

[生物化学]

次の文章を読み、以下の問(1)～(7)に答えよ。

ビタミンの一種であるビオチン(図1)は、すべての細胞に微量に存在し様々な生物学的プロセスに関与している。一例としては、脂肪酸の生合成経路において、脂肪酸の二炭素前駆体である a CoA をカルボキシ化して b CoA を生成する酵素反応において補酵素として利用される。また、ビオチンはアビジンと非常に強い相互作用を示すことから、分子生物学やケミカルバイオロジーの研究ツールとしても多用されている。例えば、核酸やタンパク質をビオチンで標識することで、これらの生体分子を選択的に精製したり検出したりすることが可能である。

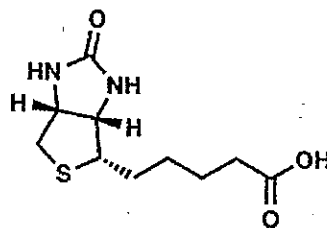


図1. ビオチンの構造式

ビオチン-アビジン相互作用を活用した実験手法の一例として、真核生物由来の全 mRNA を精製した上でその配列を決定するものがある。この実験では、①特定の配列をもつビオチン標識化 DNA オリゴマーを用いる。この DNA オリゴマーとアビジンを固定化したビーズを用いることで、真核細胞の破碎液から mRNA だけを選択的に精製することが可能である。②得られた全 mRNA を相補的 DNA (cDNA) へと変換した後に、③cDNA の配列を解析することで、細胞中に存在する mRNA の配列を決定することができる。

④ビオチンで標識されたタンパク質も様々な用途の実験に活用されている。⑤ビオチン標識化タンパク質を調製するための試薬として、ビオチンのカルボキシ基部分を反応性官能基に変えた様々なビオチン誘導体が市販されている。これらのビオチン誘導体は、適切な緩衝溶液中でタンパク質と混合するだけで、他の試薬を必要とせずにタンパク質中の特定のアミノ酸側鎖と選択的に反応し、ビオチン標識化タンパク質を与える。

- (1) a , b に入る言葉をそれぞれ記せ。
- (2) 下線部①について、真核生物由来の全 mRNA を回収するのに適した DNA オリゴマーの配列の特徴を簡潔に述べよ。
- (3) 下線部②について、精製した全 mRNA を cDNA へと変換する実験操作を簡潔に説明せよ。ただしその際、用いる DNA プライマーの配列と酵素に言及すること。

(4) 下線部③について、以下の問(c), (d)に答えよ。

(c) 以下の DNA 配列解析方法のうち二つを選び、それぞれの方法論の原理を簡潔に説明せよ。

- ・ Maxam-Gilbert 法
- ・ ジデオキシ法 (Sanger 法)
- ・ 次世代シーケンス法 (様々な手法が開発されているが、そのうち一つの原理について説明すればよい)

(d) 全 mRNA 由来の cDNA は様々な配列の混合物であり、Maxam-Gilbert 法やジデオキシ法で配列決定を行うには、単一の配列に分離する必要がある。この分離のために実施される実験操作の一例を示し、必要な手順を簡潔に説明せよ。

(5) 下線部④について、ビオチンで標識したタンパク質を活用した実験の例として以下の様な手法が挙げられる。以下の中から一つを選び、その原理とその実験により何を解析することができるかを簡潔に説明せよ。なお、ビオチン標識タンパク質とアビジンをどの様な形態で利用するかを明記しながら説明すること。

- ・ 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)
- ・ ウェスタンブロット法
- ・ 免疫沈降法 (IP)
- ・ フローサイトメトリー/蛍光活性化細胞選別 (FACS)

(6) 下線部⑤について、下記のアミノ酸の側鎖を選択的にビオチン標識するために適した反応性官能基の例をそれぞれ示せ。名称か構造式のいずれで答えてもよい。

(e) リシン                      (f) システイン

(7) ビオチン-アビジンの相互作用は非常に強く、温和な条件で両者を解離させることはできない。この制限をなくすために開発されたビオチンの改変体として、イミノビオチン (図 2) が知られる。イミノビオチンは pH 9 の緩衝溶液中ではアビジンに結合するが、pH 5 の緩衝溶液中ではほとんど結合しないため、pH 条件に応じて両者の相互作用を制御できる。ビオチンとイミノビオチンの構造の違いに言及しながら、イミノビオチン-アビジンの相互作用がなぜ pH 依存性を示すのかを考察し、簡潔に記述せよ。必要であれば図を用いてもよい。

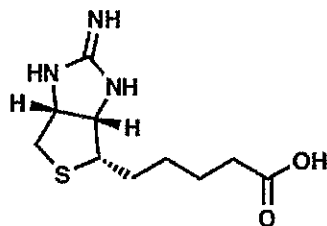


図 2. イミノビオチンの構造式