

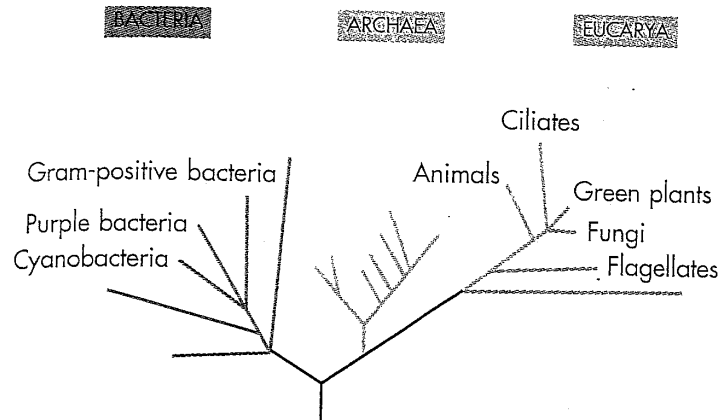
大学院工学研究科 物質・生命工学専攻

平成15年度 博士前期課程入学試験問題 専門科目 (c) (生物系)

微生物学

問題1 以下の問題に答えよ。

- 問1 下記の図は、生物種の系統樹を示したものである。この様な系統樹の基になっているデータにはどのようなものがあるか、知っているところを記しなさい。
- 問2 Bacteria と Eucarya との遺伝子発現における大きな違いを述べなさい。
- 問3 Gram-positive bacteria の代表的な属種名を学名で5種類記しなさい。
- 問4 Purple bacteria, Cyanobacteria, Archae の微生物学特性を例をあげて説明しなさい



問題2 真核微生物の分類に関する以下の設問に答えよ。

- 問1 Hawsorth(1983)による菌類の分類体系における真正菌門 (Eumycota) に属する亜門の名称を和名と学名で示し、その亜門の分類学的特徴を述べよ。
- 問2 酵母の定義を述べ、所属する亜門名を示せ。

問題3 微生物はさまざまな環境変化・刺激に応答して生存している。ある微生物は高い浸透圧条件下に置かれると、物質Aと物質Bを通常より大量に生産することがわかった。そこで、この微生物の高浸透圧応答機構を研究するため、通常条件で物質Aと物質Bをそれぞれ生産できない突然変異株を分離して遺伝学的解析を行うことにした。この微生物は通常一倍体で、xとyの接合型を持っており、x型株とy型株の交雑により二倍体を作成することができる。二倍体は栄養飢餓条件下で減数分裂を行い、4つの胞子を形成する。得られたx接合型の突然変異株の高浸透圧条件下での性質を調べると表1に示すような表現型を示した。以下の問いに答えよ。

表1. 突然変異株の表現型

突然変異株番号	物質Aの生産	物質Bの生産	高浸透圧条件下での生育
野生型株	+	+	+
#1	-	+	+
#2	-	-	-
#3	+	-	-
#4	-	-	-

問1 得られた突然変異株の相補性試験を行う具体的な実験手順を説明しなさい。

問2 遺伝解析の結果、得られた突然変異はすべて劣性で、異なる1つの遺伝子に生じていることがわかった。このことより、突然変異を起こした遺伝子の機能についても言及しながら、この微生物の高浸透圧応答機構についてどのようなことが考えられるか考察しなさい。なお、できるだけ単純な機構を想定しなさい。

問3 突然変異株#4から物質Aを再び生産する復帰変異株R1を分離した。この復帰変異が抑圧変異であるかどうかを調べる実験を考えよ。

問題4 遺伝学に関係した以下の用語について説明しなさい。

問1 上位下位試験

問2 特殊形質導入

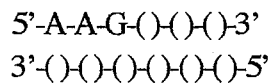
問3 連鎖分析

問4 Hfr、F⁺、F'

問題 5 DNA の構造を解析するために塩基配列特異的に 2 本鎖 DNA を切断する制限酵素と呼ばれる一群の加水分解酵素がある。これらの酵素は種々の細菌によってつくられ、外来の DNA を分解して、その侵入を防ぐ働きをしていると考えられている。加水分解するために認識する塩基配列は、主に、4, 5, 6, 8 塩基対の長さで、その配列は一般に ① 配列であることが多い。*Hind*III は 6 塩基認識の制限酵素である。(配分 13.3%)

問 1 ① に適当な語句を埋めよ。

問 2 *Hind*III の切断部位の塩基配列を下の図の () の中に、また切断部位を ↓ 印で示せ。



問 3 塩基配列が、G,A,T,C についてランダムな配列と見なせると、上記のような配列が出現するのは何個の塩基に 1 つの割合と予想されるか。

問 4 細菌自身の DNA にも上記のような塩基配列があると考えられるが、それにも関わらず外来の DNA を分解して、自身の DNA を分解しないのはなぜか。その理由を述べよ。

問題 6 以下にアミラーゼ生産菌を分離するための実験を行った。各設問に答えよ。

アミラーゼ生産菌を濃縮するために、採取したサンプルをデンプンを炭素源にした合成液体培地に加え、30℃で数日振とう培養した (①)。培養後希釈法によって、同組成の寒天培地に平板培養した。コロニーが生育してきた平板にヨウ素溶液を均一に広げ、デンプンの分解能を調べた (②)。目視によって他のコロニーから離れた別々の4種類のコロニーを選び移植した。それぞれを仮にA, B, C, Dと名付けた。その後種々の試験をした結果、下記のようになった。

	A	B	C	D
ヨウ素・デンプン反応	24時間後も青色	紫色から赤褐色に変色	すぐに呈色しなくなった	青色から時間が経つと呈色しなくなった
糖の定量・定性	分解能ない	糖化型・エキソ型・マルトース	液化型・エンド型・マルトースからマルトオクタオース	糖化型・エキソ型・グルコース
コロニーの形状	白色・なめらか	灰白色・裂片状・しわ状	黄緑色・糸状菌糸	白色・糸状菌糸
顕微鏡観察など	長桿菌～短桿菌	短桿菌 (内生孢子)・運動性あり	有性孢子がみつからない・菌糸に隔壁がある・(③)	接合孢子・菌糸に隔壁がない・(④)
グラム染色	赤	青	試験せず	試験せず
MR 反応	+	-	試験せず	試験せず
VP 反応	-	+	試験せず	試験せず
牛乳凝固試験	+	-	試験せず	試験せず

問 1 (①) のような培養方法を何といいますか。

問 2 (②) もしデンプン分解能が高ければコロニー周辺はどのようになりますか。それを何といいますか。

問 3 (③) 頂のうがあり梗子の上端に分生子を連鎖して作った。頂のう、梗子、分生子がわかるように図説しなさい。

問 4 (④) 胞子のう柄が仮根の真上から生じていた。胞子のう柄、仮根がわかるように図説しなさい。

問 5 以上の結果から B, C, D に関するデンプン分解酵素のタイプを考察しなさい。またその菌株の属名を推定しなさい。

問 6 A はデンプン分解能が認められなかったのはなぜか考察しなさい。

生物化学 A-1

I. 以下の化合物の構造を示せ。

- a) 環状の β -D-galactosamine (立体構造式)
- b) コレステロール
- c) 3',5'-cyclic AMP
- d) 2,4-ジニトロフロオロベンゼンと L-Ile との反応産物
- e) アラキドン酸

II. D-グルコースを希アルカリ水溶液として放置した。この時に生じる反応を具体的な構造を示して説明せよ。ただし構造表記には、Fisher 投影式を用いよ。

III. 飽和長鎖脂肪酸の生合成経路に関して、butyric acid 生成に至るまでを具体的な構造を示して説明せよ。

生物化学 A-2

I. 以下の反応（アミノ酸側鎖の化学修飾）の化学反応式を示せ。

- 1) リジンのアセチル化（無水酢酸との反応）
- 2) リジンのスクシニル化（無水コハク酸との反応）
- 3) システインのカルボキシメチル化（モノヨード酢酸との反応）
- 4) シスチンの 2-メルカプトエタノールによる還元
- 5) アスパラギン酸のメチルエステル化（ジアゾメタンとの反応）
- 6) アルギニンと 2,3-ブタンジオンの反応

II. リボヌクレアーゼ T₁ (pI=3.8)、卵白アルブミン (pI=4.6)、β-ラクトグロブリン (pI=5.2) の 3 つのタンパク質がある (pI は等電点)。以下の問いに答えよ。

1) Native な状態のままこれらのタンパク質を pH 5.0 で電気泳動する時、陰極方向に移動するものはどれか答えよ（一つとは限らない）。

2) 上記 3 つのタンパク質の混合物を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶かした後、同緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。その後、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、これらの蛋白質はカラムからどのような順番で溶出するか答えよ。なお、いずれの蛋白質も陰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。

III. タンパク質の構造は、一次構造、二次構造、三次構造、四次構造に区別される。では、タンパク質が四次構造を持つ利点を、ヘモグロビンを例にとり説明せよ。

生物化学 A-3

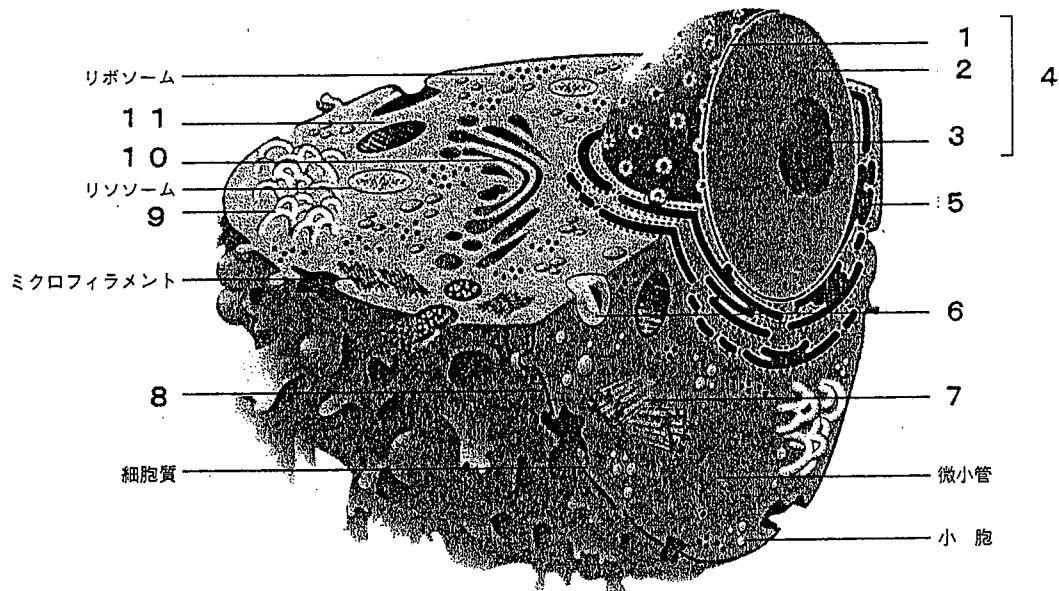
物質 A と物質 B との相互変換反応を触媒する酵素 E を考える。酵素 E は、その触媒反応中に、E・A 複合体、E・B 複合体の 2 種類の間状態を順にとり、反応が完結したとき元の状態(E)にもどる。そして、酵素の状態がこの 3 段階の反応ステップから成る触媒反応サイクルを正方向に一巡する間に、1 分子の A が 1 分子の B に変換されるものとする。今、反応系内の物質 A、物質 B、酵素 E の各々の全濃度を一定に保ち、反応が定常状態で正方向に進行しているとき、下記の問題に理由を付けて答えよ。

- 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・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・A 複合体から E・B 複合体に変化するのに要する平均時間は、E・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。

生物化学 B

問題B-1、2、3の解答はそれぞれ別の解答用紙を用いること。

問題 B-1 高等真核生物の細胞立体図を見て以下の設問に答えよ。



- 問1 上記の細胞は動物あるいは植物いずれの細胞の模式図であるか？3つ以上の理由を付けて、あわせて100字以内で答えよ。
- 問2 図中に直線で示したオルガネラ等の内、動物細胞と植物細胞に共通して存在するものの直線の番号を5つ書き出し、その直線が指し示しているオルガネラ等の名称を日本語と英語で記せ。
- 問3 オルガネラ等の内、動物細胞にのみ存在するもの、植物細胞にも共通して存在するものを各一つずつ選び、その機能についてそれぞれ200字以内にまとめよ。
- 問4 共生説に基づいた動物および植物細胞の起源について、図を描いて、その図に基づき説明せよ（200字以内）。

問題 B-2

問1 次に示す(1)から(10)までの項目について括弧内(・・)に示す語句を考慮にいれて説明せよ。

- (1): ATP (化学構造式、高エネルギー結合)
- (2): Malonyl CoA (化学構造の特徴、生合成)
- (3): Polyketide (代表的な天然物の名称、化学構造式)
- (4): Ascorbic acid (酸化型、還元型の化学構造)
- (5): Abscisic acid (イソプレノイド、生理活性)
- (6): Ethylene (生合成、遺伝子改変)
- (7): β -Ketoacid (脱炭酸機構、相当する生体内成分の化学構造式)
- (8): Polyisoprene (化学構造、天然物の例)
- (9): Auxins (組織培養、合成・天然)
- (10): Short-day plants (開花、植物名)

問2 光合成を説明した下記の文章の①～⑳内に語句あるいは数字を埋めよ。

- 1) 光化学系①において光子を吸収したP680が電子を放出すると、活性金属として4個の②を含む酸素発生複合体が③から電子を引抜いてこれを補い、結果として、④分子の O_2 と⑤分子のプロトンを生じる。
- 2) 光化学系⑥から放出された電子のほとんどは、⑦に存在する可溶性[2Fe-2S]型⑧に移動する。生じた還元型⑧は、FNRの作用により⑨を還元する。反応機構は、2分子の還元型⑧がFNRのFADに各1電子ずつ移し、⑩型を経て完全還元型の $FADH_2$ を生成し、これが光合成明反応における最終電子受容体である⑨を2電子還元する。
- 3) 光合成暗反応において、⑪の触媒により、RuBPは1分子の二酸化炭素と反応し、⑫分子の⑬を生じる。その反応機構は、RuBPの⑭位炭素のプロトンが引抜かれて生じたエンジオレート中間体が二酸化炭素に求核攻撃し、 β -ケト酸中間体を生じる。生じた β -ケト酸中間体の⑮位のカルボニル炭素に⑯が求核攻撃し、脱プロトンを伴って生じた付加物がレトロアルドール反応(アルドール開裂反応)により開裂し、⑰分子の⑱を生じる。
- 4) C_3 植物は、乾燥・強光条件においては、葉緑体内の酸素濃度が上昇し、二酸化炭素濃度が減少する。そのような条件下、RuBPの一部は、⑲の触媒により酸素と反応し、1分子の⑳と1分子の㉑を生じる。生じた㉑は、グリコール酸に加水分解された後、ミトコンドリアと㉒で行われる一連の酵素反応で二酸化炭素を生じる。本反応は㉓と呼ばれ、乾燥・強光下で㉔障害を回避するという生理学的意義を有すると考えられている。

問題 B-3

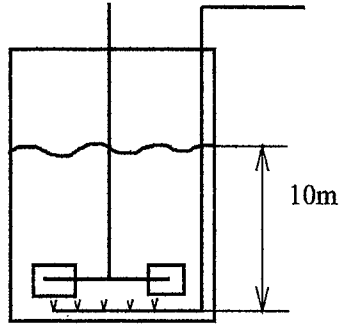
21世紀における生命科学を学習するための10章程度からなる教科書の素案を作成したい。

あなたが編者に任命されたとして、以下の各項目について論述せよ。なお、解答は英語もしくは日本語で記述すること。

- 問1 各章のタイトル（100字もしくは25英単語以内）を目次の体裁で並べ、教科書の構成を示せ。
- 問2 問1で示した各章の内、二つを選び、内容を10行程度で説明せよ。
- 問3 教科書の序文を記述せよ（字数制限なし）。本教科書の目的を明確にし、どのような観点からまとめた教科書であるのか、思想が伝わるように配慮せよ。

生物プロセス工学-I

問題1, 醗酵槽の液面の圧力が大気圧より0.5気圧(約0.5 Kg/cm²、水深5mの圧力に等しい)高い圧力を保っていると仮定する。この醗酵槽には深さ10mのところにはスパージャー(空気の吹き出し口)がある。このスパージャーの所の圧力は何MPaか。また液量100リットルとし、0.6vvm (volume volume⁻¹ minutes⁻¹)で通気したとすると、理想的には何Wの通気動力が必要か(攪拌の影響は無視)。

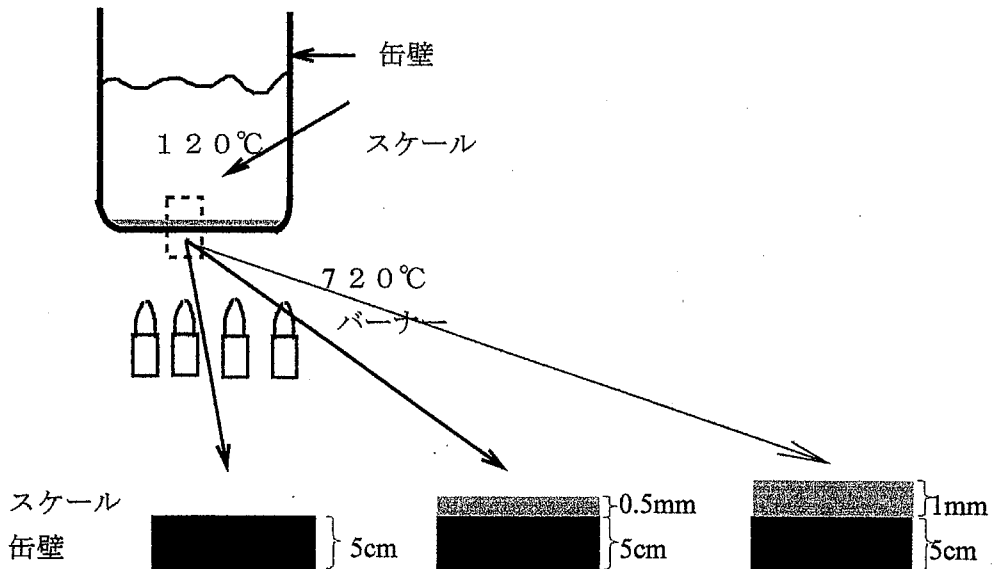


参考

$$1\text{MPa} = 10^6\text{Pa} = 10^6\text{kgm}^{-1}\text{sec}^{-2}$$

$$1\text{W} = 1\text{m}^2\text{kg s}^{-3}$$

問題2, ボイラーにおける缶壁の内側に付着するスケール影響を考察する。スケールの成分は使用の水によるが普通カルシウム、マグネシウム塩等であり、熱伝導度は非常に低い。今ボイラー館内の壁の表面においてスケールの付着が下図a, b, cのごとく進行していったと仮定する。そこでa, b, cにおけるボイラー缶壁の平均温度を計算せよ。ただし缶壁外側の表面温度は720℃、缶内の水は完全混合状態で120℃と仮定し、金属でできた缶壁の厚みは5cm、熱伝導度は50 kcal・m⁻¹・hr⁻¹・K⁻¹であり、付着したスケールの熱伝導度は0.5 kcal・m⁻¹・hr⁻¹・K⁻¹とする。なお壁とスケール以外の伝熱抵抗は無視し得るものと仮定する。スケールの厚みはaでは0mm, bでは0.5mm, cでは1.0mmとする。下図ではわかりやすくするため実際よりスケール(灰色)を厚く記してある。なお伝熱速度はFourierの法則に従い、温度勾配すなわち温度差を厚みで除した値、および熱伝導度に比例する。



問題 1. ある微生物の回分培養データが下表のように与えられている。

1-1. 菌体濃度 X は

$$dX/dt = \mu X \quad (1)$$

に従って変化する。本実験では、比増殖速度 μ は 0~4(h) までは基質濃度にかかわらず、一定であり、それ以降変化した。0~4(h) までの時間 t での菌体濃度を表す式を書き、(ア) に当てはまる数値を求めよ。

1-2. 比増殖速度 μ (1/h) と比生産物生産速度 ρ (1/h)、比基質消費速度 v (1/h) が次のように表せるとき、

$$v = \mu/Y_{X/S} + \rho/Y_{P/S} + m_k \quad (2)$$

菌体収率 $Y_{X/S}$ 、生産物収率 $Y_{P/S}$ 、維持係数 m_k を下表のデータを用いて求めたい。このため、(2) 式の両辺に菌体濃度 X をかけて、0 から時間 t まで積分する。各項がどの様な量に対応するかを考えて最終的に導出される式を書け(これを (3) 式としておく)。

1-3. 右辺第 3 項には菌体濃度積分値が表れる。この値を各時間毎に数値積分で求めておこう。台形公式(台形近似)によって積分値を求め、(イ) ~ (オ) にどんな数値が入るか求めなさい。

1-4. (3) 式を $t=2,4,6$ で具体的に数値を入れて書けば、求めたい未知数 3、式の数 3 の代数方程式となる。これを、掃き出し法によって、求め 菌体収率 $Y_{X/S}$ 、生産物収率 $Y_{P/S}$ 、維持係数 m_k の値を書け。なお、解法がわかるようにシンプレックス表などを使うと良い。また、掃き出し法以外で解いた場合は、正答と見なさない。

1-5. 比増殖速度 μ はいくらになるか?

表—1. 回分培養データ

時間	0 (h)	2 (h)	4 (h)	6 (h)
菌体濃度 X (g/L)	2. 0	(ア)	4. 5	5. 5
基質濃度 S (g/L)	3 0	2 5	1 6. 2 5	5. 7 5
生産物濃度 P (g/L)	0	1. 0	3. 0	6. 0
菌体濃度積分値 $\int_0^t X dt$	(イ)	(ウ)	(エ)	(オ)

問題 2

A. 河川の水質を論じる際に、以下の 4 項目は一般にどのように関係すると考えられるか。汚染の状態と微生物が水を浄化する過程に基づいて説明せよ。(100-150 字程度)

[汚染の状態]、[COD (化学的酸素要求量)]、[BOD (生化学的酸素要求量)]、[溶存酸素濃度]

B. 次の言葉を説明せよ。(それぞれ 50 - 100 字程度)

1) VBNC 微生物

2) Sustainable development

生物プロセス工学－3

1. 次の問の中から5問を選んで質問に答えなさい。
 - 1) 攪拌槽の代表的な攪拌翼を3種類あげ、それぞれの液流れの特徴を説明しなさい。
 - 2) 気泡塔型培養装置について説明しなさい。
 - 3) 微生物の増殖に必要な物質を列挙せよ。
 - 4) 生物量の測定法、推定法を示し、その長所と短所を比較せよ。
 - 5) ケモスタットとタービドスタットを比較して説明しなさい。
 - 6) フィードバック制御の調節計の種類と動作特性
 - 7) Bellman のダイナミックプログラミング

2. 新しく建設した実容量 1,000M³ のアミノ酸生産用培養タンクの k_{La} を動的測定法により測定することにし、以下のデータが得られた。 k_{La} (1/h)を計算せよ。

時刻	溶存酸素 (%飽和)	備考
9:00	5	通気再開
9:02	62	
9:03	75	
9:15	95	DO 定常

3. 単槽連続培養において、培養槽からの流出液を分離機に通して濃縮し、菌体の一部を培養槽に返送する場合（菌体循環再利用連続培養）を考える。培養濃縮液返送の循環比を γ ($0 < \gamma < 1$)、分離機による菌体の濃縮率を δ ($\delta > 1$) とすると、菌体濃度が δ 倍になった培養液が流入培地の流速の γ 倍で培養槽に戻される。ただし、返送液中の制限基質濃度は分離機の前後では変わらず培養槽中の濃度と同じとする。
 - 1) 体循環再利用連続培養では、再循環のない場合に比べて、wash-out になる希釈率も大きくなり、安定に運転できる操作範囲が大きくなることを示しなさい。
 - 2) この方法の応用例について述べなさい。