

生体機能化学

【問】以下の文章を読んで、設問に答えよ。

生体では、DNA がもつ遺伝子情報に従って特定のアミノ酸配列をもつタンパク質が合成される。DNA はデオキシリボヌクレオチドのモノマーからなるポリマーであり、タンパク質はアミノ酸のモノマーからなるポリマーである。(i) 2つのモノマーは化学構造が全く異なっており、DNA 中にある遺伝子情報が ア へ転写された後、 イ が遺伝子情報をアミノ酸へ翻訳し、リボソームがそのアミノ酸どうしを化学結合させることによってタンパク質が合成される。タンパク質の合成速度は様々な段階で調節されており、(ii)大腸菌では 培地成分の変化によって合成速度が変化するタンパク質がある。このタンパク質の合成過程で機能する調節機構は (iii)発現ベクターにも利用されており、目的タンパク質を適切な時期に発現させることに使われている。

- 1) 空欄 ア と イ に入る最も適切な語句をそれぞれ答えよ。
- 2) 下線部(i)について、DNA がもつどのような遺伝子情報でアミノ酸を指定しているのか説明せよ。
- 3) 下線部(ii)について、培地成分にグルコースは含まれずラクトースが含まれているとき、*lacZ*, *lacY*, *lacA* の遺伝子がコードするタンパク質の合成が促進される。その理由を説明せよ。
- 4) 下線部(iii)について、図1のDNA断片Aにある、タンパク質Xのアミノ酸配列をコードするDNA配列B(斜線部分)をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅し、その後、図2の大腸菌用の発現ベクターCへ適切に挿入し、大腸菌を用いてタンパク質Xを発現させることを考える。a)~g)に答えよ。ただし、DNA配列Bはセンス鎖の5'末端に開始コドンを含むとする。

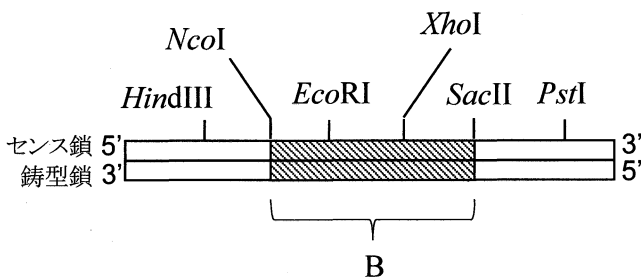


図1 DNA断片A

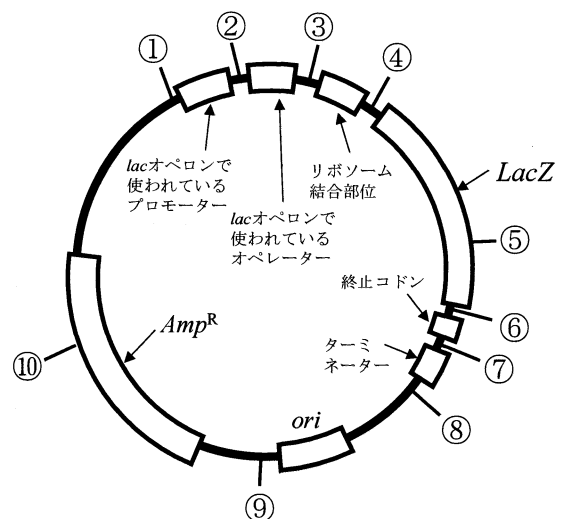


図2 発現ベクターC

- a) 図 2 のベクター C 中の塩基配列の中でクローニングベクターにも必要なものはどれか、すべて答えよ。
- b) PCR では耐熱性の DNA ポリメラーゼを使うことが多い。その理由を述べよ。
- c) ベクター C に挿入してタンパク質 X が発現できるように DNA 配列 B を PCR により増幅したい。どのようなプライマーを用いる必要があるか、答えよ。
- d) 10 fmol の DNA 断片 A を鋳型として、各プライマーを 10 pmol 加えて PCR を行った。PCR のサイクル数を、5 回、10 回、12 回それぞれ行った場合、DNA 配列 B をもつ断片はそれぞれ理論上最大何 mol まで増幅されるか答えよ。
- e) PCR で増幅した DNA 配列 B にコードされているタンパク質を大腸菌にて発現するようにベクター C へ挿入する場合、ベクター C における①~⑩のどこに何の制限酵素サイトが設計されている必要があるか答えよ。
- f) e) で取り上げた制限酵素を用いて、PCR で増幅した DNA 配列 B の断片とベクター C を制限酵素処理し、その後リガーゼによって連結反応させたベクター C で大腸菌を形質転換することを考える。形質転換した大腸菌を寒天培地で培養する場合、大腸菌がコロニーを形成し、かつ DNA 配列 B が挿入されたベクターをもつ大腸菌を選択できるようにするためには、どのような物質が寒天培地に含まれている必要があるか、その理由とともに答えよ。
- g) DNA 配列 B を適切に挿入したベクターで形質転換した大腸菌が適切な時期にタンパク質 X を効率よく発現させるためにはどのような操作が必要か、その理由とともに答えよ。