

[生物化学]

以下の問(1)～(4)に答えよ。

- (1) 酵素活性の速度論的解析を行うためには、基質の消費速度または生成物の生成速度を測定する必要がある。基質や生成物の濃度を経時的に測定するアッセイ法としては、例えばUV/Vis(紫外可視)吸光度測定や、蛍光分光、クロマトグラフィー、放射能測定などの方法が用いられる。これらのアッセイ法は、①連続アッセイ法、②不連続アッセイ法、③カップルアッセイ法の三つに分類される(各アッセイ法の定義については下記参照)。

以下の三つの酵素反応(a)～(c)に対して、上記のアッセイ法①～③のいずれかを用いて基質の消費速度または生成物の生成速度を測定する方法を説明せよ。ただし、アッセイ法①～③はそれぞれ1つずつ選ぶこと。

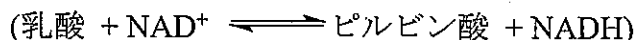
・各アッセイ法の定義

①連続アッセイ法：基質や生成物の濃度を連続して測定し続けるアッセイ法

②不連続アッセイ法：一定の時間間隔で基質や生成物をサンプリングし、その濃度を測定するアッセイ法

③カップルアッセイ法：生成物を酵素により別の物質に変換し検出するアッセイ法

(a) 乳酸脱水素酵素



(b) ピルビン酸キナーゼ



(c) フルクトース-1,6-ビスフォスファターゼ



- (2) 以下のペプチド(d)～(f)について、指定された pH において最も豊富に存在する化学種の総電荷数を答えよ。

(d) Trp-Ile-Cys-His-Ala (pH 2)

(e) Asn-Tyr-Arg-Thr-Met (pH 11)

(f) S-P-D-E-G (pH 7)

- (3) グリコシダーゼは、加水分解反応における立体化学の違いにより、反転型と保持型に分類される。反転型と保持型はいずれも活性部位に二つのカルボン酸側鎖をもつ。

図1は反転型の1段階加水分解反応の機構を電子の移動を表す巻き矢印表記法で示している。図2において、保持型グリコシダーゼの2段階加水分解反応の機構を、中間体の構造を示しつつ、電子の移動を表す巻き矢印表記法を用いて示せ。ただし、図2の(g)と(h)に対応する図を二つ描くこと。

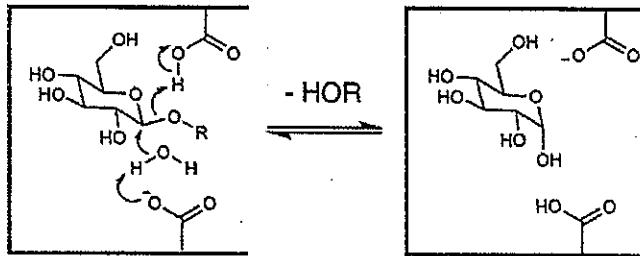


図1. 反転型グリコシダーゼの1段階の反応機構。外側の枠は酵素の活性部位を示す。

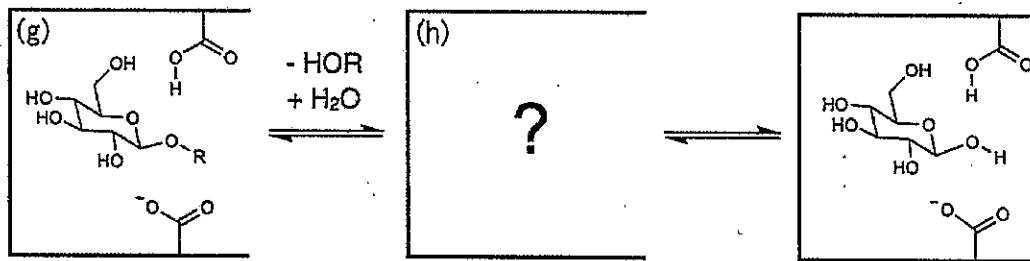


図2. 保持型グリコシダーゼの2段階の反応機構。外側の枠は酵素の活性部位を示す。図中の「？」は経由する中間体の構造に相当する。

(4) 以下の文の下線部㉑から㉔に関して、問(i)から(l)にそれぞれ 50～150 字程度で答えよ。

抗体はB細胞によって産生されるタンパク質で、免疫グロブリンとも呼ばれており、生体内において㉑外来の抗原を認識する。抗体は㉒診断ツールとして用いられ、㉓癌などの疾患の治療法として用いられる。抗体は㉔ポリクローナル抗体として調製される場合とモノクローナル抗体として調製される場合とがある。

- (i) 下線部㉑に関して、抗体がどのようにして抗原を認識するかを説明せよ。ただし、「可変領域」という用語を用いること。
- (j) 下線部㉒に関して、SARS-CoV-2 抗原検査キットにおける抗体の役割を説明せよ。
- (k) 下線部㉓に関して、抗体を用いた癌治療法のメカニズムを説明せよ。ただし、「成長ホルモン」という用語を用いること。
- (l) 下線部㉔に関して、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の調製法の違いを説明せよ。

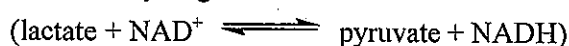
Answer problems (1) through (4)

- (1) Measuring enzyme kinetics involves determining the rate of substrate consumption or product formation. A method to measure the concentration of substrates or products as a function of time is known as an assay. Assays can be based on a variety of experimental techniques including UV/Vis absorbance spectroscopy, fluorescence spectroscopy, chromatography, radioactivity detection, and others. Assay types can be classified as the following three types: ① “continuous assays”, ② “discontinuous assays”, and ③ “coupled assays” (See below for the definitions of these assays). Using each assay type ① through ③ only once, explain how a “continuous assay”, a “discontinuous assay”, or a “coupled assay” could be used to determine the rate of substrate consumption or product formation in the enzymatic reactions (a) through (c).

Definitions

- ① “Continuous assays” are assays in which the concentration of a substrate or a product is analyzed continuously.
- ② “Discontinuous assays” are assays in which aliquots of the solution are taken out at regular intervals and then analyzed to determine the concentration of a substrate or a product.
- ③ “Coupled assays” are assays in which a product is enzymatically converted into a different compound for the purpose of detection.

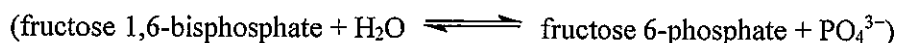
(a) Lactate dehydrogenase



(b) Pyruvate kinase



(c) Fructose 1,6-bisphosphatase



- (2) Provide the most abundant overall charge state of each of the peptides (d) through (f) at the indicated pH value.

(d) Trp-Ile-Cys-His-Ala (pH 2)

(e) Asn-Tyr-Arg-Thr-Met (pH 11)

(f) S-P-D-E-G (pH 7)

- (3) Glycosidase enzymes can be classified as either “inverting” or “retaining”, depending on whether the anomeric stereochemistry is inverted or retained during the hydrolytic reaction. Both “inverting” and

“retaining” glycosidases have two carboxylic acid side chains in their active sites. Shown in Figure 1 is the mechanism of an inverting glycosidase, represented using curved arrow formalism. Following the representation shown in Figure 2, draw the complete mechanism of the two-step reaction of a “retaining” glycosidase, including the structure of the intermediate, using curved arrow formalism. You need to draw two figures corresponding to (g) and (h) in Figure 2.

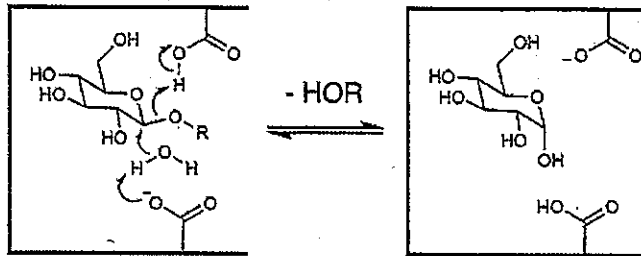


Figure 1. One-step reaction mechanism of an “inverting” glycosidase. The box with one open side represents the enzyme active site.

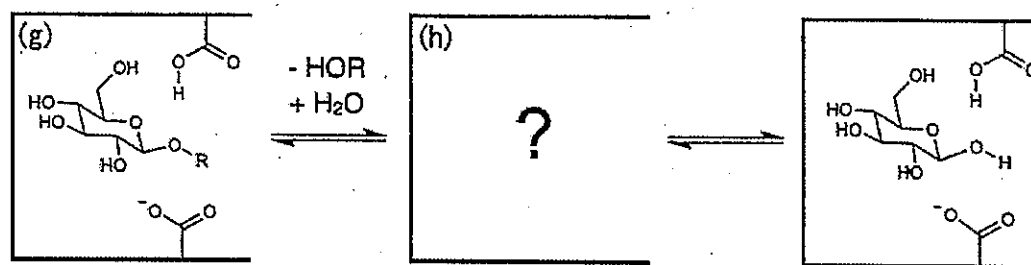


Figure 2. Two-step reaction mechanism of a “retaining” glycosidase which goes through an intermediate complex indicated by “?”.

- (4) Answer questions (i) through (l) in regard to the underlined parts ① through ④ in the following text. Each answer should be approximately 20 to 40 words.

Antibodies, also known as immunoglobulins, are proteins that are produced by B cells and ①recognize foreign antigens in the body. Antibodies can be used as ②diagnostic tools and as ③therapeutics for diseases such as cancer. Samples of antibodies can be either ④polyclonal or monoclonal.

- (i) Regarding the underlined part ①, explain how antibodies are able to recognize an antigen. Your answer should include the words, “variable domain”.
- (j) Regarding the underlined part ②, explain the role of antibodies in a SARS-CoV-2 antigen test kit.
- (k) Regarding the underlined part ③, explain the mechanism of an antibody that could be used as a cancer therapeutic. Your answer should include the words, “growth hormone”.
- (l) Regarding the underlined part ④, explain the key difference between how polyclonal and monoclonal antibodies are generated.