

日本生物学オリンピック 2017 本選 広島

実験試験 I 発生生物学 問題冊子
(80 分)

1. 机には、問題冊子（6 ページ）および解答用紙（6 枚）が配布されている。
2. 説明が始まるまでは、問題冊子を開かず、このページをよく読んでおくこと。また、実験机の上の機器にも触れないこと。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と氏名を記入しなさい。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は、挙手をすること。
5. 試験の途中で、気分が悪くなったり、トイレ等のためにやむを得ず途中退室を希望したりする場合は、挙手をすること。
6. 実験中は、必ず白衣を着用すること。また、実験用手袋は必要に応じて着用し、試料等が眼、口、皮膚などに直接触れないよう注意すること。
7. 問題冊子にメモを取ってもかまわない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
8. 実験机の上の実験道具は自由に使ってかまわない。実験中は位置も自由に動かしてかまわない。実験終了後は元の位置に戻しておくこと。
9. 問題は問 1 から問 6 までである。全体に目を通してから解答を始めること。
10. 実験机の上には、すでに準備されているものの他、配布されたペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないこと。

サンプルと器具

- サンプルが入ったマイクロチューブ A 1本
- サンプルが入ったマイクロチューブ B 1本
- サンプルが入ったマイクロチューブ C 1本
- サンプルが入ったマイクロチューブ D 1本
- スポイト 4本
- スライドガラス 5枚
- カバーガラス 1箱
- ピンセット 1本
- ビニールテープ 1個
- ハサミ 1個
- 生物顕微鏡 1台
- 実験用手袋 M 1組

2つのプラスチックビーカーは、プラスチック用とガラス用のゴミ箱として使用する。紙ゴミは、机の側面の紙ゴミ用袋に入れる。ゴミの分別は確実にを行うこと。

注意

- ・ 試験中に顕微鏡の光源がつかなくなったり、顕微鏡のレンズが汚れたりしたら、速やかに申し出ること。
- ・ スライドガラス、カバーガラスは足りなくなったら挙手をして合図する。
- ・ ガラスを割った場合は挙手をして合図する。
- ・ プレパラートは、そのままガラスゴミ用のプラスチックビーカーに廃棄する。その際、カバーガラスをスライドガラスから外す必要はない。

はじめに

動物の発生は受精卵という1個の細胞からスタートするが、その後の卵割および体細胞分裂により細胞数が増加する過程で、発生を制御する遺伝子が適切な時期に適切な場所で発現することにより体が形づくられる。真核生物の核内の遺伝子が発現するとき、DNAがもつ塩基配列は転写により核内で mRNA へと写し取られ、細胞質へ輸送された後に翻訳されてタンパク質のアミノ酸配列へと変換される。

遺伝子の発現を解析するとき、ハイブリダイゼーションという手法が用いられる。はじめに、解析の対象となる mRNA と相補的な塩基配列をもつ核酸 (DNA や RNA) を放射性同位体や化合物で標識する。この標識された核酸をプローブとよぶ。このプローブを塩基配列の相補性を介して標的 mRNA と結合させた後、標識化合物を発色もしくは発光により可視化すれば、目的の mRNA が存在する位置を調べることができる (図1)。細胞から抽出された RNA を電気泳動し、これを膜に転写して行うのがノザンハイブリダイゼーション、固定された組織中にある標的 mRNA を検出するのが *in situ* ハイブリダイゼーションとよばれる。

ウニやホヤは発生生物学のモデル生物として利用され、発生を制御する遺伝子の解析も行われてきた。また、どちらの動物も、ヒトなどの脊椎動物への進化の道筋を解析するうえでも重要な動物である。これらの動物の胚は透明度が高く、固定された胚をそのまま用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行うことができるため、発生を制御する遺伝子の発現時期・発現部位を容易に解析できる。今回の実験試験では、胚の *in situ* ハイブリダイゼーションや幼生の観察とスケッチを通じて、動物の発生および進化のしくみについて考える。

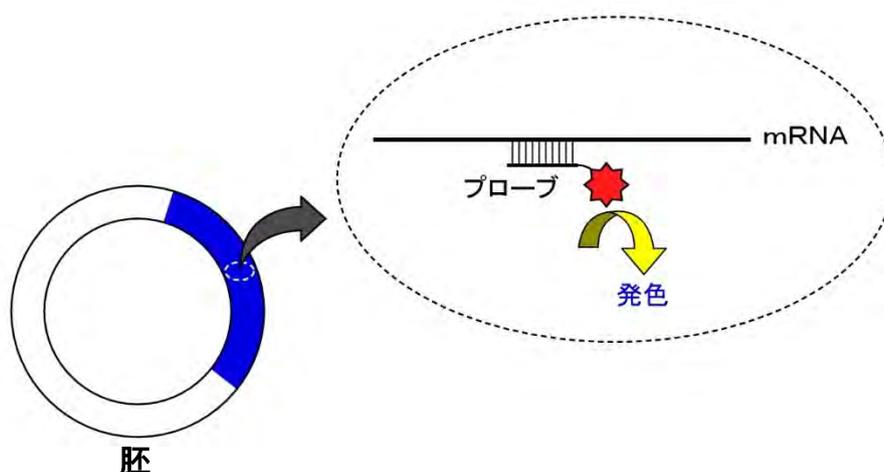


図1 *in situ*ハイブリダイゼーションの原理

胚の青で示された領域に存在する mRNA を検出するために、この mRNA に相補的な塩基配列をもつプローブを結合させる。その後、プローブに付けられた標識化合物を発色により可視化すれば、目的の mRNA が存在する位置を調べることができる。

問 1.

in situ ハイブリダイゼーションにより、バフンウニ胚における遺伝子 X mRNA の局在を調べたい。下の配列は、遺伝子 X mRNA の塩基配列の一部が示してある。この mRNA を検出するための RNA プロブの塩基配列を、解答欄に記しなさい。塩基配列は、左を 5'側、右を 3'側として記すこと。

5' -GAACGAUGCACUGAACCAUA-3'

問 2.

遺伝子 X mRNA を検出するためのプロブを使って 50°C でハイブリダイゼーションを行うと、mRNA の存在を示すシグナルが適切な場所で検出された。しかし、同じプロブを使って 70°C でハイブリダイゼーションを行ったところ、シグナルが得られなかった。温度を 70°C にすることによってどのような問題が生じたと考えられるか、説明しなさい。

問 3.

A, B および C のマイクロチューブには、*in situ* ハイブリダイゼーションにより遺伝子 X mRNA の検出を行ったバフンウニ胚が入っている。それぞれのチューブから胚を取り出してプレパラートを作って観察し、解答用紙（スケッチ用紙）にスケッチしなさい。また、各サンプルの発生段階および特徴的な部位の名称を記入しなさい。

※ サンプル A, B, C のスケッチは、それぞれ別の解答用紙（スケッチ用紙）を用いること。

書き直し等で枚数が足りない場合は、裏面を使用すること。

※ 生体試料の性質上、形態の悪い胚も含まれる。可能な限り、正常な形態であると判断できる試料を選択してスケッチを行うこと。

プレパラートの作製法（各工程はあくまで一般的な方法であるため、試料の性質を理解して適宜工夫をすること）

1. チューブの底を数回軽く指でたたき、よく混ぜる。
2. スポイトの先端をチューブ内に差し込み、ウニ胚を保存液ごと吸い取る。液量は適宜判断すること。
3. スライドガラス上へのせ、カバーガラスをかけてプレパラートとする。

問 4.

サンプル A, B, C のバフンウニ胚のそれぞれについて，遺伝子 X mRNA が発現している領域を説明しなさい。

問 5.

遺伝子 X mRNA の発現パターンから，遺伝子 X は胚のどの組織の形成に関与していると考えられるか。また，それは 16 細胞期のどの割球に由来する組織か答えなさい。

問 6.

D のマイクロチューブには，スジキレボヤの幼生が入っている。チューブから幼生を取り出してプレパラートを作って観察し，解答用紙(スケッチ用紙)にスケッチしなさい。また，脊椎動物の発生においても共通に見られ，ホヤと脊椎動物を同じ分類群とする根拠となる構造体を矢印で示し，その名称を記しなさい。

※ プレパラートの作製法およびスケッチの方法は，問 3 に準じて行うこと。

名札番号：

氏名：

実験試験 I 発生生物学

解答用紙

(1 / 6)

問 1.

--

問 2.

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 I 発生生物学
解答用紙
(2 / 6)

問3.

サンプルA

発生段階	
------	--

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 I 発生生物学
解答用紙
(3 / 6)

問3.

サンプルB

発生段階	
------	--

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 I 発生生物学
解答用紙
(4 / 6)

問3.

サンプルC

発生段階	
------	--

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 I 発生生物学
解答用紙
(5 / 6)

問 4.

サンプルA

サンプルB

サンプルC

問 5.

名札番号：

氏名：

実験試験 I 発生生物学

解答用紙

(6 / 6)

問 6.

日本生物学オリンピック 2017 本選 広島



実験試験Ⅱ 分子生物学 問題冊子

(85分)

1. 机には問題冊子（11 ページ）と解答用紙（4 枚）が配布されている。
2. 説明が始まるまでは問題冊子を開かずに、このページをよく読んでおくこと。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と氏名を記入しなさい。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は挙手をする事。
5. 試験の途中で気分が悪くなったり、トイレ等のためにやむを得ず途中退室を希望したりする場合は、挙手をする事。
6. 実験中は必ず白衣を着用すること。また、実験用手袋は必要に応じて着用し、試料等が眼、口、皮膚などに直接触れないよう注意すること。
7. 問題冊子にメモを取ってもかまわない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
8. 実験机の上の実験器具は自由に使ってかまわない。実験中は位置も自由に動かしてかまわない。実験終了後はなるべく元の位置に戻しておくこと。
9. 問題は問 1 から問 5 までである。全体に目を通してから解答を始めること。
10. 実験机の上には、すでに準備されているものの他に、配布されたペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないこと。

実験に必要なもの

この実験では、下に示した器具と試薬を用いる。足りないものがあったら挙手をする事。

<input type="checkbox"/> マイクロピペット	1 本
<input type="checkbox"/> マイクロピペット用チップ	1 箱
<input type="checkbox"/> チューブ立て	2 種類
<input type="checkbox"/> 4 連チューブ	1 本
<input type="checkbox"/> <i>GA3ox</i> 増幅用プライマー混合液 (<i>GA3ox</i> と表記)	1 本
<input type="checkbox"/> <i>UBQ</i> 増幅用プライマー混合液 (<i>UBQ</i> と表記)	1 本
<input type="checkbox"/> 乾燥種子由来の cDNA (乾燥と表記)	1 本
<input type="checkbox"/> 吸水種子由来の cDNA (吸水と表記)	1 本
<input type="checkbox"/> プレミックス (プレミックスと表記)	1 本
<input type="checkbox"/> 純水 (純水と表記)	1 本

注意事項

1. 問 1 で調整する反応液は試験開始から 40 分後に回収する。この時間までに準備できなければ、その後の反応を行うことができない。各自、間に合うように反応液を準備すること。
2. 各自の手元にある試薬の再配布は行わないので、問題文を熟読して間違いの無いよう実験を進めること。

はじめに

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、DNA を特異的かつ迅速に増幅する手法で、鋳型となる DNA が非常に少ない場合や純粋でない場合にも有効である。PCR を開発した Kary Mullis は 1993 年にノーベル化学賞を受賞した。PCR によって増幅する DNA (PCR 産物) をリアルタイムに測定 (モニタリング) する方法がリアルタイム PCR 法である。今回の実験では、リアルタイム PCR により、遺伝子の転写量を比較する。

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 DNA の増幅反応が進行する。まず、(1) 95°C 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°C 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) を結合させる (アニーリング)。そして最後に (3) 72°C で DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応を引き起こす (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する。PCR 反応が理想的に進行した場合には、目的とする DNA 配列を 1 回のサイクルごとに 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の DNA 配列を 2^n (2 の n 乗) 倍に増幅することができる。

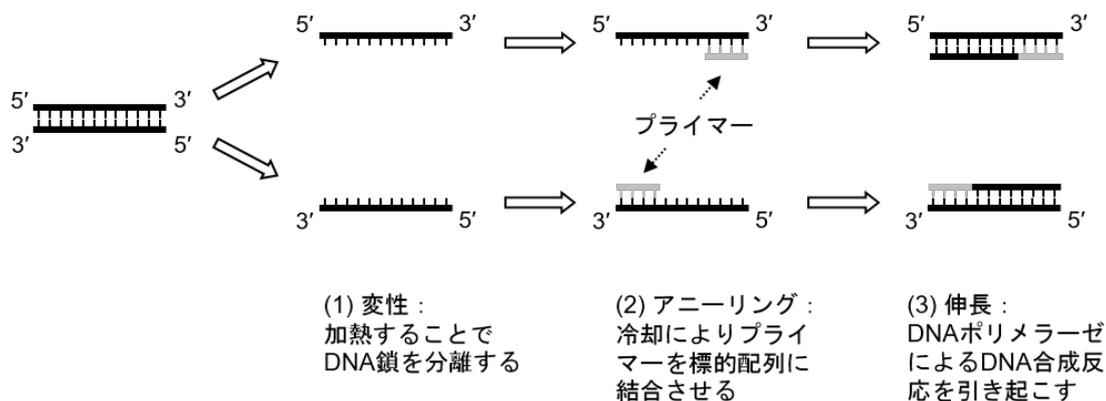


図 1. PCR の概略図

リアルタイム PCR では上記の 3 つの反応ステップを 2 つのステップにまとめて行うことがある。まず、(1) 95°C で変性を行い、(2) 60°C でアニーリングと伸長を行う。リアルタイム PCR では蛍光物質を利用して増幅した DNA 量を測定する。今回の実験では、二本鎖 DNA に入り込んだ蛍光物質が励起光の照射によって蛍光を発する特性を利用して二本鎖 DNA 量を測定する方法を用いる。蛍光の強さは DNA の量に比例して増大するため、蛍光の強さを測定することで PCR 産物量 (DNA 量) を測定することができる。

リアルタイム PCR では、横軸に PCR のサイクル数を取り、縦軸に増幅した PCR 産物量（蛍光強度）を対数でグラフを作成すると、PCR による DNA の増幅を図 2 のように表すことができる。鋳型 DNA 濃度が異なるサンプル間の増幅曲線は平行になる（図 3）。これらの増幅曲線の中で直線的な領域（図 3 の A）に 1 本の補助線を水平に引くと初期 DNA 濃度を推定することができる。増幅曲線と補助線との交点の PCR サイクル数を Ct 値と呼ぶ（図 3）。サイクル数の差（Ct 値の差、 ΔCt ）を調べることで DNA の初期濃度の差を比較することができる。同じ PCR 産物量に達するまでの Ct 値が 1 多ければ初期濃度は 1/2 少なく、Ct 値が 2 多ければ 1/4 少ないと考えられる。

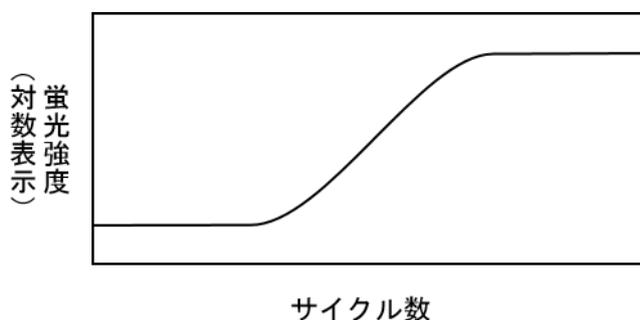


図 2. DNA 蛍光標識によるリアルタイム PCR の増幅曲線

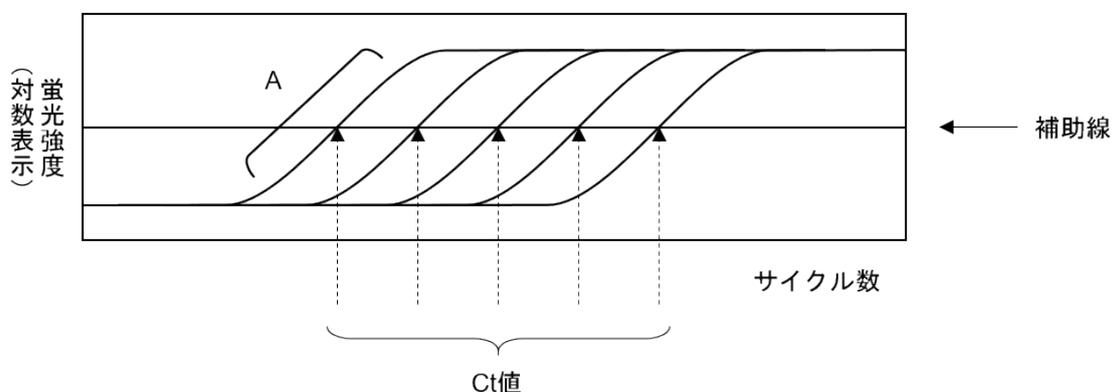


図 3. 補助線と Ct 値

リアルタイム PCR による転写量の定量方法には、絶対定量と相対定量がある。相対定量は、標的遺伝子の転写量を参照遺伝子の転写量で標準化することで、サンプル間の標的遺伝子の転写量を比較する定量法であり、検量線を用いた方法と検量線を用いない $\Delta\Delta Ct$ 法がある。参照遺伝子には、生育条件や様々な処理等に関係なく、全ての細胞で転写量が同じ遺伝子が用いられる。

実験. リアルタイム PCR による遺伝子転写量解析

次の問題文を読み、それぞれの問いに答えなさい。また、問題文に従ってリアルタイム PCR を実施しなさい。

$\Delta\Delta Ct$ 法を用いた遺伝子転写量解析は、標的遺伝子と参照遺伝子の Ct 値の差 (ΔCt 値)、さらに ΔCt 値の差 ($\Delta\Delta Ct$ 値) から未知サンプル間の標的遺伝子の転写量を比較定量する方法である。本実験では、ある植物の乾燥種子と吸水種子でジベレリン 3-酸化酵素遺伝子 (以下, *GA3ox*) の転写量を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて比較する。この遺伝子がコードするタンパク質は植物ホルモンジベレリンの生合成反応の一部を触媒する。ユビキチン遺伝子 (以下, *UBQ*) は生育条件や様々な処理等に関係なく全ての細胞で転写産物量に変化しないと考えられることから、参照遺伝子として用いる。

問 1.

以下の文章を読み、①～③を解答欄に記入しなさい。また、40 分以内に反応液を調整しなさい。乾燥種子、吸水種子からそれぞれ調製した 2 種類の cDNA (complementary DNA, 相補的 DNA) を用い、標的遺伝子の *GA3ox* と参照遺伝子の *UBQ* の 2 種類の転写量を調べる。したがって、4 つの反応液を調製する必要がある。与えられた溶液を適宜希釈することでリアルタイム PCR の反応溶液を調製する。表 1 に基づいて実験に必要な溶液量を計算し、①～③を解答欄に記入しなさい。プレミックスは DNA ポリメラーゼ、ヌクレオチドなどを含む混合液を意味している。また、[2×] プレミックスや[10×] プライマー混合液はそれぞれ 2 倍あるいは 10 倍に濃縮された溶液であることを意味している。

表 1. リアルタイム PCR 反応液の調製

	必要量 (μl)	使用濃度
純水	①	-
[2×] プレミックス	②	[1×]
[10×] プライマー混合液 <GA3ox, または UBQ>	③	[1×]
cDNA 溶液 <乾燥, または吸水>	2.0	-
総量	20.0	-

< >内は配布したチューブの表記を示す

続いて、計算した溶液量を用いて実際にリアルタイム PCR 反応液を 4 連チューブに調製しなさい。リアルタイム PCR は蛍光量を測定するため、チューブのフタをきれいに扱う必要がある。実験操作を行う前に、ゴム手袋を装着すること。続いて、図 4 の赤丸で示したよ

うに 4 連チューブの右端に各自の名札番号を油性ペンで記入すること。油性ペンで記入するのは名札番号のみとし、フタや側面には何も記入しないこと。左からチューブ番号を 1, 2, 3, 4 とする。表 2 に従い、1~4 のチューブに表 1 の反応液を入れること。マイクロピペットを用いて表 1 の上から順に各溶液を量り取り、1~4 のチューブに入れること。

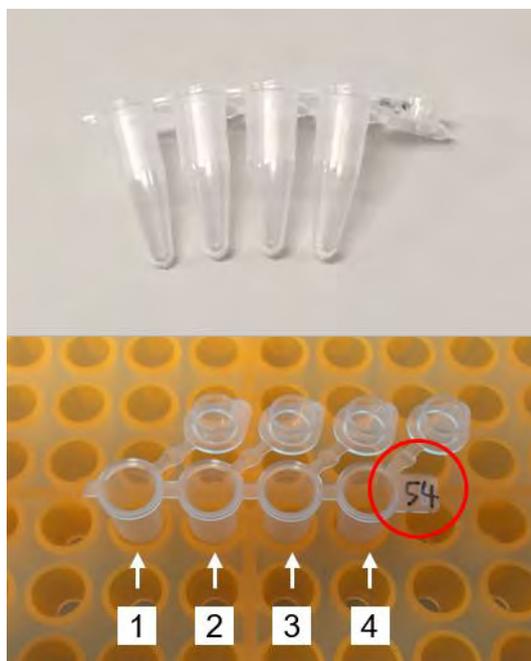


図 4. PCR チューブ (4 連) への名札番号の記入

表 2. チューブと内容物の対応表

チューブ番号	cDNA	プライマー混合液
1	乾燥種子	<i>GA3ox</i>
2	乾燥種子	<i>UBQ</i>
3	吸水種子	<i>GA3ox</i>
4	吸水種子	<i>UBQ</i>

4 連チューブへ全ての溶液を加えたら、最後にゆっくりとプッシュボタンを上下させ、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る。混ぜ終わったら、チューブのフタをしっかりと閉じること。一度閉じた 4 連チューブのフタは開けないこと。フタの密閉度が低下し、リアルタイム PCR 反応中に反応溶液が全て蒸発して無くなる可能性がある。試験開始から 40 分後に補助員が 4 連チューブを回収し、リアルタイム PCR 装置にセットする。

問 2.

問 1 で行ったリアルタイム PCR により図 5 のようなデータが得られたとする。適切な位置に補助線を引き、Ct 値を求め、表 3 の①～⑦の値を解答欄に記入しなさい。Ct 値は整数とする。

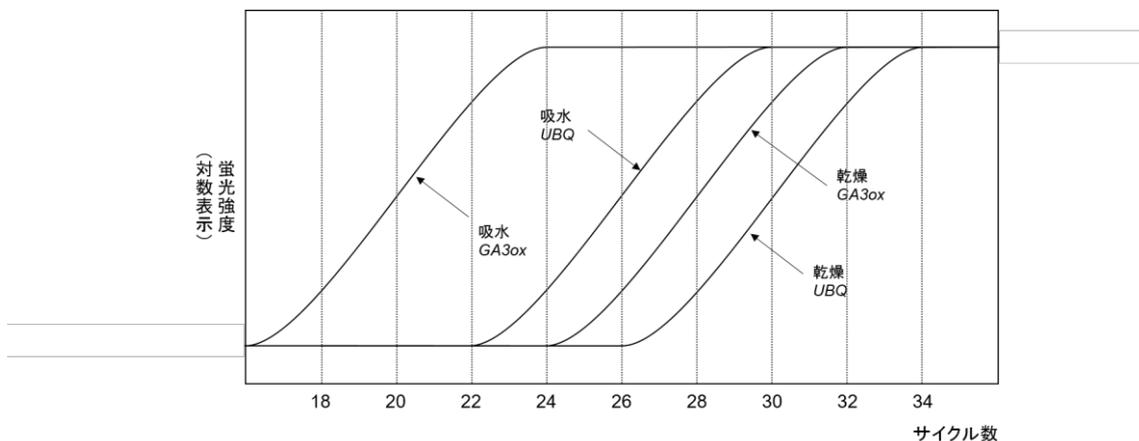


図 5. リアルタイム PCR により得られたデータ

表 3. $\Delta\Delta Ct$ 法による転写量の比較

	GA3ox の Ct 値	UBQ の Ct 値	ΔCt 値	$\Delta\Delta Ct$ 値
乾燥種子	①	②	① - ② = ③	⑥ - ③ = ⑦
吸水種子	④	⑤	④ - ⑤ = ⑥	

$\Delta\Delta Ct$ 値が n 異なれば、cDNA の初期濃度は 2^n (2 の n 乗) 異なる。このことから、吸水種子の GA3ox の転写量は、乾燥種子の GA3ox の転写量の何倍であるかを解答しなさい。 解答欄には小数は用いず、整数あるいは分数で記入すること。なお、指数の値がマイナスの場合は、例を参考に $2^{-n} = \frac{1}{2^n}$ として計算すること。

例) $2^{-3} = \frac{1}{2^3} = \frac{1}{2 \times 2 \times 2} = \frac{1}{8}$

問 3.

PCR は理論的には反応が 1 サイクル進むごとに増幅された PCR 産物量 (DNA 量) が 2 倍ずつ増える。したがって、横軸に PCR のサイクル数、縦軸に PCR 産物量 (蛍光強度) を対数で表したとき、図 6 の A で示す領域のように直線的になるはずである。しかしながら、点線で囲った領域のように、PCR の初期と後期ではサイクル数が増えても蛍光強度の上昇を検出することができずに横ばいになる。その理由をそれぞれ記述しなさい。

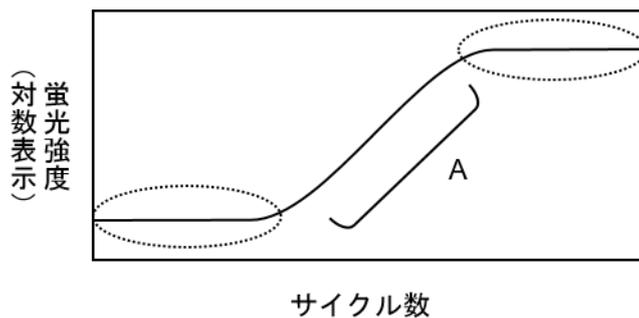


図 6. DNA 蛍光標識によるリアルタイム PCR の増幅曲線

問 4.

$\Delta\Delta C_t$ 法を用いてサンプル間の標的遺伝子の転写量を比較するためには、PCR における DNA の増幅がある条件を満たす必要がある。その条件を記述しなさい。

問 5.

真正双子葉類に属する多くの植物種は、暗所で発芽すると子葉（双葉）の展開を抑制しながら胚軸を伸長し、明るい環境に到達するまで伸長を続ける。暗所発芽した植物が光を感知すると、胚軸伸長を抑制し子葉の展開を開始する。同時に子葉の細胞内において色素体はエチオプラストから葉緑体へと分化する。その際、照射した総光量子数が多いほど光合成機能に関わるクロロフィル結合タンパク質 X をコードしている遺伝子（X 遺伝子）の転写量は上昇する。このような暗所発芽植物への光照射時の応答は脱黄化応答と呼ばれている。今回、異なる光量の赤色光を照射した植物における X 遺伝子の転写量を調べた。照射した総光量子数は、「0.0」、「0.1」、「1.0」、「100.0」（単位： $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ）の4条件である。まず、それぞれの芽生えから mRNA を抽出した後、逆転写反応を行い cDNA 試料溶液を作製した。異なる4つの光条件から調製した cDNA 溶液サンプル（サンプル名：A, B, C, D）と、あらかじめ DNA 濃度がわかっている標準試料 R1~3 と X1~3 を用いて、X 遺伝子の転写量をリアルタイム PCR 法で測定した。なお、参照遺伝子として R 遺伝子を用いた。表 4 に示した値がリアルタイム PCR の結果である。問 5-1 から問 5-4 について答えなさい。

問 5-1.

表 4 の標準試料の Ct 値を用いて解答用紙の片対数グラフに検量線を作成しなさい。

問 5-2.

得られた検量線から、表 5 のサンプル A~D に含まれる R 遺伝子と X 遺伝子の転写量におけるそれぞれの相対濃度を算出し、解答欄に記述しなさい。

問 5-3.

問 5-2 で求めた値を用いて、それぞれのサンプルにおける R 遺伝子の転写量に対する X 遺伝子の転写量の比を解答欄に記述しなさい。なお、値が 1 より小さい場合は分数で記入すること。

問 5-4.

サンプル A~D を照射した総光量子数の大きい順に解答欄に記述しなさい。

表 4. 標準試料の Ct 値

	R 遺伝子	
	相対濃度	Ct 値
標準試料 R1	4	26
標準試料 R2	128	21
標準試料 R3	512	19

	X 遺伝子	
	相対濃度	Ct 値
標準試料 X1	6	29
標準試料 X2	96	25
標準試料 X3	768	22

表 5. サンプルの R 遺伝子と X 遺伝子の Ct 値

	R 遺伝子の Ct 値	X 遺伝子の Ct 値
サンプル A	26	25
サンプル B	22	26
サンプル C	23	24
サンプル D	25	23

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 II 分子生物学

解答用紙

(1 / 4)

問 1.

①	②	③
---	---	---

問 2.

①	②	③	④
⑤	⑥	⑦	

吸水種子における *GA3ox* の転写産物量は乾燥種子の () 倍である。

問 3.

PCR の初期：

PCR の後期：

問 4.

名札番号：

氏名：

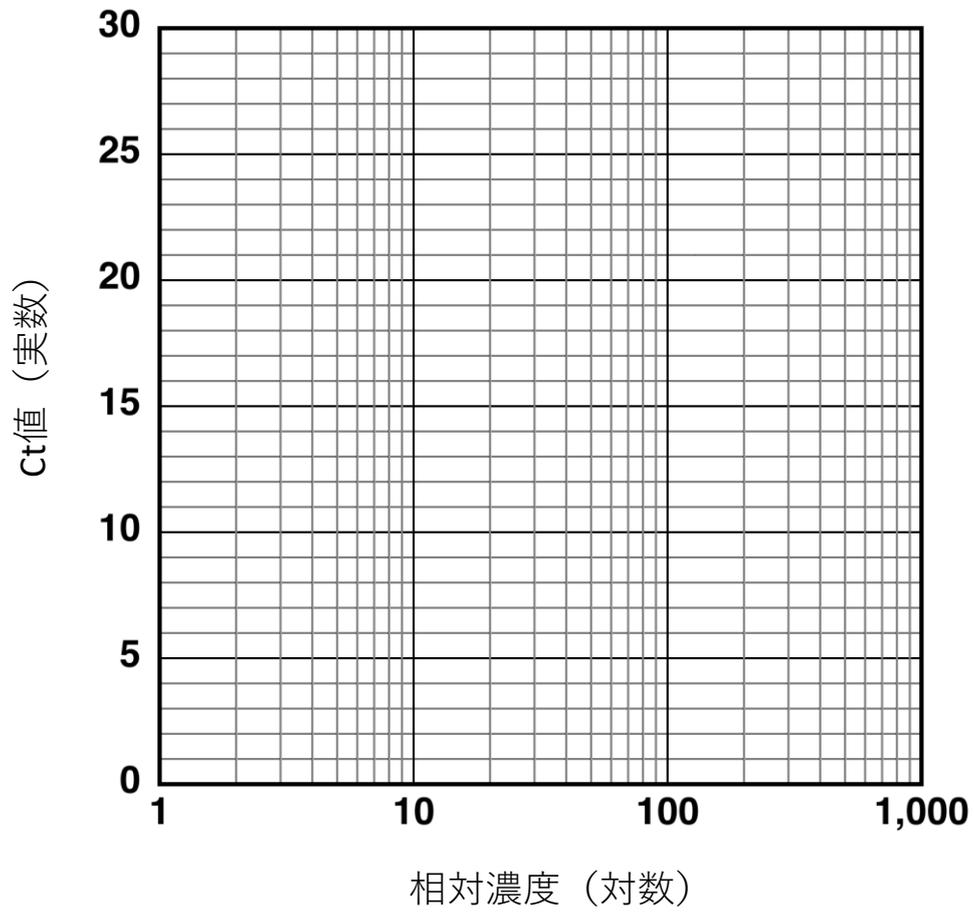
実験試験 II 分子生物学

解答用紙

(2 / 4)

問 5-1

R遺伝子用グラフ用紙



名札番号：	氏名：
-------	-----

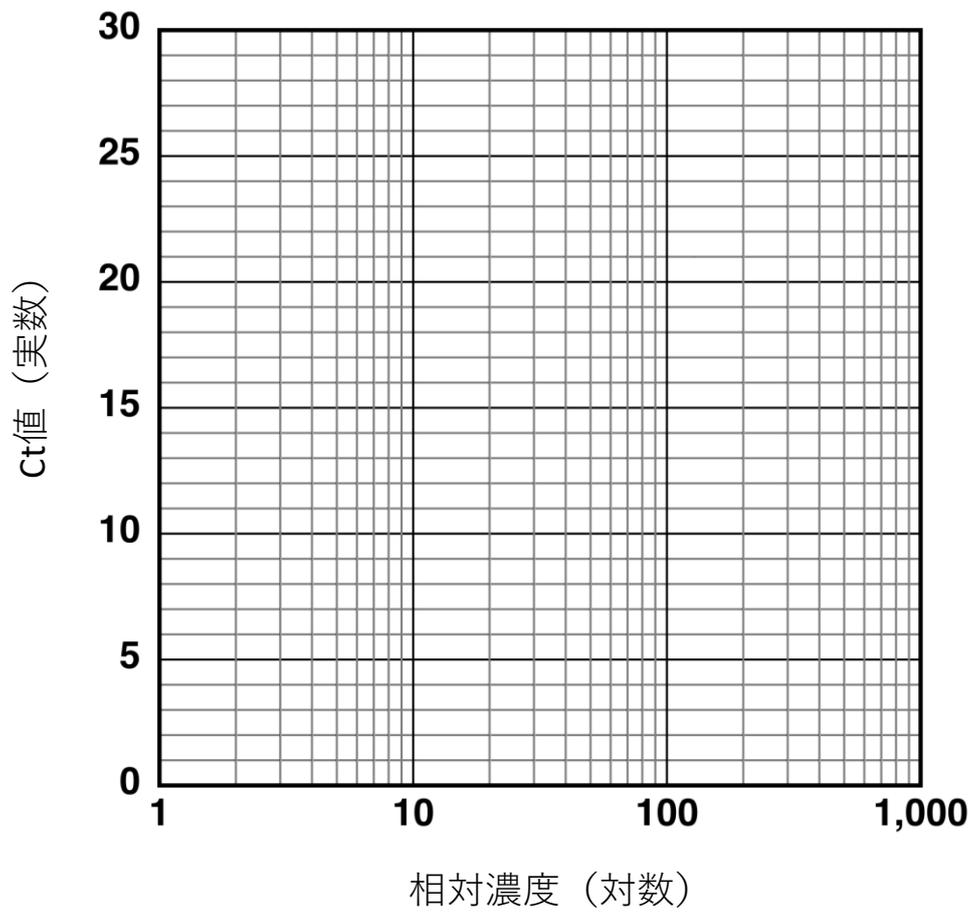
実験試験 II 分子生物学

解答用紙

(3 / 4)

問 5-1 (つづき)

X遺伝子用グラフ用紙



名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 II 分子生物学

解答用紙

(4 / 4)

問 5-2.

	R 遺伝子		X 遺伝子	
	Ct 値	相対濃度	Ct 値	相対濃度
サンプル A	26		25	
サンプル B	22		26	
サンプル C	23		24	
サンプル D	25		23	

問 5-3.

	R 遺伝子で正常化された X 遺伝子の相対転写量
サンプル A	
サンプル B	
サンプル C	
サンプル D	

問 5-4.

→ → →

日本生物学オリンピック 2017 本選 広島

実験試験Ⅲ 動物生理学 問題冊子
(120分)

1. 机には、問題冊子（6 ページ）および解答用紙（5 枚）が配布されている。
2. 説明が始まるまでは、問題冊子を開かずに、このページをよく読んでおくこと。また、実験机の上の機器にも触れないこと。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と氏名を記入しなさい。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は、挙手をすること。
5. 試験の途中で、気分が悪くなったり、トイレ等のためにやむを得ず途中退室を希望したりする場合は、挙手をすること。
6. 実験中は、必ず白衣を着用すること。また、実験用手袋は必要に応じて着用し、試料等が眼、口、皮膚などに直接触れないよう注意すること。
7. 問題冊子にメモを取ってもかまわない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
8. 実験机の上の実験道具は自由に使ってかまわない。実験中は位置も自由に動かしてかまわない。実験終了後は元の位置に戻しておくこと。
9. 問題は問 1 から問 5 までである。全体に目を通してから解答を始めること。
10. 実験机の上には、すでに準備されているものの他、配布されたペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないこと。

サンプルと器具類

以下のサンプル，試薬および器具がそろっていることを確認しなさい。

サンプル

- フタホシコオロギ 2 匹

試薬

- 低張液
- 酢酸オルセイン液（染色液）

器具

- ハサミ 1 本
- ピンセット 2 本
- 柄付き針 1 本
- プラスチックシャーレ（直径 9 cm 1 個，直径 3.5 cm 1 個）
- スライドガラス 10 枚
- カバーガラス 1 箱
- ろ紙 20 枚
- マニキュア 1 本
- 実体顕微鏡 1 台
- 生物顕微鏡 1 台
- 実験用手袋 M 1 組

3つのプラスチックビーカーは，プラスチック用，金属用とガラス用のゴミ箱として使用する。燃えるゴミは机の脇の袋に捨てること。ゴミの分別は確実に行うこと。

注意

- コオロギの追加が必要な場合は挙手をして申し出る（ただし、雌雄1匹ずつまで）。
- 顕微鏡の光源に不具合が生じたり，顕微鏡のレンズがよごれたりしたら速やかに申し出ること。
- スライドガラスやカバーガラスが足りなくなったら挙手をして合図する。
- ガラスを割ったり、けがをした場合は挙手をする事。
- 作製したプレパラートは試験終了後，そのままガラスゴミ用のビーカーに廃棄する。カバーガラスをスライドガラスから外す必要はない。
- マニキュアの液は直接嗅がないように注意すること。
- 鉛筆を削る必要のある人は挙手をして申し出る。

はじめに

動物の性と生殖

有性生殖は、真核生物で一般に見られる生殖様式の一つである。動物では基本的にオスとメスの2つの性が存在し、それぞれがつくる配偶子が融合して新しい遺伝子の組み合わせをもつ個体が誕生する。オスはメスを引き寄せるために特有の形態を進化させることもある。配偶子の融合を受精と呼ぶ。生殖腺では、その配偶子を形成するために染色体数を半減させる減数分裂がさかんに行われており、相同染色体が対合した二価染色体を形成する。今回の実験試験では、コオロギを用いて、体の構造の特徴、オスとメスの外部形態の違い、生殖腺の構造の違いと減数分裂に出現する特有の染色体を観察することが目的である。脊椎動物とは異なる動物を用いて、みなさんが学習してきた知識をうまく照らし合わせて観察することが必要とされる。一連の実験と観察、そして知識と考察の力が発揮されるよう期待する。

動物の性と生殖に関する実験試験として、次の問1～問5に答えなさい。

問 1.

動物は、発生のしかたによって大きくグループ分けがなされる。初期発生原腸胚の時期に、原腸陥入によって原口という構造（穴）ができる。グループ A は、この原口およびその近辺が肛門になるが、グループ B は、逆に原口が口になる。コオロギは A, B, どちらのグループに属するか。記号で答えなさい。また、そのグループの名称を答えなさい。

問 2.

コオロギは、繁殖期になるとオスが求愛歌を奏でることでメスを引き寄せ、交尾する。その後、オスから精子を受け取ったメスは地中に受精卵を産む。コオロギのオスとメスをそれぞれ一匹ずつ配布してある。実体顕微鏡を用いて両者を比較観察し、オスの繁殖行動およびメスの繁殖行動を特徴づける外部形態の特徴をそれぞれスケッチしなさい。

問 3.

コオロギなどの節足動物とカエルや魚などの脊椎動物では、体の中樞神経と内臓の配置が異なっている。その違いを具体的に述べなさい。

問 4.

コオロギの内臓の位置に注意しながら以下の手順にしたがって解剖し、次の問題に答えなさい。

オスのコオロギの腹部には 1 対（2 個）の精巣が存在している。白色で大型の器官であり、少し堅めの透明の膜で覆われている。一方、メスの腹部には 1 対（2 個）の卵巣があり、その中に長だ円形の卵を含んでいる。実体顕微鏡を使って精巣および卵巣を観察し、それらの形態の特徴をスケッチしなさい。

解剖のしかた

- 1) 小さいシャーレに半分程度の深さまで低張液を入れる。
- 2) 大きいシャーレの上にコオロギを置き、肛門からハサミを入れて腹部を縦に切開する。必要であれば翅を切除してもよい。
- 3) 腹部から 1 対の生殖腺を取り出し、低張液の入ったシャーレに入れる。
- 4) 生殖腺をおおう透明の膜をはがし、10 倍ないし 20 倍の実体顕微鏡で観察する。
なお、精巣をおおう膜は卵巣の膜より堅いので注意してはがすこと。

問 5.

以下の手順にしたがって 5 枚程度の染色体標本を作製し、染色体の観察を行って次の問題に答えなさい。

染色体標本のつくりかた

- 1) 精巣を 2 mm 程度の塊として切り出し、スライドガラスの中央にのせる。
- 2) 精巣の塊の周囲にある余分な低張液をろ紙で吸い取る。
- 3) 塊の上方から酢酸オルセイン液 2 滴を滴下し、5~10 分間染色する。
- 4) 染色後、カバーガラス 1 枚を組織の上に乗せ、半分に折り畳んだろ紙にはさみ、上から軽く抑えて余分な染色液を吸い取る。次にスライドガラスの位置を変え、今度は親指に体重をかけてろ紙の上から一気に標本を強く押しつぶす。
- 5) ろ紙から標本を取り出し、カバーガラスの四方をマニキュアで封入する。
- 6) マニキュアが乾いたら、生物顕微鏡で観察する。
- 7) 染色体は 40 倍の対物レンズで観察することができる。
- 8) 染色体が見えたら手を挙げて、補助員に連絡する。

減数第一分裂中期の細胞を観察し、細胞 1 個あたりの染色体の数を調べなさい。細胞の広がりや染色の具合によっては数え間違いも想定される。それゆえ、正確な染色体数を推定するため、複数の細胞の染色体を数え、染色体数ごとの分布表を作成しなさい。フタホシコオロギの性染色体構成は♂XO・♀XX 型である。観察結果と性染色体構成に基づき、このコオロギのオスの体細胞 (2 倍体, 2n) における染色体数を推測しなさい。また、その根拠となる理由も述べなさい。なお、1 個の二価染色体は 2 本の染色体として数える。また、減数第一分裂とは異なる細胞分裂を観察し、追加の分布表を作成してもよい。この場合は細胞分裂の名称も記入しなさい。

例)

観察した細胞分裂の名称： 減数第一分裂

細胞あたりの染色体の数	8 本	9 本	10 本	11 本
観察した細胞の数	1 個	2 個	20 個	3 個

名札番号：

氏名：

実験試験 III 動物生理学

解答用紙

(1 / 5)

問 1 .

記号

動物

名札番号：

氏名：

実験試験 III 動物生理学

解答用紙

(2 / 5)

問 2.

オス

メス

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 III 動物生理学
解答用紙
(3 / 5)

問 3.

名札番号：

氏名：

実験試験 III 動物生理学

解答用紙

(4 / 5)

問 4.

精巣

卵巣

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 III 動物生理学
解答用紙
(5 / 5)

問 5.

観察した細胞分裂の名称： 減数第一分裂

細胞あたりの染色体の数						
観察した細胞数						

観察した細胞分裂の名称：

細胞あたりの染色体の数						
観察した細胞数						

観察した細胞分裂の名称：

細胞あたりの染色体の数						
観察した細胞数						

<p>コオロギ(オス)の体細胞の染色体数(2n)と算出の根拠</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>
--

日本生物学オリンピック 2017 本選 広島

実験試験Ⅳ 系統・分類学 問題冊子
(120分)

1. 机には、問題冊子 (10 ページ) と解答用紙 (7 枚), 計算用紙 (1 枚) が配布されている。
2. 説明が始まるまでは、問題冊子を開かずに、このページをよく読んでおくこと。また、実験机の上の機器にも触れないこと。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に名札番号と氏名を記入しなさい。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節しなさい。椅子の高さが低すぎて合わない人は、挙手をすること。
5. 試験の途中で、気分が悪くなったり、トイレ等のためにやむを得ず途中退室を希望したりする場合は、挙手をすること。
6. 実験中は、必ず白衣を着用すること。また、実験用手袋は必要に応じて着用し、試料等が眼、口、皮膚などに直接触れないよう注意すること。
7. 問題冊子にメモを取ってもかまわない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
8. 実験机の上の実験道具は自由に使ってかまわない。実験中は位置も自由に動かしてかまわない。実験終了後は元の位置に戻しておくこと。
9. 問題は問 1 から問 6 までである。全体に目を通してから解答を始めること。
10. 実験机の上には、すでに準備されているものの他、配布されたペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないこと。

用意するもの

- 材料 植物 1 枝
- スライドガラス 5 枚
- カバーガラス 1 箱
- スポイト 1 本
- 水
- ピンセット 2 本
- カミソリ 2 枚
- 実体顕微鏡 1 台
- 生物顕微鏡 1 台
- 接眼マイクロメーター 1 枚 (生物顕微鏡に装着済み)
- 計算機

注意事項

- ・ 試験開始後、上記リストにあるものをすぐに確認して不足がある場合は挙手をして補助員に申し出ること。
- ・ 試験中に顕微鏡の光源がつかなくなったり、顕微鏡のレンズが汚れたりするなど、試験の途中で顕微鏡などに不都合が生じた場合も、速やかに申し出ること。
- ・ スライドガラス、カバーガラスは足りなくなったら挙手をして合図する。
- ・ ガラスを割った場合は挙手をして合図する。
- ・ プレパラートは、そのままガラスゴミ用のプラスチックビーカーに廃棄する。その際、カバーガラスをスライドガラスから外す必要はない。

メモリの長さについて

接眼レンズの目盛りはそれぞれ、40 倍の対物レンズで 1 目盛りが 2.5 μm 、10 倍で 10 μm 、4 倍で 25 μm とすること。

以下の文を読んで問1から問6の問題に答えなさい。

はじめに

維管束植物は維管束とよばれる通導組織をもち、陸上の環境に適応した形態をもっている。現存する維管束植物にはシダ植物と裸子植物、被子植物がある。ここでは裸子植物について述べる。裸子植物はソテツ類とイチョウ類、球果類、グネツム類の4群が現存し、絶滅した系統群も含めて、胚珠がむきだしになっているという共通した形態的特徴をもつ。現存する裸子植物の系統関係はまだ確定していないが、Hasebe *et al.* (1992) によりその単系統性が示されている。裸子植物のうちソテツ類とイチョウ類はべん毛をもった精子を作るという共通点があり、原始的な生殖様式を保持していると考えられる。ソテツとイチョウの精子は、100年以上前に日本の研究者によって発見された。球果類はマツなどに代表され、球果（松ぼっくり状の生殖枝）を作る。球果類は針のような葉（針葉）をもつ種が多いため、しばしば針葉樹類ともよばれる。グネツム類は非常に多様な形態をもつ群で、裸子植物としては進化した体制をもつ。とくにグネツム属は広葉樹のような葉をもち、被子植物との類縁性を指摘する研究者もいる。形態にもとづいた系統関係の推定には限界があるため、近年ではDNAやアミノ酸の配列情報にもとづいた系統関係の推定（分子系統解析）が行われるようになった。その結果、裸子植物についてはHajibabaei *et al.* (2006) の分子系統学的な研究などが行われ、これらの結果からはグネツム類が球果類に含まれ、さらにマツ科がグネツム類と姉妹群となる説が支持されている。

問 1.

材料となっている植物（植物 1）の植物名とそれが含まれる科名を解答欄に記しなさい。また、材料として提示された植物以外で裸子植物に含まれる種を 2 つあげて解答欄に記入しなさい。それぞれが含まれる科名もあわせて記しなさい。いずれの植物名・科名も標準和名または学名のいずれかで解答しなさい。

問 2.

材料の植物（植物 1）には 2 種類の葉がある。それぞれの葉の外観を 1 つずつスケッチしなさい。また、それぞれの葉がどこについていたか示すとともに、名称や方向などの説明を記入しなさい。

問 3.

材料の植物（植物 1）の 2 種類の葉のうち針葉の表面に見られる形態を実体顕微鏡下で観察して、スケッチしなさい。また、スケッチした上で、必要に応じて各部位の名称や方向などの説明を記入しなさい。

問 4.

材料の植物（植物 1）の針葉の横断切片のプレパラートを作製して、葉の内部の構造をおもな組織に注目してスケッチしなさい。すべての細胞をスケッチする必要はないが、全体の概略がわかるようにすること。また、スケッチした上で、必要に応じて各部位の名称や方向などの説明を記入しなさい。

問 5.

表 1 は裸子植物の各種の形態（形質状態）の概略を示したものである。例えば，形質 G について数が減少する方向にだけ進化したと仮定した場合，変化の数が最小限になるような各種の関係（最節約的な系統関係）は図 1 のようになる。このとき，以下の問に答えなさい。

表 1. 各植物種と各形質の状態

	形質						例
	A	B	C	D	E	F	G
植物 1	0	2	ア	2	0 と 1	0	0
植物 2	0	5	1	2 または 1	0 と 1 と 2	0	0
植物 3	0	3	1	2	2	0	1
植物 4	0	多数	2	0	0 と 1 と 2	0	3
植物 5	1	1	2	0	0	0	5
植物 6	0	4	多数	3	0	1	100

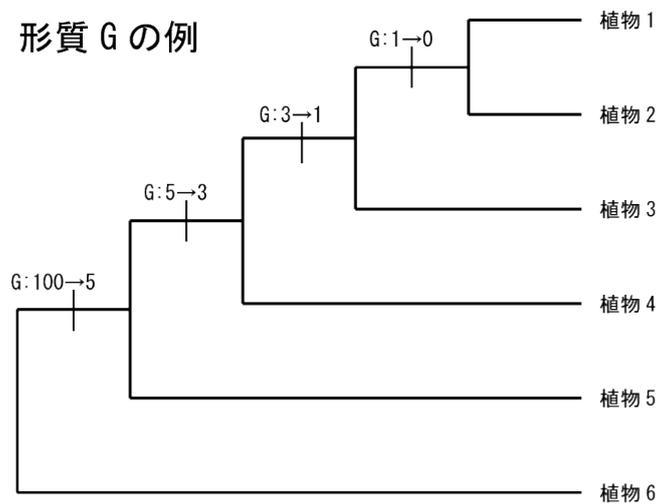


図 1. 形質 G にもとづく最節約な系統関係
（最節約系統樹）

問 5-1.

表 1 の形質 C は「1 葉あたりの通導組織の数」である。材料の植物（植物 1）について問 2 から問 4 の観察結果を参考に、表 1 のアの値を解答欄に記入しなさい。

問 5-2.

形質 B について数が減少する方向にだけ進化したと仮定した場合、それぞれの植物はどのような順番で分岐したと考えられるか。図 1 を参考にして、樹形図（デンドログラム）を示し、各形質の状態の変化を解答欄に示しなさい。

問 5-3.

形質 C について数が減少する方向にだけ進化したと仮定した場合、それぞれの植物はどのような順番で分岐したと考えられるか。図 1 を参考にして、樹形図（デンドログラム）を示し、各形質の状態の変化を解答欄に示しなさい。

問 6.

図 2 は 6 種の裸子植物の遺伝子 A の塩基配列の一部を示したものである。これについて、以下の問に答えなさい。

	10	20	30	40	50
植物 1	atgataaacg	actaagaatc	ttcggcccag	cccaccatct	gtgcttgctc
植物 2	atgatgaatg	agcgagtatc	ttcgtcccag	accaccacct	gcgcttgcg
植物 3	atggtaaacg	actaagaatc	ttcggctcag	cccaccatct	gcgcttgcg
植物 4	atgatggatg	gccgagaatc	tctagccgaa	gccaccatct	gcgtttgcg
植物 5	acgactacca	tctggaaact	cctggcccaa	gtcattgatt	acgccatga
植物 6	gtaattaata	actgagatct	tctgaaccga	actgtcgccg	acaccatgc

図 2. 各植物種における遺伝子 A の部分塩基配列

問 6-1.

図 2 の塩基配列について、植物 1 と植物 2 の間で異なる塩基を数え、解答欄の表 2a のあてはまる部分に記入しなさい。また、その数を比較した塩基配列数（植物 1 または 2 の塩基配列の全長、ここでは 50）で割った値（塩基置換率）を計算し、その値を解答欄の表 2b のあてはまる部分に記入しなさい。

表 2. 各植物種間の距離行列。ここでは、各種間の距離として遺伝子 A の塩基配列のうち異なる塩基の割合（塩基置換率）を示す。

	植物 1	植物 2	植物 3	植物 4	植物 5
植物 1	—	—	—	—	—
植物 2		—	—	—	—
植物 3			—	—	—
植物 4				—	—
植物 5					—
植物 6					

問 6-2.

植物 1 と植物 2 以外の組み合わせについて、問 6-1 と同様に、各植物間で異なっている塩基の数、およびその数を塩基配列の全長で割った値をそれぞれ計算しなさい。また、各値を解答欄の表 2a および b のあてはまる部分にそれぞれ記入しなさい。

問 6-3.

表 2b を用いて非加重結合法（UPGMA）で系統樹を作製し、解答欄に描きなさい。計算手順は手順書「非加重結合法（UPGMA）の計算手順」（9-10 頁）を参照しなさい。また、枝の長さについては概略が示されていれば良いこととする。

問 6-4.

表 1 の形質 A から F の形質の状態をそれぞれ配置し、各枝上で各形質がどのように変化したか、図 1 の形質 G の例に従って解答欄にある問 6-3 で描いた系統樹上に記入しなさい。

非加重結合法 (UPGMA) の計算手順

1. すべての OTU (operational taxonomic unit, 操作上の分類単位) の中から, 一番近い関係にある OTU を二つ選ぶ。この二つの OTU をまとめ, 新しく一つの OTU として扱う。
2. 各 OTU からの平均をとった値が新しい OTU の値となる。
3. 新しい OTU を含めた距離行列を求める。

計算の例

例. ヒトを含む霊長類の系統関係について, 非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean; UPGMA) を用いて, 以下の表 3 にある行列より系統樹を作製しなさい。

表 3. 5 つの OTU 間の 100 bp あたりの平均塩基置換数 (= 平均塩基置換率)
(Li *et al.* 1987 より)

OTU	H	C	G	O
H ヒト				
C チンパンジー	1.45			
G ゴリラ	1.51	1.57		
O オラウータン	2.98	2.94	3.04	
R アカゲザル	7.51	7.55	7.39	7.10

解法例

1. H と C の間の距離が最小であるので, H と C でまとまり (クレード) を作る。ただし, 本題の場合は平均塩基置換数が与えられているので, 各 OTU が分岐した後の距離は, 両者の間の平均塩基置換数の半分となる。このため, 2 つの OTU を $1.45 / 2 = 0.725$ のところで結合する。

OTU	H	C	G	O
H ヒト				
C チンパンジー	<u>1.45</u>			
G ゴリラ	1.51	1.57		
O オラウータン	2.98	2.94	3.04	
R アカゲザル	7.51	7.55	7.39	7.10

2. 複合 OTU (HC) と他の OTU の間の新たな距離行列を求める。

OTU	HC	G	O
HC			
G ゴリラ	<u>1.54</u> ^{*1}		
O オラウータン	2.96 ^{*2}	3.04	
R アカゲザル	7.53 ^{*3}	7.39	7.10

3. 次に, (HC) と G の間の距離が最小なので, この 2 つの OTU を $1.540 / 2 = 0.770$ のところで結合する。

4. 複合 OTU (HCG) と他の OTU の間の新たな距離行列を求める。

OTU	HCG	O
HCG		
O オラウータン	<u>2.99</u> ^{*4}	
R アカゲザル	7.48 ^{*5}	7.10

$$*1 (1.51 + 1.57) / 2$$

$$*2 (2.98 + 2.94) / 2$$

$$*3 (7.51 + 7.55) / 2$$

5. 次に, (HCG) と O の間の距離が最小なので, この 2 つの OTU を $2.98666... / 2 = 1.493$ のところで結合する。

6. 複合 OTU (HCGO) と OTU R の間の新たな距離行列を求める。

OTU	HCGO
HCGO	
R アカゲザル	7.39 ^{*6}

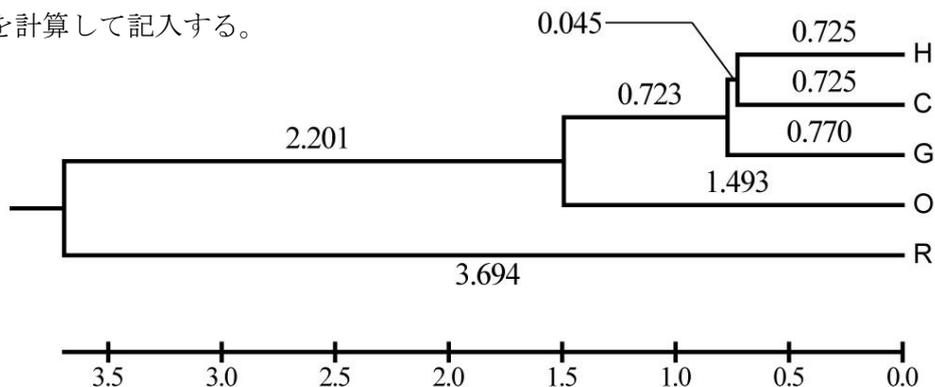
$$*4 (2.98 + 2.94 + 3.04) / 3$$

$$*5 (7.51 + 7.55 + 7.39) / 3$$

7. 最後に (HCGO) と R を $7.3875 / 2 = 3.694$ のところで結合する。

$$*6 (7.51 + 7.55 + 7.39 + 7.10) / 4$$

8. それぞれ結合する値を下のような樹形図 (デンドログラム) で示す。また, それぞれの枝の長さを計算して記入する。



名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(1 / 7)

問 1.

	植物名 (標準和名または学名)	科名 (標準和名または学名)
植物 1		
材料に提示された植物以外で裸子植物に含まれる種		
材料に提示された植物以外で裸子植物に含まれる種		

名札番号：

氏名：

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(2 / 7)

問 2.

名札番号：

氏名：

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(3 / 7)

問 3.

名札番号：

氏名：

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(4 / 7)

問 4.

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(5 / 7)

問 5-1. ①の値:

問 5-2.

問 5-3.

名札番号：	氏名：
-------	-----

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(6 / 7)

問 6-1, 問 6-2.

表 2a. 各植物種間の異なる塩基の数

	植物 1	植物 2	植物 3	植物 4	植物 5
植物 1	—	—	—	—	—
植物 2		—	—	—	—
植物 3			—	—	—
植物 4				—	—
植物 5					—
植物 6					

表 2b. 各植物種間の距離行列（ここでは、各種間の距離としてある遺伝子の塩基配列のうち異なる塩基の割合（塩基置換率）を示す）

	植物 1	植物 2	植物 3	植物 4	植物 5
植物 1	—	—	—	—	—
植物 2		—	—	—	—
植物 3			—	—	—
植物 4				—	—
植物 5					—
植物 6					

名札番号：

氏名：

実験試験 IV 系統・分類学 解答用紙

(7 / 7)

問 6-3, 問 6-4.

名札番号：

氏名：

実験試験 IV 系統・分類学 計算用紙