

令和3年度
北海学園大学 大学院工学研究科
修士課程 電子情報生命工学専攻
第Ⅱ期入学試験

専門科目A群問題紙

9:30~10:30 (60分)

注意事項

- 出題科目は下表のとおりです。

出 題 科 目
細 胞 生 物 学
—
—
—
—
—
—

- 上記の出題科目のうち出願時に選択した1科目について解答してください。
- 解答用紙には受験番号、選択問題の場合には選択した問題番号を忘れず記入してください。
- 問題紙, 問題紙以外の草案紙, 計算用紙等は全て回収します。
- 机上に置けるものは受験票の他に黒鉛筆・シャープペンシル・消しゴム・時計及び指定された参照許可物です。
- 携帯電話等は、必ず電源を切ってください。
- 試験開始・終了のベルは鳴りません。
- 試験室に入室してから試験終了まで退出を認めません。試験中の発病等やむを得ない場合は、手を挙げて監督者の指示に従ってください。

細胞生物学

1

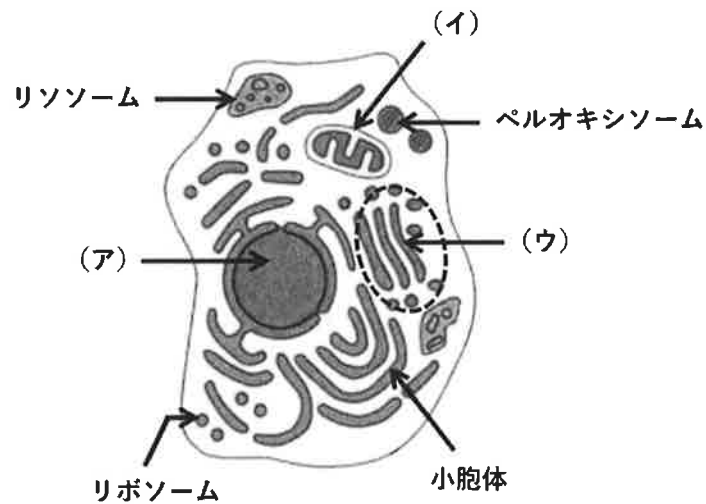
動物細胞内の構造体に関する次の各問に答えよ。

(1) 図中の(ア)～(ウ)の構造体の名称を答え、その細胞機能について説明せよ。(ウ)は小胞体とは異なった機能をもつ構造体である。

(2) 細胞が分裂するM期の各ステージに、(ア)の構造体が起こす構造変化について説明せよ。

1. 前期 (Prophase)
2. 前中期 (Prometaphase)
3. 中期 (Metaphase)
4. 後期 (Anaphase)
5. 終期 (Telophase)

(3) (イ)の構造体の進化的起源を説明する細胞内共生説について解説せよ。この仮説の根拠となった(イ)の構造上の特徴に言及すること。



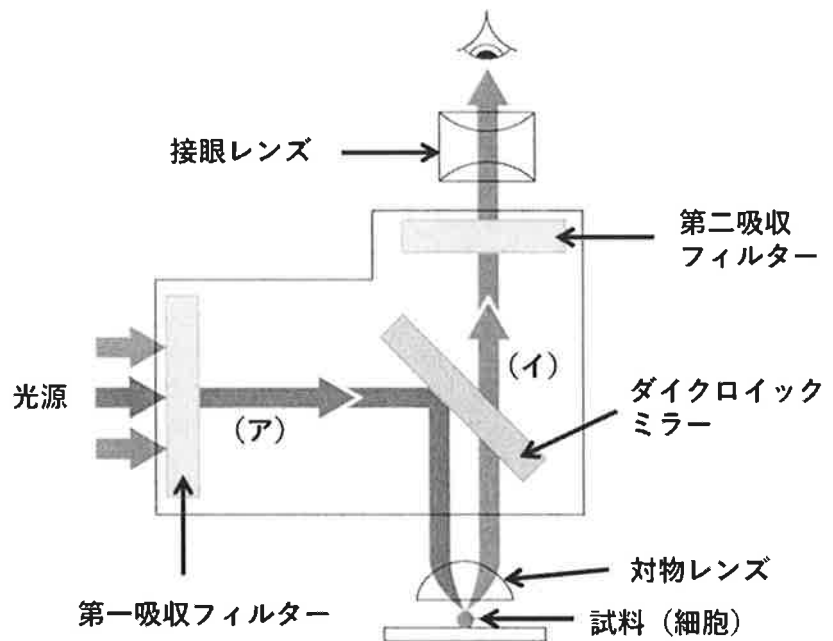
細胞生物学

2

蛍光顕微鏡を用いた細胞内構造の観察手法について述べた以下の文を読み、各問に答えよ。

細胞内構造の観察において、蛍光顕微鏡

(右図)は、細胞内に取り込ませた¹⁾ 蛍光物質もしくは細胞内で発現する²⁾ 蛍光タンパク質が局在する場所を調べるために用いる。蛍光顕微鏡では、光源から照射された光が2組の吸収フィルターを通過するように設計されている。第一吸収フィルターは試料の前にあり、特定の蛍光物質(あるいは蛍光タンパク質)を励起する波長の(ア)光だけを通す。ダイクロイックミラーは、所定の波長を境界にして、短波長側を反射し、長波長側を透過する特性をもつ。(ア)光を反射して対物レンズ光路に送り、それによって蛍光物質(あるいは蛍光タンパク質)が発する(イ)光は透過して、接眼レンズ光路に送る役割を果たす。第二吸収フィルターは、ダイクロイックミラーから漏れ出た(ア)光を完全に遮断し、(イ)光だけを透過する。



- (1) 文中の(ア)と(イ)に入る最も適当な語句を答えよ。
- (2) 下線部1)について、DNAに結合する蛍光物質としてはどのようなものがあるか、1つあげよ。それは何色の光を発するか。
- (3) 下線部2)について、緑色および赤色の光を発する蛍光タンパク質の例をそれぞれ1つずつあげよ。それぞれの蛍光タンパク質を使って、酵母細胞で微小管とミトコンドリアを可視化する場合、どのような手法をとればよいか、簡単に解説せよ。
- (4) 蛍光タンパク質を用いた細胞内構造の可視化手法は、間接免疫抗体法などによる可視化と比べて著しいメリットがある。それはどのような点か、説明せよ。
- (5) 蛍光顕微鏡を用いて、2つの異なった細胞内小器官の動態を観察することを考えよう。あなたならどのような実験を行い、どのようなことを明らかにしたいか、自由に論ぜよ。

令和3年度
北海学園大学 大学院工学研究科
修士課程 電子情報生命工学専攻
第Ⅱ期入学試験

専門科目B群問題紙

10:40~12:30 (110分)

注意事項

- 出題科目は下表のとおりです。

出 題 科 目				
遺	伝	子	工	学
分	子	遺	伝	学
		—		
		—		
		—		
		—		
		—		

- 上記の出題科目のうち出願時に選択した2科目について解答してください。
- 解答用紙には受験番号、選択問題の場合には選択した問題番号を忘れず記入してください。
- 問題紙、問題紙以外の草案紙、計算用紙等は全て回収します。
- 机上に置けるものは受験票の他に黒鉛筆・シャープペンシル・消しゴム・時計及び指定された参照許可物です。
- 携帯電話等は、必ず電源を切ってください。
- 試験開始・終了のベルは鳴りません。
- 試験室に入室してから試験終了まで退出を認めません。試験中の発病等やむを得ない場合は、手を挙げて監督者の指示に従ってください。

遺伝子工学

1

目的の遺伝子の機能を調べるための実験系の準備の一つとして、その遺伝子の翻訳領域全域もしくは領域の一部に対応する DNA をプラスミドと呼ばれる環状の DNA 分子内に挿入する実験がある。この実験に関する以下の説明を読み、各設問に答えなさい。

目的遺伝子の翻訳領域に対する DNA を得る方法の1つとして、cDNA (complementary DNA) の利用がある。真核生物におけるゲノム DNA 上の特定の遺伝子には、転写された RNA から(ア)を受けたのちに最終的な mRNA の配列に統合される(イ)と(ア)の過程で排除されてしまう(ウ)が含まれている。mRNA を鋳型とすることにより、(ウ)が含まれず、主に翻訳領域から構成される cDNA を得ることができる。この反応では、mRNA を鋳型にして、(エ)と DNA ポリメラーゼが cDNA を作製する。

得られた目的遺伝子の cDNA をプラスミドに挿入するための手段として、1 次の①から③を組み合わせた実験が考えられる。

- ① 目的遺伝子に特異的なプライマーセットを用いた PCR
- ② 得られた PCR プロダクトとプラスミドに対する制限酵素処理
- ③ 制限酵素処理された PCR プロダクトとプラスミドを(オ)による酵素反応で共有結合的に連結

これらの実験を経てできた組換えプラスミドを細菌細胞に導入すると、細菌の増殖に伴ってプラスミドが複製される。細菌を溶かしてプラスミドを精製した上で、プラスミドの塩基配列が意図したものになっているかどうかを、2 ddNTP を用いた(カ)法などの DNA シークエンス解析で確認する。これらによって得られた 3 組換えプラスミドを目的とする細胞に導入することで、目的遺伝子の機能解析などの実験が可能になる。

問1 上記の文章の空欄(ア)～(カ)に該当する語句として、最も適切なものを記述せよ。

問2 下線部1に関して、設問(1)～(5)に答えよ。

(1) 細胞から抽出してきた総 RNA (以下に示す mRNA を含む) に対して cDNA ライブラリーを作成した後、翻訳領域を2本の特異的なプライマーによる PCR で増幅させる。次に示す要件に従って、翻訳領域を増幅させるための2本のプライマーを設計せよ。

- 5'末端から3'末端に向けた DNA の塩基配列を「A, T, G, C」で記述
- 片方のプライマーには開始コドン (AUG) の直前に SalI による制限酵素サイトを加え、もう片方のプライマーには終止コドン (UAG) の直後に XhoI による制限酵素サイトを加える
- プライマーと鋳型とのアニール部分の長さは 18 塩基とする

SalI の認識配列と切断個所 (▼で表す。G と T の間で切断されるという意味)

5'.....G▼TCGAC.....3'
3'.....CAGCT▲G.....5'

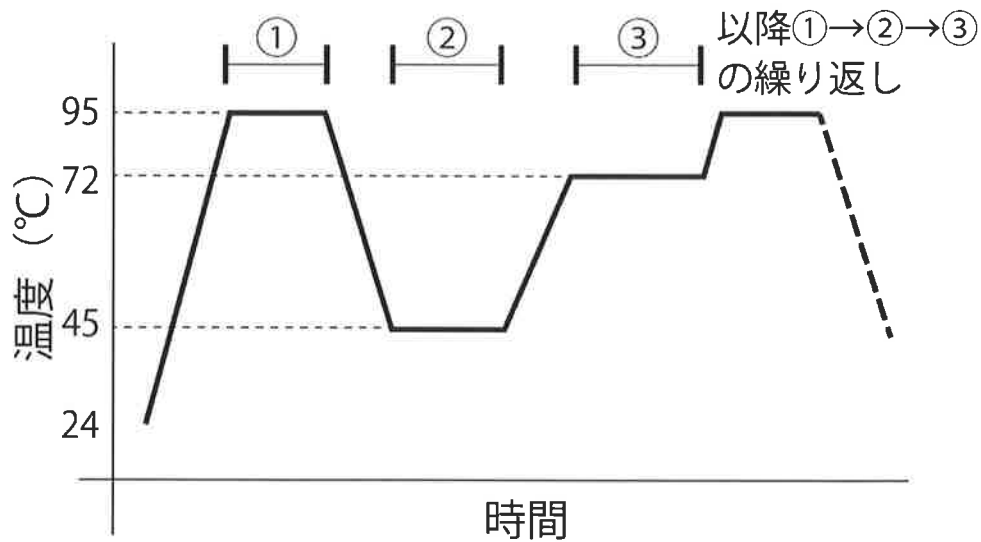
XhoI の認識配列と切断個所 (▼で表す。C と T の間で切断されるという意味)

5'.....C▼TCGAG.....3'
3'.....GAGCT▲C.....5'

< mRNA の配列 (矢印は右端の塩基から次段の左端の塩基が連結していることを表す) >

5'.....CCGCCAGCUCACCAUGGAUGAUGAUAUCGCCGCGCUCG)
▲UCGUCGACAACGGCUCGAGUCCGGCCCCUCCAUCGUCCACC)
▲GCAA AUGCUUCUAGGCGGACUAU.....3'

(2) 上記のプライマーセットを使って、下図に示された温度条件による PCR で目的遺伝子の翻訳領域を増幅させた。PCR 後の溶液をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、目的遺伝子のバンドの他に、幾つかの非特異的なバンド (目的遺伝子のバリエーション等ではない) が現れた。この温度条件のどの個所を変更すると、目的遺伝子の翻訳領域だけを増幅することができそうか。変更した方が良いステップを次ページの図中の①～③から選択し、その理由を説明せよ (作図を用いても良い)。※各ステップでの時間の長さについては、適切に設定されているものとして、この設問では考慮の対象外とする (そのため、グラフには時間のスケールを記載していない)。



(3) PCR の条件を検討することで、目的遺伝子の翻訳領域をシングルバンドで増幅することに成功した。この PCR プロダクトならびにプラスミド DNA を *SalI* と *XhoI* で制限酵素処理し、精製した後で2つを混合し、(オ) による酵素反応で連結させた。これを細菌細胞に導入し、寒天プレート上で培養したところ、2種類のプラスミド DNA を得ることができた。この2つのプラスミドに対して、*SalI* と *XhoI* で制限酵素処理したところ、片方のプラスミドでは切断が生じたが、もう片方のプラスミドでは切断が起こらなかった。片方のプラスミドで切断が生じなかった理由を説明せよ。ただし、この2つのプラスミドには、ともに目的遺伝子の翻訳領域が1つ分入っているものとし、クローニングの各プロセスでイレギュラーな変異は生じていないものとする。

(4) プラスミド DNA を *SalI* で制限酵素処理するのに際して、反応に必要な制限酵素の量を求めよう。制限酵素の量は、unit と呼ばれる単位で表現される。1 unit は $1\mu\text{g}$ の λ ファージ DNA を 37°C 、1 時間で完全に切断するのに必要な酵素量として定義される。 λ ファージ DNA の全長を 5×10^4 塩基対とし、 λ ファージ DNA の中に *SalI* サイトは2カ所あるものとする。また、切断させたいプラスミド DNA の量は $1\mu\text{g}$ であり、プラスミド DNA の全長は 5×10^3 塩基対とする。このプラスミドには *SalI* サイトが1カ所あるものとする。 37°C 、1 時間で、このプラスミド DNA を切断するのに必要な *SalI* は何 unit か (計算の過程も解答欄に記載すること)。 λ ファージ DNA、プラスミド DNA とともに塩基の偏りはなく、1 塩基あたりの平均質量は同じであるとする。

分子遺伝学

1

真核細胞の優れたモデル系である酵母について、次の各問に答えよ。

- (1) よく研究されている酵母種としては、分裂酵母と酒造や発酵食品の製造に利用される酵母の2種類が知られている。下線部の酵母の名称を答えよ。また2つの酵母の分裂様式の違いについて説明せよ。
- (2) 酵母は一倍体で安定に増殖させることができ、二倍体で増殖する生物よりも明確な表現型を示す突然変異体を分離しやすい。これはなぜか説明せよ。
- (3) 制限温度を36°C、許容温度を26°Cに設定して、酵母の条件致死変異株（温度感受性変異株）を分離することを考える。どのようにしてスクリーニングすればよいか、実験の概略を説明せよ。

分子遺伝学

2

分裂酵母の必須遺伝子 X の機能を調べるために以下の実験を計画した。次の各問に答えよ。

X を $hgu1^+$ と命名した。分裂酵母の接合型は h^- と h^+ である。接合型 h^+ の株で温度感受性条件致死変異 $hgu1-533$ を分離した (A 株: 制限温度 36°C 、許容温度 26°C)。同様に接合型 h^- の株で、 $hgu1^+$ と緑色蛍光タンパク質 GFP 遺伝子の融合遺伝子 ($hgu1^+ \cdot GFP$) を組み込んだ株を作製した (B 株)。C 株はヒストン H3 遺伝子 $hht2^+$ と赤色蛍光タンパク質 RFP 遺伝子の融合遺伝子 ($hht2^+ \cdot RFP$) を組み込んだ株である。A~C 株の遺伝型*^{注1)} はそれぞれ以下の通りである。

A 株: $h^+ \ his2-245 \ \Delta \ ura4 \ hgu1-533$

B 株: $h^- \ his2-245 \ \Delta \ ura4 \ hgu1^+ \cdot GFP::kan^R$

C 株: $[?] \ leu1-32 \ \Delta \ ura4 \ hht2^+ \cdot RFP::ura4^+$

- (1) A 株と C 株、B 株と C 株を孢子形成培地上で掛け合わせると、数日後に孢子の形成がみられた。A~C 株のそれぞれ単独では、孢子形成はみられなかった。C 株の接合型を予測せよ。
- (2) B 株と C 株それぞれについて、3つの栄養素 (ヒスチジン、ウラシル、ロイシン) に対する栄養要求性を遺伝型から予測し、ヒスチジン要求性、ウラシル非要求性、ロイシン要求性のようになんて答えよ。
- (3) B 株と C 株を孢子形成培地上で掛け合わせ、最少培地*^{注2)} にカナマイシンを添加した状態で生育させた。この培地上でコロニー形成した株 (D 株) の遺伝型を予測せよ。
- (4) A 株と C 株を孢子形成培地上で掛け合わせ、 $hgu1-533$ 変異の許容温度である 26°C の培養温度下、最少培地上で生育させた。もし $hgu1^+$ 遺伝子座が、 $his2^+$ 遺伝子座、 $leu1^+$ 遺伝子座、 $hht2^+$ 遺伝子座のいずれとも遺伝的にリンクしていない (ゲノム上で近接して存在していない) と仮定するならば、 26°C で生えてきたコロニーの何%が温度感受性 (36°C で生えてこない) を示すと予想されるか、答えよ。もし温度感受性を示すコロニーがほとんどとれなかった場合、 $hgu1^+$ 遺伝子座はどの遺伝子座の近くに存在すると予測されるか、最も可能性のあるものを2つ挙げよ。
- (5) 上記 (4) の掛け合わせにより最少培地上で得られたコロニーのうち温度感受性を示すものを E 株として分離した。E 株の制限温度 (36°C) 移行5時間後*^{注3)} における表現型を蛍光顕微鏡で観察したところ、長く伸びた細胞中に赤く発色する球状の構造体が4個ないし8個存在する細胞が多数見つかった。隔壁の形成は見られなかった。このことから $hgu1^+$ 遺伝子の細胞機能について、どのようなことが予測できるか、論ぜよ。

分子遺伝学

*注1)

*his2-245*変異はヒスチジン生合成に関与する遺伝子の変異で、ヒスチジン要求性の表現型を示す。分裂酵母では、接合型を決定する *mat* 遺伝子座と *his2+*遺伝子座は遺伝的にリンクしている。*leu1-32* 変異および Δ *ura4* 変異はそれぞれロイシンおよびウラシル生合成に関与する遺伝子変異で、それぞれロイシン要求性およびウラシル要求性の表現型を示す。 Δ *ura4* 変異は *ura4+*遺伝子のナル（遺伝子破壊）変異である。*hgu1+::GFP::kan^R* は *hgu1+*遺伝子座の野生型遺伝子の代わりに GFP 融合型遺伝子を挿入したもので、その近傍に抗生物質カナマイシンに対する抵抗性を付与する遺伝子 *kan^R* が挿入されている（*::kan^R*）。*hht2+::RFP::ura4+* は *hht2+*遺伝子座の野生型遺伝子の代わりに RFP 融合型遺伝子を挿入したもので、その近傍に野生型 *ura4+*遺伝子が挿入されている（*::ura4+*）ため、 Δ *ura4* 変異を相補することができる。

*注2)

最少培地は、分裂酵母が生育するのに必要最小限の栄養素しか加えていない培地のことで、野生株は生育することができるが、例えばウラシル要求性株は最少培地にウラシルを添加しない限り生育することができない。

*注3)

この実験において、36℃で培養した分裂酵母の倍加時間は約2時間であったと仮定せよ。