

令和6年度

静岡大学大学院総合科学技術研究科（修士課程）

一般選抜

理学専攻 生物科学コース

入学試験問題（専門）

令和5年8月24日（木）

解答時間：9時30分～12時30分

<注意事項>

1. 試験開始前に問題冊子、解答用紙ともに開けてはいけません。
2. 問題Ⅰは必修問題である。必ず解答すること。また、問題Ⅱ～Ⅳのうち2題を選んで解答すること。
3. 配布した解答用紙（横野線用の紙4枚）すべてに受験番号を記入すること。使わなかった解答用紙も回収するので、受験番号を記入すること。
4. 解答用紙は問題ごとに別にし、所定欄に問題番号を記入すること。
5. 解答用紙は裏面を使用してもよい。

問題 I DNA を取り扱う実験に関する以下の文章を読んで、問 1～7 に答えなさい。

(配点 40%)

DNA はいくつかの方法により切断や連結、増幅を行うことで、様々に加工することができる。以下は、3.0 kbp の環状プラスミド A に遺伝子 1 (1.0 kbp) をクローニングした後、サンガー法 (ジデオキシ法) により遺伝子 1 の塩基配列を確認した (a) 後に、発現ベクターであるプラスミド B (4.2 kbp) に遺伝子 1 を繋ぎ変え、哺乳類の培養細胞に遺伝子 1 がコードするタンパク質を発現させるための実験方法を示している。図 1 に、プラスミド A、およびプラスミド B の DNA 配列をそれぞれ模式的に示した。プラスミド B の CMV プロモーターは哺乳類の培養細胞において下流の遺伝子の転写を強力に促進する配列であり、SV40 ポリ A 配列は上流の配列にポリ A 配列を付加する。プラスミド A 中の矢印はこの方向に遺伝子 1 が転写された場合に活性を持つタンパク質 1 をコードする mRNA が転写されることを、またプラスミド B 中の矢印はこの方向に CMV プロモーターが転写を促進することを示している。なお、全ての実験は理論通りに正常に行われていると想定すること。

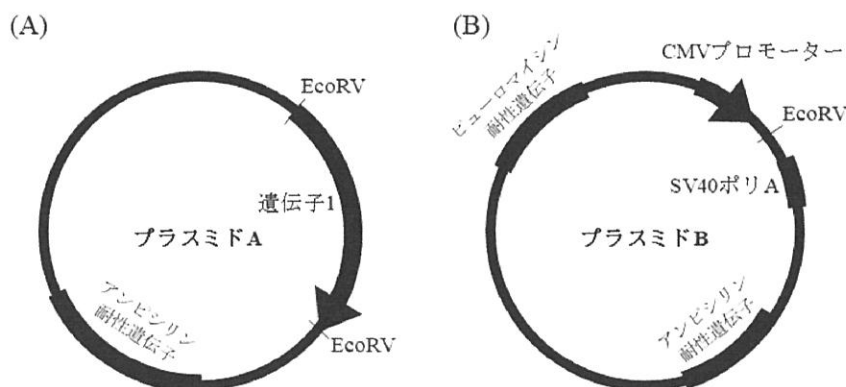


図 1. 実験に用いるプラスミドの模式図

- 実験① プラスミド A とプラスミド B のそれぞれに制限酵素 EcoRV を適量加え、37°C で 1 時間反応させた。
- 実験② 実験① で得られた反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により分離して、泳動像を確認した (b)。
- 実験③ 目的とする DNA 断片を含むアガロースゲルを切り出し、DNA を抽出、精製した後、プラスミド B を含むサンプルのみ、アルカリホスファターゼを加えて 37°C で 10 分間反応させた (c)。その後、酵素を完全に失活させて DNA のみを抽出した。
- 実験④ 遺伝子 1 とプラスミド B、およびある酵素 (d) をそれぞれ適量含む溶液を調製し、16°C で一晩反応させることで遺伝子 1 とプラスミド B とを連結させた。
- 実験⑤ 実験④ で得られた DNA 混合液を大腸菌コンピテントセル (e) に加えて形質転換させ、適切な抗生物質を含む寒天培地に植菌して 37°C で一晩培養した。

実験⑥ 実験⑤で生じた大腸菌コロニーを寒天培地からひとつ選んで液体培地で大量に培養した後、プラスミドを抽出した。

実験⑦ このプラスミドを培養細胞に導入して培養した後、ウエスタンブロッティング法 (f) によって、遺伝子1がコードするタンパク質の、この培養細胞からの検出を試みたが、全く検出できなかった。

問1. 下線部 (a) のサンガー法について、その原理を説明しなさい。適宜図を用いても構わない。

問2. 下線部 (b) の電気泳動の結果得られる泳動像について、制限酵素処理後のプラスミドA、プラスミドBそれぞれの電気泳動像を、図2を参考にして解答欄に描きなさい。解答には切断前の泳動像は描かなくてよい。その際、矢印の方向にDNAが移動する場合、電気泳動の電極はどのようにになっているか、陽極 (+) と陰極 (-) も明示しなさい。

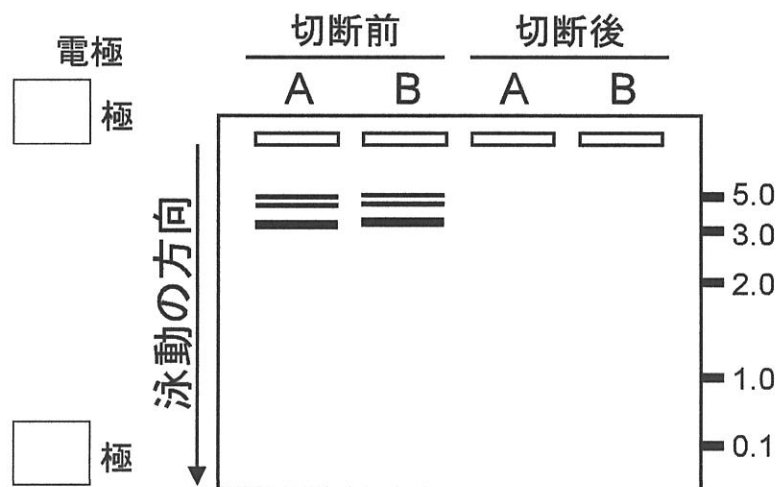


図2. 制限酵素処理前後での電気泳動像の模式図

問3. 下線部 (c) について、アルカリホスファターゼで処理する理由を簡潔に説明しなさい。

問4. 下線部 (d) で用いた酵素の名称を答えなさい。

問5. 下線部 (e) のコンピテントセルとはどういうものか説明しなさい。

問6. 下線部 (f) のウエスタンブロッティング法について、その原理を説明しなさい。適宜図を用いても構わない。

問7は次ページ。

問7. 遺伝子1がコードするタンパク質を検出できなかった原因として、プラスミドBに遺伝子1が逆向きに挿入された可能性が考えられた。この可能性を検討する実験をPCR法を用いて行う場合、どのようなプライマーを作製すると良いと考えられるか、そのプライマーを設計した意図を含めて説明しなさい。適宜図を用いても構わない。

問題Ⅱ 酵素に関する以下の文章を読んで、問1～6に答えなさい。（配点30%）

過酸化水素（ H_2O_2 ）は活性酸素分子種 (a) の一つである。カタラーゼは細胞中の過剰の H_2O_2 を酸素（ O_2 ）に変換することで「解毒」する働きを持つ酵素タンパク質である。あるバクテリアのカタラーゼの遺伝子をタンパク質発現用プラスミド (b) に組み込み、大腸菌を形質転換することで組換えタンパク質を発現させ、アフィニティークロマトグラフィー (c) の手法によって精製した。得られた組換えタンパク質が電気泳動的に均一であることを確認した後、これを用いて酵素活性を測定した。

問1. 下線部（a）について、 H_2O_2 以外の活性酸素分子種をひとつ上げなさい。

問2. カタラーゼが触媒する反応を、化学反応式で示しなさい。

問3. 下線部（b）のプラスミドには「アンピシリン耐性遺伝子」と「*lac*プロモーター」が含まれている。この実験を進めるうえでそれぞれがどのような役割をはたすか説明しなさい。

問4. 下線部（c）のうち、融合タンパク質として発現させて精製する手法について、例をひとつ上げ説明しなさい。

問5. 精製したカタラーゼ試料のタンパク質濃度は10.0 mg/mlであった。このカタラーゼのモル濃度を答えなさい。ここで、このカタラーゼの分子量は50,000である。

問6は次ページ。

問6. 様々な濃度の H_2O_2 を含む反応液 1.0 ml に、得られたカタラーゼ試料を 1.0 μl 加えることで反応を開始し、反応液中の H_2O_2 の濃度変化を追跡することで反応初速度を測定した。 H_2O_2 濃度に対して各反応初速度をプロットし、Michaelis-Menten の関係式*に従うと仮定して近似曲線を作成したものが図1である。小問 (1) と (2) に答えなさい。

$$*v_0 = V_{max}[S] / (K_m + [S]) \quad v_0 : \text{反応初速度}, [S] : \text{基質濃度}$$

- (1) 図1から読み取れる最大活性 V_{max} , および Michaelis 定数 K_m の値をそれぞれ答えなさい。
- (2) V_{max} と反応液中のカタラーゼのモル濃度から、このカタラーゼの分子活性 (k_{cat}) の値を計算しなさい。ここで k_{cat} とは、単位時間あたりに酵素一分子が最大何分子の基質と反応し得るかを示す値である。

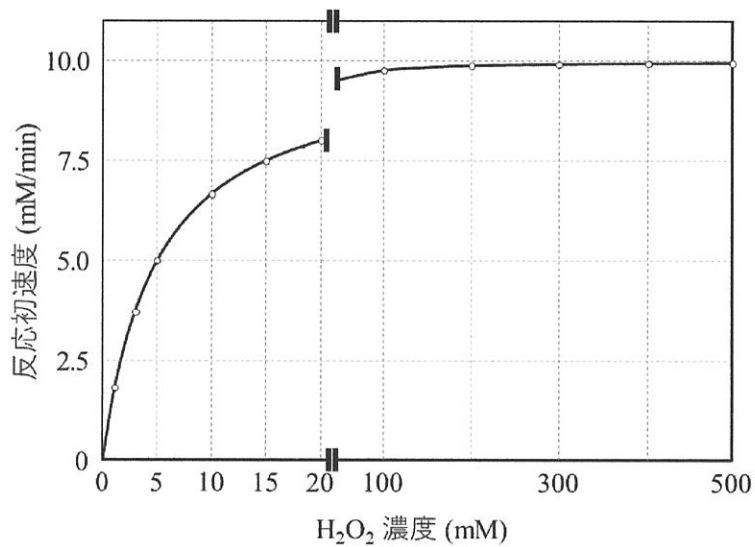


図1. カタラーゼ活性の基質濃度依存性。○は実測値。

問題Ⅲ 発生遺伝学に関する以下の文章を読んで、問1～5に答えなさい。(配点30%)

発生遺伝学はトーマス・ハント・モーガンによるショウジョウバエの突然変異体 (a) の分離からスタートした。近年では人為的な突然変異体の作出は化学変異原による処理が用いられてきた。この方法では最も変異の程度の低い点突然変異体 (b) になる場合が多い。変異の結果生じた個体全体の形質のことを一般に と呼ぶが、その判定には常に野生型との比較が必要になる。突然変異により生じた遺伝子産物(タンパク質)の変化をもとに分類すると機能欠失型と機能獲得型 (c) に大きく分けられる。

突然変異体の原因遺伝子を個体群の交配による変異遺伝子の置換率からゲノム上の物理的位置を特定していくマッピングを行ない、最終的に原因遺伝子を同定する一連の方法は と呼ばれる。

最近では遺伝子ノックアウト生物の作出には CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術が利用されるようになってきている。一つのガイドRNAを用いるゲノム編集では、遺伝子の標的箇所内に塩基の欠失が導入される (d) 場合が多い。塩基の欠失により、その遺伝子がコードするタンパク質の機能が失われることが期待される。

問1. と に入る適切な語を答えなさい。

問2. 下線部(a)の例としてホメオティック遺伝子の例をひとつ上げ、どのような異常を示すのか説明しなさい。

問3. 下線部(b)にはミスセンス変異とナンセンス変異の2種類がある。それぞれどのような突然変異が生じたのか説明しなさい。

問4. 下線部(c)はどのような突然変異体なのか説明しなさい。

問5. 下線部(d)に関して、どのような仕組みで塩基の欠失が導入されるのか説明しなさい。

問題Ⅳ 細胞の分化に関する以下の文章を読んで、問1～5に答えなさい。(配点：30%)

ヒト成人の体は、およそ37兆個の多様な細胞から成り立っている。これら細胞はすべて1個の受精卵に由来し、発生過程において細胞分裂を繰り返して細胞数を増やしながら、それぞれの細胞が次第に特殊化した形質を示すようになり、細胞間の分業が成立する。この多様な細胞を生み出す過程は「細胞分化 (a)」と呼ばれる。

胚発生過程では細胞分裂に伴って細胞分化が起こることも多い。細胞が分化すると、遺伝子発現に差を生じるが、個体内の個々の体細胞が保有する遺伝子セットは基本的に同一 (b)である。この根本原理は「ゲノム等価」と呼ばれている。

この「ゲノム等価」については、細胞分裂に際して染色体が均等に分配されるという観察結果から、20世紀中頃までは想定されてはいたものの、証明には至っていなかった。しかし、1962年のJ. B. Gurdonによるアフリカツメガエルを用いたクローン動物の作製の報告 (c)、およびその後の一連の実験によって、分化した細胞におけるゲノムの等価性が証明された。現在までに、多くの研究者によって、ヒツジやマウスなどの様々な哺乳類からのクローン動物の作製が報告されている (d)。

問1. 下線部 (a) に関して、1957年にC. H. Waddingtonが提唱した発生過程における細胞分化の概念は、谷を転がる大理石のボールになぞらえた「エピジェネティック・ランドスケープ」という比喩的な絵で示されている(図1)。細胞分化に関する概念を、この絵と以下の用語を用いながら説明しなさい。その際、細胞分化の方向性や可塑性に関する今日的な解釈も加えて説明しなさい。

用語： 分化状態、遺伝子発現、運命決定、細胞系譜、最終分化

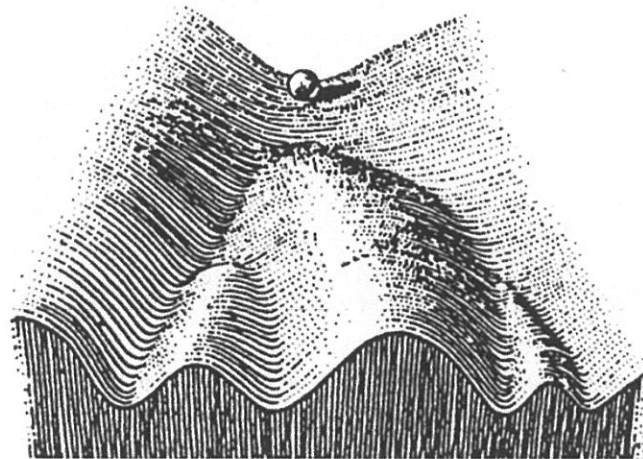


図1. “Epigenetic Landscape” Waddington, C. H. (1956). *Principles of Embryology*.

問2. 下線部 (b) に関して、細胞分化の過程で例外的に遺伝子の再構成が起こる体細胞がヒトの体の中に存在する。その細胞の例をひとつ上げ、再構成が起こる遺伝子名を記載しさい。

問3. 下線部 (c) の Gurdon によるアフリカツメガエルを用いたクローン動物作製実験にはオタマジャクシの細胞が用いられている。この実験内容と結果の概要を、「ゲノム等価」の観点から説明しなさい。

問4. 下線部 (c) に関連した以下の分章を読み、①と②に入る適切な語を答えなさい。

Gurdon によるアフリカツメガエルのオタマジャクシや成体組織由来の細胞を用いたクローン動物作製の報告に加え、2006年には S. Yamanaka によってマウス成体線維芽細胞に4つの遺伝子を導入することで①を作製できることが報告された。Gurdon と Yamanaka のこれらの研究は、ゲノムの等価性を示したのに加え、分化した細胞が「高度に分化した状態から多分化能を獲得できること」、すなわち②できることを示しており、2012年にノーベル生理学・医学賞を共同受賞する主な理由となった。

問5. 下線部 (d) に関して、哺乳類でのクローン動物の作製はヒト幹細胞研究にも大きな影響を与え、同様の「クローン技術」を用いることで「ヒト成人の“自己の遺伝情報”を持つ幹細胞」の作製法が考案され、2013年にはそれが実証された。この手法によって作製された幹細胞の名称、およびその作製法の概略を説明しなさい。なお、ヒト胚も胚盤胞期までは *in vitro* 培養が可能である。