練習問題

用語

問1

次のa～jの用語に最もよく合致するものを，下の1～10から選びなさい。

a　オリゴヌクレオチド
b　ベクター
c　粘着末端
d　組換えDNA
e　逆翻訳
f　ゲノムライブラリー
g　ゲノム相当
h　cDNA
i　PCR
j　ハイブリッド形成法

1　細菌に導入し，複製，そしてDNA断片を精製するためのDNA分子
2　ベクターに挿入されたある種のDNA断片の集まり
3　逆転写によってRNAからコピーされたDNA
4　一本鎖DNA分子が互いに安定に結合すること
5　DNA断片の多くのコピーを効率よく速く増幅する技術
6　ポリペプチドのある領域における可能な塩基対の配列を決定するコンピュータによる解析方法
7　2つの異なる生物から遺伝物質をもつ。
8　ある生物のすべてのゲノムをもつ十分な長さのDNA断片の数
9　多くの制限断片の末端にある短い一本鎖配列
10　装置によって合成される短いDNA断片

9.1

問2

次の制限酵素でヒトゲノム（3×10^9 塩基対）を完全消化すると，およそいくつの制限断片ができるか？ ただし，各々の酵素の認識配列は（　　）で示され，Nは4つのヌクレオチドのどれかを示す。

a　*Sau*3A（$_{\wedge}$GATC）
b　*Bam*HI（G$_{\wedge}$GATCC）
c　*Sfi*I（GGCCNNNN$_{\wedge}$NGGCC）

問3

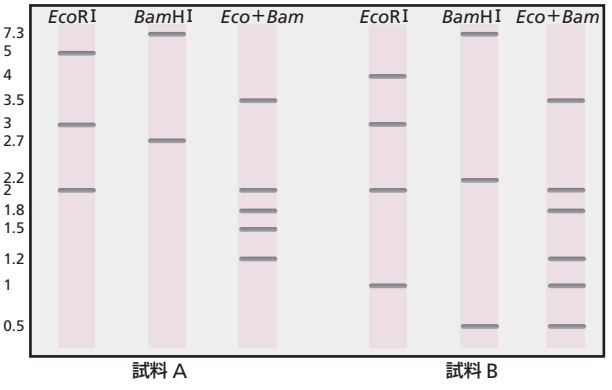
電気泳動でなぜ長いDNA分子は短いDNA分子よりゆっくり動くのか？

問4

9 kbのDNAを含む環状のプラスミドをもっていて，*Eco*RIと*Bam*HI部位の地図をつくりたい。*Eco*RIでプラスミドを切断し，DNAをゲルで泳動すると9 kbの単一のバンドが見えた。*Bam*HIで切断しても，同じ結果が得られた。両方の酵素で切断すると，6 kbと3 kbの2つのバンドが見えた。この結果を説明し，制限地図を描きなさい。

問5

線状のバクテリオファージのゲノムDNAには20塩基の一本鎖が末端にある（これらは「粘着末端」であるが，この場合制限酵素分解によってつくられたものではない）。これらの粘着末端は環状DNAを形成するために結合する。それぞれの試験管内で線状あるいは環状のDNAが*Eco*RIあるいは*Bam*HIで，あるいは2つの酵素の混合物で完全に分解した。その結果をここに示す。



a　DNA分子のどちらの試料（AあるいはB）が環状を表すか？
b　線状DNA分子の長さの合計はいくつか？
c　環状DNA分子の長さの合計はいくつか？
d　線状DNA分子の制限地図を描きなさい。すべての制限酵素部位を*Eco*RIあるいは*Bam*HIと印をつけなさい。

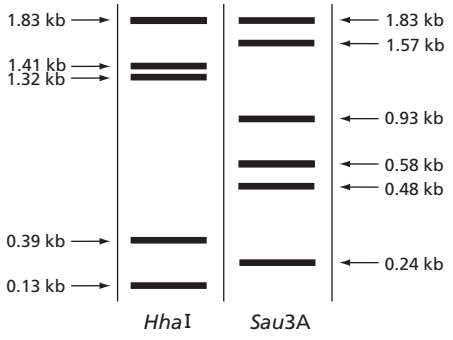
問6

記載された制限酵素で環状プラスミドを切断後，下に示す断片がみられた。プラスミドの制限地図を描きなさい。

*Eco*RI：7.0 kb
*Sal*I：7.0 kb
*Hin*dIII：4.0，2.0，1.0 kb
*Sal*I＋*Hin*dIII：2.5，2.0，1.5，1.0 kb
*Eco*RI＋*Hin*dIII：4.0，2.0，0.6，0.4 kb
*Eco*RI＋*Sal*I：2.9，4.1 kb

問7

一端に*Eco*RI部位，もう一端に*Hin*dIII部位があるヒトDNAの断片を*Eco*RI部位で標識する。この分子を制限酵素*Hha*Iあるいは*Sau*3Aで部分消化し，分解産物をアガロースゲルで分離する。このゲルのオートラジオグラフがここに示されている。



a　*Eco*RIから*Hin*dIIIの断片は何塩基対か？

b　*Hha*Iと*Sau*3A認識部位の位置と一方の端からの距離を示すこの断片の地図を描きなさい。

c　同じように標識した同じ断片を今度は*Hha*Iで完全消化し，アガロースゲルで分離した。エチジウムブロマイドで染色したゲルとオートラジオグラフィーの予想される図を描きなさい。

9.2

問8

人工染色体とは何か？ また，分子遺伝学にどのように役に立つか？

問9

ベクターの選択マーカーはどのような役に立つか？

問10

なぜ，真核生物を研究する遺伝学者は，しばしばcDNAライブラリーを構築するのに，細菌の研究をしている遺伝学者はほぼ絶対につくらないのだろうか？ なぜ，細菌の遺伝学者は望んでいても，cDNAライブラリーをつくるのが難しいのか？

問11

プラスミドベクターpBS281は，DNA分子中に制限酵素*Bam*HI（G^GATCC）で切断されるたった1つの部位がある。ヒトDNAは，多くの部位を認識する酵素*Mbo*I（^GATC）で部分的に切断する。これらの2つの分解DNAをいっしょに結合する。pBS281DNAがヒトDNA断片と結合された分子だけを考え，2つの異なるDNA間の結合領域に関する，以下の問題に答えなさい。

a　pBS281とすべてのヒトDNA断片の結合領域のどのぐらいの比率が*Mbo*Iで切断されるか？

b　pBS281とすべてのヒトDNA断片の結合領域のどのぐらいの比率が*Bam*HIで切断されるか？

c　pBS281とすべてのヒトDNA断片の結合領域のどのぐらいの比率が*Xor*II（C^GATCG）で切断されるか？

d　pBS281とすべてのヒトDNA断片の結合領域のどのぐらいの比率が*Eco*RII（Pu Pu A ^ T Py Py）で切断されるか？ ただし，PuとPyはプリンとピリミジンを表す。

e　*Bam*HIで切断される結合領域のどのぐらいの比率がヒトDNAの切断箇所がヒト染色体の*Bam*HI部位でないケースから生じるか？

問12

次の4つの異なるヒトライブラリーについて考えなさい。ゲノムライブラリー，脳のcDNAライブラリー，肝臓のcDNAライブラリー，そして単一のゲノム配列（繰り返しDNAのない）ライブラリー

a　挿入DNAがほぼ同じ大きさだとして，どのライブラリーが異なるクローンを最も多くもっているか？

b　もっている配列の点から，これらのどれが他と重複していないと予想できるか，説明しなさい。

c　これらの4つのライブラリーは，ライブラリーのクローンを構築する開始材料の点でどのように異なるか？

問13

分子生物学とキンギョソウを専門にする園芸家として，キンギョソウの花の色の遺伝子の特徴を知るためにゲノムライブラリーをつくる必要がある。

a　各遺伝子のクローンをライブラリーがもっているということに関して，95％の確信をもつためにいくつのゲノム相当をつくらないといけないか？

b　ゲノム相当の数を保証するために，分離しスクリーニングしなければならないクローンの数をどのようにして決定するか？

問14

突然変異体が重篤なヒトの病気を引き起こす，ある遺伝子を研究している分子生物学者だとしよう。まわりの調節配列を含んで，遺伝子は200 kbのDNAにわたっている。最初から最後までのコード領域の塩基は140 kbで10個のエキソンと9個のイントロンに分かれている。エキソンは全部で9.7 kbで，イントロンは130.3 kbである。研究のために，次のようなデータを得たい。

a　隣接する配列を含むすべての遺伝子の完全なクローン
b　コード配列を含むが非コード配列は含まないクローン
c　この遺伝子で最も一般的な病気を起こす突然変異があるエキソン3のクローン

挿入DNAの大きさにもとづいて，これらのクローンの各々を得るのにどのベクターを使い，そしてなぜそれを使用するか？

問15

ソマトスタチン遺伝子を含む49 bp *Eco*RI 断片は，下に示すベクター pWR590に挿入されている。挿入断片の配列は下に示す通りである。

```
5′ AATTCGATCCTATCAACACGAAGTGAAAGTCTTACAACCCATGAATTCG 3′
3′ GCTAGGATAGTTGTGCTTCACTTTCAGAATGTTGGGTACTTAAGCTTAA 5′
```

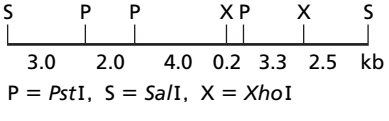
pWR590ベクターの隣接する制限酵素部位間の距離は図に示されている。ソマトスタチン遺伝子をベクターにクローニングする前と後の*Eco*RI（G^AATTC）あるいは*Mbo*I（^GATC）で切断した図はどのようなものか？ ただし，Eは*Eco*RI，M は*Mbo*I を示している。



pWR590

問16

ショウジョウバエ（*Drosophila*）の発生にはたらく*Notch* 遺伝子は，酵素*Sal*I で切断してつくられるショウジョウバエのゲノムDNAの制限断片内に含まれている。いくつかの制限酵素（*Sal*I，*Pst*I，*Xho*I）によるショウジョウバエの制限地図をここに示す。



数字は隣接する制限酵素部位間の距離を示す。この断片は5.2 kbの細菌のプラスミドベクターの*Sal*I 部位に粘着末端による結合でクローニングされる。プラスミドベクターには*Pst*I あるいは*Xho*I の制限酵素部位がない。ベクターとショウジョウバエ断片をもつプラスミドの*Sal*I 分解（単独で），*Pst*I 分解（単独で），*Xho*I 分解（単独で）した産物のゲル電気泳動と染色後の予想されるパターンを図に描きなさい。また，断片の大きさをキロベースで示しなさい。

問17

動物ウイルスSV40と細菌のプラスミドの両方の配列を含む発現ベクターは，大腸菌と動物細胞の両方でポリペプチド産物をつくるのに使用される。

a　2つのまったく異なる種類の細胞の種類で，ベクターとして使用されるこの種類のプラスミドに必要な一般的な性質を書きなさい。
b　ヒトタンパクを大腸菌で発現するのに何が必要か？

問18

学部学生の研究指導員が課題を割り当てた。カエルのDNAを*Eco*RI で切断した断片を，中央に*Eco*RI 部位のある*lacZ* 遺伝子をもった大腸菌プラスミドに挿入しなさい（p.277，図9.8を参照）。指導員はプラスミドを*Eco*RI で切断後，アルカリ性ホスファターゼで処理しなさいと指示する。この酵素はDNA鎖の5′末端のリン酸基を除く。それからカエルのDNA断片をベクターに加え，DNAリガーゼで2つを結合する。指導員の方法には，完全にはしたがわずに，アルカリ性ホスファターゼで処理したプラスミドとアルカリ性ホスファターゼで処理しないプラスミドそれぞれに結合させる。その他の結合に使う混合物は同じである。リガーゼの反応が完了したあと，リガーゼ産物の一部分を大腸菌に形質転換し，細胞をアンピシリンとX-Galを含む寒天培地に広げる。次の日にアルカリ性ホスファターゼで処理したプラスミドで形質転換した培地では，100個の青色のコロニーと1個の白色のコロニーが見つかり，アルカリ性ホスファターゼで処理していない培地では100個の白色のコロニーと1個の青色のコロニーが見つかった。

a　2つの培地で見つかった結果を説明しなさい。
b　なぜ，研究指導員はよいほうを指示したのか？
c　なぜ，プラスミドベクターをアルカリ性ホスファターゼで処理し，ベクターに加えるDNA断片を処理しないのか？

9.3

問19

白頭ワシの遺伝子からつくったプローブを使用して，フクロウから過敏症酵素（訳注：こんな酵素は実在しない。冗談の名前）遺伝子のクローンを得る段階をここに列記した。これらを適切な順に並べなさい。ただし，複数の正解がある。

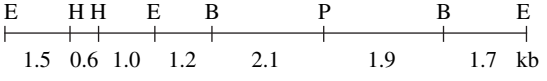
a　BACベクターDNAと，フクロウのDNAをリガーゼと混合する。
b　ニトロセルロース紙を紫外線照射し，乾燥させる。
c　フクロウ細胞からゲノムDNAを抽出する。

d　オートラジオグラフィーを行う。
e　過敏症酵素の遺伝子に対する標識したDNAプローブをつくる。
f　制限酵素*Hind*Ⅲで完全にBACベクターDNAを切断する。
g　コロニーをレプリカするために，ニトロセルロース紙を寒天表面に置く。
h　DNAプローブをニトロセルロース紙と保温する。
i　寒天と栄養を含む寒天培地に細菌をまき，増殖させてコロニーをつくる。
j　フクロウのゲノムDNAを制限酵素*Hind*Ⅲで部分消化する。
k　細菌を形質転換する。

問20

a　次に記す10 kbのクローニングしたDNAの制限地図があるとすると，各々の酵素，あるいはリストした酵素の組合せで線状DNA断片を切段するとどの大きさの断片が見えるか？
（1）*Eco*RⅠ　（2）*Bam*HⅠ　（3）*Eco*RⅠ＋*Hind*Ⅲ
（4）*Bam*HⅠ＋*Pst*Ⅰ　（5）*Eco*RⅠ＋*Bam*HⅠ

b　最後の3つの二重切断では，どの断片が4 kb *Bam*HⅠ断片からつくられたプローブでサザンブロットによりハイブリッドを形成するか？



問21

オゾン教授は生まれ故郷のロサンゼルスでスモッグのレベルを減少させる多量のオゾン分解酵素をつくる仕事に没頭している。自然界では，タンパクはヒューと呼ばれる珍しい細菌によってつくられる。オゾン教授はタンパクのアミノ酸配列を部分的に決定し，タンパクを認識する抗体ももっている。そのタンパクをコードする遺伝子をクローンしたい。遺伝子のクローンをつくり，同定することのできる2つの異なる方法を示し，この酵素を大量につくるのにどのように取りかかればよいか示しなさい。

問22

ある細菌（*Bacillus subtilis*）から非常に面白いタンパクをコードする遺伝子をクローンし，研究をしている。そして，ある種のエビに感染する珍しく，あまり研究されていない*Beneckea nigripulchritudo*から相同遺伝子を分離したい。相同遺伝子をもつクローンをハイブリッド形成法によって同定するために縮重したコードをもつプローブをつくろうと決めた。縮重した量が潜在的な問題である，なぜならプローブにより多くの型の異なるDNAが含まれていると，ハイブリッドを形成する実験で，シグナル–ノイズの割合が低下するからである。どのようにして縮重を最小にすることができるか？ プローブの長さや逆転写で合成するために選ぶ領域などの要因をできる限り特異的に述べなさい。

問23

下に列記したさまざまな制限酵素でヒトゲノムDNAを切断した。これらのDNAをアガロースゲルで電気泳動した。ゲルで分離したDNAをエチジウムブロマイドで染色し，蛍光の写真を撮った。ゲルのDNAはサザンブロットをつくるのにニトロセルロース紙に転写し，ブロットには両端に*Eco*RⅠ部位のあるクローニングされたヒトDNAに放射活性をつけた5 kbの長さの断片をプローブとした。各々の切断によりサザンブロットをX線フィルムで感光してみられる黒いバンドの大きさは下のとおりである。

*Eco*RⅠ：5 kb
*Kpn*Ⅰ：2.5 kb，6 kb
*Hind*Ⅲ：8 kb
*Eco*RⅠ＋*Kpn*Ⅰ：4 kb，1 kb
*Eco*RⅠ＋*Hind*Ⅲ：5 kb
*Kpn*Ⅰ＋*Hind*Ⅲ：2.5 kb，4.5 kb

a　なぜ，これらの切断DNAはポリアクリルアミドゲルではなくアガロースゲル電気泳動で分離されたか。
b　エチジウムブロマイドで染色したゲルの写真で何が見えるか述べなさい。
c　この問題でサザンブロットのX線フィルムでみられた黒いバンドの大きさの合計は，報告されたすべての切断DNAと同じではない。しかし，制限地図（例えば，問5，6，15，16）に関する問題では，特定のDNA試料のすべての切断物は大きさの合計が同じ断片をつくる。この違いを説明しなさい。
d　サザンブロットの結果を説明する制限地図を描きなさい。
e　dで描いた制限地図にこれらのDNAが局在するヒト染色体のセントロメア–テロメアの方向を示すことができるか？

9.4

問24

PCRを使用して常染色体劣性形質のフェニルケトン尿症（phenylketonuria：PKU）の患者のゲノムDNAからフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（phenylalanine hydroxylase）をコードするヒト常染色体遺伝子の約1 kbエキソンを増幅させたい。

a　ヒトゲノムの配列がすでに決定されていると仮定して，

なぜPCR増幅を最初に行いたいのか？

b 1ナノグラム（1×10^{-9}g）の染色体DNAを鋳型として使用して，PCR反応を行うときの鋳型分子の数を計算しなさい。ただし，各々の1倍体ゲノムがたった1つのフェニルアラニンヒドロキシラーゼ遺伝子をもっていて，また1塩基対の分子量が660 g/モルと仮定しなさい。ヒトゲノムは3×10^9塩基対をもっている。

c 25回PCRサイクル行い，各々のサイクルの収率が前のサイクルのちょうど2倍だと何分子PCR産物分子が得られるか計算しなさい。合計すると，これらのPCR産物の量はいくらになるか？

問25

下に示す*CFTR*遺伝子の最後のタンパクをコードするエキソンの一部である標的DNA配列を増幅する。このためには，下のどのプライマーを使用するか？

```
5′ GGCTAAGATCTGAATTTTCCGAG ... TTGGGCAATAATGTAGCGCCTT 3′
3′ CCGATTCTAGACTTAAAAGGCTC ... AACCCGTTATTACATCGCGGAA 5′
```

a　5′ GGAAAATTCAGATCTTAG 3′,
　　5′ TGGGCA ATAATGTAGCGC 3′
b　5′ GCTAAGATCTGAATTTTC 3′,
　　3′ ACCCGTTATTACATCGCG 5′
c　3′ GATTCTAGACTTAAAGGC 5′,
　　3′ ACCCGTTATTACATCGCG 5′
d　5′ GCTAAGATCTGAATTTTC 3′,
　　5′ TGGGCA ATAATGTAGCGC 3′

問26

問25はPCRプライマーのデザインについて，いくつかの興味深い問題を提起している。

a PCRの重要性は複雑なゲノムからDNAの1つの領域を増幅することができるという事実に由来する。問25に対する答えとして選んだ2つのプライマーがヒトゲノムDNAの試料から*CFTR*遺伝子のたった1つのエキソンだけを増幅することがなぜわかるのか？

b 図9.16（p.292～293）に示したPCRのプロトコールでは，使用される各々のプライマーは16～26ヌクレオチドの長さであるべきだと記載している。
（i）なぜ下限は約16ヌクレオチドなのだろうか？
（ii）上限の26ヌクレオチドは絶対的でない。PCRの応用でもっと長いプライマーを使用することが可能であるが，潜在的に困難となる危険性を含んでいる。より長いプライマーについて，どのような厄介な問題や不都合があるか？

c ある個人のゲノムDNAに問25の答えでつくったプライマーの1つに1塩基ミスマッチがあるとする。ミスマッチがプライマーの5′末端あるいは3′末端にある場合，どちらがこのゲノムDNAからPCR産物を得やすいか？また，その理由を書きなさい。

問27

問25で示された最後のタンパクをコードするエキソンによってコードされ，アミノ酸配列N...Leu Arg Ser Glu Phe Ser Glu...Cで始まり，N...Trp Ala Ile Met（C末端）で終わるCFTRタンパクの一部を大量に精製したい。適切なPCR産物をpMoreベクターにクローニングすることによって，この過程を開始する。pMoreの配列の一部は下に示す。pMoreベクターは大腸菌に形質転換されると，大量のマルトース結合タンパク（MBP）をつくる。ベクターとともに示すアミノ酸配列はMBPのC末端に対応する。クローニングをするために，pMoreベクターとPCR産物の両方を制限酵素*Eco*RI（G^AATTC）と*Sal*I（G^TCGAC）で切断したあと，断片を結合する。ベクターはこれらの酵素に対して1つの部位のみもっている。

```
5′...AGGATTTCAGAATTCGGATCCTCTAGAGTCGACCTGTAGGGCAA...3′
     ArgIleSerGluPheGlySerSerArgValAspLeu  pMore ベクター
```

a PCR産物がベクターに結合したときにつくられる融合タンパクを描きなさい。融合タンパクに対するMBPの一部とCFTRの方向はどのような向きか？

b 1つではなく2つの制限酵素でベクターとPCR産物を切断するのにどのような利点があるか？

c 目的とする組換えDNA分子を構築できるPCRプライマーをつくりなさい。
注意（i）問25で示した配列には*Eco*RIも*Sal*I部位もない。
（ii）PCRプライマーの適切な場所にヌクレオチドを付加することができる。
（iii）制限酵素がはたらくのに制限酵素部位のどちらかの側に約5ヌクレオチドを必要とする。この問題は大変難しいが，遺伝子の構造と組換えDNA技術についての情報を多くまとめる助けになるだろう。

d MBPは糖のアミロースとマルトースに結合することができる。MBPのC末端の最後の20アミノ酸は，この性質に必要ではない。化学的にアミロース樹脂（アミロースが共有結合で結合している樹脂）を合成することは可能である。これらの要因がCFTRタンパクの領域を大量に精製するのにどのように役立つか？

9.5

問28

本章で考察したいくつかの技術は，特に制限地図とサザンブ

ロットやオリゴヌクレオチドプローブでライブラリーをスクリーニングするなどのDNAハイブリッド形成法にもとづく方法は，珍しい生物の遺伝子を研究する際に未だにしばしば使用されている。しかしながら，ヒトや酵母，線虫，ショウジョウバエ，マウスなど，モデル生物の遺伝子を研究する際に，これらの技術は21世紀では20世紀後半より稀にしか使用されなくなった。2000年で何が変わり，その代わりにどのような新しい技術ができたのか？

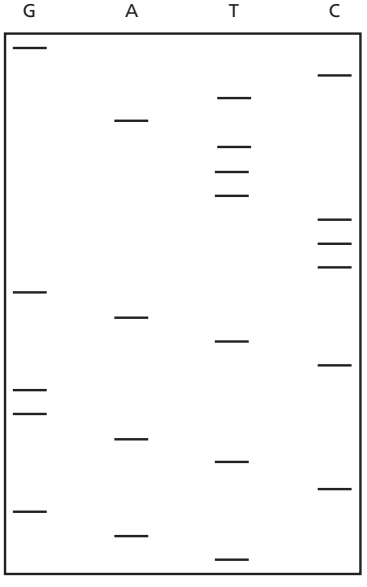
問29

生物工学で使用される次の過程のうち，どれが特異的な酵素に依存しているか？ それらの酵素は何か？ 酵素にもとづかない過程の基礎は何か？

a　DNAの結合
b　特異的な部位でのDNAの切断
c　非特異的な部位でのDNAの切断
d　DNAハイブリッド形成法
e　DNA配列解読
f　cDNA合成
g　PCR

問30

a　次の塩基配列解読のオートラジオグラフを示された場合，この塩基配列の反応に使用された鋳型鎖の配列について何がいえるか？
b　配列解読の鋳型がmRNA様の鎖であるとして，mRNAのできるかぎり完全な配列を書きなさい。
c　ゲノムの部分はコード領域内にあるか？ 答えを説明しなさい。



問31

下の配列を直接ゲルから読んだ。

5′ TCTAGCCTGAACTAATGC 3′

a　この配列を読んだオートラジオグラフを示す図を描きなさい。
b　この配列は遺伝子の中央のエキソンに由来すると仮定すると，この新しく合成された鎖あるいは鋳型鎖は遺伝子のmRNAと（TがUの代わりにあることを除いて）同じ配列をもっているか？ また，そのように答えた理由を説明しなさい。
c　遺伝子暗号表を使用して18塩基のメッセージから翻訳されたヘキサペプチド（6アミノ酸）のアミノ酸配列を書きなさい。また，どちらがペプチドのアミノ末端なのか示しなさい。

問32

下の図はヒトの細胞に由来するゲノムDNAの増幅によってつくられた，あるPCR産物の自動塩基配列解読装置から得られた結果を描いたものである。波形の左から右の方向のピークは，DNAの短いほうから長いほうに対応する。ピークの高さは重要でない。赤色はT，緑色はA，黒色はG，紫色はCを示す。

a　波形の左末端の緑色のピークは何を意味するか？ 可能なかぎり，正確に書きなさい。
b　波形によって現れるDNAの配列を5′から3′の方向に書きなさい。
c　「残基位置」が意味するのは何であると考えられるか？ すなわち残基位置1に位置するのは何か。
d　残基位置370の明らかな異常を説明しなさい。

