

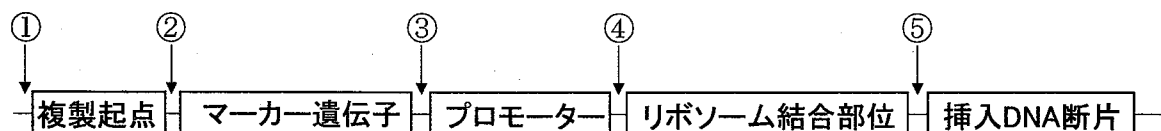
## 生体機能化学

【問1】以下の文章を読んで、設問に答えよ。

大腸菌内では、セントラルドグマに記述されるように(i)DNAの複製やタンパク質の合成が行われている。タンパク質の合成においては、DNA上のプロモーター配列にRNAポリメラーゼが結合してDNAの遺伝子配列が  ア  へ  イ  される。そして、 ア  上の特定の配列とリボソームの構成物質である  ウ  が相補的結合をして複合体が組み立てられ、タンパク質への  エ  が開始される。

この大腸菌内のDNA複製とタンパク質合成機構を利用して、外来の遺伝子配列をもつDNAの複製や、その遺伝子配列でコードされるタンパク質の合成を行うためには、DNA断片を(ii)ベクターへ挿入して、そのベクターを使って大腸菌を形質転換する。

- 1) 空欄  ア  ～  エ  に入る最も適切な語句を記せ。ただし、 イ  と  エ  は「合成」以外の語句を記せ。
- 2) 下線部(i)について、DNAポリメラーゼによる複製反応の速度を求める。大腸菌の染色体が  $4.6 \times 10^6$  塩基対と1つの複製起点をもち、細胞分裂が38分間に1回起きているときのDNAポリメラーゼによる複製反応の速度を答えよ。
- 3) 下線部(ii)について、ベクターにはクローニングベクターと発現ベクターがある。a)～c)に答えよ。
  - a) クローニングベクターに最低限必要な遺伝子配列の設計を答えよ。
  - b) 発現ベクターにおいて、ベクターへ挿入するDNA断片の配列設計によってもタンパク質の合成速度を調節することができる。その配列設計を2つ答え、調節できる理由を各々述べよ。
  - c) 発現ベクター上にオペレーター配列を設計することによって、タンパク質の発現開始時期を制御できる。オペレーター配列は、下記の配列のどこに設計すればよいか、下記の①～⑤の中から可能なものをすべて選べ。



【問2】図1のDNA断片A中にある両末端の制限酵素認識部位を含むDNA配列B（斜線部）をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅し、その後5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルβ-D-ガラクトピラノシド（X-gal）を5-ブロモ-4-クロロ-3-ヒドロキシインドールへ分解するβ-ガラクトシダーゼがコードされた遺伝子を含むクローニングベクターC（図2）へ挿入し、大腸菌を用いてクローニングすることを考える。以下の設問に答えよ。

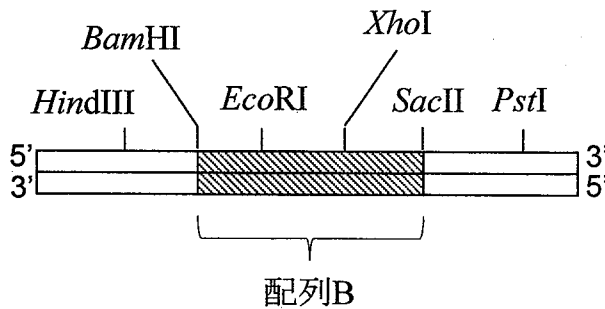


図1 DNA断片A

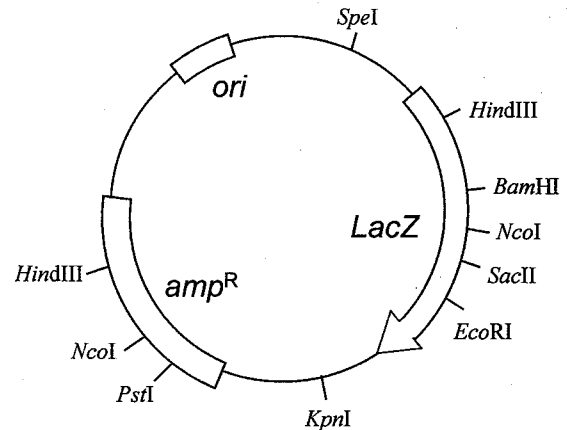


図2 クローニングベクターC

- 1) ベクターCに挿入してクローニングできるようにDNA配列BをPCRにより増幅したい。プライマーの設計として正しいものを下記より1つ選べ。
  - ① 鋳型の二本鎖DNAを構成する各一本鎖DNAに結合するプライマーは、各々のB領域の5'末端側に結合するように設計する。
  - ② 鋳型の二本鎖DNAを構成する各一本鎖DNAに結合するプライマーは、一方はB領域の5'末端側、他方は3'末端側に結合するように設計する。
  - ③ 鋳型の二本鎖DNAを構成する各一本鎖DNAに結合するプライマーは、各々のB領域の3'末端側に結合するように設計する。
- 2) 10 fmolのDNA断片Aを鋳型として、各プライマーを20 pmol加えてPCRを行った。PCRのサイクル数を10回行った場合と15回行った場合、DNA配列Bを持つ断片はそれぞれ最大何molまで理論上増幅されるか答えよ。
- 3) 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。a)～b)に答えよ。
  - a) 使用する制限酵素を答えよ。
  - b) 形質転換された大腸菌を寒天培地プレートで培養する場合、DNA配列Bが挿入されたベクターを持つ大腸菌を選択・判別するためにプレートに含まれる必須な物質は何か、その理由とともに答えよ。