

名札番号		名前	
------	--	----	--

実験試験（植物）問題冊子

（平成 23 年 8 月 18 日 14 時 10 分～17 時 40 分）

1. 机には、問題冊子（15 ページ）および解答用紙（6 枚）が配布されています。
2. 説明が始まるまでは、問題冊子を開けずに、このページをよく読んでおいてください。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と名前を記入してください。
また、このページにも名札番号と名前を記入してください。
4. 問題冊子の最初に、顕微鏡の使い方の説明があります。顕微鏡使用時は、レバーを操作して、イスを適切な高さに調整してください。イスの高さが合わない人は、挙手をしてください。
5. 試験の途中で気分が悪くなったり、用便のために外に出たりする場合には、手をあげて試験監督者の指示に従ってください。
6. 実験中はかならず実験用手袋を着用し、実験液が目、口、皮膚などに触れないよう注意すること。万一破れた場合や実験用手袋のサイズが合わないとき、数が足りないときは挙手をしてください。
7. 試験の解答開始と終了時刻は、最初の説明のあとにホワイトボードに示します。
また、ディスプレイにも定期的を示されます。
8. その他の指示は、試験室内のディスプレイまたはホワイトボードに示されますので、時々ディスプレイとホワイトボードを見てください。
9. 解答終了後、問題の解説を行います。
10. 問題冊子にメモをとってもかまいません。解説が終わったら、問題冊子は持ち帰ってください。
11. 机の上の文具や実験器具は自由に使ってください。位置も自由に動かしてください。試験終了後は元の位置に戻してください。

生物顕微鏡使用マニュアル（図 1 を参照）

I. 生物顕微鏡の使い方

1. 背筋を伸ばして観察できるようにイスの高さを調整する。
2. 明るさ調整つまみを「1」にする。
3. メインスイッチの電源を ON にする。明るさ調整つまみを回して適度な明るさにする。
4. 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
5. レボルバーを回して対物レンズを 4 倍（最低倍率）にする。
6. ステージにプレパラートをのせてクレンメル（標本押さえ）で固定する。（今回はサンプルプレパラートがあらかじめセットしてある。）
7. コンデンサ上部のレンズから見えている照明光の位置に，サンプルプレパラートの文字が書いてある部位がくるように，クレンメル縦送りハンドルと横送りハンドルを使って移動させる。
8. ステージを一番上まで上げる。プレパラートと対物レンズがぶつからないように注意すること。
9. 接眼レンズをのぞいてピントが合う位置まで粗動ハンドルを回してステージを下げる。
10. 微動ハンドルを回してピントを微調整する。クレンメル縦送りハンドルと横送りハンドルを使用してサンプルプレパラートの文字を読んでもみる。
11. コンデンサの開口絞り環を回転させてコントラストや焦点深度を調整する。
12. 倍率を上げて観察する場合には，レボルバーを回して対物レンズを 10 倍，40 倍にする。

注）使用中レンズがよごれた場合には TA まで申し出ること。TA は皆さんの実験のサポートを行うスタッフです。

II. 眼幅，視度調整

下記の説明に従ってそれぞれについて調整すること。また，眼鏡をかけて検鏡するときは，アイシェードのゴムを折り返して短くする。

眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像が一個になった位置が正常な位置になる。

視度調整：視度調整環を 0 の位置に合わせる。まず，右目で観察する標本にステージを上下させてピントを合わせる。次に，ステージをそのままの状態にして，左目でのぞき，左側の接眼レンズの視度調整環を回してピントを合わせる。

III. コンデンサの使い方（表 1 を参照）

視野の明るさが一様でない場合、コンデンサ上下動ハンドル（コンデンサの左側）を動かして調整する。コンデンサには絞りがついており、絞りを開閉することにより標本にコントラストをつけたり、焦点深度を調整することができる。

表 1. コンデンサの開口絞りと明るさ，焦点深度，コントラストの関係

	開口絞り（開）	開口絞り（閉）
明るさ	大	小
焦点深度	浅	深
コントラスト	弱	強

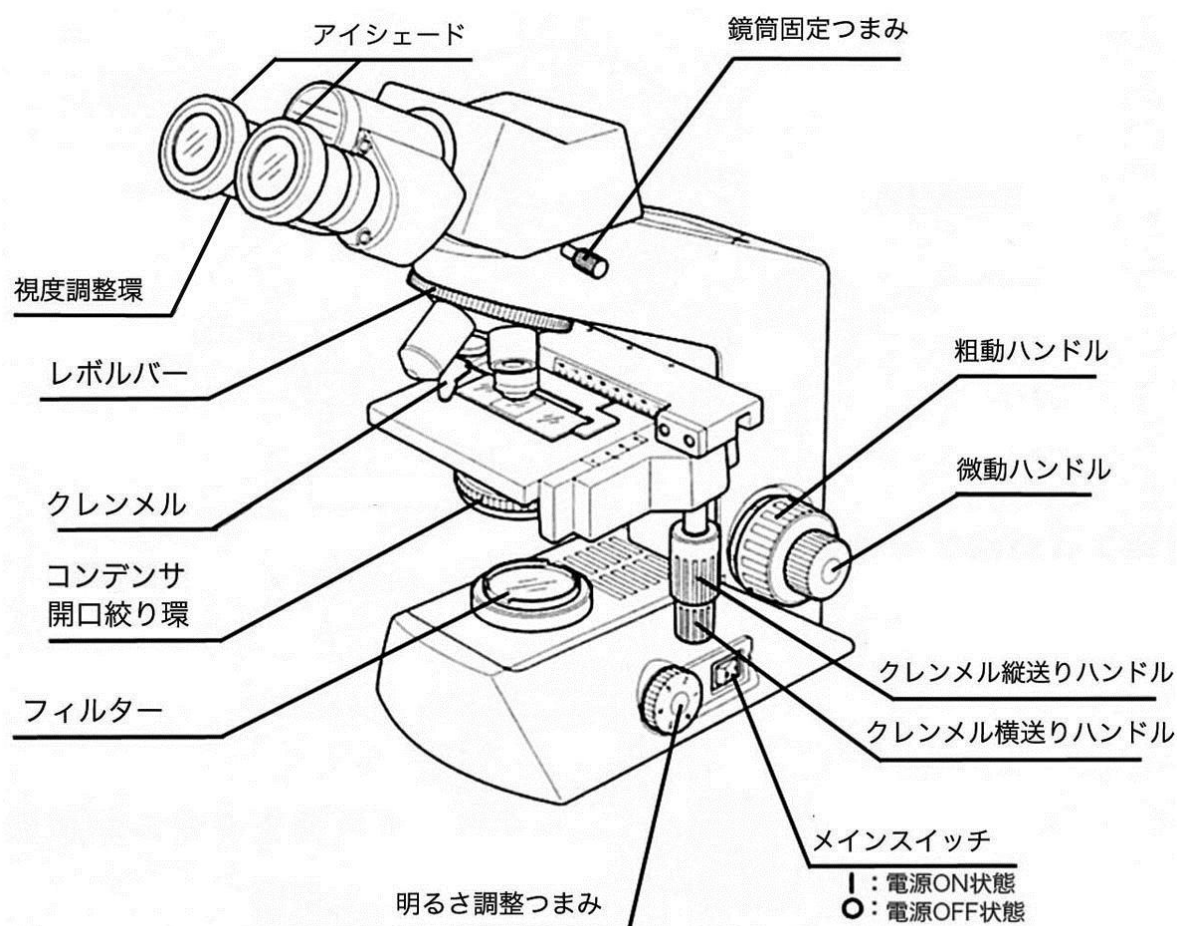


図 1. 生物顕微鏡（正立顕微鏡）各部名称

実体顕微鏡使用マニュアル（図 2 を参照）

1. ステージに直接試料をのせないこと。
2. 背筋を伸ばして観察できるようにイスの高さを調整すること。
3. 接眼レンズの眼幅、視度調整をすること。視度調整環は接眼レンズの双方についているので双方とも 0 の位置に合わせる。次に、右目で観察する標本にステージを上下させてピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして、左目でのぞき、左側の接眼レンズの視度調整環を回してピントを合わせる。眼鏡をかけて検鏡するときには、アイシェードのゴムを折り返して短くすること。
4. 観察や切片作製のときは、落射照明（左側の調整つまみ）と透過照明（本日の実験には使用しません）を観察に応じて使い分けること。落射照明は角度を調整して、試料に光が十分当たるようにすること。
5. 倍率を変えて観察する場合には、ズームハンドルを回して調節する。

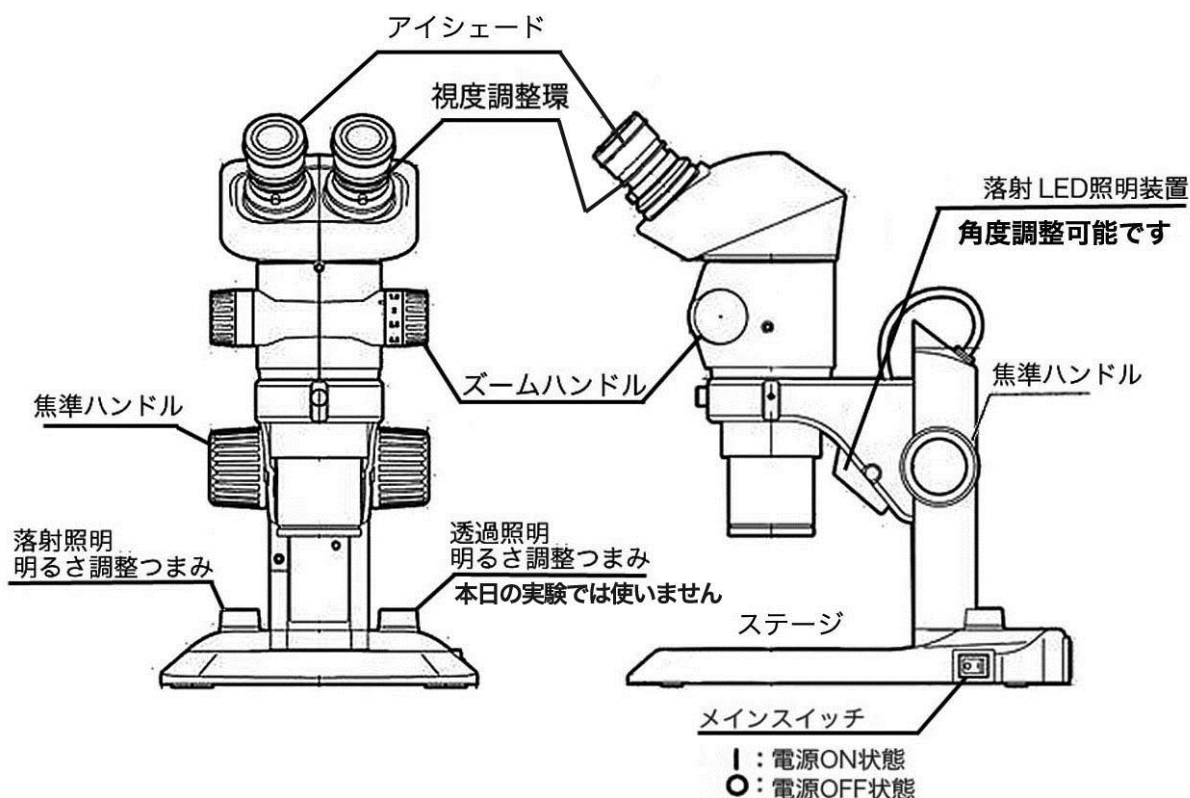


図 2. 実体顕微鏡各部名称

【実験に必要なもの】

この実験では、下に示した材料、装置、器具、試薬を用います。足りないものがあつたら挙手してください。

材料

- | | |
|------------|-----------------------------|
| 1. 実生入り管ビン | 2 本 (管ビン A および B) |
| 2. 花 | 3 種類 (テッポウユリ, キンギョソウ, ギンギシ) |

装置, 器具, 試薬

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 3. 生物顕微鏡 | 1 台 |
| 4. 実体顕微鏡 | 1 台 |
| 5. サンプルプレパラート | 1 枚 |
| 6. スライドガラス | 10 枚 |
| 7. カバーガラス | 20 枚 (プラスチックシャーレ中) |
| 8. シャーレ (大) | 1 個 |
| 9. プラスチックシャーレ | 2 個 |
| 10. 解剖バサミ | 1 個 |
| 11. 柄付針 | 1 本 |
| 12. メス | 1 本 |
| 13. ピンセット | 2 本 |
| 14. スポイト | 1 本 |
| 15. 先のとがった割りばし | 1 本 |
| 16. ろ紙 | 10 枚 |
| 17. カウンター | 1 台 |
| 18. 実験用ティッシュ | 1 箱 (キムワイプ) |
| 19. ペーパータオル | 1 束 |
| 20. 実験用手袋 (M サイズ) | 2 組 |
| 21. 赤鉛筆 | 1 本 |
| 22. マジックペン | 1 本 |
| 23. マニキュア | 1 本 |
| 24. 電卓 | 1 台 |
| 25. 酢酸オルセイン | 1 本 |

このページは白紙です。

実験 1. ^{みしょう}実生をつかった細胞分裂の観察

【はじめに】

被子植物は種子あるいは種子を含む果実を散布体として親植物から分離して、生育適地にたどり着くと発芽して新たな個体となります。この過程で植物個体は細胞分裂が起こる場所やその頻度を厳密に制御することで、個体の形態の維持と秩序だった成長をしています。この問題ではクレピス（キク科植物）の実生（芽生え）とその組織でおきている細胞分裂を観察します。

管ビン A, B にはフォイルゲン染色されたクレピスの実生が入っています。フォイルゲン染色法は DNA が含まれる部分だけが染色されるので、核や染色体だけを明瞭に染色することができます。また、その染色の濃さは含まれる DNA 量に比例します。A の実生は、播種後、21℃明所に 4 日間静置して、直ちにカルノア液で固定したものです。B の実生は、同様の条件で調製した後、固定の前に 3 時間、試薬 C で処理し、同様に固定したものです。

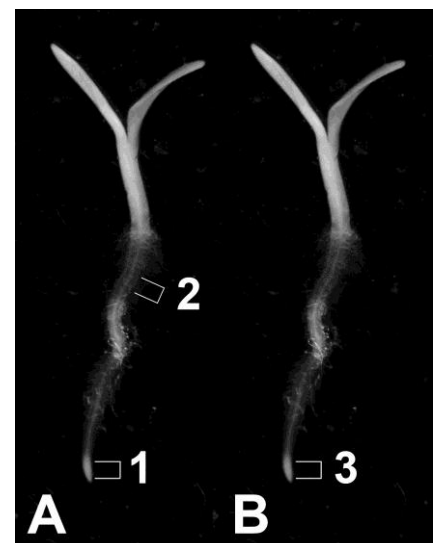
【問 1】 A の標本から実生を 1 つ選び、実体顕微鏡で全体を注意深く観察せよ。解答欄に実生全体の輪郭を黒鉛筆で模式的に描き、フォイルゲン染色によって強く発色している部分を赤鉛筆でぬりつぶせ。

実生の観察

1. 管ビン A 内の実生を液ごとプラスチックシャーレに移します。マジックペンでシャーレのふたに「A」と記入します。
2. 観察しやすい標本を選び、ピンセットで中央に移動し、実体顕微鏡で観察します。必要に応じてピンセットや柄付針を使用すること。

【問 2】 A の実生と B の実生について、図 3 に示す 1, 2, 3 の領域の細胞のプレパラートを作製し、以下の(1)～(5)に答えよ。なおプレパラートは、11 ページの補足：染色体標本の作り方の説明に従って作製し、観察すること。

図 3. 実生と細胞分裂の観察部位。A は発芽 4 日後、直ちに固定したもの。B は発芽 4 日後、試薬 C で 3 時間処理した後に固定したもの。領域 1 と領域 3：根の頂端分裂組織の各 1 mm 程度、領域 2：実生中央部の 1 mm 程度。



- (1) 図4の細胞分裂の各時期の名称を記入せよ。

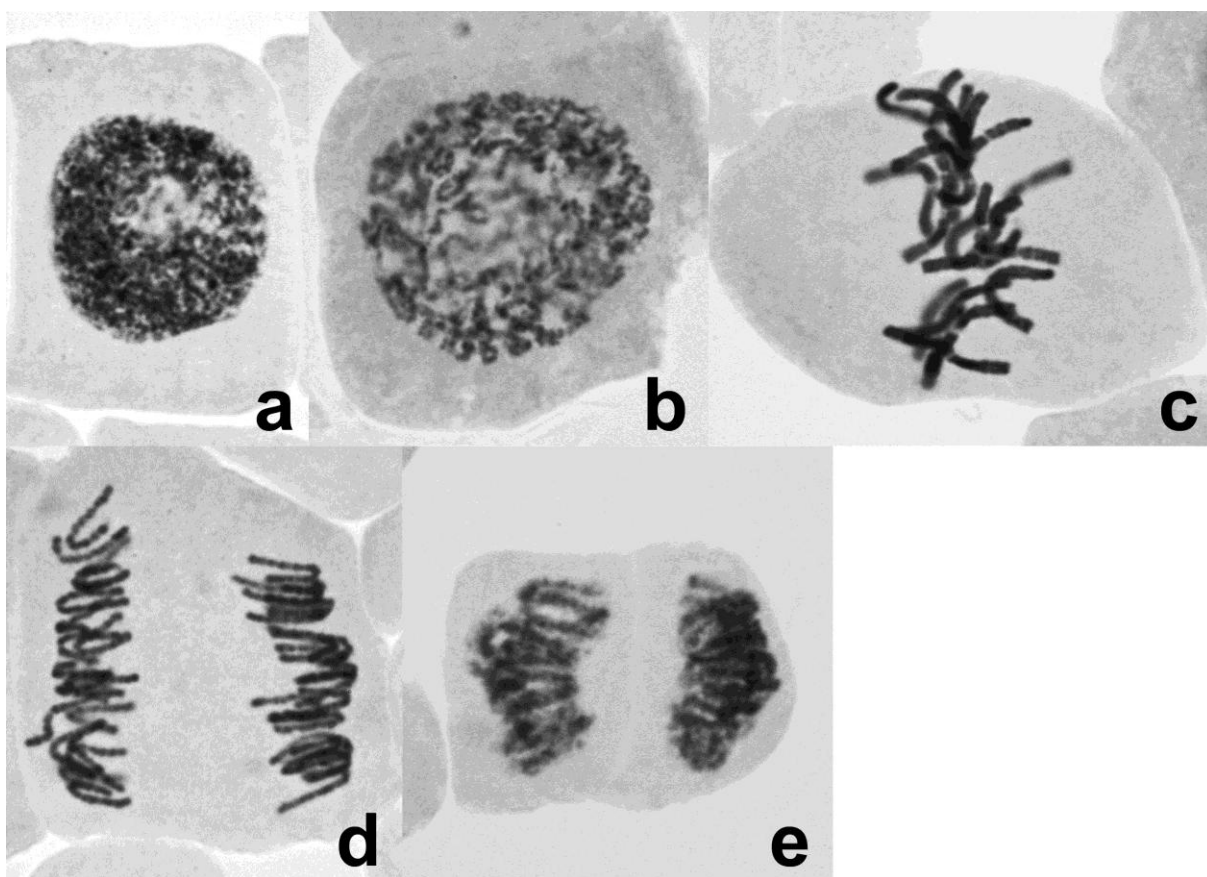


図4. 細胞分裂周期の各時期 (a-e) の顕微鏡写真。キクタニギクの根の頂端分裂組織細胞を酢酸オルセインで染色したもの。

- (2) クレピス標本の図3の領域1, 2, 3の中で染色体数が最も数えやすい領域はどれか。解答欄に領域の番号を記せ。また、クレピスの染色体数を数えて解答欄に記入せよ。
- (3) 図3に示す領域1と領域3について、プレパラートを観察し、視野ごとに観察された各細胞分裂時期の細胞数を、解答用紙の最後につけてある観察記録用紙に記入し、観察結果を集計せよ。また、解答用紙に観察細胞数と各時期の頻度および細胞分裂の各時期に要する推定時間を記入せよ。クレピスでは1細胞周期の時間が10.4時間である。次に、各時期の頻度を整理し、分裂期の頻度(%)を解答欄に記入せよ。染色体標本の作り方と細胞の観察は、11ページの補足：染色体標本の作り方と9ページの染色体標本の観察方法を参考にせよ。時期の判定は図4のキクタニギクの例を参考にすること。
- (4) (3)で観察した領域1と領域3の比較から、両者の違いを記し、試薬Cの処理により細胞分裂に何が起こったかを200字程度で述べよ。
- (5) 試薬Cはどのような薬品を使ったと考えられるか。試薬の名称を一つ挙げよ。

染色体標本の観察方法

1. 作製したスライドを明るい方向に透かしてみても、細胞の広がり具合を確かめます。適切に作製された染色体標本は図 5 と図 6 のように見えます。細胞の広がり具合が図のようになっていない場合はプレパラートを作り直すこと。
2. 生物顕微鏡のステージにプレパラートをおき、10 倍の対物レンズでひととおり全体を見わたして、観察領域の見当をつけます。例えば、図 7 では四角枠領域が観察領域となります。
3. 40 倍の対物レンズ下で、細胞分裂の各時期の細胞数を計測します。手際よく計測するためには最初の観察ポイントを決めた後、まず視野内の細胞数の総数をカウンターで計測し、観察記録用紙の「1 視野細胞総数」の項目の視野 1 の欄に記入します。次にこの視野内で見られる細胞のそれぞれの時期（図 4 の b～e）について細胞数を数えます。図 4 の a の時期の細胞数は「1 視野細胞総数」から b～e の時期の細胞数の総和を差し引いた値として計算します。
4. 1 観察視野について計測が終わると、今見た視野と重ならないように、図 8 に示すように横方向に 1 直線にステージをずらし、次の観察視野まで移動します。これを繰り返して、細胞の計測を行います。
5. 観察する細胞の数の目安は、細胞の総数が 600 以上です。観察細胞数が足りないと考えられる場合、視野が重ならないように縦方向にずらして追加計測を行うこと。

注) 1 観察視野に 100～200 細胞が見えるくらいがカウントしやすく、それよりも多い場合は細胞数を数えることが困難になります。

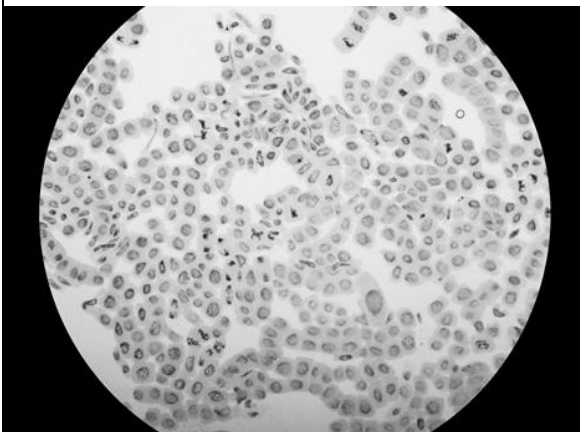


図 5. 40 倍対物レンズ下の視野

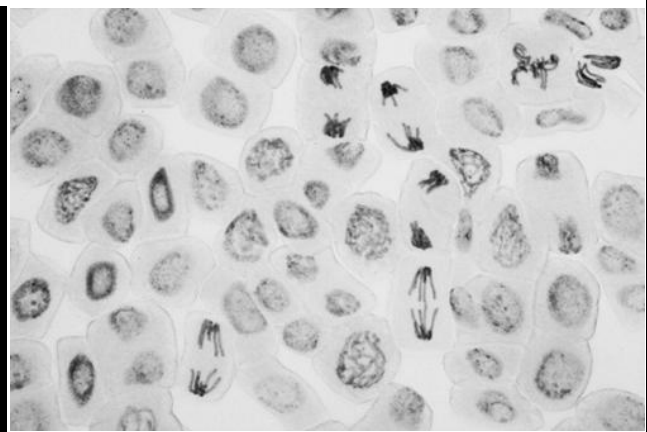
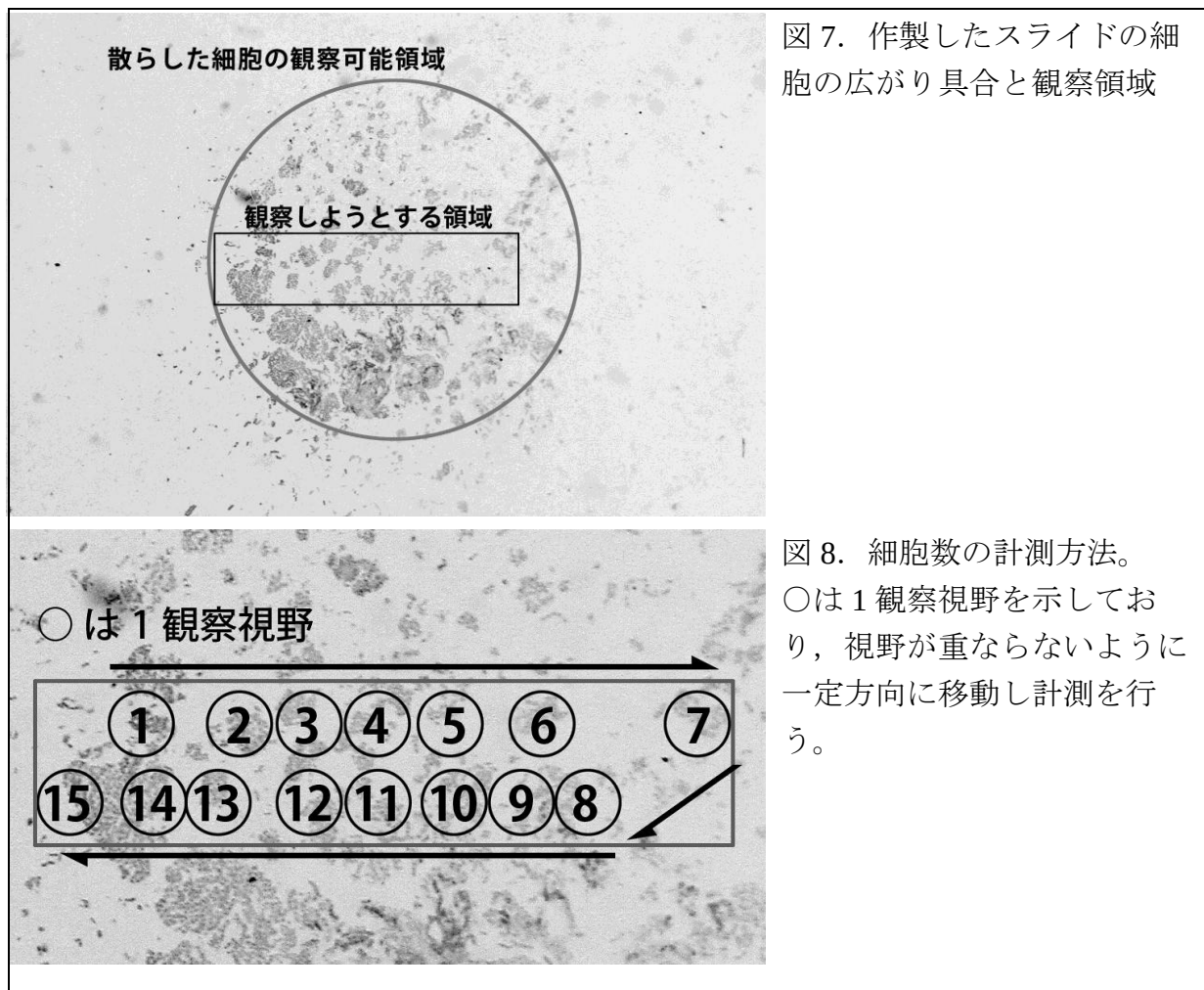


図 6. 作製された標本の拡大像の一例



【問 3】 上記の【問 1】で観察した発色の違いがなぜ生じたのか。【問 2】の観察および実験をとおして得られた結果をもとに，その理由を記し，その理由から考えられる実生の成長について 300 字程度で述べよ。すでに作製されている領域 1 と領域 3 のプレパラートに加え，領域 2 のプレパラートも作製して，観察すること。とに，実生 A の領域 1 と領域 2 の細胞と核の関係をよく考慮すること。

補足：染色体標本の作り方

染色体標本の作り方は試験室内のディスプレイに繰り返し映し出されていますので、操作がわからないときは参考にしてください。

1. 実生をフォイルゲン染色します。今回、すでに染色された実生が、2本の管ビンAおよびBに用意されています。管ビンAはすでにシャーレに移されています。同様に管ビンBもシャーレに移し、マジックでシャーレのふたに「B」と記入します。
2. 実験台の上に新しいろ紙を置きます。その上に、キムワイプでよく拭いたスライドガラスを置きます。
3. スライドガラスの左上に、管ビンの記号（AまたはB）をマジックで記入する。
4. 染色した実生をスライドガラス上に1本置きます。メスを用いて、赤紫色に発色した分裂組織だけを切り取ります。切り取る目安としては1mm程度になります。多くとりすぎると細胞同士が重なって観察しにくくなるので注意すること。分裂組織以外の部位は取り除くこと。余分な液が残っている場合は、ろ紙で吸い取ること。
5. 切り取った分裂組織に酢酸オルセインを1滴滴下し、カバーガラスをかけます。1滴より多くなると細胞を散らすのが難しくなり、少なすぎると細胞が散りにくくなります。
6. カバーガラスのひと隅にろ紙をのせ、そのひと隅をろ紙の上から人差し指で、軽く押さえたまま、先のとがった割りばしの先で切り出した分裂組織をカバーガラスの上から数回繰り返し軽くたたきます。このとき、カバーガラスがずれないように注意すること。また、分裂組織が1層になり、かつ細胞が壊れない程度に細胞を散らすこと。
7. 二つ折りにしたろ紙でプレパラート全体を挟み、カバーガラスの周辺をろ紙の上から軽くなぞり、余分の酢酸オルセインを吸い取ります。その後で標本上部を親指の先で垂直に強く押しつぶします。
8. カバーガラスの周囲をマニキュアで封じます。マニキュアをつけすぎると対物レンズに触れて、レンズを汚すので、適当な量にすること。
9. プレパラートを生物顕微鏡で観察します。

実験 2. 被子植物の花のつくり

【はじめに】

陸上植物は、配偶子同士が効率よく出会い、確実に受精をするために複雑な生殖器官を進化させました。被子植物では、外側から順に、がく、花弁（花びら）、雄ずい（雄しべ）、雌ずい（雌しべ）の4つの要素が同心円状に集まって花が構成されています。また、形や色で花弁とがくが区別できない場合、両者を合わせて花被とよびます。ただし、すべての花がこのような構造を持つわけではなく、とくに花弁や花被片は昆虫などの花粉媒介者を誘うために進化したものであり、風媒花では痕跡的です。これらの要素はいずれも葉に相同なもの（葉が変化したもの、花葉）と考えられています。この根拠として花びらが葉に変化した突然変異体や、雄ずいが花びらに変化した八重咲きの花などの存在があげられます。

この問題では、みかけの大きく異なる、テッポウユリ、キンギョソウ、ギンギシの花を観察し、花の構造の違いをもたらしている要因について考えます。

【問4】 以下の文章から、(1) テッポウユリ、(2) キンギョソウ、(3) ギンギシの花の構造の説明としてア～キの中から正しいものを選び、記号で答えよ。

- ア. 6枚のがく片のようにみえる構造は、外花被片3枚、内花被片3枚からなる。雄ずいと雌ずいの両方をもつ両性花と雌ずいしかない雌花がある。
- イ. がく片がなく、6枚の花弁のようにみえる構造は、外花被片3枚、内花被片3枚に区別できる。
- ウ. 中心に1本の雌ずいがあり、その周囲を雄ずいが囲み、その外側を2枚の鱗片が包んでいる。
- エ. 4枚に分かれたがく片、4枚に分かれた花弁、6本の雄ずい、内部が3室に分かれた1本の雌ずいをもつ。
- オ. 5枚に分かれたがく片、5枚に分かれた花弁、4本の雄ずい、内部が2室に分かれた1本の雌ずいをもつ。
- カ. 花弁は退化して小さな鱗皮として子房の基部付近に残り、3-6本の雄ずい、1本の雌ずいをもつ。
- キ. がく片がなく、8枚の花弁のようにみえる構造は、外花被片4枚、内花被片4枚に区別できる。雄ずいと雌ずいの両方をもつ両性花と雄ずいしかない雄花がある。

【問5】 花葉の種類と数、配置を模式的に表したものを花式図とよびます。アブラナ科の花式図を参考にして、テッポウユリの花式図を描け。

【問6】 キンギョソウの花は、ふだん花弁が閉じています。下側の花弁（唇弁）を軽く引っ張ると、閉じていた花弁が口をあけるように開きます。キンギョソウの花を観察し、受粉におけるこの仕組みの役割について説明せよ。

【問7】 シロイヌナズナを用いた実験で、花葉（がく－花弁－雄ずい－雌ずい）の配置や構成が変化した突然変異体を得られています。これらの変異体の多くは、花葉の構成の特徴から大きく3つのグループに分けることができます。

グループ1：雄ずい，雌ずい のみからなる

グループ2：がく，雌ずい のみからなる

グループ3：がく，花弁 のみからなる

これらの変異体の形態的特徴と、3つのグループが生じる原因について考察した以下の文章のア～ウのうち、最も適切なものを選び記号で答えよ。

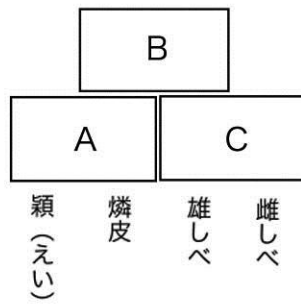
- ア．変異体は、隣り合った2種類の花葉が同時に変化して生じる傾向がある。このことから隣り合う2種類の花葉にまたがって発現する遺伝子が機能を失うことによって、これらの変異が生じたと考えられる。
- イ．変異体は、4種類の花葉が独立に変化して生じる傾向がある。このことから、それぞれの器官の形成に関与する遺伝子が別個に機能を失うことによって、これらの変異が生じたと考えられる。
- ウ．変異体は、3種類の花葉が同時に変化して生じる傾向がある。このことから、4種類の花葉は3種類の遺伝子の発現の組み合わせで形成される3つの領域に対応して形成されていると考えられる。

【問 8】 上記の【問 7】で示したような突然変異体の研究から、被子植物の花の形態形成をうまく説明できるモデルが提案されており、ABC モデルとよばれています。ABC モデルでは、3 つの遺伝子（転写因子）の発現の組み合わせが、花の各器官の発生を制御していると説明しています。ABC モデルを用いてシロイヌナズナの花の形態形成を説明した文章として適切なものを以下のア～ウの中から選び記号で答えよ。

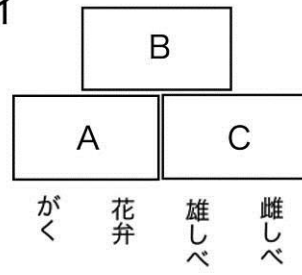
- ア. 遺伝子 A のみが発現する領域は「がく」、遺伝子 A と B が発現する領域は「花弁」、遺伝子 B と C が発現する領域は「雄ずい」、遺伝子 C のみが発現する領域は「雌ずい」が分化する。
- イ. 遺伝子 A, B, C がいずれも発現しない領域では「がく」、遺伝子 A が発現する領域では「花弁」、遺伝子 B が発現する領域では「雄ずい」、遺伝子 C のみが発現する領域では「雌ずい」が分化する。
- ウ. 遺伝子 A のみが発現する領域は「がく」、遺伝子 A と B が発現する領域は「花弁」、遺伝子 B と C が発現する領域は「雄ずい」、遺伝子 A と C が発現する領域は「雌ずい」が分化する。

【問 9】 突然変異体の研究から考えられた ABC モデルは、進化の過程で生じた多様な花の形も説明することができると考えられています。(1) テッポウユリ, (2) キンギョソウ, (3) ギンギシの花の形態について A, B, C の 3 つの遺伝子の発現様式を用いて説明した場合、花葉と遺伝子発現のパターンの関係を模式的に示した図として適切なものを図 9 のア～コの中から選び記号で答えよ。両性花、雌花、雄花がある種では両性花の遺伝子発現のパターンを選びなさい。なお、図中の記号と花葉の名称は、3 つの異なる遺伝子の発現とその遺伝子が発現している部位を示します。例えば、図 9 のアでは^{えい}穎で遺伝子 A のみ、鱗皮で遺伝子 A と B の両方、雄ずいで遺伝子 B と C の両方、雌ずいで遺伝子 C のみが発現していることを示します。

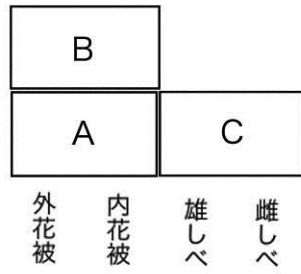
ア



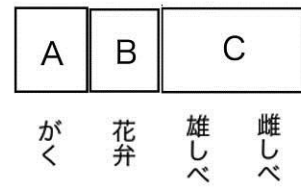
イ



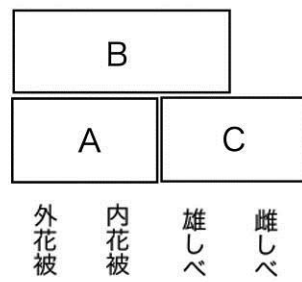
ウ



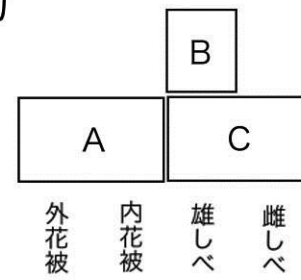
エ



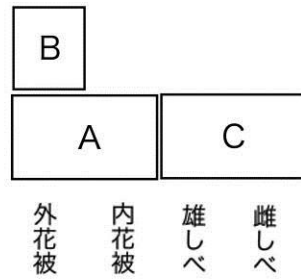
オ



カ



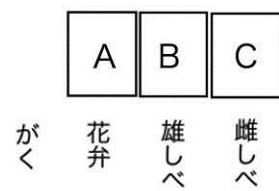
キ



ク



ケ



コ

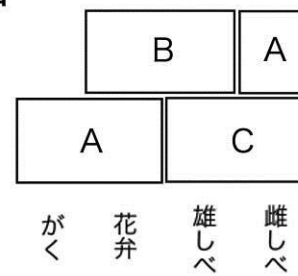


図 9. 花葉と遺伝子発現のパターンの模式

「実験 1. 実生を使った細胞分裂の観察」では、キク科植物のクレピスの実生を用いて、組織間の細胞の形態と細胞分裂を観察し、発芽初期の細胞分裂と成長の関係を探ってもらいました。

【問 1】では、フォイルゲン染色された実生全体の発色部位を観察し、スケッチしてもらいました。フォイルゲン染色では DNA が特異的に染色されるので、核のみが特異的に赤く発色します。形態的に茎頂と根端の頂端分裂組織、子葉、胚軸、幼根、根毛が区別され、これが描かれている必要があります。フォイルゲン染色された実生は、茎頂と根端の頂端分裂組織が濃い赤に染色されています。また、胚軸と幼根が薄く、あるいは子葉の葉脈に沿ってさらに薄く染まっているものも観察されます。

【問 2】では、クレピスの実生苗の 3 つの領域の細胞分裂の観察をとおして考えてもらいました。細胞分裂の各時期の特徴を知識あるいは実際の観察できちんと理解していること、および細胞分裂の進行過程で DNA 量が複製をとおして 2C 量から 4C 量に増加し、M 期を通じて 4C 量から 2C 量に DNA 量を減らすことを理解していることで、解答できます。

(1) は細胞分裂の各時期を同定してもらうことにより、これ以降の問題を解答しやすくするための設問です。答えは a~e の順に、間期、前期、中期、後期、終期です。

(2) では (1) の細胞分裂の各時期の同定に基づいて、領域 1、領域 2、領域 3 の間で染色体数の数えやすい領域を探してもらいました。領域 1 では中期染色体は普通に凝縮して、短縮しています。領域 2 では中期染色体が見られません。領域 3 では中期染色体が強く凝縮して、最も短縮した状態にあります。答えは数えやすい領域が領域 3、染色体数は $2n=6$ です。

(3) では 領域 1 と領域 3 の実際に作製した染色体標本から細胞分裂の各時期の頻度を求めてもらいました。細胞分裂の各時期がきちんと区別できれば解答できます。領域 1 では分裂期の頻度がだいたい 5~10% の範囲に収まります。分裂期のそれぞれの時期の細胞は今回の観察では計測数が少ないので、非常にばらついた結果が出ますが、前期は他の分裂期と比べて常に高い頻度を示します。また、基本的に、前期、中期、後期、終期の全ての分裂期細胞が見られます。領域 3 では分裂期の頻度が 5~15% の範囲に収まります。重要な点としては分裂期の細胞のうち、後期と終期が観察されません。

(4) では (3) の結果に基づいて、試薬 C の働きを探ってもらいました。無処理の領域 1 は細胞分裂が普通に進行しているのに対し、試薬 C 処理を行った領域 3 は中期染色体の両極への移動が阻害されていることが考えられます。

(5) では試薬 C はどのような薬品かを解答してもらいました。実際に使用した薬品はコルヒチンですが、これ以外にコルセミド、ビンブラスチン、8 オキシキノリンなどがあります。

【問 3】では、実生の細胞の形の観察と細胞分裂の観察をとおして、発芽初期の成長の仕方について考えてもらいました。核の DNA 量は 2C 量から 4C 量の間の変異で 2 倍の範囲に収まっており、核の直径にすると 1.4 倍程度の違いしかないのに対し、細胞の大きさ（長径）に関しては発色の強い領域に対して、発色の弱い領域は 2 倍よりもかなり大きい。以上の点から、発色の強い領域は単位体積あたりの核の数が多く、

発色が弱いか、発色してないように見える領域は単位体積あたりの核の数が少ないことから、発色の違いとなります。このような領域（組織）による発色の違いと細胞分裂の有無を考慮すると、実生苗の生長は根端分裂組織で盛んに細胞分裂を繰り返し、それより上部は細胞分裂することなく細胞が大きくなる伸長成長を行っていることがわかります。非常に濃く発色している頂端分裂組織の他に、胚軸や幼根の維管束や子葉の葉脈に沿ってやや薄く染まる領域が子葉下部全体に見られますが、これは周辺の皮層よりも相対的に細胞が小さいことにより、やや薄く染まっているように見えます。ほとんどの場合、肥大成長ではありません。

「実験 2. 被子植物の花のつくり」ではテッポウユリ、キンギョソウ、ギンギシの花の構造について観察し、被子植物の花の構造を遺伝子の発現パターンの違いから説明する ABC モデルについて考えてもらいました。ABC モデルはシロイヌナズナやキンギョソウの花の各器官に異常がおきた突然変異の研究成果に基づいて考えられたモデルで、その後、このモデルで他の多くの被子植物の花の構造も説明できることが分かってきました。

【問 4】では、テッポウユリ、キンギョソウ、ギンギシの花の構造を的確に説明した文章を選びます。テッポウユリの花は、一見して、6 枚の花弁があるように見えます。6 枚の花弁のような構造は、外側の 3 枚の外花被とその内側の 3 枚の内花被に区別できます。外花被は、がくに相当するものですが、花弁のような色や形をもっています。雄ずいは 6 本で、雌ずいの根元の子房の部分の断面を観察すると 3 室に分かれています。(1)の答えは (イ)です。キンギョソウの花は、5 枚に分かれたがく片、5 枚に分かれた花弁、4 本の雄ずい、内部が 2 室に分かれた 1 本の雌ずいをもちます。(2)の答えは (オ)です。ギンギシの花は、一見して花弁をもたず、6 枚のがくのような構造で雄ずいと雌ずいを取り囲まれています。6 枚のがくのような構造は、外側の 3 枚の外花被とその内側の 3 枚の内花被に区別できます。雄ずいは 6 本ですが、まれに雄ずいをつけず雌ずいだけをつけた花（雌花）が混じっています。(3)の答えは (ア)です。

【問 5】では、花の構造を模式的に描いた花式図を描いてもらいました。3 枚の外花被、3 枚の内花被、6 本のおしべ、内部が 3 室にわかれた雌ずいを同心円状の配置で描いてもらえれば正解です。

【問 6】では、キンギョソウの受粉について考えてもらいました。キンギョソウの花は受粉を効率的に行う大型の昆虫のみを選別的に、呼び寄せる構造となっています。下側の花弁の部分がハナバチなど比較的大型で体重の重い昆虫にとまりやすくなっていて、昆虫が、とまると花の内部への通路が開き、昆虫が内部にもぐり込むことができます。これらの昆虫が頭から潜り込んで中の花粉を集めたり蜜を吸い、途中で突き出したおしべからの昆虫の体に花粉がくっついて、他の花へと運ばれていきます。小さくて体重が軽い昆虫、チョウなど、受粉に関して効率が悪い昆虫が蜜に到達しにくい構造となっています。

【問 7】では、ABC モデルが提唱されるもととなった、花の突然変異体の特徴について考えてもらいました。シロイヌナズナの花の突然変異は、大きく以下の 3 つのグループに分けることができます。雄ずい、雌ずいのみからなるグループ 1、がく、雌

ずいのみからなるグループ 2、がく、花弁のみからなるグループ 3。この状況を客観的に考察した文章を選んでもらいます。変異体は、隣り合った 2 種類の花葉が同時に変化して生じる傾向があります。このことから隣り合う 2 種類の花葉にまたがって発現する遺伝子が機能を失うことによって、これらの変異が生じたと考えられます。正解は(ア)。

【問 8】では、【問 7】での考察から、導かれる ABC モデルとして適切なものを選んでもらいました。正解は(ア)。遺伝子 A のみが発現する領域は「がく」、遺伝子 A と B が発現する領域は「花弁」、遺伝子 B と C が発現する領域は「雄ずい」、遺伝子 C のみが発現する領域は「雌ずい」が分化します。ちなみに、シロイヌナズナの突然変異体の形態に関しては、グループ 1 では A 遺伝子の発現が欠失し、グループ 2 では B 遺伝子の発現が欠失、グループ 3 では C 遺伝子の発現が欠失していることで説明ができます。問 9 では、テッポウユリ、キンギョソウ、ギシギシの花の構造を ABC モデルで説明した場合に、それぞれの種で ABC の遺伝子の発現パターンはどのようになるのかを考えてもらいました。がく、花弁、雄ずい、雌ずいの分化がはっきりしているキンギョソウの花の構造は、シロイヌナズナと同じ遺伝子の発現パターンで説明がつけます。テッポウユリ、ギシギシに関しては B 遺伝子の発現する領域が変化することによって、それぞれ花弁のような外花被と内花被をもつこと、がくのような外花被と内花被をもつことが説明できると考えられます。正解は (1) オ、(2) イ、(3) カになります。

名札番号		名前	
------	--	----	--

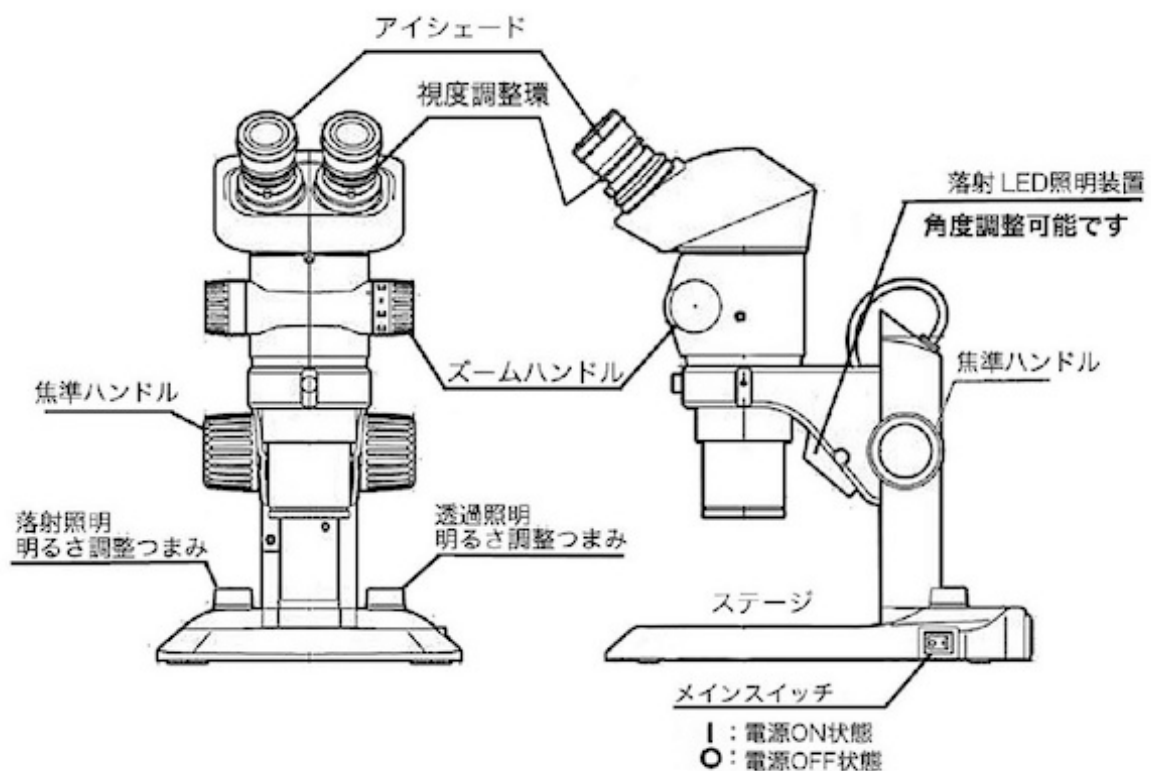
実験試験（動物）問題冊子

（平成 23 年 8 月 19 日 9 時 30 分～12 時 30 分，14 時 00 分～17 時 00 分）

1. 机には、問題冊子（21 ページ）および解答用紙（6 枚）が配付されています。
2. 説明が始まるまでは、問題冊子を開けずに、このページをよく読んでおいてください。また、机の上のアルミホイルで覆われたものを開けてはいけません。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と名前を記入してください。また、このページにも名札番号と名前を記入してください。
4. 問題冊子の最初に、実体顕微鏡の使い方の説明があります。内容は植物の試験と同じです。
5. イスの高さはレバーで調節できます。良い位置に調節してください。イスの高さが低すぎて合わない人は、挙手をしてください。
6. 試験の途中で、気分が悪くなったり、用便のために外に出たりする場合は、挙手をしてください。
7. 実験中はかならず実験用手袋を着用し、実験液が眼、口、皮膚などに触れないよう注意すること。万一触れた場合や手袋のサイズが合わないとき、数が足りないときには、挙手をしてください。
8. 試験の解答開始と終了時刻は、最初の説明のあとにディスプレイに掲示されます。
9. この試験は実験 1 と実験 2 に分かれています。実験 1 は試験開始後 1 時間で終了し、材料と試薬、器具類を入れ替えます。
10. その他の指示は、試験室内のディスプレイに映し出されますので、時々ディスプレイを見てください。
11. 問題冊子にメモをとってもかまいません。試験終了後、問題冊子は持ち帰ってください。
12. 実験机の上の文具や実験道具は自由に使ってください。実験中は位置も自由に動かしてください。試験終了後はなるべく元の位置に戻してください。

実体顕微鏡使用マニュアル

1. ステージに直接試料をのせないこと。
2. 背筋を伸ばして観察できるようにイスの高さを調節すること。
3. 接眼レンズの眼幅，視度調整をすること。視度調整環は接眼レンズの双方についているので双方とも0の位置に合わせる。次に，右目で観察する標本にステージを上下させてピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして，左目でのぞき，左側の接眼レンズの視度調整環を回してピントを合わせる。眼鏡をかけて検鏡するときは，アイシェードのゴムを折り返して短くすること。
4. 観察のときは，落射照明（左側の調整つまみ）と透過照明（右側の調整つまみ）を観察に応じて使い分けること。落射照明は角度を調整して，試料に光が十分当たるようにすること。
5. 倍率を変えて観察する場合には，ズームハンドルを回して調節する。



実体顕微鏡各部名称

実験 1. フナの解剖と分子系統

【実験に必要なもの】

この実験では、下に示した材料，器具，装置を用います。足りないものがあつたら挙手してください。

1. フナ	1 匹
2. 実体顕微鏡	1 台
3. 解剖道具	1 式
ハサミ，メス，柄付針， 先細ピンセット，先丸ピンセット	(各 1 本)
4. 電卓	1 台
5. カウンター	1 台
6. ノギス（次ページの写真参照）	1 本
7. 実験用手袋	2 組
8. 90 mm シャーレ（エタノールが入っている）	1 枚
9. 実験用ティッシュ（キムワイプ）	1 箱
10. ペーパータオル	1 束
*15 ml チューブ	24 本
*ストップウォッチ	1 台
*マジックペン	1 本
*色画用紙	1 枚

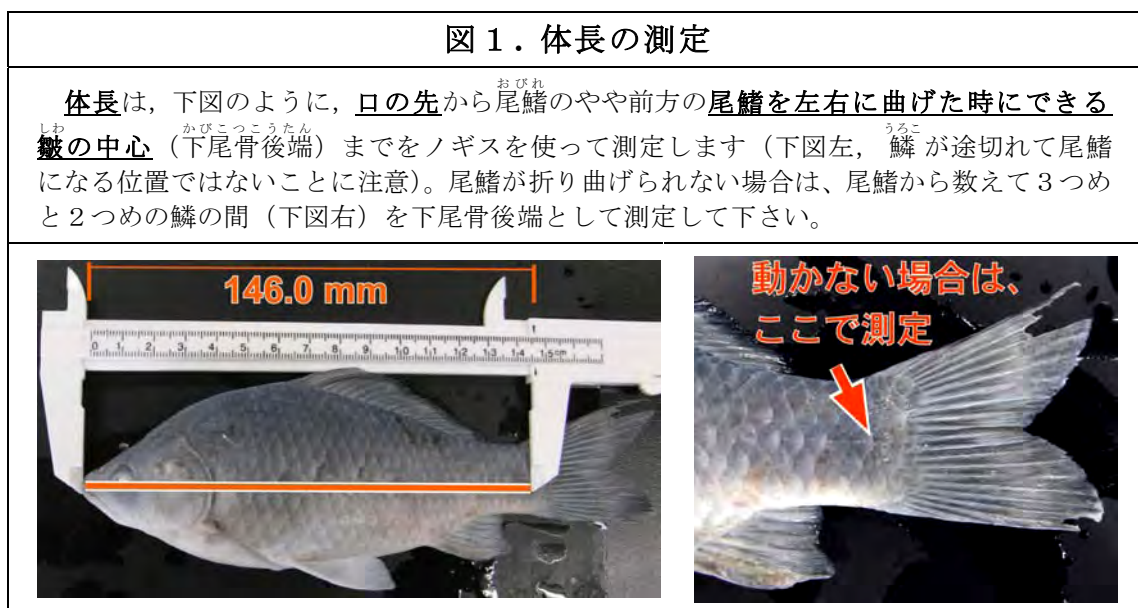
(注) *は実験 2 で使用します。

【はじめに】

動物の摂食器官や消化器官は，食性（食べているものの種類など）に適した形をもっています。本実験ではフナを解剖し，どのような食性を持っているかを考察します。また，金魚はフナから作り出された人工品種ですが，金魚がどのようなフナから作り出されたのかという点には，これまでに多くの議論がありました。この実験では，最近行われた分子（DNA）情報を使った系統解析の結果を読み取り，金魚の起源について考察します。

次のページから問題が始まります

【問 1】与えられたフナについて、図 1 に示した手順で体長を測定し、測定値を解答用紙の表に記入せよ（ミリメートルの単位で小数点第一位まで記入）。



【問 2】フナを図 2，図 3 に示す手順に沿って解剖しなさい。その上で、以下の(1)～(2)に答えなさい。なお、解剖したフナは壊したり捨てたりせず、バット上に並べておくこと。計測後の腸と^{さいは}鰓耙は、90 mm シャーレの中のエタノールに浸けておくこと。

- (1) 腸の長さを測定せよ。また、腸の長さと体長の比（腸長比＝腸長÷体長）を求めよ。それぞれの値を解答欄に記入せよ。
- (2) 第 1 ^{さいきゅう}鰓弓を取り出し、鰓弓の前部にある^{いば}襞（鰓耙）の本数を数え、本数を解答欄に記入せよ。必要に応じて、実体顕微鏡を用いなさい。この場合、鰓耙をシャーレの蓋の上にのせて観察せよ。



2. 腹部体側壁の切開：ハサミを使って、肛門から矢印③の方向に体壁を切開します。



3. 腹部体壁の除去：胸鰭の付根から矢印④の方向に体壁を鉗で切開します。その後、体壁を持ち上げ、内臓を壊さないように体壁を切除します（必要があればメスを使います）。



4. 生殖巣の除去：生殖巣が発達している場合は、それを取り除いて腸を露出させます。



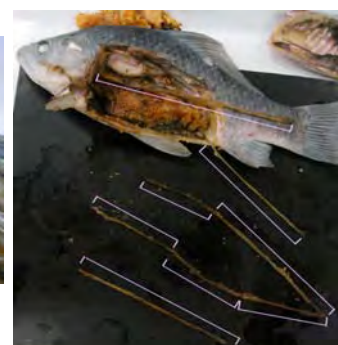
5. 腸長の測定：フナやコイは「無胃類」といわれ、明確に胃と呼べる器官を持っていません。このため、食道から肛門までの全ての消化管を腸とみなし、その長さを測定します。なお、腸は腸間膜に覆われているので、これを除き、図のように腸を引きのばして測定します。途中で切れた場合は各消化管断片の長さを測定し、足し合わせます。



腸管は折り畳まれているので、ピンセットや柄付針で腸間膜を取り除き、腸を延ばす。



食道の付根から測定する。



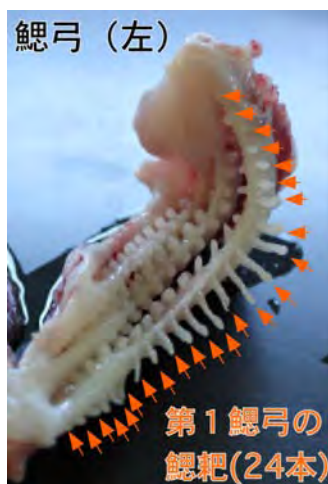
腸の全長を測定する。

図 3. 鰓弓の摘出と鰓耙の観察

鰓弓は左右に並んでいます。下の写真は、魚食性の海水魚であるスズキの口腔と鰓弓です。口から見て一番前方、側面から見て一番外側の鰓弓（第1鰓弓）を片方だけ摘出します。下写真（中央）のように、片側の鰓弓全てを取出してから、第1鰓弓だけを切除しても構いません。取り出す途中で壊してしまった際は、もう一方の鰓弓を摘出します。摘出した第1鰓弓の鰓耙数をかぞえます。必要に応じて実体顕微鏡を用いて下さい。この場合、シャーレのフタを裏返して鰓弓をのせて観察して下さい。



スズキの口腔と第1鰓弓



鰓弓（左側）。矢印は第1鰓弓の鰓耙。

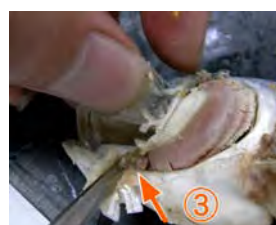


第1鰓弓。この状態で鰓耙数を数える（この場合 24 本）。

鰓弓取り出しの手順



①鰓蓋を矢印の方向に切開する。



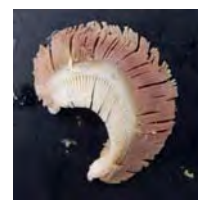
③鰓弓の下部末端を切断する



④矢印の向きにハサミを入れ、鰓弓上部を露出させる



⑤鰓弓の上部末端を切断する。



⑥第1鰓弓の鰓耙数を測定する。

【問 3】鰓耙の形状（長さや密度）と腸の長さは，魚の食性と考えられています。ここで，スズキと金魚，ゲンゴロウブナの鰓耙数と腸長比が，以下の表の範囲であるとしています。

	鰓耙数（本）	腸長比
スズキ	24～30	1.0～2.0
金魚	30～56	2.0～4.3
ゲンゴロウブナ	56～128	3.4～7.2

鰓耙数と腸長比の比較から，表の 3 種類の魚がそれぞれどのような食性を持っているか考察せよ。とくに，鰓耙については，位置と構造から推察される機能に言及せよ。また，あなたが観察したフナの食性を計測値にもとづいて推定せよ。

（解答用紙の枠内に 300 字程度で記述して下さい。的確な解答であれば，文字数は少なくてもよい）。

【問 4】最近，金魚の起源を明らかにするために，ミトコンドリア DNA の塩基配列に基づく系統解析が行われました（Komiya et al., 2009, Gene 430: 5-11）。この解析で得られた系統樹を以下の図 4 に示します。また次ページの四角で囲んだ文章は，その結果を説明したものです。これら図と説明を参照し，以下の（1）～（3）に答えなさい。

なお，系統樹の見方がわからない場合は，この問題の後にある「補足：分子系統樹の読み方・脊索動物の例」（10～11 ページ）を読んでから【問 4】に答えなさい。系統樹の見方がわかっている場合は，補足を読む必要はありません。

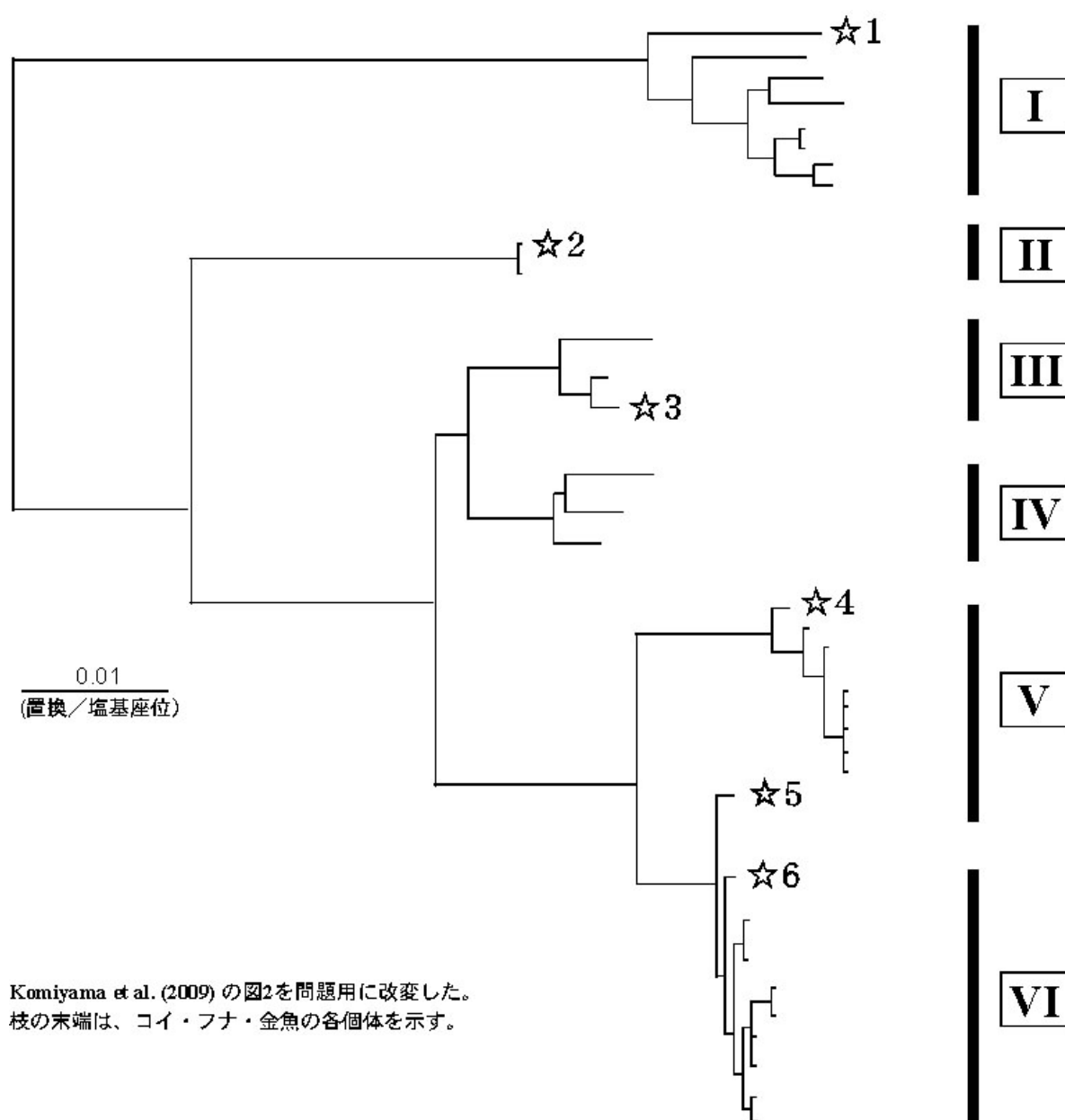


図 4．ミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列に基づくフナの系統関係

この研究では、図中の I – VI で示した日本産のフナ 3 種類（キンブナ、ギンブナ、ゲンゴロウブナ）、中国産のフナ 1 種類（ギベリオブナ）、金魚およびコイを材料に用いている。このうちコイは外群（系統樹の根元を決めるための対照群）で、系統樹上で最も初期に分かれたグループとして示されている。また、この系統樹は、ミトコンドリア DNA の調節領域（D-loop 領域）の 740 塩基座位から作成された。この系統樹からは、以下 a) ～ e) の結果が示された。

- a) 日本産フナ類は単系統群ではなく、大きく 2 つの系統に分かれていた。そのうちの一つは、中国産のギベリオブナを含むグループと近縁であった。
- b) 材料に用いたフナ類のなかで最初に分岐したのは、日本産のゲンゴロウブナである。
- c) ゲンゴロウブナ以外の日本産フナ類は、キンブナとギンブナの系統であるがこれらは単系統群となった。
- d) ヒブナは、金魚の起源であるとしばしば指摘される。しかし、ここで用いたヒブナは、金魚と近縁ではなく、むしろキンブナのグループに含まれていた。
- e) 金魚には、外部形態が大きく異なる様々な品種がある（シュブンキンやデメキン、ランチュウなど）。この解析には、これらの品種も含まれているが、品種間および金魚全体のミトコンドリア DNA の塩基配列の変化は、形態的に変化が少ないフナ類やコイと比べ、ごくわずかであった。

- (1) 説明文中的ヒブナは、系統樹中の☆1～☆6 のいずれかに位置します。どの位置が最も適当か、解答欄に記入せよ。
- (2) 系統樹中の I – VI は、それぞれギベリオブナ、キンブナ、ギンブナ、金魚、ゲンゴロウブナ、コイのどのグループに当たるか、解答欄に記入せよ。
- (3) この分子系統解析の結果から、金魚は、説明に出てくるどのフナから作出された可能性が最も高いか、解答欄に記入せよ。

試験開始 1 時間で実験 1 を終了し、解剖したフナを回収します（腸と鰓耙はシャーレのエタノールに浸けておくこと）。その後、実験 2 の材料と試薬を配布します。

補足：分子系統樹の読み方・脊索動物の例

生物間で相同な遺伝子や非コード領域の塩基配列データ（DNA 配列）を比較することで、生物間の系統関係を推定することができます。推定した系統関係は、**系統樹**と呼ばれる図で示されます。次ページの図 5は、脊索動物の系統関係を塩基配列にもとづいて推定した場合の系統樹であるとしします。この図は、以下のように読み取れます。

1. 系統樹の枝分かれ（分岐）の順序は、各動物の系統が他の系統から分かれた順序を示します。この系統樹では、脊椎動物の中でも、魚類のゼブラフィッシュに至る系統が最初に分かれ、続いてハイギョの系統が分岐しています。
2. この系統樹の中では、トリ、ワニ、カメの内、トリとワニは同じ系統樹の結節点（ノード）から分かれています（ノード 7）。そしてカメは、その一つ外側の結節点から分かれています（ノード 6）。系統樹の結節点は、その先の枝に位置する動物の共通祖先を示しています。つまり、結節点が近い動物ほど、より最近に存在した共通祖先に由来しており、系統的に近縁であることが示されています。従ってこの図では、同じ爬虫類のワニとカメよりも、ワニとトリが近縁です。また、四足動物、有羊膜類、哺乳類のように、そこに含まれる全ての生物が一つの祖先に由来している分類群を**単系統群**といいます。一方で爬虫類のように、一つの系統を除くと、そこに属する全ての生物が一つの祖先に由来するようになる分類群を**側系統群**といいます（トリの系統を除けば、爬虫類は単系統群です）。
3. この系統樹の横方向の枝の長さは、塩基配列の違いを反映しています。この図では、系統樹の横方向の枝の長さは、動物間で観察された塩基置換数を、データに用いた塩基座位数（1000 座位）で割ったものとしします（1 塩基座位につき塩基置換が生じる確率に等しい）。この図では、データに用いた遺伝子において、ヒトの系統では、ネズミと分かれてから、50 の塩基置換（ 0.05×1000 ）が生じ、ネズミの系統ではヒトと分かれてから 40 の塩基置換（ 0.04×1000 ）が生じていることが示されており、ヒトとネズミの間では 90 の塩基置換が観察されることがわかります。なお、この図では、縦方向の枝の長さはとくに意味を持っていません。

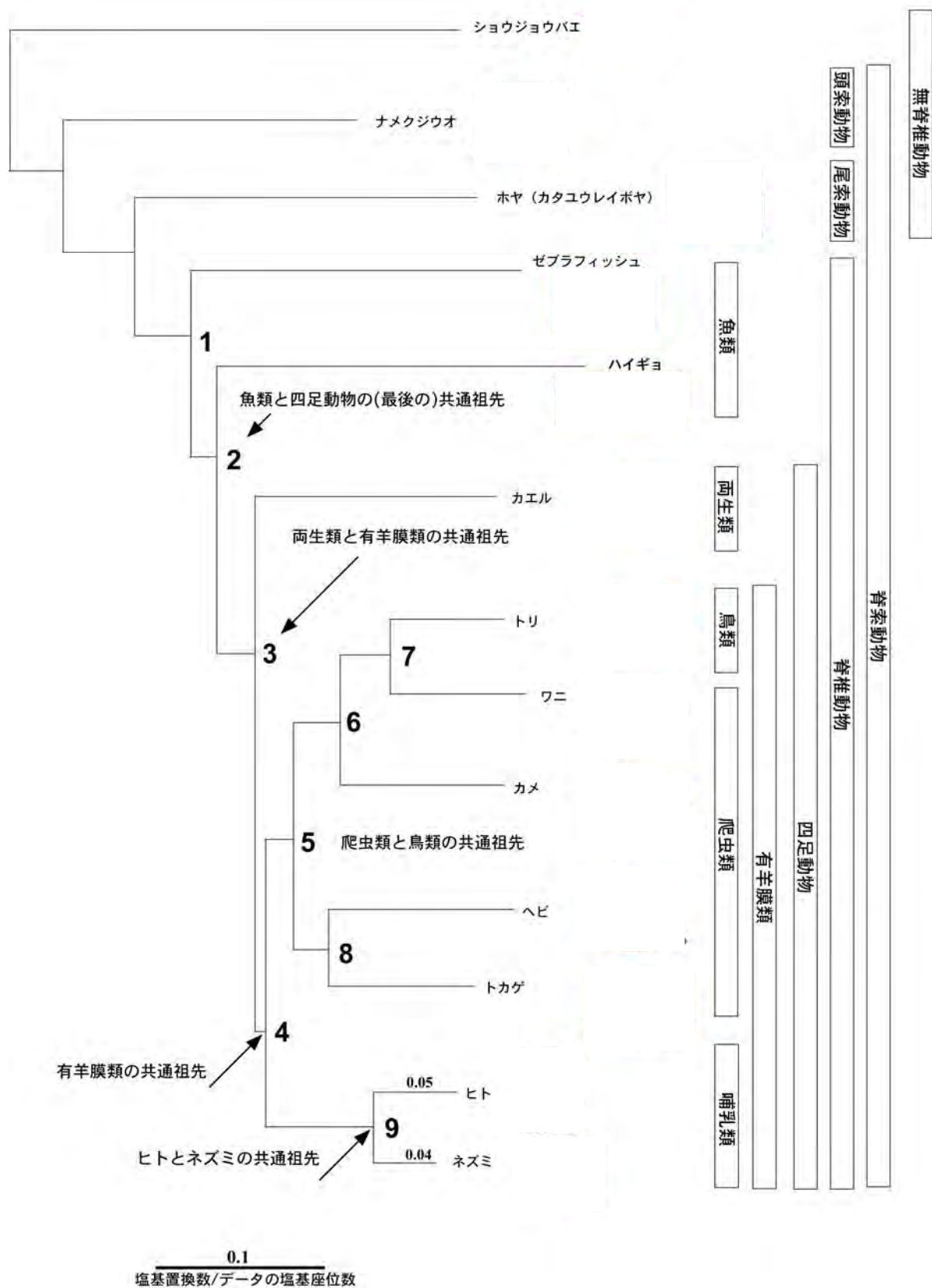


図 5. 脊索動物の分子系統樹

このページは白紙です。

実験 2. 魚類の色素胞

【実験に必要なもの】

この実験では、下に示した材料，器具，装置，試薬を用います。足りないものがあったら挙手をしてください。

1.	メダカ <i>Oryzias latipes</i> (野生型) の鱗の入ったシャーレ		1 枚
2.	12 穴のプレートディッシュ		3 枚
3.	スポイト(小)		24 本
4.	廃液入れ		1 個
5.	生理食塩水, スポイト(大)		各 1 個
6.	神経伝達物質	ノルアドレナリン	(10^{-6} M, 5 ml) 1 本
		アセチルコリン	(10^{-4} M, 5 ml) 1 本
7.	ホルモン	黒色素胞刺激ホルモン(MSH)	(10^{-5} M, 5 ml) 1 本
		メラニン凝集ホルモン(MCH)	(10^{-5} M, 5 ml) 1 本
8.	受容体阻害剤	フェントラミン	(10^{-5} M, 5 ml) 1 本
		プロプラノロール	(10^{-5} M, 5 ml) 1 本
		ツボクラリン	(10^{-5} M, 5 ml) 1 本
		アトロピン	(10^{-5} M, 5 ml) 1 本
9.	実体顕微鏡		1 台
10.	15 ml チューブ		24 本
11.	先細ピンセット		1 本
12.	実験用手袋		2 組
13.	ストップウォッチ		1 個
14.	マジックペン		1 本
15.	色画用紙		1 枚

※1～8 が，実験 2 で新しく配付したものです。

※6～8 は，チューブに入った状態でラックにまとめてあります。

※プレートディッシュに名札番号とプレート番号を記入すること。

(例：名札番号 90 の場合、90-1, 90-2, 90-3)

【はじめに】

魚類や爬虫類などの変温脊椎動物では、周囲の環境や個体の緊張状態などに応じて体色が変化します。これは、体表に存在する色素をもった細胞（色素胞）の働きによるものです。色素胞は、色素の色によって大別されます。例えば、魚類のメダカの鱗には、メラニン顆粒をもち、黒色に見える黒色素胞、カロチノイド顆粒をもち、黄色に見える黄色素胞、また、グアニン顆粒をもち、光を反射して白く見える白色素胞があります。

メダカから鱗を摘出して生理塩類溶液に浸し、透過照明を用いて顕微鏡で観察すると、放射状の突起をもつ黒色素胞と、その周辺にある黄色素胞が見えます（図6 A）。直接観察することはできませんが、色素胞の周辺には色素胞神経の神経終末が密に分布しています。色素胞神経が興奮していないときには、黒色素胞と黄色素胞は色素顆粒が細胞内に均質に拡散した状態（拡散状態）にありますが、色素胞神経が興奮して神経終末から神経伝達物質が色素胞の周りに放出されると、黒色素胞と黄色素胞では細胞の突起が収縮して円形へと変化します（図6 B）。この反応は、色素顆粒が細胞の中心部へ集まる色素顆粒凝集反応であり、細胞の輪郭は変化しないことがわかっています。

一方、同じ鱗を落射照明を用いて観察すると、白色素胞が見えます（図6 C）。白色素胞は黒色素胞や黄色素胞とは逆に、色素胞神経が興奮していないときに色素顆粒が細胞の中心部に集まっています。そのため、円形の細胞のように見えますが、実際には、白色素胞も黒色素胞と同様、突起をもった細胞です。色素胞神経が興奮すると色素顆粒拡散反応が引き起こされて色素顆粒が細胞内へ均質に拡散するため、突起をもった白色素胞の輪郭を観察できます（図6 D）。

なお、図6では、色素胞の色素顆粒が完全に拡散した状態と完全に凝集した状態のみをそれぞれ写真で示していますが、実際には、色素胞神経の興奮の程度により中間的な反応が見られます（21 ページの「色素胞の反応を判定するためのインデックス表」を参照せよ）。

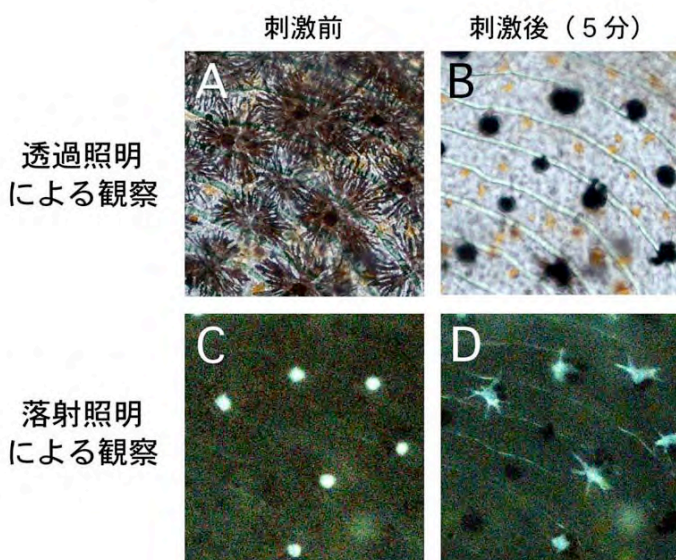


図6. メダカの鱗にある色素胞の反応

また、脳下垂体などから分泌されたホルモンが血流によって鱗にある毛細血管へ運ばれ、色素胞に作用することもわかっています。神経伝達物質やホルモンは、色素胞の細胞表面に存在する受容体と結合して色素顆粒の運動を引き起こします。

図7は、神経系と内分泌系による黒色素胞と白色素胞の色素顆粒運動調節の仕組みを模式的に示したのですが、一部、未完成です。この実験では、色素胞に対する各種薬物の作用を確かめ、下の図を完成させます。ただし、神経伝達物質Aと神経伝達物質Bが異なる物質であるとは限りません。受容体やホルモンについても同様です。

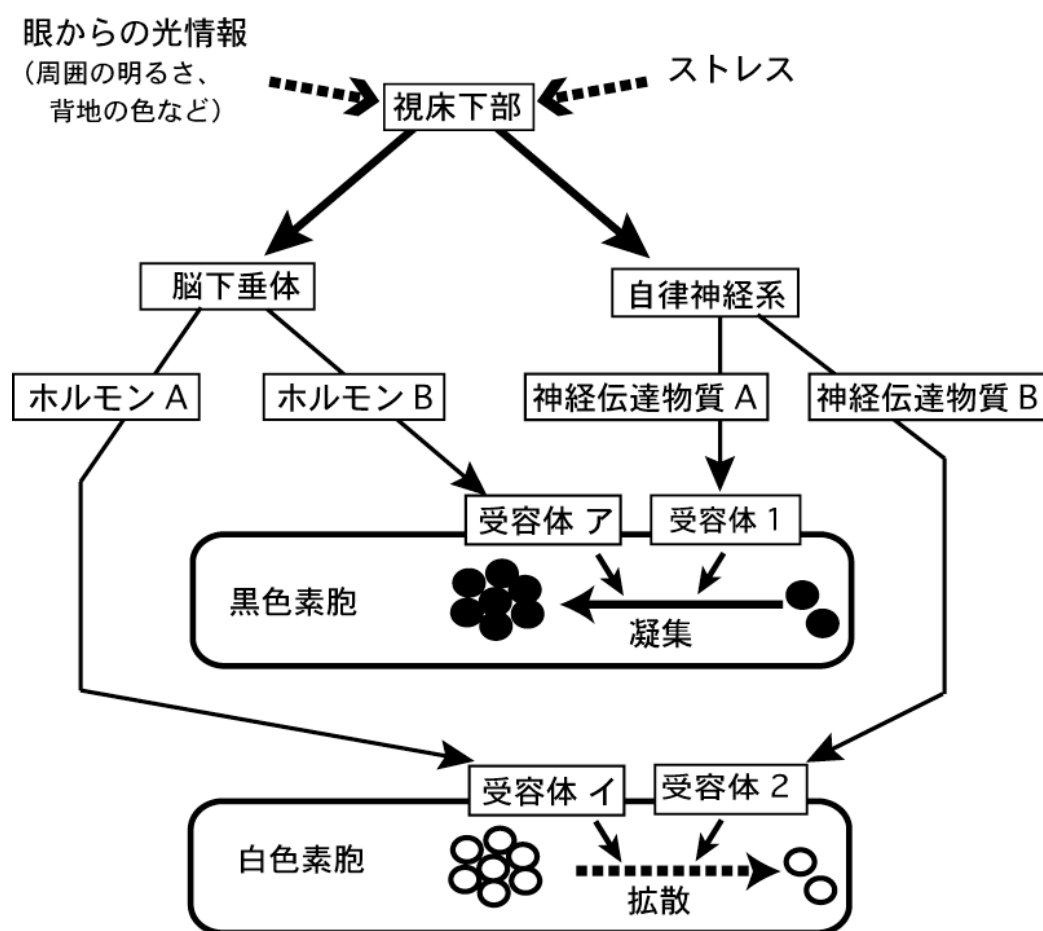


図7. メダカ色素胞の色素顆粒運動の調節機構

次のページから問題が始まります

【問 5】 まず、自律神経系から放出され黒色素胞と白色素胞に作用する神経伝達物質 A と神経伝達物質 B が、それぞれ何であることを確かめるため、自律神経系の神経伝達物質であるノルアドレナリンとアセチルコリンの作用を調べます。以下に示した【実験方法】をよく読んで実験を行い、観察結果から、図 7 の神経伝達物質 A および B がそれぞれ何かを解答用紙に記入せよ。さらに、黒色素胞や白色素胞の顆粒運動を調節する自律神経系が、交感神経か、あるいは、副交感神経かをそれぞれ考察して記入せよ。

また、実験に用いたチェンバーの番号（例：プレート 1 番のチェンバー A3 の場合は 1-A3 と記入する）、用いた神経伝達物質の名称、色素胞の反応（インデックスの番号）についても解答用紙に記入せよ。

【実験方法】

1) 実験液の調製

- ① 用意した実験液は、生理食塩水で 10 倍に希釈して実験に用います。例えば、15 ml チューブの側面にある目盛りを見ながらスポイト(大)を用いて生理食塩水を 4.5 ml 入れ、次に、スポイト(小)で 0.5 ml の実験液を 15 ml チューブに加えて 5 ml にします。ノルアドレナリンとアセチルコリンをそれぞれ 10 倍希釈した液を調製し、チューブの側面と蓋に、希釈した試薬名をマジックペンで記入しておくこと。
- ② 実験には 12 穴のプレートディッシュを用います。プレートディッシュには、縦 3 個、横 4 個の小さなチェンバー(穴)が並んでいます。縦には A～C の記号が、横には 1～4 の番号が付けてあります。たとえば、左上のチェンバーは A1、右下のチェンバーは C4 となります。
- ③ 1 つのチェンバーに希釈したノルアドレナリン液を、となりのチェンバーに希釈したアセチルコリン液を入れます。希釈液はチェンバーの深さの 1/3 程度入れば十分です。

2) メダカの鱗

- ① この実験で用いる鱗は、メダカから摘出した後、生理食塩水に浸して 18℃で 15 時間程度、静置させたものです。これにより鱗に残った色素胞神経の終末は働かなくなっています。従って、以後の実験でみられる色素胞に対する各試薬の作用は、色素胞神経を介した間接的なものではなく、色素胞に対する直接作用と考えることができます。

- ② 鱗の入ったシャーレを実体顕微鏡のステージに置き、透過照明下で鱗を観察すると、黒く広がっている黒色素胞が観察できます（図 8 A）。つぎに、透過照明を消し、落射照明を点けて鱗を観察すると、白色素胞が白い点として観察されます（図 8 B）。なお、ほとんどの白色素胞は黒色素胞と上下に重なって存在するため、鱗を黒色素胞の側から観察した場合は白色素胞を観察できないことがあります。白色素胞が観察できないときは、色素胞が載っていない鱗の透明部分を先細ピンセットでつまんで、鱗を裏返して白色素胞を確認します。色画用紙をシャーレの下に敷くと白色素胞が観察しやすくなります。
- ③ 鱗にある黒色素胞の密度には個体差があり、図 8 A のように、黒色素胞の間に隙間が広く空いている鱗や、図 8 C のように密に分布する鱗があります。いずれの鱗でも黒色素胞が拡散状態にあれば実験に用いることができます。また、図 8 D のように、一部の黒色素胞のみ凝集しているような鱗は、拡散状態にある黒色素胞にのみ注目して実験と観察を行うこともできます。
- ④ 黒色素胞の突起が細く、黒色素胞の数も少ない鱗（図 8 E）や、黒色素胞が不定型に崩れている鱗（図 8 F）、生理食塩水中ではほとんどの黒色素胞が凝集している鱗、などは実験に使用しないこと。

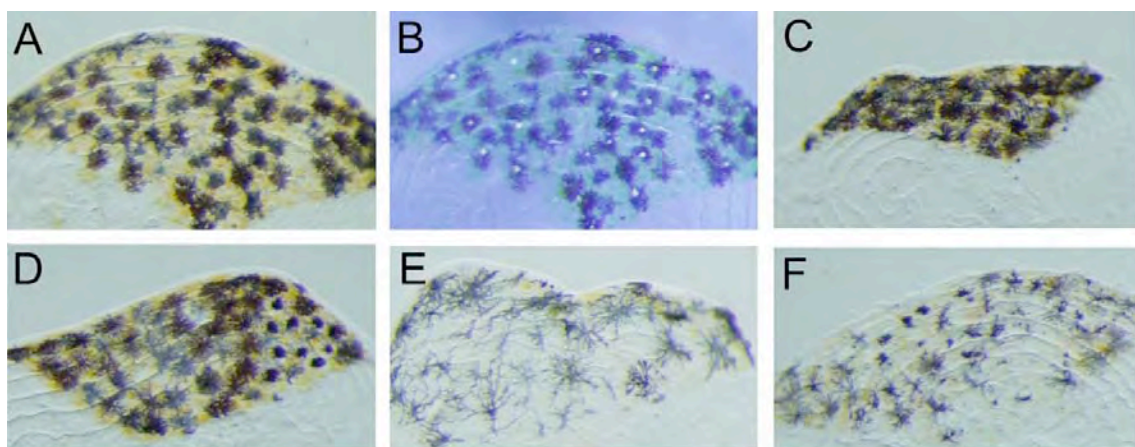


図 8. 実体顕微鏡で観察したメダカの鱗

3) 神経伝達物質に対する色素胞の反応の判定

- ① 鱗の透明部分を先細ピンセットでつまんで、それぞれの実験液が入ったチェンバーに 1 枚ずつ移します。鱗の裏表に注意し、白色素胞が見える面を上にして置くこと。
- ② 鱗を移して 5 分後の黒色素胞と白色素胞それぞれの反応を、21 ページの「色素胞の反応を判定するためのインデックス表」にあるインデックスの数字（黒色素胞は 1～4、白色素胞は 1～3）で判定しなさい。例えば、黒色素胞の色素顆粒が完全に凝集した場合は「4」、全く反応しなかった場合は「1」となります。

- ③ 単一の色素胞の反応を判定するのではなく、鱗全体の色素胞の平均的な反応となるように判定しなさい。色画用紙をプレートディッシュの下に敷くと白色素胞が観察しやすくなります。
- ④ 必要な事項を解答用紙の所定の欄に記入すること。

実験上の注意

- *実験液を扱うときには実験用手袋を着用し、実験液が眼、口、皮膚などに触れないようにすること。指先などに傷がある場合は、とくに注意すること。万一触れた場合は、挙手をしてください。
- *実験液が混和すると正しい結果が得られない場合があるので、同じチェンバーを繰り返し使ってははいけません。
- *ふつう、黒色素胞の観察は透過照明を用い、白色素胞の観察は落射照明を用います。しかし、室内の照明によっては、とくにこれらの照明法を区別しなくても黒色素胞と白色素胞を観察できる場合があります。状況に応じて観察しやすい照明方法で実験すること。

【問 6】 神経伝達物質 A と神経伝達物質 B は、色素胞にある受容体 1または受容体 2と結合して作用します。一方、受容体阻害剤は、特定のタイプの受容体と特異的に結合し、神経伝達物質の作用を阻害します。つまり、ある神経伝達物質の作用がどの阻害剤で阻害されるかを調べれば、その神経伝達物質が結合する受容体のタイプを判定することができます。この問題では、図 7 の神経伝達物質 A と B のそれぞれに対する 4 種類の受容体阻害剤の作用を確かめ、受容体 1 と受容体 2 のタイプを判定します。

4 種類の受容体阻害剤の名前や作用、結合する受容体のタイプは以下のとおりです。

アトロピン：心筋にあるムスカリン性受容体に作用させると副交感神経の刺激によって生ずる心拍動抑制が起こらなくなる。

ツボクラリン：骨格筋の神経筋接合部にあるコリン性受容体に作用させると、運動神経を刺激しても筋収縮が起こらなくなる。

フェントラミン：消化管に分布する血管にあるアドレナリン性 α 受容体と結合し、神経刺激による血管収縮反応を抑制する。

プロプラノロール：肝臓にあるアドレナリン性 β 受容体と結合し、アドレナリンの刺激によるグリコゲン分解を抑制する。

神経伝達物質と阻害剤をどのように組み合わせれば、受容体 1 と受容体 2 がそれぞれ判定できるか、【問 5】の結果も踏まえて用いる実験液の組み合わせを考察しなさい。そして、以下の【受容体阻害剤の作用を調べる実験】に従って実験を行い、観察結果と上記の受容体阻害剤の説明から、図 7 の受容体 1 と受容体 2 のタイプが何であるかをそれぞれ判定し、解答用紙に記入せよ。

また、実験に用いたプレートディッシュとチェンバーの番号、各々のチェンバーに入れた溶液が含む阻害剤や神経伝達物質の名前、各溶液内での色素胞の反応（インデックスの番号）も解答用紙の所定の欄に記入せよ。

なお、受容体のタイプの判定が可能であれば、実験を行う神経伝達物質と阻害剤の組み合わせの数が解答欄の数より少なくなってもよい。

【受容体阻害剤の作用を調べる実験】

- ① まず、16～18 ページの【実験方法】と同じやり方で、用意した阻害剤液を 10 倍に希釈します。次に、阻害剤と神経伝達物質の混合希釈液を調製します。この時、阻害剤と神経伝達物質のどちらも、用意した液の 10 倍希釈となるようにします。さらに、コントロールとして、阻害剤を含まない神経伝達物質液（10 倍に希釈）も調製します。
- ② ひとつのチェンバーに阻害剤液を、そのとなりのチェンバーに阻害剤と神経伝達物質の混合液を入れます。コントロールとして 1 つのチェンバーに生理塩類溶液を入れ、そのとなりに阻害剤を含まない神経伝達物質液を入れます。
- ③ シャーレに入った鱗 1 枚を、ピンセットでまず阻害剤液のみ（コントロールの場合は生理食塩水）が入ったチェンバー内に移します。5 分以上静置し、黒色素胞と白色素胞の凝集・拡散状態をインデックスの数値で判定します。
- ④ 鱗をピンセットで阻害剤と神経伝達物質の混合液が入ったとなりのチェンバーへ移します（コントロールの場合は神経伝達物質のみの液）。5 分後の色素胞の状態をインデックスの数字で記録します。
- ⑤ コントロールの鱗の反応と、阻害剤処理した鱗の反応を比較し、阻害剤の効果の有無を判定します。
- ⑥ 必要な事項を解答用紙の所定の欄に記入すること。

* 試薬の組み合わせの数が多い場合は、【問 5】の実験と同様、いくつかのチェンバーを使って同時進行で実験を行う、などの工夫をすること。

* 解答欄に阻害剤名を記入する際、コントロールについては「なし」と記入すること。

【問 7】 脳下垂体からは、色素顆粒運動の調節に関わる 2 つのホルモン、MSH と MCH が放出されます。【問 5】の実験法を参考にして、黒色素胞と白色素胞に対する MSH と MCH の作用を調べる実験を行い、図 7 のホルモン A とホルモン B がそれぞれ MSH と MCH のどちらであるかを判定しなさい。その結果を、解答用紙に記入せよ。

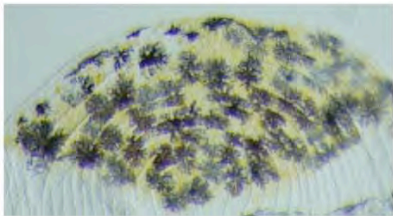
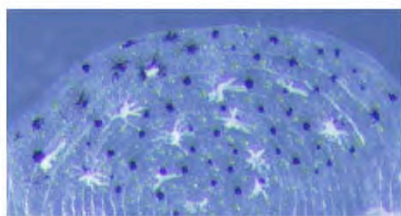
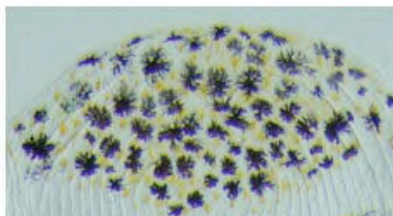
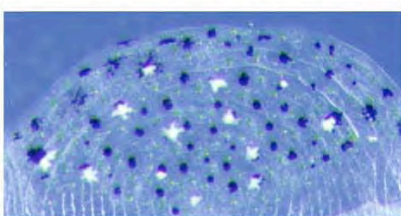
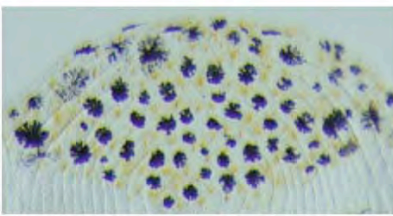
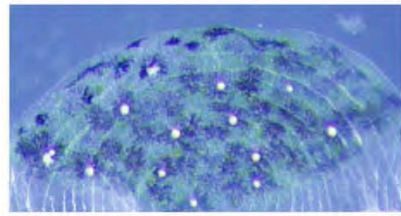
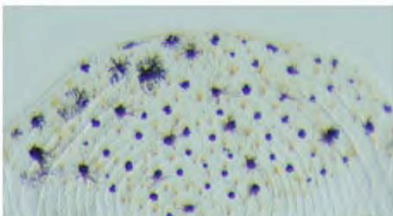
また、【問 5】や【問 6】と同様に、使用したディッシュとチェンバーの番号、各チェンバーに入れたホルモンの名称、各溶液内での色素胞の反応（インデックスの番号）も解答用紙の所定の欄に記入せよ。

【問 8】 図 7 において、脳下垂体由来のホルモン A とホルモン B が黒色素胞や白色素胞に作用するとき、「神経伝達物質の受容体 A または受容体 I と結合して色素顆粒の運動を引き起こす」という可能性が考えられます。【問 7】の実験結果を踏まえ、ホルモン B の黒色素胞に対する作用が、神経伝達物質受容体の阻害剤によって阻害されるかどうかを調べ、「ホルモン B が受容体 A と結合して色素顆粒の運動を引き起こす」という仮説を検証せよ。なお、実験方法および解答方法はこれまでの問題と同様です。

最終的に、ホルモンが神経伝達物質受容体と結合すると判定できた場合はその“受容体の名前”を、神経伝達物質受容体とは結合しないと判定した場合は“該当なし”と解答用紙に記入せよ。

【問 9】 自律神経系による各器官の機能調節では、交感神経と副交感神経が拮抗的に働くことが知られています。例えば、心臓では交感神経が働くとノルアドレナリンが放出され、心臓にある受容体と結合して拍動数を増加させます。一方、副交感神経が働くとアセチルコリンが放出され、受容体と結合して拍動数を減少させます。メダカの色素胞では、神経が興奮すると黒色素胞と白色素胞で逆の反応が起こります。実験結果から、この反応は交感神経と副交感神経による調節の結果である、と考えられますか。考えられる場合はその理由を、考えられない場合はなぜ色素胞に逆の反応を引き起こすことができるのか、実験結果を踏まえて簡潔に述べよ。

色素胞の反応を判定するためのインデックス表

黒色素胞		白色素胞			
インデックスの数字	1			1	インデックスの数字
		色素顆粒が黒色素胞全体に拡がっている。	白色素胞の突起が枝の様に伸び、一部に分枝が見える。		
	2			2	
		黒色素胞の枝の先が縮まり、細胞の周りの隙間が広くなる。	白色素胞に放射状の突起が見える。		
3			3		
		黒色素胞の枝が縮んでいるが、細胞の周囲には突起が見える。	白色素胞がほぼ、円形に見える。		
4					
		黒色素胞がほぼ、円形に見える。			

日本生物学オリンピック 2011 本選（広島大会）

実験試験（動物）試験解説

実験 1. フナの解剖と分子系統

本実験ではフナを解剖し、どのような食性を持っているかを考察しました。また、金魚がどのようなフナから作り出されたのかという点について、分子（DNA）情報を使った系統解析の結果を読み取り、金魚の起源について考察しました。

問 1 と問 2 では、問題冊子に示された手順で解剖し、数値を測定しました。問 3 では、それらの測定数値を、3 種の魚類の鰓耙数と腸長比と比較し、これら 3 種類の魚および自分が解剖したフナがそれぞれどのような食性を持っているか考察しました。

フナ属（*Carassius*）は、体高比（体長／体高）、背鰭分岐軟条数、鰓耙数の組合わせで同定できるとされています。鰓耙は口に吸い込んだ微小な餌（プランクトンなど）を鰓穴に通さずに濾しとり（フィルターの役割）、消化管に送る働きをもっています。このため、一般的に、小さいものを主食にしている魚ほど鰓耙数が多いです。フナ類では、植物プランクトンを主食とするゲンゴロウブナの鰓耙は極端に多く（92～128 本）、肉食性の強いキンブナでは鰓耙数は少ないです（26～42 本）。腸腸比については、一般的に、消化しにくい植物性の食べ物を食べている動物は腸が長く、消化が容易な動物性の食物を食べていると腸は短いです。基本的には雑食のフナでも同じ傾向があるとされています。

本実験の問題文の鰓耙数と腸長比のデータは、予備実験においてフナおよび金魚を実際に解剖して求めた数値に基づいており、図鑑に載っている文献上の数字とは異なります。本実験では、アルコール固定したフナ（全長約 15～20cm）を用意しましたが、「若いゲンゴロウブナ、成熟したゲンゴロウブナ、ギンブナ、合いべら」の可能性があり、どのフナに当たったかによって、問 3 の答えは異なります。

問 4 では枝分かれの順序、枝の長さ、外群、単系統群、側系統群、といった要素に関して与えられた条件にもとづいてフナ類および金魚、コイがあてはまる位置を割り出します。正解は、I. コイ、II. ゲンゴロウブナ、III. キンブナ、IV. ギンブナ、V. ギベリオブナ、VI. 金魚です。V のギベリオブナの一部から金魚が出現しているので（この図では、ギベリオブナは金魚に対して側系統になる）、金魚はギベリオブナから作出された可能性が高いと言えます。

実験 2. 魚類の色素胞

本実験では、メダカの鱗を材料として、この実験では、色素胞に対する各種薬物の作用を確かめる実験を行いました。神経系と内分泌系による黒色素胞と白色素胞の色素顆粒運動調節の仕組みを示した図 7 を完成させることを目的とします。

この実験で用いる鱗は、メダカから摘出した後、生理食塩水に浸して 18℃で 15 時間程度、静置させたものです。これにより鱗に残った色素胞神経の終末は働かなくなっているため、色素胞に対する各試薬の作用は、色素胞に対する直接作用と考えることができます。

問 5 で、交感神経の神経伝達物質であるノルアドレナリンの作用を調べてみると、黒色素胞では速やかな色素顆粒の凝集反応が起こり、やや遅れて白色素胞の色素顆粒拡散反応が起こります。これに対して、副交感神経の神経伝達物質であるアセチルコリンではこのような反応は見られないことから、神経伝達物質 A と B はどちらもノルアドレナリンであると考えられます。

問 6 では、黒色素胞と白色素胞がもつ神経伝達物質の受容体のタイプをそれぞれ判定します。フェントラミン（アドレナリン性 α 受容体阻害剤）、プロプラノロール（アドレナリン性 β 受容体阻害剤）、アトロピン（ムスカリン性受容体阻害剤）、ツボクラリン（コリン性受容体阻害剤）の 4 種の受容体阻害剤を用意しましたが、問 1 の結果から、アドレナリン性受容体阻害剤の効果を調べれば十分です。実験では、まず、鱗をフェントラミン液に 5 分間浸して試薬を組織中に十分に浸透させます。その後、鱗をフェントラミンとノルアドレナリンの混合液に移すと、白色素胞の顆粒拡散反応は起こりますが、黒色素胞の顆粒凝集反応は見られなくなります。一方、プロプラノロールで同様に鱗を処理すると、ノルアドレナリンによる黒色素胞の反応は起こりますが、白色素胞の顆粒拡散反応は見られなくなります。これらのことから、黒色素胞の受容体 1 はアドレナリン性 α 受容体であり、白色素胞の受容体 2 はアドレナリン性 β 受容体であると考えられます。

問 7 では、脳下垂体由来のペプチドホルモン、MSH と MCH の作用を調べます。この実験では、入手が容易なヒト α -MSH とヒト MCH を用いていますが、メダカ色素胞に対する作用は確認しています。MSH は白色素胞の顆粒拡散反応を引き起こしますが、黒色素胞には効果が見られません。一方、MCH は黒色素胞の顆粒凝集反応を引き起こし、白色素胞には効果がありません。これらのことから、ホルモン A は MSH、ホルモン B は MCH であることがわかります。

問 8 では、受容体 A の性質を調べます。問 7 より、ホルモン B は MCH であることがわかっています。そこで、MCH による黒色素胞の顆粒凝集反応が問 6 で用いた 4 種の阻害剤で阻害されるかどうかを調べますが、いずれの阻害剤も効果がないので、

受容体Aは調べた4種の受容体には該当しないことになります。ちなみに、

問9では、以上の実験結果をまとめる形で色素胞神経による黒色素胞と白色素胞の色素顆粒運動の調節機構を推論します。問1より、アセチルコリンが作用しないので交感神経と副交感神経による拮抗的な調節があるとは考えられません。一方、問2より、黒色素胞はアドレナリン性 α 受容体をもち、白色素胞はアドレナリン性 β 受容体をもつと考えられます。2つの色素胞がそれぞれ異なる受容体をもつため、1つの神経伝達物質により黒色素胞には顆粒凝集反応を引き起こし、白色素胞には顆粒拡散反応を引き起こすことができると考えられます。

名札番号		名前	
------	--	----	--

実験試験（生化学）問題冊子

（平成 23 年 8 月 19 日 9 時 30 分～12 時 30 分，14 時～17 時）

1. 机には，問題冊子（16 ページ）および解答用紙（6 枚）が配布されています。
2. 説明が始まるまでは，問題冊子を開いてはいけません。
3. 解答開始の合図の後，すべての解答用紙に名札番号と名前を記入しなさい。また，このページにも名札番号と名前を記入しなさい。
4. 試験の途中で気分が悪くなったり，用便のために外に出たりする場合には，挙手をしてください。
5. 試験の解答開始と終了時刻は，試験室内のディスプレイに映し出されます。
6. その他の指示も試験室内のディスプレイに映し出されますので，時々ディスプレイを見てください。
7. 実験試験は実験 1 と実験 2 です。実験 1 では PCR の反応時間として約 45 分，実験 2 では制限酵素処理時間として 15 分の待ち時間が必要です。これら以外に電気泳動時間として約 15 分の時間が必要です。これらの待ち時間を考慮しつつ解答すること。
8. PCR は，反応液の準備ができたなら挙手をして TA に知らせること。各自の実験進行度合いにあわせて PCR 反応開始時刻を試験開始から 30 分後と 45 分後，そして 60 分後に設けています。60 分後の 3 回目の PCR 反応に間に合わなければ，PCR 反応はできません。遅くとも 3 回目の PCR 反応開始時間に間に合うように反応液を準備すること。
9. PCR の反応開始時間がこのように設定されているので，問題は 1 問目から順にとりかかること。待ち時間の間に，次の問題の解答を始めてもよい。
10. 各自の手元にある試薬の量は 1 回の実験を行うのに十分な量であるが，再実験ができる量ではありません。問題文を熟読して間違いの無いよう実験を進めること。
11. 解答終了後，問題冊子は持ち帰ってください。

＜マイクロピペットの使い方＞

マイクロピペットは1 ml 以下の微量の液体を測りとる時に用います。今回使用するマイクロピペット（P-20）では、1 μ l から 20 μ l の容量を測りとることができます。ピストン（プッシュロッド）を上下することにより空気を出し入れすることができる構造で、目盛り調節ダイヤルを回して容量を調節します。

- ① 目盛り調節ダイヤル（図 a）を回して望みの量に合わせる。

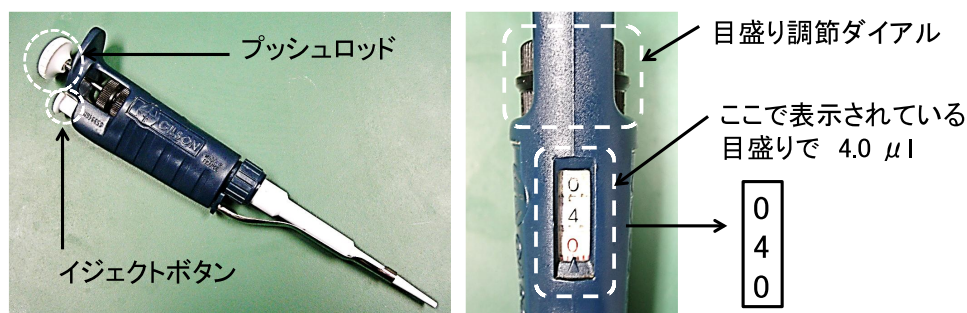


図 a. マイクロピペットの全体像（左）と目盛り表示部分（右）

- ② 片手で握りこむように持ち、親指でプッシュロッドを調節する。
③ チップラックに入ったチップにマイクロピペットの先端を差し込み、軽くトントンと叩くようにして装着する（図 b）。

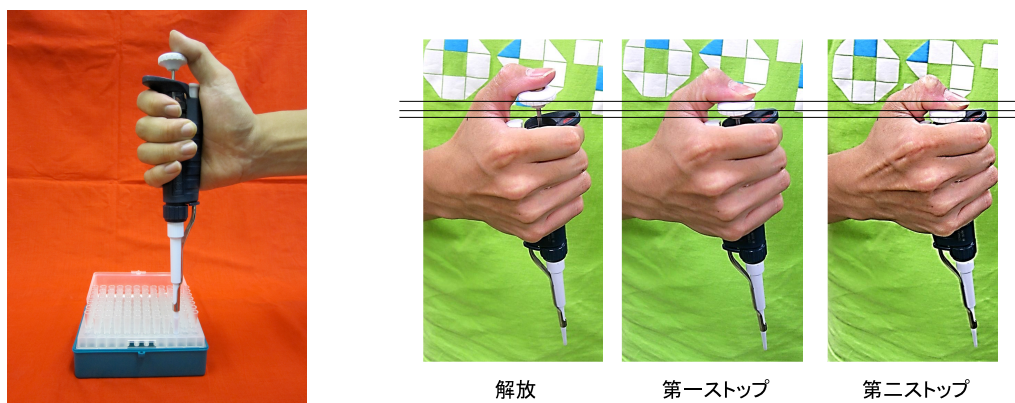


図 b. チップラックとチップの装着方法 図 c. マイクロピペットの持ち方と操作の方法

- ④ プッシュロッドを第一ストップ(図 c)にまで押し込み、その状態でチップの先を液につけ、ゆっくりとプッシュロッドを戻すことで液を吸い上げる。
⑤ 液を排出するチューブにチップの先を押し当て、プッシュロッドをゆっくりと第一ストップに押し下げることで液を排出し、続いて第二ストップまで強く押し下げることで完全に液を排出する。
⑥ プッシュロッドをゆっくりと解放し、元の位置に戻す。
⑦ イジェクトボタンを親指で押し、チップを取り外す。（チップは廃チップ入れに捨てる）

- ⑧ チップは必ず装着すること。また、試薬ごとに取り換えること。

<アガロースゲル電気泳動装置使用上の注意>

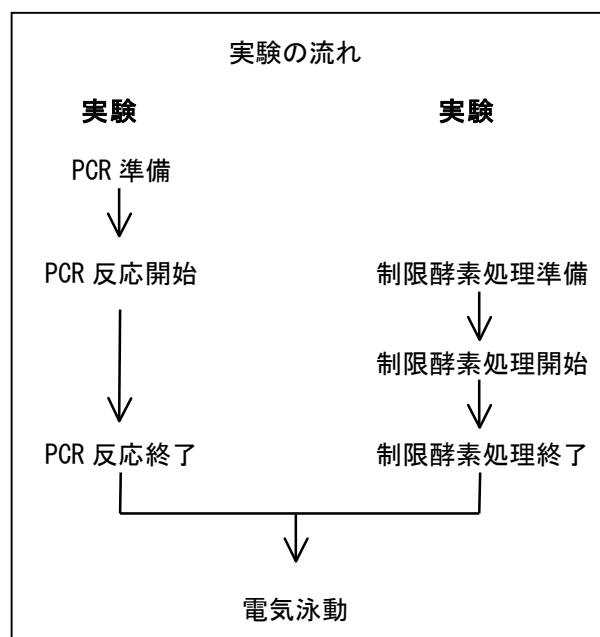


図 d. アガロースゲル電気泳動装置

- ① 電気泳動装置の使用方法は、説明文中の記述に従うこと。
- ② 発がん性物質がゲル内には含まれているので、むやみにウェル（穴）の部分に触らないこと。
- ③ 電気泳動中に濡れた手で触ると感電することもあるので、泳動中にはむやみに触らないこと。
- ④ 右側のボタンは、今回使用しない。
- ⑤ 機器によってはブザー音が聞き取りにくいものもある。電気泳動の状況は、ランプの点灯状態でも確認すること。

<実験の流れ>

実験試験（生化学）では、実験 1 と実験 2 を並行して行います。最初に実験 1 を行います。実験 1 の PCR 反応の待ち時間中に実験 2 を開始します。実験 1 と実験 2 で得られたサンプルのそれぞれを 1 枚のゲルで電気泳動し、その結果の解析を行います。



【実験に必要なもの】

この実験では、下に示した器具，装置，試薬を用います。足りないものがあったら挙手をしてください。

- | | |
|---|--------|
| 1. マイクロピペット (P-20) | 1 本 |
| 2. チップ | 1 箱 |
| 3. ストップウォッチ | 1 個 |
| 4. マジックペン | 1 本 |
| 5. 廃チップ入れ (紙コップ) | 1 個 |
| 6. 紙製チューブ立て | 1 枚 |
| 7. アガロースゲル電気泳動装置 | 1 式 |
| (アガロースゲルはアガロースゲル電気泳動装置にセットした状態で
各自の机の上に設置しています。) | |
| 8. 電卓 | 1 台 |
| 9. 空チューブ (大) | 7 本 |
| 10. 空チューブ (小) | 1 本 |
| 11. プライマー (チューブに P1~P6 と表記) | 合計 6 本 |
| 12. 鋳型 DNA (チューブに 12 と表記) | 1 本 |
| 13. プレミックス (チューブに 13 と表記) | 1 本 |
| 14. プラスミド溶液 (チューブに 14 と表記) | 1 本 |
| 15. 制限酵素 (チューブに 15 と表記) | 1 本 |
| 16. 反応緩衝液 (チューブに 16 と表記) | 1 本 |
| 17. 純水 (チューブに 17 と表記) | 1 本 |
| 18. 希釈用溶液 (チューブに 18 表記) | 1 本 |
| 19. 染色溶液 (チューブに 19 と表記) | 1 本 |
| 20. DNA サイズマーカー (チューブに 20 と表記) | 1 本 |
| (13~20 は全て氷上に保持している。使用するまでそのままにしておく
こと。) | |

実験 1. ポリメラーゼ連鎖反応による DNA の増幅

【はじめに】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は生物学的研究やバイオテクノロジーの分野に大きな影響を与えました。PCR を開発した Kary Mullis は 1993 年にノーベル化学賞を受賞しました。現在では、氷漬けのマンモスから抽出した DNA 断片の増幅や、犯罪現場に残された微量の血液や組織からの DNA 断片の増幅、そして新型インフルエンザへの罹患の確認等にも用いられています。今回の実験では、PCR による DNA の増幅に挑戦し、それが増幅されたことをアガロースゲル電気泳動によって確認します。なお、アガロースゲル電気泳動は、実験 2「大腸菌 1 細胞が保持しているプラスミド個数の算出」の電気泳動と同時に行います。

PCR によって、多くの DNA 分子の中から目的とする特定の領域を増幅することができます。PCR は、とくに材料となる DNA が非常に少ない場合や純粋でない場合に有効な方法であり、また特異的に遺伝子を迅速に増幅する方法です。

典型的な PCR では、異なる 3 つの温度条件下での反応ステップを 1 サイクルとして、これを繰り返すことで遺伝子増幅反応が進みます。図 1 にはその概略を示しました。それぞれの反応ステップを解説すると次のようになります。まず、(1) 94℃に加熱することで、二本鎖を形成している DNA 鎖の各々を分離する（変性）。次に (2) 60℃程度に冷却し、標的配列の両端の領域にそれぞれ相補的な配列を持つ短い一本鎖 DNA（プライマー）を結合させます（アニーリング）。そして最後に (3) 72℃に加熱することで、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応を引き起こします（伸長）。この一連の反応によりプライマーDNA を起点に 5'→3'方向に DNA 鎖が伸長され、標的配列全体の二本鎖が完成します。理想的に反応が進行した場合には、目的とする DNA 配列を 1 回のサイクルで 2 倍ずつ増幅できるので、 n 回の PCR サイクルを繰り返すことで目的 DNA 断片を 2 の n 乗倍に増幅することができます。

前述したように、PCR の極めて優れた特徴はその特異性にあります。これはプライマー配列に由来します。2 種類のプライマーのそれぞれに対合する配列が目的領域の両端にだけに存在するので、適切なアニーリング温度においては（上記では 60℃程度）これらのプライマーはその目的配列に特異的に結合できます。

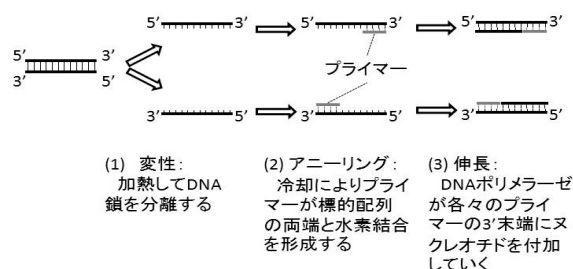


図 1. PCR の概略図

次の問題文を読み、それぞれの問いに答えよ。また、問題文に従って PCR を実施せよ。

PCR を実施するにあたり、まずはプライマーを検討します。今回増幅する遺伝子は、シロイヌナズナのホスホリブロキナーゼ遺伝子です。この遺伝子のコードするタンパク質は、光合成による二酸化炭素の固定回路であるカルビン・ベンソン回路の一部の反応を触媒します。

【問 1】ホスホリブロキナーゼタンパク質のアミノ酸配列（396 アミノ酸）は図 2 に示した通りです。それぞれのアミノ酸は 1 文字表記で示しています。* は終止シグナルを示しています。この中でも、下線(a) および (b) に相当するプライマー（それぞれプライマーA およびプライマーB）としてふさわしいものを次の表 1 にあげる候補プライマー（P1～P6）の中から選べ。なおプライマーを検討する情報として、コドンとアミノ酸の対応を図 3 に示しています。解答欄中の候補プライマーの欄に、PCR に用いたプライマー番号を記入せよ。

MAVSTIYSTQALNSTHFLTSSSSSKQVFLYRRQPQTNRNFNTLITCAQETIVIGLAADS
 (a)
 GCGKSTFMRRLTSVFGGAAKPPKGGNPDSENTLISDTTTVICLDDYHSLDRYGRKEQKVT
 ALDPRANDFDLMEYQVKALKNGIAVEKPIYNHVTGLLDPELIQPPKILVIEGLHPMFD
 ERVRDLLDFSIYLDISNEVKFAWKIQRDMAERGHSLSEIKASIEARKPDFDAFIDPQKQ
 YADAVIEVLPTTLIPDDNEGKVLRLIMKEGVKYFSPVYLFDEGSTISWIPCGRKLTCTC
 SYPGIKFNYEPDSYFDHEVSVLEMDGQFDRLDELIYVESHLNLSTKFYGEVTQQMLKH
 ADFPGSNNGTGLFQTIIVGLKIRDLYEQLIANKATARA**EAKA*** (396アミノ酸)
 (b)

図 2. ホスホリブロキナーゼタンパク質のアミノ酸配列

		mRNAの2番目の塩基			
		U	C	A	G
mRNAの1番目の塩基	U	Phe (F) UUU	Ser (S) UCU	Tyr (Y) UAU	Cys (C) UGU
		UUC	UCC	UAC	UGC
		Leu (L) UUA	UCA	STOP (*) UAA	STOP (*) UGA
		UUG	UCG	UAG	Trp (W) UGG
	C	Leu (L) CUU	Pro (P) CCU	His (H) CAU	Arg (R) CGU
		CUC	CCC	CAC	CGC
		CUA	CCA	Gln (Q) CAA	CGA
		CUG	CCG	CAG	CGG
	A	Ile (I) AUU	Thr (T) ACU	Asn (N) AAU	Ser (S) AGU
		AUC	ACC	AAC	AGC
		AUA	ACA	Lys (K) AAA	Arg (R) AGA
		Met (M) AUG	ACG	AAG	AGG
	G	Val (V) GUU	Ala (A) GCU	Asp (D) GAU	Gly (G) GGU
		GUC	GCC	GAC	GGC
		GUA	GCA	Glu (E) GAA	GGA
		GUG	GCG	GAG	GGG

図 3. コドンとアミノ酸の対応

表 1. プライマー候補

プライマー候補	配列 (5'から 3'の方向に記載)
P1	ATGGCTGTCTCAACTATCTAC
P2	GTAGATAGTTGAGACAGCCAT
P3	CATCTATCAACTCTGTCGGTA
P4	CGTGCAGAAGCTAAAGCCTAA
P5	TTAGGCTTTAGCTTCTGCACG
P6	AATCCGAAATCGAAGACGTGC

【問 2】与えられた保存溶液を適宜希釈することで PCR 反応溶液を調製します。なお、表 2 中に示されている [2×] や [10×] はそれぞれ 2 倍あるいは 10 倍に濃縮されている溶液であることを意味しています。実験に必要なそれぞれの溶液量を表 2 の空欄 (①～④) を埋め、解答欄に記入せよ。

表 2. PCR 反応液の調製

	必要量 (μl)	使用濃度
純水 (17)	①	—
[2×] プレミックス (13)	②	[1×]
[10×] プライマーA	③	[1×]
[10×] プライマーB	④	[1×]
鋳型 DNA 溶液 (12)	1	—
総量	30	—

() 内の数字は各自の手元のチューブ番号

表 2 の上から順に、空チューブ (小) の中に各溶液を測りとりまします。最後にゆっくりとプッシュロッドを上下させ、液の吸い上げと吐き出しを繰り返すことにより、確実に反応溶液を混ぜ合わせます。混ぜ終わったら、チューブのフタをしっかりと閉じます。配布されているマジックペンを用いてチューブの側面に番号を記入し、氷上で保存すること。番号は、次の例に示す通り各自の名札番号とチューブ番号を記入すること。

(例) 91-1 (名札番号 91 のチューブ 1 番)

PCR 反応溶液の準備ができたなら、もう一度チューブのフタが確実に閉じていることを確認すること。挙手をして TA を呼び、チューブを手渡すこと。TA がそれぞれの PCR チューブを回収し、PCR 自動化装置にセットします。温度サイクルが終了した後、それぞれのチューブは各自に返却されます。自分のチューブであることを番号と照合して確認すること。温度サイクルが終了するまでには約 45 分かかります。

チューブの返却時には、各自が調製した反応液を含むチューブのほかに、あらかじめ

め適正な組み合わせのプライマーを用いて PCR を行ったサンプルを含むチューブ(フタに PC と記載されている) も配布します。これら 2 つの PCR 反応溶液は、実験 2 で調製する制限酵素処理溶液のサンプルとともに、実験 2 において 1 枚のアガロースゲルに同時に電気泳動します。

【問 3】増幅した DNA がホスホリブロキナーゼ遺伝子であることを確認するためには、どういう実験を引き続き行うとよいか。思いつく実験とその理由をそれぞれ記入せよ。

【問 4】今回の実験では、ホスホリブロキナーゼタンパク質のアミノ酸配列に相当する遺伝子配列を増幅するために、鋳型 DNA として mRNA を逆転写した cDNA を用いた。ゲノム DNA を鋳型とした場合にどのようなことが起こると予想されるか。理由とともに記入せよ。

【問 5】PCR 後に行ったアガロース電気泳動の写真を両面テープを用いて解答欄に貼りつけよ。図 4 に示した DNA サイズマーカーを参考にしながら、期待したホスホリブロキナーゼ遺伝子の DNA 断片が増幅できたかどうかを理由とともに記入せよ。異なる DNA 断片が増幅されてしまったと考える場合には、ホスホリブロキナーゼ遺伝子ではないと考える理由を記入せよ。



図 4. 二本鎖直鎖状 DNA のサイズマーカー。上から順に、5.00, 3.00, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.10。 単位はキロベースペア (kbp)。

実験 2. 大腸菌 1 細胞が保持しているプラスミド個数の算出

【はじめに】

プラスミドは、宿主染色体とは物理的に独立して自立複製し、安定に遺伝することのできる染色体外遺伝因子です。プラスミドは二本鎖閉環状 DNA であり、2～3 kbp から数百 kbp に及ぶものまであります。組換え DNA 実験においては、外来の DNA 断片をプラスミドに組込ませてクローン化するための道具として広く用いられています。また、制限酵素は、二本鎖 DNA の 3～8 塩基配列の特定配列を認識し二本鎖 DNA を切断する酵素の総称です。このうち II 型制限酵素は認識配列の出現する位置で DNA 鎖を正確に切断するため、組換え DNA 実験において重要な酵素となっています。制限酵素を発見した Werner Arber と Hamilton Othanel Smith は 1978 年ノーベル生理学・医学賞を受賞しています。

本実験では、プラスミドの制限酵素処理を行い、その後電気泳動を行うことによってプラスミドの長さを決定します。その結果と与えられた値を用いて、大腸菌 1 細胞が保持しているプラスミド個数の算出を行います。

作業 1：プラスミド DNA の制限酵素処理

表 3 および以下の手順に従って、制限酵素処理するサンプル (C) と制限酵素処理を行わないサンプル (D) を準備します。

まず、各自に渡している空チューブ (大) 2 本のフタ上面に、配布されているマジックペンを用いて番号と記号を記入し、それぞれのサンプルが区別できるようにすること。次の例に示す通り各自の名札番号と記号を記入すること。

(例) 91-C (名札番号 91 のチューブ記号 C)

表 3. 制限酵素反応溶液の調製

チューブ記号	##-C	##-D
プラスミド溶液 (14)	2 μ l	2 μ l
反応緩衝液 (16)	2 μ l	2 μ l
制限酵素 (15)	1 μ l	0 μ l
純水 (17)	15 μ l	16 μ l
合計	20 μ l	20 μ l

##は各自の名札番号、() 内の数字は各自の手元のチューブ番号

次に、氷に挿している 14～20 のチューブの液を遠心操作によってチューブの底に集めます。この操作は TA が行うので、挙手をして TA を呼び、チューブを渡すこと。所定の操作を終え TA からチューブが返却されたら、表 3 に準じて試薬類を適切な量

とり、各自の名札番号と記号を記入した空チューブ（大）（##-C と ##-D）に分注せよ。入れ終わったら チューブのフタを閉じ、チューブを指で軽くはじいてチューブ内の液を混和します。この操作を終えたら、再び挙手をして TA を呼び、各チューブを手渡すこと。TA が先と同様に遠心操作によって液をチューブの底に集め、その後 37℃ のインキュベーター（恒温槽）に入れます。これにより酵素反応が開始されます。

チューブを手渡した後、各自でストップウォッチを用いて時間をはかり、15 分が経過したら挙手をして TA に酵素反応時間が終了したことを伝えること。TA は遠心操作を行い、その後チューブを返却します。返却されたチューブのフタの番号と各自の名札番号が同じであることを確認して、次の作業に進みます。

作業 2：電気泳動

配布されているマジックペンを用いて新しい空チューブ（大）のフタ上面に番号と記号を記入すること。番号は、次の例に示すように記入すること。

（例）91-E（名札番号 91 のチューブ記号 E）

表 4. 電気泳動用溶液の調製

チューブ番号	##-E	##-F
処理後のプラスミド	(##-C) 4 μ l	(##-D) 4 μ l
希釈用溶液 (18)	14 μ l	14 μ l
染色溶液 (19)	2 μ l	2 μ l
合計	20 μ l	20 μ l

##は各自の名札番号、（ ）内の数字は各自の手元のチューブ番号

受け取ったチューブから 4 μ l ずつをフタ上面に番号を記載した空チューブ（大）（##-E と ##-F）に分注します。その後、希釈用溶液と染色溶液を加えます。表 4 に従ってすべての試薬類をチューブに入れ終わったら、先ほどと同様に液を混和すること。挙手をして TA を呼び、チューブを渡すこと。所定の操作を終え TA からチューブが返却されたら、サンプル 20 μ l を電気泳動します。

電気泳動の作業を以下に示します。不具合が生じたと感じた場合は挙手をする。以下の操作では、特に「点滅」と「点灯」の違いに注意すること。

- 1) ゲル板の右下に小さく各自の名札番号をマジックペンで記入します。
- 2) コンセントにプラグを差し込み、本体の右上の穴に電源コードを差し込みます（赤いランプが点灯する）。
- 3) 左上のボタンを緑のランプが点滅するまで長く押し、プレ電気泳動を行います（プレ電気泳動中は緑のランプは点滅し続ける）。2 分後に自動停止します。終了後は赤色のランプが点滅してブザーが鳴るので、左上のボタンを押してブザーを止めます（赤いランプが点灯する）。

ブザーが鳴ったら、ただちに左上のボタンを押してブザーを止めること。
プレ電気泳動が終了した時点で挙手をして TA を呼ぶこと。TA がコーム（くし）を取り除きます。なお、アガロースゲル中には発がん性の臭化エチジウムが含まれているため、コームを取り除いた後に露出するウェル（穴）を素手で触れないこと。

- 4) 表 5 に示す順に、各ウェルにサンプル溶液あるいは純水を 20 μl ずつ注入します。DNA サイズマーカーは、ウェル番号 M と 4 にそれぞれ 20 μl ずつ注入します。PCR1 と PC は希釈溶液や染色溶液を加えずに、そのまま 20 μl ずつ注入します。
- 5) 左上のボタンを青色のランプが点灯するように 1 回軽く押し（押し続けず）、電気泳動を行います（電気泳動中は青色のランプは点灯し続けます）。青色のランプが点滅した場合には、3) のプレ電気泳動が行われています。そのまま 2 分待つと、自動停止する（赤いランプが点灯する）ので、もう一度 5) の最初から操作を行い、青色のランプが点灯することを確認すること。その後、ストップウォッチを用いて時間を計り、5 分後にゲルを観察します。電気泳動が正常に行われていれば、青色の色素が下方へ移動しています。約 15 分後に自動停止します。終了時には赤色のランプが点滅しブザーが鳴るので、左上のボタンを押してブザーを止めます（赤いランプが点灯する）。各自に渡した泳動装置によってはブザー音が聞こえない場合があります。赤いランプが点灯していれば泳動が終了していることを意味するので、ランプの状態も確認すること。
- 6) 電気泳動が終了したら、挙手して TA を呼び、ゲルの写真撮影を依頼すること。着席したまま待ち、TA から泳動写真 2 枚とゲル板を受け取り、写真の番号と各自の名札番号が同じであることを確認し、次の作業へ進みます。

表 5. 電気泳動ゲルへのサンプル注入レーン

ウェル番号	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
サンプル名	DNA サイズマーカー (20)	##-1	PC	純水 (17)	DNA サイズマーカー (20)	##-E	##-F	純水 (17)	純水 (17)	純水 (17)	純水 (17)

##は各自の名札番号、（ ）内の数字は各自に渡したチューブ番号

受け取った2枚の写真は、実験1および実験2の解答欄それぞれの指定の場所に両面テープ（はくり紙をはぐ）で貼付けること。

DNA サイズマーカーの電気泳動パターンは8 ページ図4 を参照すること。

【問6】アガロース電気泳動の写真を両面テープを用いて解答欄に貼りつけよ。今回用いた制限酵素はプラスミドDNAの1か所のみを切断します。このプラスミドDNAの長さを求める場合、制限酵素処理の有り・無しのどちらの結果を用いれば良いのか、理由とともに解答欄に記入せよ。また、今回用いたプラスミドDNAの長さを解答欄に記入せよ。

【問7】下記の記号と値、図5または図6の分子量の値を用いて、今回用いたプラスミドの分子量を求めるための式を導き、解答欄に記入せよ。ヌクレオチドの修飾は無いと仮定します。なお、解答には途中の計算過程も示すこと。

記号	説明
A	プラスミドの長さ (kbp)
X	プラスミドの GC 含有率 (%)

値	説明
1	H(水素)の原子量
12	C(炭素)の原子量
14	N(窒素)の原子量
16	O(酸素)の原子量
31	P(リン)の原子量

【問 8】以下の(1), (2)に答えよ。

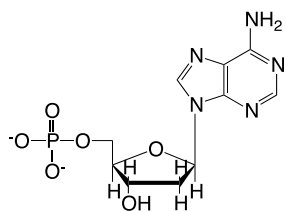
(1) 下記の記号を用いて、大腸菌 1 細胞が保持しているプラスミド個数を求めるための式を導き、解答欄に記入せよ。必要であれば【問 7】で求めたプラスミドの分子量を用いてもよい。プラスミドの抽出効率 は 100% とします (大腸菌に含まれるプラスミドはすべて調製されたと仮定する)。なお、解答用紙には途中の計算過程も示すこと。

記号	説明
A	プラスミドの長さ (kbp)
B	プラスミドを抽出した大腸菌培養液量 (ml)
C	1/10 に希釈した上記大腸菌培養液の濁度 (OD_{600})
D	大腸菌培養液濁度 $OD_{600} = 1$ のときの大腸菌密度 (細胞数/ml)
E	上記大腸菌から調製したプラスミド溶液量 (μ l)
F	1/10 に希釈した上記プラスミド溶液の吸光度 (A_{260})
G	吸光度 $A_{260} = 1$ のときの二本鎖 DNA 溶液の濃度 (μ g/ml)
H	吸光度 $A_{260} = 1$ のときの一本鎖 DNA 溶液の濃度 (μ g/ml)
I	吸光度 $A_{260} = 1$ のときの一本鎖 RNA 溶液の濃度 (μ g/ml)
K	アボガドロ定数
X	今回用いたプラスミドの GC 含有率 (%)

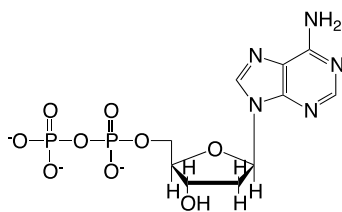
なお、 OD_{600} 、 A_{260} とは、分光光度計を用いて 600 nm あるいは 260 nm の光波長でサンプル溶液の濁度 (Optical Density) および吸光度 (Absorbance) を測定したときの値を示している。

(2) 【問 8】(1)で求めた式に下記の値を導入し，大腸菌 1 細胞が保持しているプラスミド個数を解答欄に記入せよ。なお，解答用紙には途中の計算過程も示すこと。

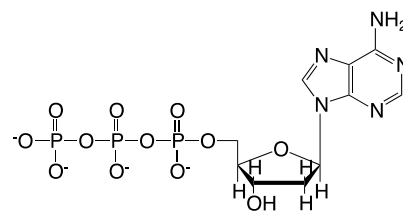
記号	値
A	【問 6】で各自がみつもった値(kbp)
B	3.0 (ml)
C	0.39
D	8.0×10^8 (細胞数/ml)
E	50 (μ l)
F	0.34
G	50 (μ g/ml)
H	33 (μ g/ml)
I	40 (μ g/ml)
K	6.02×10^{23}
X	50 (%)



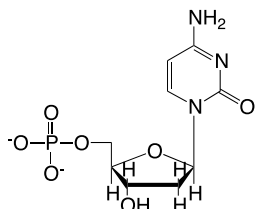
(dAMP, 分子量 : 329)



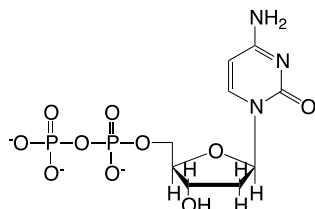
(dADP, 分子量 : 408)



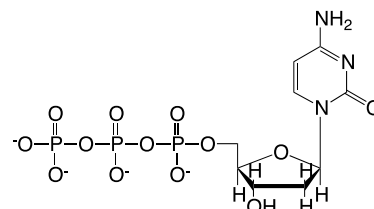
(dATP, 分子量 : 487)



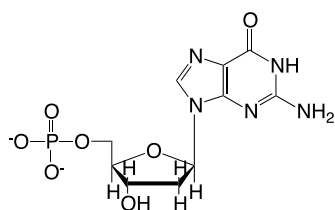
(dCMP, 分子量 : 305)



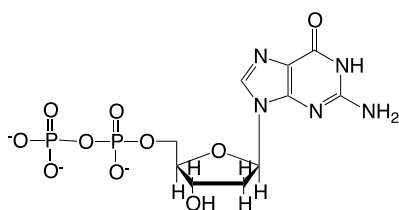
(dCDP, 分子量 : 384)



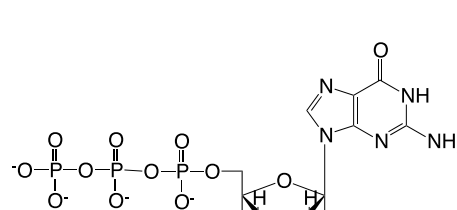
(dCTP, 分子量 : 463)



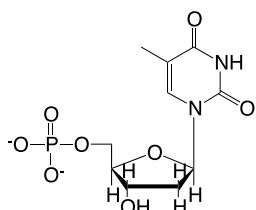
(dGMP, 分子量 : 345)



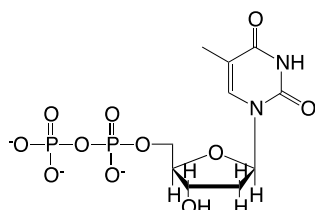
(dGDP, 分子量 : 424)



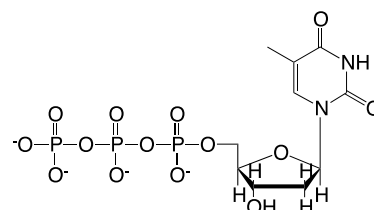
(dGTP, 分子量 : 503)



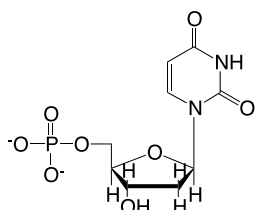
(dTMP, 分子量 : 320)



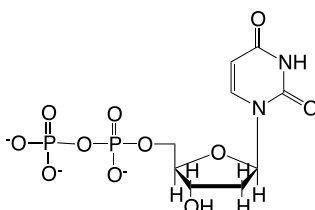
(dTDP, 分子量 : 399)



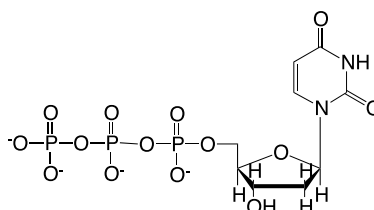
(dTTP, 分子量 : 478)



(dUMP, 分子量 : 306)

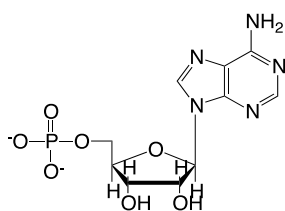


(dUDP, 分子量 : 385)

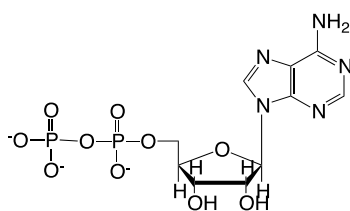


(dUTP, 分子量 : 464)

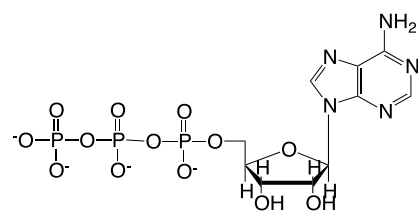
図 5. 構造式と分子量



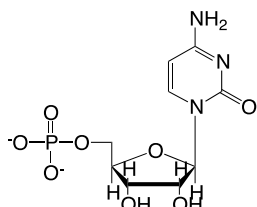
(AMP, 分子量 : 345)



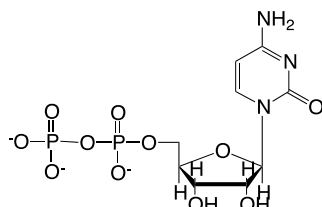
(ADP, 分子量 : 424)



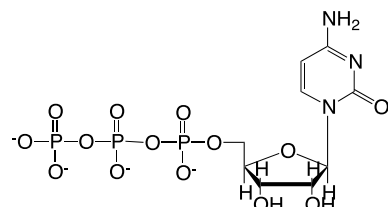
(ATP, 分子量 : 503)



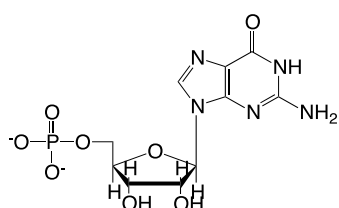
(CMP, 分子量 : 321)



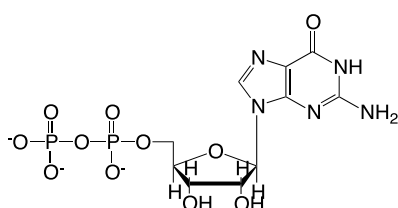
(CDP, 分子量 : 400)



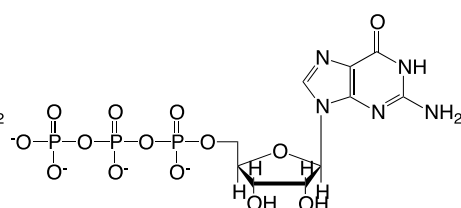
(CTP, 分子量 : 479)



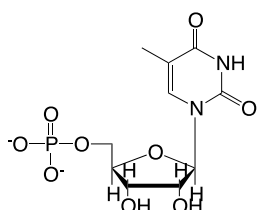
(GMP, 分子量 : 361)



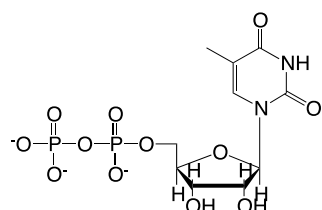
(GDP, 分子量 : 440)



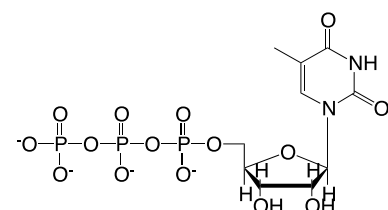
(GTP, 分子量 : 519)



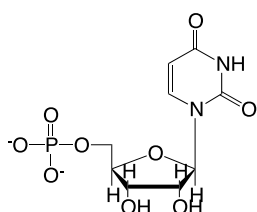
(TMP, 分子量 : 336)



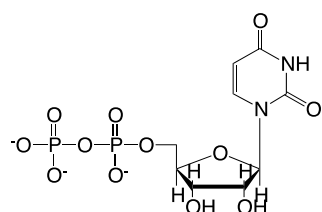
(TDP, 分子量 : 415)



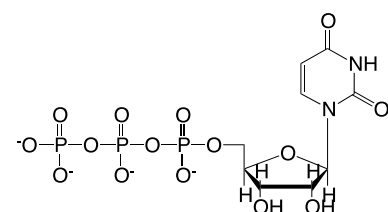
(TTP, 分子量 : 494)



(UMP, 分子量 : 322)



(UDP, 分子量 : 401)



(UTP, 分子量 : 480)

図 6. 構造式と分子量

問題訂正箇所

11 ページ 6 行目 : サンプル溶液と純水 → サンプル溶液あるいは純水

11 ページ 7 行目 : M と 3 → M と 4

11 ページ 表 5 : PCR-1 → ~~##~~-1

12 ページ : 2 (炭素の原子量) → 12

PC と同程度に増幅が認められる結果がここでは期待されます。

問 6 二本鎖 DNA の電気泳動では、直鎖状 DNA の長さと泳動度が相関関係を示します。プラスミド DNA のような環状 DNA では DNA の長さと泳動度は相関関係を示しません。よって制限酵素処理有りで直鎖状 DNA になったサンプルの結果を用いてプラスミド DNA の長さを求めます。

問 7 図 5 と図 6 の違いは糖が「デオキシリボース」か「リボース」かです。プラスミド DNA ですから、「デオキシリボース」である図 5 の値を用います。また、DNA ポリメラーゼによってヌクレオチド 3 リン酸を用いて DNA は複製されますが、この際ヌクレオチド 3 リン酸から 2 リン酸が取り除かれます。同時に 3' 末端の OH 基も取り除かれます。これらの値と A kbp のプラスミド DNA (GC 含有率 : X%) に含まれる各ヌクレオチド数を算出できれば、答えが得られます。

問 8 $(\text{プラスミド個数}) / (\text{大腸菌 1 細胞})$
 $= (\text{プラスミド全部の個数}) / (\text{大腸菌全部の細胞数})$
となりますので、プラスミド全部の個数と大腸菌全部の細胞数を計算すれば答えがでます。
モルとアボガドロ定数、ランベルト・ベールの法則を理解していれば解ける問題です。