

平成 24 年度 大学院博士前期課程入学試験問題

生物工学 II

生物化学, 微生物学, 分子細胞生物学から 2 科目選択

解答には, 問題ごとに 1 枚の解答用紙を使用すること

受験番号	
------	--

## 生物化学

### 問題 1. (配点率 34/100)

生物の代謝反応の解析において、 $^{13}\text{C}$  などの安定同位体で標識された化合物を細胞抽出液に加えたり細胞に直接取り込ませたりして、その同位体がどの代謝物質に移行するかを質量分析計等で追跡する標識実験がしばしば行われる。

$^{13}\text{C}$  で標識した化合物を、解糖系・クエン酸サイクルの反応に必要な物質・酵素などをすべて含んだ反応液に加える標識実験について考える。

- (1) 1 位の炭素原子が  $^{13}\text{C}$  で標識されたピルビン酸を反応液に加えた場合、 $^{13}\text{C}$  はどの物質から検出されるか。
- (2) 2 位の炭素原子が  $^{13}\text{C}$  で標識されたピルビン酸を反応液に加えた場合、クエン酸回路が 1 周したときにイソクエン酸, 2-オキソグルタル酸およびオキサロ酢酸のどの炭素原子に  $^{13}\text{C}$  が取り込まれているか。それぞれの構造を示し、 $^{13}\text{C}$  で標識される炭素に \* 印をつけよ。

例  $\text{CH}_3\text{-}^*\text{COOH}$

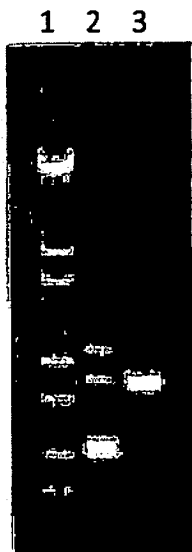
- (3) 2 位の炭素原子が  $^{13}\text{C}$  で標識されたグルコースを反応液に加えた場合、すべての  $^{13}\text{C}$  が  $\text{CO}_2$  に変換されるためにクエン酸サイクルは何周しなければならないか。その理由についても説明せよ。

問題2. (配点率 33/100)

図1は、大腸菌から環状プラスミドDNAを調製して電気泳動した写真である。(i) 精製した単一プラスミドであるのに関わらず、レーン2で3本のバンドが見られた。

DNAのトポロジーを制御する酵素を、a [ ] と言い、I型 a [ ]、および、II型 a [ ] の(ii) 2グループに分けられる。a [ ] が不活化すると、DNAの修復機構に異常を来す。そのため、a [ ] の b [ ] の中には、増殖の早い細胞の成長を止める強力な c [ ] となるものがある。

ある一部の植物が産生するカンプトテシン(以下 CP と略)は、I型 a [ ] の b [ ] であり、c [ ] として注目されている。(iii) CPを産生する植物にもI型 a [ ] が存在するのにも関わらず、これらの植物は正常に生育する。その理由はこれまで不明であった。また、CPを投与しても c [ ] として効かない患者がいることがわかった。この患者から単離した細胞(以下、CP耐性ヒト変異細胞とする)は、CPに耐性を示すことがわかった。そこで、ヒト、CP耐性ヒト変異細胞、CP非産生植物、CP産生植物におけるI型 a [ ] のアミノ酸配列について解析した。その結果、表1のような結果となった。



レーン1: 分子量マーカー  
レーン2: 精製したプラスミド  
レーン3: 制限酵素により一カ所切断したプラスミド

図1

表 1

	酵素活性に関与する領域 の一部のアミノ酸	CP 結合に関与する領域 の一部のアミノ酸
ヒト	K R H Y	Y N D T
CP 耐性ヒト変異細胞	K R H Y	Y S D T
CP 非産生植物	K R H Y	Y N D T
CP 産生植物	K R H Y	Y S D T

- (1) 文章中の a~c の名称を記せ.
- (2) (i) について, レーン 2 でバンドが 3 本となった理由について, 各バンドの特徴を DNA のトポロジーの観点から述べよ.
- (3) (ii) について, 2 グループの酵素のそれぞれの特徴を簡単に述べよ.
- (4) (iii) について, CP 産生植物でも正常に生育する理由について, 表 1 の結果から考察せよ.

問題3. (配点率 33/100)

以下の文章を読み、(1) - (9) の問いに答えよ。

卵白リゾチームは細菌の細胞壁を壊す等電点 11.2 の酵素で、129 アミノ酸残基から成り、分子内に4つのジスルフィド結合をもつ。卵白リゾチームの一次構造を図1に、卵白リゾチームによる細胞壁ペプチドグリカンの切断点を図2に示す。図1では、10残基ごとにスペースを挿入し、残基番号を両側に示してある。太字は活性中心を構成する Glu35 と Asp52 を示す。図2では、卵白リゾチームにより切断される *N*-アセチルムラミン酸 (NAM) と *N*-アセチルグルコサミン (NAG) の間のグリコシド結合を矢印で示してある。

```

1   KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYS LGNWVC AAKFESNFNT QATNRNTDGS 50
51  TDYGILQINS RWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS 100
101 DNGMNAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCR L          129
  
```

図1 卵白リゾチームの一次構造

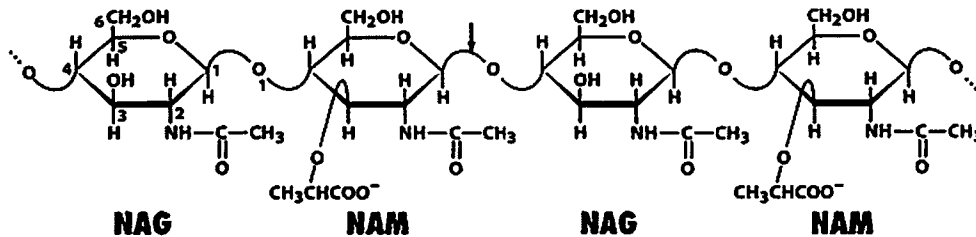


Figure 11-16 Fundamentals of Biochemistry, 2/e  
© 2006 John Wiley & Sons

1 文字表記のアミノ酸の種類 : G, Gly; A, Ala; V, Val; L, Leu; I, Ile; M, Met; P, Pro; F, Phe; W, Trp; S, Ser; T, Thr; N, Asn; Q, Gln; Y, Tyr; C, Cys; K, Lys; R, Arg; H, His; D, Asp; E, Glu

図2 卵白リゾチームによる切断点

- (1) Asp と Glu の構造を書け。記載例 : Ala の場合 R-CH<sub>3</sub>。
- (2) 卵白リゾチームを 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 0.1 mg/ml の濃度で溶かし、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ところ、卵白リゾチームはカラムに全く吸着せず、カラムを素通りした。その理由を述べよ。
- (3) 卵白リゾチームの分子内部に埋もれた Leu を Ser に置換すると、卵白リゾチームの安定性はどのように変化すると予測されるか述べよ。また、そのように予測した理由も述べよ。
- (4) 卵白リゾチームをメルカプトエタノールで還元し、尿素で変性させた後、メルカプトエタノールも尿素も含まない緩衝液に対して透析すると、卵白リゾチームは再構

成されるが、その比活性（単位重量あたりの活性）は変性前と比べると低い。なぜなら、再構成の途中で正しいジスルフィド結合だけでなく誤ったジスルフィド結合も形成されてしまうからである。しかし、このようにして再構成した卵白リゾチームにあるタンパク質を加えると、卵白リゾチームの比活性は著しく向上する。では、そのタンパク質の名前を書け。また、このタンパク質を加えると比活性が向上する理由を書け。

- (5) 卵白リゾチームをメルカプトエタノールで還元し、尿素で変性させた後、モノヨード酢酸を加えると、RCM—リゾチーム（還元アルキル化リゾチーム）ができる。では、メルカプトエタノール ( $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ ) によるジスルフィド結合 ( $\text{R-S-S-R}$ ) の還元と、モノヨード酢酸 ( $\text{ICH}_2\text{COOH}$ ) によるアルキル化の化学反応式をそれぞれ書け。
- (6) RCM—リゾチームをトリプシンで完全分解した時に得られるペプチドの中で、最も鎖長の大きいペプチドの鎖長（残基数）を書け。
- (7) 卵白リゾチームは図2に示した多糖成分だけでなく、昆虫や甲殻類の外骨格の主成分であるキチンも分解する。では、図2に示した多糖成分とキチンの分子構造の違いについて述べよ。
- (8) 卵白リゾチームは図2に示すように、多糖成分の  $\text{C}_4$  と  $\text{O}_1$  の間ではなく  $\text{C}_1$  と  $\text{O}_1$  の間の結合を切断する。では、どのような実験を行うことにより、それが証明されたのか述べよ。なお、 $\text{O}_1$  はグリコシド結合の酸素原子、 $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_4$  はそれぞれ NAG または NAM の  $\text{C}_1$  炭素、 $\text{C}_4$  炭素である。
- (9) 卵白リゾチームによるグリコシド結合の加水分解反応は、Glu35 による  $\text{O}_1$  酸素原子のプロトン化（一般酸触媒）と  $\text{C}_1\text{-O}_1$  結合の切断、切断により生じたオキシニウムイオンと Asp52 の共有結合中間体の生成（共有結合触媒）、共有結合中間体の加水分解の順に進行する。この酵素反応の至適 pH は約 5 で、pH 3 や pH 7 ではこの酵素反応の速度は著しく低下する。では、卵白リゾチームが pH 3 や pH 7 ではほとんど活性を示さない理由を、その反応機構に基づいて考察せよ。答えは、pH 3 で活性を示さない理由、pH 7 で活性を示さない理由、の2つに分けて書け。なお、卵白リゾチームの構造、安定性、基質親和性は pH3-7 の範囲で変化しないものとする。

## 微生物学

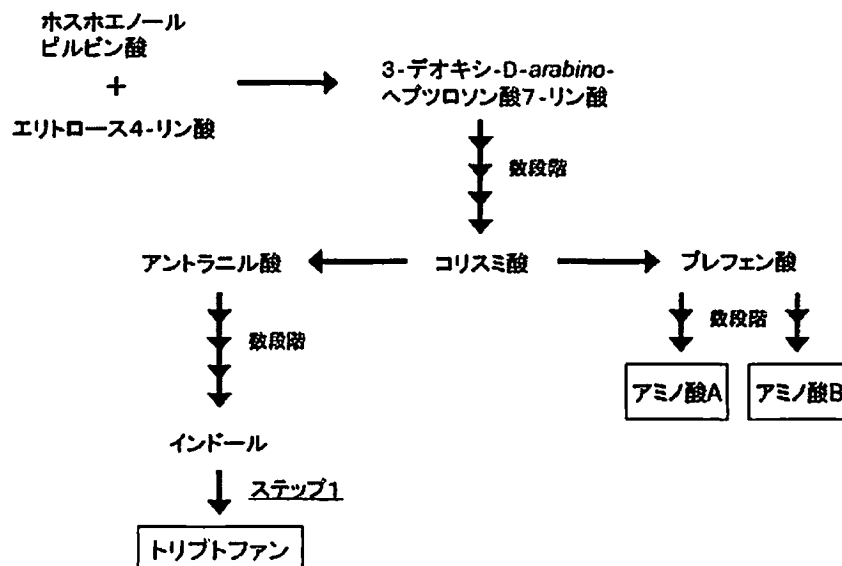
### 問題1. (配点率 25/100)

トリプトファン<sup>1</sup>の生合成について、下記の文章を読み、設問に答えよ。

ホスホエノールピルビン酸とエリトロース4-リン酸が縮合して3-デオキシ-D-*arabino*-ヘプツロソ<sup>2</sup>ン酸7-リン酸が生じ、一連の反応によりコリスミ酸となる。コリスミ酸は、アントラニル酸を経てトリプトファンとなる経路と、プレフェン酸を経てアミノ酸Aとアミノ酸Bとなる経路がある。

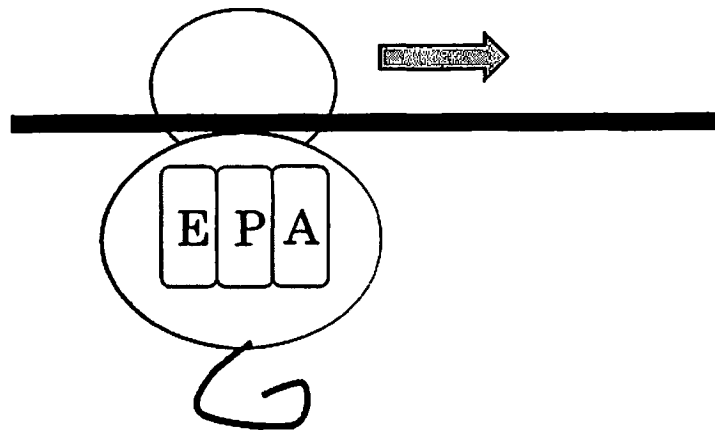
下記の図には、微生物での代謝経路の模式図を示す。

- (1) トリプトファンを英語で表記せよ。また、トリプトファンの構造を描け。
- (2) トリプトファンは、前駆体であるインドールから酵素により合成される。ステップ1において、インドール以外に、どのような物質が、酵素によるトリプトファンの合成に関与したと考えられるか。その物質の名前を英語で示せ。
- (3) 大腸菌におけるトリプトファンオペロンの発現調節様式について、ラクトースオペロンとの大きな違いは何か。その違いを40字以内で説明せよ。
- (4) アミノ酸Aとアミノ酸Bは、その化学式がそれぞれC<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とC<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>で表される。アミノ酸Aとアミノ酸Bはそれぞれ何か。名前を英語で示せ。
- (5) 哺乳類では、アミノ酸Aからアミノ酸Bが合成される。どのような酵素が関わるか。その酵素名を示せ。



問題2. (配点率 25/100)

図は原核生物のリボソームがmRNAに結合して翻訳を行っている様子を示した模式図である。矢印は翻訳の進行方向を示す。設問に答えよ。

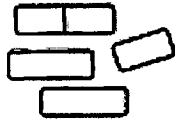


- (1) リボソームを構成する大サブユニットと小サブユニットのサイズをそれぞれ沈降係数の単位で答えよ。また、真核生物のリボソームの場合についても答えよ。
- (2) 大サブユニットと小サブユニットを構成している rRNA の分子種をそれぞれ沈降係数の単位で答えよ。
- (3) リボソームは mRNA 上を一方向に移動してタンパク質を合成する。その方向性を答えよ。
- (4) 翻訳開始時に mRNA の開始コドンの上流にある Shine-Dalgarno 配列と呼ばれる配列に結合するリボソームを構成する分子種を答えよ。
- (5) 翻訳の伸長反応プロセスを次の用語をすべて使用して簡潔に説明せよ。  
【用語】 翻訳伸長因子 EF-Tu、アミノアシル tRNA、トランスロケーション、GTP、A 部位、P 部位、E 部位、EF-G
- (6) 原核生物と真核生物の mRNA の末端構造の大きな違いを 2 つ答えよ。



問題3. (配点率 25/100)

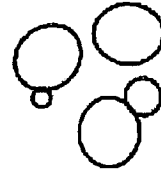
生酏づくりの日本酒醸造過程で重要な役割を果たしている3種類の微生物のスケッチ図を示した。設問に答えよ。



微生物A



微生物B



微生物C

- (1) 図はいずれも光学顕微鏡で観察したスケッチ図で、サイズスケールは統一されていない。予想されるサイズの小さい順に並べよ。
- (2) 微生物Aと微生物Cの増殖様式をそれぞれなんと呼ぶか答えよ。
- (3) 微生物Aはグラム染色陽性の性質を持つことがわかった。このことからこの微生物の細胞壁構造について考えられることを述べよ。
- (4) 下記にあげた属名の中から、それぞれの微生物についてもっとも可能性の高い属名を選び、選んだ理由も述べよ。  
*Saccharomyces, Lactobacillus, Aspergillus, Penicillium, Bacillus, Escherichia, Mucor, Pichia, Saccharomyces, Absidia, Lactococcus*
- (5) 微生物Bは分類学上どの「門」に属するか答えなさい。
- (6) 微生物Bが日本酒醸造の中で果たす重要な役割を簡潔に説明せよ。
- (7) 微生物Cの生活環について説明せよ。

問題4. (配点率 25/100)

バイオテクノロジーにおいて育種技術は重要な要素技術である。育種技術とは、言い換えれば有用微生物の創製を目指した遺伝情報の改変技術であるが、これには、i) 突然変異誘起処理によるもの、ii) 当該の生物自身が持っている性的なプロセスを利用するもの、iii) 細菌に感染するウイルスを利用するもの、iv) 人工的な方法で遺伝子を導入することにより行うものなど、色々な技術がある。これらについて以下の設問に答えよ。

- (1) i)の技術に関連して、代表的な突然変異源を1つあげ、その作用について答えよ。
- (2) ii) の技術に関連して、Hfr、F<sup>+</sup>、F-株とはどのような生物で用いられる用語か、学名で答えよ。
- (3) また、それらの違いについて、それぞれの株における F 因子の動態の違いがわかるように答えよ。
- (4) 接合において、*pro*<sup>+</sup> マーカーが最後に伝達されるように挙動する Hfr 株がある。この株と F- *pro* 株を接合させた時、*pro*<sup>+</sup> 組換え体が、接合の早い時期に出現した。この *pro*<sup>+</sup> 株と F- 株を接合させると、F- 株の大部分が *pro*<sup>+</sup> 表現型を示す F<sup>+</sup> 株になった。この現象ではどのようなことが起こっているか、その可能なメカニズムを説明せよ。
- (5) iii)の技術に関連して、なぜ、generalized transduction では、どのような遺伝子でも伝達することができて、specialized transduction は、少数の遺伝子に限られるのか、その理由を答えよ。
- (6) iv)の技術に関連して、大腸菌に遺伝子を導入する技術で用いられるベクターが備えるべき性質（特徴）について答えよ。

# 分子細胞生物学

## 問題 1. (配点率 35/100)

次の文章を読み、以下の問いに答えなさい。

- (1) 細胞は外部との物質のやり取りを膜を介して行っている。右図(a)～(d)は、膜を通過する溶質分子の基本的な4つの移動機構の概略図である。

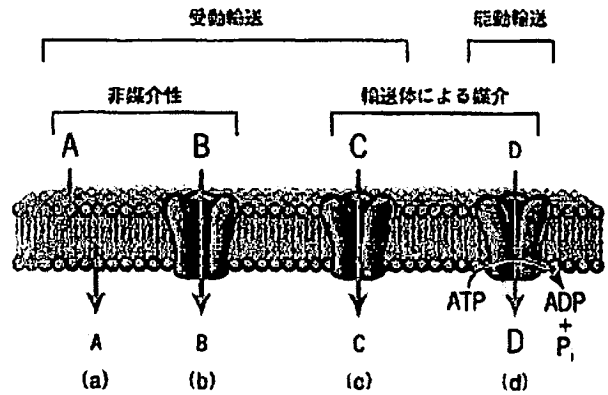


図:膜を横切る溶質分子の基本的な4つの移動機構。A、B、C、Dの文字の大きさは相対的な濃度を示す(カーブ分子細胞生物学(東京化学同人)より抜粋)

- (1-1) (a)は高濃度から低濃度の方向へ溶質が直接膜を通過する単純拡散である。単純拡散で、どのような分子も透過できるわけではない。どのような分子が透過しやすいと考えられるかを50字以内で論じなさい。
- (1-2) (a), (b), (c)の機構では溶質の濃度が高い方から低い方への移動を示しているが、(d)ではATPのエネルギーを利用することで濃度勾配とは逆らって物質を移動させることができる。溶質を濃度勾配に逆らって移動させるときATP以外のエネルギーの利用方法について50字以内で論じなさい。
- (2) タンパク質のような大きな分子を内包する輸送小胞は、細胞骨格の軌道上で働くモータータンパク質に引かれる形で細胞内を移動する。
- (2-1) 細胞骨格を構成する3つの異なるタイプの繊維状構造物の名称を答えなさい。
- (2-2) 主たる3つのモータータンパク質が同定され、研究されてきた。その名称を答えなさい。

問題2. (配点率 30/100)

次の文章を読み、以下の問いに答えなさい。

(1) 遺伝子の化学的本体に関する下記の文章を読んで、問いに答えなさい。

ハーシーと①は細菌に感染するウイルスである②を用いて実験した。彼らは、2組の②を用意した。一方の組は、③を放射能標識したDNAを持ち、もう一方は④を放射能標識したタンパク質を持っていた。それぞれを大腸菌に感染させた結果、放射能標識したDNAを持つ②を感染させた場合のみ、大部分の放射能が宿主細胞内に送られ、かつ、標識DNAの約30%が次世代の②に移っていることが判明した。これにより、DNAが遺伝物質の本体であることが証明された。この実験結果が公表された翌年、ワトソンとクリックにより「DNAの二重らせんモデル」が発表された。

(1-1) ①～④にあてはまる最も適切な用語を答えなさい。なお、③と④は元素記号で答えなさい。

(1-2) DNAの二重らせん構造の解明に貢献した「シャルガフ (Chargaff) の発見」の内容を100字以内で説明しなさい。

(2) 真核生物の遺伝子の多くはイントロンを有している。イントロンに関する以下の問いに答えなさい。

(2-1) イントロンの存在がもたらす、遺伝子の機能発現上の利点を100字以内で説明しなさい。

(2-2) イントロンの存在がもたらす、遺伝子の進化上の利点を100字以内で説明しなさい。

(3) RNA干渉および低分子量非翻訳RNAに関する以下の問いに答えなさい。

(3-1) RNA干渉を英語で記しなさい (なお、RNA以外の略語を用いてはいけません)。

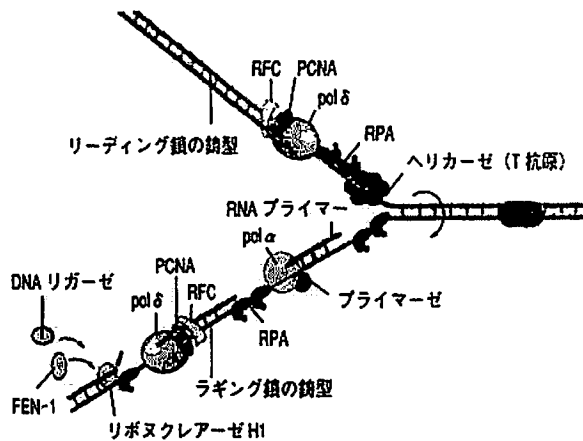
(3-2) この現象が最初に明らかにされた生物は何か答えなさい。

(3-3) 低分子干渉RNAとマイクロRNAの由来、構造的特徴、遺伝子の発現を抑制する上での作用機構について比較し250字以内で説明しなさい。

問題 3. (配点率 35/100)

DNAの複製および細胞周期に関する以下の問いに答えなさい。

- (1) 真核生物の複製フォークの主要成分の模式図を参考に、例示したDNAポリメラーゼと同様にウイルス、原核生物、真核生物に関わらずDNA複製系の全てで必要とされる重要なタンパク質を下図の中から4つ選びなさい。



図：真核生物の複製フォークの主要成分の模式図。  
RFC:複製因子 C, PCNA:増殖細胞核抗原, RPA: 1本鎖DNA結合タンパク質, FEN-1:エンドヌクレアーゼ, pol  $\alpha$ ,  $\delta$ :DNAポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\delta$ 。(カーブ分子細胞生物学(東京化学同人)より抜粋)

解答例： DNAポリメラーゼ (pol  $\alpha$ 、pol  $\delta$ )

- (2) 次の文章は真核細胞のDNAの複製について述べたものである。①～④に当てはまるもっとも適切な用語を入れなさい。
- (2-1) DNAの複製はラギング鎖とリーディング鎖に分けて行われるが、ラギング鎖で複製されるDNAは、まず(①)とよばれる小さな断片として作られる。
- (2-2) ラギング鎖とリーディング鎖上のDNAポリメラーゼ (pol  $\delta$ ) は実際には(②)とよばれる複合体を形成して機能している。
- (2-3) 真核細胞のゲノムは(③)とよばれる小さな領域に分けて複製される。各(③)にはそれぞれ一つの(④)があり、そこから複製フォークが両方向に進んでいく。
- (3) 真核生物の細胞周期の過程について、各段階を明らかにした模式図を用いて150字以内で記述しなさい。

次ページへつづく

(4) がん細胞は増殖に制御がかからなくなった細胞である。このがん細胞の増殖能は正常細胞には存在しないテロメラーゼによると見られている。また細胞のがん化を受けて核でおこる最も激しい変化は染色体に見られる。

(4-1) テロメラーゼの働きについて100字以内で述べなさい。

(4-2) 最も激しい染色体の変化とはどのようなものか100字以内で述べなさい。