

[生化学・分子生物学 II (専門)] (全 4 題)

[問題 1] 遺伝子のクローニングにおいて遺伝子産物のペプチド配列の一部がわかっている際、目的とする遺伝子を含むクローンを選択する 1 つの方法として、DNA プローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法がある。目的とするタンパク質は Arg-Leu-Met-Glu-Trp-Ile-Cys-Pro-Met-Leu のペプチド配列を持っているとして、次のコドン表を参考にして、以下の問 A~C に答えよ。

コドン表

1st base	2nd base				3rd base
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA stop	UGA stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

- 問 A この実験では 17 ヌクレオチドの DNA プローブを用いることにした。DNA プローブの種類が一番少なくなるように設計したい。どのアミノ酸に対応するものを設計すればよいか。DNA プローブに完全に対応しているアミノ酸の配列を示せ。
- 問 B 設計した DNA プローブの配列は何種類になるか。また、その一種類について配列を 5' 末端から示せ。
- 問 C 作成した DNA プローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーション法を行う。具体的な実験手順を、プレート、アイソトープ、菌体、フィルターの語句を用いて 100 字程度で説明せよ。

(生化学・分子生物学 II・6 枚中の 2 枚目)

[問題 2] 長鎖 DNA の塩基配列を決定するために制限酵素を用いたマッピングを行うことがある。17,000 塩基対の 2 本鎖環状 DNA について 2 種の制限酵素 (*Hind*III, *Pst*I) を用いた加水分解を考えてみよう。 *Hind*III はこの DNA を 2 カ所で 2 本鎖切断し 11,000 塩基対と 6,000 塩基対の DNA フラグメントを与えた。 *Pst*I はこの DNA を 2 カ所で切断し 12,000 塩基対と 5,000 塩基対の DNA フラグメントを与えた。 *Hind*III で切断された 11,000 塩基対のフラグメントをさらに *Pst*I で切断すると 7,000 塩基対と 4,000 塩基対の DNA フラグメントを与えた。 2 本鎖の環状 DNA 上の制限酵素切断サイトを、以下のような円を 2 本鎖環状 DNA にみたと、それぞれの制限酵素切断サイト間の塩基対数も含め、図 1 の例にならって図示せよ。

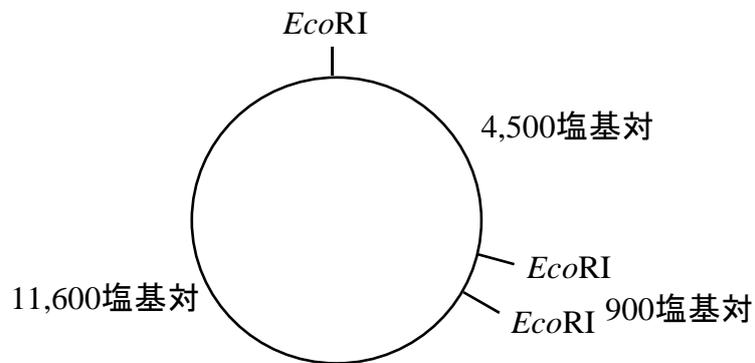


図 1. 環状 DNA の制限酵素切断サイトの模式図

[問題 3] 次の文章を読み、以下の問 A~C に答えよ。

2 本鎖 DNA では塩基はワトソン・クリック型 A・T, G・C 塩基対を形成している。また条件によっては T・A・T 及び C・G・C⁺ 水素結合を形成することによって、3 本鎖 DNA が形成されることも知られている。細胞の中で遺伝子は酸化ストレスにさらされ、DNA 中の G 残基は酸化され、図 2 に示す 8-oxoG 残基が生成し、GC→TA トランスバージョン突然変異の原因となっていることが示唆されている。

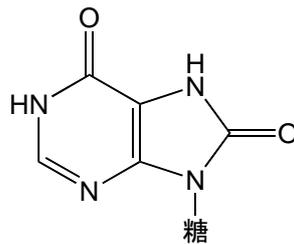


図 2. 8-oxoG 残基の化学構造

- 問 A ワトソン・クリック型 A・T, G・C 塩基対と、3 本鎖 DNA で見られる T・A・T 及び C・G・C⁺ における水素結合の様式を化学構造式で示せ。
- 問 B 3 本鎖 DNA の安定性と溶液の pH との関係を議論せよ。
- 問 C 8-oxoG 残基の生成により GC→TA トランスバージョン突然変異が引き起こされる分子機構について水素結合を含む構造式を用いて説明せよ。

[問題 4] 次の文章を読み、問 A~E に答えよ。

タンパク質 X (x 遺伝子によりコードされている) は、以下の 1), 2) の知見から外部環境から真性細菌内への糖 S の取り込み反応に関与することが示唆されている。

- 1) この真性細菌の野生株は、糖 S を唯一の炭素源とする培地で生育できるが、染色体の x 遺伝子を欠失させた変異株は、この培地では生育できない。
- 2) x 遺伝子を持つプラスミドを、染色体の x 遺伝子を欠失した株に形質転換した菌は、糖 S を唯一の炭素源とする培地中で生育可能となる。

タンパク質 X の構造と機能の関係を明らかにするために、以下の実験を行った。

(実験 1) 塩基配列から推定されるタンパク質 X のアミノ酸配列中には、図 3 の四角で示されるような、疎水性アミノ酸に富んだ膜貫通領域と予想される領域が 6 箇所存在していた。

最初に、タンパク質 X が複数回の膜貫通領域を持つ内在性膜タンパク質であることを、以下の遠心分離実験により確認した。

真性細菌を培養、細胞を回収後緩衝液で懸濁し、超音波処理により細胞を破碎した後、低速遠心分離により封入体等を除去した。低速遠心後の上清を用い、①I)-III) の操作を行った。

- I) 上清を $100,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行い、沈殿と上清に分けた。
- II) I) で得た沈殿を緩衝溶液に懸濁後、3 体積量の 8M ②尿素を加えて良く攪拌し、氷上で一時間放置した後、 $100,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して沈殿と上清に分けた。
- III) II) で得た沈殿を緩衝溶液に懸濁後、2%の③非イオン性界面活性剤トライトン X-100[®] を等量加え、氷上で一時間放置した後、 $100,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して沈殿と上清に分けた。

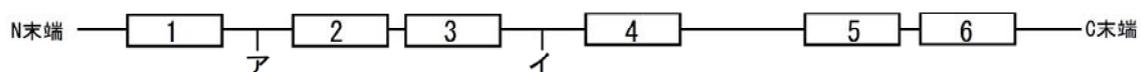


図 3. タンパク質 X の一次構造の模式図 四角は、疎水性のアミノ酸に富み膜貫通領域と考えられる領域を示す。ア、イで示した部位が、細胞質膜の外側に配置していることが実験的に示されている。

問 A 実験 1 の①I)-III) の操作に関連して以下の問に答えよ。

- (a) 操作 I) の遠心分離により、何と何を分画できるのかを記せ。
- (b) 高濃度の②尿素を加える目的を記せ。また、操作 II) の遠心分離により、何と何を分画できるのかを記せ。
- (c) ③非イオン性界面活性剤について簡単に説明し、加える目的を記せ。操作 III) の遠心分離により、何と何を分画できるのかを記せ。

問 B 図 3 のタンパク質 X の模式図において、ア、イで示した部位が細胞質膜の外側に配置していることが他の実験により示されている。この情報を基に、タンパク質 X の推定される膜内の配向を図 4 (b) の例にならって図示せよ。

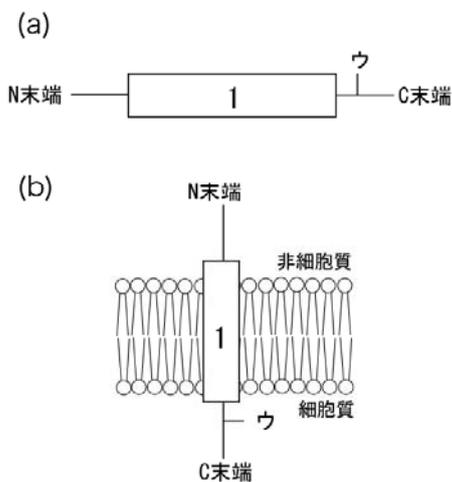


図 4. タンパク質 Y の一次構造の模式図 (a) と膜内配向図 (b). ウで示した部位が、細胞質膜の内側に配置していることが実験的に示されている。

(実験 2) 様々な生物種におけるタンパク質 X のホモログのアミノ酸配列を比較し、全ての生物種のホモログにおいて高度に保存されているアミノ酸残基 5 箇所 (E42, L99, K115, W172, D200 : アミノ酸は一文字表記で示し、後ろの数字は残基番号を表す) を同定した。これらのアミノ酸残基のうち一つをアラニン残基に置換した変異型のタンパク質 X をコードするプラスミドを計 5 種類作製した。これらを、染色体の x 遺伝子を欠失した株に形質転換し、糖 S を唯一の炭素源とする培地中での生育を調べ、図 5(a) の結果を得た。生育した株を (+)、生育しなかった株を (-) で表す。また、各変異型タンパク質 X の単位細胞あたりの蓄積量を④イムノブロッティングにより調べ、図 5(b) の結果を得た。更に、各変異型タンパク質 X をコードするプラスミドを保持する菌を、放射標識した糖 S と混合し、一定時間経過後に細胞を遠心により回収した。沈殿画分に回収された放射活性を測定し、図 5(c) の結果を得た。野性型タンパク質

X を発現する細胞 1 個の取り込み量を 100 とした際の相対値で示した。別の実験から、放射活性の取り込みには、細胞質膜間で形成される⑤プロトン駆動力が必須であることが明らかになった。

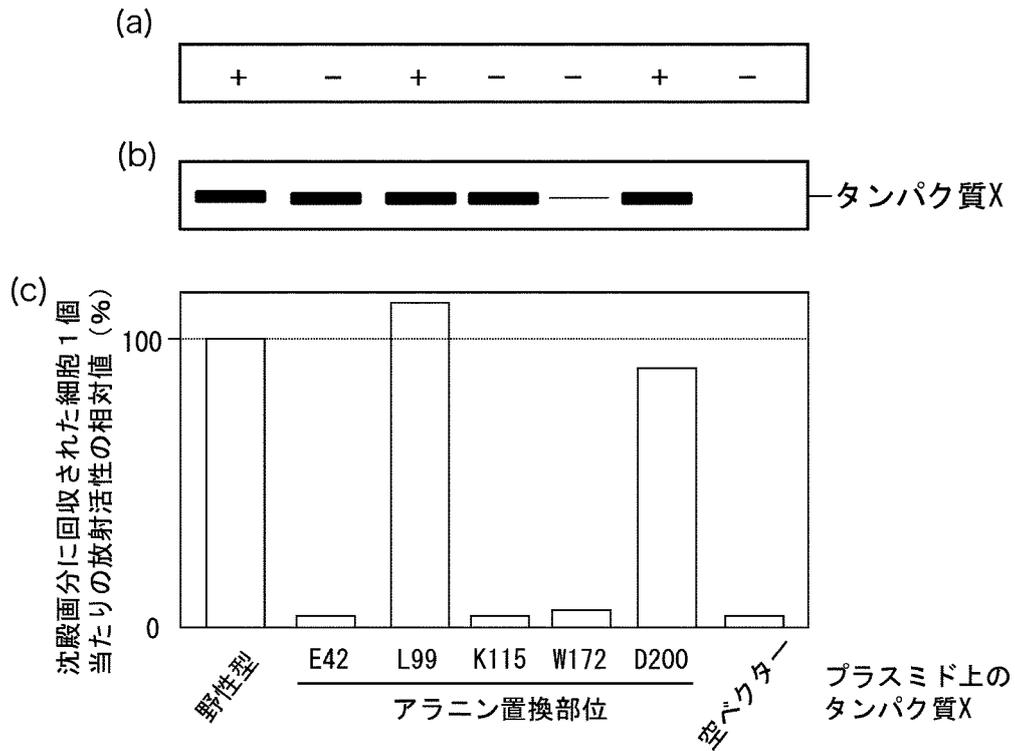


図 5. 実験 2 の結果 (a): 糖 S を唯一の炭素源とする培地上での生育, (b): イムノブロッティング, (c): 糖 S の細胞内への取り込み.

問 C ④イムノブロッティングの原理と操作について 100 字程度で説明せよ.

問 D ⑤プロトン駆動力は, 糖やアミノ酸等の輸送反応に加えエネルギー生産に関与していることが知られている. この例をあげ, そのしくみについて 100 字程度で説明せよ.

問 E 実験 2 で着目した 5 箇所のアミノ酸残基の役割に関して, 実験結果を用いて, 200 字程度で説明せよ.