

令和 8 年度

九州大学大学院生物資源環境科学府

修士課程一般第 2 次入試問題

科目名 : 専門科目

専攻 : 生命機能科学

教育コース : 生物機能分子化学

研究分野 : 水族生化学

#### 注意

1. 「解答はじめ」の合図があるまで問題用紙を開いてはいけません。
2. 問題用紙は 7 枚（表紙を含む）あります。試験開始後、まず、すべての用紙がそろっていることを確認しなさい。
3. 解答のスペースが足りないときには、裏を使用しなさい。

第一志望研究分野	受験番号	氏名
水族生化学分野		

問題 問1～7に解答しなさい。

問1. DNAを溶解する緩衝液として、TE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)が汎用される。EDTAを加える意味を説明しなさい。

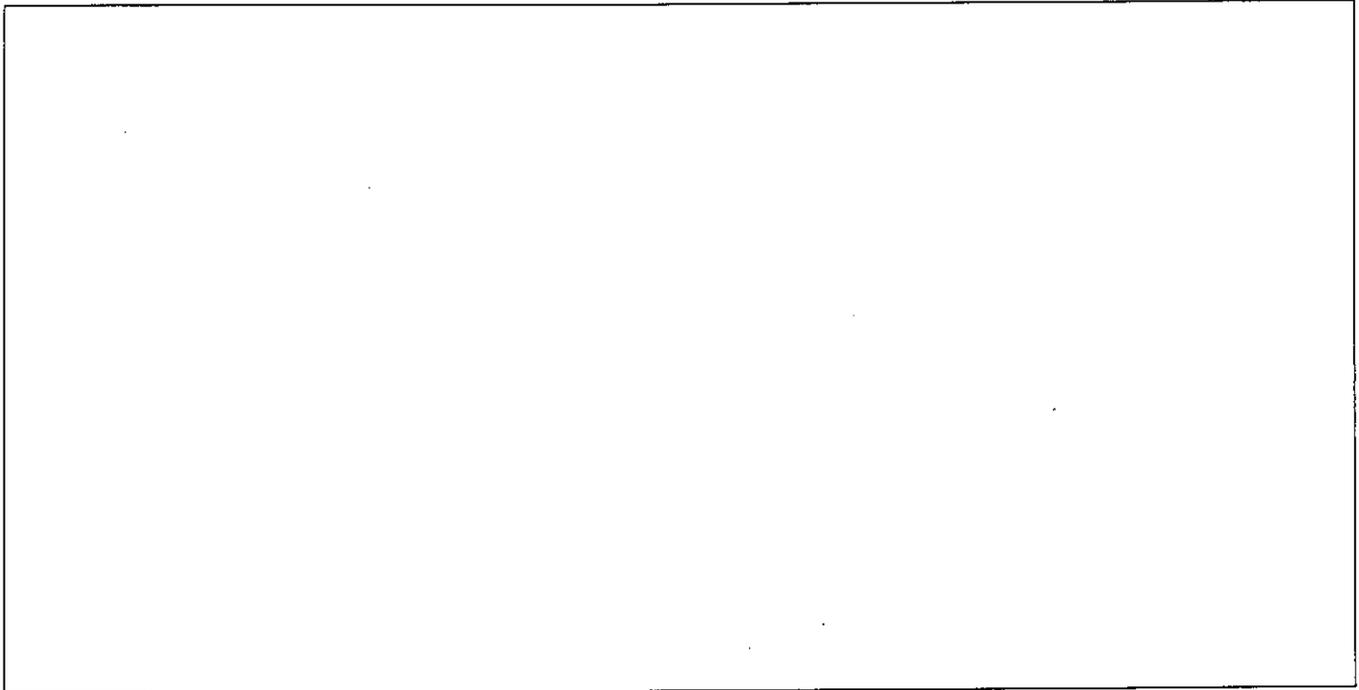
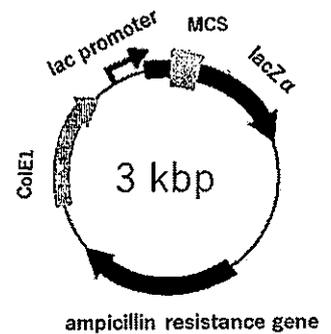
問2. C5-NTRと名付けた組換えタンパク質を、大腸菌を宿主として発現させた。この組換えタンパク質(recombinant C5-NTR、rC5-NTRと略す)のN末端側には6xHis tagが付加してある。rC5-NTRは171アミノ酸残基から構成されており、そのアミノ酸配列は下記のとおりである。また、分子量は19724、 $pI=6.05$ である。下記の(1)～(4)に答えなさい。

MNHKVVHHHHHHIEGRHMELEAECNFKSTIDPKITAVQRKNDMC  
 KESMNYAFKVLIESSEAGGDFVTYKAKVKAVLMKGQTDLLKTD  
 SEIDLKVKATCSSTNFEVKGQYLIMTAESIKIRMNRYKYKFP  
 LDSRAWVDWWPLDTCRDDACIQYANVLGEFESDFVLFQCED

- (1)このrC5-NTRタンパク質を発現させた大腸菌から、rC5-NTRを特異的に検出したい。どのような実験を行えばよいか、手法名とその内容を簡潔に説明しなさい。
- (2)rC5-NTRを発現させた大腸菌を破碎して得た抽出液から、rC5-NTRをアフィニティークロマトグラフィーで効率よく精製したい。その方法を概説しなさい。
- (3)精製されたrC5-NTR溶液の濃度は、280 nmにおける吸光度( $A_{280}$ 、光路長1 cm)を測定すると正確に求められる。今、 $A_{280}=0.85$ を示すrC5-NTR溶液の濃度をmg/mLで答えなさい。ただし、下記のモル吸光係数 $\epsilon_M$ ( $A_{280}/\text{mol}/\text{cm}$ )を利用しなさい。  
 トリプトファン： $\epsilon_M=5500$ 、チロシン： $\epsilon_M=1490$   
 ※ジスルフィド結合も若干の $A_{280}$ を示すが、ここでは無視する。
- (4)rC5-NTRを臭化シアン(CNBr)で分解してえられるペプチドのうち、最も分子量が大きなペプチドのアミノ酸配列を、1文字標記でN末端から10残基答えなさい。

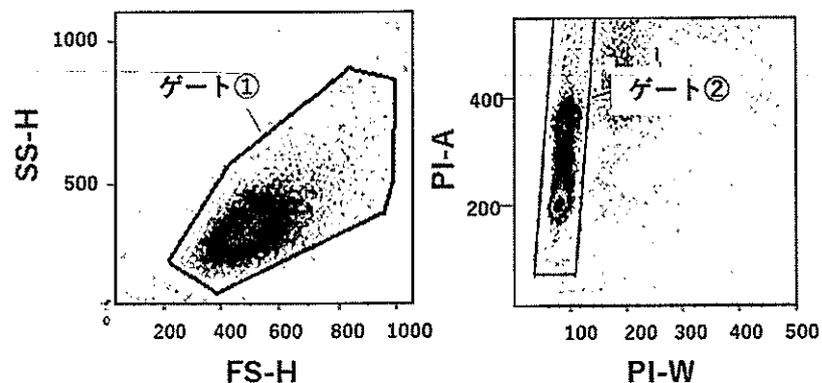
問題番号	解答欄
(1)	
(2)	
(3)	
(4)	

問3. 下図は典型的なクローニング用プラスミドベクターの構成要素を示す。  
ampicillin resistance gene と lacZα gene の役割を概説しなさい。



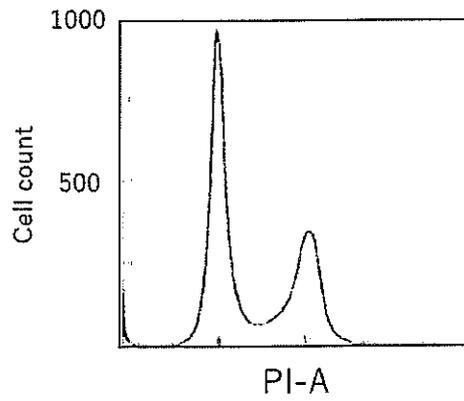
問4. 細胞周期に関する以下の問いに答えなさい。

- (1) 真核細胞の細胞周期は4期に分けられる。この4期の名称(略称可)とそのときの細胞の状態を記載した細胞周期を円状に図示しなさい。時間軸は時計回りとする。
- (2) フローサイトメトリーによって、細胞周期を解析することができる。細胞試料を Propidium Iodide (PI) で染色したのち、フローサイトメトリーに供試し、下図のように細胞をゲーティングした。①と②にゲーティングした目的をそれぞれ述べなさい。



(SS-H: Side scatter-Height, FS-H: Forward scatter-Height, PI-A: PI- Area, PI-W: PI-Width)

(3) 下図は、(2)でゲートをした細胞群の PI の蛍光強度を示した図である。細胞周期の 4 期がそれぞれ、図のどの部分に該当するか解答欄の図上に示しなさい。また、そのように示した理由を説明しなさい。



問題番号	解答欄	
(1)		
(2)	ゲート①	
	ゲート②	
(3)		理由

問5. 補体の活性化によって生じるアナフィラトキシンとは何か？その主な働きを説明しなさい。

問6. 血液細胞の組成について、硬骨魚類と哺乳類を比較して、異なる点を2つ挙げて概説しなさい。

問7. 2025年のノーベル医学生理学賞は、「末梢性免疫寛容に関する発見」に貢献した①、メアリー・E・ブランコウ、およびフレッド・ラムズデルの3氏に授与された。①は、表面に②を発現するT細胞が自己免疫疾患のマウスで免疫の暴走を抑えていることを突き止めた。この発見によって、中枢だけではなく末梢においても自己免疫を抑える仕組みがあり、②陽性T細胞である制御性T細胞がその主要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、同氏らは、③が制御性T細胞の発生、分化や機能に重要な「マスター転写因子」であることを発見した。④、②、③は、制御性T細胞を同定・解析するためのマーカーセットとして利用されている。

(1) ①～④に適切な語句を記入しなさい。

(2) 自己免疫疾患を対象とした制御性T細胞を用いた治療法の確立が期待されている。同細胞を利用した治療法は、従来の治療法と比較して、どのような点で優れていると考えられるか。150程度で述べなさい。

(3) 硬骨魚類における制御性T細胞の存在を示唆する研究例を挙げ、その内容を説明しなさい。

問題番号	解答欄			
(1)	①	②	③	④
(2)				
(3)				

令和 8 年度

九州大学大学院生物資源環境科学府

修士課程一般第 2 次入試解答例

科目名 : 専門科目

専攻 : 生命機能科学

教育コース : 生物機能分子化学

研究分野 : 水族生化学

第一志望研究分野	受験番号	氏名
水族生化学分野		

問題 問 1～7に解答しなさい。

問1. DNA を溶解する緩衝液として、TE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)が汎用される。EDTA を加える意味を説明しなさい。

DNA に働く様々な酵素(エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、DNA ポリメラーゼなど)は一般的に  $Mg^{2+}$  イオンを要求する。これらの酵素による目的 DNA の加水分解などを防止するために、 $Mg^{2+}$  などの2価陽イオンをキレート除去できる EDTA を加える。

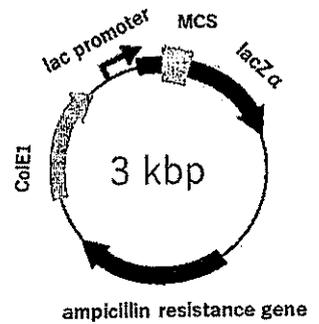
問2. C5-NTR と名付けた組換えタンパク質を、大腸菌を宿主として発現させた。この組換えタンパク質 (recombinant C5-NTR、rC5-NTR と略す) の N 末端側には 6xHis tag が付加してある。rC5-NTR は 171 アミノ酸残基から構成されており、そのアミノ酸配列は下記のとおりである。また、分子量は 19724、 $pI=6.05$  である。下記の(1)～(4)に答えなさい。

```
MNHKVVHHHHHHIEGRHMELEAECNFKSTIDPKITAVQRKNDMC
KESMNYAFKVLIESSEAGGDFVITYKAKVKAVLMKGQTDLDLKT
SEIDLKVKATCSSTNFEVVGKQYLIMTAESIKIRMNRYKYKFP
LDSRAWVDWWPLDTCRDDACIQYANVLGEFESDFVLFVGCED
```

- (1)この rC5-NTR タンパク質を発現させた大腸菌から、rC5-NTR を特異的に検出したい。どのような実験を行えばよいか、手法名とその内容を簡潔に説明しなさい。
- (2)rC5-NTR を発現させた大腸菌を破碎して得た抽出液から、rC5-NTR をアフィニティークロマトグラフィーで効率よく精製したい。その方法を概説しなさい。
- (3)精製された rC5-NTR 溶液の濃度は、280 nm における吸光度( $A_{280}$ 、光路長 1 cm)を測定すると正確に求められる。今、 $A_{280}=0.85$  を示す rC5-NTR 溶液の濃度を mg/mL で答えなさい。ただし、下記のモル吸光係数  $\epsilon_M$  ( $A_{280}/\text{mol}/\text{cm}$ )を利用しなさい。  
トリプトファン： $\epsilon_M=5500$ 、チロシン： $\epsilon_M=1490$   
※ジスルフィド結合も若干の  $A_{280}$  を示すが、ここでは無視する。
- (4)rC5-NTR を臭化シアン(CNBr)で分解してえられるペプチドのうち、最も分子量が大きなペプチドのアミノ酸配列を、1文字標記で N 末端から 10 残基答えなさい。

問題番号	解答欄
(1)	6xHis タグが付加されているので、His タグに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングによって rC5-NTR を特異的に検出することができる。
(2)	Ni <sup>2+</sup> イオンや Co <sup>2+</sup> イオンを配位結合で固定化したクロマトグラフィー担体を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行う。6xHis タグは、これらイオンに強く配位結合する。結合しなかった目的外のタンパク質を洗浄・除去した後、担体にイミダゾールを含む緩衝液を加えると、イミダゾールが His 残基の側鎖と競合して、結合している rC5-NTR を担体から脱離・溶出させることができる。
(3)	rC5-NTR には、3残基のトリプトファンと、6残基のチロシンが含まれる。したがって、rC5-NTR のモル吸光係数は、 $5500 \times 3 + 1490 \times 6 = 16500 + 8940 = 25440$ である。 よって、 $A_{280} = 0.85$ の rC5-NTR 溶液のモル濃度は、 $0.85 / 25440 = 3.34 \times 10^{-5}$ mol/L。 したがって、求める濃度は、 $3.34 \times 10^{-5} \times 19724 = 0.66$ g/L (mg/mL) である。
(4)	臭化シアンは、メチオニン残基の C 末端側のペプチド結合を特異的に切断する。もっとも分子量の大きな断片の N-末端アミノ酸配列 (10 残基) は、NRGYKYKFPL である。

問3. 下図は典型的なクローニング用プラスミドベクターの構成要素を示す。  
ampicillin resistance gene と lacZα gene の役割を概説しなさい。

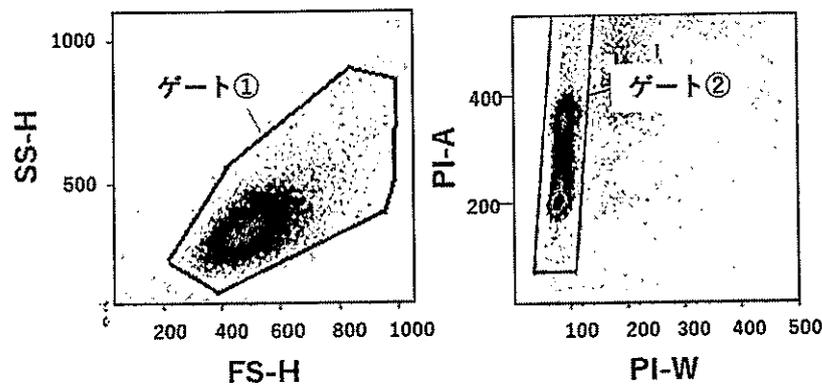


Ampicillin resistance gene は、抗生物質の ampicillin を分解する酵素(βラクタマーゼ)をコードしている。形質転換処理した大腸菌を ampicillin 存在下で培養すると、このベクターを取り込んだ大腸菌だけが ampicillin を分解して生育できるので、実際に形質転換された菌だけを選択的に培養できる。

lacZα gene は、βガラクトシダーゼの一部をコードする遺伝子である。このクローニングベクターのクローニングサイトにインサート DNA が挿入されていないと、βガラクトシダーゼが発現し、βガラクトシダーゼで加水分解されると青色に発色する基質を加えた培地上で、形質転換された大腸菌が青色を呈する。一方、インサート DNA がクローニングサイトに挿入されていると、lacZα の配列が、βガラクトシダーゼとは無関係の配列によって分断されるので、活性をもつ βガラクトシダーゼが発現されない。したがって、発色基質の存在下でも、白いコロニーが生育する。このように、青色・白色のコロニーによって、インサートを含むベクターで形質転換された菌のコロニーを簡単に見分けることができる。

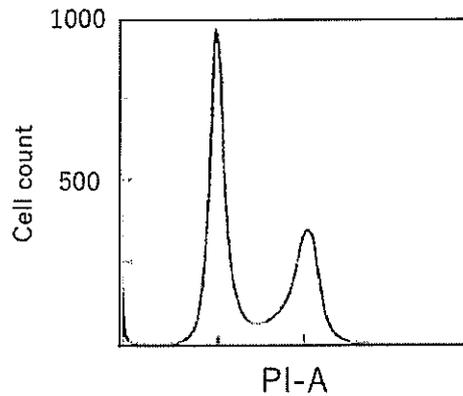
問4. 細胞周期に関する以下の問いに答えなさい。

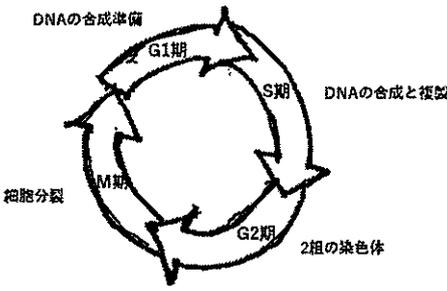
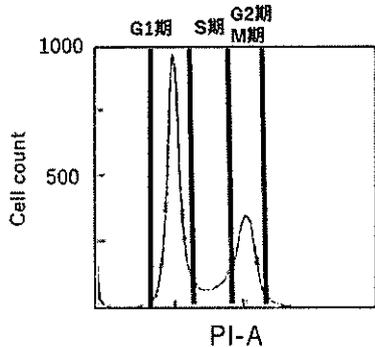
- (1) 真核細胞の細胞周期は4期に分けられる。この4期の名称(略称可)とそのときの細胞の状態を記載した細胞周期を円状に図示しなさい。時間軸は時計回りとする。
- (2) フローサイトメトリーによって、細胞周期を解析することができる。細胞試料を Propidium Iodide (PI) で染色したのち、フローサイトメトリーに供試し、下図のように細胞をゲーティングした。①と②にゲーティングした目的をそれぞれ述べなさい。



(SS-H: Side scatter-Height, FS-H: Forward scatter-Height, PI-A: PI- Area, PI-W: PI-Width)

(3) 下図は、(2)でゲートをした細胞群のPIの蛍光強度を示した図である。細胞周期の4期がそれぞれ、図のどの部分に該当するか解答欄の図上に示しなさい。また、そのように示した理由を説明しなさい。



問題番号	解答欄	
(1)		
(2)	<p>ゲート① X軸の前方散乱光とY軸の側方散乱光から、細胞の大きさと内部の複雑さを推定することで、試料中の解析対象の細胞を選定する。(死んだ細胞片や死細胞を解析対象から外す。)</p> <p>ゲート② X軸をPIシグナルのパルス幅、Y軸をPIシグナルのパルス面積値とする散布図に展開することで、単一に分離された細胞の集団のみを解析対象として選定する。(複数の細胞の集まった細胞塊を解析対象から外す。)</p>	
(3)		<p>理由</p> <p>DNA量に対する細胞数をプロットすると、S期でDNAが2倍に複製されるので、G1期のピーク(2n)、S期の遷移領域、G2/M期のピーク(4n)が明確に現れる。</p>

問5. 補体の活性化によって生じるアナフィラトキシンとは何か？その主な働きを説明しなさい。

補体成分 C3 や C5 の活性化によって、それぞれの  $\alpha$  鎖の N 末端から遊離される、74~75 残基の小フラグメント (C3a および C5a) である。白血球の誘引作用、平滑筋の収縮作用、血管透過性の亢進などを引き起こし、炎症反応を惹起する。

問6. 血液細胞の組成について、硬骨魚類と哺乳類を比較して、異なる点を2つ挙げて概説しなさい。

- ・哺乳類の赤血球は無核であるが、魚類赤血球は有核細胞である。
- ・哺乳類には血液凝固を媒介する細胞性成分として、巨核球の断片である血小板が存在するが、魚類で血小板と同様の働きをするのは、有核の栓球である。

問7. 2025 年のノーベル医学生理学賞は、「末梢性免疫寛容に関する発見」に貢献した①、メアリー・E・ブランコウ、およびフレッド・ラムズデルの3氏に授与された。①は、表面に②を発現する T 細胞が自己免疫疾患のマウスで免疫の暴走を抑えていることを突き止めた。この発見によって、中枢だけではなく末梢においても自己免疫を抑える仕組みがあり、②陽性 T 細胞である制御性 T 細胞がその主要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、同氏らは、③が制御性 T 細胞の発生、分化や機能に重要な「マスター転写因子」であることを発見した。④、②、③は、制御性 T 細胞を同定・解析するためのマーカーセットとして利用されている。

(1) ①~④に適切な語句を記入しなさい。

(2) 自己免疫疾患を対象とした制御性 T 細胞を用いた治療法の確立が期待されている。同細胞を利用した治療法は、従来の治療法と比較して、どのような点で優れていると考えられるか。150程度で述べなさい。

(3) 硬骨魚類における制御性 T 細胞の存在を示唆する研究例を挙げ、その内容を説明しなさい。

問題番号	解答欄			
(1)	① 坂口志文	② CD25	③ FOXP3	④ CD4
(2)	自己免疫疾患の治療で使われている免疫抑制剤は、免疫反応全体を抑えるため、様々な感染症などにもかかりやすくなるが、特定の抗原に対する制御性 T 細胞を誘導、作出することができれば、特定の自己免疫疾患のみを対象とした治療法の確立が期待できる。			
(3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・フグにおいて、CD4+CD25+FOXP3+T 細胞が発見されている。</li> <li>・ゼブラフィッシュにおいて、FOXP3 が適応自己免疫の制御や免疫寛容に必須の分子であることが示されている。</li> </ul>			

令和 8 年度

九州大学大学院生物資源環境科学府

修士課程一般第 2 次入試出題意図

科目名 : 専門科目

専攻 : 生命機能科学

教育コース : 生物機能分子化学

研究分野 : 水族生化学

## 出題意図（水族生化学）

### 問1

水族生化学分野において研究を実施するために必要な基本的な生化学・分子生物学の知識を備えているかを問うため。

### 問2

水族生化学分野において研究を実施するために必要な基本的な生化学・分子生物学の知識を備えているかを問うため。

### 問3

水族生化学分野において研究を実施するために必要な基本的な生化学・分子生物学の知識を備えているかを問うため。

### 問4

水族生化学分野において研究を実施するために必要な基本的な細胞生物学の知識を備えているかを問うため。

### 問5

水族生化学分野において研究を実施するために必要な魚類の免疫系に関する基礎知識を備えているかを問うため。

### 問6

水族生化学分野において比較免疫学研究を行うために必要な基礎的な免疫学の知識を有しているかを問うため。

### 問7

水族生化学分野において比較免疫学研究を行うために必要な基礎的な免疫学の知識を有しているかを問うため。