

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題 1. 制限酵素について以下の問いに答えよ。(20点)

問 1. 自然界における制限酵素の役割について解答せよ。

問 2. 制限酵素 EcoRI は大腸菌 RY13 株から発見され、GAATTC の回文配列を認識する。大腸菌のゲノムが約 4,600,000 bp から成るものとする、制限酵素 EcoRI の認識配列は大腸菌ゲノム内に何個あると推定されるか計算式とともに解答せよ。ただし、大腸菌ゲノムの塩基組成および塩基配列に偏りが無いものと仮定する。

問 3. 制限酵素 EcoRI を保有する大腸菌 RY13 株が自身のゲノム DNA を切断することはない。その仕組みを解答せよ。

解答は以下に記述 (足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題2. 核酸に関する以下の問いに答えよ。(25点)

- 問1. RNAを構成する塩基はアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルである。一方、DNAはウラシルの代わりにチミンが構成因子となっている。ウラシルとチミンの化学構造を記述せよ。
- 問2. 問1に関して、仮に、RNAと同様、DNAがチミンではなくウラシルから構成されていたとすると、生物学的にどのような不都合があると考えられるか解答せよ。
- 問3. RNAは塩基性条件において加水分解されやすい。塩基性条件においてRNAが加水分解されるしくみを記述せよ。その際、RNAの化学構造も図示しながら化学反応を論ぜよ。

解答は以下に記述 (足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題3. 原核生物の RNA 合成に関する以下の問いに答えよ. (30点)

- 問1. 原核生物の RNA ポリメラーゼホロ酵素とコア酵素では, それぞれそれらを構成するサブユニット (因子) の組成が異なる. それぞれどのようなサブユニットから構成されているか解答せよ.
- 問2. 問1に関して, ホロ酵素は RNA 合成におけるどの段階で機能する酵素であるのか解答せよ.
- 問3. 問2に関して, その機能を発揮するのに重要なサブユニット (因子) の名前を解答せよ.
- 問4. 問3に関して, そのサブユニット (因子) の役割について以下のキーワードを全て使用して解答せよ.
キーワード: プロモーター, -10 領域, -35 領域, 転写バブル, 鋳型鎖 (センス鎖), 非鋳型鎖 (アンチセンス鎖)
- 問5. RNA 鎖が伸長する際に, DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼが不可欠である. その理由を解答せよ.
- 問6. 原核生物の RNA 合成が終結するしくみとして内在性ターミネーターによる転写終結機構が存在する. 以下の DNA 配列は内在性ターミネーターをコードする転写終結配列として機能する. どのようなしくみで転写が終結するのか図示しながら解答せよ.

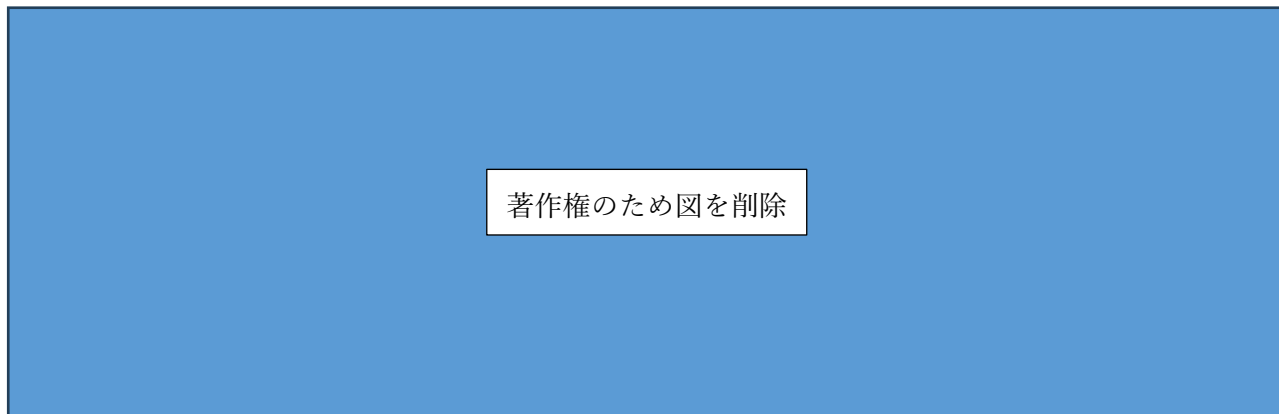
5' -CAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTTTATCTGGGC-3' (非鋳型鎖)
3' -GTTTCGGGCGGCTTTCCGCCCGAAAAGAAATAGACCCG-5' (鋳型鎖)

解答は以下に記述 (足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題 4. タンパク質の合成に関する以下の問いに答えよ。(25点)

問 1. 一つの tRNA が複数の同義コドンを認識できるしくみについて、以下のリボソームデコーディングセンターの立体構造に基づき化学的および構造学的な観点から解答せよ。



図の説明：リボソームにおけるコドン-アンチコドン相互作用

Thermus thermophilus の 30S サブユニット，UUUUUU（モデル mRNA）および tRNA^{Phe}（アンチコドンは GAA）のアンチコドンアームとの複合体の結晶構造中のコドン 1 字目（左），2 字目（中央），3 字目（右）のコドン-アンチコドン塩基対を示す。構造は半透明の表面モデルとスティックモデルを組合わせて表示した。コドンは青，アンチコドンは黄，rRNA は赤茶またはグレー，炭素以外の原子は，窒素：青，酸素：赤，リン：緑に色分けした。タンパク質部分はグレー，Mg²⁺は紫の球で表示した。

問 2. リボソームは正しくタンパク質合成を遂行するために、正しいコドンとアンチコドンの対合を監視するという校正機構をもっている。リボソームが誤ったアンチコドンをもった tRNA を排除するしくみについて解答せよ。

問 3. アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) によるアミノ酸特異性および tRNA 特異性は極めて高い。つまり、各アミノ酸に対応した 20 種類ある ARS は、それぞれに対応するアミノ酸と tRNA だけを特異的に認識しアミノアシル化反応を触媒する。ARS が有するこの高い特異性は生物にとって極めて重要である。この理由を解答せよ。

解答は以下に記述（足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする）

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題 1. 制限酵素について以下の問いに答えよ。(20点)

問 1. 自然界における制限酵素の役割について解答せよ。

問 2. 制限酵素 EcoRI は大腸菌 RY13 株から発見され、GAATTC の回文配列を認識する。大腸菌のゲノムが約 4,600,000 bp から成るものとする、制限酵素 EcoRI の認識配列は大腸菌ゲノム内に何個あると推定されるか計算式とともに解答せよ。ただし、大腸菌ゲノムの塩基組成および塩基配列に偏りが無いものと仮定する。

問 3. 制限酵素 EcoRI を保有する大腸菌 RY13 株が自身のゲノム DNA を切断することはない。その仕組みを解答せよ。

解答は以下に記述 (足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

解答例

問 1. 制限酵素は細菌がもつ塩基配列特異的な DNA エンドヌクレアーゼであり、ウイルス(バクテリオファージ)の DNA を認識して切断することにより不活化し、ウイルス感染を防ぐという役割がある。

問 2. GAATTA 配列は、 $4^6=4096$ 塩基対に一回の頻度で出現する。大腸菌ゲノムが 4,600,000 bp であるため、 $4,600,000 \div 4096=1123$ となる。したがって、大腸菌ゲノム内に 1123 カ所存在する。

問 3. 制限酵素 EcoRI が標的とする DNA 配列は、EcoRI メチラーゼによりメチル化修飾されている。このメチル化修飾により、立体障害のため制限酵素 EcoRI は標的 DNA に結合できなくなる。つまり、メチル化修飾のため、大腸菌自身のゲノム DNA は制限酵素 EcoRI から保護され切断することはない。

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

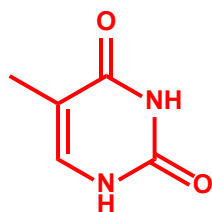
問題2. 核酸に関する以下の問いに答えよ。(25点)

- 問1. RNAを構成する塩基はアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルである。一方、DNAはウラシルの代わりにチミンが構成因子となっている。ウラシルとチミンの化学構造を記述せよ。
- 問2. 問1に関して、仮に、RNAと同様、DNAがチミンではなくウラシルから構成されていたとすると、生物学的にどのような不都合があると考えられるか解答せよ。
- 問3. RNAは塩基性条件において加水分解されやすい。塩基性条件においてRNAが加水分解されるしくみを記述せよ。その際、RNAの化学構造も図示しながら化学反応を論ぜよ。

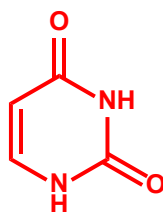
解答は以下に記述(足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

解答例

問1.

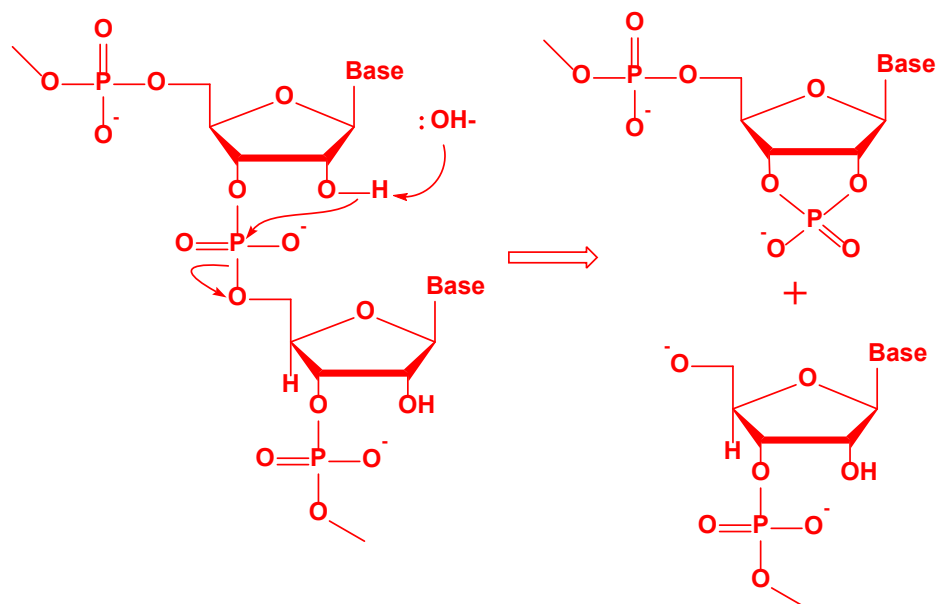


□□□



□□□□

- 問2. DNAを構成するシトシン(C)は、非酵素的に容易に脱アミノ化されウラシル(U)に変換される。もし、生物がTではなくUをDNAの構成成分として使用していると仮定すると、生物はCが脱アミノ化されて生成したUと、もともと遺伝情報としてコードされていたUを区別することができない。つまり、Cが脱アミノ化されて生成したUはG-U塩基対を形成することになるが、このUが、(i)Cが脱アミノ化されたものなのか、(ii)もともとのUなのか区別がつかない。遺伝情報を維持するためには、(i)の場合、UをCに修復することになるが、(ii)の場合は、GをAに修復することになる。しかしながら、(i)と(ii)の違いを生物は区別することができない。このように、仮にDNAがTではなくUで構成されていると、変異を正しく修復できず遺伝情報を正確に維持することができないという不都合が生じる。
- 問3. 塩基性条件下では水酸化物イオン(OH⁻)がRNAのリボースの2'-OH基を求核攻撃する。つまり、リボースの2'-OH基は脱プロトン化されやすい特徴を有している。いったん脱プロトン化されると、これが隣接リン原子を求核攻撃してRNAの糖とリン酸との間の結合を切断する。加水分解の結果、2',3'-環状リン酸基と5'-OH基をもった鎖に切断される。2',3'-環状リン酸基はさらに、2'もしくは3'にリン酸基をもったヌクレオチドに加水分解される。下の図では、塩基触媒により脱プロトン化したリボースの2'位が隣接するリン原子を求核攻撃してリン酸エステル結合を分解する反応を示した。



第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題3. 原核生物の RNA 合成に関する以下の問いに答えよ. (30点)

- 問1. 原核生物の RNA ポリメラーゼホロ酵素とコア酵素では, それぞれそれらを構成するサブユニット (因子) の組成が異なる. それぞれどのようなサブユニットから構成されているか解答せよ.
- 問2. 問1に関して, ホロ酵素は RNA 合成におけるどの段階で機能する酵素であるのか解答せよ.
- 問3. 問2に関して, その機能を発揮するのに重要なサブユニット (因子) の名前を解答せよ.
- 問4. 問3に関して, そのサブユニット (因子) の役割について以下のキーワードを全て使用して解答せよ.
キーワード: プロモーター, -10 領域, -35 領域, 転写バブル, 鋳型鎖 (センス鎖), 非鋳型鎖 (アンチセンス鎖)
- 問5. RNA 鎖が伸長する際に, DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼが不可欠である. その理由を解答せよ.
- 問6. 原核生物の RNA 合成が終結するしくみとして内在性ターミネーターによる転写終結機構が存在する. 以下の DNA 配列は内在性ターミネーターをコードする転写終結配列として機能する. どのようなしくみで転写が終結するのか図示しながら解答せよ.

5' -CAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTTTATCTGGGC-3' (非鋳型鎖)
3' -GTTTCGGGCGGCTTTCGCCCGAAAAGAAATAGACCCG-5' (鋳型鎖)

解答は以下に記述 (足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

解答例

- 問1. コア酵素: 二つの α サブユニット, そして一つずつの β , β' , ω サブユニットから構成されている.
ホロ酵素: 二つの α サブユニット, そして一つずつの β , β' , ω , σ サブユニットから構成されている.
- 問2. 転写の開始段階
- 問3. σ サブユニット (σ 因子)
- 問4. RNA ポリメラーゼのホロ酵素に含まれる σ 因子はプロモーター領域を特異的に認識する. つまり, σ 因子の働きにより RNA ポリメラーゼがプロモーターと結合して転写反応を開始できるようになる. プロモーターには-10 領域および-35 領域と呼ばれる保存されたコンセンサス配列があり, σ 因子はこれらコンセンサス配列を認識してプロモーターと結合する. σ 因子とプロモーターとの相互作用により, 二本鎖 DNA が開裂して転写バブルを形成する. 非鋳型鎖は σ 因子と結合し, 鋳型鎖は RNA ポリメラーゼの活性部位に配置され, RNA 合成の開始に適した構造をとる.
- 問5. RNA の合成とともに転写バブルも RNA ポリメラーゼの前方に進行する. 転写バブルがらせんを巻いた二本鎖 DNA を押し進むと進行方向の前方は巻がきつくなり正のスーパーコイルが生じる. 一方, 後方は DNA がほどけて負のスーパーコイルが生じる. 転写中の DNA のスーパーコイルの度合いが適当でないと転写が停止してしまう. このスーパーコイルを DNA ジャイレースおよびトポイソメラーゼが解消す

る。したがって、転写伸長反応の遂行には DNA ジャイレースとトポイソメラーゼが不可欠である。

問 6. 問の DNA 配列および RNA ポリメラーゼによりその DNA 配列から転写されている RNA の模式図を以下に示す。

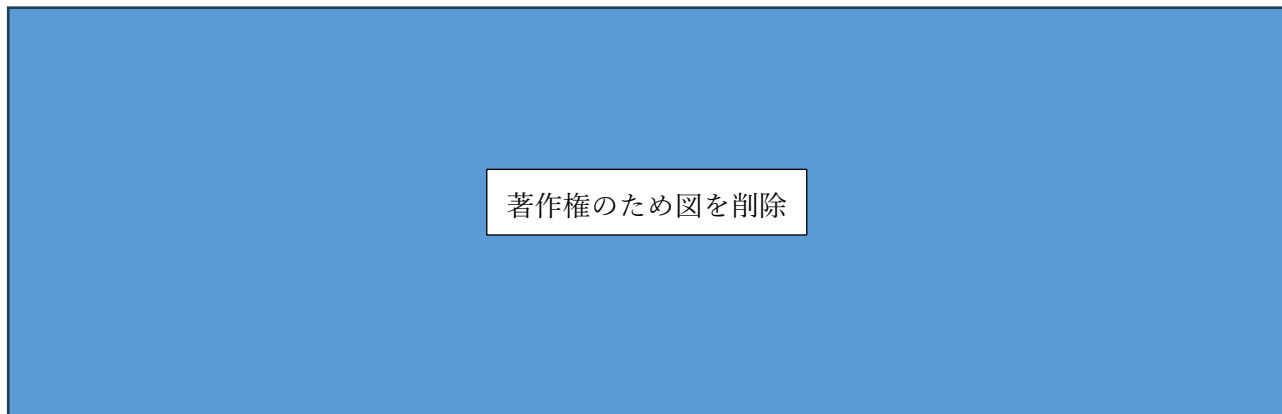


転写終結配列には GC リッチな回文配列の後に連続した数個の A-T 塩基対が続く。この A-T 塩基対の A は鋳型鎖に存在し、転写された RNA はこの配列もしくはこの配列を通過した直後に終結する。この領域が転写された RNA は内在性ターミネーターとよばれ、GC リッチな自己相補的なヘアピン構造を形成して、これに連続した U が続く。GC リッチなヘアピンは RNA ポリメラーゼを転写終結部位で足止めする。その結果、RNA ポリメラーゼの構造が変化し、非鋳型鎖 DNA が鋳型鎖に弱く結合したオリゴ U を追い出し、自発的に転写が終結する。

第一志望研究分野	受験番号	氏 名

問題 4. タンパク質の合成に関する以下の問いに答えよ。(25点)

問 1. 一つの tRNA が複数の同義コドンを認識できるしくみについて、以下のリボソームデコーディングセンターの立体構造に基づき化学的および構造学的な観点から解答せよ。



図の説明：リボソームにおけるコドン-アンチコドン相互作用

Thermus thermophilus の 30S サブユニット、UUUUUU (モデル mRNA) および tRNA^{Phe} (アンチコドンは GAA) のアンチコドンアームとの複合体の結晶構造中のコドン 1 字目 (左), 2 字目 (中央), 3 字目 (右) のコドン-アンチコドン塩基対を示す。構造は半透明の表面モデルとスティックモデルを組合わせて表示した。コドンは青, アンチコドンは黄, rRNA は赤茶またはグレー, 炭素以外の原子は、窒素：青, 酸素：赤, リン：緑に色分けした。タンパク質部分はグレー, Mg²⁺は紫の球で表示した。

問 2. リボソームは正しくタンパク質合成を遂行するために、正しいコドンとアンチコドンの対合を監視するという校正機構をもっている。リボソームが誤ったアンチコドンをもった tRNA を排除するしくみについて解答せよ。

問 3. アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) によるアミノ酸特異性および tRNA 特異性は極めて高い。つまり、各アミノ酸に対応した 20 種類ある ARS は、それぞれに対応するアミノ酸と tRNA だけを特異的に認識しアミノアシル化反応を触媒する。ARS が有するこの高い特異性は生物にとって極めて重要である。この理由を解答せよ。

解答は以下に記述 (足りない場合には裏面を使用すること 図を用いた説明も可とする)

解答例

問 1. 一つの tRNA が同義コドンを認識できるのは、mRNA のコドン 3 字目と tRNA のアンチコドン 1 字目との間の揺らぎ塩基対が許容されるからである。

左図は、コドン 1 字目とアンチコドン 3 字目とのワトソン・クリック型の塩基対合とそれを安定化する 30S rRNA の A1493 との相互作用を示している。コドン 1 字目とアンチコドン 3 字目との塩基対の副溝

に A1493 が結合して安定化する。この相互作用によりこの部位にはワトソン・クリック型の塩基対合しか許容されない。

中央の図は、コドン 2 字目とアンチコドン 2 字目とのワトソン・クリック型の塩基対合とそれを安定化する 30S rRNA の A1492 および G530 との相互作用を示している。この部位でも、rRNA のこれらヌクレオチドが塩基対の副溝を安定化しており、ワトソン・クリック型の塩基対合しか許容されない。

右図は、コドン 3 字目とアンチコドン 1 字目の対合およびそれと相互作用している G530 を示している。この部位において、rRNA の G530 は塩基対の副溝と接触しており、ある程度の安定化に関与する。しかし、左および中央の図とは異なり、副溝側のスペースは G530 によって完全に占有されていない。つまり、この部位において塩基対合と G530 の相互作用は上記の二つほど緊密ではない。このため、コドン 3 字目とアンチコドン 1 字目の対合はワトソン・クリック型だけでなく非ワトソン・クリック型（揺らぎ塩基対）も許容される。これが、一つの tRNA が複数の同義コドンを認識できるしくみである。

問 2. G タンパク質である EF-Tu は GTP 結合型でアミノアシル tRNA と 3 成分複合体を形成し、アミノアシル tRNA をリボソームの A サイトに運搬する。リボソームの小サブユニット側にはデコーディングセンターがある。デコーディングセンターにて、mRNA のコドンとそれに対応する tRNA のアンチコドンが対合すると、リボソームは EF-Tu の GTPase 活性を刺激し、GTP が加水分解される。この GTP の加水分解により EF-Tu の立体構造は大きく変化する。正しいアミノアシル tRNA が結合した場合、コドン-アンチコドン間の相互作用が強いため、アミノアシル tRNA はリボソームから解離することなく、アミノアシル基がペプチジルトランスフェラーゼセンターに配置され、ペプチド鎖の延長が触媒される。一方、mRNA のコドンに誤ったアミノアシル tRNA（つまり、誤ったアンチコドン）が結合すると、コドン-アンチコドン間の相互作用が弱く、この構造変化に耐えられない。その結果、誤って結合したアミノアシル tRNA はリボソームから解離し、誤ったアミノ酸の取り込みを防止する。このように、EF-Tu による GTP 加水分解エネルギーを利用して、正しいコドン-アンチコドン塩基対合が形成されているかどうかをリボソームが監視する。このリボソームによる校正機能により、正しいタンパク質の合成が保障される。

問 3. リボソームは mRNA コドンと tRNA アンチコドンの正確な対合をデコーディングセンターにおいてモニターするが、tRNA に正確なアミノ酸が付加しているかどうかをリボソームが識別できないためである。つまり、正確にタンパク質を合成するためには、各 tRNA に対応するアミノ酸が正しく連結されていることが前提となるためである。このように、各アミノアシル tRNA 合成酵素がそれらに対応する tRNA とアミノ酸だけを選別してアミノアシル化することこそが、正しいタンパク質の合成を保証するという意味において極めて重要である。

生物化学分野の修士研究を行うに必要な知識を問うため.