

2020年度

京都大学大学院生命科学研究科修士課程

一般入試

筆答試問

共通専門科目

問 題

注意事項

- 1) 解答時間は、60分間である。
- 2) 満点は、100点である。
- 3) 全部で4問題ある。問題1は必ず解答せよ。さらに問題2～問題4の3問題から1問題を選択して解答せよ。問題2～問題4において2問以上を解答した場合は、選択問題の全答案を無効とする。
- 4) 解答は、問題ごとに別々の解答用紙1枚を使用すること。不足する場合は裏面を使用すること。
- 5) 解答時には、まず問題番号をそれぞれ所定の欄に明記すること。
- 6) 特に指示のない場合は、英語で解答してもよい。

問題 1

次の文章 (A)、(B) を読み、以下の問 1 ~ 問 6 の全てに答えよ。

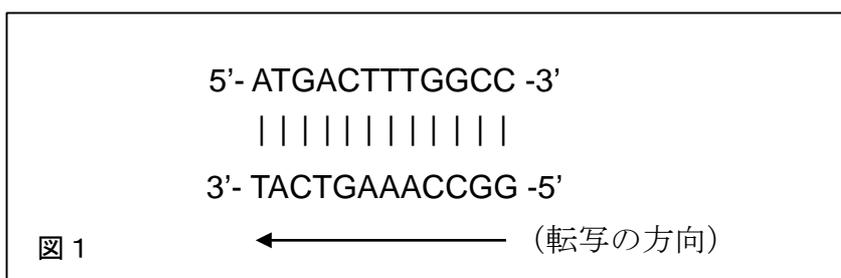
(A) 遺伝子は数多くの制御を受けてその機能を発現する。真核生物の遺伝子の転写は 3 種類の RNA ポリメラーゼにより行われ、そのうち RNA ポリメラーゼ II が① mRNA をはじめとする 転写産物 を合成する。RNA ポリメラーゼ II の C 末端領域は、転写が開始されるとリン酸化され、様々なタンパク質をよびよせて② 転写産物を効率的に成熟させる。それらのうち、成熟した mRNA は、核内から (ア) を通って細胞質基質へ輸送され、細胞質基質中あるいは (イ) 膜上において、タンパク質と RNA からなる翻訳装置であるリボソームと結合する。そこでは、連続した 3 個のヌクレオチドからなる (ウ) が tRNA を介してアミノ酸へ翻訳され、タンパク質が合成される。

多細胞生物は様々な分化した細胞をもつが、それらは異なる遺伝子発現によりもたらされる。特異的な転写の調節は、③ 転写調節因子 (転写因子) により行われる。転写因子の中には、ゲノム DNA と (エ) との複合体である (オ) を基本単位とするクロマチンの構造の局所的変化を引き起こすことにより、その DNA 領域の転写活性を制御するものがある。

問 1. 文章中の (ア) ~ (オ) に当てはまる適切な語句を答えよ。

問 2. 下線部①に関して、次の (1) ~ (3) の問いに全て答えよ。

- (1) 図 1 の DNA 二本鎖の配列は、ある遺伝子のエキソンの一部である。ここから合成される mRNA の配列を記せ。ただしその配列は、一般的に用いられる塩基の一文字表記で記すこと。



- (2) mRNA から相補 DNA (cDNA) を合成する原理を 3 行以内で説明せよ。

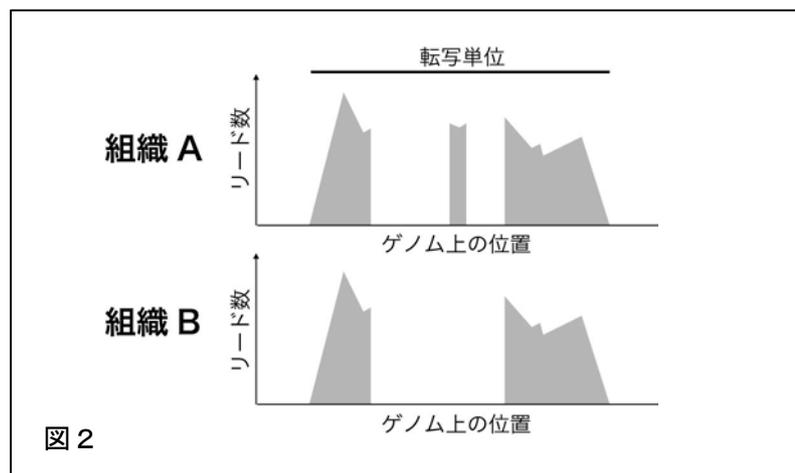
(3) 次の RNA 分子をコードする遺伝子のうち、RNA ポリメラーゼIIが主に転写するものに○、そうでないものにXをつけ、解答用紙に a ~ d の記号とともに記せ。

a. rRNA b. miRNA c. lncRNA d. tRNA

問3. 下線部②に関して、次の(1)、(2)の問いに全て答えよ。

(1) 転写産物の成熟に関わる主な修飾反応を3つ挙げよ。

(2) 図2は、遺伝子Xの組織Aと組織BでのRNA-seq解析の結果を可視化したものである。灰色の部分には転写産物の蓄積を反映している。遺伝子Xの構造と発現様式について、考えられることを5行以内で記せ。



問4. 下線部③に関して、次の(1)、(2)の問いに全て答えよ。

(1) 転写因子の中には、二量体を形成するものがある。その構造モチーフの例を1つ挙げよ。また二量体形成によって転写因子の機能にどのような寄与があるか、3行以内で簡潔に述べよ。

(2) 転写因子の機能解析法のひとつにクロマチン免疫沈降法がある。その目的と原理を10行以内で述べよ。

(B) RNAは転写のみならず、DNA複製においても重要な役割を果たす。DNAポリメラーゼは5'末端から3'末端の方向に移動し、鋳型鎖に相補的なDNA鎖を合成する。(カ)鎖のDNA合成は連続的に進むが、(キ)鎖のDNA合成は連続的ではない。先行して合成された岡崎フラグメントと複製フォークの先端部の間にRNAプライマーが形成され、これを始点としてDNA合成がはじまる。不連続に合成された岡崎フラグメントは、RNAプライマーを除去する酵素である(ク)と、DNA断片をつなぎあわせる酵素である(ケ)の作用により連続したDNA鎖となり、(キ)鎖の複製が完了する。

直鎖状DNAの(キ)鎖の最末端では、RNAプライマーが除去された後、この部分は通常のDNAポリメラーゼでは複製できない。このため、複製のたびにDNA長が短縮することが予想される。真核生物の染色体末端には短い反復配列を含むテロメアと呼ばれる構造がある。転移酵素の一種である(コ)は、染色体末端に、この反復配列を付加することで、複製のたびにDNA長が短縮する問題を克服できる。

問5. 文章中の(カ)～(コ)に当てはまる適切な語句を答えよ。なお、同じ文字で示された空欄には同じ語句が入るものとする。

問6. テロメアは染色体長の維持に重要な役割を果たすことに加え、染色体の末端同士の結合を防止することが知られている。テロメアを正常に維持できない細胞では、染色体が環状化することがある。この現象がどのようにおこるかについて、下の語句を用いて説明せよ。なお、これらの語句は必ずしも全てを使う必要はない。

DNA 損傷 相同組換え修復 非相同末端結合 塩基除去修復

問題 2

次の文章を読み、以下の問1～問7の全てに答えよ。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、細胞内シグナル伝達を担う代表的なセカンドメッセンジャーの一つであり、広範な細胞機能の制御に関与している。細胞膜上の (ア) の働きにより、①細胞内の遊離の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) は静止時には、 $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{M}$ 程度に保たれる。②これは細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($\sim 10^{-3} \text{M}$) の 10,000 分の 1 以下という非常に低い濃度である。様々な経路を通して細胞質基質に Ca^{2+} が供給されることにより $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ が上昇し、③ Ca^{2+} 結合タンパク質を介して様々な細胞内シグナルが活性化される。細胞外からは、④電位依存性 Ca^{2+} チャンネルなどを介して、大きな電気化学的勾配にしたがい、 Ca^{2+} が細胞質基質に流入する。細胞内では、細胞小器官である小胞体や (イ) が、主要な細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫として機能している。小胞体膜上の (ア) の働きにより小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度は高く維持されており、小胞体膜上の Ca^{2+} チャンネルを介して Ca^{2+} が細胞質基質に放出される。細胞外からの流入とならび、⑤小胞体内腔からの Ca^{2+} 放出は、細胞質基質への主要な Ca^{2+} 供給経路である。

問1. 文章中の (ア)、(イ) に当てはまる適切な語句を答えよ。

問2. (ア) の生理機能とその作用機序について2～3行で説明せよ。なお、説明には下記の3つの語句を全て使用せよ。

能動輸送、アデノシン三リン酸、結合エネルギー

問3. 下線部①に関して、生細胞内の遊離の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) を測定することは細胞機能の解明において重要である。次の文章は、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ 測定法の一つである Ca^{2+} 感受性蛍光色素法について述べたものである。これを読んで、問いに答えよ。

Ca^{2+} 感受性蛍光色素は、 Ca^{2+} 結合の有無により励起光や蛍光の波長が変化したり、蛍光強度が変化したりする。こうした色素を細胞内に入れ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ の変化による蛍光波長特性の変化や蛍光強度の変化を測定することで、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ の変化を測定できる。例えば、広く使われている Fura-2 の特徴は、 Ca^{2+} 濃度が低い時には、380 nm で励起時に、 Ca^{2+} 濃度が高い時には 350 nm で励起時に、510 nm の強い蛍光が得

られる。350 nm と 380 nm で励起した時の 510 nm の蛍光強度（それぞれ F_{350} および F_{380} ）から $[Ca^{2+}]_{in}$ を計測できる。この測定法は、Fura-2 の細胞内濃度や細胞の厚さによる影響を受けにくいと考えられる。Fura-2 の細胞内濃度が適正な範囲内にあり Ca^{2+} との結合が飽和していないと考えられる条件下では、Fura-2 を用いた時の $[Ca^{2+}]_{in}$ の絶対値は、次式により見積もることができる。

$$[Ca^{2+}]_{in} = K_d \beta (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

K_d : 蛍光色素と Ca^{2+} の解離定数 (nM)

R_{min} : すべての色素が遊離型の時の蛍光強度比 (F_{350}/F_{380})

R_{max} : すべての色素に Ca^{2+} が結合した時の蛍光強度比 (F_{350}/F_{380})

R : 測定時の蛍光強度比 (F_{350}/F_{380})

β : R_{min} と R_{max} 測定時の 380 nm での蛍光強度比 (F_{350}/F_{380})

さて、脳下垂体由来のある細胞株は自発的な $[Ca^{2+}]_{in}$ 変動を示すことが知られている。この細胞に Fura-2 を顕微注入法により導入し、 F_{350} および F_{380} を、120 秒間にわたって継時的に測定した。図 1 は、この測定結果を示すグラフである。この期間における $[Ca^{2+}]_{in}$ の絶対値の最小値および最大値を計算し、有効数字 2 桁で答えよ。なお計算式のパラメータの実測値は以下の通りであった。

$$K_d = 225 \text{ (nM)}$$

$$R_{min} = 0.42$$

$$R_{max} = 4.3$$

$$\beta = 4.7$$

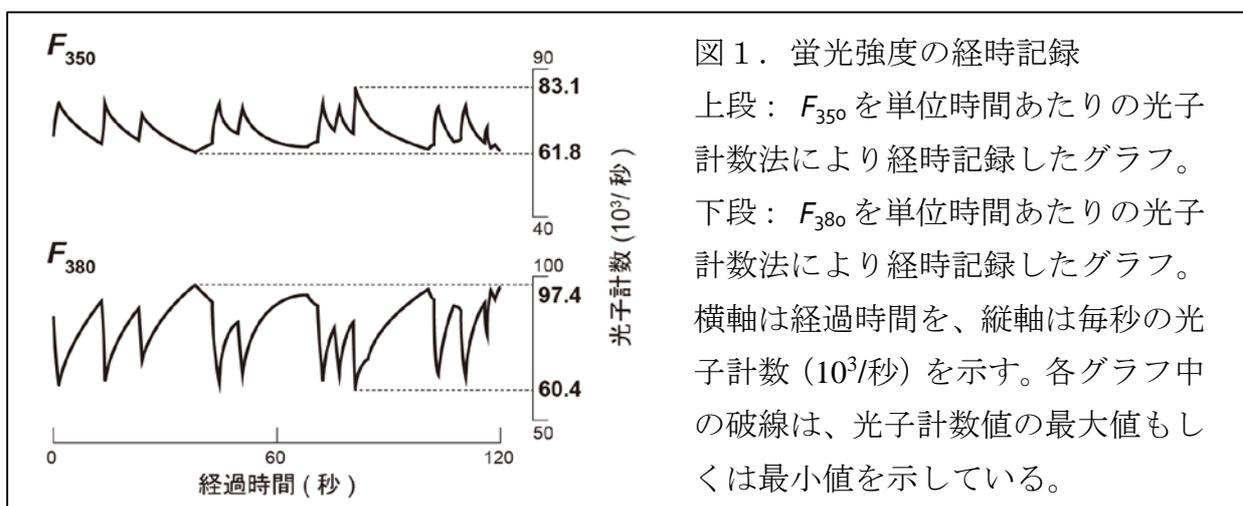


図 1. 蛍光強度の経時記録

上段: F_{350} を単位時間あたりの光子計数法により経時記録したグラフ。

下段: F_{380} を単位時間あたりの光子計数法により経時記録したグラフ。

横軸は経過時間を、縦軸は毎秒の光子計数 ($10^3/\text{秒}$) を示す。各グラフ中の破線は、光子計数値の最大値もしくは最小値を示している。

- 問4. 下線部②に関して、このように Ca^{2+} 濃度に細胞の内外で大きな差があることの利点は何か。特に、セカンドメッセンジャーとしての観点から述べよ。
- 問5. 下線部③に関して、下記に挙げた3つの Ca^{2+} 結合タンパク質（複合体）の中から一つを選び、その分子機能について3～4行で説明せよ。ただし、説明には Ca^{2+} 依存的に生じる構造的あるいは機能的な変化と、その変化によって直接的な影響を受ける分子の名称を含むこと。

トロポニン複合体、カルモジュリン、プロテインキナーゼC

- 問6. 下線部④に関連する以下の文章を読み、(1)、(2)の問いに答えよ。

イオンは電気化学的勾配にしたがって細胞膜を透過して移動し、十分長い時間が経過した後に正味の移動が0になる。単一のイオン種のみが存在するとき、この状態での細胞膜内外での電位差（膜電位）を、そのイオン種の（ウ）という。また、温度 37°C の系における（ウ）は、次式（Nernstの式）で表されることが知られている：

$$E_i = \frac{62}{Z_i} \log_{10} \frac{[i]_{\text{out}}}{[i]_{\text{in}}}$$

$[i]_{\text{out}}$: イオン種 i の細胞外での濃度 (nM)

$[i]_{\text{in}}$: イオン種 i の細胞内での濃度 (nM)

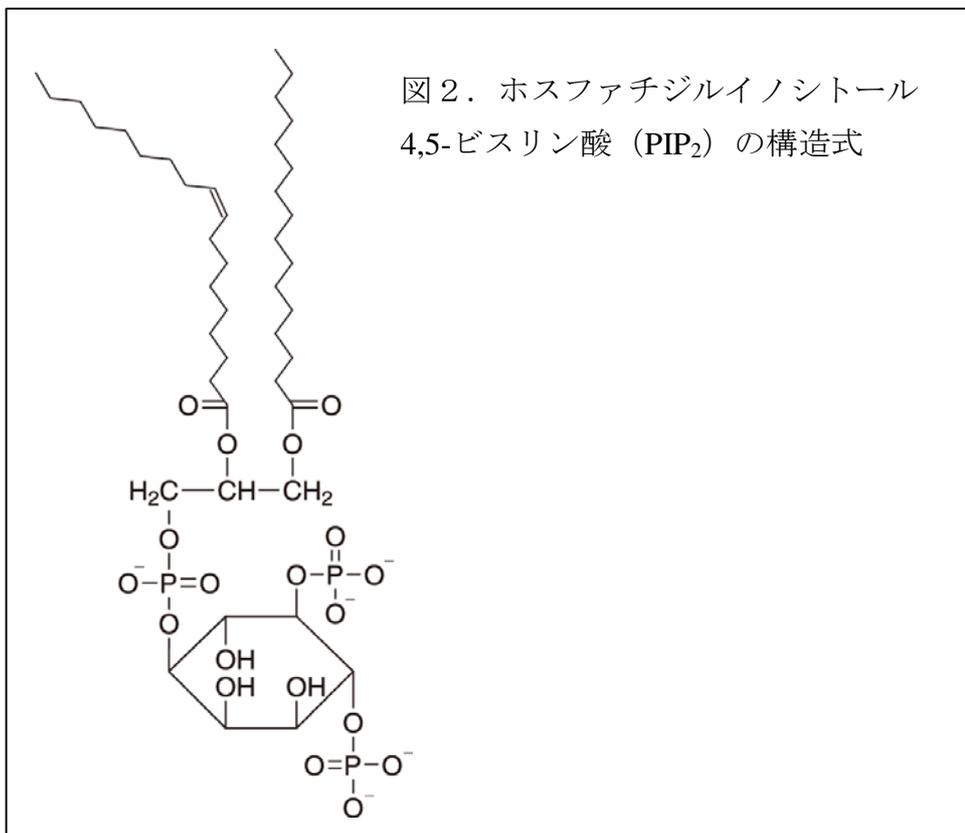
Z_i : イオン種 i の価数

E_i : イオン種 i の（ウ） (mV)

- (1) 文章中の（ウ）に当てはまる適切な語句を答えよ。
- (2) 複数のイオン種が共存する系においても、各イオン種の（ウ）がNernstの式により定まる。ある培養神経細胞は、通常の培養条件下での $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ が 50 nM 、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ が 2.0 mM であることがわかっている。この神経細胞での Ca^{2+} の（ウ） ($E_{\text{Ca}^{2+}}$) を、Nernstの式を用いて計算し、有効数字2桁で答えよ。ただし、培養温度は 37°C とし、 $\log_{10} 2$ の値を 0.301 とする。また、細胞膜の Ca^{2+} に対する膜透過性は、非常に小さいが0ではないものとする。

問7. 下線部⑤に関して、以下の問いに答えよ。

小胞体膜上のイノシトールトリスリン酸受容体 (IP_3R) を介した Ca^{2+} 放出機構が知られている。この受容体のリガンド分子であるイノシトールトリスリン酸 (IP_3) は、ホスホリパーゼ C (PLC) の酵素活性によりホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP_2) を基質として、副産物 X とともに加水分解反応により産生される。この副産物 X の名称を答えよ。また、図2の PIP_2 の構造式を参考にして IP_3 の構造式を書け。ただし、図2の構造式における脂肪鎖部分は一例を示している。



問題3

次の文章を読み、以下の問1～問6の全てに答えよ。

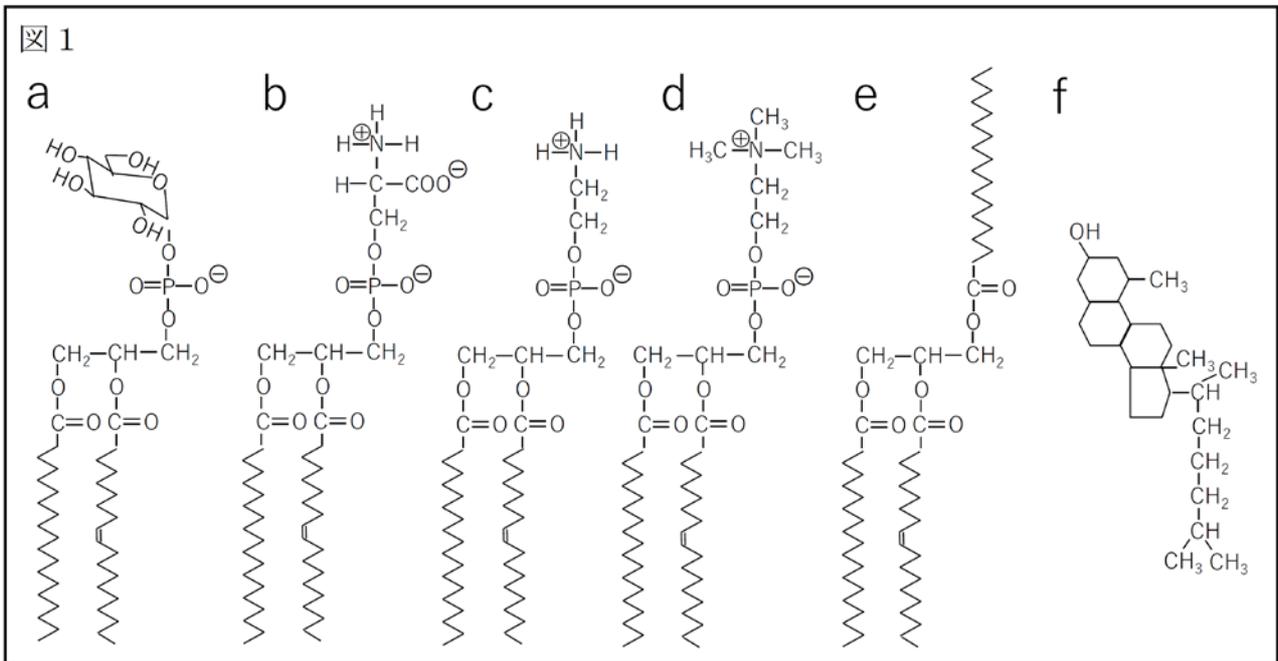
真核生物の細胞膜は脂質二重膜により構成されており、①リン脂質、糖脂質、コレステロールなどを構成要素としている。細胞膜は、細胞の内と外を隔てるバリアとしてだけでなく、②膜タンパク質が埋め込まれる場所、細胞内タンパク質が結合する足場、さらには、細胞がアポトーシスにより死んだ場合にはシグナル分子としても機能する。

生体内では、毎日不必要な細胞がアポトーシスにより除去され、同時に新しい細胞が生まれ出されることで恒常性が保たれている。アポトーシスには内因性シグナルと外因性シグナルが存在し、内因性シグナル経路では、細胞小器官の1つである（ア）の膜上に存在するタンパク質（イ）が凝集することで（ウ）が放出され、③カスパーゼを段階的に活性化する。そして、活性化したカスパーゼによって細胞内の様々な基質が切断されることで細胞死が進行する。例えば、核内に存在する（エ）がカスパーゼによって切断され、その後、核は断片化する。一方、外因性シグナル経路では、④細胞膜上の受容体がリガンドにより刺激されることで、内因性シグナルと同様、カスパーゼを活性化する。最終的には、アポトーシスを起こした細胞は、細胞膜が変化してシグナル分子として機能することで、主に（オ）などの貪食細胞に取り込まれ、細胞内容物が細胞外に漏出するのを防いでいると考えられる。

問1. 文章中の（ア）～（オ）に当てはまる最も適切な語句を答えよ。ただし、（イ）、（ウ）、（エ）は具体的なタンパク質の名前とする。

問2. 下線部①に関して、下の(1)～(5)の脂質の化学構造を図1のa～fより選択せよ。

- (1) ホスファチジルセリン
- (2) ホスファチジルエタノールアミン
- (3) ホスファチジルグルコース
- (4) コレステロール
- (5) トリアシルグリセロール



問3. 下線部②に関する以下のa～fの記述のうち、正しいものを全て選択せよ。

- a. 細胞膜タンパク質は界面活性剤によってペプチドに分解される。
- b. 細胞膜上のトランスポーターはそれぞれ1種類のイオンやアミノ酸を輸送する。
- c. 脂質の疎水性領域がATP依存的にタンパク質の疎水性領域と相互作用する。
- d. 受容体型チロシンリン酸化酵素は脂質二重膜の片側の膜にのみ埋め込まれる。
- e. 細胞膜タンパク質は細胞内領域ではなく細胞外領域が糖鎖修飾される。
- f. 細胞膜を構成する脂質は親水性領域が細胞外、疎水性領域が細胞質と接する。

問4. 下線部③に関する以下の a ~ f の記述のうち、正しいものを全て選択せよ。

- a. カスパーゼはアポトーシス時に複数の箇所が脱リン酸化されることで活性化する。
- b. カスパーゼはアポトーシス時に複数の箇所がリン酸化されることで活性化する。
- c. カスパーゼはアポトーシス時に切断されることで活性化する。
- d. カスパーゼはアポトーシス時に切断されることで不活性化する。
- e. カスパーゼはアポトーシス時に ATP を用いて酵素反応を触媒する。
- f. カスパーゼはアポトーシス時に GTP を用いて酵素反応を触媒する。

問5. 下線部④に関して以下の実験を行った。文章中の (カ) ~ (サ) に当てはまる適切な数字を答えよ。有効数字は2桁とする。

細胞死を引き起こすことが知られている細胞膜受容体（細胞死受容体 R）の機能を調べるために、ある培養細胞に細胞死受容体 R を強制発現させる実験を行うことを計画した。市販の発現用ベクターのプラスミド（全長 8,000 塩基対）に、PCR で増幅した細胞死受容体 R をコードする cDNA 断片（全長 2,000 塩基対）を組み込み、発現ベクターを作製する。デオキシヌクレオチドの平均分子量を 350 とすると、PCR で増幅した細胞死受容体 R の cDNA 断片の分子量は (カ) になる。

まず、40 ng の発現用ベクターを制限酵素で処理し、平滑末端をもつ直鎖状にした。次に、この直鎖状のベクター40 ng と、同じく平滑末端をもつ細胞死受容体 R の cDNA 断片とを混合してライゲーション反応を行う。反応の効率を考慮し、ベクターと cDNA 断片とのモル比を 1:2 で混合することにした。cDNA 断片のストック溶液の濃度が 7 nM だとすると、このストック溶液より (キ) μl をベクターと混合しなければならない。この混合液の中には、cDNA 断片が (ク) mol 含まれており、これは (ケ) ng に相当する。

ライゲーション反応はトータル 50 μl の反応液で行うことにした。酵素の DNA リガーゼが 100 nM の濃度で 20 μl のストックとしてある。リガーゼを最終濃度 5 nM で添加するには、ストックから (コ) μl を反応液の中に加える必要がある。ライゲーション反応後、5 μl の反応液を 95 μl のコンピテントセル^(注)と混合し、熱ショックにより DNA を取り込ませた。これに 900 μl の液体培地を添加した後、10 μl を寒天培地に撒くと、翌日には 25 個の大腸菌コロニーがあらわれた。ライゲーション後の反応液 50 μl の中には全部で (サ) 個のコロニーを形成することができる量のプラスミドがあったと予想される。

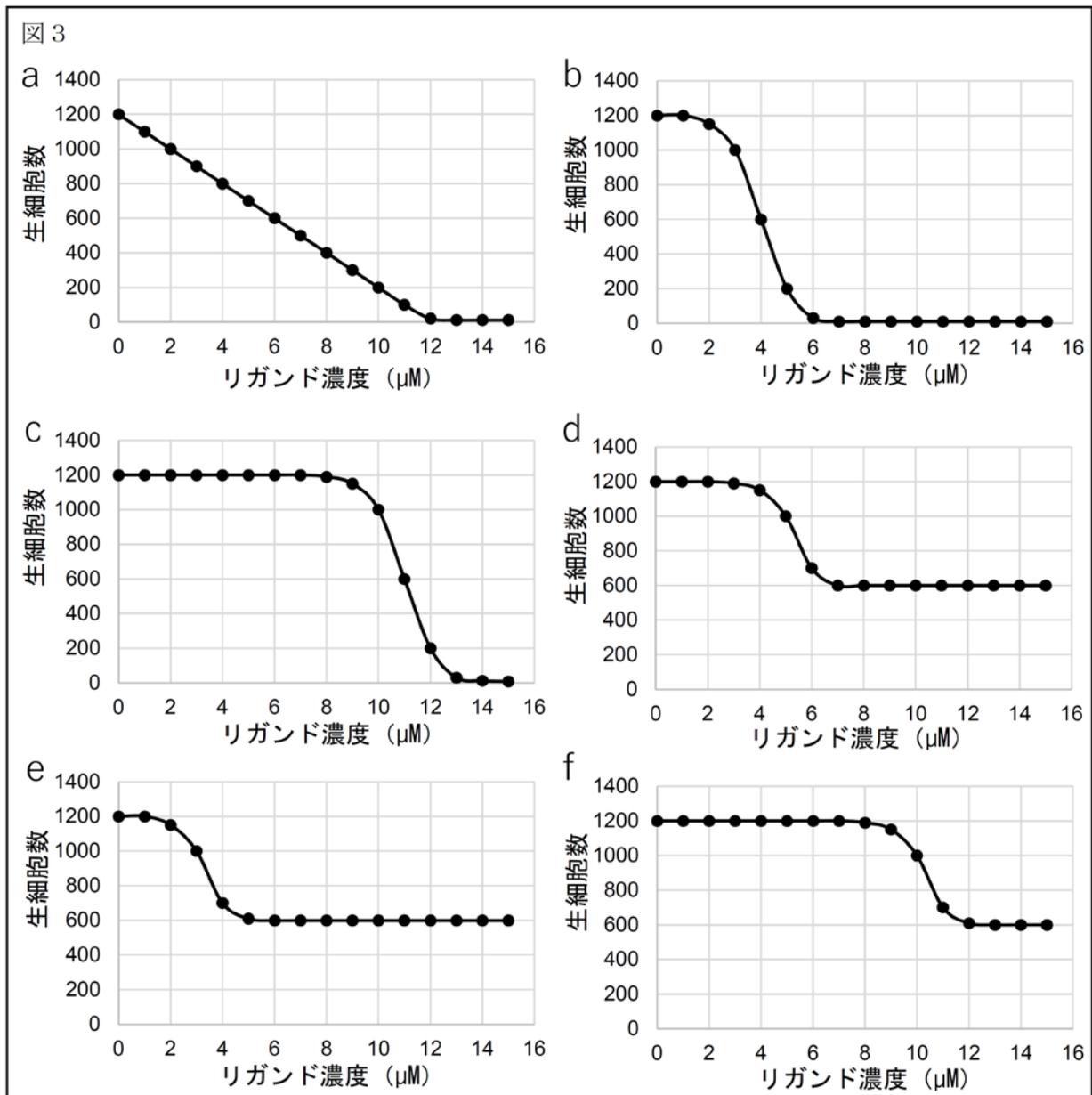
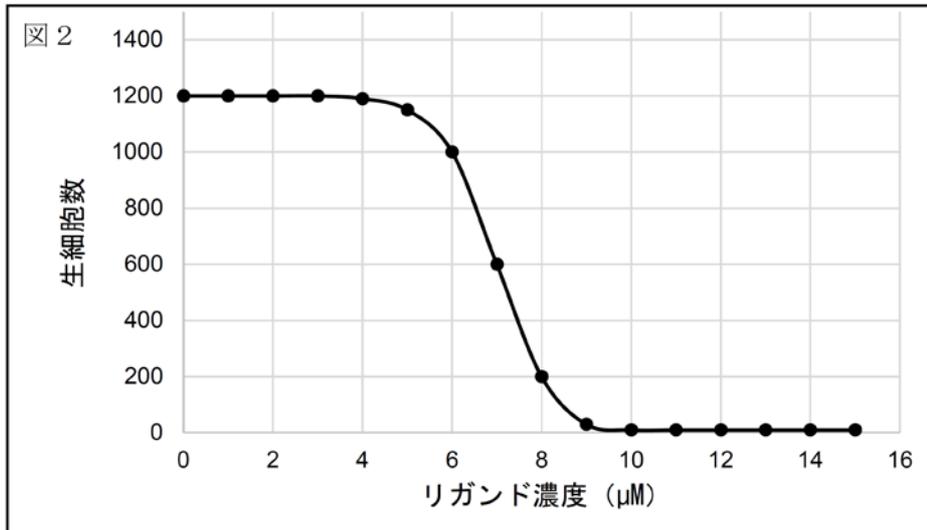
最後に、このコロニーを液体培地に移して培養した大腸菌からプラスミド DNA を

精製し、細胞死受容体 R の cDNA 断片が含まれていることを確認した。

(注) プラスミドを取り込みやすくする処理をほどこした大腸菌

問6. 内在性の細胞死受容体 R を発現する細胞はリガンド A を添加することでアポトーシスにより死滅する。細胞死受容体 R に対するリガンド A の濃度依存性を調べるために、培養細胞の培地にリガンド A を添加し、37°C で 3 時間静置した後に生細胞数を計測するという実験を行った。図2は、0 ~ 15 μM の範囲で、1 μM おきにリガンド A の濃度を変化させた時の生細胞数をプロットしたグラフである。これに関して以下の(1) ~ (4)の問いに全て答えよ。

- (1) 上記の実験条件で、50%の細胞に細胞死を誘導できるリガンド A の濃度を求めよ。
- (2) リガンド A に対して競合阻害することが知られている薬剤を加えた時、図2のグラフはどのように変化するか。図3の a ~ f の中から最も適切なものを選べ。
- (3) 問5で作製した細胞死受容体 R の発現ベクターを細胞に導入し細胞死受容体 R を過剰発現させた後、リガンド A で刺激を行った時、図2のグラフはどのように変化するか。図3の a ~ f の中から最も適切なものを選べ。
- (4) 細胞死受容体 R に点変異を導入した後、問5と同じ要領で発現ベクターを作製し、その後細胞に導入した。すると、細胞死受容体 R がタンパク質として発現し細胞膜に移行後、3 時間後に細胞がアポトーシスにより死滅した。この反応はリガンド A 非依存的であった。この結果から考えられる細胞死受容体 R の作用機序、ならびに作製した変異体の特性を 3 行以内で記述せよ。



問題 4

次の文章を読み、以下の問1～問7の全てに答えよ。

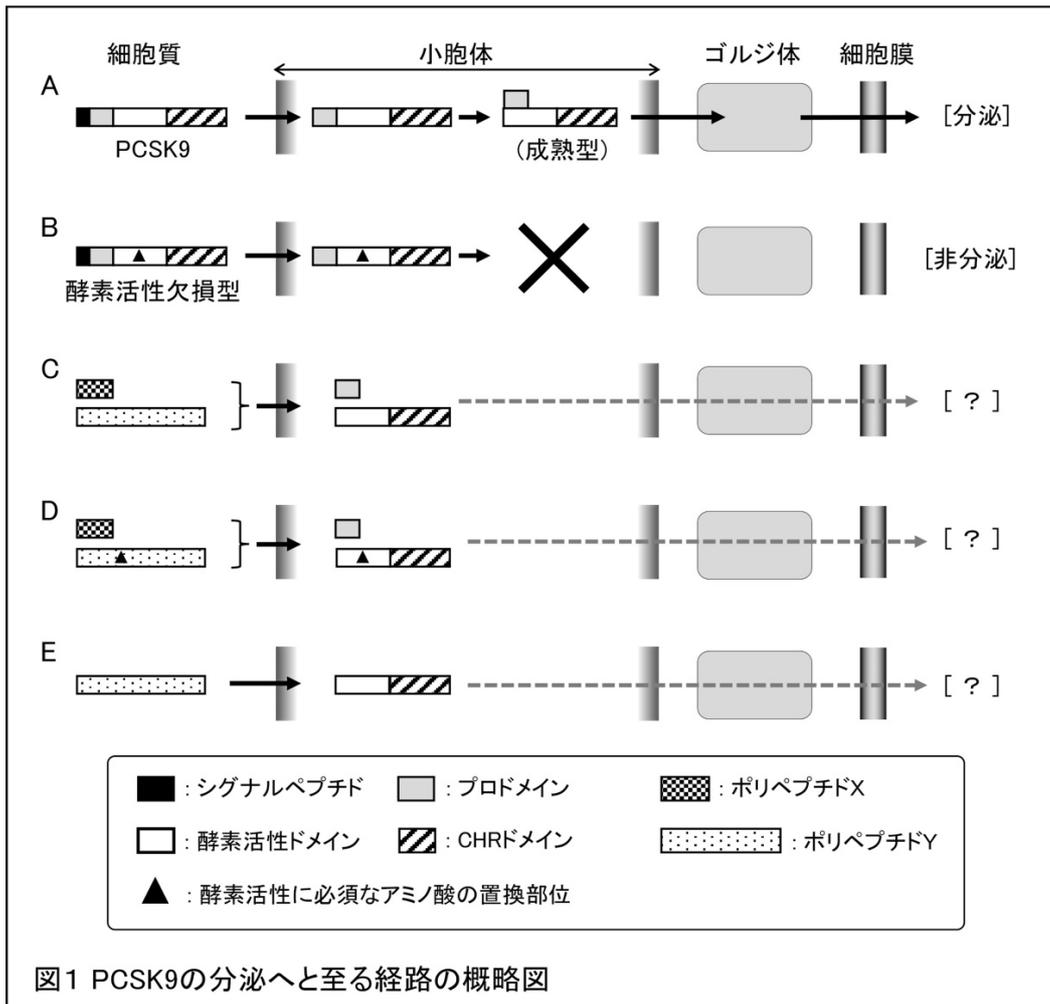
コレステロールは、重要な脂質の一つであり、細胞膜の形成に不可欠であるとともに、①ステロイドホルモンやビタミンDなどを生成するための前駆体になっている。コレステロールは、その多くが肝臓で（ア）を出発原料にして複数の過程を経て生成される。コレステロールは不溶性であるために、（イ）と呼ばれる粒子に取り込まれたかたちで細胞外にも放出され血液循環を介して全身に拡散する。（イ）は、大きさや密度により働きが異なる VLDL、IDL、LDL、HDL として血液中に存在する。その中で LDL は、「悪玉コレステロール」とも呼ばれ、LDL が血液中に長く存在し続けると動脈硬化を引き起こす原因となる。通常 LDL は肝細胞の細胞膜上に発現している LDL 受容体に結合し、その複合体は（ウ）という作用によって細胞内に取り込まれる。複合体はその後細胞内で解離し、LDL 受容体は細胞膜へと輸送されて再利用される。また LDL は、リソソームへと運ばれ、そこで加水分解を受ける。

分泌タンパク質の PCSK9 は、プロプロテイン変換酵素ファミリーに属する酵素である。この酵素は主に肝臓の細胞で生成された後、細胞小器官間でタンパク質の運搬に関わる（エ）の過程を経て細胞膜まで運ばれ、さらに（オ）という作用によって細胞外へと分泌される。血液中を循環している PCSK9 は、肝臓にたどり着くと細胞表面の LDL と LDL 受容体の複合体に結合する。この PCSK9 が加わった複合体は、（ウ）によって細胞内に取り込まれるが、この時 LDL 受容体は複合体から解離できず LDL や PCSK9 と共にリソソームで分解される。その結果、細胞膜上の LDL 受容体数が減少するために血液中の LDL 量の増加につながる。

図1Aに示すように、PCSK9はアミノ基末端側のシグナルペプチドを介して小胞体へ移動する。そしてこの小器官内においてプロドメインと酵素活性ドメインの間を自己切断することにより、プロドメインと、酵素活性ドメイン+CHR(システイン-ヒスチジンに富む)ドメインの2つのペプチド断片に分かれる。その後2つのペプチド断片は、安定的に結合して成熟型の立体構造を形成する。成熟型ポリペプチドは切断能をもたず、その構造を保ちながらゴルジ体へと移動し最終的に細胞外に分泌される。また、酵素活性に必須なアミノ酸を置換した PCSK9 の変異体(酵素活性欠損型)は自己切断できず不安定な構造であるためにゴルジ体へは運ばれず、その結果細胞外への放出も起きない(図1B)。

問1. 文章中の（ア）～（オ）に当てはまる適切な語句を述べよ。なお同じ文字で表記された空欄には同じ語句がはいるものとする。

問2. 下線部①に関して、ステロイドホルモンは副腎皮質ホルモンと性ホルモンの2つのサブグループに分類できる。性ホルモンのグループの中から1種類を挙げよ。



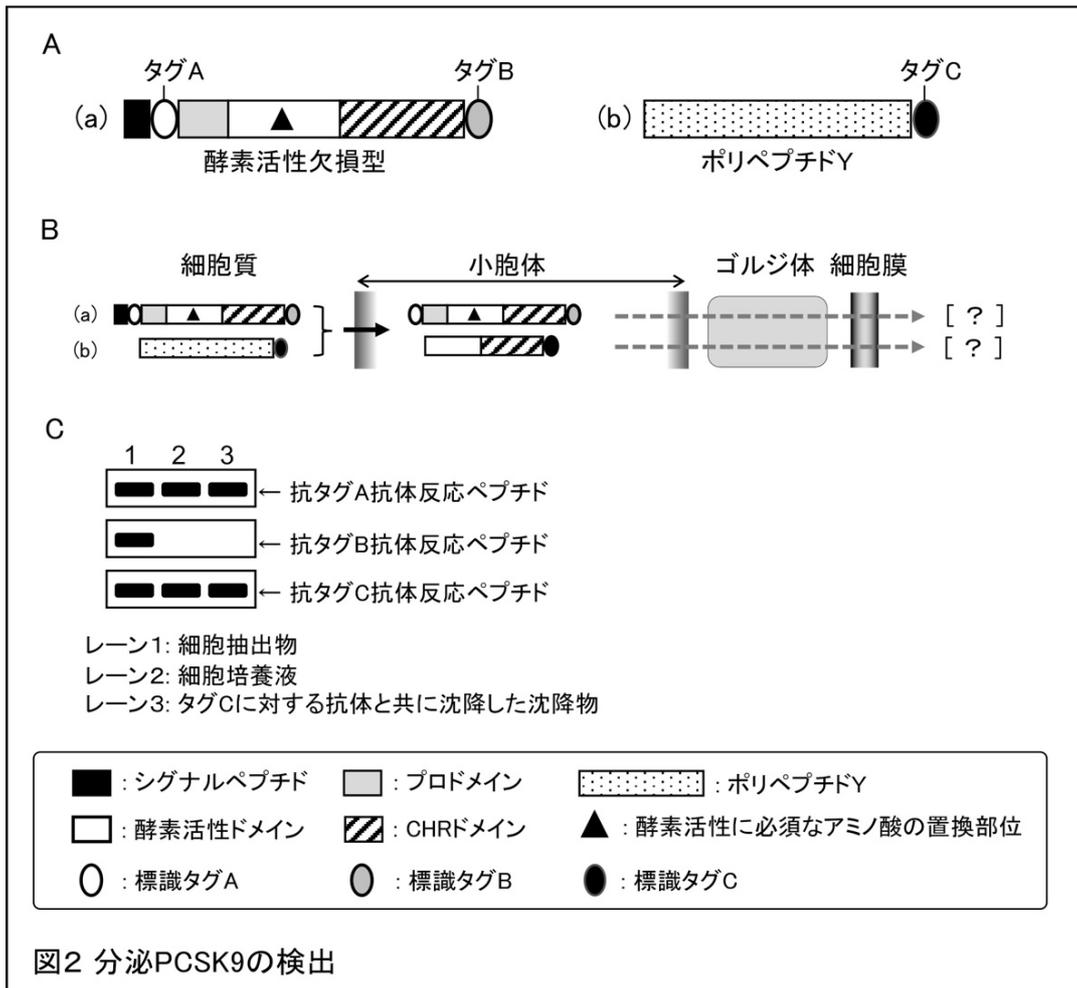
問3. 図1 CとDでは、PCSK9をプロドメインと酵素活性ドメインの間で分割したかたちの2種類のポリペプチド（ポリペプチドXとポリペプチドY）を遺伝子組換え操作によってそれぞれ作製し、それらを同時に培養細胞で発現させた。ポリペプチドXはプロドメインを含み、ポリペプチドYは酵素活性ドメイン+CHRドメインを含む。また図1 Eでは、ポリペプチドYを単独で発現させた。図1 C～EのポリペプチドYは、小胞体内に移行後は正常型と同じ構造のペプチド断片となる。次の(1)、(2)の問いに答えよ。

- (1) 酵素活性ドメイン+CHRドメインから成る分割型をそのまま細胞に発現させると、小胞体膜は通過できない。酵素活性ドメイン+CHRドメインを小胞体内へ移行させるために、ポリペプチドYを作製する際に施した遺伝子組換え操作は何か、1～2行で簡潔に説明せよ。
- (2) 図1 C～EでポリペプチドY由来のペプチド断片（酵素活性ドメイン+CHRドメイン）が最終的に細胞外に分泌されるか否かを調べた。C～Eにおいて予想される分

泌の有無をそれぞれ答えよ。また、判断に至った根拠をC～Eそれぞれについて1～2行で簡潔に述べよ。

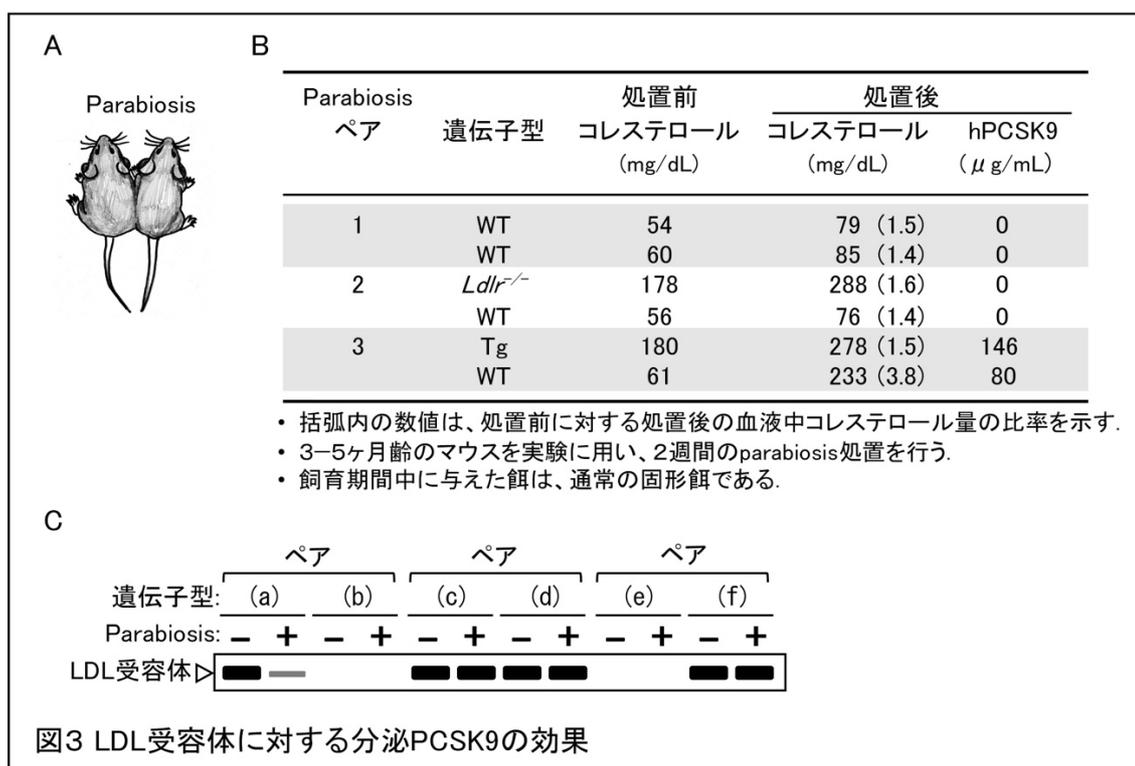
問4. 酵素活性欠損型とポリペプチドYについて、細胞や細胞培養液から抽出した際に両者を識別できるように、3種類の標識タグ（タグA～C）を両分子にそれぞれ付加した（図2 A）。両者を一緒に培養細胞で発現させ（図2 B）、しばらく培養した後細胞抽出物と培養液を回収・調製した。さらに一部の培養液については、抗タグC抗体を使って免疫沈降を行った。細胞抽出物・培養液・免疫沈降物の各サンプルについて3種類の抗タグ抗体を使って免疫ブロッティングを行った結果を図2 Cに示す。

図2を参考にして、標識した(a)酵素活性欠損型と(b)ポリペプチドYにそれぞれ由来するペプチド断片（酵素活性ドメイン+CHRドメイン）は細胞外へ放出されるか、(a)、(b)各々につき分泌の有無を答えよ。また PCSK9 の「酵素活性」あるいは「立体構造の安定化」の分子機序を踏まえて、結論に至った根拠を(a)、(b)それぞれについて2～3行で説明せよ。



問5. 同じ系統のマウスを使って、LDL受容体の遺伝子欠損マウス ($Ldlr^{-/-}$) とヒト $PCSK9$ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (Tg) をそれぞれ樹立し、これら2種類のマウスと野生型マウス (WT) を Parabiosis (並体癒合) という手法 (図3A) によってつなぎ合わせた。この処置により、循環体液が相手方に入り込み、血液成分も一部共有されることが分かっている。図3Bは、野生型マウス同士、遺伝子欠損マウスと野生型マウス、そしてトランスジェニックマウスと野生型マウスの組み合わせで Parabiosis を行い、その処置の前後において各個体の血液中のコレステロール量とヒト $PCSK9$ タンパク質 (hPCSK9) の分泌量を測定した結果を示す。血液中のコレステロール量と LDL 量の間には強い相関関係がある。図3Cは、マウスから肝臓を一部摘出して得られた細胞の膜画分について LDL 受容体の量を調べた免疫ブロッティングのパターンを示す。図3Cの(a)~(f)に該当するマウスの遺伝子型を以下の3つの中からそれぞれ選び答えよ。

{ WT、Tg、 $Ldlr^{-/-}$ }

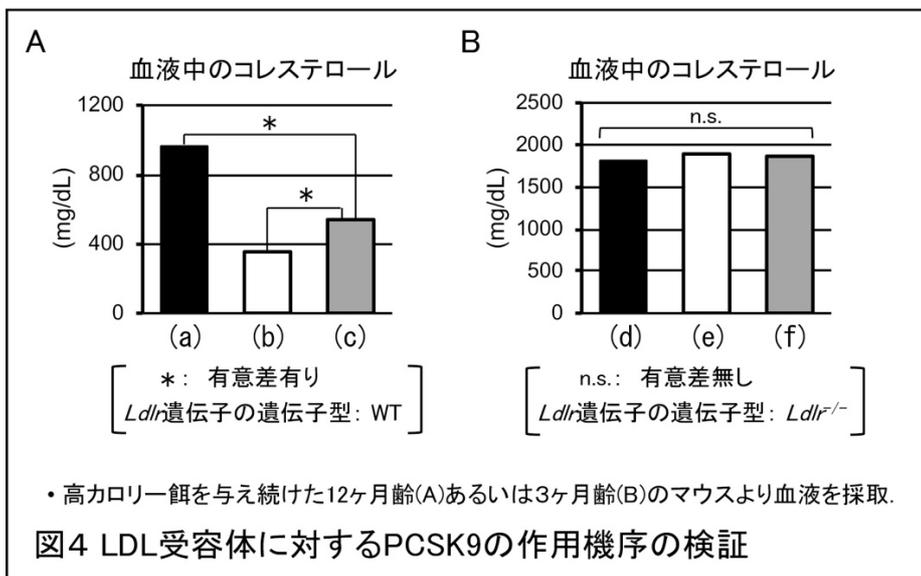


問6. 問5と同じ系統のマウスを使って *Pcsk9* 遺伝子欠損マウス (*Pcsk9*^{-/-}) を作製した。図4 Aは、野生型マウス (WT)、ヒト *PCSK9* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (Tg)、*Pcsk9* 遺伝子欠損マウスにおける血液中のコレステロール量を示している。次にこれら3種類のマウスを用いて、LDL 受容体の遺伝子欠損マウス (*Ldlr*^{-/-}) と交配して生まれてきたマウスについても同様に血液中のコレステロール量をそれぞれ測定した (図4 B)。次の (1)、(2) の問いに答えよ。

(1) 図4 Aの (a) ~ (c) のマウスに該当する PCSK9 の遺伝子型を以下の3つの中からそれぞれ選び答えよ。

{ WT、Tg、*Pcsk9*^{-/-} }

(2) 図4に示した (a) と (d)、(b) と (e)、(c) と (f) のマウスは、PCSK9 に関してそれぞれ同じ遺伝子型である。また図4 Bのデータは、3サンプル間において有意差が無いことを示す。図4の測定結果から、PCSK9 と LDL 受容体の関係について機能面からみた場合に成り立つ解釈を、その根拠と併せて2~3行で述べよ。



問7. PCSK9 の分泌量が多いために、血液中の LDL 濃度が高い患者がいる。PCSK9 を標的としてどのような治療戦略を立てればこの患者の血液中の LDL 濃度を下げることができると考えられるか、作用機序も含めて1~3行で簡潔に説明せよ。