

大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻

平成14年入学博士前期課程入学試験問題（生物学1－微生物学）

問題1. あるカビを観察したところ、図1と図2に示すような器官を観察した。
以下の文章の空欄に適切な語句を挿入しなさい。(1/10)

このようなカビは、通常菌糸に（1）を有し、このカビが属する分類学的亜門は（2）である。この亜門に属するカビの有性胞子を作っている器官は一般名を（3）と呼び、このカビの（3）を示した図は（4）である。この図の形態的特徴からこの器官は（5）（英語表記）と呼ばれ、分類学上重要な形質である。一方、無性世代の胞子は図（6）に示されるように形成される。この胞子は（7）（英語表記）と呼び、胞子形成過程から（8）型の胞子である。もし、有性世代が見つからない場合は、このカビは（9）亜門に分類される。このカビは、日本酒醸造に用いられる麴かびと同じ属（genus）に分類され、その属名は（10）（ラテン語学名表記）である。

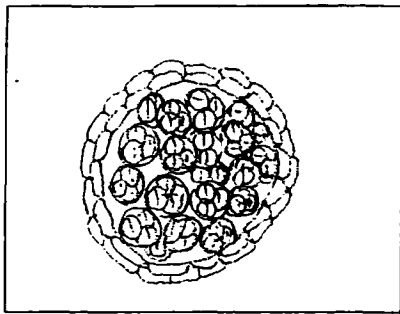


図1

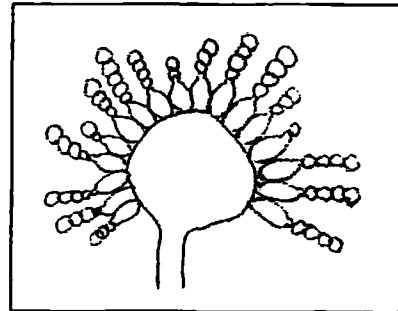


図2

問題2. 以下の問いに答えよ。(1/10)

1. 光合成独立栄養生物、化学合成独立栄養生物、光合成従属栄養生物、化学合成従属栄養生物の相違について述べよ。
2. 地球誕生後、上記の4種はどの順番に現れたと考えるか。また、その考えに至った理由を述べよ。

問題3 次の表はグラム陽性細菌の主要群を示したものである。

- (1) (A), (B), (C)にあてはまる日本語の総称を記しなさい。
- (2) 上記 A,B,C のいずれかの菌を使用した代表的醗酵産物を A,B,C ごとに2つずつあげなさい。
- (3) この表に対比するものとして、グラム陰性細菌群があります。代表的なグラム陰性細菌の属名をラテン語表記で3つ記しなさい。
- (4) こうした細菌を分類するにあたって、指標となる重要な化学・分子系統分析項目を4つ記しなさい。(採点1/5)

グラム陽性細菌の主要群*

I群. 規則的細胞形態の単細胞性桿菌または球菌：
二分裂による増殖

- 代表菌属
- (A) { *Streptococcus*(レンナ球菌属)
Leuconostoc
Pediococcus
Lactobacillus
- マイクロコッカス { *Staphylococcus*(ブドウ球菌属)
Micrococcus
Sarcina

II群. 単細胞性で、多様な または不規則な形態の傾向をもつ
か、または菌糸状で菌糸の分裂によって増殖する。

- 代表菌属
- (B 型細菌) { *Corynebacterium*
Aerobacter
Propionibacterium
- (C) { *Bifidobacterium*
Actinomyces
Mycobacterium
Nocardia
Geodermatophilus

III群. 栄養形は菌糸状でのみ生育；特殊分化胞子の形成による増殖

- 代表菌属
- (C) { *Streptomyces*
Micromonospora
Streptosporangium
Thermoactinomyces

* 単細胞性有胞子菌を除く。

問題4. 多くの化学物質が生物の遺伝子に作用し、突然変異や染色体異常を引き起こすことが知られている。これまで様々な生物材料を用いた変異原性試験が開発されているが、微生物を用いた Ames テストや umu テストが広く用いられている。以下の設問に答えよ。(配点1/5)

Ames テストではヒスチジン要求性 *Salmonella typhimurium* 菌株^(問4)を、変異原の存在下で高頻度で野生型(ヒスチジン非要求性)に復帰突然変異する頻度により変異原性を検出することを利用したものである。本試験にはフレームシフト型変異株及び塩基対交換型変異株^(問1)が最もよく用いられている。試験菌株と前処理後の被検試料と S-9 mix (代謝酵素誘導製剤として Phenobarbital 及び 5, 6-Benzoflavone を併用投与したラットの肝臓ホモジネート)^(問2)を加えて試験を行う。これらを 37°C 20 分放置した後、0.001%(w/v)のヒスチジンを含む最少培地に広げて 37°C 2 日間培養する^(問3)。増殖してきたコロニー数で変異原性を検定する。

一方細胞が外的要因(紫外線・化学物質)により DNA 損傷を受けた場合、緊急に修復する機能として、SOS 修復が知られている。20 ほどある SOS 遺伝子群の1つである *umuDC* 遺伝子は、本遺伝子によって翻訳されるタンパク質が損傷 DNA の合成に伴うエラーを生じる機能を持ち、それゆえ多くの突然変異が起こるとされている。従ってこの *umuDC* 遺伝子の誘発を測定することによって、DNA 修復の定量化及び変異原の可能性を測定することが出来る。この機能に関与する SOS 遺伝子群は、通常 LexA リプレッサータンパク質により発現が抑制されているが、紫外線などの DNA 損傷で 1 本鎖 DNA が生じると、これが SOS シグナルとなって RecA タンパク質の持つプロテアーゼを活性化し、LexA タンパク質が分解されて SOS 遺伝子群が誘導されると考えられる。*umu* テストは、SOS 遺伝子の1つで突然変異を起こさせる *umuDC* 遺伝子に β -ガラクトシダーゼ遺伝子を結合させた *umuC'::lacZ* 融合遺伝子をもつプラスミド pSK1002 を導入した *Sal. typhimurium* TA1535^(問4)を用いるもので、変異原物質により DNA に損傷を受けると SOS 反応が誘導され *umuDC* 遺伝子の調節下にある *umuC'::lacZ* 融合遺伝子が発現するので、その産物である UmuC':LacZ タンパク質がもつ β -ガラクトシダーゼ活性を測定することで変異原性を調べるものである^(問5)。本試験菌株を対数増殖期前期まで培養し、そこに前処理後の被検試料と S-9 mix^(問2)を加えて 37°C 2 時間培養する。培養後の菌液をサンプルとし、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定する。

設問1. フレームシフト型と塩基対交換型変異を説明せよ。

設問2. なぜ S-9 mix を加えて試験を行うのか、その理由を述べよ。

設問3. Ames テストで変異原性を検定する場合、最少培地に要求アミノ酸のヒスチジンを加えている。これでは復帰突然変異した菌株だけを選択出来ないように思われる。本実験方法が正しいかどうかを理由と共に述べよ。

設問4. SOS 応答は大腸菌でよく研究されているものの、Ames テストや *umu* テストでは *Salmonella* 菌を用いている。それはなぜだと考えられるか。

設問5. 本文中より考えられる SOS 反応機構及び *umuC'::lacZ* 融合遺伝子の発現機構を説明する図を書きなさい。

設問6. Ames テストと *umu* テストの特徴を対比し、箇条書きにして述べよ。

設問7. *umu* テストで陽性を示した 135 種類の化学物質を Ames テストに供した結果、123 種類で一致した結果が生じた。この結果を考察せよ。

問題5. 表1を参照して、突然変異に関する以下の問いに答えよ。(配点1/5)

- 問1) DNA塩基配列の変異によって、あるタンパク質を指令する mRNA の中に UGA コドンが生成した。この変異を、遺伝学的にはどのような変異と呼ぶか答えよ。
- 問2) その変異細胞に、第2番目の変異が起こり、tRNA のヌクレオチド1個が変化して、そのタンパク質の翻訳が正しく行われるようになった。このような第2番目の変異を、遺伝学的にはどのような変異と呼ぶか答えよ。
- 問3) 変異した tRNA によって、UGA がトリプトファンに翻訳されるとすれば、変異 tRNA 分子ではヌクレオチドがどのように変化したか答えよ。
- 問4) もし、変異 tRNA によって、UGA がアルギニンに翻訳されるとすれば、変異 tRNA 分子ではヌクレオチドがどのように変化したか答えよ(但し、ヌクレオチドはひとつしか変わっていないとする)。
- 問5) このような変異 tRNA が存在すると、この細胞の正常な遺伝子の翻訳にはどのような影響が現れる可能性があるか答えよ。
- 問6) 以下の DNA 鎖の塩基配列を鋳型にして、mRNA が合成され、さらにそれがタンパク質に翻訳されたとする。

5'-TTAACGGCTTTTTTC-3'

この mRNA は開始コドン無しでも翻訳されると仮定して、合成されるタンパク質のカルボキシル末端のアミノ酸とアミノ末端のアミノ酸は、それぞれ何か答えよ。

- 問7) あるタンパク質に起こった変異によって、その活性が少しだけ低下するような変異を、遺伝学的にはどのような変異と呼ぶか答えよ。

表1. 遺伝暗号

1 番目 (5'末端)	2 番目				3 番目 (3'末端)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

問題6. 一般形質導入実験で、供与菌 ($cys^+ leu^+ trp^+$) から調製したファージを用いて受容菌 ($cys^- leu^- trp^-$) の形質導入を行った。形質導入処理した受容菌をロイシンとトリプトファンを加えた最少合成平板培地に塗布することにより、多くのコロニーを得た。以下の問いに答えよ。(配点1/5)

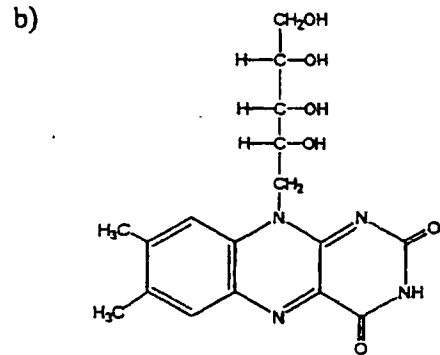
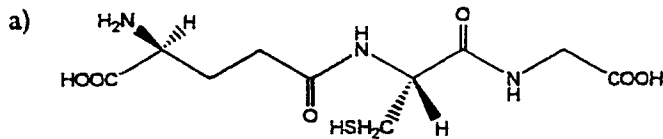
- 1) 得られたコロニーの考えられる遺伝子型を述べよ。
- 2) 次に、得られたコロニーを以下に示す3種類の平板培地(培地a、b、c)にレプリカした。原理的にどのような遺伝子型のコロニーがそれぞれの培地で生育してくるか?
培地a (トリプトファンだけを加えた最少合成培地)
培地b (ロイシンだけを加えた最少合成培地)
培地c (何も加えない最少合成培地)
- 3) 最初に得られたコロニーの56%が培地aで生育し、5%が培地bで、培地cでは何も生育しなかった。実際にレプリカした培地で生育したコロニーのそれぞれの遺伝子型は何か?
- 4) 染色体上の3つの遺伝子の順番を述べ、外側の遺伝子のどちらが真ん中の遺伝子とより近いか?

生化学1 (配点率 50点/150点)

I. 以下の化合物の構造を示せ。(5 x 3 = 15点)

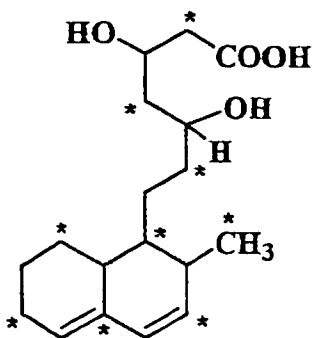
- a) Sucrose (立体構造式)
- b) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
- c) 1-Methylguanosine

II. 以下に構造式で示す化合物の名称、及び生体内でどのような反応に関与しているかを述べよ。(14点)



III. 仮想のアルドトリオースのD体、L体の混合物がある。この混合物の比旋光度は、+12度であった。この混合物に対して、立体特異的触媒の存在下、 NaBH_4 でL体のみの還元反応を行うと、比旋光度は、-6.5度になった。最初の混合物の光学純度(% e.e.)を、計算の根拠を示して求めよ。ただし、還元反応は、100%収率で、副反応は生じないと仮定する。(8点)

IV. 下に示す構造は、ある仮想天然物の構造である。酢酸Naを取り込ませたと、*印の炭素は、酢酸の2位の炭素に由来することが判明し、本化合物は、脂肪酸生合成系と極めて類似した経路で生合成される事が明らかになった。



(13点)

設問1) 酢酸がスターター分子であり、伸長反応にはマロニル-CoAのみを用いるとすると、何回の伸長反応が必要かを答えよ。

設問2) 脂肪酸生合成系では、ケトアシル基生成後、(A)→(B)→(C)3種の異なる反応の後、次の伸長反応が生じる。この3種の反応について述べよ。

設問3) 本化合物では、各伸長過程で(A)(B)(C)すべてが行われるわけではなく、いずれかの反応の後、次の伸長反応に移っていることが構造より推定される。各伸長サイクルで、行われる最後の反応の順を示せ。例) 3回の伸長サイクルがあるとした場合、第1回目の伸長サイクルでは(B)反応の後に第2回目の伸長反応に移り、第2回目の伸長サイクルでは(A)反応の後に、更に第3回目の伸長サイクルでは(C)反応までが生じているとすると、B-A-C と記せ。

生化学2 (配点 50/150)

I. Anfinsen は蛋白質の立体構造がそのアミノ酸配列により自動的に決まることを実験的に初めて証明したが、それはどのような実験であったのか説明せよ (10 点)。

II. A, B, C, D, E 5つの蛋白質を混合して水に溶かした溶液がある。これらの蛋白質の分子量、等電点、サブユニット数は下に示すとおりである。なお、分子量はサブユニット一つあたりの分子量とする。以下の問いに答えよ (24 点)。

	分子量	等電点	サブユニット数	
A	10000	8	1	
B	30000	3	2	(ホモダイマー)
C	15000	9	1	
D	20000	5	4	(ホモテトラマー)
E	40000	7	1	

1) 上記混合物を 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に透析した後、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。この時、カラムに吸着しないと予想される蛋白質はどれか答えよ (複数の場合あり)。また、その理由を述べよ。なお、いずれの蛋白質もこの条件下で変性したり凝集したりせず、陽イオン交換樹脂と静電的相互作用以外の相互作用をしないものと仮定する。

2) 上記条件下カラムに吸着した蛋白質を、カラムに通す緩衝液の食塩濃度を連続的に上昇させることによりカラムから溶出させた。この時、蛋白質はカラムからどのような順番で溶出すると期待されるか答えよ。また、その理由を述べよ。

3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で上記混合物を分離した時、ゲル中の移動速度が最も遅いと期待される蛋白質はどれか答えよ。また、その理由を述べよ。なお、泳動は pH 9 で負から正の方向に行うものとする。

4) 上記混合物を 0.2 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析した後、同緩衝液で平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供した。この時、蛋白質はどのような順番でカラムから溶出すると期待されるか答えよ。また、その理由を述べよ。なお、いずれの蛋白質もこの条件下で変性したり凝集したりせず、ゲルろ過樹脂と特別な相互作用 (吸着など) をしないものと仮定する。

III. 酵素反応における反応中間体と遷移状態の違いについて説明せよ。また、セリンプロテアーゼの反応機構を模式的に示すとともに、どれが反応中間体の構造を反映し、どれが遷移状態の構造を反映するのか示せ (16 点)。

生化学 3 (配点率 30/150)

物質 A と物質 B との相互変換反応を触媒する酵素 E を考える。酵素 E は、その触媒反応中に、 $E \cdot A$ 複合体、 $E \cdot B$ 複合体の 2 種類の間状態を順にとり、反応が完結したとき元の状態(E)にもどる。そして、酵素の状態がこの 3 段階の反応ステップから成る触媒反応サイクルを正方向に一巡する間に、1 分子の A が 1 分子の B に変換されるものとする。今、反応系内の物質 A、物質 B、酵素 E の各々の全濃度を一定に保ち、反応が定常状態で正方向に進行しているとき、下記の問題に理由を付けて答えよ。

- 1) 系の自由エネルギーの時間的変化はどうなるか。
- 2) A が B に変換される速度は、 $E \cdot B$ 複合体が E になるステップの正味の反応速度に等しいと考えてよいか。
- 3) 酵素 1 分子の立場からみると、A が B に変換される速度は、酵素分子の状態が触媒反応サイクルを一巡するに要する平均時間に反比例すると考えてよいか。
- 4) 酵素 1 分子が $E \cdot A$ 複合体から $E \cdot B$ 複合体に変化するのに要する平均時間は、 $E \cdot B$ 複合体から E に変化するのに要する平均時間に等しいと考えてよいか。

生化学 4 (配点率 20 / 150)

あるタンパク質が、高温条件下で不可逆的にその機能を失った。

- 1) この不可逆的な変化を観察する実験方法を述べよ。
- 2) この変化が不可逆になった要因を考察せよ。

細胞生理学

問題1, 2, 3の解答はそれぞれ別の解答用紙を用いること。なお, 各問題の配点割合は1/3である。

問題1. 図1. 1, 1. 2および1. 3を見て, 設問1-1から1-3の()内に適切と思われる語を記入しなさい。また設問1-4から1-6に答えなさい。

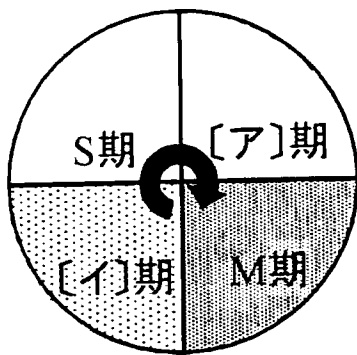


図1. 1

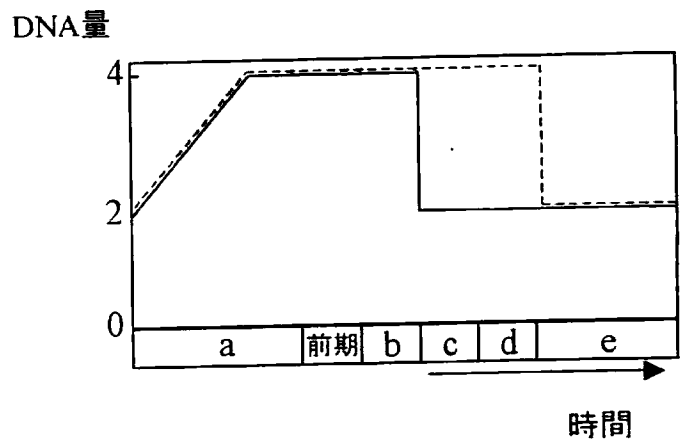


図1. 2

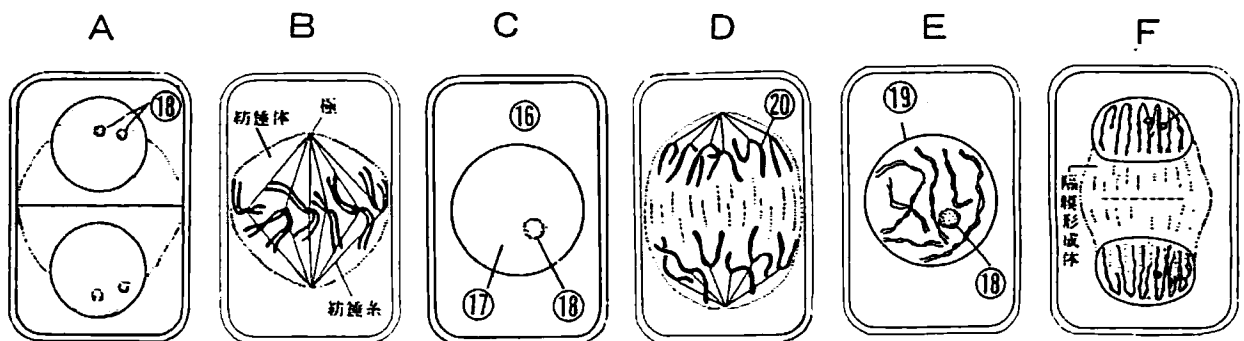


図1. 3 (細胞は分裂する順に並べられてはいない)

- 問1-1 図1. 1は有糸分裂のうち、(1)分裂の細胞周期を模式的に示したものである。細胞周期を4つの時期に区分した場合、[ア]期は(2)期、[イ]期は(3)期と呼ばれる。このうち[イ]期から[ア]期へかけての時期は(4)期とも呼ばれる。4つの時期のうちDNAが複製されるのは(5)期である。細胞周期の各期の開始と終結はそれぞれ特異的な(6)および(7)の複合体によって制御される。これらを細胞周期エンジンとよぶ事もある。
- 問1-2 図1. 2は有糸分裂に伴って認められるDNA量の相対的な変化を模式的に示したものである。図1. 2の a から e の時期を図1. 1におけるS期、[ア]期、M期、[イ]期に対応させると a は(8)期および(9)期、b は(10)期、c は(11)期、d は(12)期、e は(13)期となる。実線で示すように、b期とc期の間でDNA量が(14)当り半減し、破線で示すように、d期とe期の間では(15)当り半減する。
- 問1-3 図1. 3は有糸分裂に伴って見られる細胞の変化である。図1. 3の中の⑮から⑳までの名称を英語で答えよ。また各分裂時期のAからFを図1. 2のaからeの時期に対応させるとAは(21)、Bは(22)、Dは(23)となる。
- 問1-4 細胞周期の進行を制御しているのは(6)と(7)である事が明らかになっているが、その働きについて、チェックポイント、リン酸化という2つの用語を用いつつ、150字以内で述べなさい。
- 問1-5 細胞質分裂(Cytokinesis)は図1. 2の中のどの時期で生じるのかを明らかにし、細胞が2つの娘細胞に分かれる境界が動物細胞と植物細胞ではどのように決定されるのかを150字以内で述べなさい。
- 問1-6 図1. 3で示した細胞は動物細胞あるいは植物細胞のいずれであるか？判断の根拠を2つあげて答えなさい。また、その細胞の進化的な成り立ちについて細胞小器官の起源を考慮して述べなさい。併せて150字以内で述べなさい。

問題 2

(注：解答にあたっては、該当する項目番号を必ず明記すること)

問 2-1

下記に示す化合物の化学構造式を用い、IPP (Isopentenyl pyrophosphate) の生合成について説明しなさい。また、解答にあたって、これら以外の化合物(化学構造)も引用すること。

- D-glucose
- acetyl CoA
- mevalonic acid
- HMG CoA
- D-xylulose-5-phosphate

問 2-2

陸上植物の光合成暗反応に関する下記の 2 問 (2-2 a, b) に答えなさい。

2-2 a)

C 3 植物および C 4 植物の命名の由来は、初発の炭酸ガス固定反応産物の炭素数に関係している。C 3 植物および C 4 植物の初発炭酸ガス固定反応をそれぞれ簡単に説明しなさい。(両者の違いを明確に示すこと) (200 字程度)

2-2 b)

C 3 植物においては、強光乾燥下、適正な生育条件に比べ光呼吸が大きく変化する。その理由を説明しなさい。(150 字程度)

生物工学一1 (配点率 計33.3%)

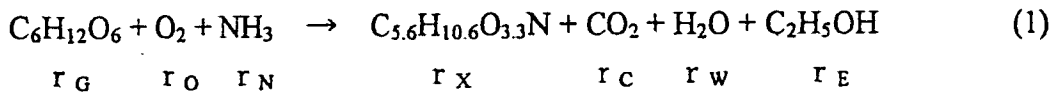
1, 膜分離技術としてUF, RO, MFがある。これらの特徴、及びどのようなタイプのモジュールがそれぞれの膜分離技術で採用されているか、各技術ごと5行以内に説明せよ。説明に図を用いてもよい。(配点率10%)

2, 硫酸タンク内の硫酸の密度が293 Kで 1200 kg m^{-3} でなければならないのに吸水によって 1120 kg m^{-3} と低くなっていた。そこで密度 1600 kg m^{-3} の硫酸を加えて 1200 kg m^{-3} に調整したい。タンク内の硫酸 100 kg に対して密度 1600 kg m^{-3} の硫酸を何 kg 加えてやればよいか。密度 1120 kg m^{-3} , 1200 kg m^{-3} , 1600 kg m^{-3} の硫酸濃度はそれぞれ 200 kg m^{-3} , 300 kg m^{-3} , 800 kg m^{-3} と仮定する。(配点率13.3%)

3, 新しく建設した実容量 100 M^3 の抗生物質生産用培養タンクの k_{La} を動的測定法により測定し、以下のデータが得られた。 $k_{La}(\text{h}^{-1})$ を計算せよ。(配点率10%)

時刻	溶存酸素 (%飽和)	備考
9:00	5	通気再開
9:01	65	
9:02	87	
9:15	100	DO 定常

問題1 グルコースを炭素源とする酵母好気培養系がある。
この生物反応は、次の巨視的な代謝反応モデルで書ける。



右辺第一項は実験的に求めた菌体成分を表す化学式で N を基準に表現している。(モル当量は灰分も考慮して 154.6g と考えている。)

いま、この反応式の C, H, O, N 各元素に注目すれば、その反応速度間のバランス式は以下のように

$$A r = 0 \quad (2)$$

と、書ける。ただし、 r ($r^T = (r_G, r_X, r_W, r_E, r_O, r_N, r_C)$) は 反応式中 7 成分のそれぞれのモル変化速度からなるベクトルである。ここで、酸素、アンモニア、二酸化炭素の生成速度 r_O, r_N, r_C はオンラインで測定できるものとし、この 3 成分まとめて r_m と書くことにし、残りの 4 成分 r_G, r_X, r_W, r_E をまとめて r_c と書くことにする。このとき式(2)を式(3)のように変形する。なお変化速度が $-$ の場合は消費を、 $+$ の場合は生成を表すものとする。

$$B r_c = M r_m = b \quad (3)$$

50 L 発酵槽でのデータは、 $r_O = -0.075(\text{mol/h})$, $r_N = -0.5(\text{mol/h})$, $r_C = 3.2(\text{mol/h})$ と観測された。このとき、

- (1-1) (4 x 7)次元行列 A を具体的に数値を入れて書きなさい。(配点率 4%)
- (1-2) 4次元ベクトル b を具体的に数値を入れて求めなさい。(配点率 4%)
- (1-3) (3)式は r_c を未知数とする 4元連立線形代数方程式と考えられる。掃き出し法を使って、解を求めなさい。ただし、掃き出し法以外で解いても正解とは見なさない。
(解き方へのアドバイス：掃き出し法を始める前に、式および変数を並び替えると、見通しよく解ける場合がある) (配点率 15.3%)

2. 二酸化炭素問題、地球温暖化問題の解決がなぜ難しいのか？ 次のポイントの内ひとつを選び、この問題の難しさを 200 字程度で説明しなさい。(配点率 5.3%)

ポイント 1：環境における南北問題

ポイント 2：森林による二酸化炭素吸収と京都議定書批准問題

3. 水質を示す指標、TOC と COD についてそれぞれ定義を簡単に述べなさい。また次の物質の TOC 当たりの COD はモルで表示する (COD/TOC (mol-O₂/mol-C)) といくらか計算しなさい。(配点率 4.7%)

- (1) グルコース、(2) メタン

生物工学 3 (配点率 計 33.3%)

1. 次の質問についてそれぞれ 200 字以内で答えなさい。(配点率 11.1%)

- (a) 微生物の増殖、代謝に影響する重要な環境因子について述べなさい。
- (b) 微生物量の測定法とその特徴について述べなさい。
- (c) エアリフト発酵槽について説明しなさい。
- (d) Bellman の最適性の原理を述べ、例を示しながらその利用法を説明しなさい。
- (e) 比例制御のオフセットとは何か説明し、その軽減法を示しなさい。

2. つぎの図に示すように完全混合培養槽あるいは管型培養槽を用いる 3 種のシステムによる連続培養において、それぞれの場合について菌体の生産性を計算し、もっとも高いのはどれであることを示しなさい。(配点率 22.2%)

ただし、いずれの場合も制限基質グルコースの濃度が 200 kg m^{-3} である培地を $F = 15 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ の速度で供給する。培養する微生物は Monod の速度論にしたがって増殖するものとし、最大増殖比速度 μ は 0.4 h^{-1} 、飽和定数 K_s は 2 kg m^{-3} 、収率定数 $Y_{x/s}$ は $0.5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ とする。

