

[ 生化学・分子生物学 II ( 専門 ) ] ( 全 2 題 )

[ 問題 1 ]

次の文章を読み、問に答えよ。

研究室では、タンパク質の耐熱化に関する研究を行っている。大腸菌の酵素 A ( アミノ酸 B の生合成に関わる酵素 ) の、熱 ( 高温 ) に耐性を示す変異体を作製・解析するため、次の研究計画を立てた。

- 1) 酵素 A の遺伝子 ( 遺伝子 a と呼ぶことにする ) を持つプラスミドを作製する。
- 2) 遺伝子 a 内に無作為に変異を導入する。これら変異プラスミド群を好熱菌に導入する。これらのプラスミドを持つ好熱菌群の中から アミノ酸 B を含まない培地中で 60 で生育可能となった菌株 <sup>(2)</sup> を選別する。
- 3) 選別した好熱菌において、遺伝子 a が変化していることを確認する <sup>(3)</sup>。
- 4) 変異した遺伝子 a を持つプラスミドを大腸菌に導入する。そして、変異型酵素 A を大腸菌中で大量に生産させ、その細胞質抽出液より、変異型酵素を精製する <sup>(4)</sup>。
- 5) 精製した酵素 A ( 野生型・変異型 ) を用いて、酵素化学的、物理化学的な性質を調べる <sup>(5)</sup>。

注意)

- i) この実験に用いる好熱菌は、自身のアミノ酸 B 合成酵素の遺伝子を破壊してある。
- ii) この好熱菌の至適生育温度は 60 ~ 70 ，大腸菌の至適生育温度は 30 ~ 42 である。

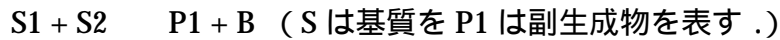
問 A 下線部 2 の方法によって、耐熱性を獲得した変異型酵素 A を得る計画である。何故それが可能か簡単に説明せよ。

問 B 選別した菌内の遺伝子 a が変化していることを調べる ( 下線部 3 ) には、どのようにすればよいかを記せ。

問 C 予測される変異型酵素の性質に基づいて、その精製を進めたい ( 下線部 4 )。有効であると思われる方法を 1 つ挙げよ。

問 D 精製した野生型・変異型両酵素を用いて次の実験を行った ( 下線部 5 ) .

酵素 A は次の反応を触媒する .



基質 S2 が過剰に存在する条件で , 基質 S1 の濃度を変化させ , 37 °C で各精製酵素の反応初速度を測定したところ , 表 1 の結果を得た .

( ア ) この結果をもとに , 野生型 , 変異型各酵素の基質 S1 に対する見かけの  $K_m$  値 ( $\mu\text{M}$ ) ,  $k_{\text{cat}}$  値 ( $\text{s}^{-1}$ ) を添付のグラフ用紙を用いて求めよ . ( グラフ用紙には受験番号を記入し , 解答用紙と共に提出すること . ) なお , 使用した酵素の濃度は , 野生型酵素は  $0.1 \mu\text{M}$  , 変異型酵素は  $0.2 \mu\text{M}$  である . 酵素 A は単量体として働き , 1 分子当たり活性中心を 1 つ持つ .

( イ ) 変異によって , 酵素の性質がどのように変わったかを簡単に記せ .

表 1

基質 S1 濃度 ( $\mu\text{M}$ )	2	2.5	5	10	20
反応速度 $V$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )					
野生型酵素	8.3	9.6	13.9	17.9	20.8
変異型酵素	3.8	4.4	6.4	8.2	9.5

問 E 精製した野生型酵素 , 変異型酵素の CD ( 円偏光二色性 ) を種々の温度で測定した ( 下線部 5 ) . 各測定温度での 222 nm のモル楕円率を算出したところ , 表 2 の結果を得た . 野生型酵素 , 変異型酵素の熱変性温度  $T_m$  ( タンパク質分子内に含まれる  $\alpha$ -ヘリックスの半分が変性する温度と定義する ) を添付のグラフ用紙を用いて求めよ . ( グラフ用紙には受験番号を記入し , 解答用紙と共に提出すること . ) 222 nm のモル楕円率は , タンパク質分子内の  $\alpha$ -ヘリックスの含有量を表している .

表 2

測定温度 ( °C )	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
モル楕円率 ( $\times 10^3 \text{ deg cm}^2 / \text{dmol}$ )											
野生型酵素	-17.0	-16.0	-14.0	-10.0	-6.0	-4.0	-3.0	-2.8	-2.2	-2.0	-2.0
変異型酵素	-17.8	-17.4	-17.0	-16.0	-14.0	-10.0	-6.0	-4.0	-3.0	-2.5	-2.2

( 生化学・分子生物学 II : 4 枚中の 3 枚目 . グラフ用紙も含む )

[ 問題 2 ]

以下の事項について各々 200 字以内で簡単に説明せよ .

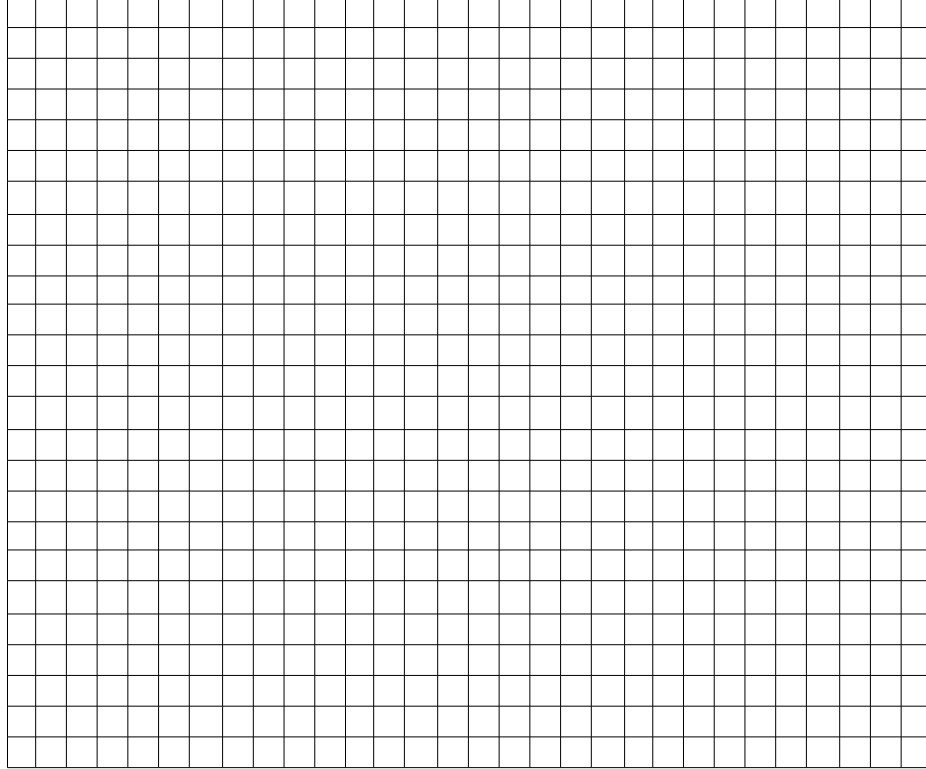
A . 損傷 DNA の除去修復

B . 生体膜を構成する脂質二重層とその性質

このグラフ用紙は [ 問題 1 ] 問 D, E の解答用です。  
受験番号を記入し、解答と共に提出して下さい。

受験番号

[ 問題 1 ]  
問 D ア



[ 問題 1 ]  
問 E

