

筆頭専門試験科目（午後）

30 大修

生命理工学系

時間 13:30 ~ 16:00

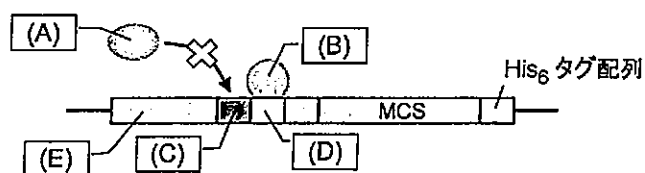
注 意 事 項

1. 次の 8 題から 4 題を選択して解答せよ。解答する問題は 4 題を超えてはならない（5 題以上解答した場合は採点しない）。
2. 解答は 1 題ごとに別々の解答用紙に記入せよ。
3. 各解答用紙には、1 枚ごとに必ず 問題番号と受験番号を記入せよ。問題番号は各答案用紙の左上に大きくわかりやすいように記入すること。
4. 定規、コンパス、電卓は持ち込み不可。
5. 通信機能や計算機能を持つ機器を使用してはならない。
6. 試験問題は試験終了後持ち帰ってよい。

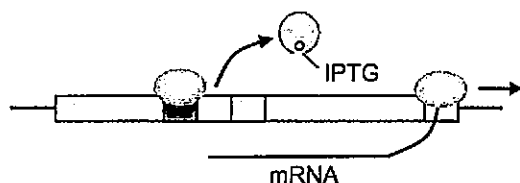
① 組換え大腸菌を用いてある真核生物由来の細胞内タンパク質(以下 Tokodain と呼ぶ)を発現させて、その機能を調べたい。この過程に関する以下の I～IV の間に答えよ。なお、Tokodain は細胞内で翻訳後修飾を受けないものとする。

I. 図 1 は、isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside (IPTG) で誘導可能なタンパク質発現ベクター(プラスミド)の発現制御領域の周辺の構造と、その発現制御機構を示している。(A)～(E) に当てはまる適切な語句を記せ。

(i) 発現誘導前(転写抑制状態)



(ii) 発現誘導後(転写活性化状態)



\* (B) は (E) の遺伝子産物  
\* MCS : multi-cloning site

図 1 ベクターのタンパク質発現制御領域の構造とその制御機構

II. 異種生物由来の組換えタンパク質を発現させるにあたり、誘導可能な発現ベクターを用いる利点は何か、2 行程度で説明せよ。

(次ページに続く)

III. I に示したプラスミドのマルチクローニングサイト(MCS、図 2)に、図 3 に示す Tokodain をコードする cDNA 配列を組み込み、野生型と同じ N 末端を持ち、かつ C 末端に短いリンカー配列を介して His<sub>6</sub> タグ配列をつないだ全長タンパク質を発現させたい。このために、両末端に異なる制限酵素認識部位を付加した cDNA 断片を PCR で増幅し、これをそれぞれの制限酵素で切断し MCS に挿入することにした。これに必要な全長 30 塩基の PCR プライマーのペアを設計せよ。なお、ここで用いる制限酵素は、DNA の末端にある認識配列は切断しないが、そこに任意の 2 塩基を付加すれば切断できるものとする。配列の向き (5'→3') も示すこと。

```

                NdeI   EcoRI   NotI   XhoI
AAGAAGGAGATATACATATGACGAATCCGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCAGGACTGAGGCACTGGCCG
                MetThrAsnSerAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisEnd

```

図 2 MCS 周辺の塩基配列とコードされるアミノ酸配列。下線は制限酵素認識部位を示す。

```

ATGAAACCACATCCGTGGTTTTTTGGCAAA( 180 塩基省略 )TTCAATTCTTTGAATGAGCTGGTG
MetLysProHisProTrpPhePheGlyLys( 60 残基省略 )PheAsnSerLeuAsnGluLeuVal

                XhoI
GATTATCACAGATCTACATCTGTCTCGAGAAACCAGCAGATATTCCTGCGGGACATAGAACAGGTGCCACAGCAGCCG
AspTyrHisArgSerThrSerValSerArgAsnGlnGlnIlePheLeuArgAspIleGluGlnValProGlnGlnPro

ACATACGTCCAGTGA
ThrTyrValGlnEnd

```

図 3 Tokodain をコードする cDNA 配列。この cDNA 配列中には、1 か所の XhoI 認識部位を除き、図 2 に示す 4 種類の制限酵素の認識部位は存在しない。

(次ページに続く)

IV. IIIで作製した組換え発現ベクターで大腸菌を形質転換し、抗生物質を含む選択培地において37°Cで対数増殖期後期まで液体培養した後、IPTGでタンパク質を発現誘導した。しかし、菌体を超音波破碎しSDS-PAGEによる解析を行ったところ、可溶性画分にはTokodainは含まれておらず、相当する約(ア)kDaのTokodainが不溶性画分に見られた。Tokodainは(イ)として蓄積したと考えられる。以下の1)～4)の間に答えよ。

1) (ア)に当てはまる適切な数字(有効数字2桁)を、算出過程も含めて記せ。なお、タンパク質中のアミノ酸の平均分子量は110とし、Tokodainは大腸菌においても翻訳後修飾を受けないものとする。

2) (イ)に当てはまる適切な語句を記せ。

3) 下線のような状況を解決し、機能解析に必要な可溶性Tokodainを得るためには、いくつかの実験手法がある。以下の(あ)～(お)より、適切な方法を全て選べ。

(あ) N末端に可溶性タンパク質を融合する。

(い) 分子シャペロン欠損大腸菌を用いて発現させる。

(う) 発現誘導前の培養温度を下げる。

(え) 発現誘導後の培養温度を下げる。

(お) 不溶性画分を精製し、変性剤で溶解してから緩衝液に透析する。

4) 3)で得られたTokodainは、 $\text{Ni}^{2+}$ などの金属イオン固定化カラムで精製できる。その原理を2行程度で説明せよ。

② 以下の I および II の間に答えよ。

I. ホルモンは、20 世紀初頭に細胞間の情報伝達に作用する生体内の化学的伝達物質の総称として提唱された。これまでに数多くのホルモンが発見され、(a)ホメオスタシスに働くことが明らかにされてきた。ホルモンは化学構造上、ペプチドホルモン・(b)アミノ酸誘導体ホルモン・(ア)ホルモンに大別され、複数のホルモンが協調してホメオスタシスに寄与している。ホルモンの血中濃度は非常に低いため測定が困難であったが、1959 年に Berson と Yalow により (c)ラジオイムノアッセイ法が開発され、ホルモン研究は大きく進展した。現在では、その測定原理は酵素標識抗体を用いる(イ)などに応用され、微量の物質を定量する方法として活用されている。

- 1) 文章中の (ア) および (イ) に当てはまる適切な語句を答えよ。
- 2) 下線部 (a) に関し、ホメオスタシスについて 2 行程度で説明せよ。
- 3) 下線部 (b) に関し、アミノ酸誘導体ホルモンの 1 つにアドレナリンがある。生体内でアドレナリン合成に利用されるアミノ酸の名称を 1 つ記し、その化学構造式を描け。ただし、立体化学については区別しなくてよい。
- 4) ホルモン分泌は巧妙に調節されており、上位のホルモンが過剰に分泌されると、それを抑制するように下位のホルモンが働くことがある。この制御機構の名称を答えよ。
- 5) 下線部 (c) のラジオイムノアッセイについて、以下の語句をすべて用いて 2 ~ 4 行程度で説明せよ。

競合、抗体、放射性同位体

(次ページに続く)

II. G タンパク質共役受容体(GPCR)は G タンパク質と共役して働く受容体であり、細胞外のリガンドを受容してそのシグナルを細胞内に伝える。G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットには、アデニル酸シクラーゼを活性化する (ア) タンパク質、逆にアデニル酸シクラーゼを阻害する (イ) タンパク質、ホスホリパーゼ C を活性化する Gq タンパク質などがある。GPCR はヒトでは 800 種類近く存在し、受容体の中で最大のファミリーを形成している。しかしその中には (d) 内因性リガンドが不明の受容体 が数多く存在するため、これら受容体のリガンド探索と (e) 生理機能解析 がさかんに行われている。

- 1) 文章中の (ア) および (イ) に当てはまる適切な語句を答えよ。
- 2) 下線部(d)に関し、このような「リガンドが特定されていない受容体」のことを何と呼ぶか答えよ。
- 3) 下線部(e)に関し、哺乳動物の生理機能解析には遺伝子ノックアウトマウスがよく用いられる。近年では、CRISPR/Cas9 システムを用いることでその作製を簡便かつ迅速に行えるようになった。以下の文章中の (ウ) ~ (キ) に当てはまる適切な語句を記せ。

CRISPR/Cas9 システムは、ゲノム (ウ) 技術として用いられているが、本来は、バクテリアにおける (エ) 機構として発見された。ウイルスゲノムなどが、バクテリアゲノム中の CRISPR 座位に挿入されることで外来 DNA として (エ) 記憶される。このようなバクテリアに同一ウイルスが再度感染すると、挿入されていた DNA 断片を (オ) として CRISPR RNA (crRNA) が転写される。次に、この crRNA とトランス活性化型 CRISPR RNA (tracrRNA) および DNA (カ) 酵素 Cas9 が複合体を形成し、ウイルスゲノムを配列特異的に (カ) する。現在汎用されているゲノム (ウ) 技術では、Cas9 を標的配列へ誘導する crRNA と tracrRNA を組み合わせた一本鎖の合成 (キ) RNA を用いることで実験デザインが容易となり、さまざまな生物種の遺伝子機能解析に利用されている。

③ 以下の I および II の間に答えよ。

I. 生物が生命活動を維持し成長するためには、外界から栄養素を取り込む必要がある。一般に植物が生育するために必須な栄養元素は17種類あることが知られており、(a)それらの栄養素を欠くと、植物の生育異常や枯死をまねく。たとえば、必須元素の中でも要求量が多い窒素が欠乏すると、(ア)や(b)アミノ酸などの基本的な細胞成分が合成できなくなるため、植物の生育は著しく阻害される。窒素の欠乏は同時に、多くの植物種において葉の白化を引き起こす。その主な原因は、光合成の明反応で光エネルギーを吸収する役割を持つ(イ)の生合成阻害と分解であると考えられている。(イ)は、一部の例外を除いてテトラピロール環の中央に(ウ)を配位している。(ウ)と同じ2価の陽イオンであるカルシウムイオンは、酵素の補助因子としての機能に加え、シグナル伝達に関わる(エ)として働く。窒素同様に植物の生育における要求量が多い(オ)は、(ア)の他に、生体膜を構成する(オ)脂質の構成成分としても重要な元素である。

- 1) (ア)～(オ)に当てはまる適切な語句を答えよ。
- 2) 下線部(a)に関し、生育阻害や枯死を避ける目的で、植物に限らず真核生物は一般に、タンパク質など細胞質成分のみならず、オルガネラのような構造体を丸ごと分解し、栄養源のリサイクルを行う。この機構の名称を答え、その機構による分解過程を3～5行程度で説明せよ。
- 3) 下線部(b)に関し、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸のうち、側鎖に窒素元素を含むものをすべて答えよ。

(次ページに続く)

II. 葉緑体は、シアノバクテリアが原始真核生物に入り込んで誕生したオルガネラであると考えられている。よって、(c)シアノバクテリアと葉緑体には様々な観点から共通点を見出すことができる。しかし、葉緑体のゲノムサイズはシアノバクテリアのゲノムサイズと比べてはるかに小さい。これは、進化の過程において(d)シアノバクテリア由来遺伝子のほとんどが葉緑体から核ゲノムに移行したためと考えられている。

- 1) 真核生物の特徴の1つは、オルガネラを持つことである。その利点を1つ挙げ、2～3行程度で説明せよ。
- 2) 下線部(c)の一例として、同一の抗生物質を用いて葉緑体とシアノバクテリアの翻訳反応を阻害することができる。そのような抗生物質を以下から1つ選び、翻訳阻害におけるその抗生物質の作用機構を1～2行程度で説明せよ。

アンピシリン、クロラムフェニコール、シクロヘキシミド、  
バンコマイシン、リファンピシン

- 3) 下線部(d)に関し、葉緑体ゲノム上の遺伝子Xがちょうど今、核ゲノムに移行したとする。しかし、核に移行した遺伝子Xからの転写産物は全く観察されなかった。遺伝子Xからの転写産物が観察されなかった理由を考察し、3～5行程度で説明せよ。



④ 次の文章を読み、以下の I～VI の間に答えよ。

動物の有性生殖では、2つの配偶子が<sup>(a)</sup>受精して新しい個体ができる。そのため、もし配偶子の染色体数が、親の体細胞のそれと同じであれば、受精によって生じる子の染色体数は親の2倍になってしまう。このことを回避するため、配偶子では<sup>(b)</sup>特別な細胞分裂が行われている。この分裂においては、(ア)染色体が対合し、(イ)染色体が形成される。このとき、(ア)染色体の間で(ウ)が起き、<sup>(c)</sup>染色体の一部が交換される場合がある。染色体の(ウ)が起きている部位を(エ)と呼ぶ。この特別な細胞分裂の際には、染色体構造も劇的に変化し、幅100～200 nmの密度の濃い平行したリボン状の2本の側方要素と、密度の低い1本の中央要素からなる構造を形成する。この構造体は(オ)と呼ばれる。

配偶子の受精や接合によらない生殖法である<sup>(d)</sup>無性生殖では、有性生殖と異なり、生じる新しい個体の遺伝情報は親と基本的に同じになる。多くの動物で広く有性生殖が行われていることから、<sup>(e)</sup>有性生殖が進化上有利であると考えられるが、すべての動物が有性生殖のみを行うわけではない。

- I. 下線部(a)に関し、1個の卵には多数の精子が到達できるが、卵の細胞膜と融合して卵の細胞質に自身のDNAを持ち込むことができるのは、通常1個の精子だけである。このことは、受精卵の染色体セットを確実に2つだけにするために重要である。どのようなしくみで2番目以降の精子が卵に入り込むことができないようになっているのか、2～4行程度で説明せよ。
- II. 下線部(b)を何と呼ぶか答えよ。
- III. (ア)～(オ)に当てはまる適切な語句を答えよ。
- IV. 下線部(c)に関し、この染色体の一部の交換機構は、体細胞のある種のDNA修復機構と共通である。このDNA修復機構を2～3行程度で説明せよ。
- V. 下線部(d)に関し、どのような場合に無性生殖が有利になると考えられるか、その理由を含めて2～4行程度で説明せよ。
- VI. 下線部(e)に関し、有性生殖が有利な点を2つ以上挙げ、あわせて2～4行程度で説明せよ。

⑤ 以下の I～III の間に答えよ。なお、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルはテトラメチルシランを標準物質として 100%重水素化されたクロロホルム中、室温で測定した。 $\delta$  と  $J$  はそれぞれ化学シフト (ppm)、カップリング定数 (Hz) を表す。

I. アルデヒド  $\text{Ph}(\text{CH}_2)_2\text{CHO}$  と  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  との Wittig 反応を行ったところ、 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_2$  の分子式を持つ化合物 **A** が生成し、以下の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルが得られた。以下の 1)～4) の間に答えよ。

化合物 A:

- $\delta$  7.5–7.2 ppm (5 プロトン, 多重線),
- $\delta$  7.0 ppm (1 プロトン, 二重線の三重線,  $J=15.6$  Hz (二重線),  $J=6.8$  Hz (三重線)),
- $\delta$  5.9 ppm (1 プロトン, 二重線,  $J=15.6$  Hz),
- $\delta$  4.2 ppm (2 プロトン, 四重線,  $J=7.1$  Hz),
- $\delta$  2.8 ppm (2 プロトン, 三重線,  $J=7.4$  Hz),
- $\delta$  2.5 ppm (2 プロトン, 二重線の三重線,  $J=6.8$  Hz (二重線),  $J=7.4$  Hz (三重線)),
- $\delta$  1.3 ppm (3 プロトン, 三重線,  $J=7.1$  Hz)

- 1) 化合物 **A** は二重結合を含んでいる。二重結合炭素に結合している水素の化学シフト値を答えよ。
- 2) 上記  $^1\text{H}$  NMR スペクトルデータから化合物 **A** の二重結合の立体化学 (シスまたはトランス) を決定し、その理由を 1～2 行程度で説明せよ。
- 3) 化合物 **A** のエチル基に相当する化学シフト値を答えよ。
- 4) 化合物 **A** に水素化ジイソブチルアルミニウムを反応させたところ、以下の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを示す高極性の化合物 **B** が得られた。これらの情報をもとにして化合物 **B** の化学構造式を描け。

化合物 B:

- $\delta$  7.5–7.2 ppm (5 プロトン, 多重線),
- $\delta$  5.8 ppm (1 プロトン, 二重線の三重線,  $J=15.9$  Hz (二重線),  $J=7.2$  Hz (三重線)),
- $\delta$  5.6 ppm (1 プロトン, 二重線の三重線,  $J=15.9$  Hz (二重線),  $J=7.4$  Hz (三重線)),
- $\delta$  4.2 ppm (2 プロトン, 二重線,  $J=7.2$  Hz),
- $\delta$  2.7 ppm (2 プロトン, 三重線,  $J=7.7$  Hz),
- $\delta$  2.2 ppm (2 プロトン, 二重線の三重線,  $J=7.4$  Hz (二重線),  $J=7.7$  Hz (三重線)),
- $\delta$  1.3 ppm (1 プロトン, 一重線)

(次ページに続く)

II.  $C_6H_{12}$  の分子式を持つ化合物 **C** をオゾン酸化し、オゾンドを酢酸中、金属亜鉛を用いて還元すると化合物 **D** が得られた。化合物 **C** と **D** の  $^1H$ NMR スペクトルは以下のとおりであった。これらの情報をもとにして化合物 **C** と化合物 **D** の化学構造式を描け。

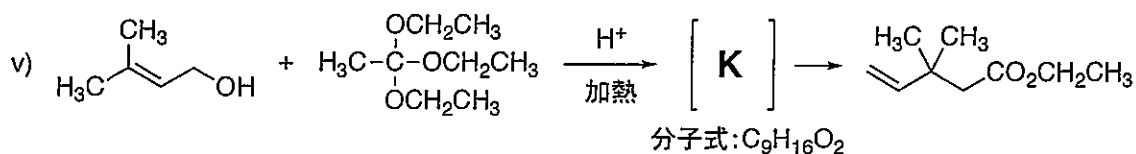
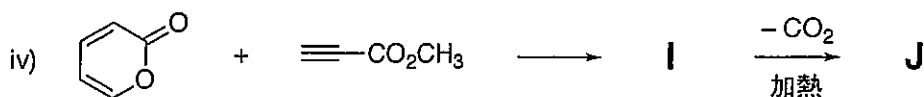
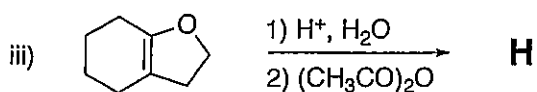
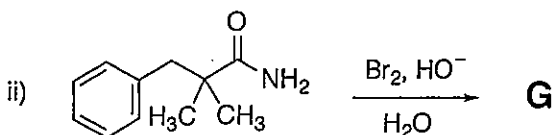
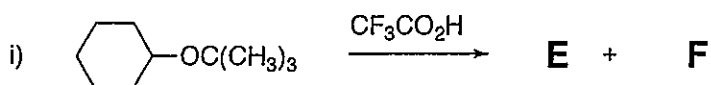
化合物 C:

- $\delta$  4.7 ppm (1 プロトン, 二重線,  $J=2.2$  Hz),
- $\delta$  4.6 ppm (1 プロトン, 二重線,  $J=2.2$  Hz),
- $\delta$  2.0 ppm (2 プロトン, 三重線,  $J=7.3$  Hz),
- $\delta$  1.7 ppm (3 プロトン, 一重線),
- $\delta$  1.6–1.4 ppm (2 プロトン, 多重線),
- $\delta$  0.9 ppm (3 プロトン, 三重線,  $J=7.2$  Hz)

化合物 D:

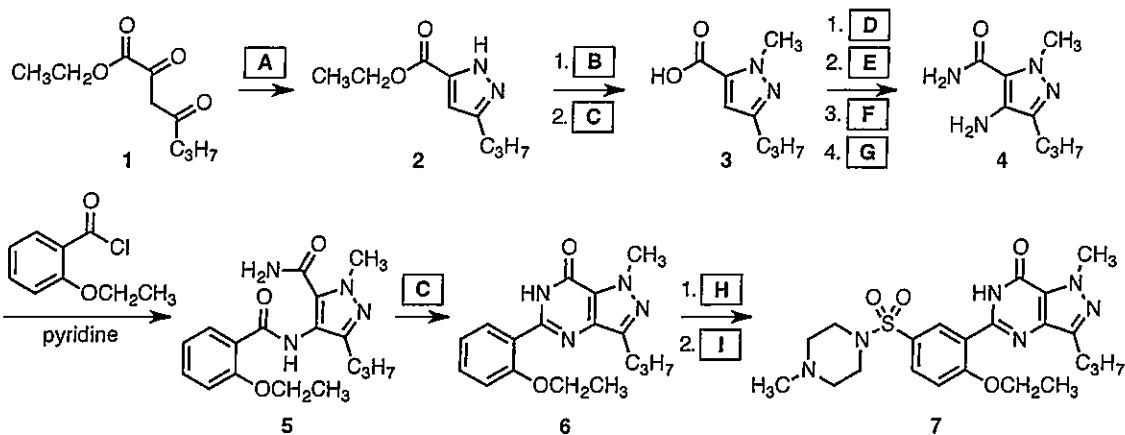
- $\delta$  2.4 ppm (2 プロトン, 三重線,  $J=7.2$  Hz),
- $\delta$  2.1 ppm (3 プロトン, 一重線),
- $\delta$  1.7–1.5 ppm (2 プロトン, 多重線),
- $\delta$  0.9 ppm (3 プロトン, 三重線,  $J=7.3$  Hz)

III. 次の合成経路 i) ~v) のそれぞれの反応で主生成物として得られる化合物 **E** ~**J**、ならびに中間体 **K** に当てはまる化学構造式を描け。ただし、光学活性体は考慮しなくてよい。

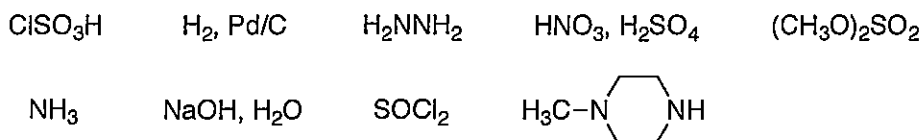


⑥ 以下の I および II の間に答えよ。

I. 以下の合成スキームは、ホスホジエステラーゼ阻害薬 **7** の合成経路を示したものである。

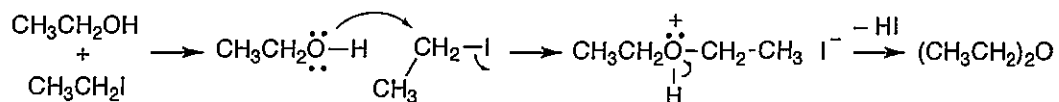


1) **A**~**I** に適した試薬を以下の 9 つの試薬群から選び、それぞれ答えよ。



2) 化合物 **1** から化合物 **2** が生成する反応機構を説明せよ。なお、記載する際は下記の例にならうこと。

例)



3) 化合物 **3** の IR スペクトルにおいて、カルボン酸のカルボニル基 (C=O) の伸縮振動の吸収波数 ( $\text{cm}^{-1}$ ) は、以下のどの範囲で観測されるか答えよ。

800~1200   1200~1600   1600~2000   2000~2400   2400~2800   2800~3600

4) 化合物 **4** には 2 つの  $\text{NH}_2$  基が存在するにもかかわらず、化合物 **5** が選択的に生成している。その理由を 1~2 行程度で説明せよ。

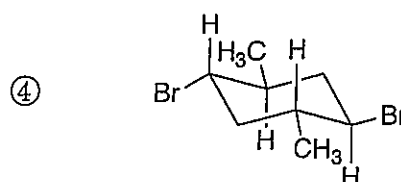
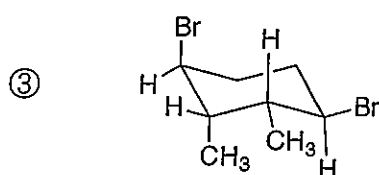
(次ページに続く)

II. 次の記述 1～5 のうち正しいものをすべて選べ。また、正しいものがない場合は「なし」と答えよ。

1. 安息香酸はサリチル酸(2-ヒドロキシ安息香酸)より酸性度が高い。
2. Hammond の仮説によると、吸熱反応では遷移状態の構造は反応物ではなく生成物に類似している。
3. 次の①～④の 4 つの化合物の中に光学活性な化合物は 2 つある。

① (2*R*,3*S*)-2,3-ジブロモブタン

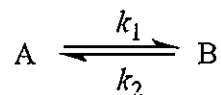
② (2*R*,3*R*)-2,3-ジブロモブタン



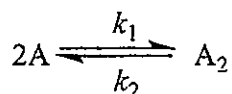
4. 環状のクロロシクロプロパンを基質とする  $S_N2$  反応は、非環状の 2-クロロプロパンの反応に比べて速い。
5.  $S_N1$  反応における律速段階は 2 つのイオンが生成する段階であることから、極性の高い溶媒は反応の進行を妨げる。

⑦ 次の文章を読み、以下の I～V の間に答えよ。

正反応と逆反応の両方が 1 次である次の反応を考える。



- I. A の濃度  $[A]$  の正味の変化速度の式を記せ。
- II. 平衡にある系の温度を急に上げると、速度定数は元の温度での値  $k_1, k_2$  から新しい温度での値  $k_1', k_2'$  へと急に変化し、その瞬間の A と B の濃度は元の平衡値のままである。このとき系は平衡ではないため、新しい平衡濃度へと反応が進行する。新しい平衡濃度  $[A]_{\text{eq}}, [B]_{\text{eq}}$  からのずれを  $x$  とすれば、 $[A] = [A]_{\text{eq}} + x$  および  $[B] = [B]_{\text{eq}} - x$  と表せる。 $[A]$  の正味の変化速度の式を記せ。
- III. 時間  $t = 0$  の時、 $x$  の初期値を  $x_0$  として  $x$  の時間変化を示す式を記し、緩和時間  $\tau$  を  $k_1', k_2'$  を用いて記せ。
- IV. このような温度ジャンプ法を用いると、新しい条件の下での速度定数  $k_1', k_2'$  を別々に求めることができる。新しい条件下での  $k_1'$  を、緩和時間  $\tau$  と新しい条件下での平衡定数  $K$  を用いて記せ。
- V. 正反応が 1 次である上記の式の場合と異なり、正反応が 2 次、逆反応が 1 次の以下の平衡反応では、緩和時間  $\tau$  はどのような式で表されるか記せ。ただし、新しい平衡濃度  $[A_2]_{\text{eq}}$  からのずれを  $x$  とし、 $x^2$  項は無視せよ。



⑧ 次の文章を読み、以下の I～V の間に答えよ。

$a$ 、 $b$ 、 $c$  軸がそれぞれ直交し、 $a=2.00 \text{ \AA}$ 、 $b=4.00 \text{ \AA}$ 、 $c=1.00 \text{ \AA}$  の単純単位胞を持つ結晶による回折を考える。この結晶は (ア) 種類ある結晶系のうち、(イ) 晶系に属するものである。この結晶内のある 1 組の面のひとつ X 面は、軸と  $2a$ 、 $b$ 、 $c$  で交わる。ある波長の X 線をこの結晶に照射し、X 面からの 1 次反射を測定したところ、視射角  $60.0^\circ$  のところに観測された。

必要に応じて以下の値を用いよ。また、長さの単位は  $\text{\AA}$  ( $\text{\AA}$  は  $10^{-10} \text{ m}$ ) を用いることとする。

$$\sqrt{2} = 1.41, \sqrt{3} = 1.73, \sqrt{5} = 2.24, \sqrt{7} = 2.65$$

$$\text{電気素量 } e = 1.6 \times 10^{-19} \text{ C}, \text{ 電子の質量 } m_e = 9.1 \times 10^{-31} \text{ kg}$$

$$\text{プランク定数 } h = 6.6 \times 10^{-34} \text{ J s}, \text{ 光速 } c = 3.0 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$$

$$\text{真空の誘電率 } \epsilon_0 = 8.9 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$$

- I. (ア) に適切な数、(イ) には適切な語句を、それぞれ記せ。
- II. X 面のミラー指数を記せ。
- III. X 面の面間隔  $d$  を求めよ。
- IV. 照射した X 線の波長を求めよ。
- V. この波長の X 線を制動放射により得るために必要な電子の最低加速電圧  $V$  を求めよ。