

「微生物学」練習問題解答 6 章

- [1] DNA 複製の際、二本鎖 DNA のうち一方の鎖は 3'側から、もう一方の鎖は 5'側から巻きほどこれる。DNA ポリメラーゼは 5'→3'方向に向けてヌクレオチドを結合し、新しい DNA 鎖を伸長させる。3'側から巻きほどこれる鎖上では、DNA ポリメラーゼが巻きほどこく方向と同じ向きで作用するため、連続的に DNA 鎖が伸長しリーディング鎖となる。一方、5'側から巻きほどこれる鎖上では、DNA ポリメラーゼは巻きほどこく方向とは逆に作用するため、連続的に DNA 鎖が伸長されず短いヌクレオチドの断片がいくつも合成されてラギング鎖となる。

- [2] 相補鎖：5'-TTACGTTGACGCCCTCGTAATACAT-3' アミノ酸配列：MYYEAST

※M:メチオニン, Y:チロシン, E:グルタミン酸, A:アラニン, S:セリン, T:トレオニン

- [3] (1) アンピシリン耐性プラスミドをもった大腸菌との接合によってアンピシリン耐性プラスミドを取得した。
 (2) 人為的な処理により、アンピシリン耐性プラスミドが細胞内に導入される形質転換が起こった。
 (3) アンピシリン耐性遺伝子をもった溶原性ファージの感染によって、アンピシリン耐性遺伝子が染色体またはプラスミド中に導入される形質導入が起こった。
 などによって、大腸菌はアンピシリンに対する耐性を獲得したと考えられる。

- [4] イントロンは、真核生物において mRNA に転写されない DNA 配列部分であり、タンパク質に翻訳される遺伝子部分を分断する形で存在している。エキソンは、イントロンによって分断されたタンパク質をコードする DNA 領域である。

転写後、真核生物の mRNA の 5'末端は、グアニン(G)が付加され、さらにこの G はメチル化されたキャップ構造となる。一方、3'末端は、ポリ A 付加シグナルの 11~30bp 下流でエンドヌクレアーゼによって切断された後、ポリ A ポリメラーゼによってポリ A が付加される修飾を受ける。その後、核内低分子リボ核酸タンパク質の作用による一連のスプライシング反応によってイントロン部分が除去され、エキソンどうしが連結して成熟 mRNA となる。

- [5] PCR に必要な三つのステップは、DNA の熱変性 (thermal denaturation)、DNA の再会合 (reassociation)、そして、DNA の伸長 (extension)である。PCR 反応には、耐熱性 DNA ポリメラーゼ、4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP)、2 価マグネシウムイオン、増幅させる鋳型となる DNA、そして、増幅領域を挟むようにデザインされた 2 種類のプライマーが必要となる。

DNA の熱変性のステップにおいて、反応系の温度を 94° C にすることで鋳型となる DNA や非特異的に会合したプライマーを解離させる。次に、DNA の再会合のステップにおいては、反応系の温度を

段階的にプライマーの溶解温度 (T_m 値) まで、または、溶解温度よりも数度低い値まで、下げることによって、プライマーを鋳型のターゲット部位に会合させる。さらに、DNA の伸長のステップにおいては、反応系の温度を耐熱性 DNA ポリメラーゼの反応最適温度 ($68\sim 72^\circ\text{C}$) に設定することにより、プライマーの 3' 側に dNTP が取り込まれて DNA の伸長が行われる。

PCR 反応では、この三つのステップを、通常 25～30 回繰り返して行うことにより、ターゲットの DNA 断片を指数関数的に増幅することが可能である。

- [6] 通常、pUC18 のマルチクローニングサイトに DNA 断片が挿入されると β -ガラクトシダーゼ遺伝子である lacZ が分断されて酵素活性を失う。しかしながら、挿入される DNA 断片が 3 の倍数の長さ (base pair) であるとき、フレームシフトが起こらずにポリペプチド鎖が β -ガラクトシダーゼの途中に挿入された形の融合タンパク質として発現する。このような融合タンパク質の多くは、タンパク質の立体構造が崩れて酵素活性を完全に失っているか、非常に弱い活性を残すだけなので選別は容易である。しかし、まれに立体障害に影響を与えることなく β -ガラクトシダーゼ活性をほぼ完全に保持したままの場合がある。マイケル君は、このような DNA 断片が挿入されたクローンを拾ったと考えられる。