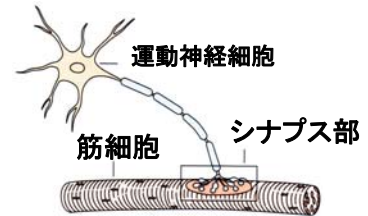


図1

問1) 上の(a)～(j)に当てはまる語句を書け(同じ語句を何度用いても良い)。(f)は伝達物質名を答えよ。

問2) 神経細胞と筋細胞は、静止状態では主にカリウムイオン(K^+)の平衡電位で決められる静止膜電位を示す。以下の問いに答えよ。

(1) 温度を 20°C に保った細胞内の K^+ 濃度が 400 mM で細胞外の K^+ 濃度が 20 mM のとき、 K^+ の平衡電位は -75 mV であった。細胞外液の K^+ 濃度を2倍にしたとき、 K^+ の平衡電位はどちらへどれだけ変化するか?(有効数字2桁)。ただし、 $\log_{10}2=0.3$ とせよ。

(2) 実際の神経細胞や筋細胞の静止膜電位は K^+ の平衡電位より、少し脱分極側にシフトしている。その理由を簡単に述べよ。

問3) 運動神経細胞から放出された伝達物質が、筋細胞の受容体に結合すると、受容体のチャネルをナトリウムイオンとカリウムイオンが通過する。

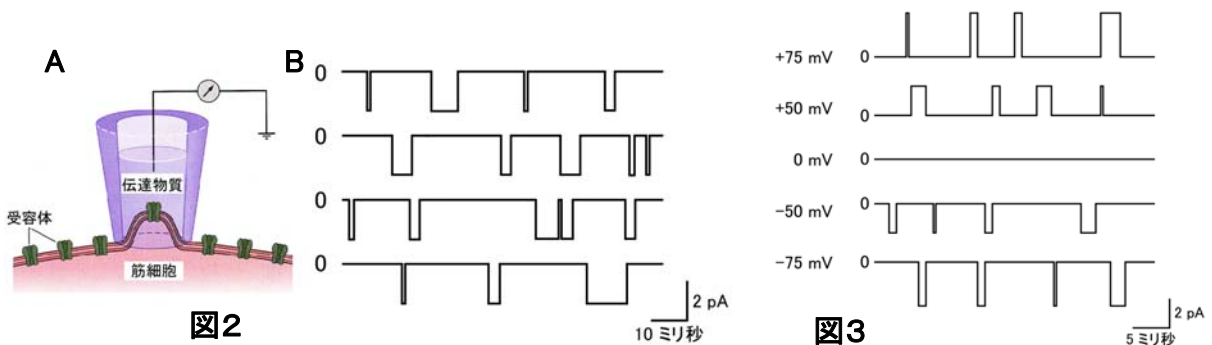


図2は運動神経細胞の伝達物質を含んだ液をガラス管（パッチ電極）につめて(A)、一定の膜電位のもとで1個の受容体チャネルを流れる電流を記録したものである(B)。また、図3は異なる5種類の膜電位でそのチャネルを流れる電流を測定した記録であり、筋細胞へ流れ込む電流（内向き電流）の向きを下向きに表している。以下の問いに答えよ。

(1) 図2Bに示すチャネルの開閉の仕方について、2つの特徴を簡潔に述べよ。

(2) 図3において膜電位 0 mV のとき、電流が観測されないのはなぜか？ その理由を述べよ。

(3) このチャネルを通過するイオン流の向きと大きさは、筋細胞の膜電位とそれぞれのイオンの平衡電位に従う。筋細胞の膜電位 (V_m) とこのチャネルを流れるナトリウムイオン流 I_{Na} およびカリウムイオン流 I_K の関係をグラフに表せ。

グラフは膜電位 (V_m) を X 軸とし、イオン流 (I_{Na} , I_K) を Y 軸とせよ。筋細胞へ流れ込むイオン流の符号を負、流れ出すイオン流を正として表せ。

ただし、筋細胞内の Na^+ 濃度は 50 mM、 K^+ 濃度は 400 mM、細胞外の Na^+ 濃度は 400 mM、 K^+ 濃度は 20 mM、温度は 20°C である。

(4) (3) で描いた I_{Na} および I_K のグラフの X 切片の値をグラフの中に書き込め（有効数字 2 桁）。また、 I_{Na} と I_K のグラフの Y 切片は 2 つの比がわかるように示せ。

問題 6

光合成について以下の問いに答えよ。必要に応じ次ページの数値表を利用せよ。また計算は有効数字 2 桁まで求めれば良いが、数値のみでなく、計算の根拠が判るように式も記入すること。

問 1) 光合成の明反応は 2 つの反応系 (光化学系 I と光化学系 II) の共役で行われている。この共役の発見のきっかけになったのは Red-drop という現象とエマーソン効果と呼ばれる現象であった。それぞれの現象を説明し、Z スキームとよばれる 2 つの反応系の共役が提案された経緯を説明せよ。

問 2) 光化学系の共役により初めて実現された重要な生化学反応を挙げ、その意義について説明せよ。また、生命の進化過程において、この共役はどのような生物によって実現され、その後の生命進化にどのような影響を与えたかを述べよ。

問 3) 1 つの葉緑体を円筒形と仮定し、円筒の軸方向に 675 nm の光を強度 $42 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ で照射した (円筒の厚みは $2 \mu\text{m}$ とする)。葉緑体には $20 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ の濃度でクロロフィルが含まれるとし、クロロフィルの 675 nm でのモル吸光係数 ϵ_{675} は $0.60 \times 10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ とする。以下の問いに答えよ。

(1) 葉緑体に入射した光のクロロフィルによる吸光度を求めよ。この時、葉緑体を照射した光のうち、クロロフィルに吸収される光は何パーセントになるか示せ。なお、吸光度は入射光と透過光の比の対数 (底を 10) であることに注意せよ。

(2) 1 つの葉緑体に吸収される光 (フォトン) の量を $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で示せ。なお、1 mol の 675 nm のフォトンの持つエネルギーは $176 \times 10^3 \text{ J mol}^{-1}$ とする。つぎに、この光を吸収する葉緑体内のクロロフィルの単位面積当たりの量を $\mu\text{mol m}^{-2}$ で示せ。

(3) フォトン吸収したクロロフィルは励起される。(2) の条件で、クロロフィルは 1 秒間に平均何回励起されるか示せ。

x	10^{-x}	x	10^{-x}
0.10	0.79	0.51	0.31
0.11	0.78	0.52	0.30
0.12	0.76	0.53	0.30
0.13	0.74	0.54	0.29
0.14	0.72	0.55	0.28
0.15	0.71	0.56	0.28
0.16	0.69	0.57	0.27
0.17	0.68	0.58	0.26
0.18	0.66	0.59	0.26
0.19	0.65	0.60	0.25
0.20	0.63	0.61	0.25
0.21	0.62	0.62	0.24
0.22	0.60	0.63	0.23
0.23	0.59	0.64	0.23
0.24	0.58	0.65	0.22
0.25	0.56	0.66	0.22
0.26	0.55	0.67	0.21
0.27	0.54	0.68	0.21
0.28	0.52	0.69	0.20
0.29	0.51	0.70	0.20
0.30	0.50	0.71	0.19
0.31	0.49	0.72	0.19
0.32	0.48	0.73	0.19
0.33	0.47	0.74	0.18
0.34	0.46	0.75	0.18
0.35	0.45	0.76	0.17
0.36	0.44	0.77	0.17
0.37	0.43	0.78	0.17
0.38	0.42	0.79	0.16
0.39	0.41	0.80	0.16
0.40	0.40	0.81	0.15
0.41	0.39	0.82	0.15
0.42	0.38	0.83	0.15
0.43	0.37	0.84	0.14
0.44	0.36	0.85	0.14
0.45	0.35	0.86	0.14
0.46	0.35	0.87	0.13
0.47	0.34	0.88	0.13
0.48	0.33	0.89	0.13
0.49	0.32	0.90	0.13
0.50	0.32	0.91	0.12

問題 7

次の文章を読んで、以下の問 1) から問 5) に答えよ。

酸素運搬体であるヘモグロビン(Hb)は α サブユニットと β サブユニットそれぞれ 2 つから構成される四量体構造 ($\alpha\beta$ ペアの二量体) である。各サブユニットは 2 個の Fe 原子を中央に配位したヘムを含み、酸素はヘムの Fe 原子に配位する。Hb の α サブユニットと β サブユニット、及び、ミオグロビン(Mb)は相同タンパク質である。酸素と Mb の結合は単純な平衡反応であり、酸素解離曲線は双曲線型となる (図 1; 曲線 A)。一方、酸素は Hb に協同的に結合し、酸素解離曲線はシグモイド型となる (図 1; 曲線 B)。また、ボーア効果として知られているように、Hb の酸素解離曲線は pH によって変わる (図 2)。

Mb と Hb の α サブユニットと β サブユニットは 8 本のヘリックス (N 端側から A~H とよばれる) からなる (但し、 α サブユニットにはヘリックス D が無い)。ヘムは E ヘリックスと F ヘリックスがつくる疎水ポケットにおさまっている。ヘム Fe の 5 番目の配位子は F ヘリックスのヒスチジン残基である。酸素はヘム Fe に配位し、かつ、E ヘリックスのヒスチジン残基と水素結合する。酸素を結合していない Hb (デオキシ Hb) と酸素を結合した Hb (オキシ Hb) が結晶構造解析され、4 次構造 (4 つのサブユニットの配置) が異なることが分かった。デオキシ Hb とオキシ Hb の 4 次構造をそれぞれ T 状態と R 状態とよぶ。

T 状態では、ヘム Fe はポルフィリン平面から F ヘリックス側へ飛び出ている、酸素結合能が低い。また、 α サブユニットの C 端アルギニン残基は別のサブユニットにある特定のアスパラギン酸残基と、そして、 β サブユニットの C 端ヒスチジン残基は同じサブユニットにある特定のアスパラギン酸残基とイオン対を作っている。

R 状態では、ヘム Fe はポルフィリン平面にあって、酸素結合能が高い。また、T 状態と比べて 4 つのサブユニットの配置が異なり、C 端のアルギニン残基とヒスチジン残基はイオン対を作っていた相手と引き離されている。

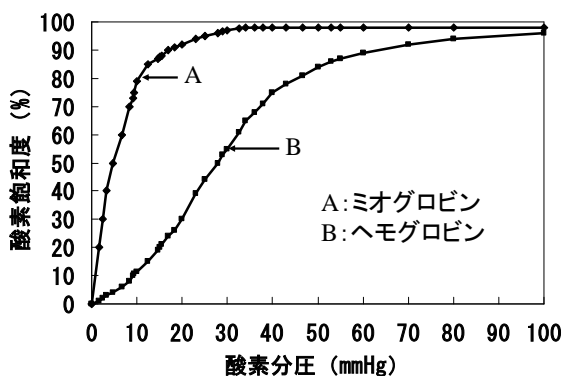


図 1. Mb と Hb の酸素解離曲線

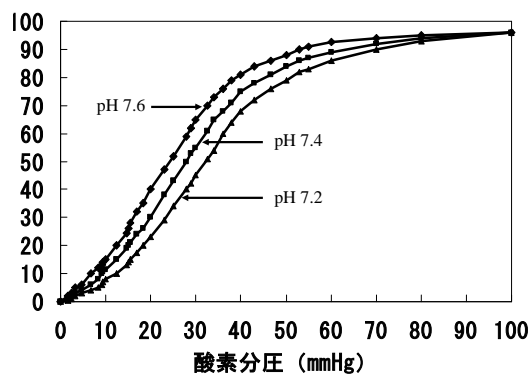


図 2. Hb の酸素解離曲線に対する pH の影響

問 1) 次の文章の空欄 (ア) から (ケ) に入る適切な語句を以下から選べ。但し、同じ用語が入る場合がある。

酸素が Hb に協同的に結合する現象はアロステリック相互作用による。一般に、タンパク質へのリガンド A の特異的部位への結合が別のリガンド B の他の部位への結合によって影響される場合、アロステリック相互作用があるという。この別のリガンド B を (ア) という。リガンド A とリガンド B が同じ場合を (イ) 効果、異なる場合を (ウ) 効果という。リガンド B がリガンド A の親和性を増す場合、リガンド B は (エ) の (オ) という。リガンド B がリガンド A の親和性を減らす場合、リガンド B は (カ) の (キ) という。Hb の場合、酸素は、(ク) の (ケ) な (コ) である。

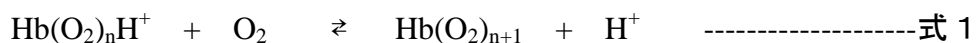
語句：基質、特殊、ホモトロピック、抗原、ビタミン、エフェクター、正、逆、負、機能、ヘテロトロピック、酵素、相乗、抑制、オリゴマー

問 2) ヘモグロビンの二つの $\alpha\beta$ ペアは 2 回対称の関係にあると言われる。2 回対称とは何か、30 字以内で説明せよ。

問 3) シグモイド型の酸素解離曲線から T 状態の酸素解離曲線と R 状態の酸素解離曲線を推定せよ。

解答用紙にヘモグロビン解離曲線を図 1 にならって描き、そこに T 状態の酸素解離曲線と R 状態の酸素解離曲線を描け。

問 4) 生理的条件下の pH 7.4 付近で T 状態へ酸素が結合して R 状態になると、以下の式 1 のようにヘモグロビンからプロトンが放出される。



ここで、n は 0, 1, 2, 3 である。

(1) T 状態と R 状態の構造比較からプロトン放出に関与するアミノ酸残基を予想して記せ。また、その理由を 100 字以内で述べよ。

(2) 式 1 を用いて図 2 の酸素解離曲線に対する pH の影響を 80 字以内で説明せよ。

問 5) ボーア効果には、酸素を肺から末端の組織に運び、細胞呼吸で生じる二酸化炭素を肺へ持ち帰るという生理機能がある。次の用語をすべて使って、酸素と二酸化炭素の輸送におけるボーア効果の役割を 250 字以内で説明せよ。

用語：肺、組織、酸素分圧、細胞呼吸、二酸化炭素、酸素、炭酸脱水酵素

問題 8

以下の文章を読んで、問1)～問5)に答えよ。

真核生物のDNA複製は細胞周期に一度だけ起きるように厳密に制御されている。複数の複製開始点を持ち、それらがS期の中に順次複製を開始する真核生物では、一度複製を開始した複製開始点と同じ細胞周期で二度と複製開始しないことが重要である。複製開始点の制御は、比較的短い複製開始点の配列が同定されている出芽酵母を用いてよく研究されている。細胞周期で出芽酵母の複製開始点の一つである *ARS1*(autonomously replicating sequence 1)にタンパク質がどのように結合しているかを、DNA結合タンパク質が結合した状態の出芽酵母染色体を鋳型として、DNA footprint法を用いて調べた(図1)。その結果、細胞周期をG1期に同調した際には図1の①のパターン、細胞周期をG2/M期に同調した場合には図1の②のパターンを得た。また、G1期に同調した細胞の細胞周期を進行させたところ、DNA複製の開始に伴って、①から②のパターンに変換されることがわかった。複製開始点に結合するタンパク質複合体としてORC(origin recognition complex)が同定されていたが、*in vitro*でORCを複製開始点に結合させたところ②のパターンとほぼ同一のパターンを得た。

G2/M期の細胞は高いCDK(cyclin-dependent kinase)活性を保持していることが知られている。そこで、G2/M期の細胞にCDKインヒビターであるSic1と呼ばれるタンパク質を発現させたところ、CDK活性の減少が認められfootprintのパターンは②から①になったが、それだけでは再複製は起こらなかった。さらにその後Sic1の発現を抑制したところ、CDKの活性化が認められDNAの再複製が観察された。

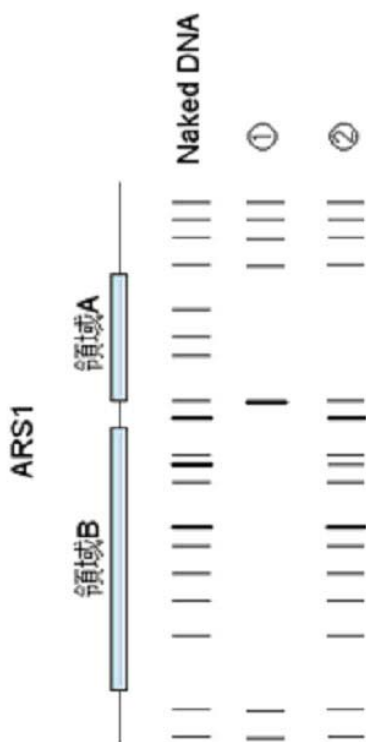


図1 DNA footprint 法による *ARS1* 結合タンパク質の解析。出芽酵母染色体を単離しヌクレアーゼ処理した後、放射性同位元素でラベルした *ARS1* プライマーDNA を用いてプライマー伸長法を行った。得られた DNA 断片を電気泳動しゲル中の放射能を検出している。左に示しているのは *ARS1* の構造の模式図。領域 A および B は複製活性に特に重要な領域を示している。Naked DNA はヌクレアーゼ処理前に除タンパク質操作を行ったことを示す。

問1) 出芽酵母の複製開始点 *ARS1* は、どのように同定されたと考えられるか、以下の語句を用いて説明せよ。

プラスミド、選択マーカー、ゲノム断片

問2) あるタンパク質が特定の DNA の塩基配列に結合するかどうか調べる方法を DNA footprint 法以外に2つ挙げ、その原理を含めて簡潔に述べよ。

問3) 下線部1から、G1期およびG2/M期に、複製開始点上にどのようなタンパク質複合体が形成されていると考えられるか模式図を用いて示し、またそのとき複製開始点が複製開始可能かどうか、その状態を示せ。

問4) 下線部2から、CDKの活性がDNA複製の開始と再複製阻止をそれぞれどのように制御していると考えられるか説明せよ。

問5) 最近、出芽酵母で、変異を導入した複製関連タンパク質を一過的に発現することにより再複製を起こし致死となる例がいくつか報告されている。ある場合は、CDK活性が高い状態で、ある場合はCDK活性が無い状態で再複製が誘導される。それぞれ、どのような複製タンパク質にどのような変異が導入されていると考えられるか推測せよ。

問題 9

24時間周期の概日リズムを示す真核生物が存在する。この生物を用いて、概日リズムに関連する遺伝子を同定するために下に示す実験を行った。ただし、以下の点に留意すること。

- ・この生物は2倍体ゲノムを持つことが知られており、その全塩基配列は既に決定されているものとする。
- ・この生物は複数本の染色体を持ち、いずれの染色体も組換えを起こすのに十分なサイズがあるものとする。
- ・細胞外から移入されたDNA断片は核ゲノム上のランダムな部位に1コピーだけ挿入されてその部位の遺伝子を破壊する。その結果生じる変異株はヘテロ接合体となるものとする。
- ・挿入されたDNA断片は欠失することなくゲノム上で保持されるものとする。
- ・形質転換時に形質転換DNAの挿入以外に予期せぬ変異が起こる可能性はあるものとする。

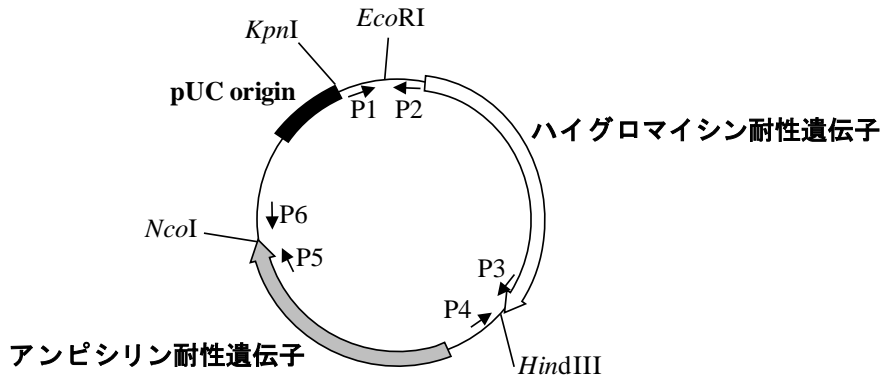
実験1) 図1はマーカー遺伝子を含むプラスミドの模式図である。このプラスミドを *EcoRI* で消化して直鎖状にしたものを形質転換に用いた。形質転換体はハイグロマイシン存在下で選択した。

実験2) 得られた形質転換体を概日リズムの表現型でスクリーニングし、リズムの周期が22時間に短縮された変異株を2株得た(変異株a、変異株b)。

実験3) 変異株a、bをそれぞれ野生株に戻し交配し、得られた子孫の表現型を調べた。結果を表1に示す。さらに、変異株a、bそれぞれにおいて、得られた子孫のうち22時間周期を示し且つハイグロマイシン耐性の子孫で交配を行った。その結果を表2に示す(変異株a、変異株bの子孫をそれぞれ子孫a、子孫bと表す)。

実験4) プラスミドレスキュー法により、挿入DNAを含むゲノムDNA断片を得た。このDNAを用いて挿入DNA断片に隣接するゲノムDNA配列を決定した。その配列を全ゲノム配列のデータベースと照らし合わせた結果、変異株aは遺伝子X、変異株bは遺伝子YのORFに形質転換DNAが挿入されていることがわかった。

図 1



- 注 1、このプラスミドには *Pst*I の認識配列は存在しない。
 2、P1~P6 はプライマーの位置を示す。
 3、ハイグロマイシン耐性遺伝子は真核生物型のプロモーターとターミネーターを持つ。
 4、アンピシリン耐性遺伝子は原核生物型のプロモーターとターミネーターを持つ。

表 1

	22時間周期	24時間周期
♂変異株a × ♀野生株	489個体 (489個体)	495個体 (0個体)
♂変異株b × ♀野生株	501個体 (249個体)	496個体 (246個体)

※表1、表2ともに、括弧内の数字はそれぞれのリズム表現型の子孫のうち、ハイグロマイシン耐性である個体の数を表している。

表 2

	20時間周期	22時間周期	24時間周期
♂子孫a × ♀子孫a	250個体 (250個体)	498個体 (498個体)	252個体 (0個体)
♂子孫b × ♀子孫b		750個体 (561個体)	246個体 (184個体)

問 1) 変異株 a、変異株 b それぞれに関して、短周期遺伝子の野生型対立遺伝子に対する遺伝学的な優劣を答えよ。

問 2) 実験 4 のプラスミドレスキュー法で挿入 DNA を含むゲノム断片を回収し、隣接するゲノム配列を決定する方法を述べよ。その際、図 1 を参照して具体的な制限酵素名、抗生物質名、プライマー名を記載すること。

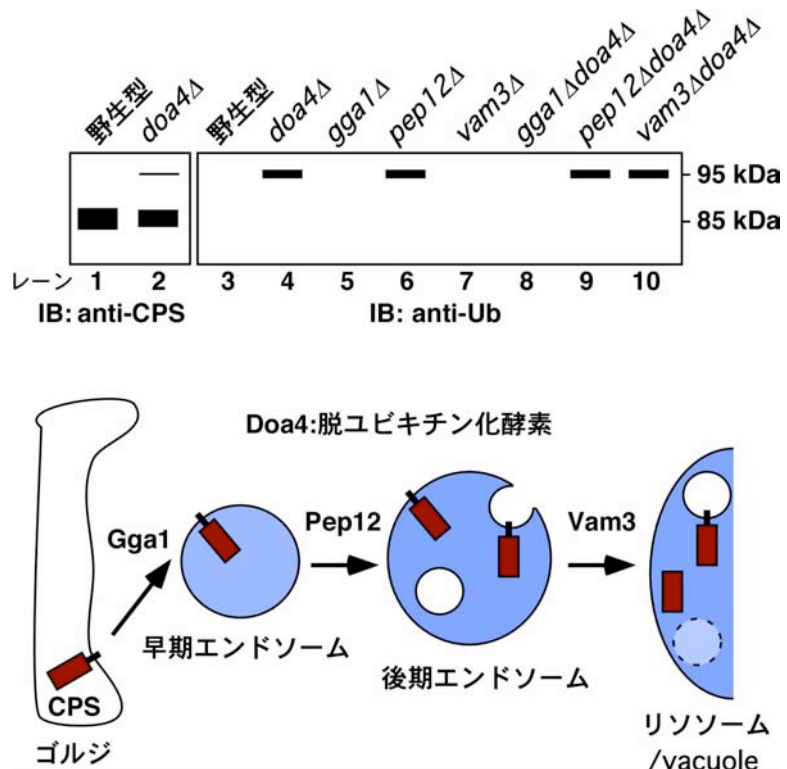
問 3) 短周期変異の原因遺伝子である可能性が高いのは遺伝子 X と遺伝子 Y のどちらか。理由を含めて述べよ。

問 4) もし、問 3 で解答した遺伝子が原因遺伝子ではないとしたら、どのような可能性が考えられるか述べよ。

問題 10

出芽酵母 CPS (carboxypeptidase S) は、リソソーム (vacuole) で機能する加水分解酵素である。CPS は前駆体タンパク質として合成された後、ゴルジ体から早期エンドソーム、後期エンドソームを経てリソソームへと運ばれ、成熟体タンパク質となって機能する。この輸送には CPS のユビキチン化が重要な働きをしていることが知られている。CPS のユビキチン化がどの段階でおきているのか調べるために、以下の変異体を用いて検討した。Gga1 はゴルジ体から早期エンドソーム移行に、Pep12 は早期エンドソームから後期エンドソーム移行に、Vam3 は後期エンドソームからリソソームへの移行に必須な遺伝子である。また Doa4 は脱ユビキチン化酵素である。*doa4Δ*、*gga1Δ*、*pep12Δ*、*vam3Δ* は各遺伝子が欠損した変異体酵母を、*gga1Δdoa4Δ*、*pep12Δdoa4Δ*、*vam3Δdoa4Δ* は二重変異体酵母を示している。図の結果をみながら以下の問いに答えなさい。

問1) 野生型酵母及び各変異体酵母から細胞抽出液を調製し、前駆体 CPS を特異的に認識する抗 CPS 抗体 (anti-CPS) で免疫沈降後、レーン 1、2 は抗 CPS 抗体で、レーン 3-10 は抗ユビキチン抗体 (anti-Ub) でイムノブロッティング (IB) した。各レーンには同じ量のタンパク質を泳動している。



(1) レーン3で野生型ではバンドが検出されなかった。このことからどのようなことが考えられるか。レーン1、2、4の結果も参考にして述べなさい

い。

(2) GPS のユビキチン化は輸送のどのステップでおきていると考えられるか。理由とともに答えなさい。

問2) Doa4 は脱ユビキチン化酵素である。

(1) *vam3Δ* と *vam3Δdoa4Δ* の結果からわかることを答えなさい。

(2) *pep12Δ* と *pep12Δdoa4Δ* の結果からわかることを答えなさい。

(3) Doa4 は輸送のどのステップで機能していると考えられるか答えなさい。

問3) これまでの研究から、ゴルジ体から後期エンドソームへと移行するタンパク質のすべてがユビキチン化されるわけではないことがわかっている。リソソーム (vacuole) への移行におけるユビキチン化の役割を明らかにするための実験を2つ考察しなさい。

問題 1 1

庭に生えている植物よりタンパク質Xを抽出・精製し、その特性を研究室で詳しく分析した。このタンパク質Xについて以下の問いに答えよ。

問1) タンパク質Xを精製したところ、1 mLの緩衝液に12 mg含まれることがわかった。この溶液を光路長1 cmの光学セルに入れて可視吸収スペクトルを測定したところ、440 nmに吸光度が1.0となる吸収極大を示した。タンパク質Xの440 nmにおけるモル吸光係数($L \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$)を求めよ。ただし、タンパク質Xの分子質量は120 kDaとする。

問2) 次の文章中の空欄 ~ に入る語の組み合わせとして最も適切ものを、次の①~⑥のうちから一つ選べ。

可視吸収スペクトルから、タンパク質Xが440 nmを極大とする吸収帯を持つことが判明した。この吸収帯では主に の光が吸収されるため、結果として、タンパク質Xは を呈すると予測できる。 と の関係は と呼ばれる。

- ① A : 青色、B : 黄色、C : 補色
- ② A : 青色、B : 青色、C : 対色
- ③ A : 緑色、B : 赤色、C : 補色
- ④ A : 緑色、B : 紫色、C : 退色
- ⑤ A : 赤色、B : 青色、C : 対色
- ⑥ A : 赤色、B : 黄色、C : 退色

問3) 以下の文章中の空欄 ~ に適当な語句を入れよ。

タンパク質Xの2次構造を分析するために を測定すると、215nmに負の極大を示した。また赤外吸収分光測定を行ったところ、 1630cm^{-1} に吸収帯を示したことから、タンパク質Xは2次構造の1つである を多く含むものと予想される。赤外吸収分光法はラマン散乱分光法などと併せて、化学結合の 情報を鋭敏に反映することから 分光法とも呼ばれる。

タンパク質Xを質量分析計で測定したところ、分子量400程度の低分子Yが含まれ、この低分子Yが の光を吸収する源であることが判明した。このように折り畳まれたポリペプチド鎖に捕捉された低分子Yの事を と言い、 を含まないタンパク質は タンパク質、含むタンパク質は タンパク質と呼ばれる。

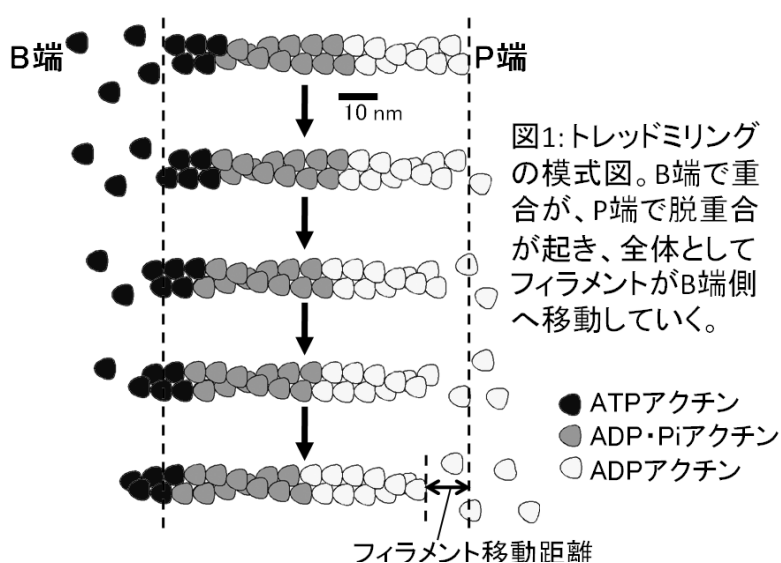
問4) タンパク質と低分子Yを、それぞれ C_X 、 C_Y の濃度で別個に調製した。2つの溶液を1対1の体積比で混合して赤外分光測定を行ったところ、 タンパク質と タンパク質が等濃度で混在していることが確認された。 タンパク質と低分子Yの結合比を1対1とした場合の解離定数(K_D)を C_X と C_Y を用いて表わせ。

(H 及び I は問3の H 及び I に対応するものとする)

問5) タンパク質Xにレーザー光をパルス照射すると、瞬時に色の異なる中間化学種(Z)へと励起され、ある時間の後にもとの色(基底状態G)へ戻った。Z → Gへの反応速度定数を k 、Zの濃度を $[Z]$ として、この緩和反応を記述する微分方程式を立てよ。

また、励起された分子の大部分(99.9%)がもとの色を呈するまでに要する時間は、励起された分子の半分(50.0%)がもとの色を呈するまでの時間の何倍か求めよ(必要に応じて、 $\ln 10 / \ln 2 = 3.334$ と近似して良い)。

問題 12



このとき、アクチンフィラメントの平均重合速度を測ることができる。しかし、しばらく置くと、溶液中のアクチンフィラメントの量は変化しなくなる。

アクチンフィラメントの両端は異なる性質を持ち、それぞれB端、P端と呼ばれる。アクチンはATP また ADP を結合し、ATP 状態のフィラメントのほうが安定である。ATP はフィラメントの中で加水分解され、ADP・Pi を経て ADP になる。ADP 状態のフィラメントは不安定になる。重合が進んで溶液中の単量体が少なくなると、B 端、P 端の重合、脱重合速度の違いから、B 端で ATP をもったアクチン単量体が重合し、フィラメントの中で ATP が加水分解されて、P 端から ADP アクチンが脱重合するようになる。その結果、アクチンフィラメントは P 端側から B 端側へ長さを一定に保ったまま移動する(図1)。このアクチンフィラメントの動態をトレッドミリングと呼ぶ。これが起こるようになると、重合と脱重合が釣り合い、溶液中のアクチンフィラメントの量はほぼ変化しなくなる。ちなみに、さらに時間をおいて、単量体アクチンの多くが ADP を結合するようになってくると、フィラメント量は減少する。

問1) トレッドミリングをはじめとするアクチンの重合、脱重合現象は、真核細胞の中で多様な役割を果たしている。アクチンの重合、脱重合が関与する生命現象を二つ挙げよ。

問2) B 端、P 端での重合速度定数を、 k_{b+} ($M^{-1}s^{-1}$)、 k_{p+} ($M^{-1}s^{-1}$) とする。このとき、B 端、P 端の重合速度 (単位時間あたりに一つの端に結合する平均分子数) はそれぞれ k_{b+} [アクチン単量体濃度] (s^{-1})、 k_{p+} [アクチン単量

アクチンは、単量体が重合してフィラメントを作る。アクチンはイオン強度が低いと単量体になり、生理的イオン強度ではフィラメント状態になる。イオン強度が低い状態に塩を加えることで、アクチンは重合を開始する。ATP を結合している状態で重合開始すると、最初は溶液中

体濃度] (s^{-1}) である。また、B 端、P 端の脱重合速度(単位時間あたりに一つの端から解離する平均分子数)をそれぞれ k_{B-} (s^{-1})、 k_{P-} (s^{-1}) とする (図 2)。

(1) B 端において、重合速度と脱重合速度が等しくなるアクチン単量体濃度を k_{B+} 、 k_{B-} を用いて表せ。この濃度を (B 端の) 臨界濃度と呼ぶことにする。

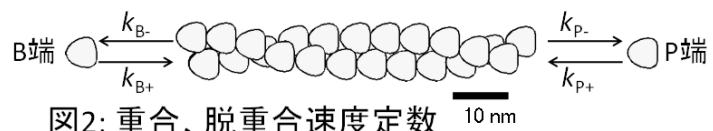
(2) 溶液中のアクチン (フィラメント内部も含む) がすべて ADP を結合しているとき、(a)-(d) の等式のうち一つが成り立つ (ADP だけの状態でもフィラメントは不安定であるが存在する)。どれか。またその理由を以下の 6 つの単語のうち一つ以上を用いて答えよ。“トレッドミリング”、“仕事”、“臨界濃度”、“ATP の加水分解”、“平衡定数”、“自由エネルギー”

(a): $k_{B-} k_{B+} = k_{P-} k_{P+}$

(b): $k_{B-} - k_{B+} = k_{P-} - k_{P+}$

(c): $k_{B-} / k_{B+} = k_{P-} / k_{P+}$

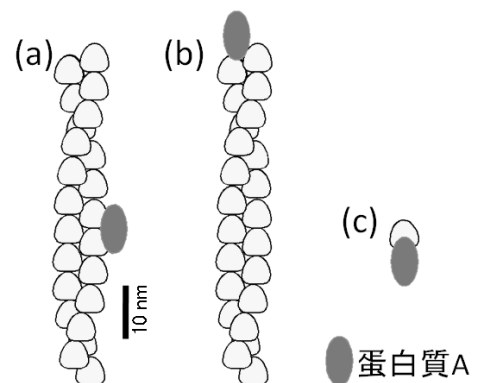
(d): $k_{B-} + k_{B+} = k_{P-} + k_{P+}$



ある未知のアクチン結合タンパク質 A の性質を調べるため、 $10 \mu M$ のアクチンが重合中の溶液 1 ml に $4 \mu M$ のタンパク質 A 溶液 0.1 ml または、タンパク質を含まない溶液 0.1 ml を加えて、両者で平均重合速度を比べた。タンパク質を含まない溶液を加えた場合、加える前と速度にほとんど変化はなかったが、タンパク質 A を含んだ溶液を加えた方は、含まない溶液を加えた場合に比べて速度が $1/5$ 以下に低下した。重合中のアクチン溶液および追加する二つの溶液における、タンパク質以外の溶液条件はすべて同じである。

問 3) タンパク質 A がアクチンと何らかの安定した結合を作り、重合速度測定中にはほとんど解離しないこと、タンパク質 A の大きさは、最も長い軸でも 10 nm を越えないことが別の実験から分かっている。タンパク質 A の結合場所としてもっとも可能性が高いのはどこか。その理由も述べよ。

- (a) アクチンフィラメント側面
- (b) アクチンフィラメントの端
- (c) アクチン単量体。



問 4) タンパク質 A の結合場所が (a)-(c) のどれであることをより正確に決定するにはどうしたらよいか? 一連の実験を提案せよ (提案の理由も述べよ)。また、(a)-(c) それぞれの場合に、提案した実験から期待できる結果を述べよ。