

東京女子医大 生物

I 転写を調節するタンパク質に関する次の文章を読み問(e)~(h)に答えよ。

マウス由来のタンパク質 A は、そのアミノ酸配列から、DNA に結合し、標的遺伝子の転写を制御する調節タンパク質である可能性が考えられた。そこで、タンパク質 A が、どのような塩基配列の DNA と結合するかを調べるために、以下の〔実験 1〕を行った。

〔実験 1〕

手順 1

図 5 のように、太字で示す特定の配列(アダプター配列)の間に、13 塩基対の全ての組み合わせ(4^{13} 通り)の塩基配列を含むように混和した 2 本鎖 DNA 溶液を用意した。その DNA 溶液を大腸菌で合成したタンパク質 A と混和し、(1)任意の 13 塩基対の配列を含む DNA 分子の中から、タンパク質 A に結合する DNA だけを回収した。

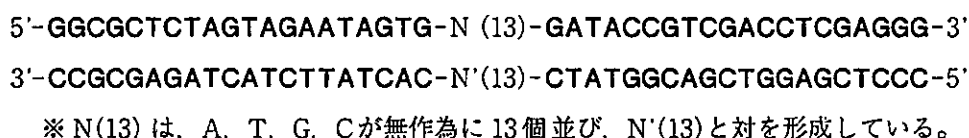


図 5 結合実験に用いた DNA の塩基配列

手順 2

アダプター配列に対するプライマーを用いて、(2)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により、回収した DNA を増幅した。

手順 3

手順 1 と 2 を数回繰り返して、タンパク質 A に特異的に結合する DNA 断片 R だけを濃縮した。

手順 4

手順 3 で得られた DNA 断片 R をプラスミド DNA に組み込んで、大腸菌に導入し形質転換を行い、コロニーという小さな円形状の塊を形成させた。

手順 5

得られた複数のコロニーからプラスミド DNA の塩基配列を決定した。

〔結果 1〕

アダプター配列に挟まれた領域に、5'-GAANNTTCNNGAA-3'(Nは、A、T、G、C 任意の配列を示す)を含む配列が多数見つかった。

問 1 〔実験 1〕について説明した次の文章の(ア)~(ウ)に当てはまるものを、それぞれの選択肢から 1 つずつ合計 3 つ選び、13の対応する番号をマークせよ。13

手順 1 の下線(1)で示す DNA 分子において、どの塩基配列の DNA 分子も均等に存在する場合、〔結果 1〕で多くみられた配列(5'-GAANNTTCNNGAA-3')を含む分子は、(ア)種類の塩基配列が存在することが考えられる。

手順 2 の下線(2)で使用した PCR 法では、鋳型となる DNA、1 セットのプライマー、耐熱性 DNA ポリメラーゼ、そして 4 種類のヌクレオチドを用いて、(イ)の順番に 3 つのステップを繰り返すことで、鋳型 DNA を指数関数的に増幅することができる。また、図 5 に示す DNA を PCR 法で増幅するためには、プライマー配列(ウ)を用いることで、53 塩基対の 2 本鎖 DNA が得られる。

(ア) ① 256 ② 512 ③ 1,024

(イ) ④ 2 本鎖 DNA の解離 → プライマーの結合 → DNA の伸長
⑤ プライマーの結合 → 2 本鎖 DNA の解離 → DNA の伸長
⑥ 2 本鎖 DNA の切断 → プライマーの結合 → DNA の伸長

(ウ) ⑦ 5'-GGCGCTCTAGTAGAATAGTG-3'、および
5'-GATACCGTCGACCTCGAGGG-3'

⑧ 5'-GGCGCTCTAGTAGAATAGTG-3'、および
5'-CCCTCGAGGTTCGACGGTATC-3'

⑨ 5'-CCGCGAGATCATCTTATCAC-3'、および
5'-GATACCGTCGACCTCGAGGG-3'

⑩ 5'-CACTATTCTACTACAGCGCC-3'、および
5'-CCCTCGAGGTTCGACGGTATC-3'

問2 〔実験1〕手順4に関する〔説明文〕を読み、適切な記述を次の①～⑧から3つ選び、**14**の対応する番号をマークせよ。**14**

〔説明文〕 DNA断片Rを挿入するプラスミドDNAとして、ラクトースオペロンの一部と薬剤(アンピシリン)耐性遺伝子を含むベクターBを使用した(図6)。通常の大腸菌は、抗生物質のアンピシリン存在下では増殖できない。しかし、大腸菌がベクターBを取り込むと、アンピシリンを含む寒天培地上でも増殖することができる。また、ベクターBのLacZ遺伝子は、 β -ガラクトシダーゼをコードしている。その β -ガラクトシダーゼの基質となるX-gal、およびラクトース代謝産物に類似した物質であるIPTGを培地に添加すると、ベクターBを取り込んだ大腸菌から、青いコロニーが生じる。制限酵素Xが認識する塩基配列は、ベクターB内ではLacZ遺伝子のタンパク質をコードする領域内の一ヶ所のみ存在する。そこで、ベクターBを制限酵素Xで切断後、DNAリガーゼを用いてDNA断片R(53塩基対)と切断したベクターBとの連結反応を行った。その反応産物を大腸菌に導入し、アンピシリン、X-gal、IPTGを含む寒天培地で培養したところ、青と白のコロニーが生じた。この白いコロニーに含まれるプラスミドDNAを調べたところ、全てのコロニーにおいて、DNA断片R由来の53塩基対の配列を含んでいることがわかった。ただし、今回用いた大腸菌では、ラクトースオペロンの調節タンパク質(リプレッサー)が発現している。また、1つのコロニーを形成する大腸菌には、1種類のプラスミドDNAのみ導入される。

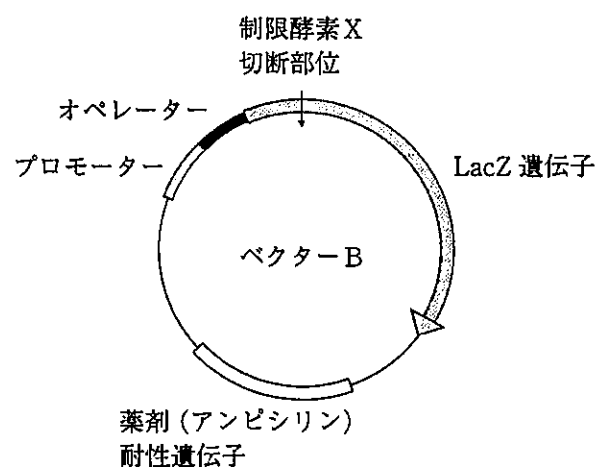


図6 ベクターBについて

- ① 大腸菌に導入したベクターBは、大腸菌の染色体に組み込まれることで、LacZ遺伝子が発現できるようになる。
- ② DNA断片RがLacZ遺伝子内に挿入されたことにより、DNA断片Rを含むLacZ遺伝子の転写が起これず、白いコロニーになった。

- ③ DNA 断片 R が LacZ 遺伝子内に挿入されたことにより、DNA 断片 R を含む LacZ 遺伝子の転写は起こるが、活性のある β -ガラクトシダーゼのタンパク質が合成されずに、白いコロニーになった。
- ④ 青いコロニーには全て、DNA 断片 R を含むプラスミド DNA が、含まれている。
- ⑤ 制限酵素 X で切断したベクター B の末端が、DNA リガーゼによって再結合したことにより、青いコロニーとなった。
- ⑥ 白いコロニーを形成する大腸菌内では、調節タンパク質(リプレッサー)がオペレーターに結合している。
- ⑦ 青と白のどちらのコロニーを形成する大腸菌内でも、IPTG と調節タンパク質(リプレッサー)は結合できる。
- ⑧ DNA 断片 R が挿入された LacZ 遺伝子から転写される産物が、選択的スプレイングを受けることによって、青と白のコロニーが生じている。

問 3 [実験 1] 手順 4 において大腸菌の形質転換を行う際、表 3 のように DNA リガーゼでベクター B と DNA 断片 R とを反応させた溶液(DNA 反応液)の有無、あるいは、培地におけるアンピシリンおよび IPTG の有無によるコロニーの色および数への影響を調べた。その結果、組み合わせ A では、10 個の青いコロニーと 100 個の白いコロニーがみられた。また、組み合わせ H では、 1×10^6 個の白いコロニーだけが観察された。ただし、IPTG は形質転換の効率や大腸菌の増殖に影響を与えることはないものとする。A~H までの組み合わせの結果として、適切な記述を次の①~⑧から 4 つ選び、15の対応する番号をマークせよ。15

表 3

組み合わせ	DNA 反応液	アンピシリン	IPTG	コロニー数	
				青	白
A	添加	添加	添加	10	100
B	添加	添加	未添加	/	/
C	添加	未添加	添加		
D	添加	未添加	未添加		
E	未添加	添加	添加		
F	未添加	添加	未添加		
G	未添加	未添加	添加		
H	未添加	未添加	未添加		

- ① 組み合わせ B では、コロニーが全て白く、コロニーの総数は、組み合わせ A と同程度だった。
- ② 組み合わせ C では、青と白のコロニーがみられたが、青いコロニーが大半を占めた。
- ③ 組み合わせ D では、組み合わせ H と同程度の白いコロニーが観察された。
- ④ 組み合わせ B, C, D では、いずれも青いコロニーが少なくとも 1 つは観察された。
- ⑤ 組み合わせ E, F, G では、いずれもコロニーは全く観察されなかった。
- ⑥ 組み合わせ D で得られたコロニーを単離して、アンピシリンを含む培地で培養すると、大腸菌の増殖がみられない場合がある。
- ⑦ 組み合わせ B では、いずれの白いコロニーからでもプラスミド DNA を抽出すると断片 R を含んでいる DNA が単離される。
- ⑧ いずれかの組み合わせで、青いコロニーが出現した場合は、そのコロニーを形成した大腸菌には、断片 R が挿入されていないベクター B が必ず含まれている。

II

問 1 分子進化に関する問(a), (b)に答えよ。

(a) 分子進化に関する記述として適切なものを、次の①～⑧から 4 つ選び、**1**の対応する番号をマークせよ。**1**

- ① アミノ酸を指定する mRNA のコドンにおいて、1 番目と 2 番目の塩基に比べ、3 番目の塩基が変化する速度は大きい場合が多い。
- ② エキソンに比べて、イントロンの塩基配列が変化する速度は小さい場合が多い。
- ③ 脊椎動物において、フィブリン遺伝子とヒストン遺伝子の分子進化速度は同一になる。
- ④ タンパク質のアミノ酸配列において分子時計が成立する場合、分岐年代が古いほど、アミノ酸置換数が多くなる傾向がある。
- ⑤ 遺伝子の塩基配列から推定した系統樹は、化石から推定された系統樹と必ず一致する。
- ⑥ 遺伝子重複によって新たに生じた遺伝子が、変異などによって、もとの遺伝子と異なる機能を獲得する場合がある。
- ⑦ 生物の集団において蓄積されている DNA の塩基配列の突然変異は、生存に有利でも不利でもない中立か、中立に近いものが大半を占める。
- ⑧ 遺伝的浮動によって集団に広まった突然変異は、生存に有利な場合が多い。

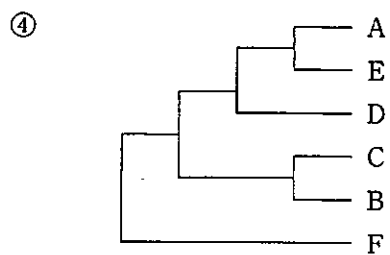
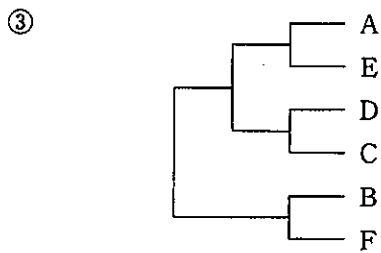
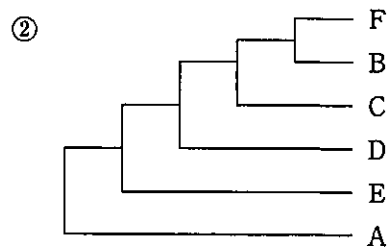
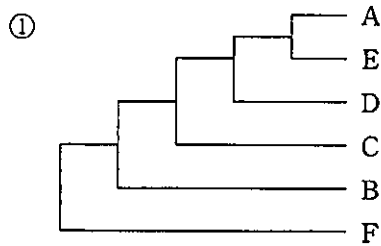
(b) 次の文章の(ア)～(ウ)に当てはまるものを、それぞれの選択肢から 1 つずつ合計 3 つ選び、**2**の対応する番号をマークせよ。**2**

現存する脊椎動物種 A～F において、300 個のアミノ酸からなるタンパク質 Z のアミノ酸配列について調べたところ、アミノ酸置換数が表 1 のようになった。また、このアミノ酸配列をもとにして、分子系統樹を作成したところ、(ア)のようになった。この分子系統樹の右端を現在とすると、動物種 A と最も近縁種との分岐年代は 1000 万年前であることがわかっている。このことから、このタンパク質のアミノ酸が 1 個置換するのに要した時間は、平均すると(イ)になる。また、動物種 A とその最も遠縁な動物種の共通祖先は、(ウ)に分岐したことが推定できる。なお、アミノ酸の置換速度は、どの種においても一定であり、同じ箇所ではアミノ酸の置換は 2 度起こらなかったものとする。

表1 タンパク質Zのアミノ酸置換数

	A	B	C	D	E	F
A	—	20	16	8	4	24
B	—	—	20	20	20	24
C	—	—	—	16	16	24
D	—	—	—	—	8	24
E	—	—	—	—	—	24
F	—	—	—	—	—	—

(ア)



(イ) ⑤ 250 万年 ⑥ 500 万年 ⑦ 1000 万年

(ウ) ⑧ 1500 万年前 ⑨ 3000 万年前 ⑩ 6000 万年前

問 2 免疫に関する問(c), (d)に答えよ。

(c) 次の記述のうち**誤ったもの**を, 次の①~⑧から 3 つ選び, **3**の対応する番号をマークせよ。 **3**

- ① 自然免疫では, マクロファージはToll様受容体などで異物を認識する。
- ② 自然免疫における生体防御のしくみはおもに食細胞による異物の分解である。
- ③ 自然免疫では, 抗原情報が記憶される。
- ④ 自然免疫では, 抗原情報が記憶されない。
- ⑤ 抗原は抗体が結合すると, マクロファージの食作用を受けやすくなる。
- ⑥ 抗原への抗体の結合は, マクロファージの食作用に影響を与えない。
- ⑦ 適応免疫(獲得免疫)が誘導されるのに時間がかかるのは, 抗原受容体の遺伝子再編成に時間がかかるためである。
- ⑧ 適応免疫(獲得免疫)が誘導されるのに時間がかかるのは, リンパ球の増殖に時間がかかるためである。

(d) 免疫系は, 侵入する異物を効率よく排除する仕組みである。病原性の弱い細菌は自然免疫により排除され, 病原性の強い細菌は適応免疫(獲得免疫)が誘導されないと効率よく排除されない。適応免疫(獲得免疫)の中でも, 体液性免疫により効率よく排除される細菌や, 細胞性免疫により効率よく排除される細菌など様々な細菌が存在する。細菌 A, 細菌 B および細菌 C を用いて以下の実験を行った。

[実験 1] 正常なマウスに, 細菌 A, 細菌 B および細菌 C をそれぞれ個別に感染させた。細菌 A, 細菌 B および細菌 C が感染したマウスの体内からは, 細菌が排除され, マウスは生存した。

[実験 2] 放射線照射することで, 全身の白血球を除いたマウスに, 放射線照射直後に細菌 A, 細菌 B および細菌 C をそれぞれ個別に感染させた。細菌 A, 細菌 B および細菌 C が感染したマウスは死亡した。

[実験 3] 先天的に胸腺がないヌードマウスに, 細菌 A, 細菌 B および細菌 C をそれぞれ個別に感染させた。細菌 A が感染したマウスは生存したが, 細菌 B および細菌 C が感染したマウスは死亡した。

[実験 4] 胸腺を摘出したマウスに放射線照射した後, 正常マウスの骨髄細胞を移植して 1 ヶ月後に細菌 A, 細菌 B および細菌 C をそれぞれ個別に感染させた。細菌 A が感染したマウスは生存したが, 細菌 B および細菌 C が感染したマウスは死亡した。

〔実験5〕 先天的にB細胞を欠損したマウスに、細菌A、細菌Bおよび細菌Cをそれぞれ個別に感染させた。細菌Aおよび細菌Bが感染したマウスは生存したが、細菌Cが感染したマウスは死亡した。

次の記述の3つの()から適切なものを、次の①～⑨から1つずつ合計3つ選び、4の対応する番号をマークせよ。4

細菌Aは主に(①自然免疫 ②体液性免疫 ③細胞性免疫)により排除される。

細菌Bは主に(④自然免疫 ⑤体液性免疫 ⑥細胞性免疫)により排除される。

細菌Cは主に(⑦自然免疫 ⑧体液性免疫 ⑨細胞性免疫)により排除される。

問3 細胞に関する問(e)~(h)に答えよ。

(e) 「細胞接着」と「細胞骨格」に関する次の文章の3つの()から適切な語句を1つずつ合計3つ選び $\boxed{5}$ の対応する番号をマークせよ。 $\boxed{5}$

多細胞動物の多くの細胞は、細胞どうしやコラーゲンなどを主成分とする細胞外物質と結合しており、これを「細胞接着」という。隣どうしの細胞が膜タンパク質を介して結合することは、多細胞動物にとって非常に重要である。例えば、動物の消化管では、消化管の内腔とからだの内部は、1層の細胞からできている上皮組織によって隔てられている。上皮組織の細胞どうしは、膜を貫通しているタンパク質によって小さな分子も通れないほどぴったり結合している。このような結合を(①密着結合 ②デスモソーム ③ギャップ結合)という。また、上皮組織では、隣どうしの細胞が膜タンパク質によって結合するだけでなく、膜タンパク質と細胞内にある「細胞骨格」が結合して上皮細胞に強度を与えている。このような構造を(④密着結合 ⑤デスモソーム ⑥ギャップ結合)という。「細胞骨格」は、タンパク質からできた繊維構造であり、微小管、中間径フィラメント、アクチンフィラメントの3つに分けられる。この内、細胞膜や核膜の内側に位置し、繊維状のタンパク質を束ねた構造をもち非常に強度のある細胞骨格は(⑦微小管 ⑧中間径フィラメント ⑨アクチンフィラメント)である。

動物細胞の細胞接着のしくみについて調べるために以下の実験を行った。ペトリ皿の中に培養液を入れて、ヒト由来の培養細胞 H を加えて数日間培養した。細胞は分裂を繰り返して増えながら、細胞どうしが接着し合ってペトリ皿の底に一面に広がった。なお、実験で用いるトリプシンとはタンパク質を分解する酵素であり、EDTA は Ca^{2+} を捕獲できる分子である。〔実験1〕と〔実験2〕は細胞を処理した後、時間をおかないで観察した結果である。

〔実験1〕 細胞が一面に広がったペトリ皿から培養液を取り除き、 Ca^{2+} を含む緩衝液を加えた。さらにトリプシンと EDTA を同時に加えたところ、細胞は個々の細胞にばらばらに分離した。ここに EDTA が捕獲できる以上に Ca^{2+} を過剰に加えたところ細胞は、ばらばらになったままであった(図1)。

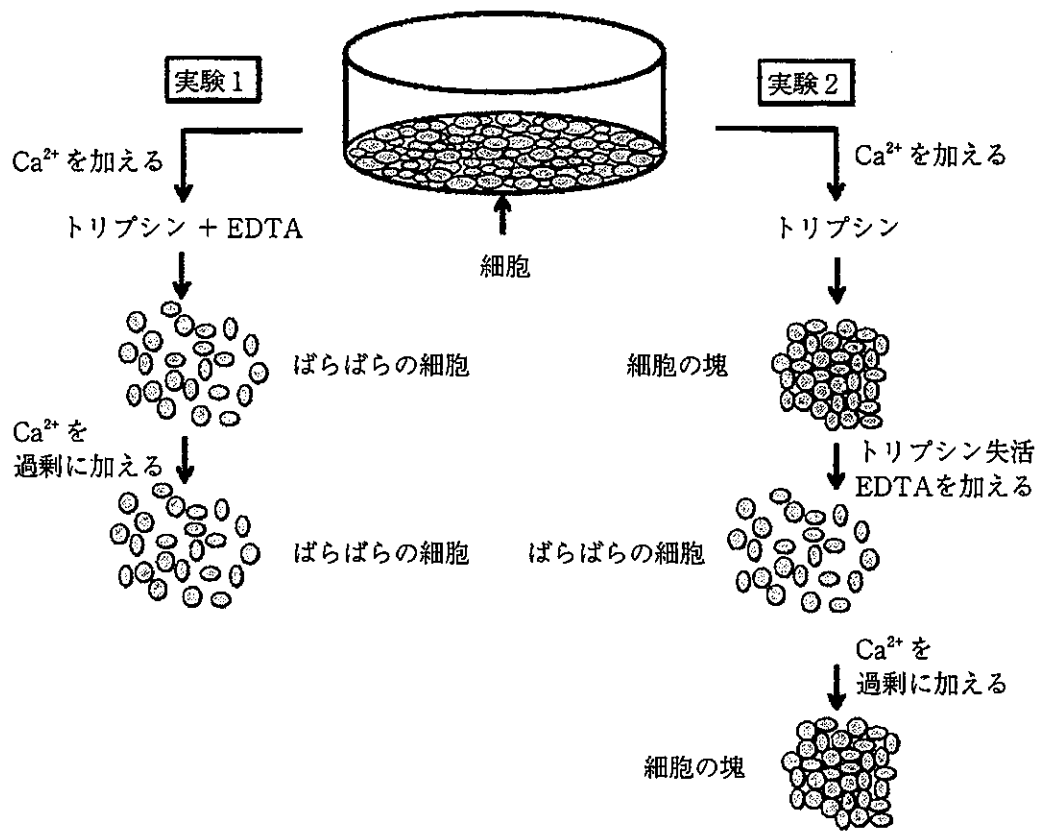


図 1 実験 1 と実験 2 の模式図

[実験 2] 細胞が一面に広がったペトリ皿から培養液を取り除き、Ca²⁺を含む緩衝液を加えた。まず、トリプシンのみを加えると細胞は互いに接着し合った塊の状態のままだった。続いてトリプシンの働きを失活させてから EDTA を加えたところ細胞は、ばらばらになった。さらに EDTA が捕獲できる以上に Ca²⁺を加えたところ、細胞は塊になった(図 1)。

(f) [実験 1] および [実験 2] の結果についての記述と考察で適切なものを、次の①～⑧から 4 つ選び、**6**の対応する番号をマークせよ。**6**

- ① 培養細胞 H の細胞どうしの接着には、 Ca^{2+} が必要である。
- ② 培養細胞 H の細胞どうしの接着には、 Ca^{2+} は必要でない。
- ③ 培養細胞 H の細胞どうしの接着には、タンパク質が関わっている。
- ④ 培養細胞 H の細胞どうしの接着には、タンパク質は関わっていない。
- ⑤ 接着に関わる分子のトリプシンによる分解は、 Ca^{2+} があると起こりにくい。
- ⑥ 接着に関わる分子のトリプシンによる分解は、 Ca^{2+} があると促進される。
- ⑦ Ca^{2+} に対する細胞接着の反応性は、培養細胞 H に特有の現象であると考えられる。
- ⑧ Ca^{2+} に対する細胞接着の反応性は、培養細胞 H 以外の細胞でも起こると考えられる。

解答例

I

問1 (ア) ② (イ) ④ (ウ) ⑧

問2 ③, ⑤, ⑦

問3 ①, ③, ⑥, ⑧

II

問1

(a) ①, ④, ⑥, ⑦

(b) (ア) ① (イ) ⑥ (ウ) ⑩

問2 (c) ③, ⑥, ⑦ (d) ①, ⑥, ⑧

(e) ①, ⑤, ⑧ (f) ①, ③, ⑤, ⑧