

[専門科目 (生化学)]

[問題 1] 次の文章を読み、以下の問 A～E に答えよ。

細胞内では様々な立体構造をもつ生体高分子が相互に作用しながら機能している。例えば DNA には生命に必要な情報が塩基配列として書き込まれている。DNA は通常①二つの溝をもつ二重らせん構造をしており、二本の鎖のヌクレオチド配列は互いに **a** である。真核細胞では遺伝子の発現は **b** と呼ばれるタンパク質が塩基配列選択的に DNA のプロモーター領域に結合したのち、RNA ポリメラーゼによって引き起こされることが知られている。

このメカニズムに加え、クロマチンの高次構造の変化や DNA の可逆的な修飾による、**c** と呼ばれる遺伝子発現の制御メカニズムも、最近明らかになってきた。これは細胞分裂を通して娘細胞に受け継がれるという遺伝的な特徴を持ちながらも、突然変異などの DNA 塩基配列の変化とは独立したメカニズムである。主な **c** による遺伝子発現の制御メカニズムとして、②DNA の修飾とヒストンの修飾がある。これらの修飾によって、③クロマチンには遺伝子がより多く含まれている転写が頻繁な領域である **d** と、凝縮された **e** の二つの領域が形成されている。

問 A **a** ～ **e** に適切な語句を入れよ。

問 B 下線部①の二つの溝について名称を記載せよ。また、それぞれの溝を認識する分子の例を具体的に挙げよ。

問 C 下線部②の DNA の修飾とヒストンの修飾について、一つずつ例を化学構造式で示せ。DNA は修飾された塩基部、ヒストンは修飾されたアミノ酸残基部を示せ。

問 D 下線部③の二つのクロマチンの状態を変換するために利用されている酵素について二つ挙げ、その機能を簡単に説明せよ。

問 E 下線部③の凝縮されたクロマチンの典型的な染色体上の領域名を二つ示し、それぞれの役割について説明せよ。

[問題2] 次の文章を読み、以下の問A～Eに答えよ。

DNAは紫外線、有害な化学物質、放射線などの作用によってしばしば損傷を受ける。DNA二本鎖が同時に切断を受ける二本鎖切断(DSB)は、一本鎖切断に比べより重大な損傷である。DSBの修復機構の一つに、切れたDNA末端を直ちにつないで修復する **a** がある。この機構では複数の修復酵素がDNA末端を加工し、 **b** によって切断面がつなぎ合わされる。 **a** は鋳型を利用しないため、しばしば修復の際に数塩基の挿入や欠失が起こるエラー頻度が高い機構である。より正確性の高い修復機構としては、もう一方の染色体を鋳型として行われる **c** がある。

このような細胞の持つDNA修復機構を利用したゲノムDNA改変手法がゲノム編集である。ゲノム編集では、人工DNAヌクレアーゼによって目的の遺伝子にDSBを導入し、その修復過程を利用してDNAを改変する。CRISPR-Cas9システムは、ゲノム編集を簡便かつ高効率に行う画期的技法である(図1)。このシステムでは、人工的に合成された一本鎖のガイドRNA(single guide RNA: sgRNA)と、任意のDNAにDSBを導入する細菌由来のヌクレアーゼCas9を利用する。ガイドRNAの5'末端に位置する①20塩基からなる配列が標的のDNA配列を認識し、Cas9を誘導することで標的DNAを切断する。この認識配列は直

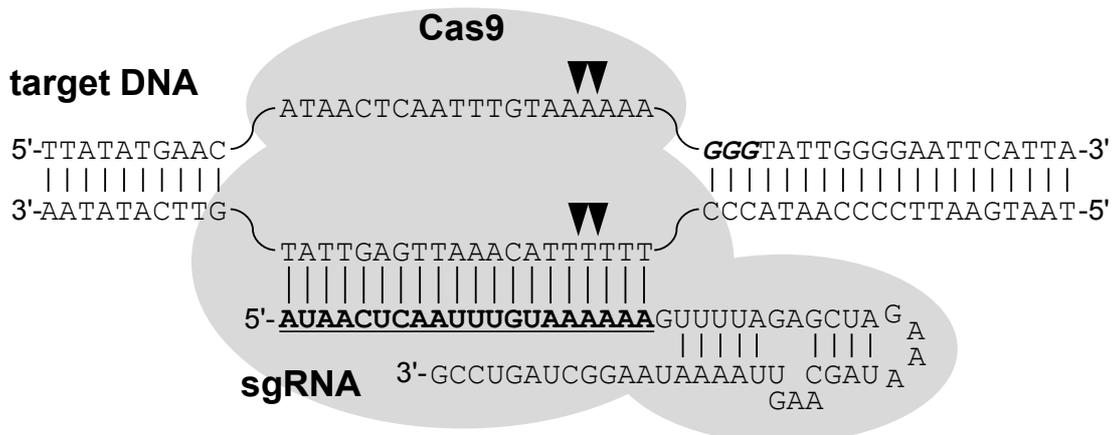


図1 CRISPR-Cas9システムの概略図。斜体はNGG配列を、  
下線は任意の認識領域を、矢頭は切断部位を示す。

後に 5'-NGG-3'配列 (N は任意の塩基) が続く必要があるものの, ガイド RNA の認識領域を任意の配列に置き換えることでゲノム上の目的の遺伝子を正確に標的とすることができる. 例えば, Cas9 により切断を受けた DNA 鎖が a で修復される際に, 数塩基の挿入や欠失が起こることで, 目的遺伝子を破壊することができる.

問 A a ~ c に適切な語句を入れよ.

問 B 図 2 はモデル生物の仮想の遺伝子 a を含む DNA 領域とその読み枠を示す. この遺伝子は 33 アミノ酸からなるタンパク質 A をコードする.

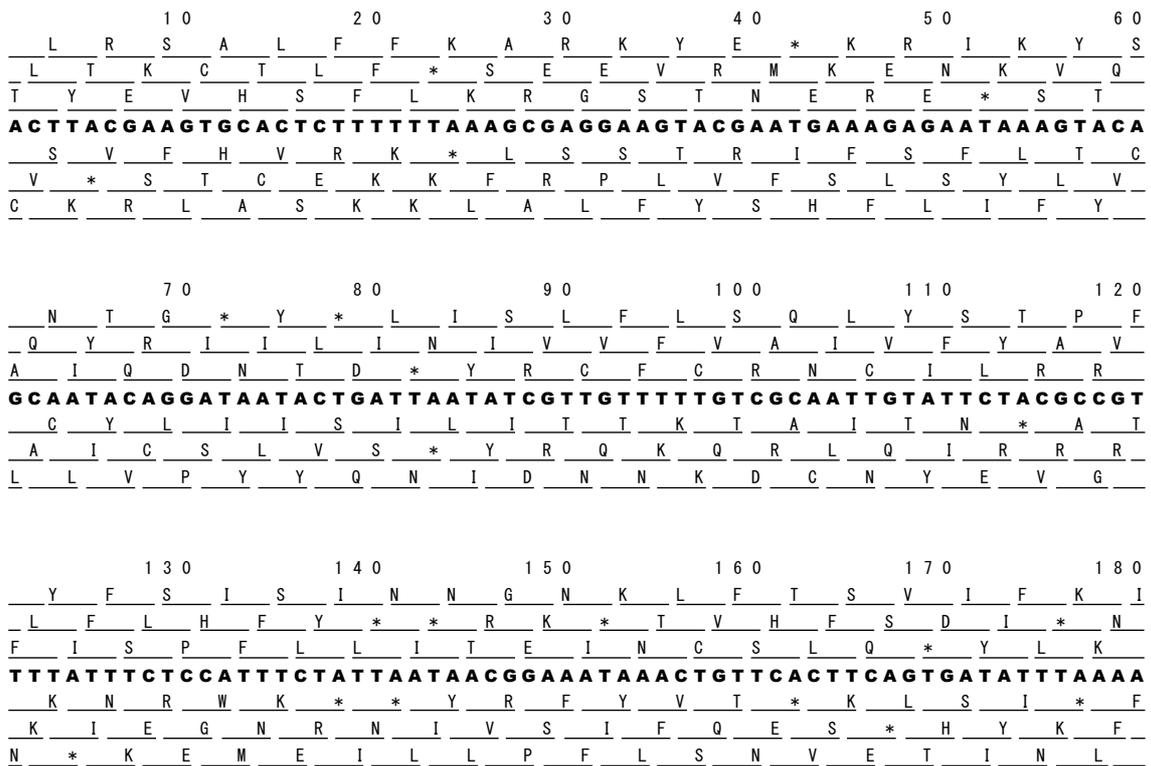


図 2 遺伝子 a を含む DNA 配列と読み枠.

DNA 配列を太字, アミノ酸を一文字表記で示し, \*は終止コドンを表す.

アミノ酸配列は上三段がセンス鎖の, 下三段がアンチセンス鎖の読み枠を表す.

- (1) このタンパク質 A のアミノ酸配列を書け.
- (2) タンパク質 A のアミノ酸配列からその構造的特徴を推測し、50 字程度で書け.

問 C 下線①に関連して、図 2 の遺伝子 a を CRISPR-Cas9 システムで破壊したい。どのようなガイド RNA をデザインすればよいか、適切な配列を示すとともにその理由を 50 字程度で書け。ただし配列は 20 塩基からなる認識領域のみ示せば良い。

問 D 下線②に関して、以下の問(1)及び(2)に答えよ。

- (1) 数塩基の挿入や欠失が遺伝子破壊につながる理由を 100 字程度で説明せよ。
- (2) あるガイド RNA をデザインして図 2 の遺伝子 a の破壊を試みた。ゲノム編集後の遺伝子 a 領域のコードタンパク質のアミノ酸配列の一部を決定したところ、KVQQIQDN という断片の配列が得られた。この時ゲノム DNA にはどのような変異が導入されたか、考えられる可能性を 50 字程度で示せ。

問 E ガイド RNA の特異性は認識配列のみに依存するとする。ヒトゲノムを対象とした場合、任意の遺伝子一か所のみを標的とするためには、原理的にガイド RNA の認識領域の長さは 20 塩基あれば充分であると見積もることができる。その時の CRISPR-Cas9 の標的とする塩基配列のヒトゲノム中での出現頻度を計算し、その値を記せ。ただしヒトゲノムのサイズは  $3.0 \times 10^9$  塩基対とし、GC 含量は 50%とする。