

## [生化学・分子生物学II(専門)] (全2題)

## [問題1]

次の文章を読んで、以下の問いに答えなさい。

大腸菌の細胞質中に存在する酵素 A は、基質(S)を生成物(P)に変換する活性を持つが、その活性は生育状況に応じて変化することが知られている。対数増殖期(細胞が一定速度で分裂し対数的に細胞数が増加する時期)には、この活性は高く保たれているが、定常期(栄養の不足、代謝産物の蓄積等により細胞分裂が抑制される時期)になると、活性は著しく低下する。この酵素 A は遺伝子 a によってコードされている。この酵素活性は菌の生育に必須ではない為、遺伝子 a が欠失した変異株が既に分離されている。

生育状況に応じたこの酵素活性の調節機構を調べることを目的に、研究をスタートさせた。最初に、酵素 A の細胞内蓄積量の変化と、遺伝子 a の mRNA 量の変化を調べた<sup>(1)</sup>。いずれも対数期と定常期で差が見られなかった<sup>(2)</sup>。次に遺伝子 a をクローニングし、酵素 A を大腸菌中で発現・精製した<sup>(3)</sup>。遺伝子の配列から推定される酵素 A の分子量は、約 8 万である。

精製酵素 A を用いて以下の I)—III)の実験を行った。

- I) 2  $\mu\text{g}$  の酵素 A を、過剰量の基質(S)を含む緩衝溶液に加え、全体積を 1.5 ml に合わせた後、37°C で一定時間保温し、得られた生成物(P)の反応液中の濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を測定した。図1の太線は、得られた生成物の反応液中の濃度を保温時間に対してプロットした結果を示す。

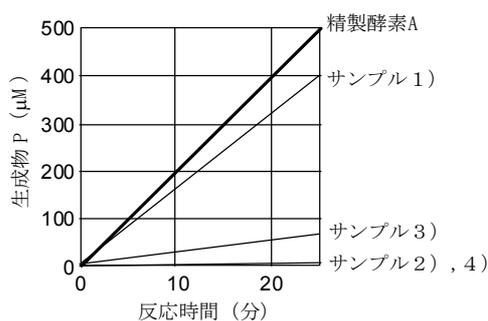


図 1

(図 1) 基質 S (終濃度 10 mM) を含む緩衝溶液と 2  $\mu\text{g}$  の酵素 A を混合し、体積を 1.5 ml に合わせた。溶液を 37°C に保温すると同時に、溶液中の生成物の濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を、経時的に測定した。得られた結果を保温した時間に対してプロットした(太線)。

本文中に記した 1 - 4 のサンプルと、基質 S (終濃度 10 mM) を緩衝液中で混合し、溶液の体積を 1.5 ml に調製した。反応溶液中の生成物の濃度を先と同様に測定した。

- II) 遺伝子 a を欠失させた変異株を対数増殖期および定常期まで培養させた後、菌体を回収・破碎し、細胞質画分粗抽出液を調製し、緩衝液に対して透析した。透析後の粗抽出液(約 100  $\mu\text{g}$  のタンパク質を含む)と精製酵素 A を用いて、次の 1) — 4) の 4 サンプルを作り、それらの酵素活性を測定し、図1の結果を得た。

- 1) 2  $\mu\text{g}$  の精製酵素 A と対数増殖期の細胞質抽出液の混合物
- 2) 対数増殖期の細胞質抽出液のみ
- 3) 2  $\mu\text{g}$  の精製酵素 A と定常期の細胞質抽出液の混合物
- 4) 定常期の細胞質抽出液のみ

III) II)の測定に用いた各サンプルを酵素 A に対する抗体と混合し、抗原—抗体複合体を形成させた後、これらを単離し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により解析した。図2はその結果である。観察された分子量約5万、3万5千 2万5千のタンパク質を、便宜上タンパク質 B, C, D と名付けた。タンパク質 B, D は、抗体の重鎖、軽鎖である。

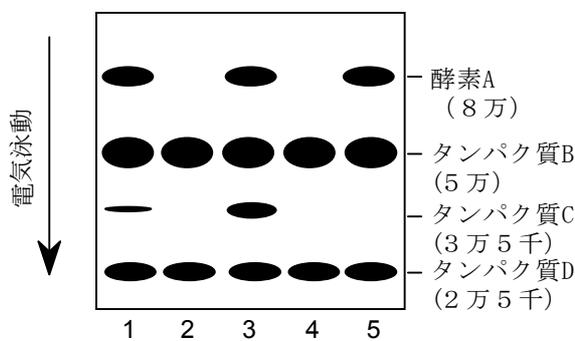


図2

図2) II)の実験で用いたサンプルを酵素 A に対する抗体と混合し、抗原-抗体複合体を形成させた。その後、これらタンパク質複合体を回収した。タンパク質成分を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により展開後、クマシー・ブリアントブルー(色素)を用いて染色した。図中 1-4 は、実験 II)の 1)-4)のサンプルを用いて得られた結果を示す。5 は、I)の実験サンプル(酵素 A のみを含む)を用いて、同様の実験を行った結果を示す。各タンパク質の分子量は、同時に電気泳動を行った分子量マーカーの移動度を指標に推定した。

問 A 下線部(1)に関して、細胞内の特定の

タンパク質、特定の mRNA を検出する実験方法と関連の深い言葉を下から各々1つ選び、簡単に説明しなさい。(イースタン・ブロットイング、ウエスタン・ブロットイング、サザン・ブロットイング、ノザン・ブロットイング)

問 B 下線部(3)に関して、細胞抽出液から、タンパク質を精製する為に、種々のカラムクロマトグラフィーの手法が良く用いられる。その例を2つあげ、タンパク質分離の原理を、それぞれ簡単に説明しなさい。

問 C 図1の太線の実験結果から、酵素 A の比活性 (units/mg)を計算しなさい。計算の過程もあわせて記しなさい。1 unit は、1分間あたりに、1  $\mu$  モルの基質 S を生成物 P に変換する酵素の能力と定義する。

問 D 下線部 (2)、並びに図1、2の結果から、生育状況に応じた酵素活性の調節機構についての考えをまとめなさい。その際、以下の単語を必ず使用すること。(転写、翻訳、酵素 A、タンパク質 C、会合、抑制)

[問題 2]

次の文章を読んで、以下の問いに答えなさい。

DNA の二重らせん構造が発見されて 50 年経過し、「我々の設計図」である ヒト DNA の全塩基配列の解析が完了した。約 30 億塩基対からなる DNA 塩基配列中には我々が生きていく上で必要な遺伝情報がすべて書き込まれている。染色体は、様々な遺伝子をコードした 1 本の非常に長い DNA からなっており、ヒトにおいては、22 種類の  と 2 種類の  が存在している。真核生物の DNA ではタンパク質や構造 RNA、触媒 RNA をコードしているのは、全配列のわずか数パーセントである。染色体の DNA には、遺伝子のほかに重要な機能をもつ 3 種類の塩基配列がある。複製起点と  は DNA の完全な複製において重要な役割をはたし、 は紡錘体に付着させた娘細胞の DNA を、M 期<sub>a</sub> にそれぞれの細胞に正確に分配するように働いている。

真核生物において DNA は塩基性タンパク、ヒストンの  量体のまわりを二重らせんが 2 回転弱ほど巻きつき、 とよばれる DNA-タンパク粒子の繰り返し構造を形成している。DNA 上への  の配置は不規則だが、ヒストン H1 分子によってきつく詰め込まれることによって 30 nm 繊維を形成している。クロマチンは密に凝縮しているが、その構造は動的で細胞は DNA の遺伝情報を活用することができる。

問 A  ～  に適当な語句や数字をいれよ。

問 B 下線部 a の M 期とは何か、細胞周期の図を用いて簡単に説明せよ。

問 C クロマチン構造を部分的に可逆的に変化させて DNA の遺伝情報を活用する方法を 2 つ示し、化学反応が利用されている場合はその種類も記せ。

問 D 1 つの休止期にある体細胞の核内の DNA を 2 本鎖状態で直線上にのぼすと、その長さの合計は、細胞の直径の何倍になるか計算せよ。1 塩基対あたり DNA は 0.33 nm の長さを持ち、細胞の直径は 10  $\mu\text{m}$  とする。