

ゲノム医科学 試験問題・解答例および資料(第6問差し替え版)

平成23年2月14日

1. ある遺伝子のコーディング領域のゲノム塩基配列を2名(1氏と2氏)の個体で調べたところ下記の通りであったとする。この領域のSNPのジェノタイプ判定実験デザインについて以下の設問に答えよ。

1: 5' - GTCCGGGAGTTGGGCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACCGAATTCAAAACTGTCAGTGTGGGACCTGCT

2: 5' - GTCCGGGAGTTGGGCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACCGAACTCAAAACTGTCAGTGTGGGACCTGCT

設問1. 5'側から数えて何番目の塩基がSNPであるか述べよ。

(解答例)

1: 5' - GTCCGGGAGTTGGGCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACCGAATCAAAACTGTCAGTGTGGGACCTGCT

2: 5' - GTCCGGGAGTTGGGCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACCGAACCAAAACTGTCAGTGTGGGACCTGCT

したがって43番目がSNP。

設問2. このSNPのジェノタイプを多数の検体で判定するためのDNAチップ実験を樹立するために、まずこの領域のgenomic PCRを設定する。PCR産物の長さが69塩基対となるような19塩基のフォワードプライマーと19塩基のリバースプライマーの塩基配列の例を書きなさい。

(解答例)

プライマーは元のDNAの5'-3'の方向と順方向がフォワードプライマーForward Primer、逆方向がリバースプライマーReverse Primerである。DNAポリメラーゼは元のDNAを3'→5'の方向に読むので、元のDNAに相補的な塩基配列を準備する。

したがって

Forward: 5' - GTCCGGGAGTTGGGCGAGT - 3'

Reverse: 5' - AGCAGGTCCCACACTGACA - 3'

設問3. 上記のgenomic PCR産物とハイブリダイゼーションさせるべきチップに搭載する17mer程度の2種のプローブ配列の例を書いて判定の理論を説明しなさい。

(解答例)

[1]: 5' - CAGTTTTGAATTCGGTG - 3'

[2]: 5' - CAGTTTTGAGTTCGGTG - 3'

このようにプローブを準備する。PCRのリバースプライマーにはビオチン標識受容体を結合させたものを使いPCRで試料DNAを作る。資料DNAに[1][2]のプローブでハイブリダイズさせる。アルカリホスファターゼで標識したとき[1]が発色すれば43番目はTであり、[2]が発色すれば43番目はCであることがわかる。

プライマー設計条件

増幅サイズ	80~150bp (300bp程度までは増幅可能)
プライマーのサイズ	17~25塩基
GC含量	40~60% (望ましくは、45~55%)

Tm 値	2つのプライマーの Tm 値をそろえる Tm 値の計算は、専用のソフトウェアで行う OLIGO: 63℃ < Tm < 68℃ Primer3: 60℃ < Tm < 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3'末端） T/C の連続 (polypyrimidine)は避ける A/G の連続(polypurine)は避ける
3'末端配列	3'末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける 3'末端塩基は、G または C が望ましい 3'末端塩基が T であるプライマーは避ける
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける プライマー3'末端が 2 base 以上相補する配列を避ける
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する
RT-PCR 用プライマー	エキソンジャンクションにプライマーを設計すると、ゲノム DNA 由来の増幅が起こらない

設問 4. 制限酵素 *EcoRI* の認識配列は GAATTC である。*EcoRI* を使用する PCR-RFLP 法を用いて 1 氏と 2 氏のこの領域の SNP のジェノタイプを判定する方法について説明せよ。

(解答例)

EcoRI は

5' - GAATTC - 3'

3' - CTTAAG - 5'

という塩基配列の部分で認識し、

5' - G AATTC - 3'

3' - CTTAA G - 5'

のように切断する。SNP の部分が *EcoRI* の認識配列である。

まず PCR で試料 DNA を作り、それを *EcoRI* で酵素反応させる。次に生成物を電気泳動し、元の DNA の塩基数 69 よりも少ない塩基のバンドが 2 本出ると *EcoRI* で切断されたと考えられるので 43 番目は T となり、1 氏の DNA だとわかり、1 本のバンドのみが検出された場合は *EcoRI* で切断されなかったと考えられるので 43 番目は C となり、2 氏の DNA だとわかる。

設問 5. DNA チップと PCR-RFLP 法以外の SNP のジェノタイプ判定方法にどのような方法があるかを列挙して説明しなさい。

(解答例)

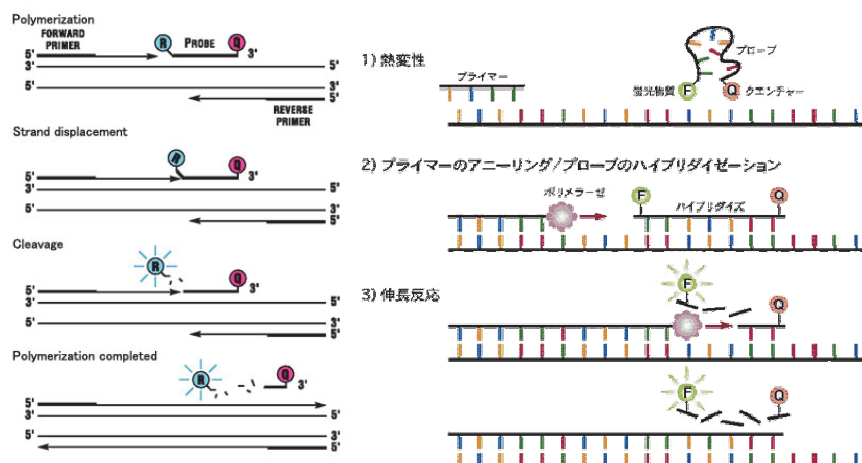
PCR-SSCP…Single Strand Conformation Polymorphism

DNA に SNP があると熱変性させて一本鎖にした DNA の立体構造が違ってくる。この一本鎖 DNA を電気泳動して移動度の違いを見て SNP かどうか判定する方法。ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた場合の、SSCP による変異検出手法の概略は次の通りである。

- (1) 特定の遺伝子領域の切り出し（または PCR による増幅）により試料 DNA を得る
- (2) ホルムアミドの存在下で試料 DNA を熱変性（加熱・急冷）させる これにより二本鎖 DNA が乖離して一本鎖となり、それぞれが分子内で水素結合して高次構造を形成する。
- (3) 熱変性させた試料 DNA をポリアクリルアミドゲル で電気泳動
- (4) 銀染色等により検出する

TaqMan…リアルタイム PCR の蛍光標識プローブの一つ。TaqMan プローブは、5'末端を蛍光物質で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチドである。

まず、PCR プライマーの間に 2 つの蛍光色素を持ったオリゴヌクレオチドプローブ（TaqMan プローブ）をセット。



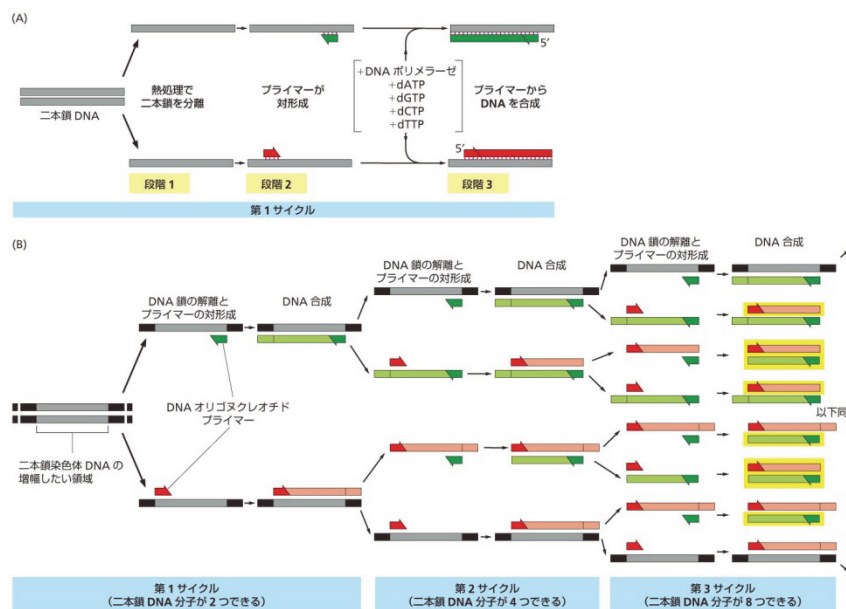
R の蛍光色素(右図では F)はプローブが分解されないうちは発光がおさえられている。

次に Taq ポリメラーゼによってプライマーから伸長反応をつづけます。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解されると 2 つの蛍光色素のうち、R が強い発光を発するようになる。Real-time PCR システムではこの蛍光を検出する。ここで、PCR 反応が行われてプローブが分解されなければ蛍光は検出されないということから、目的遺伝子の有無を測定できることになる。

設問 6．PCR の意義と方法を説明せよ。さらに各反応ステップを図示して説明せよ。

(解答例)

Molecular Biology of THE CELL 5th Edition
©2010 Newton Press / ©2008 Garland Science



[PCR の意義]

自分の望んだ特定の DNA 断片（数百から数千塩基対）を選択的に膨大に増幅させることができる。極めて微量な DNA 溶液で増幅でき、増幅に要する時間が 2 時間程度である。プロセスが単純で、全自動の卓上用装置で増幅できる。

[PCR の方法]

準備として増幅対象の DNA 領域の両端の塩基配列を決定し、対応するプライマーを用意する。このときプライマーは、増幅予定の 2 本鎖 DNA の両鎖それぞれの 3'側に結合する相補配列である 20 塩基程度のものを用意する。必要なものは、増幅対象 DNA、1

対のプライマー、DNA ポリメラーゼおよび DNA 合成の素材（基質）であるデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）、そして酵素が働く至適塩濃度環境をつくるためのバッファー溶液であり、それらを混合し PCR 装置にセットする。

(1) 反応液を 94° C 程度に加熱し、30 秒から 1 分間温度を保ち、2 本鎖 DNA を 1 本鎖に分かれさせる。

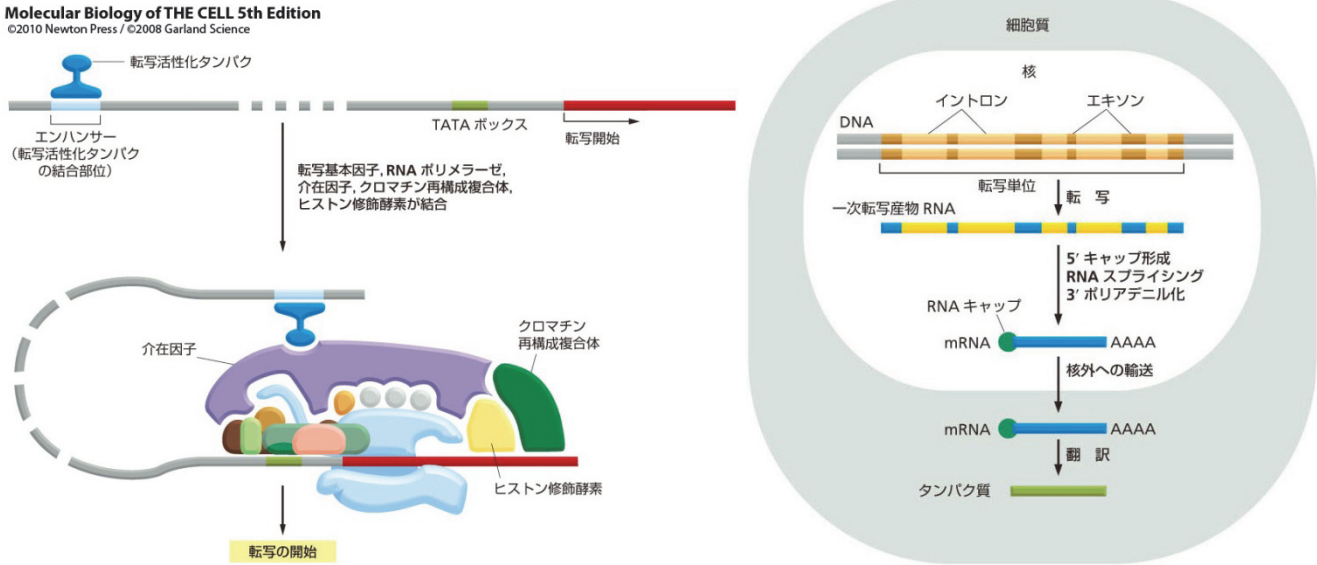
(2) 60°C程度（プライマーによって若干異なる）にまで急速冷却し、1 本鎖 DNA とプライマーをアニーリングさせる。

(3) プライマーの分離がおきず DNA ポリメラーゼの活性に至適な温度帯(72°C程度)まで再び加熱する。DNA が合成されるのに必要な時間、増幅する長さによるが通常 1 分から 2 分、この温度を保つ

ここまでが 1 つのサイクルで、以後、(1)から(3)までの手順を繰り返していく事で特定の DNA 断片を増幅させる。

2. エキソン、イントロンとプロモーター、エンハンサーを図示して説明せよ。さらに一次転写物が修飾されて成熟メッセンジャーRNA を形成するまでをスプライシングの分子機序を含め分子生物学的に説明せよ。授業と教科書の情報を総合的に論じることを期待している。

(解答例)



エキソン exon

真核生物の遺伝子の中で、転写されてメッセンジャーRNA となり、発現する翻訳領域。タンパク質のアミノ酸配列を指令する。

イントロン intron

真核細胞の遺伝子の中にある非翻訳領域で、RNA 分子に一旦転写されるが、mRNA ができる際に RNA スプライシングによって取り除かれる。

プロモーターpromoter

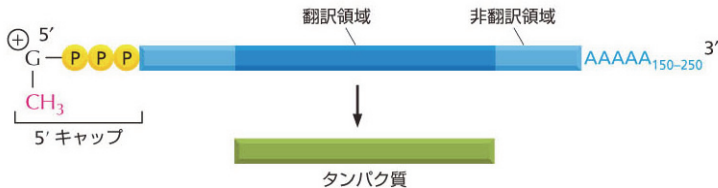
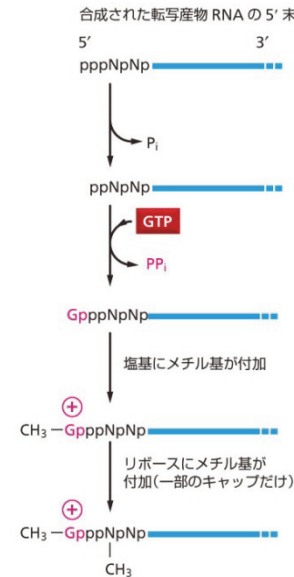
DNA にあるヌクレオチド配列の1つ。RNA ポリメラーゼが結合して転写を開始する部位。

エンハンサーenhancer

転写調節因子が結合する DNA の調節配列で、数千塩基対離れた場所にあっても、遺伝子の転写速度に影響を及ぼす。

Molecular Biology of THE CELL 5th Edition

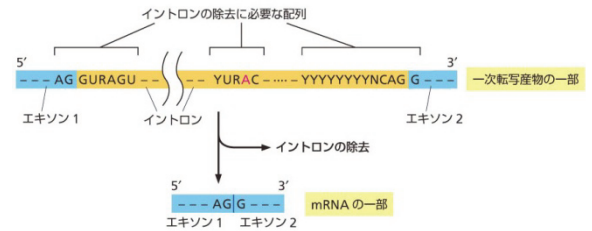
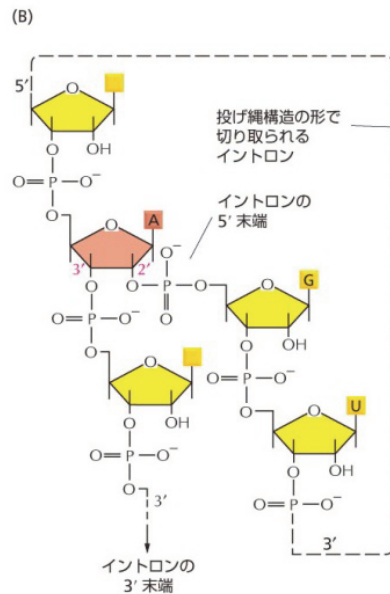
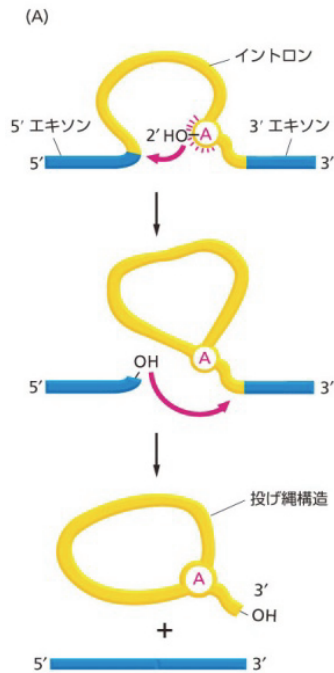
©2010 Newton Press / ©2008 Garland Science



一次転写物 RNA は RNA キャップ形成とポリアデニル化、スプライシングという修飾を受ける。

RNA キャップ形成は mRNA になる転写産物の 5'末端(転写で最初に合成される末端)をメチル基を持つグアニンが付加されるという修飾。これは RNA ポリメラーゼが 25 ヌクレオチド程度の RNA を合成したところに行われる。

ポリアデニル化は転写したばかりの mRNA の 3'末端への数百ヌクレオチドのアデニンの反復配列の付加である。



mRNA を作るには、まずエキソンとイントロンを含めた遺伝子全体が転写される。キャップ形成後、ポリ A 尾部が最終的に付加されるが、その付加はスプライシングの後の場合と、スプライシングの最終反応が終わる前の場合とがある。イントロンにある特定配列を snRNP(核内低分子リボ核タンパク粒子)が認識し、イントロン中の分岐点のアデニン(A)が 5'スプライス部位の糖ーリン酸主鎖を攻撃して切断。切断されたイントロンの 5'末端がこのアデニン(A)のリボースの

2'-OH 基に共有結合して、分岐構造が完成。次に、遊離したエキソンの 3'-OH が第 2 のエキソンの先頭と反応して、2 つのエキソンが繋ぎ合わされて連続した翻訳配列となる。イントロンは投げ縄構造の形で外れ、最終的に分解される。

3. 代謝経路と信号伝達経路の概念上の違いについて、それぞれ代表的に経路または回路を例示した上で説明せよ。

(解答例)

代謝経路は細胞内のみで行われる有機物の一連の連鎖的な化学変化のルートであり、生命の維持に不可欠である。代謝経路では、元の分子が段階的に修飾を受け、別の物質に変化する。最終産物は消費されるか、次の代謝回路に回されるか、細胞内に貯蔵されるかである。たとえば尿素回路では発生した尿素は排出され、フマル酸はクエン酸回路で代謝されオルニチンはミトコンドリア内に移動される。

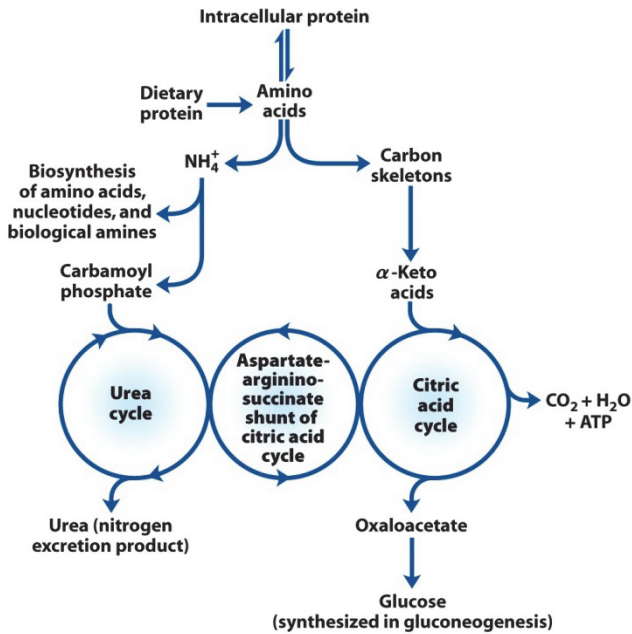
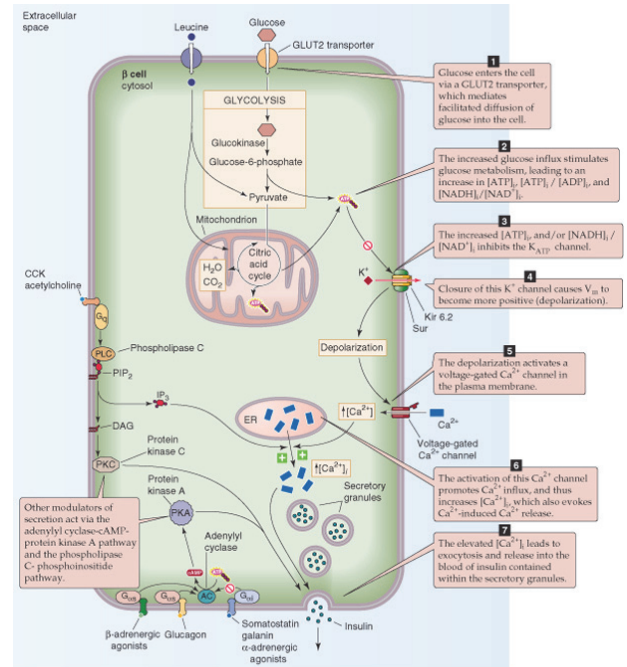
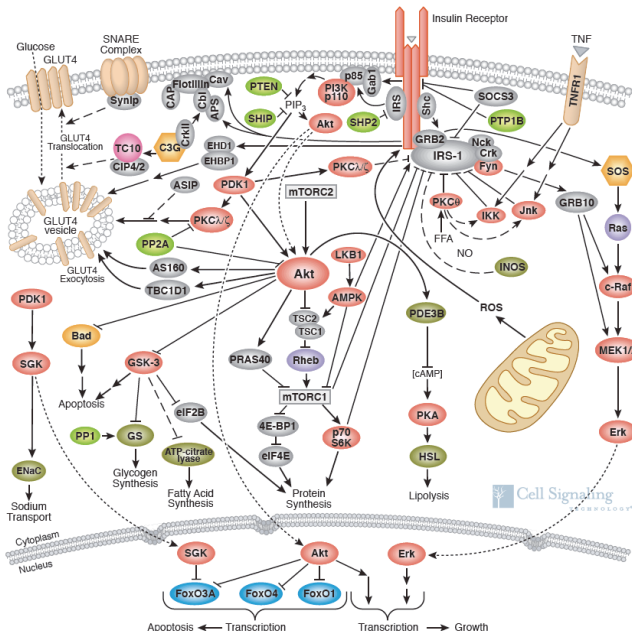


Figure 18-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



Boron & Boulpaep: Medical Physiology, 2nd Edition.
Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

Insulin Receptor Signaling



一方、信号伝達経路は細胞外の情報をリガンドなどにより感知し、細胞内に取り込んで細胞内シグナル伝達により応答し、細胞間シグナル伝達で違う細胞に伝達するという経路である。つまり、一つの細胞内だけでなく細胞間の情報伝達を行っている。たとえばインスリンを産生する膵ランゲルハンス島β細胞では血糖の状態を GLUT2 から感知して、細胞内に ATP やセカンドメッセンジャー Ca^{2+} の形で伝達、インスリンを放出することによってインスリン受容体を持つ細胞に細胞間伝達で働きかけ、細胞内シグナル伝達により GLUT4 を細胞膜へ移動させグルコースを細胞内に取り込むのである。

4. 日本の娯楽メディアで見かける「ABO 血液型で性格判定ができる」との記載について、ゲノム医科学的・分子生物学的にその妥当性を論じよ。また、疑似科学に対する医学生としての心構えについて述べよ。

(解答例)

「ABO 血液型で性格判定ができる」というのはゲノム医科学的・分子生物学的に加え、統計学的にもその妥当性が見いだせない。その理由としては、ゲノム医科学的観点からは SNPs の解析・研究の結果、遺伝子は 3 万程度、SNPs は少なくとも 10^7 以上存在するので、ヒト第 9 染色体上にある ABO 型血液型の遺伝子座(9q34)のみを取り上げることがそもそもナンセンスであるということ。分子生物学的(生化学的)メカニズムの観点からは、ABO 血液型を決定するのはスフィンゴ糖脂質の糖鎖部分の差異であり、これが神経線維のネットワークなどに機能する関連性を示したり情動性へ関与したりすることに関する証拠が全くないこと。統計学的観点からは、たいていこのような内容のデータは ABO 型血液型占いなどの性格判定を信じる人からのフィードバックで成り立っていることが多い(読書カードやインターネットのリサーチなどでデータを集めるため)のでデータに偏りが多いと考えられ、「無作為抽出」という検定の基本が成り立っていないことである。

医学生としては娯楽と割り切ることも難しいものである。迷信や思い込みによる差別や正しい治療を断る理由に用いられることもあるからである。安易に疑似科学を口にする一般人との会話によるリラックスしたコミュニケーションも医療行為上重要であるので、関係を悪くしない程度にやんわりと否定するべきと思われる。科学的根拠の乏しいことを臆面もなく発言することは恥ずかしいことであると認識することが重要である。

5. 翻訳機構について説明せよ。さらに細胞が取り込んだポリペプチド鎖にアミノ酸を付加して伸長させるメカニズムが存在するかどうかについて説明せよ。授業と教科書の図や情報を総合的に論じることを期待している。

(解答例)

mRNA の指令はリボソームによって解読される。解読される暗号はトリプレットコドンと呼ばれ、3 文字の塩基の組み合わせとアミノ酸には対応がある。tRNA 分子は特異的に酵素によって、tRNA がもっているアンチコドンに対応するアミノ基を 3'末端に高エネルギー結合によってひっつける。この結合エネルギーはポリペプチド鎖にアミノ酸を共有結合し伸長するのに使われる。

mRNA の翻訳は AUG コドンから開始され、メチオニンができるが、これは特異的プロテアーゼで除去される。

翻訳は 4 段階の反応の連鎖である。

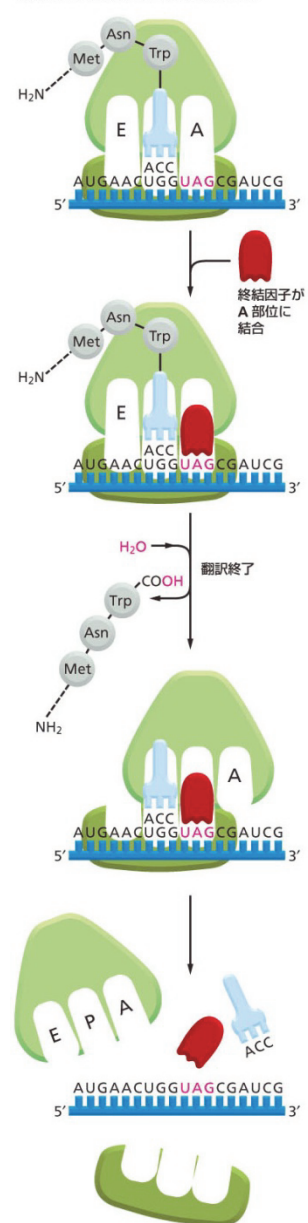
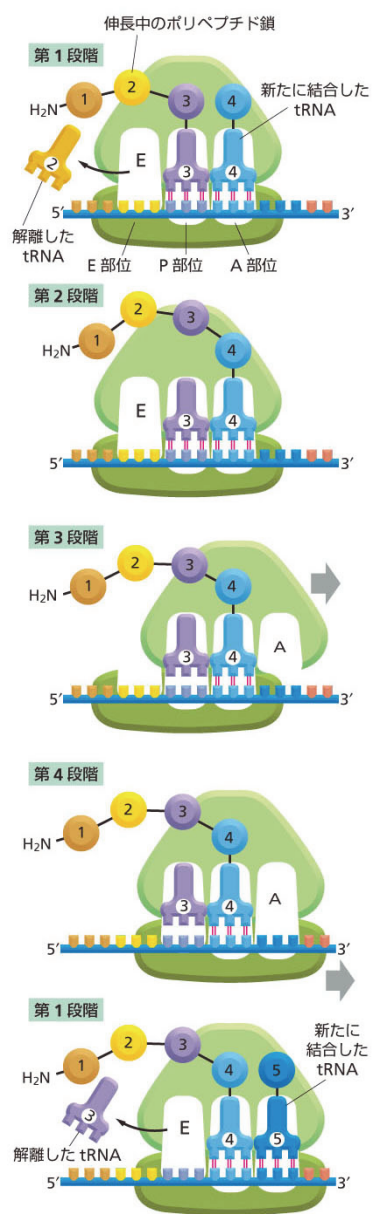
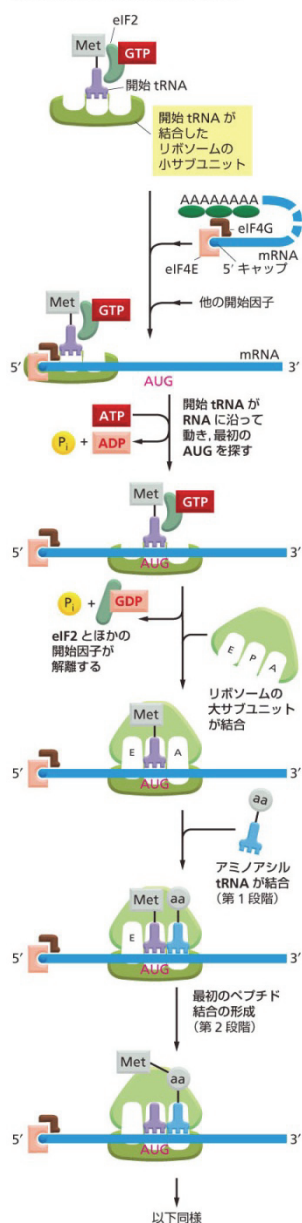
第 1 段階：次のアミノ酸を結合した tRNA が空いている A 部位に結合、mRNA のコドンと塩基対を作る。

第 2 段階：ポリペプチド鎖のカルボキシル末端 P 部位の tRNA から外れ、A 部位にある tRNA に結合したアミノ酸の遊離アミノ基とペプチド結合を作る。この反応は大サブユニットにある酵素部位が触媒する。

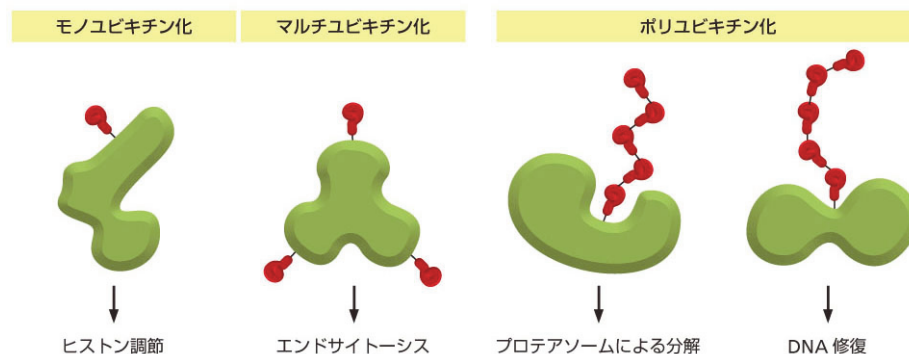
第 3 段階：大サブユニットが動いて小サブユニットに対してずれ、P 部位と A 部位にあった 2 個の tRNA が、大サブユニットの E 部位と P 部位にそれぞれ来る。

第 4 段階：小サブユニットが mRNA 分子上を正確に 3 ヌクレオチド分移動して mRNA 分子と大サブユニットが最初の位置関係に戻る。

これを終止コドン(UAA、UAG、UGA)が現れるまで繰り返す。



また、タンパク質にはユビキチン化という修飾によってユビキチンというアミノ酸が付加される。ユビキチン化されるとプロテアソームこれを認識して修飾されたタンパク質を分解する。



[平成 20 年度の問題]

「ゲノム医学・プロテオミクス解析に関する下の 8 つの語句を説明せよ。」に対する解答例。

a. ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられる方法。

生体試料中には、種々雑多なタンパク質が存在するが、特定のタンパク質を検出・定量するには、特に他のタンパク質と比べて微量にしか存在しない場合は、特異性の高さ（夾雑物からどれだけ正確に区別できるか）と定量性の良さ（微量であっても検出できる、あるいは低濃度における再現性の良さ）が求められる。ELISA は特異性の高い抗原抗体反応を利用し、酵素反応に基づく発色・発光をシグナルに用いることで上記の条件をクリアしている。ELISA は、同様の原理に基づく放射免疫測定（ラジオイムノアッセイ、RIA）と比べて、放射性物質を用いないため安全性が高く、安価で簡便であるため、現在微量タンパク質や感染微生物抗原の検出・定量に広く用いられている。

b. ウェスタンブロット法

タンパク質を電気泳動により分離した後に膜に移し、目的とするタンパク質に特異的な抗体を用いてそのタンパク質の存在を検出する方法。

c. 遺伝的個体差

疾病発症、疾患進行制御、体格、知能などの個体差のうち遺伝的な要因、すなわち SNP により生み出される個体差のこと。

d. 質量分析

試料の質量電荷比を求めるときに使用される分析法。

高電圧をかけた真空中で試料をイオン化すると、静電力によって試料は装置内を飛行する。飛行しているイオンを電氣的・磁氣的な作用等により質量電荷比に応じて分離し、その後それぞれを検出することで、質量電荷比を横軸、検出強度を縦軸とするマススペクトルを得ることができる。

e. 個人最適化医療

personalized medicine

各個人のゲノムデータを用いる有効性予測によって治療方針を決定し、試行錯誤を回避して各個人に最適な医療を提供すること。一人一人に適した薬剤やその量を的確に投与でき、有害事象出現の制御につながる。全員への機械的投薬を回避することで総医療費も抑制可能である。

f. 制限酵素

2 本鎖の DNA を切断する酵素のこと。特に遺伝子工学の実験で広く用いられる II 型制限酵素はパリンδροーム(回文)を認識して特定の位置で切断する酵素である。切断点は、認識部位内かそのごく近傍に限定されている。酵素反応には、 Mg^{2+} が必須である。例えば EcoRI は

5'GAATTC

3'CTTAAG

を認識し

5'---G AATTC---3'

3'---CTTAA G---5'

のように切断する。

g. 連鎖不平衡ブロック

ハプロタイプ(複数の遺伝マーカーによる組み合わせ)の出現頻度が有意に高くなる現象である連鎖不平衡が起きている部分に近い SNP のことをまとめて LD ブロックという。

h. ゲノムプロジェクト

シーケンシングによって生物のゲノムの全塩基配列を解読しようとするプロジェクト。

そのほか。

GWAS

Genome-wide association study

疾患群(ケース)と健常者群(コントロール)を準備、ゲノムから選別された 50~100 万 SNP をジェノタイピング。高品質 SNP データの抽出と統計処理を行い、疾患群に有意な SNP(マーカーSNP)を同定する。

SNP ジェノタイピング

1 組の遺伝子のどちらに点突然変異が存在するかを決定するプロセスで疾患や薬物応答関与し、集団にまたは個人に影響を与える単一 SNP または一連の SNP セットを検出するために使用される。