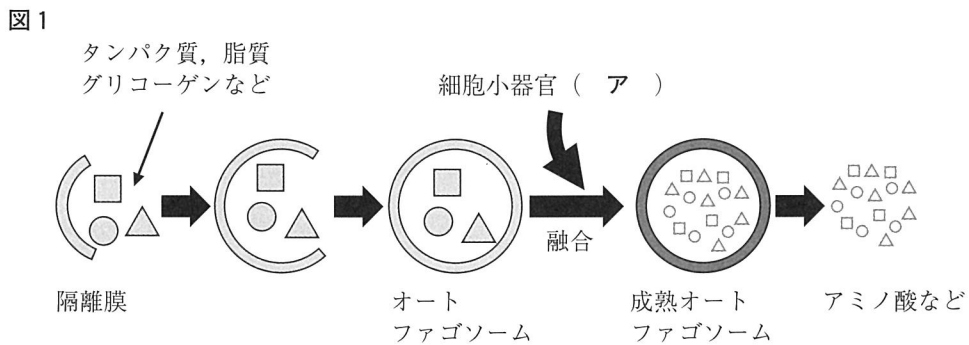


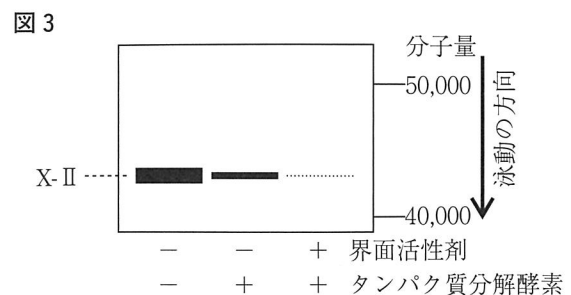
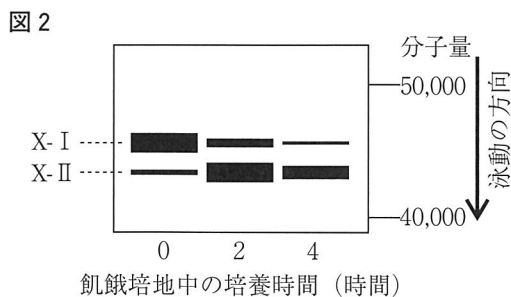
〔I〕 以下の問題文を読み、答えを解答欄に記入しなさい。

飽食の時代に生きる我々現代人は、肥満や糖尿病などの生活習慣病に悩まされるようになってきたが、人類の歴史を紐解くと、人類はほんの少し前までは十分な食事を摂取することができない飢餓の時期を生き抜いてきていたことが分かる。個体レベルでは、内分泌系と神経系の相互作用のもと、複雑ではあるが非常に調和の取れた生体システムを稼働させることで飢餓に適応している。一方、古くから飢餓時の応答は単一細胞レベルでも観察されることが分かっており、近年、その分子機構が次第に明らかになってきた。飢餓状態になると細胞は、タンパク質、脂質やグリコーゲンなどの生体高分子を積極的に分解して生存に必要なエネルギーを生じるシステムを活性化させる。この飢餓応答の重要なシステムがオートファジー（自食作用）である。オートファジーでは、まず隔離膜と呼ばれる生体膜が細胞内のさまざまな物質を囲い込み、オートファゴソームと呼ばれる二重の生体膜からなる小胞が形成される。次に、この小胞と細胞小器官の（ア）が融合し（この融合体をここでは成熟オートファゴソームと呼ぶことにする）、その後、細胞小器官内の酸性条件下で働く酵素により内容物が分解される（図1）。オートファジーに必須であり、オートファジー開始時に隔離膜上に結合して集積することが分かっている142個のアミノ酸からなる分子量22,000のタンパク質Xに着目し、培養細胞を用いて次のような実験を行い、オートファジーの過程を調べてみた。



**実験1** タンパク質Xのアミノ基側の末端に緑色蛍光タンパク質（GFP）を、カルボキシ基側の末端に9アミノ酸からなるペプチドAを結合させたタンパク質（GFP-X-Aタンパク質）を発現する細胞を作製した。この細胞を通常培地あるいはアミノ酸を全く含まない培地（飢餓培地）中で2ないし4時間培養した後、それぞれの細胞からタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を電気泳動により分離し、GFPを特異的に認識できる抗体（抗GFP抗体）を用いて、タンパク質Xの発現を解析した結果、移動度の異なる2本のバンド（移動度の遅いバンドをX-I、速いバンドをX-IIとする）を検出した（図2）。GFPタンパク質の分子量は27,000とし、一方、ペプチドAの分子量は無視できるほど小さく、電気泳動の移動度に影響を与えないものと仮定する。バンドの太さは、タンパク質の発現量に比例するものとする。また、飢餓培地中で培養した場合、細胞内での新たなタンパク質の合成は完全に抑制されるものとする。

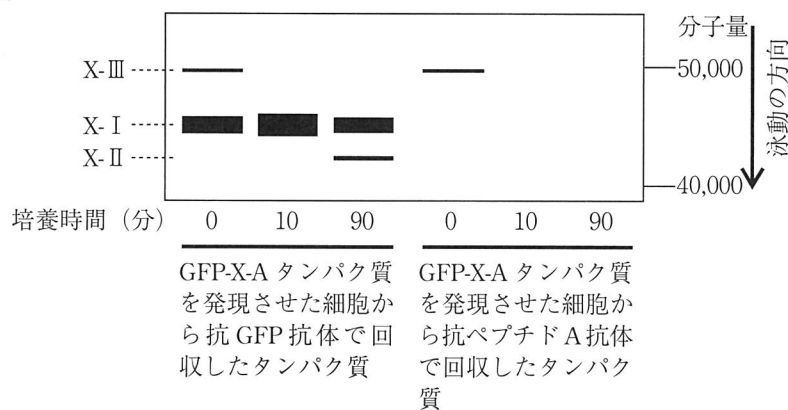
一方、別の解析からX-IIバンドのタンパク質は、X-Iバンドのタンパク質のカルボキシ基側の末端のアミノ酸特異的に、ある脂質が結合したものであることが分かった。なお、X-IIは、この脂質修飾により分子量が増加するにもかかわらず、X-Iよりも速く移動することが知られている。



**実験2** 実験1において飢餓培地中で4時間培養した細胞からオートファゴソームだけを分離し、それを3つに分け、1つを未処理群とした。残り2つのサンプルは、生体膜に対するタンパク質の透過性を上げる界面活性剤の存在あるいは非存在下で、タンパク質分解酵素によって一定時間処理した。その後、これらのサンプルについて**実験1**と同じ方法でタンパク質Xの発現量を解析した結果、X-IIのバンドのみを検出した(図3)。

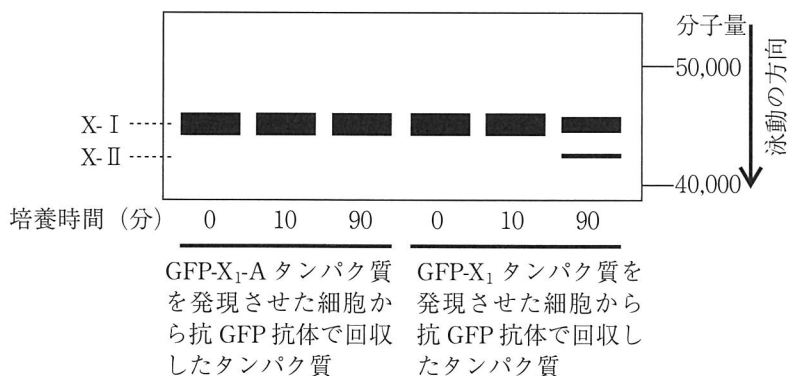
**実験3** 成熟オートファゴソームの形成過程におけるタンパク質Xの動態を解析するために、**実験1**で作製した細胞を放射性同位元素で標識したアミノ酸を加えた通常培地中で非常に短い時間(数分間)だけ培養した。その後、放射性同位元素を含まない通常培地に戻し、0、10および90分間培養した。それぞれの時間培養した後、細胞からタンパク質を抽出した。その細胞抽出液から、抗GFP抗体を用いてGFPを結合したタンパク質のみを回収した。同様に、ペプチドAを特異的に認識できる抗体(抗ペプチドA抗体)を用いて、ペプチドAを結合したタンパク質を別に回収した。これらの回収したタンパク質を電気泳動で分離後、それをフィルムに感光させた結果、3本のバンド(X-I、X-IIとX-III)が検出された(図4)。

図4



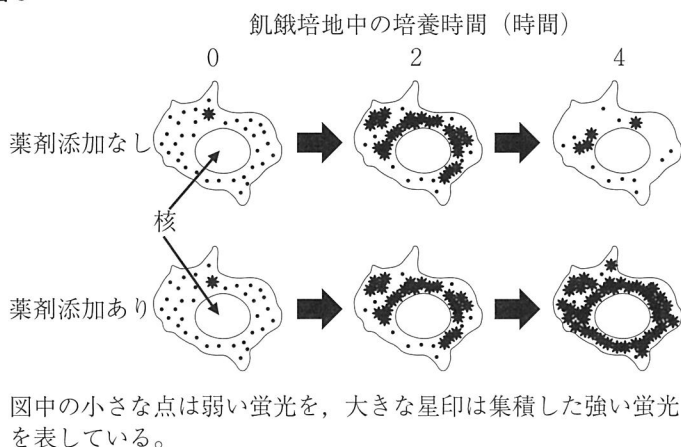
**実験4** タンパク質Xのカルボキシ基側の末端から22個のアミノ酸(分子量4,000)を欠失したタンパク質X<sub>1</sub>に対して、アミノ基側の末端にGFPとカルボキシ基側の末端にペプチドAを結合させたタンパク質(GFP-X<sub>1</sub>-Aタンパク質)を発現させた細胞を作製した。さらに、タンパク質X<sub>1</sub>のアミノ基側の末端にGFPのみを結合させたタンパク質(GFP-X<sub>1</sub>タンパク質)を発現させた細胞も別に作製した。これらの細胞に対して、抗GFP抗体を用いて**実験3**と同じ実験を行った結果、X-IおよびX-IIと同じ移動度の位置にバンドが検出された(図5)。

図5

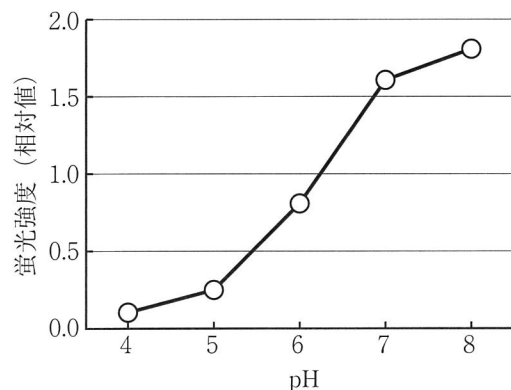


**実験5** 成熟オートファゴソームの形成過程におけるタンパク質Xの細胞内挙動を解析するために、タンパク質Xのアミノ基側の末端にGFPのみを結合させたタンパク質を安定的に発現した細胞を作製した。その細胞を飢餓培地に移し蛍光顕微鏡下で経時的に観察した結果、**図6**上段のような結果が得られた。次に、オートファゴソームと細胞小器官との融合を抑制する薬剤を添加した条件下で、同様な実験を行ったところ、**図6**下段のような結果が得られた。また、さまざまなpHの緩衝液中でGFPの蛍光強度を測定した結果を**図7**に示す。

**図6**



**図7**



**問1** (ア)にあてはまる語句を答えなさい。

**問2** 実験2の結果から、タンパク質X-IIは飢餓応答時に、オートファゴソームにどのように分布していると考えられるか。理由とともに答えなさい。

**問3** 実験3および4の結果から、通常培地で培養している条件下では、翻訳されたタンパク質Xはどのような修飾を受け、オートファゴソームに局在していると考えられるか答えなさい。

**問4** 実験4において、なぜGFP-X<sub>1</sub>-Aタンパク質を発現させた細胞ではX-IIが検出されなかったのかについて、考えられる可能性を答えなさい。

**問5** 実験5の結果の**図6**上段において、飢餓培地に移した4時間後に認められた蛍光像の減弱にかかわっていると考えられる原因を2つ挙げなさい。

**問6** 実験5の結果の**図6**下段において、オートファゴソームと細胞小器官との融合を抑制する薬剤を添加した場合に、4時間後の蛍光像が増強した理由を説明しなさい。

**問7** 実験5において、成熟オートファゴソームで働くタンパク質分解酵素を完全に抑制する薬剤を添加し、飢餓培地で4時間培養した細胞では、どのような蛍光像が得られると考えられるか。オートファゴソームと細胞小器官との融合を抑制する薬剤の添加群、薬剤未添加群のそれぞれと比較しながら、理由とともに答えなさい。

**問8** 実験5において、実験4で作製したGFP-X<sub>1</sub>-Aタンパク質を発現させた細胞を飢餓培地で2時間培養した場合、どのような蛍光像が得られると考えられるか。理由とともに答えなさい。ただし、蛍光像は何も薬剤を添加しない条件で取得するものとする。

〔Ⅱ〕 以下の問題文を読み、答えを解答欄に記入しなさい。

ヒトの体内の水分量は体重の60%と見積もられ、そのうちの3分の2が細胞内に存在する細胞内液であり、3分の1は細胞外に存在する細胞外液である。細胞外液の4分の1は血しょうであり、4分の3が間質液と呼ばれる細胞間や組織間のすきま（間質腔）を満たす液体である。これら体液量やその中に存在するイオンを含むさまざまな物質（以下、物質とする）の組成は、腎臓での尿の産生と排出を通じて一定に保たれている。

腎臓は皮質、髄質、腎うの3つの部分から構成される。皮質と髄質における腎臓を構成する各部位の配置を図1に示す。腎臓に流れ込んだ血液は、輸入細動脈から皮質に位置する糸球体を構成する細い血管に送られ、輸出細動脈へと流れ出ていく。輸出細動脈からは、以下に述べる尿細管の周囲に、網目状に広がった毛細血管が続いている（図1では省略してある）。糸球体の血管の外側にはボーマン嚢が位置し、血液はここでろ過され、血液中の血球やタンパク質を除く大部分の成分や水分はボーマン嚢に押し出されて原尿となる（問5あ）。続いて原尿は尿細管に送られる。尿細管は近位尿細管、ヘンレ係蹄、遠位尿細管、集合管から構成される。主に髄質に位置するヘンレ係蹄はU字形をしており、下行する部分を下行脚、上行する部分を上行脚とよぶ。集合管はヘンレ係蹄の近傍に平行するように伸びている。物質や水分は尿細管の内部から間質腔に移動し、さらに尿細管の周囲の毛細血管へと再吸収される（問5い）。再吸収される物質の種類や量および水の量は、尿細管の各部位により異なる。それぞれの尿細管の部位の全長において、物質や水分の間質腔への移動ならびに毛細血管への再吸収は均等に起こるとする。尿細管で吸収されなかった物質および水分は尿として排出される。

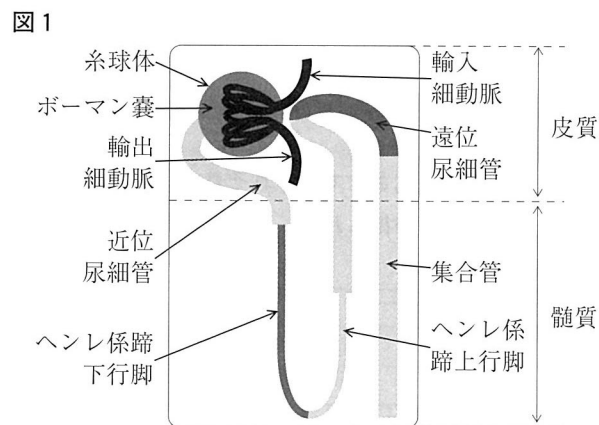


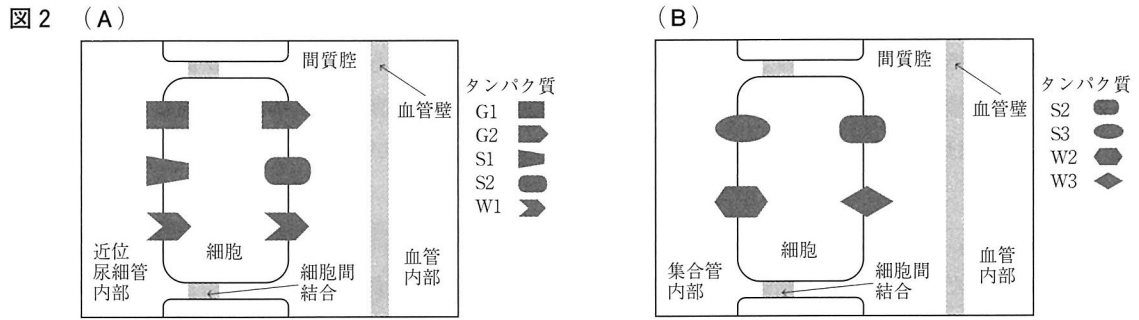
図2（A）には、近位尿細管の細胞と、近位尿細管内部側と間質腔側の細胞膜にそれぞれ存在するタンパク質の種類を示す。近位尿細管では、細胞同士がゆるやかに結合して近位尿細管の壁を形成している。グルコースは、タンパク質G1とタンパク質G2を介して近位尿細管内部から間質腔へ移動する。タンパク質G1は、グルコースと同時に近位尿細管内部から細胞内部への $\text{Na}^+$ の移動も行う。タンパク質G2はグルコースの移動のみを行う。

タンパク質S1も近位尿細管内部から細胞内部への $\text{Na}^+$ の移動を行い、この際に $\text{H}^+$ が逆方向に移動する。さらにタンパク質S2は細胞内部から間質腔への $\text{Na}^+$ の移動を行う。この際に $\text{K}^+$ が逆方向に移動する。近位尿細管内部、細胞内部、間質腔のそれぞれの液体の $\text{Na}^+$ 濃度を比べると、細胞内部が他の二つに比べて圧倒的に低い。このため、タンパク質S2は、低濃度側の細胞内部から高濃度側の間質腔へと $\text{Na}^+$ の移動を行っている。

さらに、タンパク質W1は、水が近位尿細管内部から細胞内部を通り間質腔へ移動する場合に使われる。

図2（B）には、集合管の細胞と、集合管内部側と間質腔側の細胞膜にそれぞれ存在するタンパク質の種類を示す。集合管では、細胞同士が密に結合して集合管の壁を形成する。タンパク質S3は尿細管内部から細胞内部への $\text{Na}^+$ の移動のみを行う。細胞膜に存在するタンパク質S3の量は、鉱質コルチコイドの作用により増加する。続いて、近位尿細管の細胞でもみられたタンパク質S2が、細胞内部の低い濃度側から間質腔の高い濃度側へと $\text{Na}^+$ を移動させる。また、

タンパク質 W2 とタンパク質 W3 を介して水が尿細管内部から細胞内部を通り間質腔へ移動する。



物質が腎臓で処理され、1分間あたりに血しょうから尿中にどれだけ取り出されたかを示す値を「クリアランス (C)」 [mL/分] とよび、以下の式で表される。

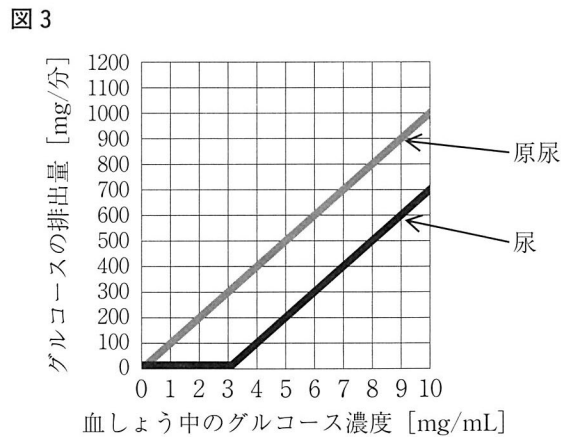
$$C = \frac{U \times V}{P}$$

ここで、 $U$  : 尿中の物質濃度 [mg/mL],  $V$  : 1分間あたりの尿の産生量 [mL/分],  $P$  : 血しょう中の物質濃度 [mg/mL], である。また、糸球体で血しょうからろ過されて原尿中に移動した物質が、尿細管から周囲の毛細血管へ再吸収されることなくすべて尿中に排出される場合のクリアランス値を特に「糸球体ろ過量 (GFR)」とよび、1分間あたりにどれくらいの量の血しょうから対象とする物質が完全に除去され得るかを示す。

腎臓の働きを調べるために、以下の実験を行った。

### 実験 1

血しょう中のグルコース濃度をさまざまに変化させて、それぞれの条件における1分間あたりに原尿中と尿中に排出されたグルコースの量を調べたところ、図 3 が得られた。また、グルコースの分泌 (尿細管周囲の血管から尿細管内部への追加排出) はなかった。



実験 2

原尿中の量を基準にして、尿細管の各部位において水と Na<sup>+</sup> がそれぞれ再吸収される割合を調べたところ、**図 4** のグラフが得られた。さらに、Na<sup>+</sup> の再吸収量の変化に伴う腎臓の酸素消費量の変化を調べたところ、**図 5** のグラフが得られた。

図 4

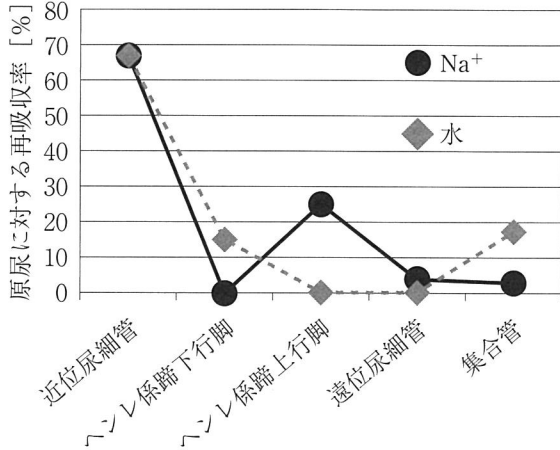
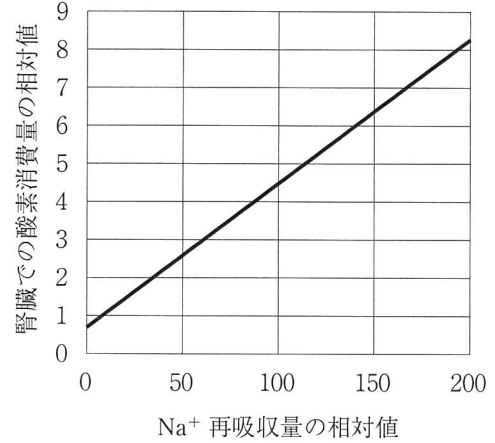


図 5



実験 3

集合管の細胞を詳しく調べたところ、タンパク質 W2 は集合管内部側の細胞膜だけではなく、細胞内部に位置する小胞にも存在していることが分かった。ここで、バソプレシンの投与が集合管に与える影響を調べたところ、**図 6** に示すように、バソプレシンの投与に依存して、集合管の内部から間質腔への水の透過性が変化した。また、**図 6** の (ア) および (イ) の時の集合管の細胞におけるタンパク質 W2 の細胞膜と小胞への分布を調べたところ、それぞれ **図 7** の (ア) と (イ) に示す結果が得られた。

図 6

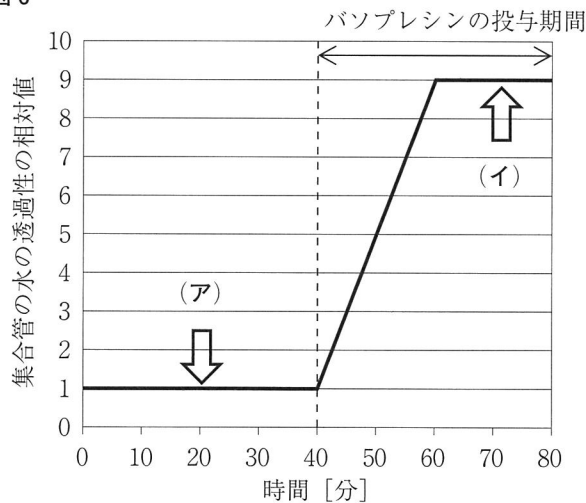
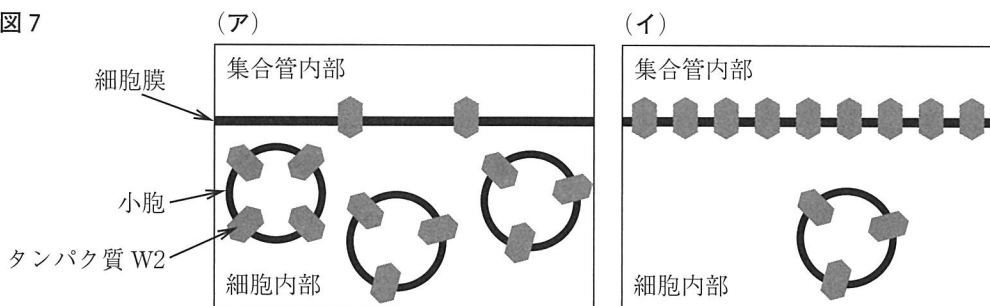


図 7

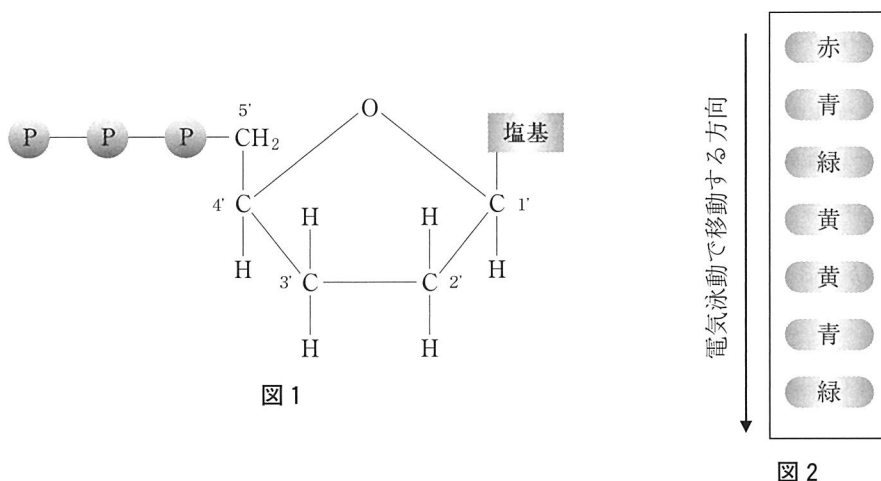


- 問1 図2のタンパク質 G2, タンパク質 S2, タンパク質 S3 の名前を答えなさい。
- 問2 図3より, 血しょう中のグルコース濃度に対する近位尿細管で再吸収されるグルコースの量の変化を表すグラフを, 解答欄の図中に示しなさい。
- 問3 図3における血しょう中のグルコース濃度の各自然数の値に対して, グルコースのクリアランスの値を解答欄の図中に●で示しなさい。また, 血しょう中のグルコース濃度が著しく大きくなった場合に(無限大を仮定してよい), グルコースのクリアランスがとる値を単位と共に答えなさい。さらに, この値が持つ意味を説明しなさい。
- 問4 血しょう中のグルコース濃度が5 mg/mLにおけるグルコースの濃縮率が32であった場合, 1分間あたりの尿の産生量を小数第二位までの値で単位と共に答えなさい。
- 問5 本文中の下線部(い)について, 間質腔から血管内部に水が移動することに対して, 本文中の下線部(あ)の血管内部に残ったタンパク質によりどのような効果もたらされるかを説明しなさい。ここで, 血管壁は水を透過する性質を有するものとする。
- 問6 ヘンレ係蹄の $\text{Na}^+$ と水の再吸収の働きにより, 髄質において間質液の浸透圧に勾配が形成される。図4の実験結果に基づき, 浸透圧が高くなっていく方向を解答欄の図中に矢印で示しなさい。また, その浸透圧勾配が形成される理由を答えなさい。ただし, ヘンレ係蹄の全長にわたり, 同じ高さにある内部の液体と間質液の浸透圧は平衡により等しくなるとする。
- 問7 髄質において同じ高さにある間質液の浸透圧は等しいとすると, 図4の実験結果が示すように集合管において水の再吸収が顕著に起こる理由を, 図1の各部位の位置関係も踏まえて説明しなさい。
- 問8 図5において,  $\text{Na}^+$ の再吸収量の増加に対して腎臓の酸素消費量が増える理由を考えて答えなさい。
- 問9 実験3において, バソプレシンの投与直後から集合管における水の透過性の変化が現れたことと, タンパク質 W2の分布に小胞が関与していることに留意して, バソプレシンの働きを考えて答えなさい。

〔Ⅲ〕 以下の問題文を読み、答えを解答欄に記入しなさい。

生命の設計図であるゲノムの実体は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T) から構成される DNA の塩基配列である。様々な生物のゲノム DNA 塩基配列を解読する (読む) ことは、現代の生命科学における重要な研究テーマである。

DNA の塩基配列を解読する装置を「シーケンサー」と呼ぶ。従来型のシーケンサーは、サンガー法と呼ばれる配列決定法に基づく。サンガー法では、第一に、塩基配列の解読の対象となる 1 本鎖 DNA X を大量に準備する。次に、DNA を構成する「通常のコクレオチド」、および、これとは構造が異なる「特殊なコクレオチド」(図 1) を含む混合液中で、X を鋳型として DNA ポリメラーゼによって X に相補的な DNA 鎖の合成反応を行う (問 1)。この際、特殊なコクレオチドには、上述の構造の違いとは別に、A、T、G、C それぞれの塩基部分に異なる蛍光色素を付与する (ここでは、A に赤、T に青、G に緑、C に黄の蛍光色素を付与したとする)。最後に、合成した 1 本鎖 DNA を集めて、電気泳動および蛍光検出を行い、得られるバンドのパターンから目的の塩基配列を決定する (図 2、問 2)。



近年では、DNA 塩基配列の解読能力がサンガー法に比べて劇的に向上した「次世代シーケンサー」が開発されている。しかしながら、シーケンサーで解読ができる配列長には限界がある (サンガー法では 500 ~ 1000 塩基程度、次世代シーケンサーでも 100 ~ 数千塩基程度)。そのため、ヒトなどのゲノム DNA 配列を解読する場合には、DNA を短く断片化し、断片化したそれぞれの DNA の塩基配列の読み取りを行う。この際得られる DNA 断片の塩基配列を「リード配列」と呼ぶ。次世代シーケンサーは、この「リード配列」を一度に大量に読むことが可能であるが、読み取りは完璧ではなく、一定の割合で塩基の読み取りエラーが生じる (図 3 A の太字の塩基)。また、一般に、解読対象となる DNA 配列の任意の場所の部分塩基配列がランダムに (全て等しい確率で) 読まれる (図 3 A リード配列)。そこで、シーケンサーで配列情報を解読する際は、解読対象となる DNA のおのおのの塩基 (配列) が平均的に複数回読まれるように余裕を持った配列解読を行う必要がある。例えば、図 3 A の①の塩基「G」と②の塩基配列「TTA」は、読み取りエラーも含めると共に 3 回読まれている。すなわち、長さが 3 億 ( $3 \times 10^8$ ) の 1 本鎖ゲノム DNA 配列から配列長 (塩基数) が 100 のリード配列を読む場合に、解読対象となる DNA の各塩基の平均的な解読回数を 30 とするためには、(あ)本のリード配列を読む必要があることがわかる。したがって、シーケンサーにより得られるリード配列の配列情報は膨大となる。

このような大量のリード配列からゲノム DNA 配列の特徴を推察するために、コンピュータを用いて、以下に示すようなリード配列情報の解析を行った。この際に使う「長さが  $k$  の短い部分 DNA 塩基配列」を  $k$ -mer と呼ぶ (図 3 B)。 $k$ -mer はリード配列のさまざまな情報解析に用いられる重要な概念である。特定の  $k$  に対して  $k$ -mer は全部で (い)種類存在する。また、DNA 配列「GGCTCG」からは、その開始位置に応じて「GGC」、「GCT」、「CTC」、



「TCG」の4個の  $k$ -mer ( $k = 3$ ) が得られることがわかる (図 3 B)。すなわち、長さが  $L$  の DNA 配列から得られる  $k$ -mer の数は (う) となる。今、ある生物種 Z のゲノム DNA (2 倍体で 1 倍体あたり 3 億塩基対) から、シーケンサーを用いて十分な量のリード配列 (リード配列集合) の解読を行った。次に、リード配列集合に含まれる各  $k$ -mer ( $k = 17$ ) に対して、リード配列集合中でのその出現回数を数えた (例えば、図 3 A の下線が示すように、 $k$ -mer 「GCT」はリード配列集合において 5 回出現する)。その後、リード配列の集合に含まれる  $k$ -mer の出現回数の頻度 (個数) を、コンピュータを用いてグラフにしたところ、図 4 のようなグラフが得られた。仮に、このグラフの横軸の値が 15 ときに縦軸の値が 50 であった場合、リード配列集合の中に 15 回出現する  $k$ -mer の種類が 50 個であったことを示している。ここで、B のピークに対応する横軸の値 ( $x_B$ ) は、C のピークに対応する横軸の値 ( $x_c$ ) のちょうど半分であった。このグラフから、ゲノムおよびリード配列の特徴をある程度推察することができる (問 5)。

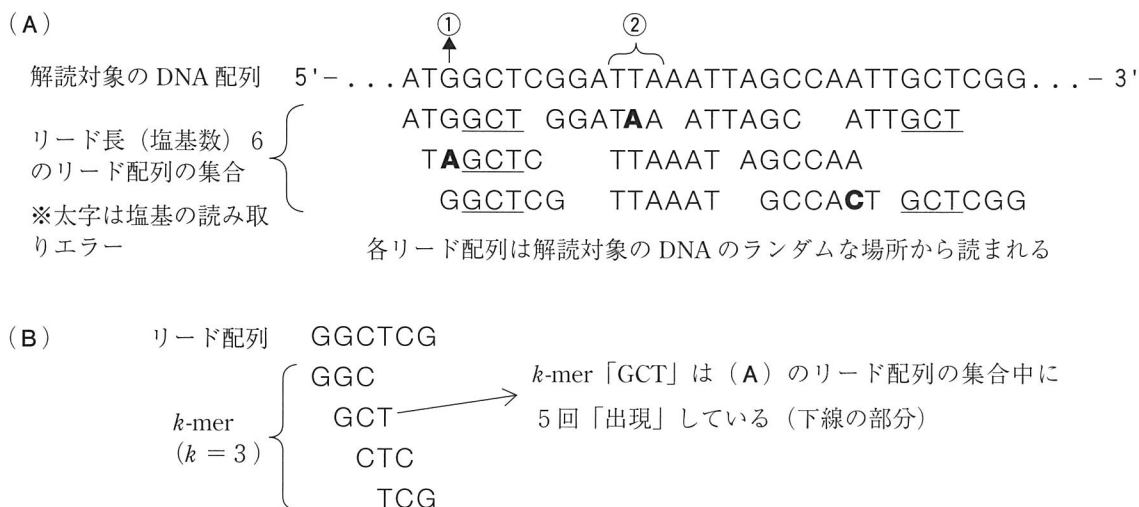


図 3 リード配列と  $k$ -mer の概念図

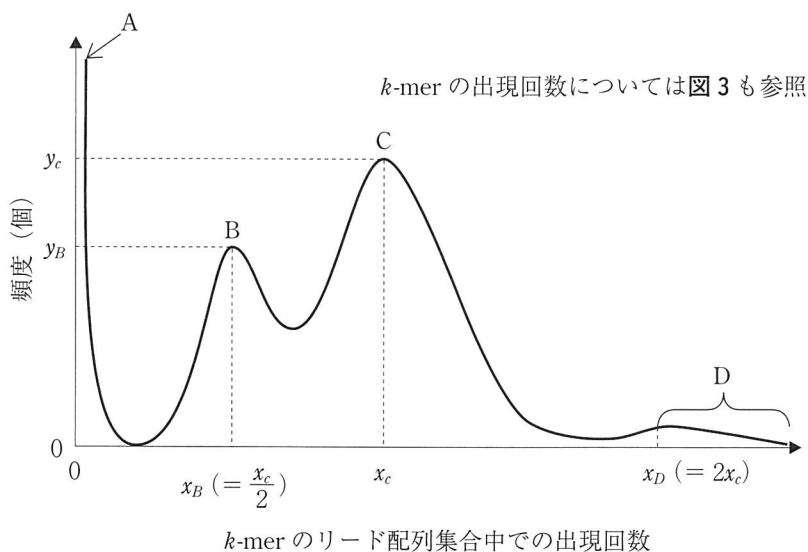


図 4

問1 「特殊なヌクレオチド」に関して以下の問いに答えなさい。

- (1) 「通常のヌクレオチド」に対して「特殊なヌクレオチド」の蛍光色素以外の化学構造の違いを図1を用いて簡潔に説明しなさい。さらに、この違いから「特殊なヌクレオチド」が、DNAポリメラーゼの伸長反応において、どのような性質を持つヌクレオチドであるかを説明しなさい。
- (2) 混合液中の「特殊なヌクレオチド」の割合が、「通常のヌクレオチド」に比べて多すぎる場合、塩基配列の決定においてどのような問題が生じるかを説明しなさい。

問2 電気泳動と蛍光検出により図2のようなバンドパターンが得られたとする。このとき「調べたい1本鎖DNA X」(7塩基であることがわかっている)をA, T, G, Cの文字列として記入しなさい(例:ATTGCAA)。

問3 計算式を示しながら(あ)に入る数を記入しなさい。

問4 (い), (う)に入る数式を記入しなさい。

問5 図4のグラフに関して以下の問いに答えなさい。

- (1) Aの部分に対応する $k$ -merは、リード配列集合中における出現回数が少ない。このような $k$ -merは主に、リード配列の読み取りの際の問題に由来すると考えられるが、どのような問題に由来するかを簡潔に説明しなさい。
- (2)  $y_B$ の値(ピークBの大きさ)により生物種ZのゲノムDNA配列のどのような特徴が推察されるかを説明しなさい。
- (3) Dの部分の頻度は、生物種ZのゲノムDNA配列のどのような特徴を反映していると考えられるかを説明しなさい。
- (4)  $x_c$ の値(ピークCに対応する横軸の値)は解読対象となるDNA配列中の $k$ -merの平均的な解読回数に等しくなると考えられる。ここでは簡単のため、3億塩基の長さの1本鎖DNAから、各塩基の平均的な解読回数が30となるように長さが100のリード配列を読んだ場合を考える(問3と同じ状況)。このとき、この1本鎖DNA中の各 $k$ -mer( $k=17$ )の平均的な解読回数として最も近い整数の値を計算式を示しながら解答欄に記入しなさい。

〔IV〕 以下の問題文を読み、答えを解答欄に記入しなさい。

バクテリオファージ（以下、ファージという）は大腸菌などの細菌に感染して増殖するウイルスである。ファージは大腸菌とともに分子遺伝学、分子生物学の発展に大きな役割を果たした。たとえば、遺伝子の本体がDNAであることを示したハーシーとチェイスの実験では、ファージがDNAとタンパク質で構成されていることに着目し、ファージのゲノムDNAとタンパク質を異なる放射性同位元素（問1）で標識したのちに大腸菌に感染させることによって、DNAが遺伝子の本体であることを証明した。この実験に使用されたT2ファージは、大腸菌に感染すると自身のゲノムDNAを大腸菌に注入して、菌体内でファージゲノムDNAを複製するとともにファージを構成するタンパク質を発現する。菌体内で子ファージを作ると、大腸菌を壊して外に出てくる。この一連の過程を溶菌サイクルという。

しかし、一般的にはファージは感染しても必ずしも宿主の菌を溶菌する訳ではない。 $\lambda$ （ラムダ）ファージは大腸菌に感染後、栄養状態が悪いと溶原サイクルという運命をたどることがある。溶原サイクルを選択すると、ファージゲノムDNAは大腸菌ゲノムDNAに組み込まれ、ほとんどのファージ遺伝子の発現は抑制されて子ファージを作ることはない。大腸菌ゲノムの中に組み込まれたファージゲノムは大腸菌ゲノムとともに複製され、分裂後の大腸菌に受け継がれていく。ファージゲノムが組み込まれた菌を溶原菌といい、溶原菌となることを溶原化とよぶ。あるファージで溶原化した大腸菌に同じタイプのファージを感染させても、子ファージを作らず、溶菌しない（問7）。しかし、溶原菌が再び、溶菌サイクルに入ることもある。そのスイッチとなるのが、宿主である溶原菌の“危機”である。たとえば、溶原菌に紫外線を照射したり、ある種の薬剤で処理したりすると、ファージゲノムの遺伝子が発現を始め、子ファージを作って溶菌する（問8）。

溶菌サイクルと溶原サイクルのどちらに進むかを定めるしくみは、ファージゲノムの一部のDNA配列とファージタンパク質との結合による転写制御とみることができる。図1に溶原サイクルと溶菌サイクルの調節に関わる遺伝子 $x$ 、 $y$ 、 $z$ の転写制御領域の模式図を示す。これらの遺伝子の転写はそれぞれ2つのプロモーター（P1、P2）と3つのオペレーター（O1、O2、O3）によって調節を受け、図に示すようにそれぞれ左方向、右方向に転写される。 $\lambda$ ファージの感染直後には、プロモーターP2から遺伝子 $y$ とともに遺伝子 $z$ が発現する。遺伝子 $x$ が指令するタンパク質Xは溶原菌状態の維持に関与し、遺伝子 $y$ が指令するタンパク質Yは溶菌サイクルの開始に関与する。遺伝子 $z$ が指令するタンパク質Zは大腸菌の栄養状態がよいと分解され、栄養状態が悪いと安定化する。タンパク質Zは遺伝子 $x$ の転写を誘導する別のプロモーターであるプロモーターP3からの転写に関与する（図1中には示していない）。

タンパク質Xは、図2に示すように特定のDNA配列に結合する構造（ドメインI）と二量体の形成に関わる構造（ドメインII）から成るダンベルのような構造をしており、二分子が結合した二量体を形成してオペレーターO1、O2、O3のそれぞれのDNA配列に結合する。タンパク質Xの単一分子（単量体）のDNA結合活性は非常に低い。また、ドメインIIは、二量体どうしの結合による四量体の形成も促進することが知られている。

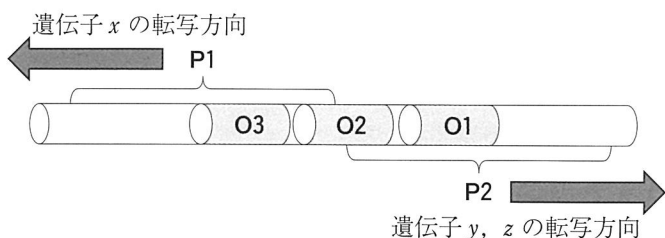


図1

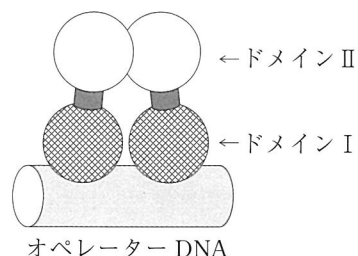


図2 タンパク質Xの模式図

遺伝子  $x$ ,  $y$ ,  $z$  がどのようにして溶菌サイクルと溶原サイクルの二つの運命を決定するのかを調べるために、以下の実験を行った。

**実験 1** 図 1 のオペレーターを含む DNA 断片とタンパク質 X を用いて DNA フットプリント法を行った。この方法は、ある決まった DNA 配列に結合するタンパク質と DNA との結合を調べることができる (図 3)。まず二本鎖 DNA 断片の一方の端を放射性同位元素で標識する。この DNA 断片と過剰量の精製したタンパク質とを結合させた後に、DNA 分解酵素 (DNase) を反応させる。DNase はほぼランダムに DNA を切断するが、タンパク質が結合したところは切断することができない。そのため、DNase による切断反応後の DNA を電気泳動すると、タンパク質と結合したところがあたかもフットプリント (足跡) のように抜ける。DNA フットプリント法を使うと、タンパク質が結合する DNA の領域がわかる。さらに、タンパク質の量を変化させてフットプリントをとることにより、DNase による分解から完全に保護できる最小量のタンパク質の量から DNA 結合活性を決めることができる。実際に、精製したタンパク質 X の量を増やしながらオペレーター DNA へのタンパク質 X の結合を調べたところ、図 4 の結果を得た。なお、図中の O1, O2, O3 は、それぞれのフットプリントがオペレーター O1, O2, O3 のいずれに該当するかを示している。この結果からタンパク質 X がオペレーター O1 に結合する活性を 100 としてオペレーター O2, O3 への結合活性を算出したところ、それぞれ 50, 4 となった。さらに、タンパク質 X が結合できない変異オペレーターや、二量体は形成するがドメイン II に変異があって四量体形成ができない変異タンパク質 X を用いて、それぞれのオペレーターに対する結合活性を測定し、表 1 の結果を得た。

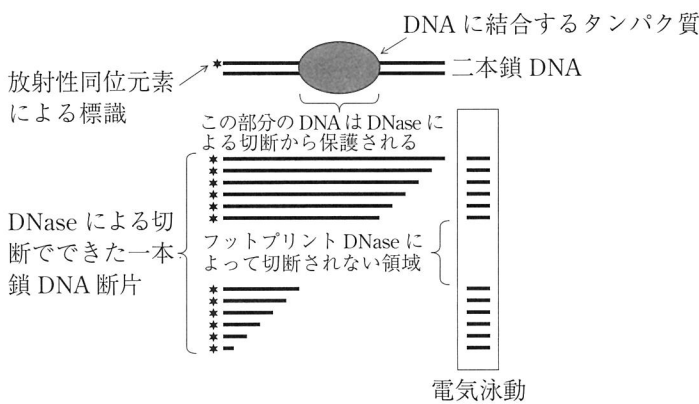


図 3 DNA フットプリント法

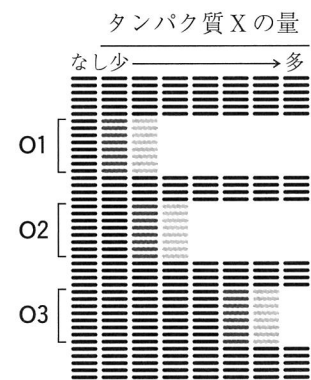


図 4 タンパク質 X の量を変化させたときの電気泳動の結果

DNA	野生型タンパク質 X			変異タンパク質 X		
	O3	O2	O1	O3	O2	O1
O	4	50	100	4	4	100
O1 <sup>-</sup>	20	20	—	4	4	—
O2 <sup>-</sup>	4	—	100	4	—	100
O1 <sup>-</sup> O2 <sup>-</sup>	4	—	—	4	—	—
O1 <sup>-</sup> O3 <sup>-</sup>	—	4	—	—	4	—

表 1

O は O1, O2, O3 ともに野生型のオペレーター, O1<sup>-</sup> は O1 にタンパク質 X が結合できない変異が入っていることを表す。タンパク質 X がオペレーター (O) の O1 に結合する活性を 100 とした相対値を示す。

**実験 2** プロモーター P1 と P2 の転写活性を測定するために、ある薬剤を加えるとその濃度に応じた量のタンパク質 X を発現する大腸菌を作製した。さらに、野生型のオペレーター O1, O2, O3 を含むプロモーター P1 もしくは P2 の配列に、ある酵素の遺伝子をつないだ人工遺伝子を作製し (図 5)、この大腸菌に組み込んだ。加える薬剤の濃度を変えて、この酵素の活性を指標としてプロモーターの転写活性を測定したところ、図 6 A の結果を得た。次に、オペレーター O1, O2, O3 のうちいずれか一つのみが野生型で、他の二つにはタンパク質 X が結合しない変異を入れたオペレーターを含むプロモーター P1, P2 の転写活性を調べ、それぞれ図 6 B ~ 図 6 D の結果を得た。

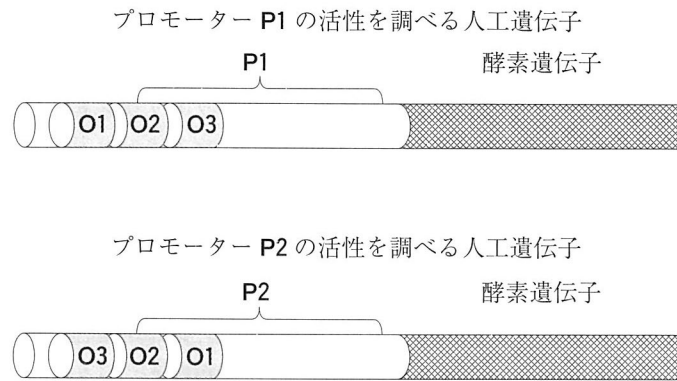
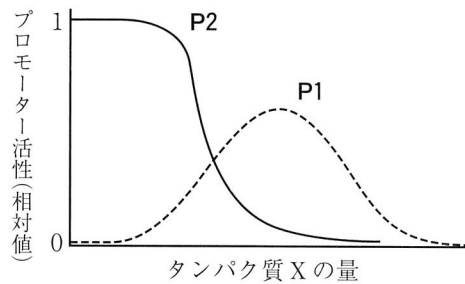
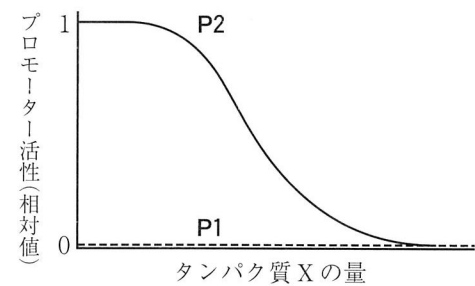


図 5

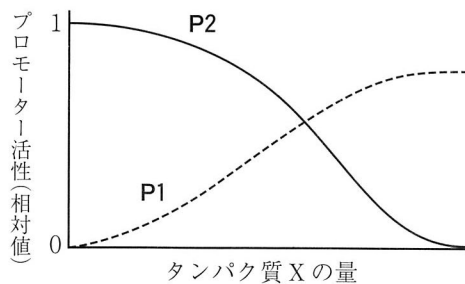
A オペレーター O1, O2, O3 がすべて野生型の場合



B オペレーター O1 のみ、野生型の場合



C オペレーター O2 のみ、野生型の場合



D オペレーター O3 のみ、野生型の場合

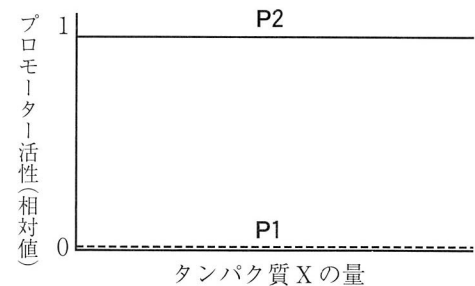


図 6

**実験 3** プロモーター **P3** からの転写におけるタンパク質 **Z** の役割を調べるために、フィルター結合実験を行った。この実験では、DNA は通過するが、タンパク質を吸着する特殊なフィルターを使用する。まず、プロモーター **P3**, **P3'** および **P0** を含む DNA 断片をそれぞれ放射性同位元素で標識した。プロモーター **P3'** はプロモーター **P3** に変異が入ったもので、この変異をもつファージは溶原化を誘導できない。プロモーター **P0** には RNA ポリメラーゼが結合する。これらのいずれかの標識 DNA と、RNA ポリメラーゼおよびタンパク質 **Z** をさまざまな組み合わせで混合し、一定時間後にこのフィルターに通し、フィルターに残った放射能を測定して表 2 の結果を得た。表中の値は、プロモーター **P0** を用いた場合にフィルターに残った放射能を 100 とした相対値で表している。表中の「-」は実験を行っていないことを表す。

タンパク質	プロモーター DNA		
	P3	P3'	P0
RNA ポリメラーゼのみ	2	2	100
RNA ポリメラーゼ+タンパク質 Z	80	4	-
タンパク質 Z のみ	2	2	-
タンパク質なし	2	2	2

表 2

- 問 1 下線部について、DNA と区別してタンパク質を標識するために用いた放射性同位元素を答えなさい (問 1-1)。また、その元素を含むアミノ酸を二つ答えなさい (問 1-2)。
- 問 2 図 4 から、タンパク質 X の量を増やすにつれて、タンパク質 X がオペレーター **O1**, **O2**, **O3** にどのような順序で結合するかを、“ $O1 > O2 = O3$ ” (**O1** に最初に結合し、**O2** と **O3** にはほぼ同時に結合する場合) のように答えなさい。
- 問 3 タンパク質 X のオペレーター **O3** への結合活性について、考えなさい。表 1 から **O1**<sup>-</sup> 型におけるタンパク質 X のオペレーター **O3** への結合活性は、**O1**<sup>-</sup>**O2**<sup>-</sup> 型と比較して、何倍強いかを答えなさい (問 3-1)。また、その理由を答えなさい (問 3-2)。**O** 型の場合は、タンパク質 X のオペレーター **O3** への結合活性の増強は見られない。この理由を答えなさい (問 3-3)。
- 問 4 図 6 A から、薬剤を加えることで大腸菌内に発現するタンパク質 X の量を増やしていくと、プロモーター **P1** と **P2** からの転写活性はそれぞれ、どのように変化するかを答えなさい (問 4-1)。図 6 B, 図 6 C, 図 6 D から、タンパク質 X がそれぞれのオペレーター配列に結合することによってプロモーター **P1** と **P2** からの転写はどのように調節されるか、促進する場合は「+」、抑制する場合は「-」、変化がない場合は「0」として解答用紙の表に記入しなさい (問 4-2)。
- 問 5 表 2 から、プロモーター **P3** からの転写におけるタンパク質 **Z** の役割を答えなさい。
- 問 6 ファージが感染した直後から溶原サイクルに入る過程において、プロモーター **P1**, **P2**, **P3** が遺伝子 *x*, *y*, *z* の発現をどのように調節するのかを答えなさい (問 6-1)。溶原菌の状態においてタンパク質 X はオペレーター **O1**, **O2**, **O3** のいずれに結合していると考えられるか、また、そう考えた理由を答えなさい (問 6-2)。

**問7** 下線部について、 $\lambda$ ファージで溶原化した雄の大腸菌と $\lambda$ ファージで溶原化していない雌の大腸菌が接合した場合（問7-1）と $\lambda$ ファージで溶原化していない雄の大腸菌と $\lambda$ ファージで溶原化した雌の大腸菌が接合した場合（問7-2）に、それぞれ雌の大腸菌が溶菌するかどうかを、溶菌する場合は「○」、溶菌しない場合は「×」で答えなさい。また、溶菌する場合はその理由を答えなさい（問7-3）。なお、大腸菌が接合すると、雄のゲノムDNAが雌に移動する。また、接合時の大腸菌の栄養状態はよいものとする。

**問8** 下線部について、溶原菌を紫外線で処理したところ、タンパク質XがドメインIとドメインIIをつなぐ領域で切断を受けることがわかった。溶菌サイクルに入る過程で遺伝子 $x$ の発現は抑制され、遺伝子 $y$ の発現は誘導されたが、タンパク質Xの切断がなぜこのような遺伝子発現の変化をもたらしたのか、考えられる理由を答えなさい。

[以下余白]