

## 生 物

1 次の文章を読み、問に答えよ。

細菌類や菌類などの微生物は様々な物質を利用して増殖する能力を持っており、特殊な化合物を代謝できる微生物も多い。このため微生物は様々な酵素を生産しており、それらは環境浄化や病気の診断などに利用されている。

ある病気にかかった人では血液中に特殊なアミノ酸 X が増加する。X はそのままでは検出しにくいアミノ酸であるが、ある種の酵素は、X を検出・定量が容易な化合物 Y に変換するため、この病気の診断薬として利用できる。そこで、土壌の微生物を探索したところ、X を Y に変換する酵素(X 変換酵素)を生産する細菌 A と糸状菌(カビ)B を単離することができた。細菌 A が生産する X 変換酵素を酵素 C、カビ B が生産する X 変換酵素を酵素 D とする。

細菌 A、カビ B の菌体を破碎して、酵素を抽出した。その後、X 変換活性を指標に酵素 C、酵素 D を精製してその性質を調べた。酵素 C、酵素 D とも四次構造は取っておらず、1本のポリペプチド鎖で構成されていた。酵素 C、酵素 D について、X の濃度を変化させて X 変換の反応速度を調べたところ、図 1 に示す関係が得られた。また、酵素 D においては、ある濃度のアミノ酸 Z を反応液に添加すると、X の濃度と反応速度の関係は S 字型の曲線となった(図 1)。

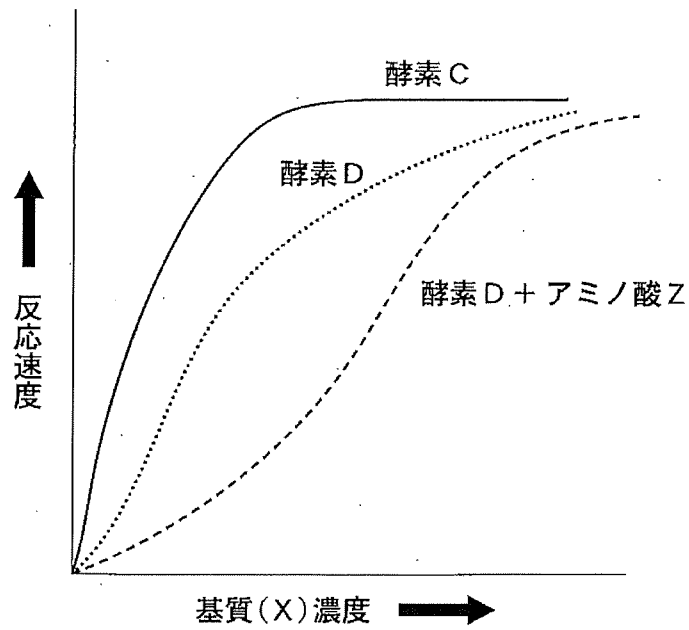


図1 基質濃度と反応速度の関係

酵素Cの溶液を半透性のセロハン膜でできたチューブに入れ、適当な緩衝液中で十分な時間を置くと酵素Cの活性は消失した。この活性を失った酵素Cの溶液に、セロハンチューブの外側の緩衝液を濃縮して添加すると再び活性が検出された。この一連の操作の概要を図2に示す。

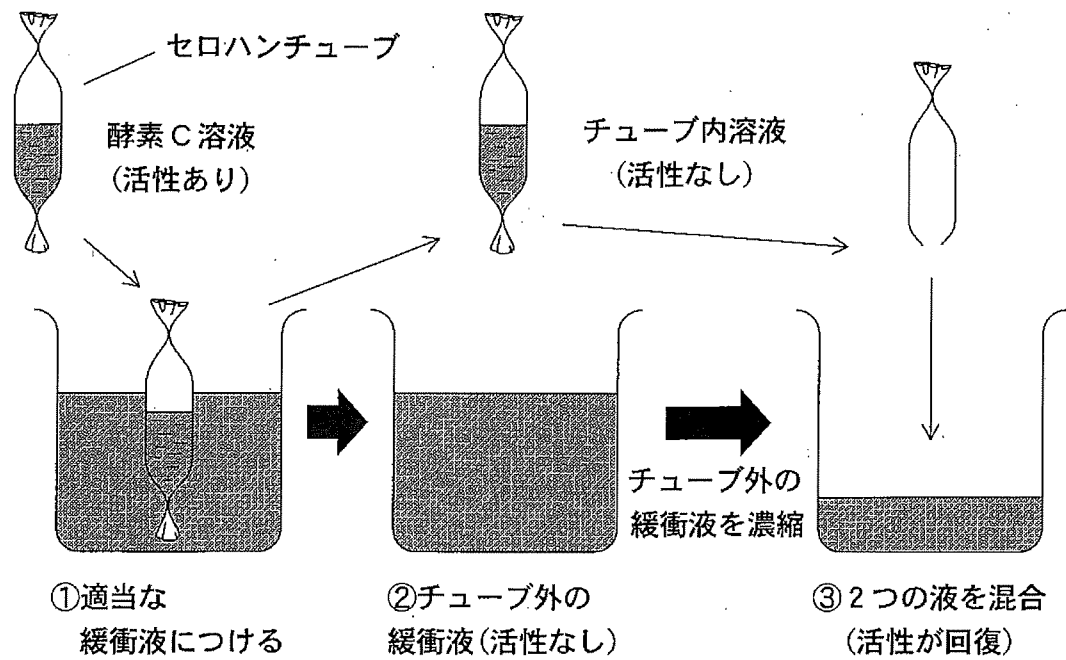


図2 操作の概要

酵素Cのアミノ酸配列に変換されるDNA領域のうち、開始コドンから終止コドン<sup>C</sup>までを含む部分を遺伝子Eとする。この遺伝子Eを単離して、遺伝子組換え技術を利用して大腸菌で酵素Cの生産を試みた。遺伝子Eを含むプラスミドを以下の手順で構築した。なお、今回の実験で使用した3つの制限酵素 *EcoRI*、*MfeI*、*HindIII* の認識配列および切断様式は図3のとおりである。

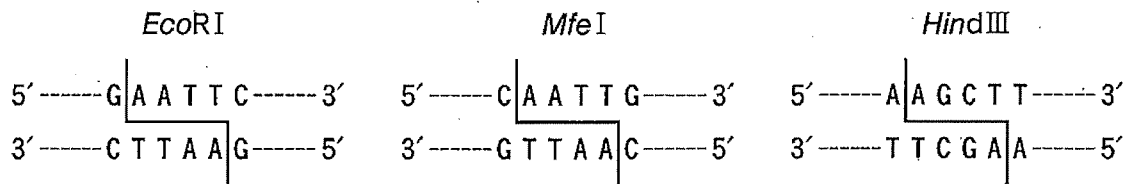


図3 各制限酵素の認識配列と切断様式

【手順1】 遺伝子 E の 5' 末端側に *EcoRI*, 3' 末端側に *HindIII* の認識配列を付加した DNA 断片を合成した(図4)。

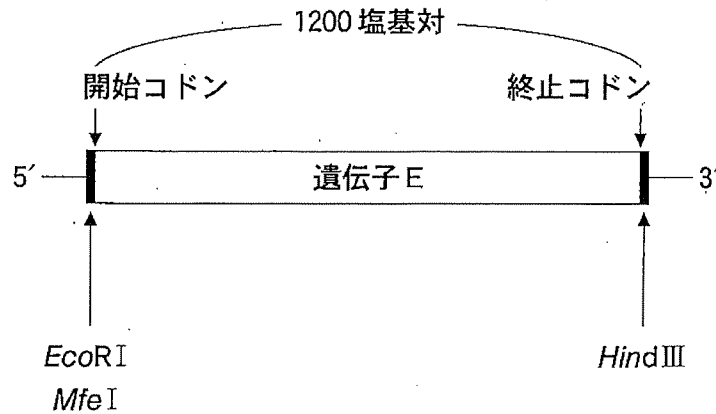


図4 遺伝子 E の構造と人為的に付加された制限酵素の認識配列の位置

【手順2】 大腸菌で機能することが知られているプロモーターと、その下流に *EcoRI* および *HindIII* 切断サイトを持つプラスミド F を用意した。このプラスミドは 3000 塩基対であり, *EcoRI*, *MfeI* および *HindIII* で 1箇所ずつ切断される(図5)。

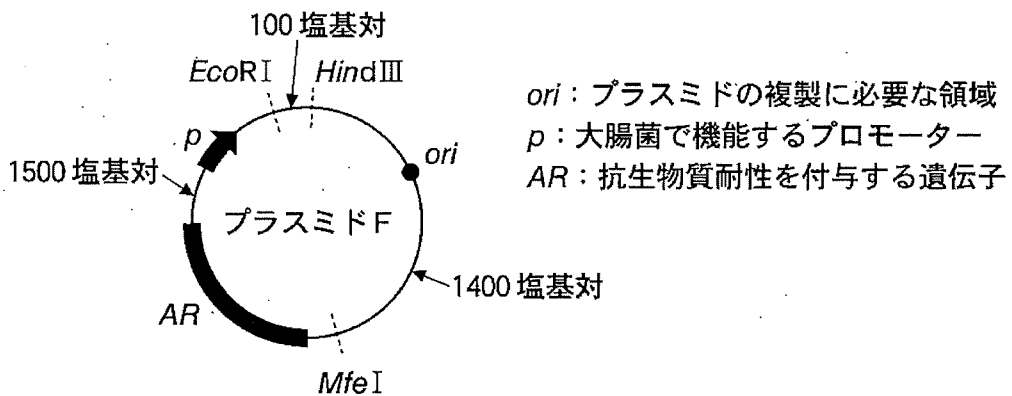


図5 プラスミド F の構造(3つの制限酵素認識配列の位置と切断される3つの断片の長さ)

- 【手順3】 遺伝子 E、プラスミド F をそれぞれ *EcoRI* と *HindIII* の両者で処理し、処理後の DNA 断片の長さを確認したところ、遺伝子 E からは 500 塩基対と 700 塩基対の 2 つの DNA 断片、プラスミド F からは 100 塩基対と 2900 塩基対の 2 つの DNA 断片が検出された。このことから、*EcoRI* と *HindIII* を用いる方法では適切なプラスミドを構築できないことがわかった。<sup>d</sup>
- 【手順4】 遺伝子 E の 5' 末端側に付加する配列を別の制限酵素 *MfeI* に変更した。この DNA 断片を *MfeI* と *HindIII* で処理したところ、1200 塩基対の DNA 断片 1 つだけが確認された。
- 【手順5】 遺伝子 E を *MfeI* と *HindIII* で処理した DNA 断片とプラスミド F を *EcoRI* と *HindIII* で処理した DNA 断片を混合し、DNA 断片同士を結合する働きのある酵素で 2 つの DNA 断片を連結した。
- 【手順6】 上記の操作で作製した プラスミドを大腸菌に導入し、適切な抗生物質を含む寒天培地で一晚培養した。<sup>e</sup><sup>f</sup>
- 【手順7】 得られた大腸菌を培養し、そこに含まれているプラスミドを解析し、遺伝子 E が 1 つ挿入されたプラスミドを持つ大腸菌を選抜した。<sup>g</sup>
- 【手順8】 手順 7 で得られた大腸菌を培養し、生産された酵素 C について、その性質を調べた。
- 【手順9】 酵素 C の性質を改良する目的でプラスミド上の遺伝子 E の塩基配列を変化させ、変異型酵素 C の生産を試みた。<sup>h</sup>

問 1 下線部 a について、

- (1) 酵素 C と酵素 D ではどちらが X と結合しやすいといえるか、答えよ。
- (2) アミノ酸 Z は酵素 D の活性部位と異なる場所に結合すると考えられる。このような性質の酵素を何と呼ぶか、答えよ。

問 2 下線部 b について,

- (1) 図 2 の①に示した操作の名称を漢字で答えよ。
- (2) 一連の操作から酵素 C の性質として分かることについて, (A)~(D)から適切なものを 1 つ選び, 記号で答えよ。
  - (A) 酵素 C はタンパク質と分子量の小さい物質から構成されている。
  - (B) 酵素 C は 2 種類のタンパク質から構成されている。
  - (C) 酵素 C は熱に対して安定である。
  - (D) 酵素 C を構成するタンパク質はセロハン膜を通過できる。

問 3 血液中の X を検出するための酵素にはどのような性質が求められるか。

正しいと考えられるものを(A)~(F)からすべて選び, 記号で答えよ。

- (A) 検出のための反応が終了した後は, 酵素がすみやかに失活するほうが良い。
- (B) 微量の X でも検出できるよう, X の濃度が低くても高い反応速度を示す性質が必要である。
- (C) X 以外のアミノ酸も検出できるよう, さまざまなアミノ酸に反応する広い基質特異性をもつことが必要である。
- (D) 検出のための反応を高温で行えるよう, 最適温度は高い方が良い。
- (E) 血液中には X 以外にも多様な物質が存在しているので, X 以外の物質に反応が影響されない性質が必要である。
- (F) 病院の検査室などで保管されるため, 長期の保存に耐える高い安定性が求められる。

問 4 下線部 c について、酵素 C のアミノ酸配列を指定する遺伝子 E の長さは 1200 塩基対である。では、カビ B のゲノム上に存在する酵素 D の遺伝子において、開始コドンから終止コドンまでを含む DNA 領域の長さを推察した場合、(A)~(D)のうちのどれがもっとも適切と考えられるか、1 つ選び記号で答えよ。ただし、酵素 C と酵素 D を構成するアミノ酸配列は同じとする。

- (A) 1200 塩基対である。
- (B) 1200 塩基対、またはそれよりも長い。
- (C) 1200 塩基対、またはそれよりも短い。
- (D) 一概に言えない。

問 5 下線部 d について、なぜ *EcoRI* と *HindIII* の組み合わせでは適切なプラスミドを構築できないのか、30 字以内(句読点を含む)で理由を述べよ。

問 6 下線部 e について、遺伝子 E が挿入されたプラスミドが大腸菌に導入される確率(形質転換効率)を 0.025 とする。 $10^6$  個の大腸菌をこのプラスミドを用いて形質転換し、その溶液の 1% を採取し、抗生物質を含む寒天培地に塗布して培養すると、何個のコロニーが出現すると期待できるか。

問 7 下線部 f について、なぜ抗生物質を添加する必要があるのか、30 字以内(句読点を含む)で答えよ。

問 8 下線部 g について,

- (1) この遺伝子 E が挿入されたプラスミドを *EcoRI* と *HindIII* の両者で処理すると, どのような DNA 断片が得られるか。想定可能なものを(A)~(E)からすべて選び, 記号で答えよ。
- (A) 500 塩基対, 3600 塩基対
  - (B) 500 塩基対, 700 塩基対, 2900 塩基対
  - (C) 4100 塩基対
  - (D) 700 塩基対, 3400 塩基対
  - (E) 700 塩基対, 1400 塩基対, 2000 塩基対
- (2) 同様に遺伝子 E が挿入されたプラスミドを *MfeI* と *HindIII* の両者で処理すると, どのような長さの DNA 断片が得られるか。得られるすべての DNA 断片の長さを答えよ。

問 9 下線部 h について, 酵素 C の活性を向上させる目的で, 酵素 C のアミノ酸配列に変異を導入したい。その説明として適切なものを(A)~(E)からすべて選び, 記号で答えよ。

- (A) プラスミド上の遺伝子 E の塩基配列を適切に変化させれば, 大腸菌で生産される酵素 C のアミノ酸配列を変化させることができる。
- (B) 細菌 A と大腸菌では使用されるコドンが違うので, 人為的に酵素 C のアミノ酸配列を変化させることはできない。
- (C) 酵素 C のアミノ酸配列を変化させても, 基質特異性が変化することはない。
- (D) 酵素 C のアミノ酸配列を変化させることで, 酵素の活性や安定性を変化させることができる場合がある。
- (E) 酵素は天然のものが最も活性が高く, 人為的にそれ以上の高い酵素活性を持つものを作り出すことはできない。