

平成29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

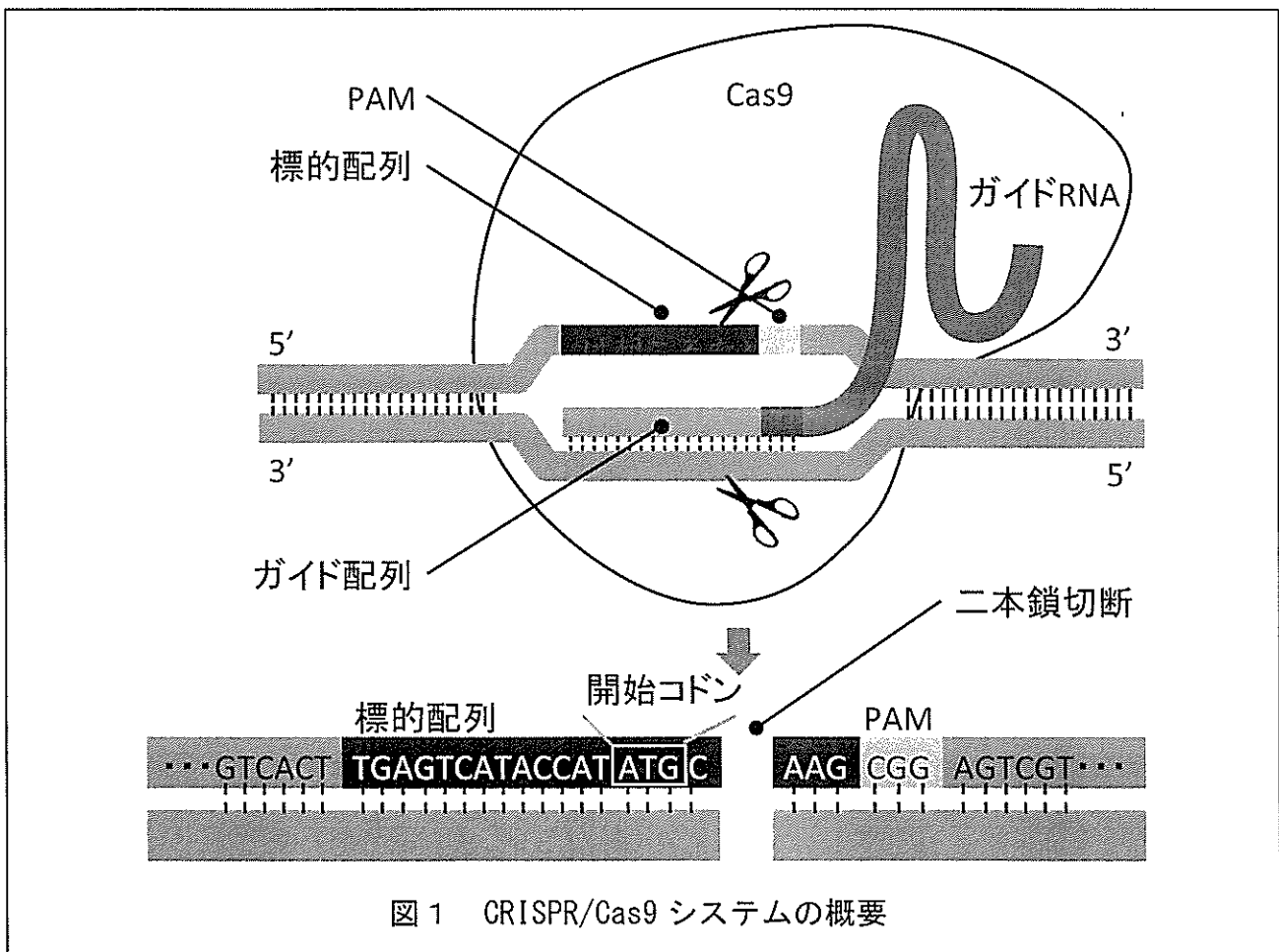
- 1) 解答時間は、60分間である。
- 2) 満点は、100点である。
- 3) 全部で4問題ある。共通専門科目の問題1は必ず解答せよ。さらに問題2～問題4の3問題から1問題を選択して解答せよ（共通専門科目の問題1から問題4までの3問以上を解答した場合は、共通専門科目の全答案を無効とする。）
- 4) 解答は、問題ごとに別々の解答用紙1枚を使用すること。不足する場合は裏面を使用すること。
- 5) 解答時には、まず問題番号をそれぞれ所定の欄に明記すること。
- 6) 特に指示のない場合は、英語で解答してもよい。

問題 1

次の文章を読み、以下の問1～問8の全てに答えよ。

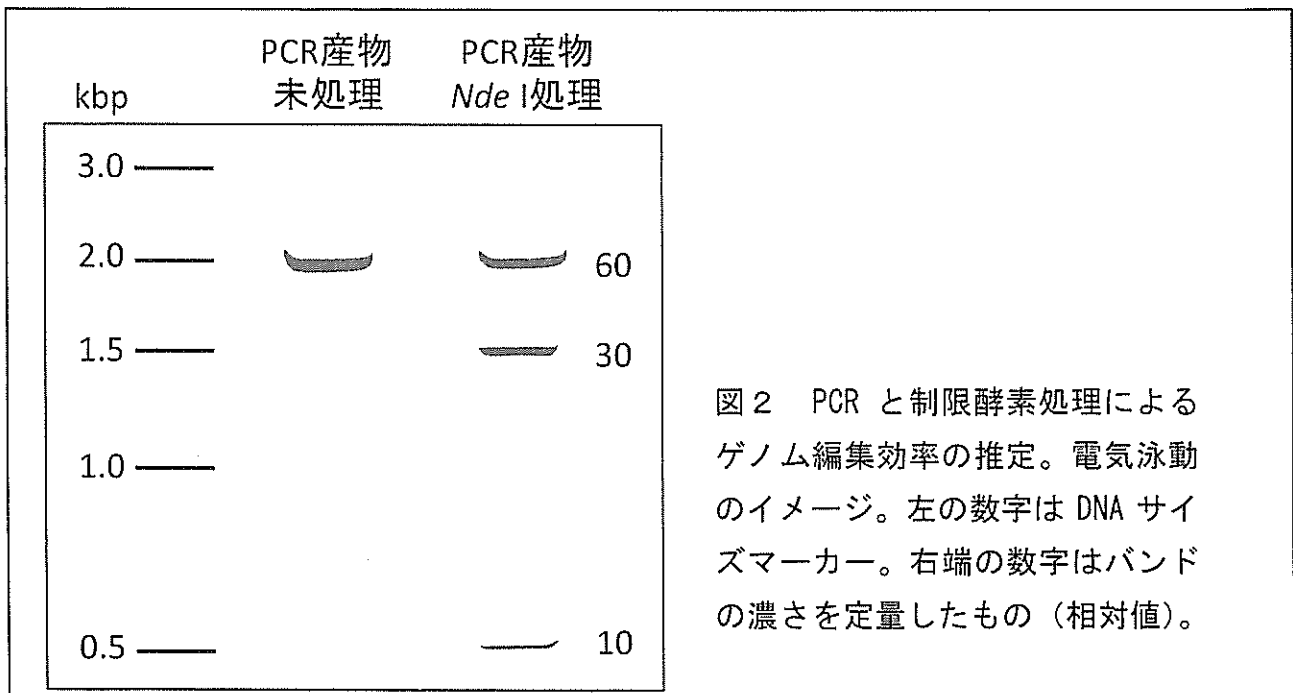
ゲノム編集とは、部位特異的なヌクレアーゼを利用して、思い通りに標的遺伝子を改変する技術である。そのうちのひとつである CRISPR/Cas9 システムは、Cas9 ヌクレアーゼとガイド RNA から構成され、ガイド RNA 中の①標的配列に相補的な 20 塩基のガイド配列が②特異性を決定する。Cas9 が導入された細胞では、ガイド RNA によって認識された標的遺伝子内の配列が③二本鎖切断される。多くの生物では、④DNA の二本鎖切断部位の修復方法は (ア) および (イ) によって行われる。(ア) による修復では、塩基配列の (ウ) や (エ) がしばしば起こるため、結果として遺伝子破壊が起こる。一方で、ドナーとなる DNA 存在下では (イ) による修復が起こり、外来遺伝子を挿入することが可能となる。

よく用いられている CRISPR/Cas9 システムでは、標的配列は 5'-NGG-3'のプロトSpacer隣接モチーフ (PAM) の直前に配置される必要がある。ガイド RNA は、Cas9 ヌクレアーゼを「相補的な塩基対を形成できる標的配列」に誘導し、Cas9 ヌクレアーゼは PAM 配列から 3 塩基程度上流において二本鎖切断を行う (図 1)。



- 問1. 文章中の(ア)～(エ)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2. 下線部①について、標的配列を切断するためのガイドRNA中のガイド配列20塩基を記せ。ただし、ガイド配列は対合する配列と完全に相補的として、5'端を左側として左から右に記すこと。
- 問3. 図1で示すように、真核生物の培養細胞ゲノム中の標的配列に対して、この技術を用いて遺伝子破壊を試みた。ゲノム編集後の十分な数の細胞群からゲノムDNAを抽出し、標的配列を挟むようにPCRを行った。さらに、標的配列中のユニークな*Nde*I (CATATGを認識・切断) サイトを利用し、増幅産物を完全消化したところ、図2のような結果が得られた。この実験から、アレルを単位としたゲノム編集効率は約(オ)%と見積もられるが、実際の効率はそれよりも(カ)と考えられる。ただし、電気泳動のバンドの濃さは断片長と分子数に比例するとする。文章中の(オ)および(カ)に当てはまる適切な数字または語を下のA～Fの中からそれぞれ選べ。

	A	B	C	D	E	F
(オ)、(カ)	30	40	50	60	低い	高い



- 問4. 図1で示すゲノム編集は、あるタンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点近傍が標的であった。遺伝子の機能が実際に欠損しているかを確認するために、配列の確認以外に追加で行うべき実験の1つについて、その目的と方法を2~3行で説明せよ。
- 問5. 下線部②について次の文章を読み、空欄に当てはまる指数を答えよ。ただし、 $\log_{10}2 = 0.3$ とする。

ヒトゲノムは約30億塩基対である。一方で20塩基の認識配列を持つガイドRNAが認識しうる塩基配列の全ての組み合わせは約 10^{\square} 通りである。

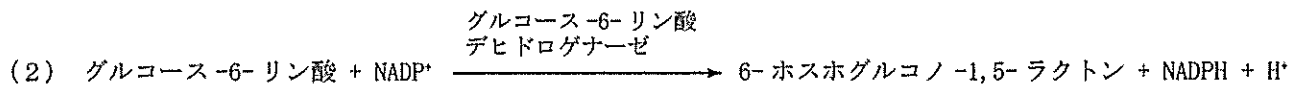
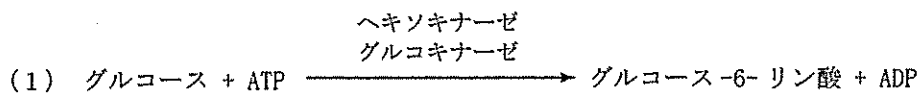
- 問6. 理論上、ガイドRNAは特異性を持たせるのに十分な長さであるにも関わらず、標的とした部位以外でゲノム編集が起こってしまう「オフターゲット作用」が稀に生じる。なぜオフターゲット作用は生じると考えられるか。1~2行で簡潔に説明せよ。
- 問7. 下線部③について、Cas9の触媒領域の一つを失活させたCas9(D10A)は「ニックアーゼ」として機能し、DNA二本鎖のうち的一本鎖を切断する。一方で、ガイドRNAの結合特異性には変わりはないので、Cas9(D10A)はオフターゲット作用部位に送達される可能性はある。近年、これを用いた「ダブルニックアーゼ」によるオフターゲット作用の低減方法が提案されている。その原理について2~3行で説明せよ。
- 問8. 下線部④について、2015年のノーベル化学賞は「DNA修復のメカニズムの解明」であった。受賞した三氏が発見したDNA修復はそれぞれ、(ア) mismatch修復、(イ)ヌクレオチド除去修復、(ウ)塩基除去修復である。(ア)~(ウ)それぞれの修復方法に関する説明に関して、A~Eから最も適切なものを一つ選べ(例(ア)-A)。
- A. DNAグリコシラーゼ酵素群が関わり、変化した部分を加水分解して取り除く修復。
 - B. DNA複製の際に生じた誤りの修正で、1~5塩基対程度の対合しない部位の修復。
 - C. メチルグアニンメチル基転移酵素によるグアニンからのメチル基の除去修復。
 - D. 紫外線によるものを含め、数十塩基対におよぶ比較的大規模な、二重鎖を歪ませるような損傷に対し行われる修復。
 - E. 可視光の紫色や青色を利用した、ピリミジン二量体の相補DNAの修復。

問題2

次の文章を読み、問1～問5の全てに答えよ。

食品中に含まれるグルコースは血液によって全身に運ばれ、主に受動的なグルコース輸送体を介して細胞膜を通過し、細胞内に取り込まれる。細胞内に入ったグルコースはヘキソキナーゼの働きによって①グルコース-6-リン酸へと変換されて細胞内に捕捉され、②解糖系、ペントースリン酸経路、グリコーゲン合成経路等によって代謝される。③肝臓など一部の臓器や組織では、ヘキソキナーゼではなく、同じ反応を触媒するが反応特性の異なるグルコキナーゼが発現している。

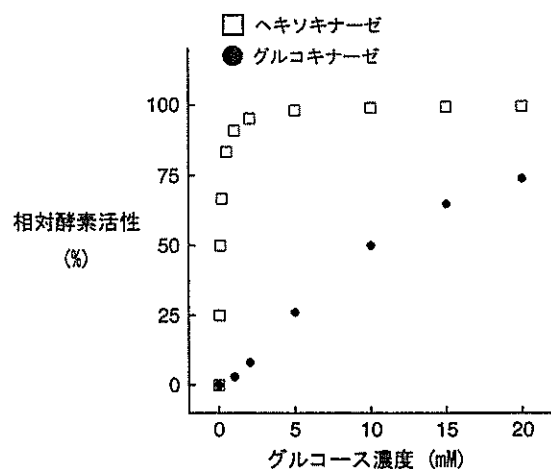
今回、下の反応式に示すように、ペントースリン酸経路の第一段階目の反応を触媒するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの反応と共役させることで、精製したヘキソキナーゼ、およびグルコキナーゼの酵素活性を測定することにした。



(2)の反応によって、(1)の反応で生じたグルコース-6-リン酸と等量の④NADPHが生成する。NADP⁺は340 nmに吸収を持たないのに対し、NADPHは吸収を持つ。そのため、340 nmにおける光の吸収変化を測定することによって、⑤ヘキソキナーゼおよびグルコキナーゼによる反応の進行を定量的に測定することができる。ATP濃度を固定したまま、反応液中のグルコース濃度を変化させて反応速度を測定した。グルコース濃度を横軸、各酵素の最大反応速度に対する相対活性を縦軸にプロットした結果、図1のようなグラフとなった。

図1. 各酵素の反応速度とグルコース濃度の関係

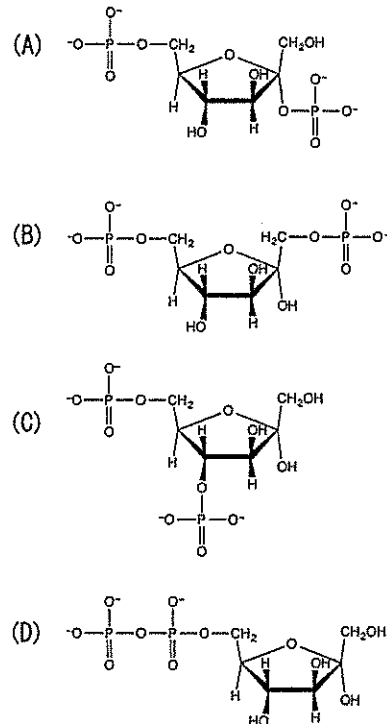
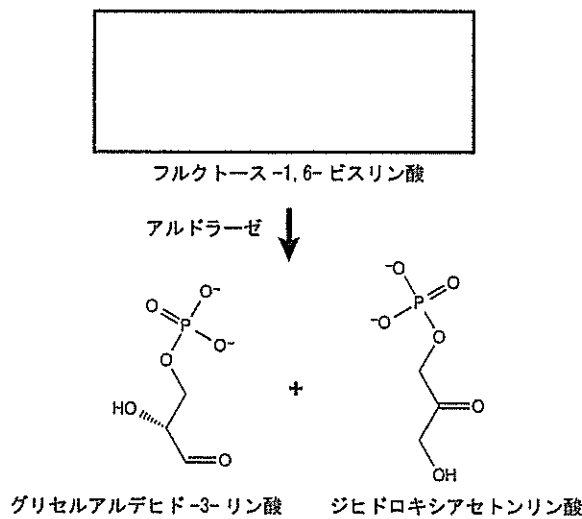
横軸は基質であるグルコース濃度、縦軸は各酵素の最大反応速度に対する相対活性を示す。健康人の血糖値(血中グルコース濃度)は空腹時で約4 mM、食事直後で約7 mMである。



問1. 下線部①について、グルコースよりグルコース-6-リン酸の方が細胞内に保持されやすい理由を3～6行で述べよ。

問2. 下線部②に関する以下の問に答えよ。

解糖系の4番目の反応では、アルドラーゼによってフルクトース-1,6-ビスリン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸が生成する。フルクトース-1,6-ビスリン酸の化学構造として正しいものを(A)～(D)のうちから1つ選べ。



問3. 下線部③について、反応速度測定の結果(図1)も考慮して、肝臓でグルコキナーゼが働く生理的な意義について、および仮に肝臓でグルコキナーゼではなくヘキソキナーゼが働くとした場合に予想される結果について考察し、4～8行で述べよ。なお、肝臓ではインスリン非依存的なグルコース輸送体が存在することが知られている。

問4. 下線部④に関連して、以下の(A)～(E)の記述それぞれについて、細胞におけるNADPHの役割の説明として正しいものに○を、間違っているものに×を付けよ。

- (A) ミトコンドリアの電子伝達系に電子を受け渡し、ATP合成に必要なプロトン駆動力の形成に寄与する。
- (B) 脂肪酸合成反応に必要な電子を供給する。
- (C) 酸化型グルタチオンを還元する反応の還元力を供給する。
- (D) タンパク質のシステイン残基を直接酸化し、ジスルフィド結合の形成を促進する。
- (E) ADPリボシルトランスフェラーゼによるタンパク質のADPリボース化反応において、ADPリボース基の供与体となる。

問5. 下線部⑤に関する以下の問に答えよ。

光路長が1 cmの石英キュベットにグルコース、ATP、NADP⁺およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼが含まれる緩衝液1.90 mLを入れたのち、キュベットを25°Cに設定した分光光度計にセットした。続いて、マグネチックスターラーで混合しながら、波長340 nmにおける吸光度が十分に安定したことを確認した。そののち、0.10 mLのヘキソキナーゼ(全量 1.00×10^{-9} mol)を添加して反応を開始し、吸光度を経時的に測定した。吸光度変化の初速を計算したところ 1.86×10^{-1} /分であった。この条件において、1分子のヘキソキナーゼは平均して毎分何回の触媒反応をおこなっているか。計算式とともに答えよ。

なお、波長340 nmにおけるNADPHのモル吸光係数を 6.20×10^3 (cm⁻¹ M⁻¹)、アボガドロ定数を 6.02×10^{23} とし、反応(2)は反応(1)より十分速いとする。なお、吸光度Aとモル吸光係数 ϵ 、物質の濃度 c (M)、光路長 l (cm)の間には、 $A = \epsilon c l$ の関係が成り立つ。

問題3

次の文章を読み、以下の問1～問8の全てに答えよ。

生体内における哺乳類の細胞は、コラーゲンや（ア）等から成る細胞外マトリックスに囲まれて、その形態および機能を維持している。コラーゲンは組織タンパク質の中で最も量の多いタンパク質である。線維状コラーゲンであるI型コラーゲンは、（イ）-X-Y（XおよびYは任意のアミノ酸）の3つのアミノ酸が多数連続したコラーゲン部分（領域）からなる不溶性タンパク質であり、（イ）に加えてプロリンの含有率も非常に高い。マトリックス内では分子間で①会合し、これが更に集まり棒状の原線維を形成する。②線維芽細胞で産生されるI型コラーゲン前駆体（プロコラーゲン）は、コラーゲン領域の両端にN-およびC-末端非コラーゲン領域を持ち可溶性である。これがまず前述の様にコラーゲン領域で会合し、その後に細胞外で両非コラーゲン領域が除かれ、不溶性となる。コラーゲンと細胞の直接の相互作用はさほど強くない。この両者を繋ぐのは（ア）である。（ア）はコラーゲンと細胞側の受容体③インテグリンを結合し、橋渡し役を務めている。

生体内における細胞の機能、および組織構築には、細胞-細胞間の結合も重要である。ここでは、単層上皮層をなす腸上皮細胞を例に考えてみよう。腸上皮細胞には極性があり、腸内腔側を（ウ）面、基底膜側を基底面と呼ぶ。食物が通過する腸の上皮ではそのバリア機能および強度が重要である。上皮細胞を基底面を下にして横から見ると、細胞間結合には上から、（エ）およびオクルディンを介する密着結合（tight junctions）、カドヘリンを介する接着結合（adherens junctions）およびデスモソーム、並びにコネクソンを介するギャップ結合がある。これらの中で、バリアとして最も重要なのは（オ）である。④接着結合およびデスモソームは共にカドヘリンの細胞質領域に連結タンパクを結合し、これを介してそれぞれ細胞内のアクチンフィラメント、および中間径フィラメントを結合することによって、組織全体の機械的強度を得ている。⑤ギャップ結合領域ではコネクソンが隣同士の上皮細胞を繋いでおり、細胞間の情報伝達にも働いている。

問1. （ア）に入る細胞接着因子として適当なものは以下のどれか、アルファベットで答えよ。

- (a) ラミン、(b) フィブロネクチン、(c) プロラクチン、(d) フィブリン

問2. 上の文章中の（イ）～（オ）に当てはまる適切な語句を答えよ。

問3. 下線部①によって生じる構造は以下のどれか、アルファベットで答えよ。

- (a) 二重らせん構造、(b) 三重らせん構造、(c) β シート構造、(d) 四次構造

問4. 下線部③にあるインテグリンは、複合体構造として以下のどの形態から成っているか、アルファベットで答えよ。

- (a) ホモ二量体、(b) ヘテロ二量体、(c) ホモ四量体、(d) ヘテロ多量体

問5. 細胞外マトリックス中のコラーゲンは不溶性であるが、下線部②にあるように最初に細胞内で合成されるコラーゲン前駆体は可溶性である。この溶解性の変化はコラーゲンのプロセッシングと相関がある。そこで、以下のような実験を行った。

(実験) 線維芽細胞に [14 C] 標識プロリンを加えて数日間培養し、培養上清よりプロコラーゲンを精製した。これに、それぞれ N-および C-末端非コラーゲン領域を切断する、ADAMTS-2 プロテアーゼ (ADAM) および BMP-1 プロテアーゼ (BMP-1) を加えてインキュベートした。次に、遠心により上清と沈殿にわけ、それぞれを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、図1にあるようなオートラジオグラムを得た。

次に別の実験として、同細胞を [14 C] 標識プロリン存在下で培養し、10分後に培地を [14 C] 標識プロリンを除いたものに交換して培養を続け、経時的に細胞を回収した。細胞より細胞表面に付着しているタンパク質を 1 M NaCl を含むバッファーで抽出し、先と同様にオートラジオグラムにて解析し、図2のような結果を得た。

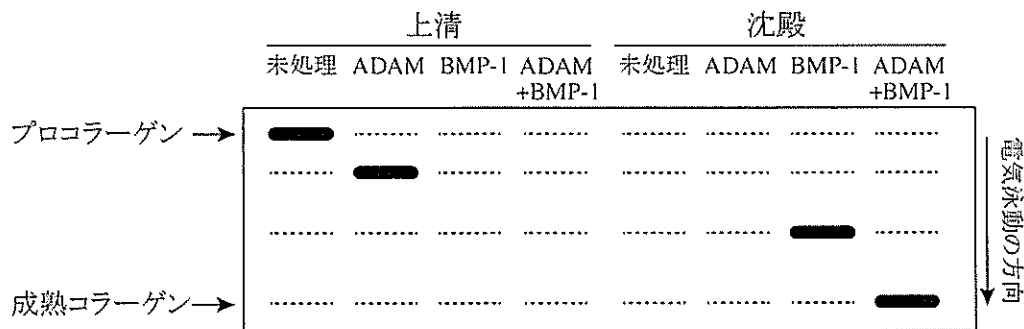


図1

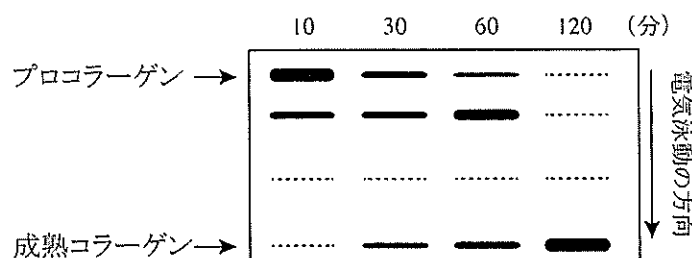


図2

以上の結果から、細胞におけるコラーゲンのプロセッシングと不溶化は、以下の (a) ~ (d) のいずれの様に進むと予想されるか、アルファベットで答えよ。ただし、この細胞は1種類の線維状コラーゲンを合成すると仮定する。

- (a) 最初にプロコラーゲンの N-末端非コラーゲン部分が切断される。次に C-末端非コラーゲン部分が切断され、この段階で不溶性となる。
- (b) 最初にプロコラーゲンの C-末端非コラーゲン部分が切断される。次に N-末端非コラーゲン部分が切断され、この段階で不溶性となる。
- (c) プロコラーゲンの両末端の非コラーゲン部分が同時に切断され、不溶性となる。
- (d) 最初にプロコラーゲンの N-末端非コラーゲン部分が切断され不溶性となる。次に C-末端非コラーゲン部分が切断される。

問6. ある上皮系の培養細胞を使って、細胞-細胞間の接着に関与する機構を検討するために以下の実験を行った。

(実験) シャーレで培養した細胞に 1 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 入り 0.01% トリプシン、または 0.1 mM Ca^{2+} 入り 0.01% トリプシンを加えて 37°C で 15 分静置し、これにトリプシン阻害剤入りの生理食塩水を加えピペッティングにて細胞を剥がした。前者では個々の細胞に分散したが (細胞 A)、後者では細胞がシャーレから剥がれたものの、複数の細胞が集まり、塊を作っていた (細胞 B)。そこで、細胞 B を再度 EDTA 入りの緩衝液で洗ったところ、細胞は分散した (細胞 B')。次に、細胞 A を赤色の蛍光色素で、細胞 B' を青色の蛍光色素で標識し、 Ca^{2+} 入りリン酸緩衝生理食塩水中に懸濁した。続いて、細胞が貼り付きにくいプレートに A および B' を単独または混ぜて移し、37°C で緩やかに揺らしながら 30 分間培養した。その後、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

以下の各文章で正しいものに○を、そうでないものに×をつけ、解答用紙にアルファベットとともに記入せよ。

- (a) A と B' をそれぞれ単独で培養すると A より B' で細胞塊が多くできる。
- (b) A と B' を混ぜて培養すると、赤と青の蛍光が入り混じった細胞塊が主になる。
- (c) B' を再度トリプシン+EDTA で処理した後に単独で培養したが、処理前の B' と結果は変わらない。
- (d) B' を単独で培養して得られた細胞塊は、主に密着結合を介して形成されている。

問7. 下線部④の接着結合領域におけるアクチンフィラメントは、胚発生時の管腔形成にも働いている。図3にある上皮細胞層から管腔が形成される過程におけるその役割を、簡潔に説明せよ。なお、説明の際に図を書いて説明しても良い。

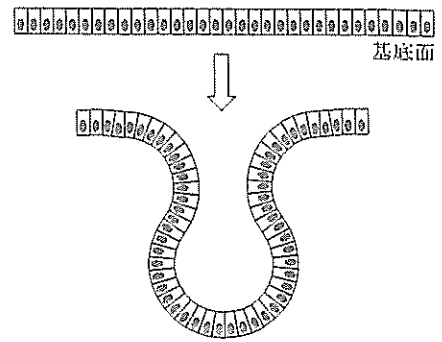


図3

問8. 下線部⑤の構造は上皮細胞だけでなく、心筋細胞の同調的・協調的収縮にも重要である。その理由をコネクソンの構造・性質を交え2～3行以内で説明せよ。

問題 4

次の (A) ~ (C) の文章を読み、以下の問 1 ~ 問 7 の全てに答えよ。

(A) Wnt シグナル伝達経路は、細胞の増殖、分化等を制御する代表的なシグナル伝達経路のひとつである。Wnt は細胞外に分泌されるタンパク質であり、①細胞膜に存在する②受容体 Frizzled タンパク質と結合すると、細胞内で種々のプロセスを誘導し、最終的にはシグナルタンパク質③β-カテニンを安定化する。安定化した β-カテニンは、核内において転写調節因子 TCF と結合して、Wnt 応答遺伝子群の転写を促進する。哺乳類の腸上皮において、Wnt シグナル伝達経路は④幹細胞の維持に必須であることが知られている。

問 1. 下線部①に関連して、細胞膜の脂質二重層の主成分であるリン脂質と、細胞がエネルギーとして脂肪滴に蓄える脂質について、化学的構造の違い、および性質の違い（なぜ一方は二重層を形成し、一方は脂肪滴を形成するのか）を 5~10 行程度で説明せよ。ただし、「グリセロール」「脂肪酸」という言葉を用いること。

問 2. 下線部②は 7 回膜貫通型の受容体である。膜貫通型受容体の膜貫通部位は、主にどのような性質のアミノ酸から構成され、どのような二次構造を取るか 1~2 行程度で答えよ。

問 3. 下線部③に関連して、Wnt シグナルがない場合は、β-カテニンは小さいタンパク質ユビキチンの鎖（ポリユビキチン鎖）と共有結合して、すみやかに分解される。ポリユビキチン鎖と共有結合したタンパク質を識別して分解する巨大分子複合体の名前を答えよ。

問 4. 下線部④に関連して、「幹細胞」の一般的な特性を 2~3 行程度で答えよ。

(B) タンパク質リン酸化酵素 X は、基質タンパク質 Y をリン酸化する活性を持つが、X と Y は直接結合できない。足場タンパク質 Z は、X と Y の両方に結合することにより、X と Y を物理的に近づけ、X による Y のリン酸化を促進する。

問5. 一定量の X と、一定量の Y を混合し、そこに様々な量の Z を加え、Y のリン酸化を検出する実験を行なったところ、図1の結果が得られた。なぜこのような山型のグラフになったのか、4~8行程度で説明せよ。

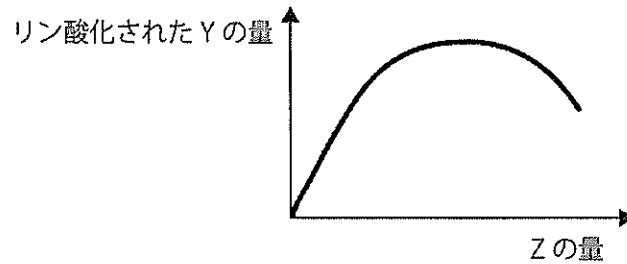


図1

(C) ある動物の初期胚の未分化外胚葉細胞は、神経もしくは表皮へと分化する。この分化誘導過程には、未分化外胚葉細胞に存在するシグナルタンパク質 A、B、C、および D が構成するシグナル伝達経路が関与する。A、B、C、D が作用する順番を決定するため、それぞれの常時活性型を、単独もしくは様々な組み合わせで未分化外胚葉細胞に過剰発現させ、神経もしくは表皮のどちらに分化するか調べた。その結果を表1に示した。

表1

過剰発現させたタンパク質	表現型
常時活性型 A	表皮
常時活性型 B	表皮
常時活性型 C	神経
常時活性型 D	表皮
常時活性型 A + 常時活性型 B	表皮
常時活性型 A + 常時活性型 C	表皮
常時活性型 A + 常時活性型 D	表皮
常時活性型 B + 常時活性型 C	神経
常時活性型 B + 常時活性型 D	表皮
常時活性型 C + 常時活性型 D	神経

問6. この実験結果から、A、B、C、Dが構成するシグナル伝達経路について考察し、図2のようなモデルを立てた。(イ)、(ロ)、(ハ)、(ニ)のどれに、A、B、C、Dが当てはまるか。最も適切な組み合わせを答えよ。ただし、(イ)と(ロ)については、入れ替え可能なので正解は2通りあるが、どちらかを答えれば良い。

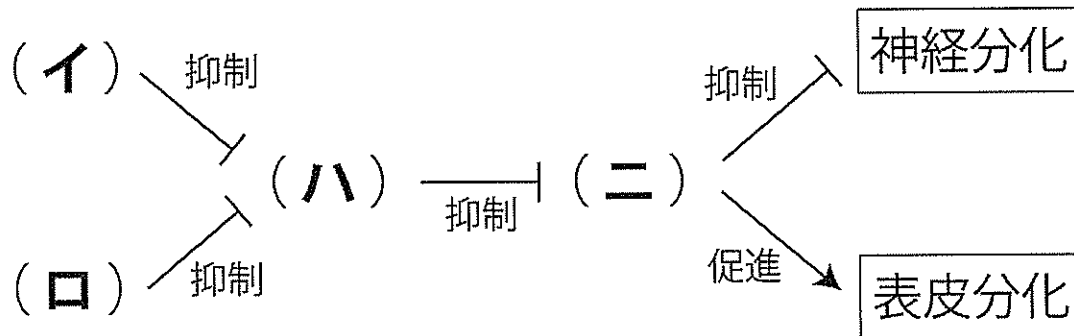


図2

問7. さらに追加の実験として、遺伝子工学的手法により未分化外胚葉細胞の(イ)を完全に欠失させたうえで、常時活性型(ロ)を過剰発現させたところ、神経に分化した。この結果をふまえて、図2のモデルにおける(イ)と(ロ)の関係を考察しなおした。最も適切なものを一つ選べ。

- 考察a (イ)は(ロ)を介して表皮への分化を促進する。
- 考察b (ロ)は(イ)を介して表皮への分化を促進する。
- 考察c (イ)と(ロ)は独立に表皮への分化を促進する。
- 考察d (イ)は(ロ)を介して神経への分化を促進する。
- 考察e (ロ)は(イ)を介して神経への分化を促進する。
- 考察f (イ)と(ロ)は独立に神経への分化を促進する。