

[生物学基礎]

以下の問 (1) ~ (7) に答えよ。

ある Mg^{2+} チャネルの結晶構造を解析するために、このタンパク質の精製を行った。2種類の生物種 A と B からその遺伝子をクローニングし、図 1 のように GFP 遺伝子をつないで、融合タンパク質の発現系を構築した。この発現プラスミドを導入した大腸菌を培養し、目的の融合タンパク質を発現させた後、膜画分を調製した。この膜画分を可溶化し、ゲル濾過カラムによりタンパク質を分離した。溶出液の 280 nm の吸光度と 508 nm の蛍光強度を測定した結果が図 2 である。

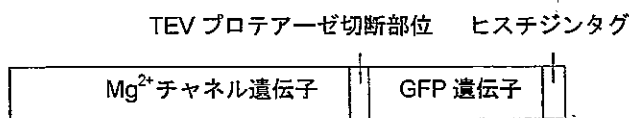


図 1 融合タンパク質発現のための遺伝子コンストラクト

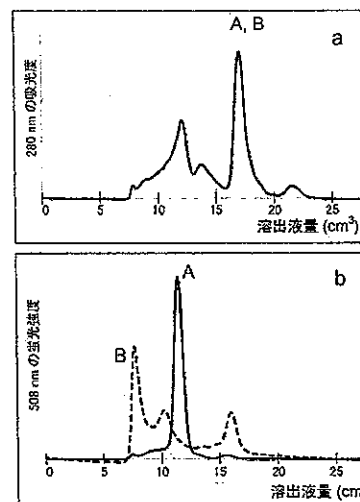


図 2 ゲル濾過カラムからの溶出パターン
(a) 280 nm の吸光度, (b) 508 nm の蛍光強度.
(a) では、生物種 A と B のタンパク質の溶出パターンが重なっている。

- (1) 280 nm の波長の紫外線をよく吸収するアミノ酸の構造を 2 つ描け。また、これらのアミノ酸に共通した特徴を簡潔に述べよ。
- (2) この Mg^{2+} チャネルには、280 nm の波長の紫外線を吸収するアミノ酸が 2 種類含まれており、1 分子あたりモル吸光係数 $5,700 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のアミノ酸が 6 残基、 $1,300 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のアミノ酸が 16 残基それぞれ含まれていた。この Mg^{2+} チャネルを大腸菌で発現させ、 10 dm^3 の大腸菌培養液から精製したところ、280 nm の吸光度が 0.5 の溶液を 10 cm^3 得た。
 - (a) 280 nm におけるこのタンパク質のモル吸光係数 ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を求めよ。
 - (b) この Mg^{2+} チャネルの培養液 1 dm^3 あたりの収量 (mg dm^{-3}) を求めよ。ただし、このタンパク質の分子量は 55,000 であり、用いた吸光度計のセルの光路長は 1 cm とする。
- (3) 下線部①について。この実験で Mg^{2+} チャネルを GFP との融合タンパク質として発現させる利点を 50 字程度で記せ。
- (4) 図 2b から A と B のどちらの生物種由来の Mg^{2+} チャネルを構造解析できる可能性が高いと考えられるか。理由とともに 50 字程度で述べよ。

- (5) この Mg^{2+} チャンネルを結晶化するために、可溶化した膜画分から GFP を取り除いた Mg^{2+} チャンネルを高純度に精製する手順を 70 字程度で述べよ。

この Mg^{2+} チャンネルを発現させた動物細胞をガラスパッチ電極で吸引し、このチャンネルを含む細胞膜の一部を細胞からパッチ状に切り取った。この電極の内側（細胞外に相当）と電極の外側（細胞内に相当）の間を流れる電流 I を測定することで、チャンネルの Mg^{2+} 透過性が測れる。膜電位 V を変えて電流 I を測定し、図 3 の I - V 曲線を得た。ただし、この Mg^{2+} チャンネル以外の内在性のイオンチャンネルの影響は無視できるものとする。

パッチ状に切り取った細胞膜に含まれるチャンネルの分子数を N 、チャンネルの開口率を P_o 、チャンネルのコンダクタンス（抵抗の逆数；単位 $A V^{-1}$ ）を γ とするとき、オームの法則から、

$$I = NP_o\gamma(V - V_{rev})$$

が成り立つ。 V_{rev} はチャンネルの逆転電位とよばれる電位であり、膜電流が 0 A のときの電位である。

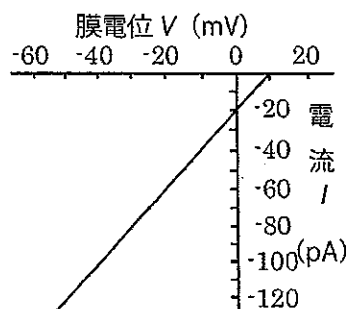


図 3 膜電位と電流の関係

- (6) 図 3 のグラフから、膜電位 -40 mV におけるこの Mg^{2+} チャンネルのコンダクタンス γ ($A V^{-1}$) を求めよ。ただし、 $N=10$ 、 $P_o=0.4$ として計算せよ。
- (7) 膜電位 -40 mV において、この Mg^{2+} チャンネル 1 分子が 1 秒間に透過する Mg^{2+} の数を有効数字 2 桁で答えよ。ただし、電子の電荷を -1.6×10^{-19} C とする。1 秒間に 1 A の電流によって運ばれる電荷が 1 C である。