

日本生物学オリンピック 2018 東京



実験試験 I 動物細胞・顕微鏡操作 問題冊子 (120 分)

- 机上には、問題冊子（7ページ）と解答冊子（4ページ），別紙1，別紙2，資料1，明視野観察手順要約書，および計算・草稿用紙が配布されている。
- 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。
- 椅子の高さが低すぎて合わない人は、挙手をすること。
- 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や電卓、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ以外のものは置かないこと。
- 解答開始の合図の後、すべての解答用紙、別紙1、別紙2に氏名と選手番号とを記入すること。
- 解答開始の合図の後、実験に取り掛かる前に、問題全体を通して読み、それぞれの実験、および解答の計画を練ること。
- 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、資料1、明視野観察手順要約書、および計算・草稿用紙は持ち帰ること。
- 実験中は、必ず白衣を着用すること。また、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。
- 実験中は、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。
- 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。
- 試験終了後、解答用紙、別紙1、別紙2、計測に用いたプレパラートは回収する。

注意事項

- ・ 試験開始後、下記リスト（次ページ）にあるものをすぐに確認して不足がある場合は、挙手をして試験監督補助者に申し出る。
- ・ 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、明視野観察手順要約書で対応できないような不都合が生じた場合、速やかに補助員に申し出る。
- ・ スライドガラスやカバーガラスが足りなくなったら、挙手をして試験監督補助者に申し出る。
- ・ ガラスを割った場合は、挙手をして試験監督補助者に申し出る。
- ・ 使用済みの不必要的なプレパラートやカバーガラス等は、ガラスゴミ捨て用容器に廃棄する。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。ただし、計測に用いたプレパラートは回収するため捨てないこと。

試料・試薬・器具等

- 特定の領域を染色した胚（3個）の入った小瓶 1個
(蓋にAと記載されている)
- 神経胚期の特定の領域を染色した胚（2個）の入った小瓶 1個
(蓋にBと記載されている)
- スライドガラスに固定されたカバーガラス 1個
(カバーガラスには赤と青の線が塗られている)
- スライドガラス 6枚（クリアケースに入っている）
- カバーガラス 8枚（直径35mmシャーレに入っている）
- 直径60mmシャーレ 1枚
- 直径35mmシャーレ 1枚
- ピンセット 1本
- 50%グリセロール溶液が入ったエッペンチューブ 1本
- 両刃カミソリ 1枚
- ろ紙 1枚
- スポイト 大1本
- スポイト 小1本
- 油性マジックペン 1本（配布済みのペンケースに入っている）
- 電卓（配布済み）
- 実体顕微鏡 1台
- 生物顕微鏡 1台
- ガラスゴミ捨て用容器

A. 次の光学顕微鏡に関する文を読み、下の問1、および問2について答えよ。

生命が「生きている」その動的なふるまいを光学顕微鏡で観察することで、多くの生命現象が解明されてきた。虫メガネから最先端の光学顕微鏡に至るまで、全てに共通するレンズの結像原理は、その発見以降、およそ400年もの間、何も変わらぬままであるが、生物個体、細胞、および細胞を構成する生体分子を観察する技術は格段に進歩し、蛍光・分光測定、力学計測や微細加工技術の進歩と相まって、生命システムの理解には欠かせない研究手法の一つとなっている。近年、超解像顕微技術にノーベル賞（2014年ノーベル化学賞）が付与されたことも記憶に新しい。

通常、光学顕微鏡を用いた観察では、xy平面上での観察対象の情報を得ることを目的とすることが多いが、近年では、共焦点顕微鏡をはじめ、光軸（z）方向での情報も得ることができる光学系を利用し、三次元空間での細胞内イメージング等も盛んに行われている。

問1. 本実験で使用する生物顕微鏡では、40倍の対物レンズと15倍の接眼レンズの組合せで観察した時、接眼ミクロメーターのめもり1つは2.5 μmに相当する。これを前提にして、次の(1)、および(2)の設間に答えよ。

- (1) 接眼レンズだけを30倍の接眼レンズに変更した場合、一般に、接眼ミクロメーターのめもり1つは何μmに相当するようになるか、その値を答えよ。
- (2) 接眼レンズだけを30倍の接眼レンズに変更した場合、一般に、像全体の明るさはどのように変化するか。「明るくなる」、「暗くなる」、「変わらない」のうちから一つ選べ。

問2. 配布したカバーガラスの厚みから、顕微鏡ステージを移動させる微動ハンドル1目盛が、z軸（高さ）方向に何マイクロメートルに相当するかを、以下の指示(i) – (vi)に従って見積もりなさい。ただし、配布したカバーガラスは、その表面と裏面とに、それぞれ青と赤の油性ペンで線を描かれ、スライドガラス上に張り付けてある。スライドガラス上に表示してある数値(μm)は、あらかじめ測定したカバーガラスの厚みを指す。照明用の光量は観察しやすいように適宜調整すること。また、n回の計測データa₁, a₂, …, a_nの標準偏差σは

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (a_i - \mu)^2}$$

で見積もることができ、μは計測データの平均値である。なお、計算には配布された電卓を使用してもよい。

- (i) 生物顕微鏡を用いて、まず 10 倍の対物レンズで、配布されたカバーガラスの赤色線状領域の端を見つける。その位置で焦点をおよそ合わせてから、レボルバを動かし 40 倍の対物レンズに替えて再び観察する。40 倍の対物レンズを用いて、赤色線状領域の焦点が合ったところで、微動ハンドルのツマミと連動して変わる目盛を、小数点以下一桁までの数値として読み取り、その結果を、解答用紙の表 Z 内で対応する欄 (Z1) に記入せよ。
- (ii) 観察位置を青色線状領域に移動させ、青色線状領域の端に焦点を微動ハンドルで合わせ、微動ハンドルと連動した目盛の少数第一位までの数値を読み取り、その結果を、解答用紙の表 Z 内で対応する欄 (Z1) に記入せよ。
- (iii) 上の (i), および (ii) と同じ操作を、観察位置を変えながら、さらに 4 カ所で実施し、同様に、解答用紙の表 Z 内で対応する欄 (Z2~Z5) に記入せよ。ただし、おおよその焦点位置が合っている場合には、10 倍の対物レンズで観察する操作は省いてもよい。
- (iv) 合計 5 カ所でのカバーガラスの厚みに対応する微動ハンドルを動かした操作量（何目盛動かしたかに相当する量）を求め、解答用紙の表 Z 内で対応する欄 (Z1~Z5 の操作量) に記入せよ。
- (v) 微動ハンドルの操作量の Z1~Z5 の平均値、および標準偏差それぞれの値を少数第一位まで求め、解答欄に記入せよ。
- (vi) 以上より、微動ハンドルの 1 目盛が、z 軸（高さ）方向において何マイクロメートルに相当するのか平均値を求め、有効数字 2 行で解答欄に記入せよ。

B. 次のアフリカツメガエル胚に関する文章を読み、下の問3、および問4について答えよ。

カエルの中でもモデル生物として最もよく使用されているアフリカツメガエルの初期の胚発生過程では、外観にはあまり変化がない。しかしながら、胚の内部では細胞がダイナミックに移動し、各器官へと分化する準備が着々と行われている。

問3. 小瓶Aの中の胚を用い、次の(1)、および(2)の設間に答えよ。

- (1) 小瓶Aには、ある特定の時期のアフリカツメガエル受精卵が入っている。これらの胚（以後、胚Aとよぶ）を、スポット（大）を用いて保存液ごとやさしく吸い取って（破壊しないように注意すること）、直径35mmシャーレ内に移し、実体顕微鏡を用いて観察しなさい。観察する際、胚が溶液に十分浸っていることを確認すること。さらに、配布されたNieuwkoop & Faberの発生段階表（資料1）を参考にして、観察した受精卵が、卵割過程のどの段階にあるかを判定し、その発生段階を解答欄に記入せよ。なお、観察する胚の領域を限定するため、配布した胚は、特定の領域だけが染色されている。
- (2) 胚Aの染色領域が観察しやすいよう、下の【プレパラート作製法】を参考に、胚の一部を剃刀で切り出してプレパラートを作成した後、胚Aの染色領域の細胞の体積を、以下の指示(i) – (iv)に従って見積もりなさい。作製したプレパラートが観察に適していないと判断した場合には、小瓶Aの中にある別の胚を用いてプレパラートの作製を再度行うこと。解答に用いたプレパラートを以後、プレパラートAとよぶ。剃刀の取り扱いには十分注意すること。なお、計算には配布された電卓を使用してもよい。

【プレパラート作製法】

各工程はあくまでも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. (1)の設問で直径35mmのシャーレ内に取り出した胚Aの一つを、スポット（大）を用いて保存液ごとやさしく吸い取り（破壊しないように注意すること）、逆さまに置いた直径60mmシャーレの上におく。直径60mmシャーレを逆さまにして使用するのは、胚の切断を行いやすくするためである。液量は適宜判断し、足りなくなった場合はエッペンチューブに入っている50%グリセロール溶液を使用すること。
2. 実体顕微鏡で胚をみて、染色領域を確認する。
3. 胚のまわりの液をろ紙で吸い取る。
4. 実体顕微鏡下で胚をピンセットで押さえつつ、剃刀で切斷する。一般的に、より薄い切片の方が観察しやすい。
5. スポット（小）を用い、50%グリセロール溶液を3滴、スライドガラス上に垂らす。

6.4 の工程で切断した胚をスライドガラスの 50 %グリセロール溶液上に、凸面が上になるように載せ、カバーガラスをかけてプレパラートとする。

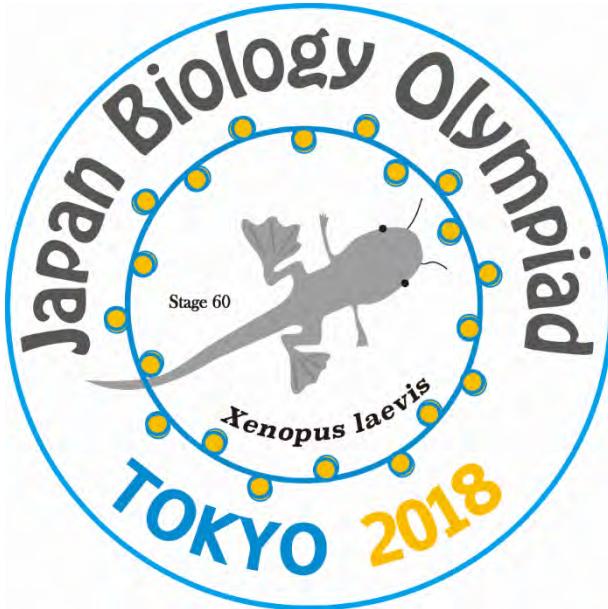
- (i) 作成したプレパラート A を生物顕微鏡のステージに載せ、10 倍の対物レンズを用いて観察し、胚の染色領域の細胞のうち 10 個をスケッチせよ。ただし、方眼用紙（別紙 1）の最小の一目盛を 1 μmとして、細胞のサイズだけが判別できるようにスケッチすればよく、細胞内の詳細な描写は必要としない。スケッチが終わり次第、スケッチに用いた観察像を画像データとして保管するため、観察視野はそのままの状態にしておき、挙手し、試験監督補助者を呼ぶこと。また、スケッチに用いたプレパラートは回収するため、スライドガラスのすりガラス（白色）部分に選手番号と A の文字を例にならって記入せよ（例：109A）。
- (ii) スケッチした細胞において、隣接する 5 個の細胞を選び、それぞれの細胞の xy 平面の面積での平均値、および標準偏差それぞれの値を答えよ。ただし、選んだ 5 個の細胞それぞれに A1 から A5 の番号を割り振り、スケッチした各細胞の枠線内の余白に割り振った番号を書き、書き入れた番号と解答用紙の表 A 内の番号とが対応するように、各細胞の面積の値を記入すること。
- (iii) (ii) で計測した細胞において、細胞の z 方向（光軸方向）の長さ（以後、厚みとよぶ）を、10 倍の対物レンズから 40 倍の対物レンズにかえて計測し、厚みの平均値、および標準偏差それぞれの値を、問 2 を参考にして答えよ。ただし、各細胞の厚みの値を解答用紙の表 A 内で対応する欄に記入すること。
- (iv) (ii)、および (iii) で計測した細胞の体積の平均値、および標準偏差それぞれの値を答えよ。ただし、各細胞の体積の値を解答用紙の表 A 内で対応する欄に記入すること。

問4. 小瓶Bの中の胚を用い、次の設間に答えよ。

小瓶Bには、卵割過程の神経胚期のアフリカツメガエル受精卵が入っている。問3(2)を参考に、これらの胚（以後、胚Bとよぶ）の切断を行って、プレパラートを作製し（以後、プレパラートBとよぶ）、胚Bの染色領域の細胞の体積を、以下の指示(i) – (v)に従って見積もり、また、指示(vi)に従って細胞の体積に関する考察をしなさい。なお、計算には配布された電卓を使用してもよい。

- (i) 作成したプレパラートBを生物顕微鏡のステージに載せ、胚Bを40倍の対物レンズを用いて観察し、胚Bの染色領域の一部の細胞を15個スケッチせよ。ただし、方眼用紙（別紙2）の最小の一目盛を1μmとし、細胞のサイズ、および細胞が何角形になっているのかが判別できるようにスケッチすればよく、問3–(2)同様、細胞内の詳細な描写は必要ない。スケッチが終わり次第、スケッチに用いた観察像を画像データとして保管するため、観察視野はそのままの状態にしておき、挙手し、試験監督補助者を呼ぶこと。また、スケッチに用いたプレパラートは回収するため、スライドガラスのすりガラス（白色）部分に選手番号とBの文字を例にならって記入せよ（例：109B）。
- (ii) 卵表面から観察される細胞の形状に着目すると、円形ではなく、多角形の形状をしていることがわかる。スケッチした範囲において、各細胞の形状が何角形か、その角数を調べ、角数ごとの頻度を示す分布表を作成せよ。
- (iii) スケッチした細胞において、細胞数が最も多い角数をもつ細胞を5個選び、それぞれの細胞のxy平面での面積の平均値、および標準偏差それぞれの値を答えよ（細胞が5個に足りない場合、次に細胞数が多い角数の細胞から選ぶこと）。ただし、選んだ5個の細胞それぞれにB1からB5の番号を割り振り、スケッチした各細胞の枠線内の余白に割り振った番号を書き、書き入れた番号と解答用紙の表B内の番号とが対応するように、各細胞の面積の値を記入すること。
- (iv) (iii)で計測した細胞において、細胞の厚みを計測し、厚みの平均値、および標準偏差それぞれの値を答えよ。ただし、各細胞の厚みの値を解答用紙の表B内で対応する欄に記入すること。
- (v) (iii)、および(iv)で計測した細胞の体積の平均値、および標準偏差それぞれの値を答えよ。ただし、各細胞の体積の値を解答用紙の表B内で対応する欄に記入すること。
- (vi) プレパラートAで観察した胚Aの細胞から算出した体積（問3–(2)で算出）と、プレパラートBで観察した胚B（神経胚期）の細胞から算出した体積とを比較し、その差異について考察せよ。

日本生物学オリンピック 2018 東京



実験試験Ⅱ 植物解剖学・生理学 問題冊子 (120分)

1. 実験机の上には、問題冊子（7ページ）と解答用紙（3枚）、草稿用紙（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。
3. 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に選手番号と氏名を記入すること。
4. 椅子の高さはレバーで調節できる。各自、適切な位置に調節すること。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。
7. 必要に応じ、実験用手袋や保護メガネを着用すること。この実験試験では強い酸を扱う操作段階が複数ある。少なくともそれらの操作の際には、必ず実験用手袋と保護めがねをともに着用すること。なお、実験用手袋は、操作毎に着脱する必要はなく、実験開始から終了まで始めたままでもかまわない。
8. 実験用手袋は、各選手のTシャツのサイズに合わせた大きさのものが、実験机の上に置かれている。待機時間中に試着して、大きさが合っているか、確かめておくこと。合わない場合は、挙手して申し出ること。
9. 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。
10. 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。
11. 問題は問1から問6まである。全体に目を通してから解答を始めること。
12. 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、ティッシュ以外のものは置かないこと。

材料・試薬・器具等

- オクラの芽生え（3個体以上）が入っている直径9cmのシャーレ 1枚
- マカラスムギの芽生え（5個体以上）が入っている直径9cmのシャーレ 1枚
- シロイヌナズナの野生型（4～5個体）と*lig*変異体（4～5個体）が培地上で育っている直径6cmのシャーレ 4枚（対照培地、GlcNAc添加培地、UDP-GlcNAc添加培地、PipA添加培地が各1枚）
- 純水 1本
- フロログルシノール塩酸液 1本
- 14cm×10cmの長方形シャーレ 3枚（うち1枚は、8つの円が描かれている）
- ピンセット 2本
- パラフィルム 1枚
- ハサミ 1本（配布されたペンケースに入っている）
- 両刃カミソリ 4枚
- スライドガラス 5枚
- 18mm×18mmのカバーガラス 5枚
- 24mm×24mmのカバーガラス 10枚
- スポイト 3本
- コピー紙 1枚
- ろ紙 3枚
- ティッシュペーパー 数枚
- 油性マジックペン 1本（配布されたペンケースに入っている）
- 物差し 1本（配布されたペンケースに入っている）
- 実験用手袋 1組
- 保護メガネ 1個
- 実体顕微鏡 1台
- 生物顕微鏡 1台
- ガラスゴミ用プラスチックビーカー 1個
- 使用済みカミソリ廃棄用シャーレ 1枚
- 廃液用プラスチックチューブ 1本

注意事項

- ・ 試験開始後、前ページのリストにあるものをすぐに確認し、不足がある場合は、
　　挙手をして補助員に申し出る。
- ・ フロログルシノール塩酸液が皮膚や顕微鏡などに付いた場合、直ちに拭き取り、
　　速やかに補助員に申し出る。
- ・ 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、
　　顕微鏡に不具合が生じた場合、速やかに補助員に申し出る。
- ・ スライドガラス、カバーガラスなどが足りなくなったら、挙手をして合図する。
- ・ 実験用手袋を交換したいときは、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。
- ・ フロログルシノール塩酸液や純水の廃液は、廃液用のプラスチックチューブに入
　　れる。
- ・ 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（カ
　　バーガラスをスライドガラスから外す必要はない）。
- ・ カミソリは、使用済みカミソリ用のシャーレに廃棄する。

はじめに

リグニンは、植物の細胞壁成分の一つで、フェニルアラニン派生物を単位とする複雑な構造の不溶性高分子である（図1）。健全な植物体では、リグニンはとくに成熟した木部通道組織（道管や仮道管）の細胞壁に多く、これらの組織に力学的強度を付与する役割などを果たしている。また、ある種のストレス下においては、通常はリグニンをほとんどつくらないような組織も、リグニンを合成して細胞壁に蓄積する。例えば、病原菌が感染すると、そのストレスに応じて感染部位にリグニンが蓄積し、病原菌を感染部位に封じ込める。

リグニンの合成・蓄積を引き起こすストレスには、突然変異などの内的要因によるものもある。シロイヌナズナの *lig* は、成長の不全とリグニンの異常な蓄積を特徴とする変異体である。*lig* 変異体では、グルコサミン-6-リン酸（GlcN-6-P）*N*-アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の突然変異により、*N*-アセチルグルコサミン-6-リン酸（GlcNAc-6-P）の合成能力が低下している（図2）。GlcNAc-6-P からつくられるウリジン二リン酸-*N*-アセチルグルコサミン（UDP-GlcNAc）は、タンパク質の糖鎖修飾前駆体の生成に必須である（図2）が、*lig* 変異体では GlcNAc-6-P の供給不足から UDP-GlcNAc が欠乏して、タンパク質の糖鎖修飾が停滞し、これがストレスとなって成長不全やリグニンの異常蓄積が引き起こされる。

リグニンの生理的作用を研究する際には、ピペロニル酸（PipA）など、リグニンの生合成を阻害する薬剤がしばしば利用される。また、リグニンの検出には、フロログルシノールという化合物を塩酸に溶かした染色液（フロログルシノール塩酸液）がよく用いられる。リグニンは、フロログルシノール塩酸液中で、速やかに赤く染まるので、容易に識別できる。

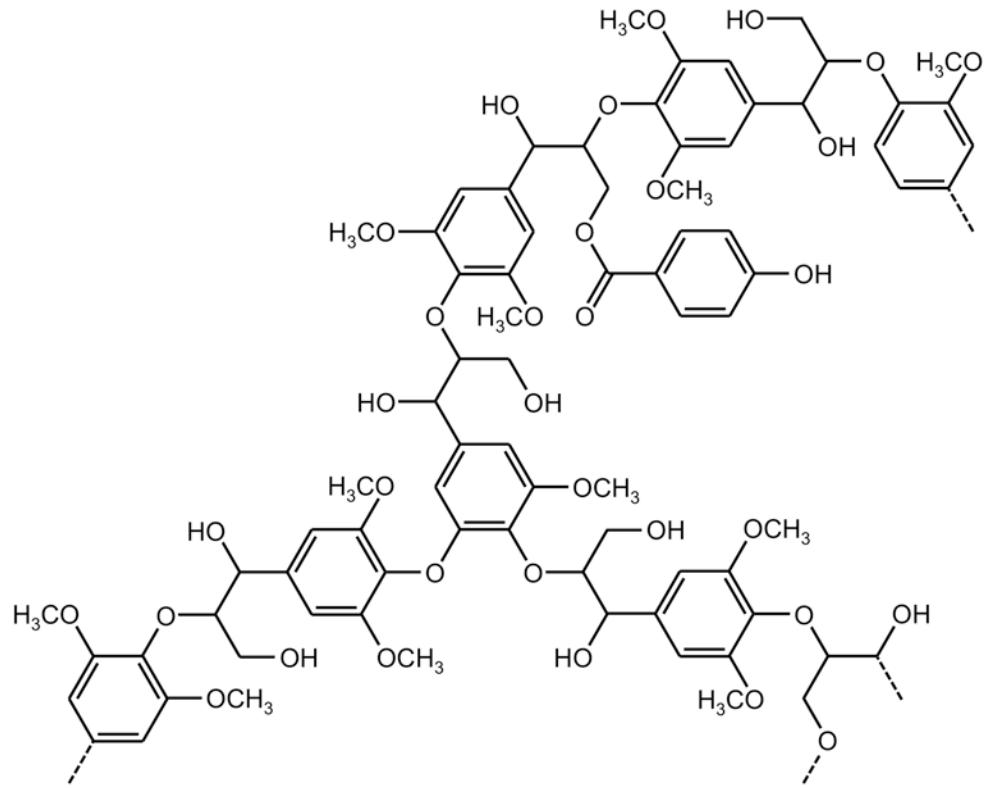
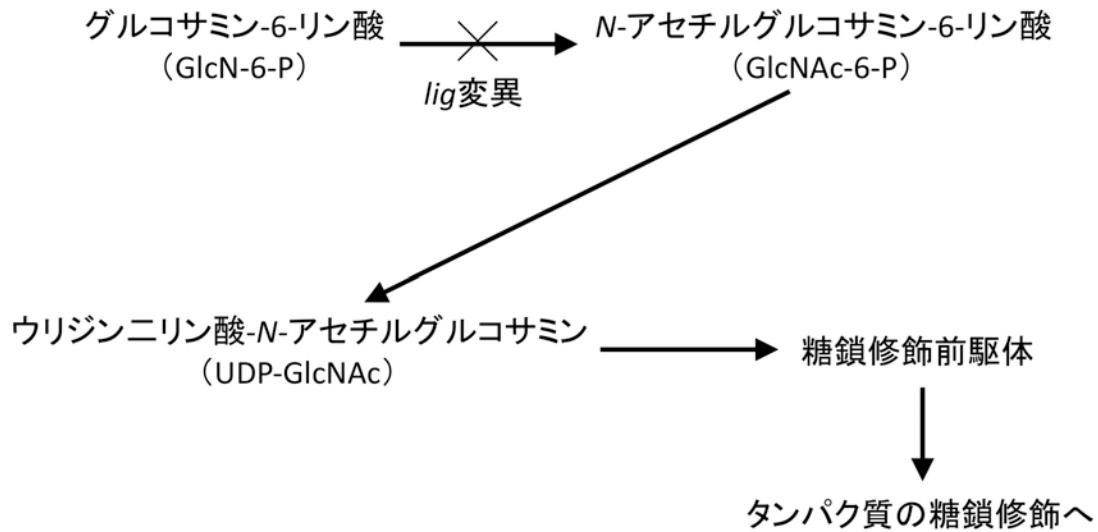


図 1. リグニンの部分構造の一例



問 1.

オクラとマカラスムギのそれぞれについて、以下の手順に従って根の横断切片の顕微鏡観察を行い、リグニンが沈着している道管をスケッチせよ。

- ① 両刃カミソリを半分に折り、2枚に分ける（図3参照）。
- ② コピー紙を4cm×2cm程度の大きさに切り、純水で濡らす。
- ③ 2枚のカミソリの間に濡らしたコピー紙を1～2枚挟む。このとき、コピー紙はカミソリの刃の部分には重ならないようにずらす（図3参照）。
- ④ スライドガラスの切片を置く位置に純水を滴下しておく。
- ⑤ パラフィルムを適当な大きさに切り、長方形シャーレに敷く。
- ⑥ 芽生えから根を数本切り取り、パラフィルムの上に載せる。
- ⑦ コピー紙を挟んだカミソリで、パラフィルム上の根を垂直に切断する。数本の根をまとめて、数カ所切断する。なお、カミソリはすぐに切れ味が落ちるので、隨時新しいものに交換すること。
- ⑧ 根の横断切片がカミソリの間に残るので、これをスライドガラス上の純水に移す。一度に多数の切片を載せる。
- ⑨ 純水をスポットで吸い取り、残っている純水はろ紙片に吸わせて除去する。
- ⑩ フロログルシノール塩酸液を切片に滴下し、2分以上待つ。
- ⑪ ろ紙の切れ端でフロログルシノール塩酸液を吸い取ってから、純水を滴下し、18mm×18mmのカバーガラスを被せる。
- ⑫ 生物顕微鏡を用いて観察する。横断面がきれいに見えている切片を選び、切片の輪郭に対して道管の位置がわかるようにスケッチする（道管以外の細胞を描く必要はない）。

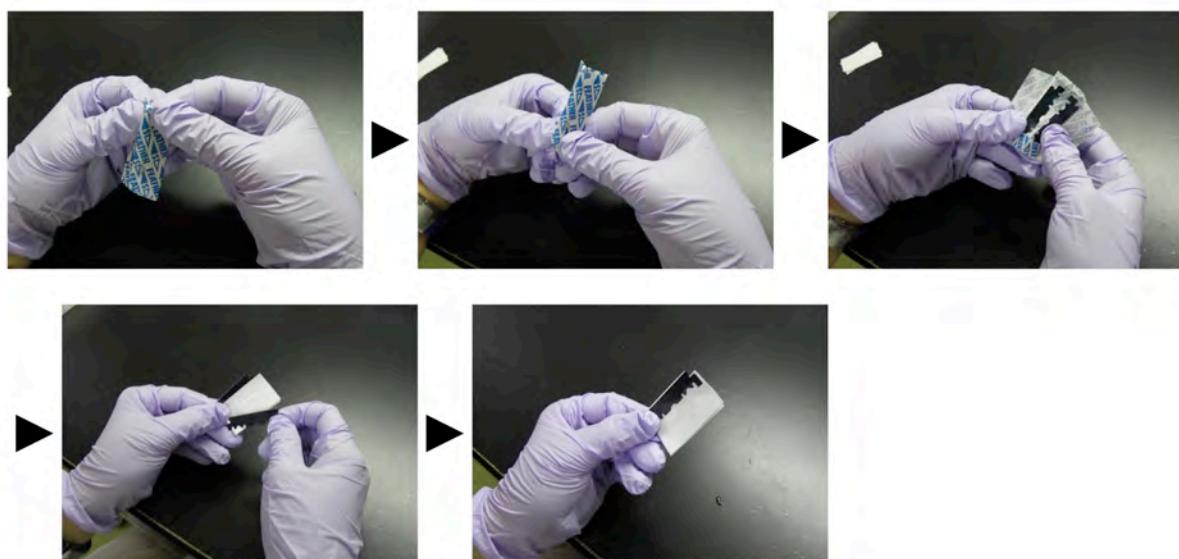


図3. カミソリの準備

問 2.

問 1 の観察結果に基づき、オクラとマカラスムギの根における道管の構成（数や配置）について、簡潔に記述せよ。

問 3.

対照、GlcNAc 添加（終濃度 10 μM）、UDP-GlcNAc 添加（終濃度 10 μM）、PipA 添加（終濃度 10 μM）の各条件で育てたシロイヌナズナの野生型と *lig* 変異体について、以下の手順に従って主根の長さの測定とリグニンの沈着状況の判定を行い、結果を記録せよ。

- ① 8つの円が描かれている長方形シャーレの各円の脇に、試料名を、「PipA 添加_野生型」、「対照_lig」のように、油性マジックペンで書き入れる。油性マジックペンは、配布されたペンケースに入っているものを用いること。
- ② スポイトを用いて、各円内に純水を 0.5~1 ml 程度載せる（この円はシャーレの内側に撥水性の塗料で描かれているので、純水は円内に留まって盛り上がった状態になる）。
- ③ 芽生えを 1 個体ずつ取り、主根がまっすぐになるように長方形シャーレに置いて、主根の長さを物差しで測定し、測定結果を記録する（1 mm 刻みでよい）。物差しは、配布されたペンケースに入っているものを用いること。
- ④ 測定が終わった芽生えは、乾燥しないよう、直ちに長方形シャーレ各円内の純水に移す。
- ⑤ 全種類、全個体の測定が完了すると、長方形シャーレのどの円内でも 4~5 個体の芽生えが純水に浸かった（あるいは浮いた）状態になっているはずである。純水をスポットで吸い取り、残っている純水はろ紙片に吸わせて除去する。このとき、芽生えは重なったり、絡み合ったりしていても構わない。
- ⑥ 各円内の芽生えに、フロログルシノール塩酸液を 3~4 滴滴下して、24 mm × 24 mm のカバーグラスを被せる。以後、長方形シャーレの蓋は閉めない。
- ⑦ 2 分以上待ってから、実体顕微鏡で観察する。
- ⑧ 各試料について、根端部分の赤い呈色の平均的な強さを、「-」、「±」、「+」、「++」の 4 段階で評価し、記録する。なお、対照_lig と同程度の強い呈色を「++」、対照_lig よりは弱いけれども明らかな呈色を「+」、微弱な呈色を「±」、呈色が全く認められない場合を「-」とする。

問 4.

問 3 の結果に基づき、各処理の影響と *lig* 変異の影響について、簡潔に記述せよ。

問 5.

lig 変異体の表現型は、GlcNAc-6-P 生産の低下による UDP-GlcNAc の欠乏に起因する。これを前提とすると、*lig* 変異体に対する GlcNAc 添加の影響と UDP-GlcNAc 添加の影響から、GlcNAc および関連物質の移動・代謝についてどのようなことが推定できるか。

問 6.

一般にリグニンは細胞壁を強化するため、リグニンの過剰な蓄積は細胞壁の伸展を妨げて成長を抑制することになる。*lig* 変異体の成長不全も、同様の理由により、リグニンの異常蓄積が直接の原因になっていると考えてよいか。リグニン生合成阻害剤の PipA を添加した実験の結果から、*lig* 変異体における成長不全とリグニン異常蓄積の因果関係について考察せよ。

日本生物学オリンピック 2018 東京



実験試験 III 分子生物学 問題冊子 (105 分)

- 机には問題冊子(13 ページ)と解答用紙(7 枚)が配布されている。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 問題の全体に目を通してから解答を始めること。
- 実験机の上には、すでに準備されているもの他に、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。

1 実験器具・試薬

試験開始後 5 分間で、以下の実験器具や試薬が揃っているか確認しなさい
(確認できた項目の□に✓を書き入れなさい)。
足りないものがあった場合、挙手をして知らせなさい。5 分後に気づいても、対応しない。

- ピペットマン P-20 このピペットマンの最小容量は 2 μL である。
- ピペットマン P-200 このピペットマンの最小容量は 20 μL である。
- 氷箱
- 直鎖状二本鎖 DNA 溶液 (氷中、フタに D と表記、15 μL 入っている)
- PCR 断片溶液 (氷中、フタに P と表記、青色の溶液、85 μL 入っている)
- 2 倍濃縮 酵素反応溶液 (氷中、フタの支点が黒く塗られた緑色の溶液、16 μL 入っている)
- 超純水 (フタに水と表記、800 μL 入っている)
- 正常対照 (氷中、フタに M と表記、10 μL 入っている)
- 空のチューブ 2 本 (フタに何も書かれていない)^{*1}
- チップ 1 箱
- 使用済チップ・チューブを入れる器
- チューブ立て (超純水などのチューブが既に立っている)
- 電気泳動槽
- アガロースゲル 既に泳動槽にセットされている。
- 泳動バッファー 300 mL
- 手袋^{*2}
- 電卓
- マジック
- 泳動済ゲルを載せるトレー (プラスチックシャーレ)
- 保護眼鏡

^{*1} 予備にするなり練習するなり他の用途にするなり、自由に使いなさい。

^{*2} かゆみやかぶれを感じる人にはビニール手袋を配布するので、申し出ること。

2 注意事項

1. まず、本文全体を通して読み、全体の実験及び解答の計画を練ってから作業に移りなさい。最後に実験する時間が無くなっても、救済措置は無い。
2. 國際単位系の接頭語を表に記した。必要に応じて参考にしなさい。

接頭語	単位	10^n
ミリ (milli)	m	10^{-3}
マイクロ (micro)	μ	10^{-6}
ナノ (nano)	n	10^{-9}
ピコ (pico)	p	10^{-12}

3. 本問において、アボガドロ数は 6.0×10^{23} とする。
4. 本問において、1 塩基対の平均分子量は 660 とする。
5. 『DNA の分子数』という言葉が混乱を招く場合がある。二本鎖 DNA を 1 分子とみなすか、一本鎖 DNA を 1 分子とみなすかで解釈が変化し、前者で 1 分子とみなされたものが後者では 2 分子となってしまうのである。特に断りのない限り、本問においては二本鎖 DNA を 1 分子とみなし、以降の文章を読み進めなさい。
6. 各自の手元にある試薬の再配布は行わないで、問題文を熟読して間違いの無いよう実験を進めること。
7. ピペットマンは高価な実験器具である。許容された範囲を超えて目盛を回すと壊れるので、絶対に行ってはならない。
8. 実験中に各自の実験サンプルを実験補助員に渡す段階が 2 か所ある。問題文中に自分の選手番号や氏名を書くように指示されているので、その都度指示に従うこと。この指示に従わずに身元不明になったサンプルは採点のしようがない。
9. 電気泳動の中には感電に注意すること。泳動槽は安全を確保する構造になっているが、実験する当事者がその仕組みを理解しない限り、不慮の事故はいつでも起こりうる。

3 吸光光度法

3.1 はじめに

溶液中に含まれる DNA の濃度を測定することは、分子生物学実験の中でも基本中の基本の操作である。溶液に溶けている DNA の濃度を測定する実験手法に、吸光光度法がある。ここで緑茶のように、濁らず透明だが色のついた溶液があったとする。透明な容器にこの溶液を入れ、かつ、そこへ光を当てたときを想像してみよう。もし溶液が完全に無色であれば、光は素通りで透過するだろうし、溶液に色がついていれば、その色の濃さに応じて透過光の量は減衰するだろう。

実際には、溶液中に存在する分子に光を当てると、その分子の構造に応じて特定の波長の光が分子に吸収されることが知られている。つまり、ある物質が溶解している溶液中の物質濃度を調べたければ、そこに光を当て、その物質が吸収する特定の波長における入射光の量と透過光の量を比較すれば良いのである。

ここで、溶液にあてる光の強さを I_0 、透過光の強さを I とする。ただし、光の波長と光路長は一定とする。ここで I_0 と I の比を取ると、その値は溶液中の濃度に対して指數関数的に変化することが知られている。従って I_0 と I の比の対数を取り、それを吸光度 (Absorbance, A) と定義すると、吸光度 A はサンプル濃度に対して比例関係にある。

これを数式で表現すると、

$$\text{吸光度 } A = \log \frac{I_0}{I} = (\text{物質に特有の定数}) \times (\text{光路長}) \times (\text{溶液中のサンプル濃度})$$

となる^{*3}。以上のことから、同じ測定容器を使い続ける限り、吸光度は溶液中のサンプル濃度と比例関係にあると理解すれば良い。

DNA が溶解した溶液は人間の目で見ても無色透明のままだが、核酸は 260 nm を最大吸収波長として光を吸収することが知られている。従って溶液中の DNA 濃度を調べたい場合、波長 260 nm の光を照射し、その入射光と透過光の量比を測定することで吸光度を得たのちに、濃度を算出することができる。

^{*3} この関係を Lambert-Beer の法則と呼ぶ。

3.2 実際の吸光度曲線

今回の実験に用いる直鎖状二本鎖 DNA の吸光度測定結果を図 1 に示した。また参考として、一般的なタンパク質の吸光度測定結果を図 2 に示した。

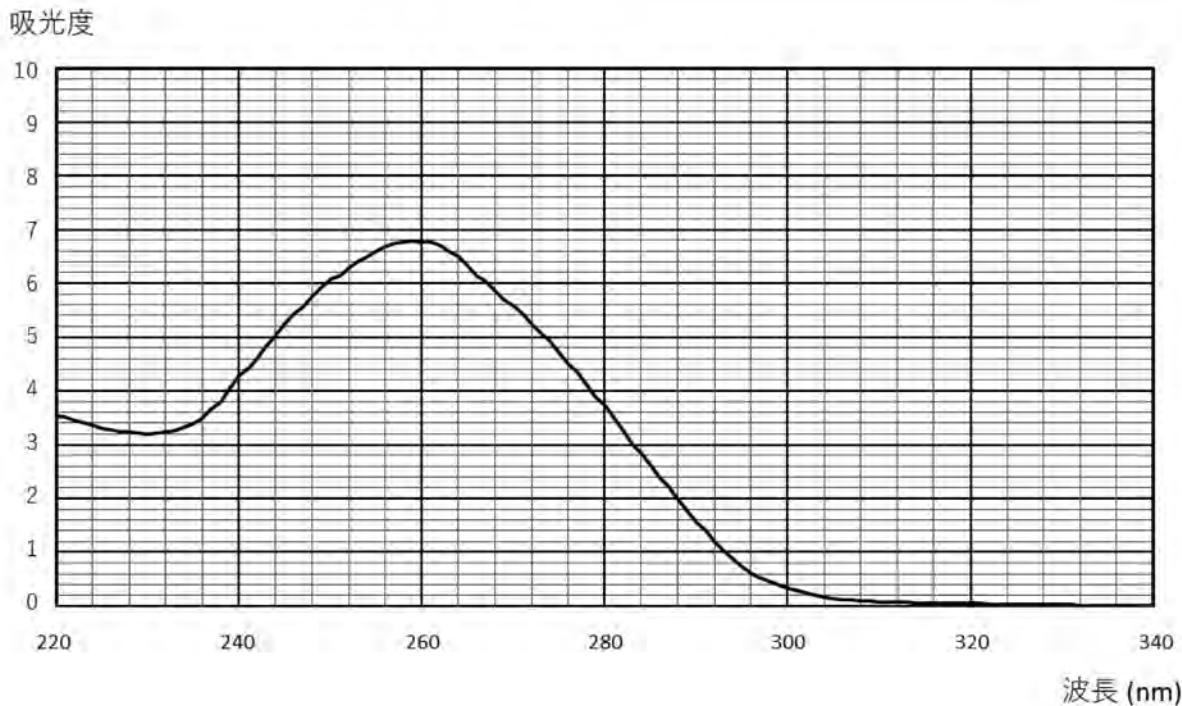


図 1: 今回用いる直鎖状二本鎖 DNA の吸光度測定結果

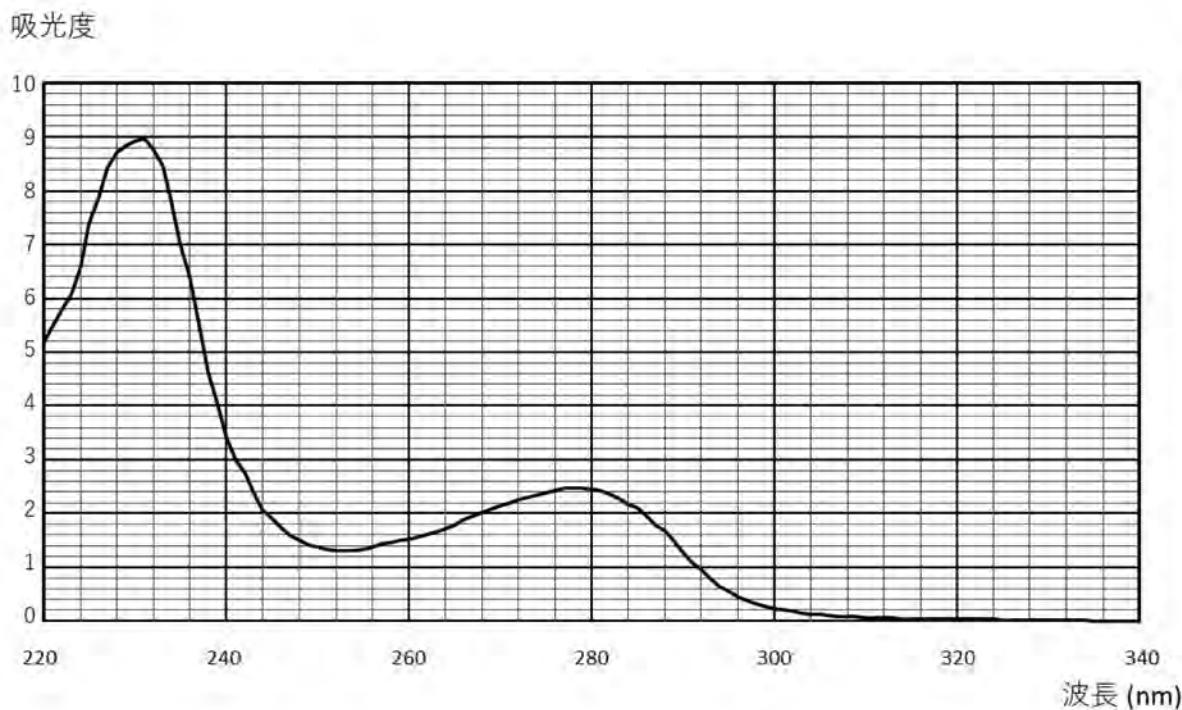


図 2: 一般的なタンパク質の吸光度測定結果

3.3 問題：吸光度から DNA の濃度と純度を算出する

波長 260nm の吸光度が 1.0 のとき、溶液中の二本鎖 DNA 濃度は $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ であることが知られている。このことから、この直鎖状二本鎖 DNA の濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) を求めなさい。答は小数第一位を四捨五入して整数で答えなさい。

また、(波長 260nm の吸光度) \div (波長 280nm の吸光度) を計算し、小数第三位を四捨五入して解答欄に記入しなさい。この値は、核酸の純度を推定する簡便な指標となることが知られている。この値は、一般的に r と呼ばれている。

3.4 問題：DNA の純度に関して考察する

もし核酸溶液にタンパク質が混入していた場合、 r の値はどのように変化するか推定し、論じなさい。

4 DNA を制限酵素処理する

ここで、3.3で濃度を算出した直鎖状二本鎖DNAを実際に制限酵素で切断しよう。制限酵素反応にはDNA、酵素反応溶液(酵素と塩、pH調整剤等が入っている)と超純水が必要である。今回はDNAの終濃度が $125\text{ ng}/\mu\text{L}$ の溶液を $32.0\text{ }\mu\text{L}$ 調製することにする。

4.1 問題：直鎖状二本鎖DNAを制限酵素で切断するために、反応溶液を調製する

まず、反応チューブに加えるDNA、酵素反応溶液(制限酵素添加済)、超純水の容量を解答用紙の表に小数第一位まで記入(少数第2位を四捨五入)しなさい。

次に、一覧表に従って溶液を混合し、反応サンプルを作りなさい。酵素反応溶液(制限酵素添加済)のチューブには、酵素反応溶液(制限酵素添加済)が正確に $16.0\text{ }\mu\text{L}$ 入っている。このチューブに対して他の溶液を加えて混合し、反応サンプルとしなさい。混合後、チューブを上手く振って溶液をチューブの底まで落としなさい。これらの作業を終えたら、チューブのフタに自分の選手番号を書きなさい。チューブのフタに自分の選手番号を書いた後、手を挙げて実験補助員を呼び、サンプルを回収してもらいなさい。実験補助員は君のサンプルを 37°C で10分保温、その後、更に 65°C で10分保温したのちに、君のもとへサンプルを返却する。

5 PCRを行うための実験計画

5.1 PCRの概要

PCR (Polymerase Chain Reaction) は非常に汎用性が高く、現代の生命科学研究に不可欠な実験手法である。この実験の一番の利点は感度が高いことである。数百から数千塩基対のDNA断片を得たい場合、そのDNA断片增幅のための特異的なプライマーと極微量の錆型DNAさえあれば、基本的には任意のDNA断片をPCRによって得ることができる。図3に、PCRの反応サイクルの概要を示す。

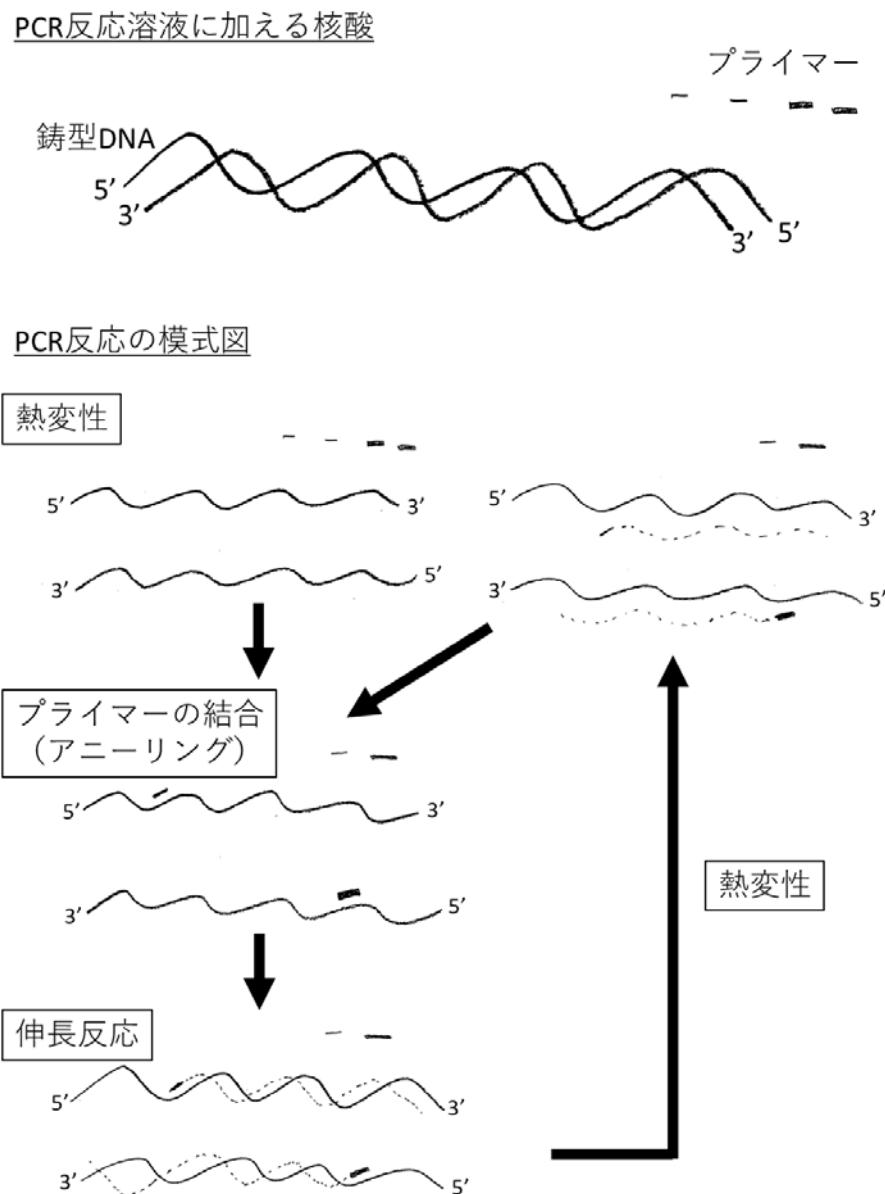


図3: PCRの反応サイクルの概要

5.2 問題：PCR プライマーを設計する

図 4 に、ある原核生物が保持する遺伝子周辺の DNA 配列を示した。この遺伝子から転写・翻訳されるタンパク質は、360 個のアミノ酸によって構成される。この遺伝子の開始コドンから終止コドンまでの DNA 配列を PCR で増幅したい。その際、どのような配列のプライマーを用いれば良いか各自で設計し、解答欄に記入しなさい。なお、設計するプライマーの長さは 18 塩基とする。解答にあたり、塩基配列は左を 5' 側、右を 3' 側として解答欄に記入しなさい。また、遺伝暗号表を掲載するので参考にしなさい。

		2つ目の塩基					
		T	C	A	G		
1 つ 目 の 塩 基	T	TTT TTC TTA TTG	Phe TCC Leu TCG	TAT TAC TAA TAG	Thr TGC 終止 終止	TGT TGC TGA TGG	Cys A Trp
	C	CTT CTC CTA CTG	Leu Pro	CAT CAC CAA CAG	His CGT CGC CGA CGG	Arg	T C A G
	A	ATT ATC ATA ATG		AAT AAC AAA AAG	Asn AGT AGC AGA AGG		T C A G
	G	GTT GTC GTA GTG	Val Ara	GCT GCC GCA GCG	GAT GAC GAA GAG	Gly	T C A G
				Asp Glu	GGT GGC GGA GGG		

また、図 4 に示した塩基配列は転写の結果得られる mRNA と同一の配列 (センス鎖) である。転写の際に錆型となる鎖 (アンチセンス鎖) の配列ではないことに注意すること。

5.3 PCR 断片の濃度を簡便な実験で推測する方法

たいていの場合、PCR の結果得られた DNA 断片の長さを議論することが多い。しかし実際の研究では、PCR 断片の DNA 量 (つまり、溶液中の PCR 断片の濃度) を知ることが必要なときもある。もちろん、先述のように吸光度測定を行えば溶液中の DNA 濃度が判明するが、正確でなくとも良い場合には、濃度既知の DNA サンプルと比較することで、おおよその濃度を見積もることができる。

目に見えない DNA を可視化するために、臭化エチジウムなどの蛍光試薬が用いられる。これらの化合物は DNA の二重らせん構造に入り込み、紫外線照射によって蛍光を発する^{*4}。二重らせん構造が長いほど、もしくは DNA の分子数が多いほど、二重らせん構造に入り込む蛍光試薬の量も多くなる。つまり、DNA を蛍光試薬で染色し、紫外線を照射して可視化した蛍光の強さは、そこに存在する DNA 量に比例するのである。

*4 今回は臭化エチジウムではなく、より安全性が高いといわれる別の蛍光試薬を用いることとする。

5'側

20 40 60
atggtgcaaaaccccttcgcgttatggcatgatagcgccccggaaaggaggatcaattcagggt
80 100 120
ggtaatatgaaaccagtaacgttatacgtatgtcgccagatgtccggtgtctcttatca
140 160 180
gaccgtttcccgcgtggtgaccaggccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagt
200 220 240
ggaaggcggcgatggcggagctgaattacattccaaaccgcgtggcacaacaactggcggg
260 280 300
caaacagtcgttgctgattggcggttgcacccactccagtcgtggccctgcacgcggcgtcgca
320 340 360
aattgtcgccgcattaaatctcgccgcataactgggtgccagcgtgggtcgat
380 400 420
ggtagaacgaagcggcgtcgaaggcctgtaaaggcgccgtgcacaatcttcgcgcac
440 460 480
cgtcagtggtgatcattaaactatccgcgtggatgaccaggatgcattgtgtggaaagc
500 520 540
tgccctgcactaatgttccggcggttatttcttgcgttgcaccagacaccatcaac
560 580 600
tattattttctccatgaagacggtacgcgactggcggtggagcatctggtcgcattgg
620 640 660
tcaccagcaaatcgccgtgttagcgggcccattaagttctgcggcggtctgcgtct
680 700 720
ggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggAACGGGAAGG
740 760 780
cgactggagtgccatgtccggttttcaacaaccatgcggatgcgtgatggggcatcgt
800 820 840
tcccactgcgatgtgggttgcacatcagatggcgctggcgcaatgcgcgcattac
860 880 900
cgagtccggctgcgcgttgcggatatactcggttagtggatacgacgataccgaaaga
920 940 960
cagctcatgttatatccgcgttaaccaccatcaacagggatttcgccctgtggggca
980 1,000 1,020
aaccagcgtggaccgccttgcacttcggatctcaggggccaggcggtgaaggggcaat
1,040 1,060 1,080
gttgcggctctcactgggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgc
1,100 1,120 1,140
tccccgcgcgttggccgatttattaaatgcggatgcacgcagggttccgactggaaag
1,160 1,180
cgggcagtgagcgcacgcattaaatgtgagttgcactcattag

3'側

図 4: ある原核生物が保持する遺伝子周辺の DNA 配列

6 制限酵素による DNA の切断と電気泳動

5.2 で設計したプライマーを用いて得られた PCR 断片のおおよその濃度を、3.2 で濃度決定した直鎖状二本鎖 DNA を用いて求めたい。そのために、以下の実験を考えた。

3.3、4.1 で用いた直鎖状二本鎖 DNA の制限酵素地図を図 5 に示した。図中に、制限酵素で切れる位置が数字で示してある。この制限酵素反応済みの DNA を電気泳動に供する。その際、流す DNA の量を何通りか段階的に変化させ、それを並べて電気泳動することを考える。かつ、同じアガロース ゲルの別の穴に濃度未知の PCR 断片を注ぎ入れ、一緒に電気泳動を行うという実験計画である。

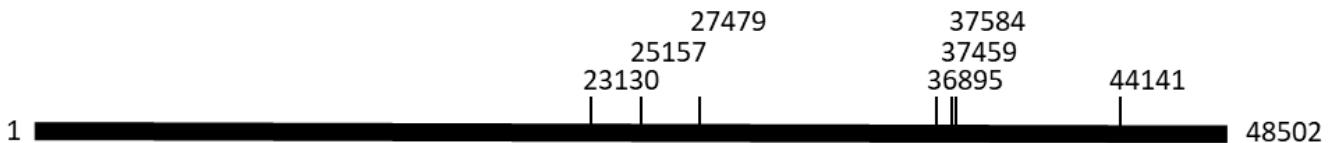


図 5: 電気泳動に供する直鎖状二本鎖 DNA の制限酵素地図

6.1 制限酵素処理した直鎖状二本鎖 DNA の電気泳動結果を予測する

6.1.1 問題：制限酵素反応によって得られる DNA 断片の数と、その長さを計算する

4.1 の制限酵素反応によって、何通りの DNA 断片が得られるだろうか。また、各々の DNA 断片の鎖長はどうなるであろうか。長い順に並べ直し、一覧表にして記入しなさい。ただし、今回の制限酵素反応によって DNA は完全に反応したものとする^{*5}。

6.1.2 問題：制限酵素反応によって得られる DNA 断片の電気泳動結果予測

6.1.1 の答に従い、直鎖状二本鎖 DNA 制限酵素反応済サンプルの電気泳動で得られるバンドパターンを予測したい。解答欄に従い、6.1.1 の断片長を縦軸とした図を作成しなさい。

^{*5} つまり、部分消化はなかったものとする。

6.2 DNA をアガロース電気泳動にかける

6.2.1 問題：加える直鎖状二本鎖 DNA の容量を計算する

制限酵素反応サンプルには、既にローディングバッファーが入っている^{*6}。このサンプルから適量取り、アガロースゲルの穴^{*7}に以下の量の DNA が注ぎ込まれるようにしなさい。順番は左から以下の通りである。図 6 を参考にしなさい。なお、この時点で 5 番目以降の穴が余るが、それで良い。

1. 正常対照 ($10 \mu\text{L}$ 、チューブ内の溶液を全量加えなさい)
2. 500 ng の DNA
3. 1000 ng の DNA
4. 2000 ng の DNA

まず、実際に各々何 μL 取って注ぎ入れれば良いか計算し、解答欄に記入しなさい。

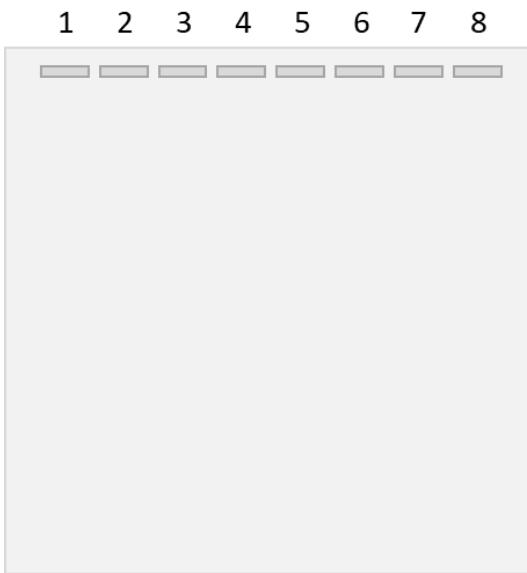


図 6: アガロースゲル 穴を上にして、左から順番に穴を数える。

6.2.2 問題 PCR 断片の泳動計画を立てる

今回の PCR では、 $200 \mu\text{L}$ の反応液中にそれぞれ 10 ng のプライマーを加えて反応させた。PCR サンプルはひとつの穴あたり何 μL 加えれば良いだろうか。余った穴は自由に使って良い。電気泳動実験の計画を立て、思考の過程が分かるように解答用紙に記入しなさい。

今回の PCR サンプルは、PCR 後にローディングバッファーを加えた状態で提供されている^{*8}。上記の計算の際、今回は加えたローディングバッファーの量を無視して良い。また、穴に入る液体の容量には上限がある。 $20 \mu\text{L}$ 注ぎ入れようとした場合、あふれ出る可能性がある。

*6 つまり、このまますぐに電気泳動に用いることができる

*7 専門的には「ウェル」と呼ぶ。

*8 つまり、この状態ですぐに電気泳動に用いることができる

6.2.3 実際に電気泳動をおこなう

実際に操作する際には、電気泳動装置の構造を良く理解して安全を心がけなさい。アガロースゲルは既に電気泳動装置にはめ込まれている。そこへ上からゆっくりと泳動バッファーを全て注ぎ込みなさい。泳動装置とゲルとの間に空気が入ることがあるが、その時は工夫して空気を追い出しなさい。泳動バッファーがゲル表面まで浸っていることを確認しなさい。

全てのサンプルを計画通りに注ぎ込み、かつ、全ての準備と配線を済ませてから、通電時の電圧を100Vに設定し、電気泳動装置のスイッチをONにして電気泳動を行なさい。電気泳動の通電時間は、だいたい30分程度だと見込まれる。サンプルバッファーの黄色がゲルの半分に達したことを確認したら、電気泳動を止めなさい^{*9}。それと前後して、プラスチックシャーレの縁に自分の選手番号と名前（カタカナ）をマジックで記入しておきなさい。

手袋をした手を使ってゲルを泳動槽から取り出し、ゲルの型枠ごとプラスチックシャーレに乗せなさい。そこまで出来たら、周囲の実験補助員に挙手で合図しなさい。実験補助員が写真を撮影してくれる。撮影後の写真を実験補助員から受け取りなさい。

^{*9} 本来は黄色が全体の4/5程度に達するまで通電する場合が多い。従って、ちょうど半分ということにこだわる必要は無い。また、時間の都合で半分に達していないくとも写真撮影自体は可能である。しかし通電時間が短いとDNAの分離が不明瞭になる可能性もあるので、この場合は自己責任である

7 電気泳動の結果から、PCR 断片の濃度を見積もる

7.1 問題：濃度未知の PCR 断片の濃度を見積もる

電気泳動の結果の写真を観察し、濃度未知の PCR 断片の濃度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) を見積りなさい。また、最初のチューブに入っていた PCR 断片の量 (μg) を求めなさい。思考過程や計算の過程も記入しなさい。

7.2 問題：PCR のサイクル数を算出する

今回の PCR 反応で、最初の反応溶液には鋳型となる二本鎖 DNA が 10 分子存在していたとする。最初のチューブに入っていた PCR 断片の量 (μg) を得るのに、理想的な環境下で PCR の反応サイクルは最低でも何回必要か計算し、整数で答えなさい。

以上、問題終わり

日本生物学オリンピック 2018 東京



実験試験IV 系統学 問題冊子 (105分)

- 机には、問題冊子（7ページ）と解答冊子（6ページ），計算用紙（1枚）が配布されている。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 問題は問1 から問7 まである。全体に目を通してから解答を始めること。
- 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A-I (A, E, Hはプリント)
- スライドガラス 5 枚
- 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

注意事項

- ・ 試験開始後、上記リストにある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。
- ・ サンプルA-Iが欠番なく入っているか確認すること。
- ・ 試験中に実体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。

以下の文を読んで問1から問7の問題に答えなさい。

はじめに

【文1】 形態学的あるいは分子系統学的さまざまな証拠により陸上植物の直系の祖先群はシャジクモ藻綱であることが明らかになってきた。植物は、水中生活をしていた祖先から、陸上生活に適応したさまざまな構造を新たに進化させてきた。このような構造的な新規性がどのような植物に存在するかを調べることにより、植物のたどつてきた進化の道筋、すなわち系統関係を推定する事が可能となる。

【文2】 分岐学と呼ばれる方法では、祖先共有を基準として系統を推定する。この方法論を用いて、祖先種とそのすべての子孫が含まれている群、すなわちクレードに種を配置していく。クレードは、分類学における階層構造のように、より大規模なクレード内に入れ子構造をとる。

具体的な系統推定法としては、以下のような方法をとる。

1. 系統解析に使用する形質を複数選択し、それぞれの形質状態を各分類群において観察する。
2. 各形質で見られた形質状態に関し、どの形質状態が祖先的であり、どれが派生的かを決定する。この形質進化方向の決定には外群比較が有用である。
3. 各形質において、派生的な形質状態を共有する分類群をまとめていく。
4. 3で見いだした派生形質を共有するグループがまとまるように系統樹に変換していく。
5. 4のステップにおいて、派生形質を共有するグループのまとめ方が、形質によって競合する場合は、それぞれ形質のまとめを重視した複数の系統樹を作成し、形質変化の回数のより少ない系統樹を採用する。

問1 系統解析には外群の選択が重要である。今回の陸上植物の系統推定において、外群はどれか、A～I の記号で答えなさい。

問2 配布されたサンプル D の雌の生殖器官の縦断面をスケッチし、以下の器官名を入れなさい。

珠皮、珠孔

問3 サンプル D の雄・雌の生殖器官を観察した結果、この植物は以下のどの分類群

に属するものであるか、番号で答えなさい。また、判断に至った理由を述べなさい。

1. コケ植物
2. シダ植物
3. 裸子植物
4. 被子植物

問4 配布されたサンプルFの花の縦断面をスケッチし、以下の器官名を入れなさい。
ただし該当しないものは名前を入れないこと。

ガク片、花弁、雄蕊、心皮、柱頭、花柱、薬、花糸、胚珠

問5 配布されたサンプルGの1つの花をスケッチし、各器官名を入れなさい。器官名は問4の選択肢の中から使用すること。

問6 配布された各サンプルの生殖器官などを観察して、解答用紙の表の形質(1)-(11)について空欄を埋めなさい。ただし対象器官などを持たないため、当てはまらない場合は - を記入すること。また、配布のサンプルでは観察できない形質については、あらかじめ表中に記入してある。

問7 問6で作成した形質の表に基づき、最節約法による系統樹を作成せよ。また、それぞれの形質の変化がどこで起きたかを(1)-(11)の番号で系統樹上に示しなさい。

参考：配布サンプル名と問6で使用する表。

配布サンプル

A	シャジクモ(印刷物)
B	ヒメツリガネゴケ
C	ノキシノブ
D	イチョウ
E	アンボレラ(印刷物)
F	ユリ属の1種
G	キク属の1種
H	タガラシ(印刷物)
I	アキギリ属の1種

問6の表

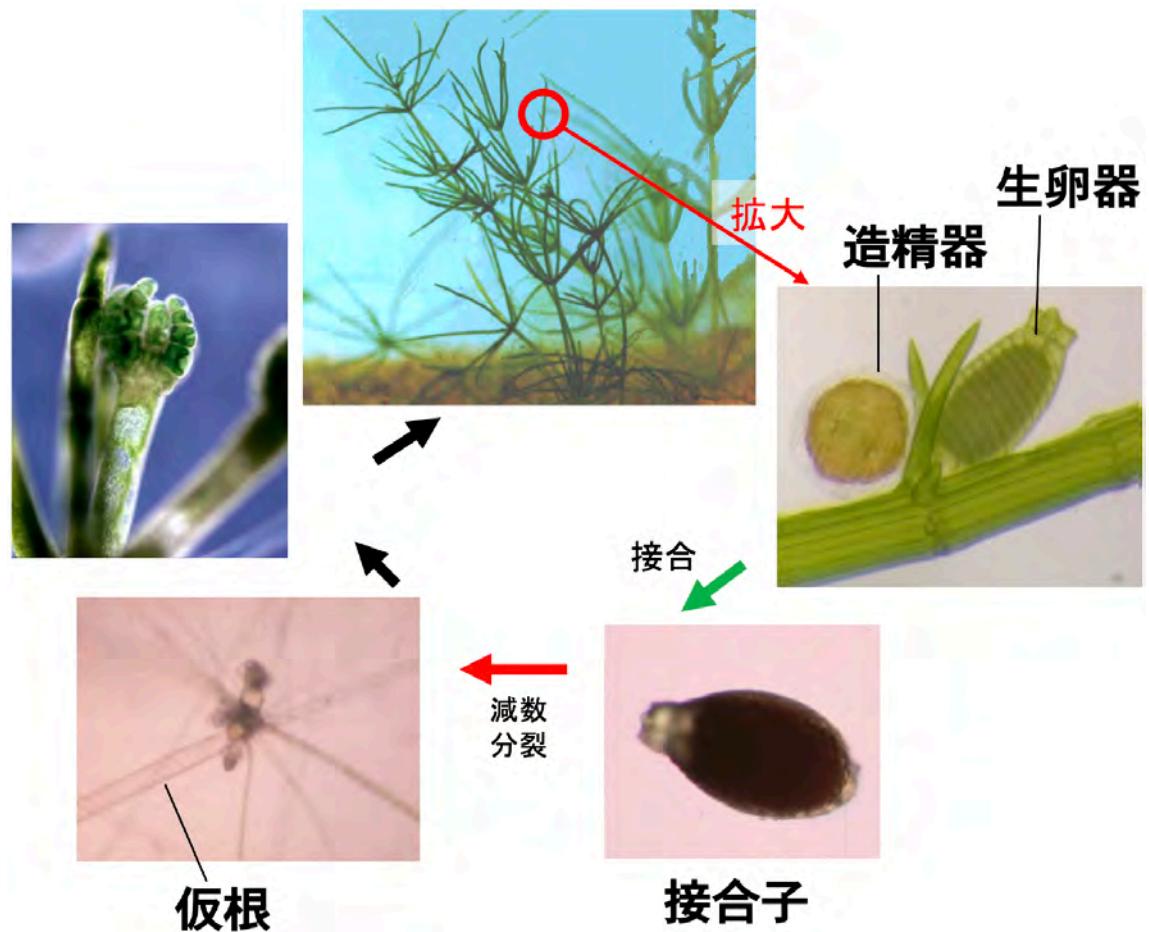
番号 形質	(1) 花を持つ	(2) 花被 ^{注1} が 明確に分化	(3) 花被 ^{注1} の数性	(4) 合弁か 離弁か	(5) 子房が離生 か合生 ^{注2} か	(6) 花粉の発 芽溝の数	(7) 胚珠	(8) 道管	(9) 維管束	(10) 胞子	(11) 生活 の場
A						-		なし	なし	-	水中
B						-		なし			陸上
C						-		なし			陸上
D						1		なし			陸上
E		未分化				1		なし	あり		陸上
F						1		あり			陸上
G					合生	3		あり			陸上
H						3		あり	あり		陸上
I						3		あり			陸上

注1：花被とは、花弁およびガク片のことを指し、花弁とガク片が未分化の花もある。

注2：合生子房とは、複数枚の心皮で構成される子房である。

A

カタシャジクモ *Chara globularis*



カタシャジクモの生活環

E

アンボレラ *Amborella trichopoda*



A: 雄花, B: 雌花 (走査電顕), C: 雄花 (走査電顕), D: 雌しづいの縦断面、E: 雌花, F: 雄花, G: 植物全体。 A-D は Endress and Doyle 2015 を改変

H

タガラシ *Ranunculus sceleratus*



<https://ja.wikipedia.org/wiki/タガラシ> より