

生物 試験問題(?)

範囲:全範囲

指導教員の書いた論文について知って
おくのは理系生物選択者のたしなみ？

問題は【1】、【2】のみ
試験時間目安;30 分

2年 組 番 名前

【1】

軟骨細胞の分化や増殖は、機械的な刺激(物理的刺激)によって制御されている。このことを知った根本君は、地球の重力を超える過重力(Hypergravity)が細胞に与える影響を調べるために、マウスの軟骨前駆細胞株(ATDC5)を用いて実験を行った。

根本君が先行研究を調べてみると、初期胚の発達や細胞増殖に関わる転写因子をコードする *c-fos* 遺伝子は、通常、成長因子の刺激などによって速やかに発現が誘導されるが、ATDC5 細胞を 10G の過重力環境に曝露したところ、*c-fos* 遺伝子の発現が著しく抑制されたことが判明した。根本君はこのメカニズムを解明するため、以下の実験を行った。

・実験 1: 細胞骨格の再構成に関わるタンパク質 Rho およびその下流のリン酸化酵素 ROCK に着目した。過重力環境では、活性型 Rho(Rho-GTP)の量が減少していた。また、ROCK の阻害剤を添加すると、1G 環境下であっても *c-fos* の発現が抑制された。

・実験 2: 細胞内生存シグナルに関わる PI3K(ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ)経路を調べた。過重力環境では、PI3K の下流で働く Akt のリン酸化(活性化)が抑制されていた。

・実験 3: PI3K の活性化剤を添加した状態で過重力を負荷したところ、*c-fos* の発現抑制が一部解除された。一方、Rho の活性化剤を添加しても、PI3K の活性は変化しなかった。

問 1

c-fos のように、刺激を受けて短時間で一過性に発現が誘導される遺伝子を総称して何と呼ぶか、答えなさい。

問 2

実験 1 の結果から、過重力が *c-fos* 発現を抑制する経路について根本君はどうに推測しただろうか。「Rho」「ROCK」という言葉を用いて 40 字程度で説明しなさい。

問 3

実験 1~3 の結果に基づき、過重力、Rho/ROCK、PI3K、*c-fos* 発現の間の関係性を示す図(シグナル伝達経路)として最も適切なものを、次の(A)~(D)から選べ。なお、「A → B」は促進(活性化)を、「A ↯ B」は抑制を示す。

- (A) 過重力 ↯ Rho/ROCK → PI3K → *c-fos* 発現
- (B) 過重力 ↯ PI3K → Rho/ROCK → *c-fos* 発現
- (C) 過重力 ↯ Rho/ROCK ; 過重力 ↯ PI3K(両経路が独立して *c-fos* を制御)
- (D) 過重力 → Rho/ROCK ↯ PI3K ↯ *c-fos* 発現

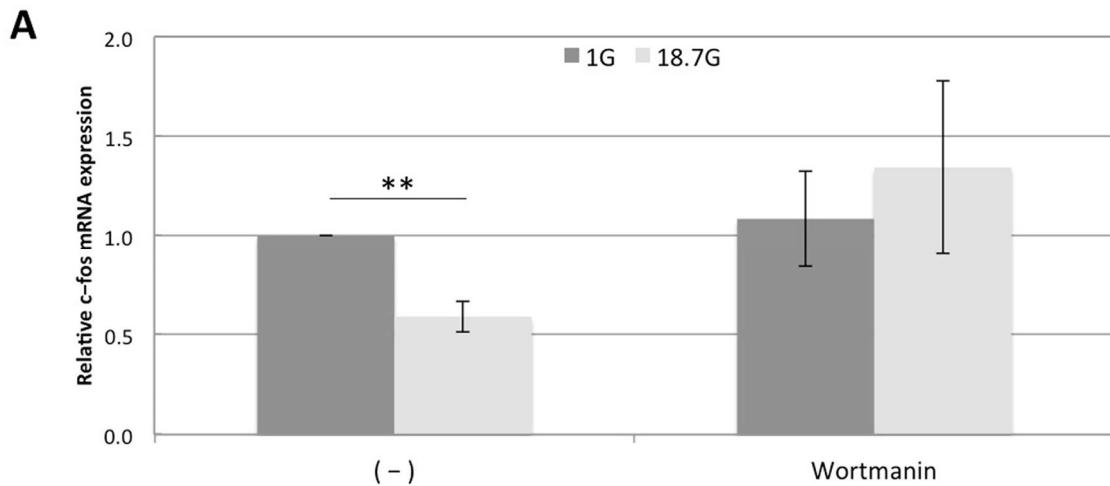
問 4

軟骨細胞において、過重力が持続的にかかると骨の形成が抑制される可能性がある。根本君はこの実験の結果を踏まえ、宇宙飛行士が経験する「微小重力(低重力)」環境では、*c-fos* の発現はどうなると予想しただろうか。また、その理由を細胞に加わる物理的刺激の観点から簡潔に述べなさい。

問 5

下図は、1G(対照群)および 18.7G(過重力)の環境下で、PI3K の阻害剤(Wortmannin)を添加し

た際の *c-fos* mRNA の相対的な発現量を示したものである。



(論文より引用) Fig 3. Involvement of PI3K signaling pathway in the down-regulation of *c-fos* by hypergravity. Wortmanin Inhibitor tests in ATDC5cells under hypergravity for 60 min. *c-fos* mRNA expression was analyzed by real-time PCR and normalized to Gapdh and Rpl13a expression. Wortmanin was utilized as a PI3K inhibitor.

- (1) グラフから根本君が読み取った内容として最も適当なものを、次から選べ。
- (ア) PI3Kの活性を阻害することは、過重力負荷と同様の効果を *c-fos* 発現に与える。
 - (イ) 18.7G 環境下では、PI3Kは過重力の影響に関与していない。
 - (ウ) PI3Kは過重力による *c-fos* 発現の低下をもたらしている。
- (2) この実験結果だけでは、「過重力が PI3K の活性を抑制した」のか、単に「過重力と PI3K 阻害が別々に発現を下げた」のか判別しにくい。これを証明するために根本君が追加で行った実験として、最も適切な操作を次から選べ。
- (A) 1G 環境で、PI3Kを過剰に活性化させる試薬を添加し、*c-fos* 発現が上昇するか確認する。
 - (B) 10G 環境で、PI3Kの下流因子である Akt のリン酸化状態(活性化状態)が、1G 環境と比較して低下しているか確認する。
 - (C) 10G 環境で、ROCK の阻害剤を添加し、さらに *c-fos* 発現が低下するか確認する。

問 6

根本君が行った実験において、過重力負荷(10G)を開始してから *c-fos* mRNA 量が最小値を示すまでの時間を調べたところ、負荷開始から 30 分後であった。しかし、その 120 分後には、10G 負荷を継続しているにもかかわらず、*c-fos* の発現量は 1G の状態に近いレベルまで回復し始めた。この現象について説明した文として最も適切なものを次から選べ。

- (A) 過重力による刺激が細胞死を誘発したため、相対的な発現量が上昇したように見えた。
- (B) 細胞には持続的な物理刺激に対して応答性を低下させ、恒常性を維持する適応機構が存在する。

- (C) *c-fos* 遺伝子は一度抑制されると、正のフィードバック調節により発現が暴走する性質がある。
- (D) 120 分経過すると、細胞内の Rho や PI3K が枯渇するため、抑制シグナルが伝わらなくなつた。

問 7

根本君は、*c-fos* の発現量を測定するためにリアルタイム RT-PCR 法を用いている。この手法に関する説明として誤っているものを、次からすべて選べ。

- (A) 逆転写酵素を用いて、抽出した mRNA から相補的な DNA(cDNA)を合成するステップが必要である。
- (B) PCR のサイクルを繰り返す過程で、増幅した DNA 量に応じた蛍光強度を測定することで定量を行う。
- (C) 内部標準(コントロール)として、重力環境によって発現量が変動しない *GAPDH*などの遺伝子が一般的に用いられる。
- (D) この手法では、タンパク質としての c-Fos の活性やリン酸化状態を直接測定することができる。

問 8

Rho/ROCK 経路は、細胞骨格(アクチンfilaメント)の形成を促進することが知られている。

根本君は「過重力が細胞骨格の構造変化を引き起こし、それが核内の転写調節に影響を与える」という仮説を立てた。この仮説が正しいと仮定し、本論文の結果(過重力で *c-fos* が抑制される)を統合すると、過重力環境下での細胞骨格の状態はどうなっていると根本君は考えただろうか。「重力」「アクチン」「転写」という言葉を用いて、論理的に説明しなさい。

【2】

関節軟骨は、歩行などの日常動作によって常に数 MPa(メガパスカル)に及ぶ「静水圧」を受けている。軟骨細胞はこの物理刺激を感じ、細胞外マトリックス(Ⅱ型コラーゲンなど)の合成を調節することで組織の恒常性を維持している。これを踏まえて、根本君は次の実験を行った。

【実験】

1. 培養した軟骨細胞に 5MPa の静水圧を負荷したところ、対照群と比較して、転写因子である **p65** および **Elk** のリン酸化(活性化)が促進された。
 2. 静水圧負荷により、軟骨分化に不可欠な転写因子をコードする **SOX9** 遺伝子の発現が上昇した。
 3. 膜貫通型の陽イオンチャネルである **TRPV4** の阻害剤を添加すると、静水圧による SOX9 の発現上昇が抑制された。
 4. 静水圧負荷は、核内において染色体の構造(クロマチン構造)に変化を与え、特定の遺伝子領域の転写効率を変化させている。
-

問 1

下線部 **SOX9** のように、特定の遺伝子の転写を促進または抑制するタンパク質の総称を答えよ。

問 2

軟骨細胞が受ける 5MPa の圧力について、1 気圧を 0.1MPa としたとき、この圧力は標準的大気

圧の何倍に相当するか答えよ。

問 3

実験 3 の結果から、静水圧という物理刺激が細胞内に伝えられる最初のステップにおいて、どのような分子機構が働いていると考えられるか。「細胞膜」「イオン」という言葉を用いて 40 字程度で説明せよ。

問 4

軟骨細胞における静水圧刺激の重要性を踏まえ、長期間の寝たきり生活や宇宙空間での微小重力環境が、関節軟骨の健康にどのような悪影響を及ぼすと予想されるか。本問題の知見を基に、「恒常性」という言葉を用いて簡潔に述べよ。

研究グループは、静水圧(HP)負荷後の軟骨細胞を解析し、以下の事実を明らかにした。

・**事実 A:** HP 負荷直後、細胞質内のカルシウムイオン(Ca^{2+})濃度が一時的に上昇した。この上昇は、細胞外液の Ca^{2+} を除去すると消失した。

・**事実 B:** HP 負荷により、MAP キナーゼ(MAPK)の一種である **ERK** がリン酸化され、活性化した ERK は核内へ移行した。

・**事実 C:** 活性化した ERK は、転写因子 **Elk** をリン酸化して活性化させ、これが **c-Fos** 遺伝子の発現を誘導した。

・**事実 D:** 一方で、HP 負荷は炎症性サイトカイン(IL-18 など)によって誘導される軟骨分解酵素(MMP-13)の発現を抑制する効果も見られた。

問 5

事実 A および実験 3(前述)の結果から導かれる考察として、最も適切なものを次の(a)～(d)から選べ。

- (a) 静水圧は細胞内の小胞体から Ca^{2+} を放出させる。
- (b) TRPV4 は Ca^{2+} を細胞外へ排出するポンプとして機能している。
- (c) 静水圧刺激により TRPV4 を介して細胞外から Ca^{2+} が流入する。
- (d) Ca^{2+} の流入は SOX9 の遺伝子発現を直接的に抑制する。

問 6

事実 B および事実 C に基づき、静水圧刺激が最終的に特定のタンパク質合成を誘導するまでの経路を、「リン酸化」「核膜孔」という言葉を用いて 100 字程度で説明せよ。

問 7

軟骨細胞において、静水圧(HP)刺激と炎症性サイトカイン(IL-18)を同時に与えた場合、IL-18 単独の場合よりも軟骨破壊が進まないことが分かった。この現象の生物学的な意義を、以下の語句を用いて説明せよ。

【 語句：恒常性(ホメオスタシス)、分解、合成】

問 8

近年の研究では、静水圧が「エピジェネティック」な変化、すなわち DNA の塩基配列を変化させずに遺伝子発現を調節する仕組みに関与していることが示唆されている。静水圧負荷によって起こると推測される、クロマチン構造の変化について「凝集」という言葉を使って説明せよ。