

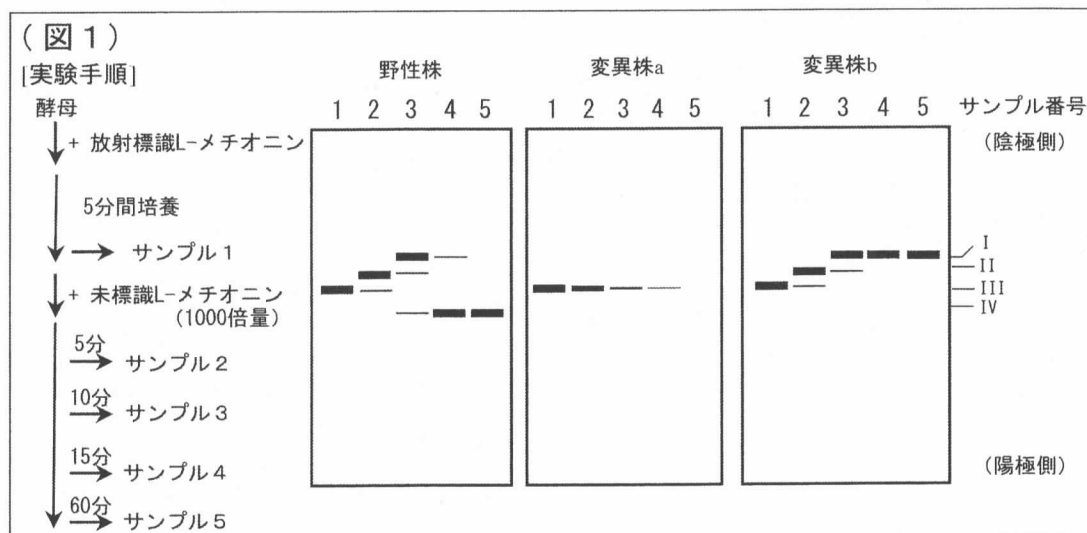
[生化学・分子生物学Ⅱ (専門)] (全2題)

[問題1]

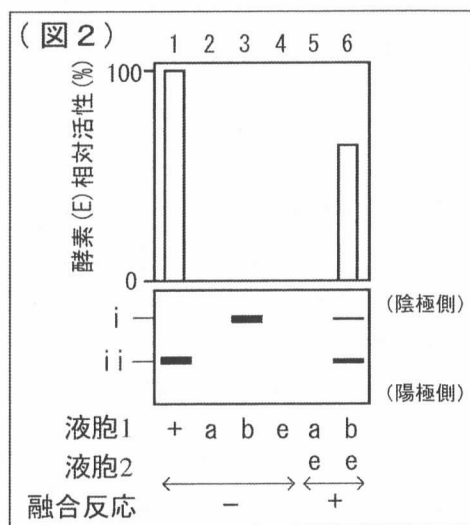
次の文章を読み、問A～Dに答えよ。

①液胞で働く「酵素E」(切断されるシグナル配列を持たない膜タンパク質、「遺伝子E」によりコードされている。)の成熟化と酵素活性の関係を調べるために以下の2つの実験を行った。

(実験1)「遺伝子A」もしくは「遺伝子B」に変異を持つ酵母細胞(各々a, bと呼ぶ。これらの酵母では、2本の相同染色体どちらにも同じ変異を持つ。)と野性型酵母細胞の計3種類を並べて培養し、放射標識②L-メチオニンを用いて、細胞を5分間放射標識したのち、図1の実験手順の項に示したように、一定量のサンプルを取り出し直ちに酸を加え、タンパク質を変性させて細胞内反応を停止させた。これをサンプル1とした。残りの培養液に、③未標識のメチオニンを放射標識メチオニンの1,000倍になるように加え、更に培養を続けた。未標識メチオニンを添加後5, 10, 15, 60分後に一定量のサンプルを順次取り出し、先と同様に酸を加え、細胞内反応を停止させた。これらのサンプルを各々2～5とした。次にこれらのサンプルをドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む緩衝液に可溶化した後、免疫沈降法により「遺伝子E」の翻訳産物だけを選択的に回収した。得られたサンプルをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、オートラジオグラフィーにより解析した。図1に野性株(左)、変異株a(中央)、変異株b(右)を用いて得られた結果を示す。検出された各バンドは、便宜上ゲル上部から順にI, II, III, IVと名付けた。ゲル上部が電気泳動の陰極側、下部が陽極側を意味する。



(実験2) 野性型酵母と2種類の変異型酵母, 更に, 「遺伝子 E」を欠失した酵母 e を各々培養後, 各細胞から液胞を調製した. 図2中では, 野性株を+, 変異株 a, 変異株 b, 変異株 e を, それぞれ a, b, e で表す (図2レーン1~4). 各液胞蛋白質の濃度を揃えた後, 「酵素 E」活性を測定した. 次に, 酵母 a, b から調製した液胞と酵母 e から調製した液胞を, 図2レーン5, 6で示した組み合わせで混和し, ある条件下におくことで, 2種類の液胞を試験管内で融合させ, 液胞内の内容物を混合させた. その後, 「酵素 E」活性を測定した. 得られた結果を, 野性株に対する相対値として, 図2の上段にグラフで示した. 活性測定後の各液胞内のタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後, 「酵素 E」の活性中心領域に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い, 図2下段の結果を得た. 便宜上, 陰極に近い側から, 各々バンド i, ii と名付けた.



問A

(a) 下のI)からV)の文章を読み, ①液胞の役割について, 説明が正しい番号を選択せよ. 誤っているものについては, その役割を担う正しい細胞内小器官の名前を答えよ.

- I) プロトン駆動力を利用して ATP 合成を行う.
- II) リソソームと近縁で加水分解酵素に富み, 老廃物の分解に寄与する.
- III) 栄養分の貯蔵器官として働く.
- IV) クロロフィルを含み, 炭酸固定を行う.
- V) 細胞内 pH を調節し, 細胞の恒常性を維持する.

(b) 合成されたタンパク質が液胞まで輸送される過程を下の5つの単語全てを用いて100字程度で説明せよ.

(ゴルジ体) (糖鎖) (小胞輸送) (タンパク質膜透過装置) (小胞体)

問B

- (a) 下線② L-メチオニンの構造式を書け。光学活性に留意し、立体構造が明らかになるよう、Fischerの投影式等を用いること。
- (b) 下線②に関連して、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸のうち、分子内に不斉炭素を2個持つアミノ酸と、1つも持たないアミノ酸の名称を各々一つ記せ。

問C

下線③に関して、未標識のL-メチオニンを大量に加え、更に培養を続けることで、何を調べることができるのか。100字程度で説明せよ。

問D

実験結果をもとに以下の設問(a)～(d)に答えよ。

- (a) 図1のポリアクリルアミドゲル上で、野生株では、4種類のバンドI, II, III, IVが観察されている。例にならない、タンパク質が合成されてから活性型の「酵素E」が生成するまでの順番に並べよ。
(例) 合成直後 I → II → III → IV 成熟型 (活性型「酵素E」)
- (b) 図2のバンドi, iiは、図1のバンドI～IVのどれに対応しているかをそれぞれ記せ。
- (c) 実験2の結果から、活性を保持した「酵素E」が生成するには、液胞内でどのような反応が起こる必要があると考えられるか。理由も含めて100字程度で説明せよ。
- (d) 変異型酵母a, bは、「酵素E」の成熟過程のどの段階に不全を持つと考えられるか。それぞれについて、理由も含めて100字程度で説明せよ。

[問題2]

次の文章を読み、以下の問A～Eに答えよ。

DNA塩基配列決定法としては、塩基に特異的な化学反応での部分分解によって切断し決定する【ア】法と、酵素反応にATP, TTP, GTP, CTPのジデオキシ体を使用する【イ】法がある。【ア】法では、ジメチル硫酸によってプリン塩基である【1】と【2】がメチル化され、その後のアルカリ処理によって切断される。この時、高温中性の条件下では【1】で切断されやすく、低温酸性の条件下では【2】で切断されやすい。また、水溶液中のヒドラジンによってピリミジン塩基である【3】と【4】が化学的に切断され、塩化ナトリウム溶液中のヒドラジンによって【3】のみが切断される反応をそれぞれ利用している。

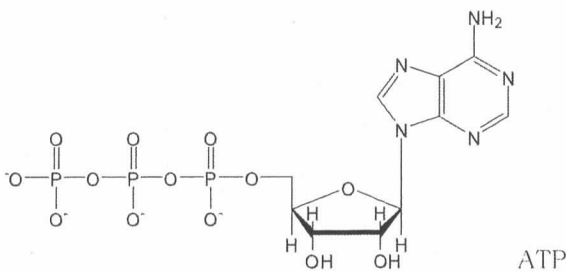
【イ】法では、DNAポリメラーゼを用いて、配列を決めたいDNAの相補的コピーをつくる際の反応溶液にジデオキシ体を少量混合させて、5'末端を標識したプライマーの伸長反応をおこなう。この方法では、①プライマーにジデオキシ体が取り込まれると、その位置より後の伸長反応が進行できなくなる現象を利用している。これらの方法で得られた反応液中のDNA断片を電気泳動することで、そのパターンからDNA塩基配列を解析することができる。

問A

【ア】法および【イ】法には、それぞれ開発者の名前が付けられている。その名称を答えよ。

問B

ATPの化学構造式を参考にして、デオキシCTP、ジデオキシGTPの構造式をそれぞれ書け。



問C

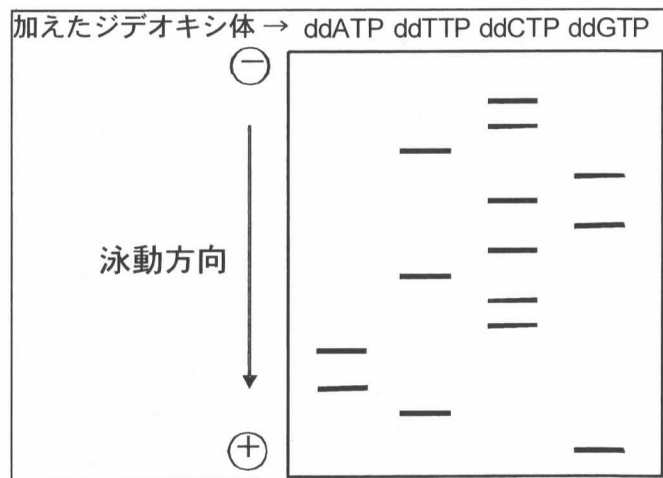
- (a) [ア] 法によって切断される [1] ~ [4] の塩基に該当する名称を答えよ。
- (b) [2] と [4] は Watson-Crick 型塩基対を形成するが, [1] と [3] の塩基対よりも結合力がいくぶん弱いとされる。その理由を30字程度で述べよ。

問D

下線①について, ジデオキシ体によって DNA の伸長反応が停止する原理を100字程度で説明せよ。

問E

ある遺伝子の配列を持つ1本鎖 DNA の3'末端に相補的な, 5'末端放射線標識したプライマーを用意し, 伸長反応用の溶液を調製した。これらにジデオキシ(dd)体をそれぞれ1種ずつ加えた4種の反応溶液を作り, DNA ポリメラーゼによる伸長反応を開始した。反応後の溶液は, ②変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて, オートラジオグラフィによる解析をおこなった結果, 右図に示す泳動結果が得られた。以下の設問(a), (b)に答えよ。



なった結果, 右図に示す泳動結果が得られた。以下の設問(a), (b)に答えよ。

- (a) 下線②にある変性ポリアクリルアミドゲルには, 高濃度の尿素などの変性剤が用いられるが, この場合の変性とは何を示すのかを答えよ。また, 変性させる原理も80字程度で述べよ。
- (b) 図の結果から, この遺伝子配列を持つ1本鎖 DNA には, どのような配列が含まれていたかを5'方向から記述せよ。