

## [ 生化学・分子生物学 II ( 専門 ) ] ( 全 1 題 )

### [ 問題 1 ]

次の文章を読み、問 A ~ 問 F に答えなさい。

一倍体の酵母細胞において、ある遺伝子 X を染色体上で完全に欠失させた変異株を作製したところ、変異株細胞の生育は野生型の遺伝子 X を持つ親株と比べ大きな変化はなかった。この変異株細胞から調製した全抽出液について、種々のアッセイを行った結果、抽出液に含まれる未知の酵素によると考えられるある活性が、親株抽出液と比べて著しく上昇していた。この未知の酵素（以降酵素 Z と呼ぶ）およびそれをコードする遺伝子を同定することをめざした。

まず、変異株の細胞抽出液から酵素 Z ( 図 II の Z 印 ) を以下の実験操作により精製した。抽出液に、60 % 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、4 で 1 時間攪拌後、遠心分離により沈殿を回収した。この沈殿を、緩衝液 ( pH 7.5 ) に溶解し、同じ溶液で一晩透析を行った。<sup>(1)</sup> 透析後のサンプルを、陰イオン交換カラムにかけ、NaCl の濃度勾配を用いてタンパク質を溶出させることで、酵素 Z の部分精製標品を得た。このサンプルを濃縮後、カラム (A) にかけたところ、図 I の溶出パターンが得られた。図 I の各試験管のサンプルを SDS、ジチオスレイトール ( 還元剤 ) を含む緩衝液と混和した後、SDS を含むポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行い、クマシー・ブリリアントブルー色素で染色し、図 II のようなパターンを得た。

表 I は今回の一連の精製の結果をまとめたものである。

問 A 遺伝子 X の機能として考えられる可能性を 2 つあげなさい。なお、変異株と親株で、X 遺伝子以外には遺伝的違いはないものとする。

問 B (a) 硫酸アンモニウム分画の原理ならびに特徴を説明しなさい。  
(b) 下線 (1) の操作を行う理由を説明しなさい。

( 生化学・分子生物学 II : 3 枚中の 2 枚目 )

問 C (a) カラム (A) を用いた分画法の名称 , ならびに , その原理を図 II の結果を参考にして説明しなさい .

(b) 酵素 Z は , 細胞抽出溶液中でどのような存在状態にあることが予想されるかを述べ , その予想を確認するためにはどのような実験をすれば良いか例を 1 つあげて簡単に説明しなさい .

問 D 表 I 中の空白 (a) – (c) に適当な数字を入れなさい .

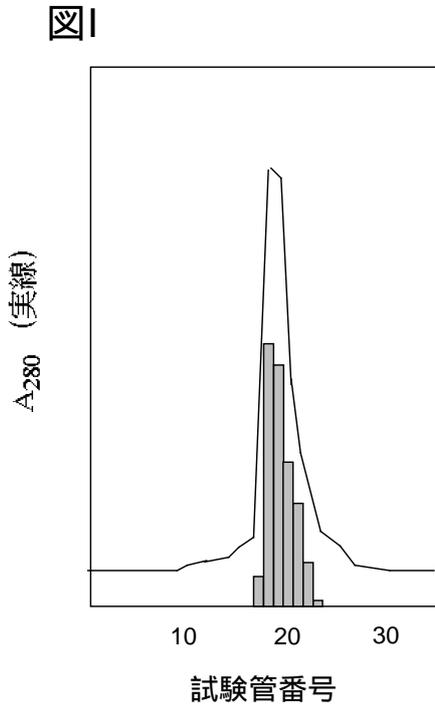
問 E 精製酵素 Z のアミノ末端の配列解析をエドマン法により行ったところ , サンプル量は充分あるにもかかわらず , 配列情報が全く得られなかった .

(a) 理由として考えられることを述べなさい .

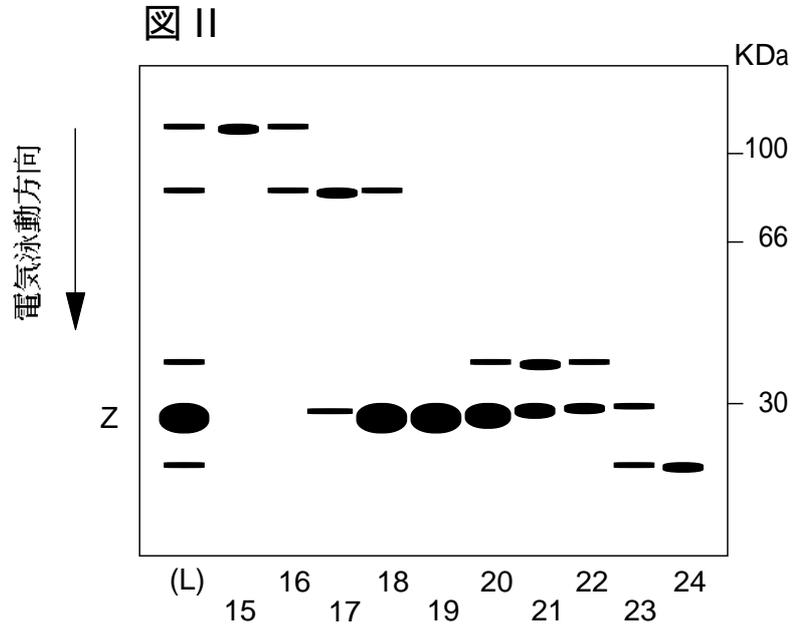
(b) エドマン法について , 説明しなさい . ( 反応の結果得られる化合物名をあげて , どのようにアミノ酸配列を帰属・決定するのかを述べなさい . )

(c) このようなアミノ末端の配列が決められないようなタンパク質のアミノ酸配列情報を得るためには , どのような実験を行えばよいか . 簡潔に説明しなさい .

問 F 得られたアミノ酸配列の情報を基に , 酵素 Z の遺伝子をクローニングする方法を 1 つあげ簡潔に述べなさい .



注) 図中棒グラフは酵素 Z の活性 ( 相対値 ) を表す .



カラム(A)を用いた分画実験の各試験管から等体積量のサンプルをとり、電気泳動後、色素染色を行った。図中サンプル(L)は、カラム(A)にかける前のサンプルの一部を用いた。右は既知分子量タンパク質マーカーの移動度を示す。

表 I

実験操作	全タンパク量 (mg)	全活性 (units)	比活性 (units/mg)	精製倍率 (-fold)	回収率 (%)
粗抽出液	2,500	12,500	5	1	100
硫酸アンモニウム分画	2,000	(a)	5.75	1.15	92
陰イオン交換分画	15	7,800	520	(b)	62.4
分画法 (A)	10	6,500	(c)	130	52

注) 1 unitは、1 分間に 1 マイクロモルの基質を生成物に変換する酵素の活性と定義する。各実験操作を行った後、回収した試料について各項目の値を示した。