

国際生物学オリンピック訓練実習（第2次試験）

実習①「生物多様性」

指導責任者：長谷川 雅美 生物学科助教授

- Task 1 アメリカザリガニの付属肢を解剖し、その機能を明らかにする
(制限時間 45分)
- Task 2 ガザミの付属肢をアメリカザリガニと比較し、相同器官の対応を
明らかにする
(制限時間 45分)
- Task 3 動物の分類群とその住み場所に関する基礎知識
(制限時間 20分)

東邦大学理学部 生物学科

実習「生物多様性：動物の形態と分類」

Laboratory<<BIODIVERSITY:ANIMAL MORPHOLOGY AND SYSTEMATICS>>

分類学は地球上に存在する多様な生命体を種という単位で認識・記載し、それを進化という枠組みで体系立てることを目的とした生物学の一分野です。そのため、生物と環境の関係を明らかにする生態学、あるいは様々な生理機能の種間比較から生物学的機能の進化を研究する比較生理学など、分類学の成果を利用するさまざまな学問分野にとって、分類学は基礎学問とみなすことができます。また、分類学は、それ自体で進化という視点で生物の多様性を体系化するという、自立した目標を掲げています。この実習では、節足動物の形態を観察し、その機能を考察することを通じて、生物多様性について学びます。

この課題実習①「生物多様性：動物の形態と分類」では、以下に示す3つの実技試験とトレーニングを行います。

課題1 アメリカザリガニの付属肢を解剖し、その機能を明らかにする

課題2 ガザミの付属肢をアメリカザリガニと比較し、相同器官の対応を明らかにする

課題3 動物の分類群とその住み場所に関する基礎知識のテスト

トレーニング1：検索表によって陸生甲殻類を分類する（採点の対象とはしません）

節足動物は、体表を被う外骨格が多数の節で連結し、いわゆる体節構造を示します。この体節には1対の付属肢がついていて、体の位置(頭部、胴部、腹部)によって、感覚器官、摂食器官、運動器官などの機能を果たすように分化しています。アメリカザリガニとガザミはともに甲殻綱に属していますが、外見は全体的に異なります。アメリカザリガニは細長い体型で、淡水中の泥底で、体を前後に動かして移動します。一方、ガザミは非常に平らな体型をして海水の砂泥底に潜み、時に水中を遊泳します。外形の相違とは異なり、甲殻類に属するこの2種は、体節の構造やその数、付属肢の数は基本的に同じです。このような共通性は、祖先を共有することによって分かち持つ性質であり、その器官は互いに相同であるといえます。外見の相違と共通性を観察することで、祖先から受け継いだ形質と現在の生活環境への適応による特徴は何か、を把握するのが課題1と2のテーマです。

課題3は、動物の分類群に関する基礎知識の確認、トレーニング1は検索表を用いた生物分類の実作業がテーマです。生物の分類群を正しく認識し、種を正確に同定することは全ての生物学の基礎となりますので、慎重に取り組んで下さい。解答は、解答用紙の所定の場所に記入してください。実習が終わったら、動物資料と実習用具を元の場所に戻して下さい、動物標本が破損していた場合には申し出て下さい。標本を交換することができます。

課題1 アメリカザリガニの付属肢を解剖し、その機能を明らかにする

材料、器具、設備

1. アメリカザリガニ (雄)
2. 器具一式 (ピンセット2本、ハサミ、外科用メス、解剖針、シャーレ)
3. 解剖皿、ルーペ
4. キムワイプ
5. ゴム手袋
6. 1から18まで番号をふったピン
7. 台紙 (スチレンボード)

アメリカザリガニについて

北アメリカが原産で、日本には大正時代に持ち込まれ、水田や池など止水環境で大繁殖している淡水性甲殻類です。メスは大型 (直径2mmほど) の卵を産み、孵化するまで腹部に抱えています。プランクトン幼生の時期を持たずに、稚エビの姿で孵化します。水底の泥の上を歩行し、逃走時には腹部を用いて後方へ素速く遊泳して逃げます。

観察の仕方と課題の内容

解剖を始める前に、アメリカザリガニの体全体を体節構造に注意して詳しく観察しなさい。それから、体の一方の側から付属肢を全て取りはずしなさい。その際、2対ある触角の内2番目のものから取りはずすこと (1番目の触角ははずさずに残しておく)。はずした付属肢を白いウレタンの板の上に置き、体の前方から順番に並べ、順番と同じ番号付きのピンでマークしなさい。

作業手順

1. ザリガニを手に持ち、腹側を上にする。手にはゴム手袋をはめ、ザリガニを素手で直接さわらないようにする。ルーペを用いて、付属肢の付き方をくわしく観察する。
2. ピンセットあるいは、小型のハサミを用いて、体の一方の側から全ての付属肢をはずしなさい。付属肢の基部をピンセットでつまみ、関節部分をハサミで切り開くようにしてザリガニの体から取りはずす。
3. 取りはずした付属肢を、再構成する。白いウレタンの板の上に付属肢を置き、体の前方から正しい順番に並べ、順番と同じ番号付きのピンでマークしなさい。

解答方法と採点基準

- 1) アメリカザリガニの付属肢を正確に全て取り外し、それを正しい順番に並べる。
- 2) 取りはずす過程で付属肢の形が分からなくなるぐらいに破損してしまった場合は、採点不可 (ゼロ点) とする。
- 3) 18対の付属肢について、次ページにその機能を答える表がある。付属肢ごとに3つの機能が示されているので、この選択肢から機能として正しいものを選びマークする。

解答用紙：正しいと判断した機能の○を黒く塗りつぶしなさい。氏名

番号	機	能	
1.	☐ 感覚	☐ 呼吸	☐ 繁殖
2	☐ 遊泳	☐ 餌の粉碎	☐ 呼吸
3	☐ 食物を口へ運ぶ	☐ 呼吸	☐ 繁殖
4	☐ 繁殖	☐ 食物を口へ運ぶ	☐ 感覚
5	☐ 食物を口へ運ぶ	☐ 歩行	☐ 防衛と攻撃
6	☐ 防衛と攻撃	☐ 食物を口へ運ぶ	☐ 繁殖
7	☐ 繁殖	☐ 遊泳	☐ 呼吸
8	☐ 遊泳	☐ 餌の捕獲と保持	☐ 繁殖
9	☐ 繁殖	☐ 呼吸	☐ 防衛と攻撃
10	☐ 繁殖	☐ 歩行	☐ 感覚
11	☐ 繁殖	☐ 食物を口へ運ぶ	☐ 歩行
12	☐ 歩行	☐ 餌の粉碎	☐ 感覚
13	☐ 歩行	☐ 繁殖	☐ 防衛と攻撃
14	☐ 歩行	☐ 呼吸	☐ 繁殖
15	☐ 防衛と攻撃	☐ 遊泳	☐ 歩行
16	☐ 遊泳	☐ 餌の粉碎	☐ 呼吸
17	☐ 繁殖	☐ 感覚	☐ 遊泳
18	☐ 遊泳	☐ 食物を口へ運ぶ	☐ 呼吸

課題2 ガザミの付属肢をアメリカザリガニと比較し、相同器官の対応を明らかにする

材料、器具、設備

1. ガザミとその付属肢一式（取りはずし、大型シャーレに保存してある）
2. 器具一式（ピンセット2本、ハサミ、外科用メス、解剖針、シャーレ）
3. 解剖皿、ルーペ
4. キムワイプ
5. ゴム手袋
6. 台紙（スチレンボード）
7. 番号付きピン

ガザミについて

海性甲殻類。普段は砂、泥の海底に生息しているが、海水中を遊泳することがある。メスは小型（直径1mm以下）の卵を大量に産み、孵化した幼生はプランクトンとなり、変態して稚ガニとなって砂泥底に定着する。

観察の仕方と課題の内容

ガザミとアメリカザリガニは同じ十脚目の甲殻類に属し、体節構造と付属肢の数は同じですが、生息環境の違いから各付属肢の形態と機能が異なります。まず、ガザミの体全体を体節構造に注意して詳しく観察しなさい。シャーレの中には、すでに体の一方の側から取りはずした付属肢が入っています。それを取り出して、アメリカザリガニの付属肢と対応するように、体の前方から順番に並べなさい。この課題によって、付属肢の基本構造と機能に応じた変化を学びます。

作業手順

1. ガザミを手に持ち、腹側を上にする。手にはゴム手袋をはめ、ガザミを素手で直接さわらないようにする。ルーペを用いて、付属肢の付き方をくわしく観察する（5分間のみ）。観察時間が終わったら、一旦ガザミは回収します。
2. 付属肢を容器から取り出し、白いウレタンの板の上に付属肢を置き、体の前方から正しい順番に並べ、アメリカザリガニの付属肢に対応する付属肢に対して、同じ番号付きのピン（アメリカザリガニで用いたピンをここで再利用する）でマークしなさい。
3. 1. で観察したガザミを解剖して、付属肢の順番を確認しなさい。その上で、各付属肢の機能を、対応する記号で示しなさい。

解答方法と採点基準

- 1) ガザミの付属肢をアメリカザリガニの付属肢と正しく対応させることができる。
- 2) アメリカザリガニの付属肢に対応しながら、付属肢の番号とその機能を解答用紙に記入する。
- 3) 動物の体の左右を判定できる。

解答用紙 氏名 _____

ガザミの付属肢とその機能（シャールレに入っていた付属肢の番号に対応する○を黒く塗りつぶしなさい）。その付属肢の機能を、選択肢から選びその記号を下の表の該当する欄に記入しなさい。

番 号	機 能	左右性
1 ○		
2 ○		
3 ○		
4 ○		
5 ○		
6 ○		
7 ○		
8 ○		
9 ○		
10 ○		
11 ○		
12 ○		
13 ○		
14 ○		
15 ○		
16 ○		
17 ○		
18 ○		

付属肢の機能

- A: 感覚
- B: 呼吸
- C: 繁殖
- D: 遊泳
- E: 餌の粉碎
- F: 食物を口へ運ぶ
- G: 歩行
- H: 防衛と攻撃
- I: 餌の捕獲と保持

課題3 動物の分類群とその住み場所、食性に関する基礎知識

次のページに、10 種類の動物が描かれており、それぞれにローマ数字がふられている。下の表には、動物の門(A-K)、亜門(a-k)、属(1-10)が示されている。

解答用紙に、描かれている動物の門、亜門、属が正しく対応するように表を完成させなさい。

Phylum 門	Subphylum/Class 亜門/綱	Genus 属
A. Annelida 環形動物門	a. Anthozoa 花虫綱	1. <i>Araneus</i> コガネグモ属
B. Arthropoda 節足動物門	b. Cephalopoda イカ綱	2. <i>Asterias</i> マヒトデ属
C. Chordata 脊索動物門	c. Chelicerata 鋏角亜門	3. <i>Corallium</i> アカサング属
D. Cnidaria 刺胞動物門	d. Crustacea 甲殻綱	4. <i>Cyclops</i> ケンミジンコ属
E. Echinodermata 棘皮動物門	e. Hydrozoa ヒドロ虫綱	5. <i>Fasciola</i> カンテツ属
F. Mollusca 軟体動物門	f. Insecta 昆虫綱	6. <i>Hydra</i> ヤマトヒドラ属
G. Nematoda 線形動物門	g. Polychaeta 多毛綱	7. <i>Locusta</i> トノサマバッタ属
H. Platyhelminthes 扁形動物門	h. Scyphozoa 鉢虫綱	8. <i>Musca</i> イエバエ属
I. Porifera 海綿動物門	j. Asteroidea ヒトデ綱	9. <i>Nereis</i> フツウゴカイ属
J. Protozoa 原生動物	k. Trematoda 吸虫綱	10. <i>Sepia</i> コウイカ属

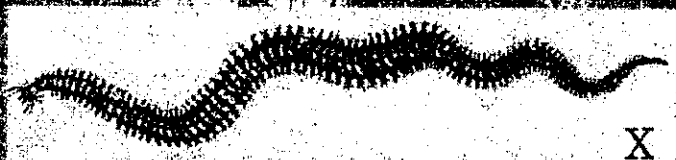
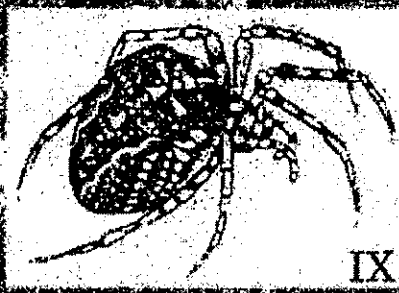
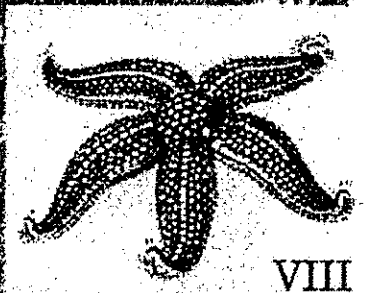
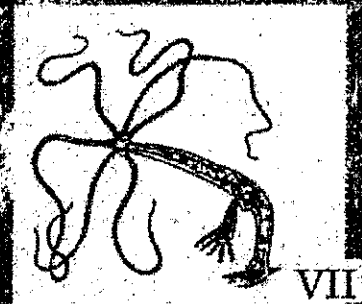
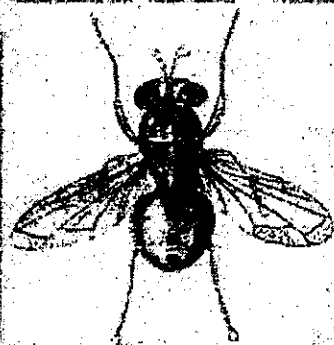
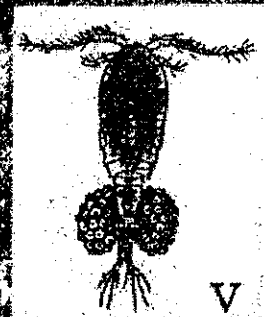
住み場所の記号

アー陸上

イー淡水

ウー海洋

エー動物の体内



解答用紙 氏名 _____

生物 / 分類階級	門	亜門/綱	属	住み場所
I				
II				
III				
IV				
V				
VI				
VII				
VIII				
IX				
X				

課題1．解答 アメリカザリガニ（オス）の節と肢の関係と機能

節番号	機能	体の部分	肢	脚の通称名
1	● 感覚	頭部	第一頭肢	第一触角
2	1 ● 感覚	頭部	第二頭肢	第二触角
3	2 ● 餌の粉碎	頭部	第三頭肢	大顎（おおあご）
4	3 ● 食物を口へ運ぶ	頭部	第四頭肢	第一小顎
5	4 正解なし	頭部	第五頭肢	第二小顎
6	5 正解なし	胸部	第一胸肢	第一顎脚
7	6 正解なし	胸部	第二胸肢	第二顎脚
8	7 ● 呼吸	胸部	第三胸肢	第三顎脚
9	8 ● 餌の捕獲と保持・呼吸	胸部	第四胸肢	第一歩脚
10	9 ● 歩行・呼吸	胸部	第五胸肢	第二歩脚
11	10 ● 歩行・呼吸	胸部	第六胸肢	第三歩脚
12	11 ● 歩行・呼吸	胸部	第七胸肢	第四歩脚
13	12 ● 歩行	胸部	第八胸肢	第五歩脚
14	13 ● 繁殖	腹部	第一腹肢	第一遊泳脚
15	14 ● 繁殖	腹部	第二腹肢	第二遊泳脚
16	15 ● 遊泳	腹部	第三腹肢	第三遊泳脚
17	16 ● 遊泳	腹部	第四腹肢	第四遊泳脚
18	17 ● 遊泳	腹部	第五腹肢	第五遊泳脚
19	18 ● 遊泳	腹部	第六腹肢	尾翼
20		腹部	なし	なし

課題2. 解答 ガザミ（メス）の付属肢とその機能

体節の 番号		番号 *	機 能	体の部分	脚の通称名
1	○		A: 感覚	頭部	第一触角
2	○	1	A: 感覚	頭部	第二触角
3	●	2	E: 餌の粉碎	頭部	大顎
4	●	3	F: 食物を口に運ぶ	頭部	第一小顎
5	●	4	B: 呼吸	頭部	第二小顎
6	●	5	B: 呼吸・F: 食物を口に運ぶ	胸部	第一顎脚
7	●	6	B: 呼吸・F: 食物を口に運ぶ	胸部	第二顎脚
8	●	7	B: 呼吸・F: 食物を口に運ぶ	胸部	第三顎脚
9	●	8	I: 餌の捕獲と保持・ H: 防衛と攻撃	胸部	第一歩脚（缺脚）
10	●	9	G: 歩行	胸部	第二歩脚
11	○	10	G: 歩行	胸部	第三歩脚
12	○	11	G: 歩行	胸部	第四歩脚
13	●	12	D: 遊泳	胸部	第五歩脚
14	●	13	C: 繁殖	腹部	第一腹肢
15	○	14	C: 繁殖	腹部	第二腹肢
16	○	15	C: 繁殖	腹部	第三腹肢
17	○	16	C: 繁殖	腹部	第四腹肢
18	○			腹部	なし
19	○			腹部	なし
20	○			腹部	なし

* 課題1で、アメリカザリガニの付属肢につけた番号に対応するガザミの付属肢（あらかじめ体から取りはずしておいたもの）に付与した番号。

* ●は、あらかじめ取りはずしておいたガザミの付属肢

A: 感覚

B: 呼吸

C: 繁殖

D: 遊泳

E: 餌の粉碎

F: 食物を口へ運ぶ

G: 歩行

H: 防衛と攻撃

I: 餌の捕獲と保持

課題3. 解答 動物の分類群とその住み場所

生物 階級	分類	門	亜門/綱	属	住み場所
I		B Arthropoda 節足動物門	f. Insecta 昆虫綱	7. <i>Locusta</i> トノサマバッタ属	アー陸上
II		F Mollusca 軟体動物門	b. Cephalopoda イカ綱	10. <i>Sepia</i> コウイカ属	ウー海洋
III		D Cnidaria 刺胞動物門	a. Anthozoa 花虫綱	3. <i>Corallium</i> アカサンゴ属	ウー海洋
IV		H Platyhelminthes 扁形動物門	k. Trematoda 吸虫綱	5. <i>Fasciola</i> カンテツ属	エー動物の 体内
V		B Arthropoda 節足動物門	d. Crustacea 甲殻綱	4. <i>Cyclops</i> ケンミジンコ属	イー淡水
VI		B Arthropoda 節足動物門	f. Insecta 昆虫綱	8. <i>Musca</i> イエバエ属	アー陸上
VII		D Cnidaria 刺胞動物門	e. Hydrozoa ヒドロ虫綱	6. <i>Hydra</i> ヤマトヒドラ属	イー淡水
VIII		E Echinodermata 棘皮動物門	j. Asteroidea ヒトデ綱	2. <i>Asterias</i> マヒトデ属	ウー海洋
IX		B Arthropoda 節足動物門	c. Chelicerata 鋏角亜門	1. <i>Araneus</i> コガネグモ属	アー陸上
X		A Annelida 環形動物門	g. Polychaeta 多毛綱	9. <i>Nereis</i> フツウゴカイ属	ウー海洋

国際生物学オリンピック訓練実習（第2次試験）

実習 ②「生体防御」

指導責任者：丹羽 和紀 生物学科講師

Task 1 貪食細胞の観察と同定。
(制限時間50分)

Task 2 抗原抗体反応による毒素中和反応。
(制限時間80分)

東邦大学理学部 生物学科

生体防御

(異物の処理)

[目的]

生体内に異物（抗原）が侵入した際、食作用を有する白血球は異物まで遊走してこの異物を貪食し、消化を行う。さらに、この異物の消化断片を細胞膜表面に露呈させ、異物が侵入したことを伝達する。この抗原と特異的に反応するBリンパ球が活性化し、抗体産生能力を有する形質細胞に分裂、分化する。その結果、この抗原に特異的に反応する抗体が産生され、抗原抗体反応により異物の無毒化や除去が行われる。

本実習では以下の2項目について行う。

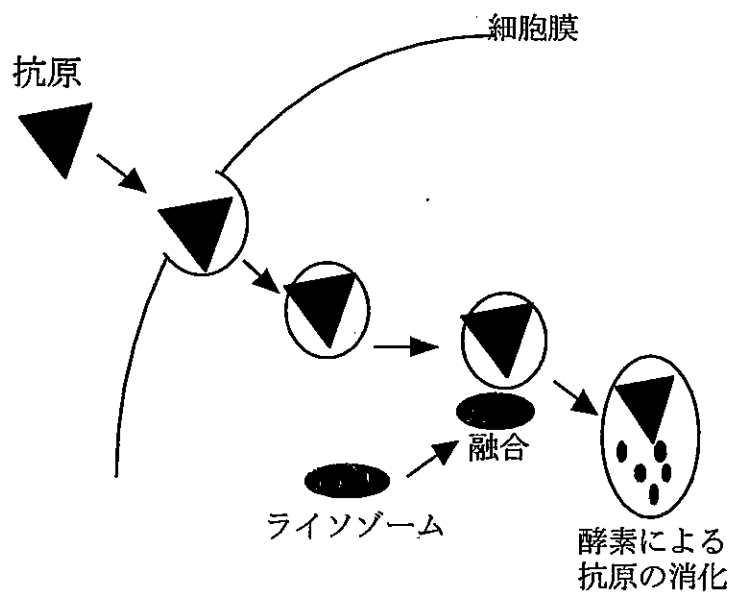


図1. 貪食細胞による抗原の消化

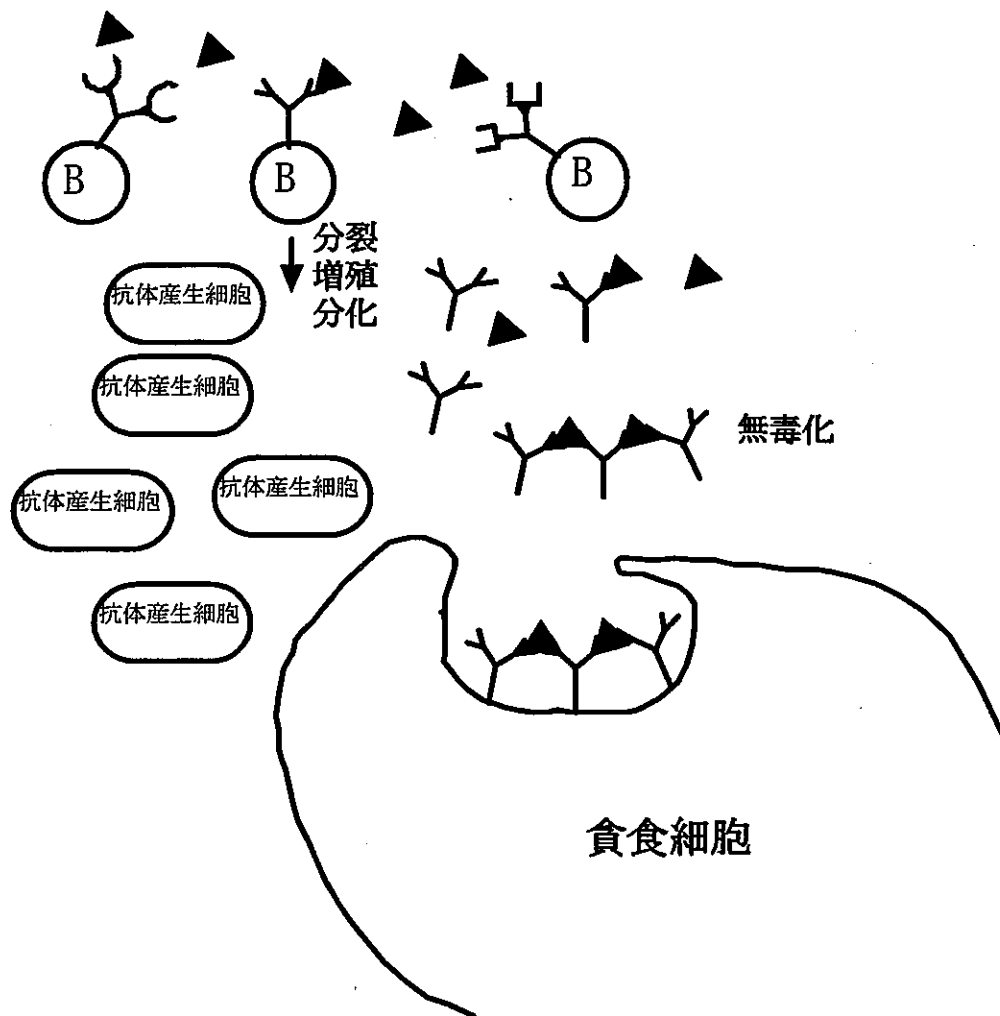


図2. 体液性免疫の仕組み

課題1. 貪食細胞の観察と同定

抗凝固させた血液に抗原（墨）を加え、37°Cに放置後、血液標本を作製し、この標本を用いて貪食している細胞を観察し同定する。

課題2. 抗原抗体反応による毒素中和反応

溶血性連鎖球菌の溶血毒（ストレプトリジンO:SL_O）と既にSL_Oで免疫したヤギの血清を試験管内で反応させることにより、SL_Oと血清中の抗SL_O抗

体が抗原抗体反応を行い、毒素の作用が中和されることを観察する。

* ストレプトリジン O (streptolysin O) は化膿連鎖球菌 (*Streptococcus Pyogenes*) が細胞外に分泌する分子量約 69,000 の毒素である。この毒素は細胞膜の脂質に作用し、細胞膜を破壊する。その結果、赤血球の場合、溶血が認められる。

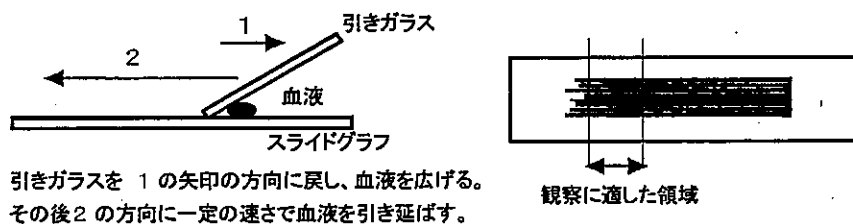
課題 1. 貪食細胞の観察と同定 (制限時間 50 分)

[試薬および器材]

ヘパリン加新鮮静脈血、スライドグラス、引きガラス、墨、硯、生理食塩液、ゴム手袋、光学顕微鏡、油浸オイル、エーテルアルコール、キシレン

[方法]

- 1) ヘパリンを加えて凝固反応を阻害したヒト新鮮静脈血 1 ml を試験管にとり、そこに少量の墨汁を加え、37℃ に 2 時間放置する。
- 2) 軽く攪拌し、少量の血液をスライドグラスに載せ、下図の要領で血液塗抹標本を作製する。この際、ゴム手袋を装着する。



血液塗抹標本の作製方法

- 3) 標本を乾燥させた後、ライト・ギムザ染色を行う。すなわち、標本をライト液に 5 分間浸した後、8% ギムザ溶液に 10 分間浸し、染色を行う。その後、十分水洗して染色液を除いて乾燥させる。

・方法 2) の塗抹標本の作成と、方法 1) ～ 3) のを終了した標本について貪食細胞の観察と同定を行う。

- 4) 標本に油浸オイルを少量のせ、油浸オイルに光学顕微鏡の対物レンズ (100 倍) が接する様にして、ピントを調節して観察する。

- 5) 観察が終了したら、対物レンズをエーテルアルコールに染みませた布でふく、また、標本はキシレンに浸け、オイルを取り除く。

課題2. 抗原抗体反応による毒素中和反応 (制限時間80分)

[試薬および器材]

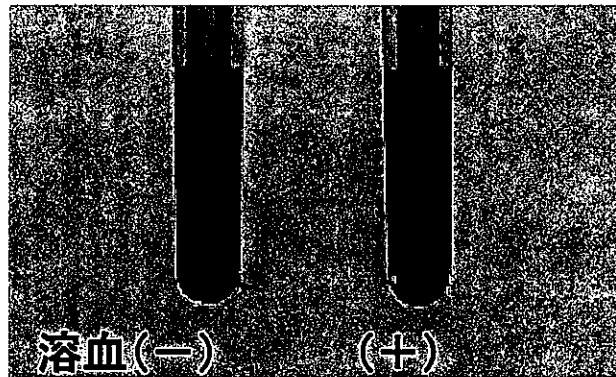
ストレプトリジンO、ストレプトリジンO抗血清 (抗体)、緩衝液、5%ウサギ赤血球、試験管、恒温層、メスピペット、マイクロピペット、安全ピペット

[方法]

- 1) 7本の試験管を用意し、それらに1～7までの番号をつける。
- 2) ストレプトリジンOとストレプトリジンO抗血清を安全ピペットを用いて、精製水で溶解する。
- 3) 下記の要領で試薬を加え、37℃で15分間放置する (恒温層を使用)。

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7
抗血清(ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.3	0.0	0.0
緩衝液(ml)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.7	1.5	1.0
SLO (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5

- 4) 試験管を恒温層から取り出し、1番から7番までの各試験管に5% 赤血球浮遊液を0.5ml 加え、軽く攪拌し、37℃で45分間放置する (恒温層を使用)。
- 5) 試験管を取り出し、溶血の具合を観察する。



実技1 血液塗抹標本が適切に作製できるか。

- | | |
|---------------------------------|----|
| 1) 滴下する血液は適当量であるか | 1点 |
| 2) 血液を均一に引き延ばせているか | 2点 |
| 3) 塗抹標本の厚さは適当であるか | 1点 |
| 4) 観察に適した領域が約スライドガラスの末端になっていないか | 1点 |

実技2 油浸オイルがスライドガラスと接眼レンズに適切に接しているか 1点

実技3 血液標本の適した領域を観察しているか。 2点

実技4 安全ピペットを適切に使用しているか。 3点

問1 墨を貪食してる細胞の名前を答えよ。 6点

問2 赤血球のおおよその直径を答えよ。 3点

問3 課題2の方法3)で15分間放置している時、試験管の中で起こっている現象を説明せよ。 5点

問4 課題2の方法4)で45分間放置している時、試験管の中で起こっている現象を説明せよ。 5点

問5 試験管1～5で最も強い溶血を示した試験管番号を答え、その理由について説明せよ。 5点

問6 試験管6を行う目的を説明せよ。 5点

合計40点

[用語]

免疫学—immunology

抗原—antigen

抗体—antibody

免疫複合体—immunocomplex

貪食—phagocytosis

リンパ球—lymphocyte

ライソゾーム—lysosome

(リソソーム)

溶血—hemolysis

生体防御実習 正解例

問1 好中球と単球

問2 6～12 μ m までを正解とする

問3 抗原である SLO と抗血清中の抗 SLO 抗体が特異的に結合し、SLO の無毒化が行われている。

問4 抗 SLO 抗体と結合していない SLO (残存 SLO) が赤血球を溶血させている。

問5 試験管番号— 5

理由—各試験管の SLO の量は一定だが、試験管 5 の抗 SLO 抗体が最も少ない (残存 SLO が最も多い) ため、溶血が最も強い。

問6 SLO の作用とは関係のない、血球を放置することによる溶血 (自然な溶血) の程度を知るため。

国際生物学オリンピック訓練実習（第2次試験）

実習③「細胞内構造」

指導責任者：宮地 和幸 生物学科助教授

Task 1 細胞の微細構造。

（制限時間 150 分）

東邦大学理学部 生物学科

電子顕微鏡試料作成の手順，観察，像解釈

生物の体は細胞から出来ている。その細胞を構成する各種の細胞内小器官はほとんどの生物に共通する。これらを観察する方法の一つとして電子顕微鏡がある。今回の実験では、電子顕微鏡で観察された像を写真という手段で複写し、それを観察することによって、生物の細胞の成り立ちを勉強する。

高校等の教科書などで、取り上げられる細胞は主にほ乳類の細胞を中心にして記述されている。ほ乳類でも最も代表的な材料としてマウスが使われることが多い。

ほ乳類では、約 100 種類の細胞があり、同じタイプの細胞が集まったものを組織といい、代表的な組織として上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織である。その中でも、電子顕微鏡で観察するのに、最も簡便にかつ分かりやすい組織は上皮組織であり、その上皮組織の細胞を今回観察することにする。

透過電子顕微鏡で観察するのにはいろいろな過程を経ないといけない。その最大の理由は電子顕微鏡が電子の発生を必要とするところにある。安定した電子線を出すには、高真空が必要である。この高真空に耐えるのには、試料を完全に脱水しておかなければならない。また、電子線が試料を通過させるには試料が非常に薄い必要がある。その薄さは 50 から 100nm が理想的である。その薄さになるには光学顕微鏡で使用されているパラフィンのようなワックスでなく、エポキシやスチレンといった人工樹脂が必要となる。

以上を踏まえて、これから透過型電子顕微鏡で観察するための過程を一通り、記述する。本来なら、この過程を経験して貰いたいのが、残念ながら時間がないので、文章だけで済ます。

固定

固定は死による組織内の化学的変化を最低限に阻止し、生前の構造をより自然の状態に維持するために行う処理である。電子顕微鏡で観察する為の固定は 2 回連続した異なる固定液での固定が常識である。

固定液：前固定 2.5%グルタルアルデヒド溶液(pH 7.4, 0.1 M 燐酸バッファーで希釈)

後固定 1%四酸化オスミウム

死後変化及び酸素欠乏による細胞内変化を避けるため、切り取ったらすぐに固定液に入れる。いったん、固定後、10分後、採取し、固定を始めた組織片は、あらかじめ厚手のプラスチックシートの上に数滴たらしめておいた固定液中に入れて細切りにする。細切りにはアセトンなどで脂を拭き去った両刃のカミソリを2つに折って、それぞれ2枚を用いて左右に軽く引きながら切る。組織片は大きいと固定が不十分になるので、1mm 角前後の大きさにするのがよい。固定中はときどき軽く瓶を揺り動かすと良いが、この際に組織片が液面より上の容器の壁につかないように注意する。

水洗

前固定では通常等張液＋緩衝液を使用する。その時の水洗時には等張液の比率を段階的に落とし、最終的に緩衝液だけにする。

走査電子顕微鏡 (SEM)と透過電子顕微鏡(TEM)の撮像原理の図と説明、得られる顕微像、金撮像プローブの説明が示されていた。

後固定は四酸化オスmium水溶液を使用する。四酸化オスmiumは非常に猛毒の為、この薬品の蒸気は鼻や喉の粘膜をおかすので、決して蒸気を嗅がないこと。また、手についたら、即座に洗浄をすること。それでも、ついたところは黒くなる。四酸化オスmiumの臭いが消えるまで、数回以上蒸留水で洗う。

脱水

組織内に入っている自由水を溶媒に置換する。

脱水にはエチルアルコールかアセトンを使用する。

脱水は一気に 100%脱水剤を使用すると、組織を痛めるので、段階的に脱水剤の濃度を上げて、脱水をしていく。100%以外は組織の大きさにもよるが、一般的には 15 分前後つけておくが、100%になると、1 時間前後処置する。

脱水に入ったら振盪器にひょう量瓶を置き、振盪させ、脱水を促進させる。理想としては固定した試料全体が 100%アルコールに置換され、一滴の水もない状態にすることが求められる。

包埋

電子線が通る厚さの超薄切片を作るには光学顕微鏡の組織切片の観察に使用してきたパラフィンやセロイジンでは 30-100nm に切ることは不可能である。このような目的にかなうものとして、現在、重合して硬化する人工樹脂が使用されている。これまで、メタクリル樹脂、スチレン樹脂、エポキシ樹脂が使われてきたが、今では殆どエポキシ樹脂が専ら使用されている。但し、最近免疫電顕ではアクリル系樹脂で紫外線硬化をさせるものもある。

今回包埋材として使用する混合樹脂(Luft 変法)の調合比は下記の通りである。

エポキシ樹脂	EPOK 812	25cc
	D.E.R. 736	75cc
硬化剤	MNA	89cc

以上の割合の混合液を調合し、使用直前に加速剤 DMP-30 (Dimethylaminoethanol)1.5~2%を加えたものを使用する。

70℃で12時間重合する。

樹脂への包埋の際の注意

EPOK, D.E.R.736, MNA はともに吸湿性が強い、調合後密栓してデシケーターに保存しておく。DMP-30 は酸化されやすいので、なるべく新しいものを使用する。

エポキシ樹脂は、皮膚につくと炎症をおこすので、皮膚についたら、石鹼でよく洗うこと。また、発ガン物質でもあるので、重合後、トリミングをおこなう時に出る粉状になった樹脂粉末を吸い込まないように注意する。

樹脂は上記の理由により劇物であることから、特に気を付けて取り扱い、実験台上などに落とさないようにする。そのため、樹脂を使い始めたら、新聞紙などを実験台上に敷き、その上にひょう量瓶を置く。

包埋作業は専ら観察する材料の中に、樹脂が十分に浸透させることである。樹脂の浸透がうまくいかないと、薄切が殆ど不可能になってしまう。

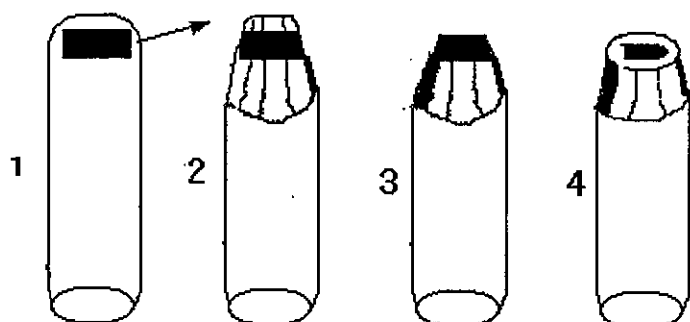
樹脂が入ったら、組織に樹脂が速やかに浸透するように脱水に引き続き、振盪器において浸透を促進させる。

樹脂の粘性を低くするために、ひょう量瓶を白熱電球で暖めるとよい。

浮いている試料はアルミ皿に包埋しない。

一つのアルミ皿には固定・脱水した試料を全部入れる。

面出し、トリミング



50 から 100nm の薄さに切るためには、いくつかの手順を踏まないときれいな切片は作れない。
樹脂で固めた試料はその組織が出るまで、まずヤスリで荒削りをする。
試料が出てきたら、
大きな台形約 3mm 角の長方形あるいは正方形の形にして、小山を作

る。

トリミングの作業は実体顕微鏡下で行う。

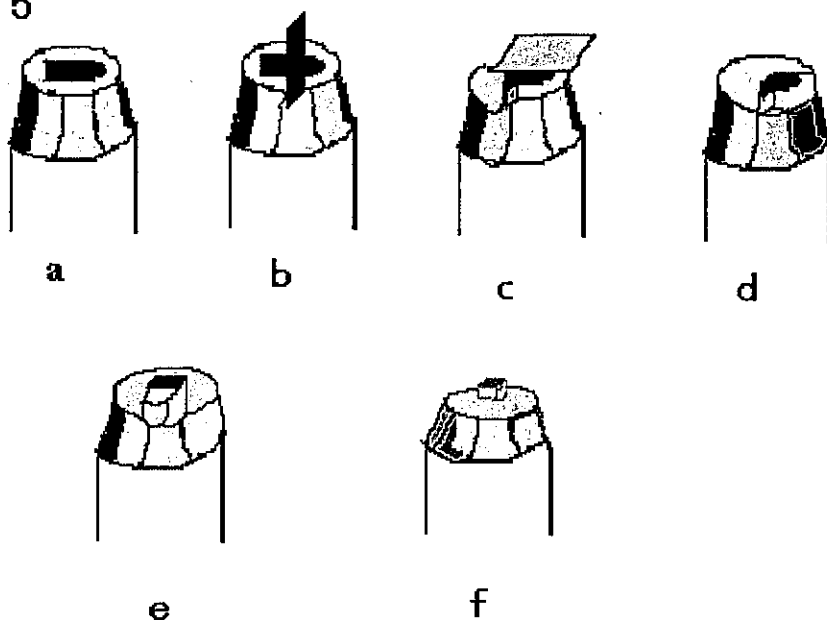
樹脂は硬いので両刃のカミソリ(鋼鉄製に限る)でトリミングする際には指など切らないように注意する。

厚切りした切片(1 μ m—5 μ m)を光学顕微鏡で検鏡し、トリミングする目的の場所を決める。

トリミングした面はほぼ台形になるように、また上下は必ず平行になるように切る。 大きさはほぼ 1mm x 0.5mm を目安にして切る。

トリミング下面は決して剃刀等で傷つけないように注意する。

5



トリミングまず大きく削り取りそれから目的の大きさに近づける。

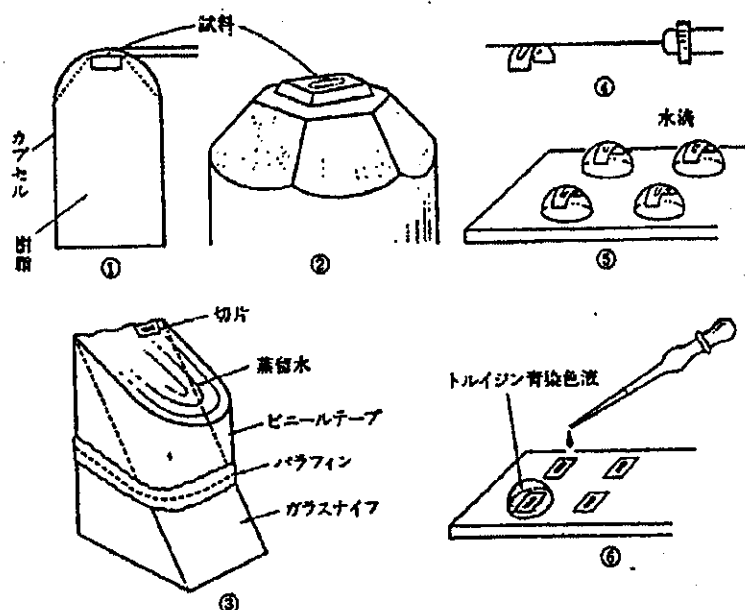
厚切り切片の観察

エタノールを含んだガーゼでよくふいたスライドガラスを用意する。

その後蒸留水で水滴を作る。

ウルトラミクロームで切片を作る。それを蒸留水の水滴の上に浮かべる。

スライドガラスを 60°～80°C のウォームプレート上で水分を蒸発させ、切片をスライドガラス上に貼つける。



乾燥した切片の上に2%トリジンブルー液を滴下する。乾燥するまで放置しておく。切片の上に水を流し、余分な染色液を洗い流してしまう。余計な水を拭き取って検鏡し、十分に染色され、観察に耐えられることが分かったら切片の上に包埋に使用したエポキシ樹脂を滴下して、カバーガラスをかけて永久プレパレートにする。

図4 厚切り切片と染色の仕方

薄切

ウルトラミクロームを使用して、薄切する。薄切するナイフは一般的にダイヤモンドナイフを使用する。

電子染色

電子顕微鏡における染色は組織の微細構造のコントラストを一様に高める為の方法である。電子染色の方法には下記の2通りがある。

ブロック染色法 試料を直接染色液に浸せきする方法。

切片染色法 超薄切片をシートメッシュにのせて染色する方法。

染色液; 電子顕微鏡で使用する染色液は下記の2つある。

1. 酢酸ウラニル: $(\text{UO}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2. 鉛塩

1は酢酸ウラニルの飽和水溶液を使用する。

2は佐藤法を使用する。

佐藤法の作成手順

硝酸鉛 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1.0g

酢酸H鉛 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0g
 クエン酸鉛 $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0g
 クエン酸ナトリウム $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7/2\text{H}_2\text{O}$ 2.0g
 100mlのメスフラスコ 20ml メスピペット 1本

上の薬品を同時に蒸留水 82ml 中に溶解する。液は白濁する。

約 1 分間振とう後 4% NaOH 18ml を加える。この時白濁は急速に消失し数分の振とうで完全に透明になり、pH は 12 前後となる。

保存容器は密栓できる褐色瓶を用い、室温保存でよい。

鉛は空気中や水に含まれる炭酸ガスと反応して炭酸鉛となり、沈澱を起こすので、空気曝さないこと。また、蒸留水もなるべく炭酸ガスの入っていないものを使用する。

染色方法

パスツールピペットで染色液を取り出し、パラフィルム上に滴下し、水滴を作る。

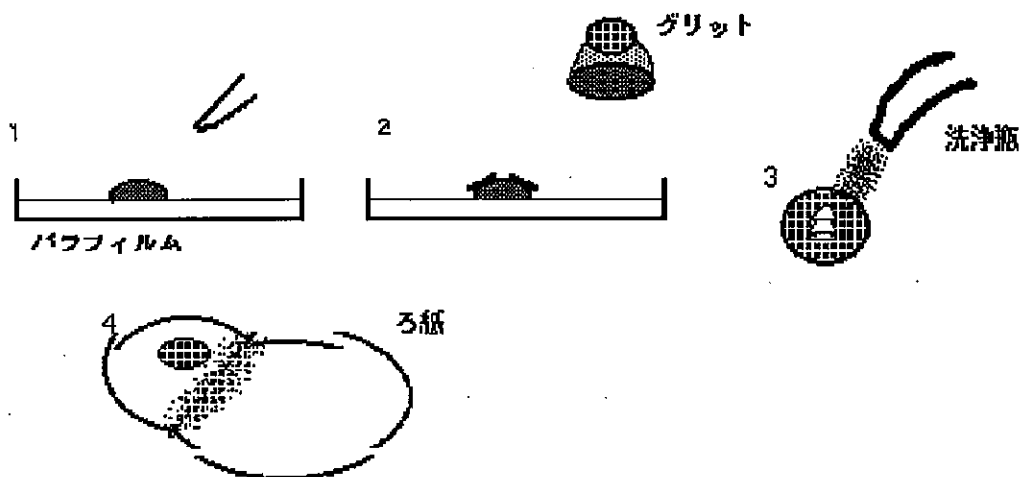
切片を張り付けられた面が染色液に接するように水滴の上にメッシュを浮かべ、12分間染色する。染色中はパラフィン台に蓋をする。

洗浄瓶でメッシュの染色した面を洗う。洗う際には切片上に鉛の結晶を残さないようにある程度の水流を出して洗う。鉛の結晶が残っていると鏡体を汚すばかりでなくきれいな像が獲られなくなるので、注意する。

濾紙で、メッシュに残っている水滴を取る。

パラフィン台も染色液を取ってから、蒸留水でよく洗う。

図5 染色方法



電子顕微鏡における観察

電子顕微鏡による物を大きく見る原理は基本的に光学顕微鏡と同じである。光学顕微鏡が可視光線なら、電子顕微鏡は電子線である。レンズの代わりに電磁石を利用する。電磁石は電磁コ

イルで作られている。電子線は電磁石で曲げられる。

70 から 80KV の加速電圧をかけると、タングステンのコイルから熱電子が飛び出し、それが試料を突き抜けて蛍光板に像が投影される。その際、非常に高倍率に像が投影される。最大で 0.2nm まで解像力がある。電子線は蛍光板にあたると蛍光を発するが、それが非常に微弱な光であるので、明るい日の光の中では、殆ど電子線の蛍光は検出できない。そこで、電子顕微鏡で観察するのは暗室の中で、暗黒下でないといけない。

フィルムの撮影

光学顕微鏡で見られる像の精緻さは人間の目でもほぼ把握できるぐらいである。それをスケッチや一般的な写真機で撮影して、その像を把握する。ところが、電子顕微鏡では、蛍光板に投影されている像が非常に細かいので、人間の目で画面全体を把握することは不可能である。そこで、蛍光板に映し出されている像をフィルムに映し込み、それを印画紙に焼き付けて、その写真を観察することによって、観察結果を把握することが出来る。そのことから、電子顕微鏡で研究する場合は、写真技術にある程度修得する必要がある。

フィルムを現像

透過型電子顕微鏡で使用するフィルムは薄いプラスチックの板に写真乳剤が塗られた板状で、大きさは 5.9cm x 8.2cm か 8.3cm x 11.8 cm です。このフィルムは通常の写真機などで使われるフィルムに比べると、非常に感度が悪く、露光時間 4S が常識です。フィルムを現像するには安全光下で現像できる。フィルムの現像は現像液、停止液、定着液という行程を経て、フィルムを現像する。

フィルムから焼き付け

フィルムが現像できたら、そのフィルムを使って、印画紙に焼き込みます。印画紙は一般的に紙の上にプラスチックが塗布されており、簡単に乾燥でき、表面が光沢になっています。引き伸ばし機を使って、フィルムの 2 倍から 4 倍に伸ばして、印画紙に映し込みます。

今回、電子顕微鏡での微細構造の観察はこの印画紙に焼き付けた動物の細胞を見て、その像を解釈する。

動物細胞、植物細胞、細菌細胞の模式図と細胞器官が図示されていた。

像の解釈

電子顕微鏡写真による細胞の像解釈

動物の場合、植物と異なり、細胞と細胞の境界線が非常に不明瞭で、時として間違えることがある。そこで、動物細胞の場合、いかにして細胞膜の把握をするかである。最初に、細胞膜を把握する。細胞膜の外側に何か被覆している物があるかないかを把握する。特に、上皮細胞ではそれが顕著である。

今回の実習で、使用する写真はマウスの肝臓、腎臓、そして小腸の細胞である。実技試験として採用した写真は小腸の横断面からみた吸収上皮細胞である。

Q1. では、手渡した写真の中で、1 個の細胞のアウトラインを細胞膜に沿って、写真の上に被さっているトレーシングペーパーに直接、図示しなさい。(3 点)

哺乳動物の場合、赤血球を除いて、どのような細胞でも、必ず一個以上の核が存在している。

Q2. 核を図示しなさい。(2 点)

Q3. 核を取り囲む膜にはある構造体が存在するが、これを何と呼ぶのか。また、その場所をトレーシングペーパーに直接、図示しなさい。(3 点)

A:

Q4. また、核膜に沿って、電子密度の高い部分がありますが、これは何から出来ていますか。(3 点)

A:

核と同様な膜が()重になる細胞小器官が存在する。この細胞内小器官は細胞にとって重要な働きをしている。

Q5. 上記のカッコの中に入る数字を入れなさい。(2 点)

()

Q6. この細胞内小器官は何か。その名称を記述しなさい。(3 点)

A:

Q7. この細胞内小器官を細胞膜の場合と同様に図示しなさい。(3 点)

Q8. この細胞内小器官の働きの正しいものを下記から選びなさい。(2点)

1. タンパク質を貯蔵する。
2. 糖を分解する。
3. 細胞の発電所であり、エネルギー産生工場である。
4. タンパクの製造工場である。
5. 脂質を作り出すところである。

Q9. この細胞内小器官と同じ膜数で囲まれている植物の細胞に見られる細胞内小器官を記述せよ。(3点)

A:

小胞体, ゴルジ体, ゴルジ小胞, 分泌小胞それぞれ順番に一つの流れとなっている。それはタンパク質の合成と細胞外あるいはリソソームへとタンパク質を運ぶ流れとなっている。

Q10. では、小胞体はどれか、上記の細胞膜と同様な方法で、図示しなさい。但し、その一部を図示するだけでよい。(3点)

Q11. 小胞体上に付いているものは何か。(3点)

A:

Q12. 小胞体に関しての記述で誤りを下記から選びなさい。(2点)

1. 小胞体上にリボソームが付く。
2. 小胞体は小さな小胞の集まりである。
3. 小胞体には滑面小胞体と粗面小胞体がある。
4. 小胞体上でタンパク質が合成されている。
5. 小胞体は一つながりで、切れ目がない。

Q13. ゴルジ体を上記の細胞膜と同様な方法で、図示しなさい。但し、1個だけで良い。(3点)

Q14. ゴルジ体はレンズのように曲面を作ることがある。さて、核の方に向いているのはどちらか、正しい方に丸を付けなさい。(2点)

凸面

凹面

Q15. リソソームを上記の細胞膜と同様な方法で、図示しなさい。但し、1個だけで良い。(3点)

問題図



小腸，吸収上皮細胞

国際生物学オリンピック訓練実習（第2次試験）

実習④「遺伝子」

指導責任者：高橋 秀典 生物学科講師

Task 1 アガロースゲルを用いたプラスミド pX DNA 断片の電気泳動による分離とプラスミド pX の制限酵素地図の作成。
(制限時間 150 分)

東邦大学理学部 生物学科

【1】はじめに

実習4「遺伝子」では、アガロースゲルを用いたプラスミド pX DNA 断片の電気泳動による分離とプラスミド pX の制限酵素地図の作成を行う。実習を始める前に、実習指導者より実習内容やその他の諸注意について説明がある。

(注意) 実習中は白衣を着用し、使い捨て手袋を装着すること！

【2】技術的な説明

1) 電気泳動の理論

電気泳動は分子を電荷や分子量やサイズによって分離する解析方法として広く用いられている。電気泳動ではしばしばゲルと呼ばれる媒体中で同じような電荷を持った分子を分子量やサイズに従って分離することが行われる。ゲルを構成する物質は緩衝液中に溶解されている。

2) プラスミド DNA のマッピング

プラスミドは多くの種のバクテリア（細菌）にみられる染色体に存在する DNA とは別個に存在する2本鎖の環状 DNA 分子のことである。制限酵素とは核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の1つであり、特異的な4～6塩基対の配列を認識してDNAを切断する。例えば、*Hae*III とよばれる酵素は GGCC という配列のところで2本鎖 DNA を切断するが、*Eco*RI とよばれるものは GAATTC という配列のところで2本鎖 DNA を切断する。

プラスミドDNAマッピングとはプラスミド分子を円形に表した模式図上に制限酵素切断部位のそれぞれの相対的位置を書き記したものである。模式図を作製するためには、異なった制限酵素で切断したときに生じるDNA断片の長さを決定しなければならない。プラスミド

分子を1つのあるいは複数の制限酵素で同時に切断することが可能である。切断によって生じたDNA断片は、はっきりとしたバンドとして移動し、ゲル中で特異的な染色剤によって可視化することが出来る。DNA断片が電気泳動中にゲルの中で移動する距離（移動の開始地点（ウェル）からDNA断片のバンドの前端まで）は塩基対（bp）で表された断片の長さの対数と反比例する。核酸の電気泳動で媒体としてもっとも良くゲルに用いられている物質はアガロースである。アガロースゲルの編み目の穴は、質量が100,000 Da（ダルトンまたはドルトン）を超える分子を分離するのに十分な大きさがある。（注：Daは分子の質量の単位であり、数値は分子量と同じである。）

【3】実験器具

1) アガロースゲル電気泳動槽

電気泳動槽（図1-1の4）は2つの電極；陰極（5）と陽極（6）を含む。電気泳動の前にゲルは緩衝液（7）で浸される。解析する分子を含んだサンプルは、ゲルをゲル支持体（3）上で作製するとき特別なコーム（くし）によって形成されたウェル（1）の中に装填される。電源装置につなぐ前に泳動槽（タンク）のカバー（8）を閉じる。

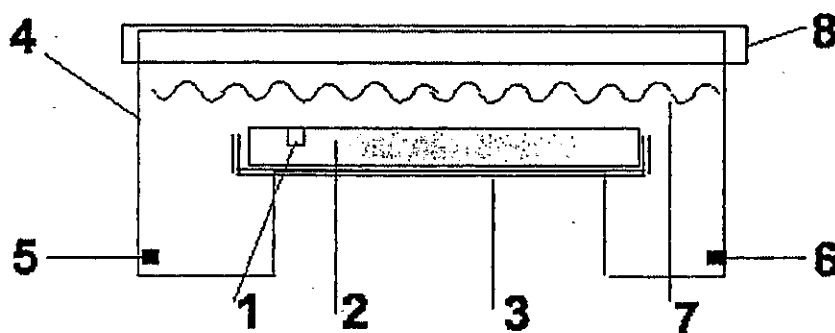


図1-1 ゲルを装着した電気泳動槽を横から示した図

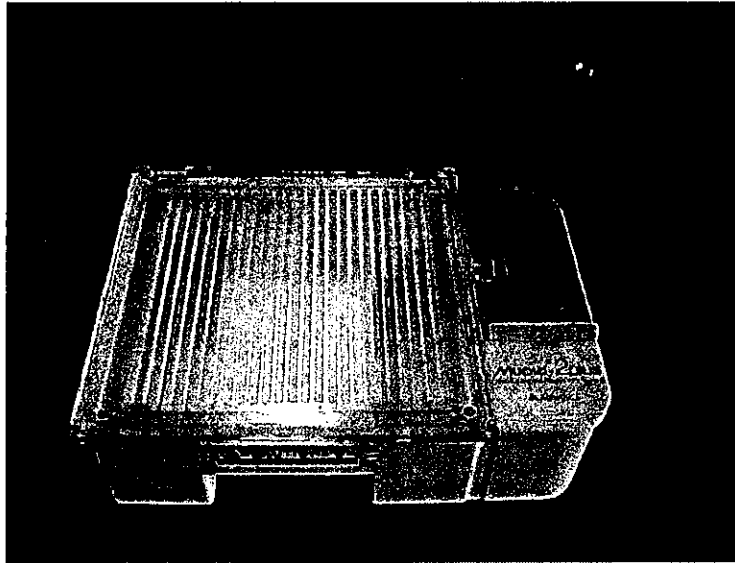


図1-2 この実習で用いる電気泳動槽

2) マイクロピペット (ピペットマン) (図2)。

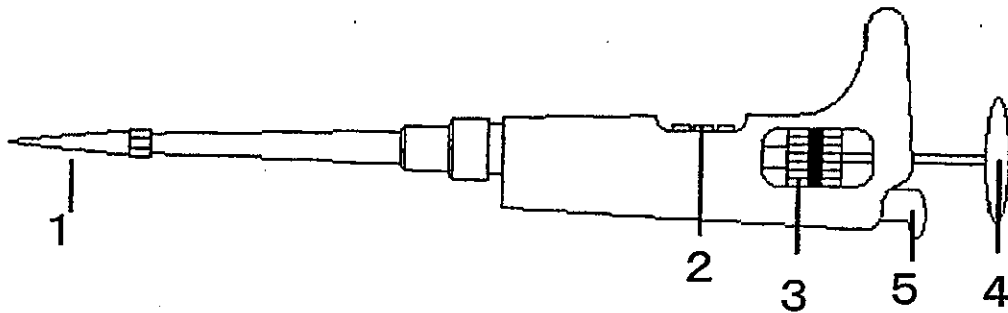
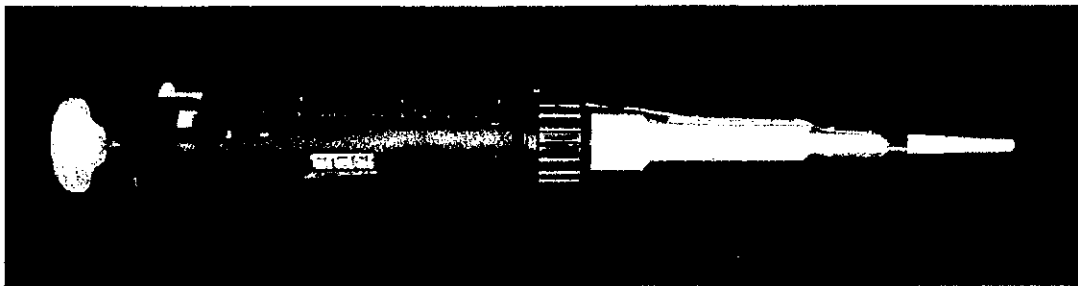


図2 可変容量ピペット

ピペットマンの使い方

1. 容量モニター (2) を見ながら調節ねじ (3) を回し、目的の容量を表示させる。モニターに見える正しい容量設定例は図3に示されている。

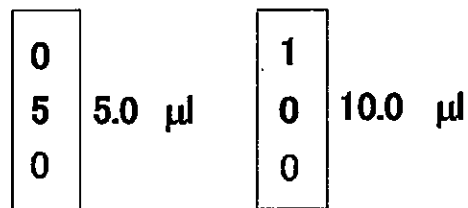


図3 ピペットのモニターにおける 5 μ l と 10 μ l の正しい設定

2. 白色チップ (図2の1) をピペットの柄のところに装着する。

(注意) チップなしで液体を取り扱ってはならない！

3. ボタン (図2の4) を親指でゆっくり最初に止まるところまで押し、この状態を保持したままチップの先端を液体 (試料) の中に入れる (図4A)。

4. ボタンを押す親指の力をゆっくり抜き、ボタン元の位置まで戻して (バネの力で自然に戻る) 試料を吸引する (図4B)。

5. 液体を含んだチップを目的のところ (ゲルのウェル) まで移動させ、液体がチップから出きるまでボタンをゆっくり押し込む (図4C)。

(注意) チップでウェルの底部を突き破らないように。

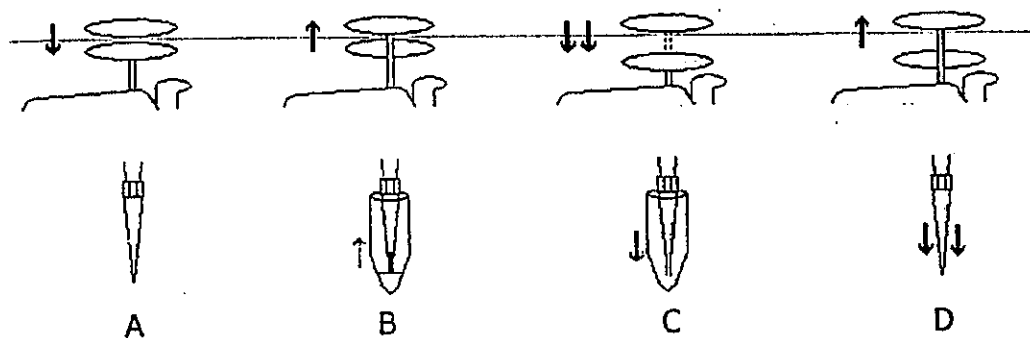


図4 液体取扱の行程

6. ボタンを押し込んだまま、ピペットマンを持ち上げてチップを緩衝液中から出し、ボタンを押す親指の力をゆっくり抜いてボタン元の位置まで戻す。

7. 解除ボタン（図2の5）を親指で押し（図4D）、使用したチップを専用のゴミ箱へ入れる。

（注意）それぞれの液体や試料には新しいチップを使用する！

◎DNA試料を取り扱う前に、チップ1つと1 x GLBを用いて一番端のウェルにサンプルの装填練習を行う。

【4】試薬と材料

1. 1 x TAE 緩衝液で調整した 1.0%アガロースゲル。

（今回はこちらで作製したものを泳動に使用する。泳動のあいだにどのように作製するのかの説明を行う。）

2. 1 x TAE 緩衝液（40 mM トリス酢酸、1 mM EDTA, pH 8.0）で満たした電気泳動槽

3. 1 x GLB: gel loading buffer（ゲル装填用緩衝液。グリセリンとブロモフェノールブルーを含む。）ゲルへのサンプル装填練習に用いる。

4. 6 x GLB: サンプルを電気泳動にかける前にサンプルに混合する。

5. St: DNA サイズ標準マーカー、20 μ l。各バンドのサイズは、小さい方から 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 kbp（1 kbp = 1,000 bp）である。

6. B+C, B+D, C+D: 制限酵素 B+C, B+D, C+D でそれぞれ切断したプラスミド pX の DNA 20 μ l ずつ。

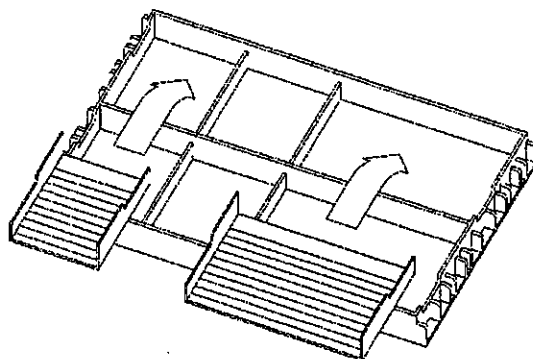
7. ゲル染色液（蛍光色素である SYBR Green を 1 x TAE で 10,000 倍希釈したもの）。

8. プラスミド pX。長さは約 4.4 kbp。

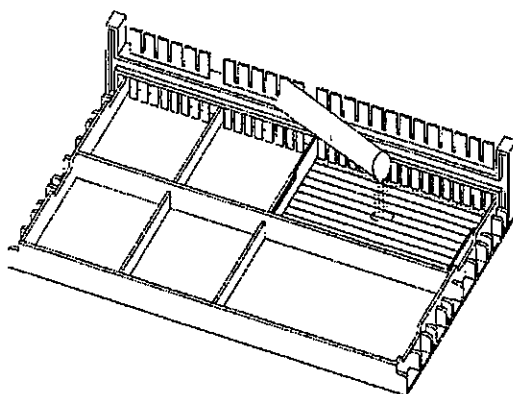
【5】実験1：ゲルの作製～電気泳動開始

1) アガロースゲルの作製（今回は説明のみで、予め作製してあるゲルを使う）

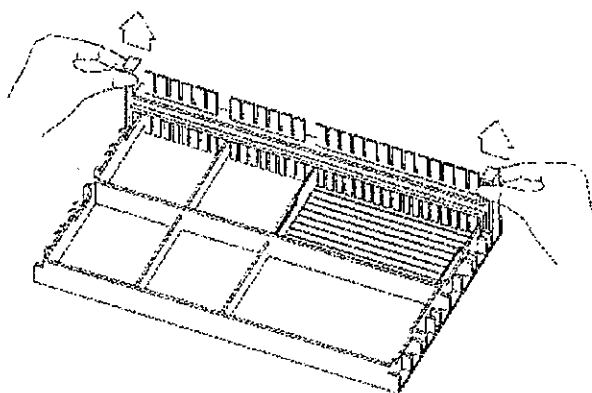
1. アガロース 0.6 g を計量して耐熱広口ビンに入れた後、60 ml の 1 x TAE 泳動緩衝液を加え、電子レンジで加熱してアガロースを完全に溶かす（最終濃度 1%）。
2. ゲル成型トレイを付属のゲル作製用の容器にセットする。



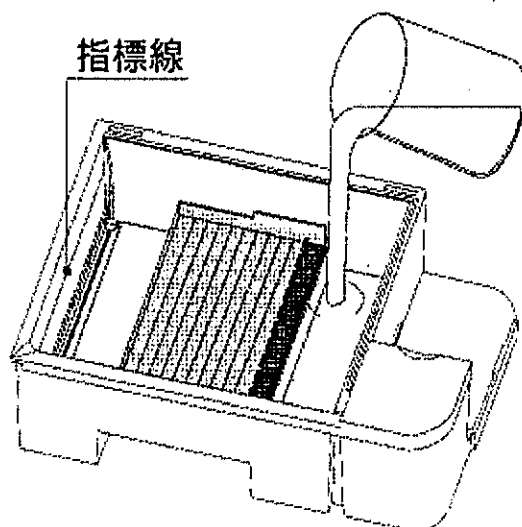
3. コームをセットし、ゲルが 50℃くらい（手で触れるくらい）まで冷めたらゲル成型トレイに流し込む。



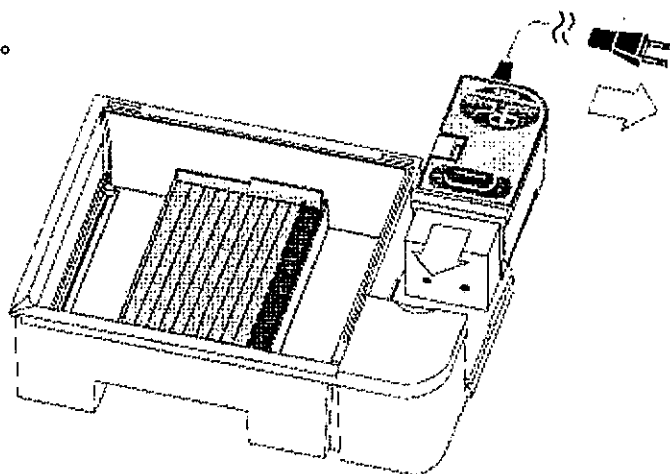
4. ゲルが固まったら専用容器から注意してゲルとトレイをはずし、コームをゆっくりと注意深く抜く。



5. ゲルをサブマリン電気泳動槽にセットし、1 x TAE 泳動緩衝液をゲルが完全に浸る程度にまで満たす。



6. 電極を泳動槽に取り付ける。陰極と陽極を間違えないようにする。DNA は陽極へ向かって移動する。



2) 試料の装填

1. St, B+C, B+D, C+D の4つに、6 x GLB を 4 μ l ずつ加える。
2. ピペットマンのメモリを 12 μ l にあわせ、ゲルの奥から5番目のウェルに DNA のサイズ標準マーカを2回に分けて装填する。
3. 同様に、B+C, B+D, C+D をそれぞれゲルの奥から6、7、8番目のウェルに装填する。
4. 電気泳動槽の蓋を閉める。
5. 手を挙げて実験アシスタントに確認してもらう。

3) 泳動

1. 電源ボタンを押す。
2. 定電圧 (100V) で60分間泳動する。

【6】電気泳動の時間を利用して巻末の問題①に答える。解答時間は指示に従う。

【7】実験2：電気泳動停止～DNAの染色・ゲル撮影

1) 電気泳動の停止

1. 電気泳動を始めてから60分後にはDNAの断片は十分に分離されているので、電源ボタンを押して電源を切る。

2) DNAの染色

1. 手袋を着用してゲルをゲル支持板からはずし、1 x TAE で 10,000 倍希釈した SYBR Green 溶液の入ったタッパー容器に慎重に移す。ゲルは壊れやすいので取扱に注意する。また、SYBR Green 溶液は毒性があるので皮膚に付かないように注意する。
2. タッパー容器ごと振とう台の上にのせ、ゆっくりと15分間振とうして染色する。

3) ゲル撮影

1. 染色し終わったらスタッフの人を呼び、染色溶液を所定の廃液入れに入れ（ゲルが落ちないように注意すること）、ゲルをタッパー容器に入れた状態でUVトランスイルミネーターのある部屋へ持って行き撮影に用いる。ただし、当日はスタッフが用意したゲルを撮影に用いるので、各自のゲルは持って移動する必要はない。
2. トランスイルミネーターの保護シールドを開ける。

3. ゲルを UV テーブルの上に置く。
4. 保護シールドを閉じ UV 光のスイッチを入れる。

(注意)・保護シールドが空いている状態で UV トランスイルミネーターのスイッチを入れない！

・UV 光がついている状態で保護シールドを開けない！

5. DNA バンドの像を観察し、それを実験アシスタントに写真を撮ってもらう。
6. UV 光のスイッチを切りゲルを容器に戻す。
7. UV トランスイルミネーターの掃除をし、手を洗う。使用したゲルの処分はアシスタントにまかせる。

【8】実験室に戻り、巻末の問題②に答える。解答時間は指示に従う。問題①を解き終わっていない場合は問題①も含めて解答してかまいません。ただし、解答時間を延長することはありません。

【9】解答用紙 1 枚、グラフ用紙 2 枚にそれぞれ氏名が記入されていることを確認して、提出する。

【10】解説（指導教員）

1. 実技課題 (6 点)

1. 実験中は白衣と使い捨ての手袋を着用する。(1 点)
2. ピペットマンを正しく使うことができる。(1 点)
3. サンプルをあふれさせることなく全量をゲルに装填できる。(1 点)
4. 電気泳動装置を正しく使うことができる。(1 点)
5. ゲルを傷つけることなく染色することができる。(1 点)
6. 廃棄物を正しく処理することができる。(1 点)

2. 解析問題 (34 点)

※ 別紙の解答用紙の所定欄に解答しなさい。解答用紙のみが採点の対象です。

問題① (電気泳動中に答える。解答時間は指示に従う。)

<Q 1. 電気泳動>

pH 8.0 の緩衝液中で電気泳動を行うと DNA 分子は陰極から陽極へ移動することが知られている。この現象に関して、以下の2つの問いに答えよ。

Q 1-1. DNA 分子はどちらの電荷に帯電しているか? (3 点)

- A. 負
- B. 中性
- C. 正
- D. 決定できない

Q 1－2. 次のうちのどの構成要素が DNA 分子の電荷を主に決定しているか？（3 点）

- A. プリン
- B. ピリミジン
- C. デオキシリボース
- D. リン酸基
- E. 両方の DNA 鎖間の水素結合
- F. 上記のどれでもない

<Q 2. DNA 断片の計算と制限酵素地図の作製①>

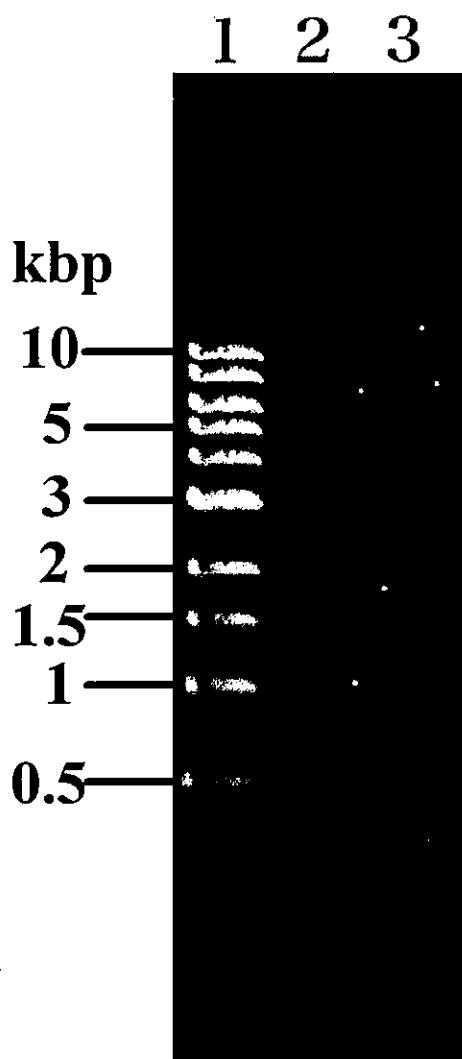
右のゲルの写真は DNA サイズ標準 St と、プラスミド pX を制限酵素 A, B, C を用いて切断したときに生じる DNA 断片を電気泳動によって分離したものを示している。

レーン 1 : サイズ標準 DNA 断片 (St)

レーン 2 : 酵素 A+B で切断したプラスミド pX

レーン 3 : 酵素 A+C で切断したプラスミド pX

これをもとに、以下の問いに答えなさい。ただし、プラスミド pX の大きさは 4.4 kbp で、制限酵素 A, B, C は pX DNA をそれぞれ 1 カ所のみ切断する。また、A+B, A+C の酵素の組み合わせでプラスミド pX を切断すると図中の 2 つの断片のみが生じるものとする。



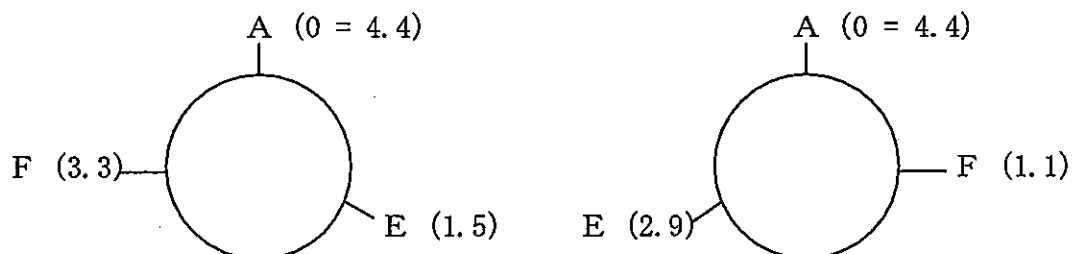
Q 2-1. サイズ標準 DNA の各断片の大きさ (kbp) に対して、各 DNA 断片のウェルからの移動距離 (cm) をプロットし、プロットされた各点を結んでグラフを作りなさい。各断片の大きさの詳細は、テキスト 5 ページ「【4】材料と試薬」第 4 項参照。グラフ用紙は Q 2-1 を用いること。(4 点)

Q 2-2. Q2-1 で作製したグラフを用いて、A+B、A+C の酵素処理で生じる 2 つの DNA 断片の大きさを、単位は kbp で小数点 1 桁まで求めなさい。ただし、プラスミド pX の大きさは 4.4 kbp とする。本当の大きさの $\pm 10\%$ の誤差は正答とする。(3 点 $\times$ 2)

Q 2-3. 試料 A+B (図 6、レーン 2) は 200 ng (ナノグラム。1 ng = 10^{-3} μ g = 10^{-9} g) のプラスミド pX を酵素 A と B で切断し、全量をゲルに装填したものである。この場合、2 つの DNA 断片はそれぞれ何 ng になるかを求めなさい。ただし、小数点以下は四捨五入しなさい。また、A+B の酵素処理では 2 つの DNA 断片以外のものは生じないものとする。本当の大きさの $\pm 10\%$ の誤差は正答とする。(3 点)

Q 2-4. 酵素 A の切断部位をこのプラスミドの制限酵素地図の開始点 (0 kbp = 4.4 kbp) として、Q2-2 の結果をもとに酵素 B と C の切断部位の位置を、考えられる位置関係の数だけ図で示しなさい。ただし、プラスミド地図で互いに鏡像関係にあるものは 1 つだけ示せばよい。(6 点)

<書き方の例>



(これら 2 つは鏡像関係にあるので、いずれか 1 つを記載すればよい。)

問題② (ゲル写真撮影後に答える。解答時間は指示に従う。)

<Q 3. DNA 断片の計算と制限酵素地図の作製②>

電気泳動して得られたゲルの染色像をもとに以下の問いに答えなさい。

Q 3-1. サイズ標準 DNA の各断片の大きさ (kbp) に対して、各 DNA 断片のウェルからの移動距離 (cm) をプロットし、プロットされた各点を結んでグラフを作りなさい。各断片の大きさの詳細は、テキスト 5 ページ「【4】材料と試薬」第 4 項参照。グラフ用紙は Q 3-1 を用いること。(4 点)

Q 3-2. ゲルの写真から、B+C, B+D, C+D のサンプルで見られる 2 つずつの DNA 断片のサイズを、単位は kbp でそれぞれ小数点 1 桁まで求めなさい。ただし、プラスミド pX の大きさは 4.4 kbp とする。本当の大きさの $\pm 10\%$ の誤差は正答とする。(3 点 $\times$ 3)

Q 3-3. Q2-4 と Q3-2 の結果を総合し、酵素 A, B, C, D の切断部位を全て記入したプラスミド地図を完成させなさい。ただし、制限酵素 A, B, C, D はプラスミド pX をそれぞれ 1 カ所でのみ切断し、A+B, A+C, B+C, B+D, C+D の酵素の組み合わせでプラスミド pX を切断すると 2 つの断片のみが生じるものとする。プラスミド地図で互いに鏡像関係にあるものは 1 つだけ示せばよい。(6 点)

解答用紙

氏名 _____

Q 1 - 1	
---------	--

Q 1 - 2	
---------	--

Q 2 - 1	(別紙のグラフ用紙Q 2 - 1 に記入のこと。)
---------	---------------------------

Q 2 - 2	A+B :	kbp と	kbp
	A+C :	kbp と	kbp

Q 2 - 3	ng と	ng
---------	------	----

Q 2 - 4	
---------	--

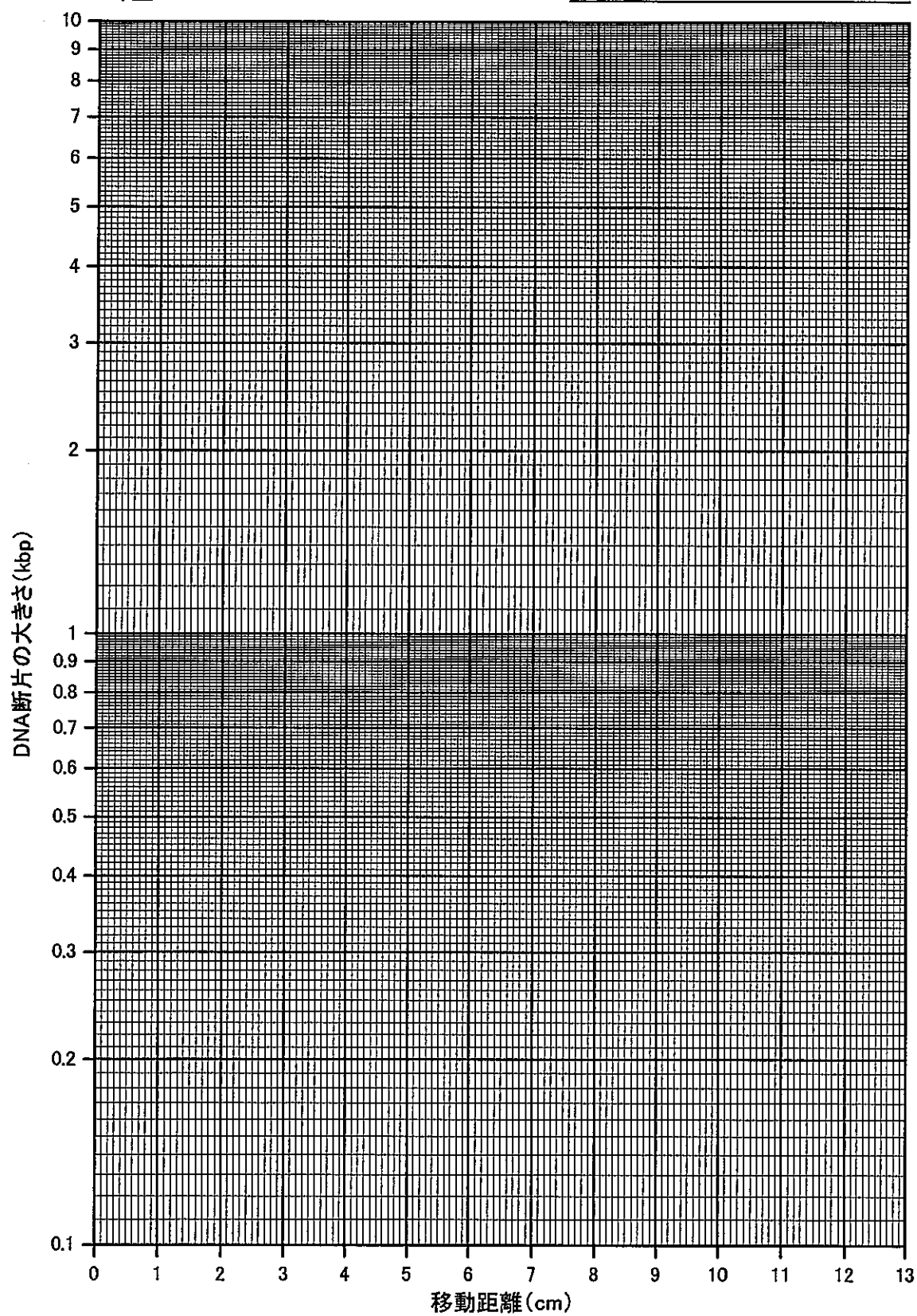
Q 3 - 1	(別紙のグラフ用紙Q 3 - 1 に記入のこと。)
---------	---------------------------

Q 3 - 2	B+C :	kbp と	kbp
	B+D :	kbp と	kbp
	C+D :	kbp と	kbp

Q 3 - 3	
---------	--

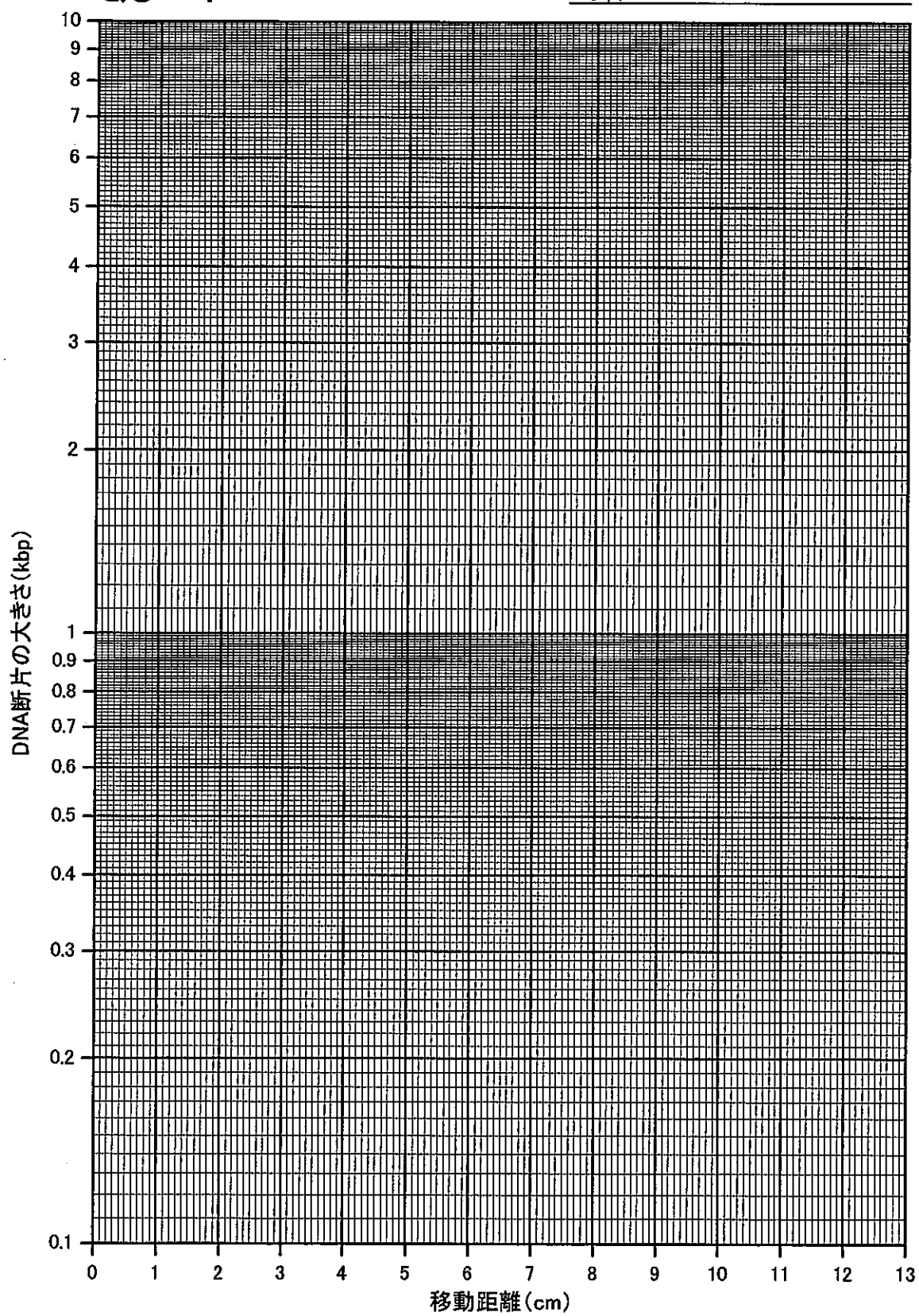
Q2-1

氏名 _____



Q3-1

氏名



国際生物学オリンピック訓練実習（第2次試験）

小観察 ①「土壌生物」

指導責任者：石井 規雄 千葉県立船橋高等学校教諭

Task 1 土壌生物のソーティング実習と形態的考察。

（制限時間60分）

Task 2 ササラダニの検索表作成。

（制限時間50分）

Task 3 ササラダニの口器の構造と落葉分解の考察。

（制限時間50分）

Task 1 (制限時間 60 分) : 土壌動物のソーティング実習と形態的考察

1. はじめに

ツルグレン装置で抽出された土砂と土壌動物を選別するのが、ソーティング法です。

2. 準備されている道具や試薬類

ガラス器具

9 cm シャーレ・ 4. 5 cm シャーレ・ 小型スポイト

装置と道具

ピンセット・ 柄付き針・ 固定用アルコール入り洗浄ビン・ 抽出サンプル・ 双眼実体顕微鏡

3. 実験手順

- ① 抽出サンプルの中身を全てシャーレに開けます。このときビンの壁に残っている可能性がありますから、洗浄瓶のアルコールを入れて、シャーレの中に洗い出します。シャーレの容量とアルコールの量を考えて、上手にシャーレ内に入れて下さい。
- ② シャーレを双眼実体顕微鏡のステージ中央に置いて、小型スポイトやピンセットを使い土壌動物だけを拾い出し、別に用意してある小型シャーレに入れます。この時に土砂が小型シャーレ内に入らないように注意します。ここで問題となる動物群は節足動物だけですから、それ以外の動物を拾い出す必要はありません。これは例外的に落下したものであって、その数量等については全く信頼性の無いデータとなります。ですからミミズ・センチュウ・陸生貝類などはそのまま大型シャーレの中に放置しておいてください。また生物としての特徴的な構造があっても、節足動物でないものは拾い出さないように注意してください。
- ③ 柄付き針で少しずつ土砂を動かして、土砂の下に紛れている土壌動物がいなくなを確認しますが、土砂を柄付き針で細かく砕くと、アルコールが濁ってソーティングの能率が低下します。崩さないように注意をして土砂を除いて、残っている土壌動物を拾い出します。
- ④ 全ての土壌動物を拾い出したら、小型シャーレの中の土壌動物を観察します。ここで見られる土壌動物は一つのサンプルですが、一般的に見られるものとして観察をします。即ち科学的な資料は、実験サンプルの数量から一般化することが大切ですが、ここでは時間が限られていますから、自分が見ているサンプルが例外的であるという事を考慮する必要はありません。ただし、ソーティングの結果見落とし数が多い場合は、大きな問題であるということを考慮してください。

問題

自分で責任を持ってソーティングした土壌動物を観察した結果だけから、体色・体形・大きさなどの特徴から、土壌動物が土壌環境に適応するために、どのように変化したのかを考察し、箇条書きで簡潔に要点を述べてください。

Task 2 (制限時間 50 分) ササラダニの検索表作成

1. はじめに

土壌節足動物の中で最も個体数が多く、種類も多様な動物はダニ目とトビムシ目です。土壌環境によってその割合は異なりますが、一般的な傾向として、熱帯ではダニ目が最も多く、土壌節足動物のツルグレン装置での抽出個体数の 50%～80% に達することがあります。それに対してトビムシ目は 15%～35% 程度です。しかし、千葉県ではダニ目が 40%～60% で、トビムシ目が 30%～40% になります。東北では、60% 以上がトビムシ目であるという例があります。従ってダニ目は土壌節足動物の中では特異な働きをしていると考えられます。そして落ち葉などの腐植質を食べているのがササラダニ類です。ここで以下の 8 種類のササラダニのプレパラートを用意しましたので、特徴を正確に捉えて、検索表を作成してください。

検索表とは、他の生物と比較して、特徴となる部分に着目して、幾つかに分類していく方法です。ここに 5 種類の果実の検索例を示します。

例) モモ・カキ・ブドウ・キウイフルーツ・ドラゴンフルーツ (サボテンの一種)

- | | | |
|---|--------------------------------|----------|
| 1 | 果実の中に種子が 10 個以上入っている…………… | 2 |
| | 果実の中の種子数は 10 個未満である…………… | 3 |
| 2 | 果肉の色は薄い桃赤色である…………… | ドラゴンフルーツ |
| | 果肉の色は黄色いものもあるが緑色が多い…………… | キウイフルーツ |
| 3 | 果実は 1 個ずつ売られている…………… | 4 |
| | 果実は幾つか集まり房状になっている…………… | ブドウ |
| 4 | 種子は中心に硬い殻に包まれて 1 個ある…………… | モモ |
| | 種子は無いものもあるが種子の入る場所が 8 室ある…………… | カキ |

2. 準備されている道具や資料

プレパラート

ヒメヘソイレコダニ・ヤマトクモスケダニ・フトゲナガヒワダニ・ナカタマリイブシダニ・コンボウイカダニ・ヤマトモンツキダニ・ハナビライレコダニ・オオハラミゾダニの8種類

装置と道具

テクニカルステージ付き、微動・粗動調節ネジ付き光学顕微鏡

3. 観察手順

プレパラートをテクニカルステージ上に設置して、ササラダニを視野の中心に置き、光量と絞りを調節して、最も見やすい状態にしておきます。その後倍率を高くして、それぞれのササラダニの特徴を捉えます。必ずしも高倍率で観察することが良いとは限りません。

種名	形態的特徴	体色・体長・その他
ヒメヘソイレコダニ		
ヤマトクモスケダニ		
フトゲナガヒワダニ		
ナカタマリイブシダニ		
コンボウイカダニ		
ヤマトモンツキダニ		
ハナビライレコダニ		
オオハラミゾダニ		

Task 3（制限時間50分）：ササラダニの口器の構造と落葉分解の考察

1. はじめに

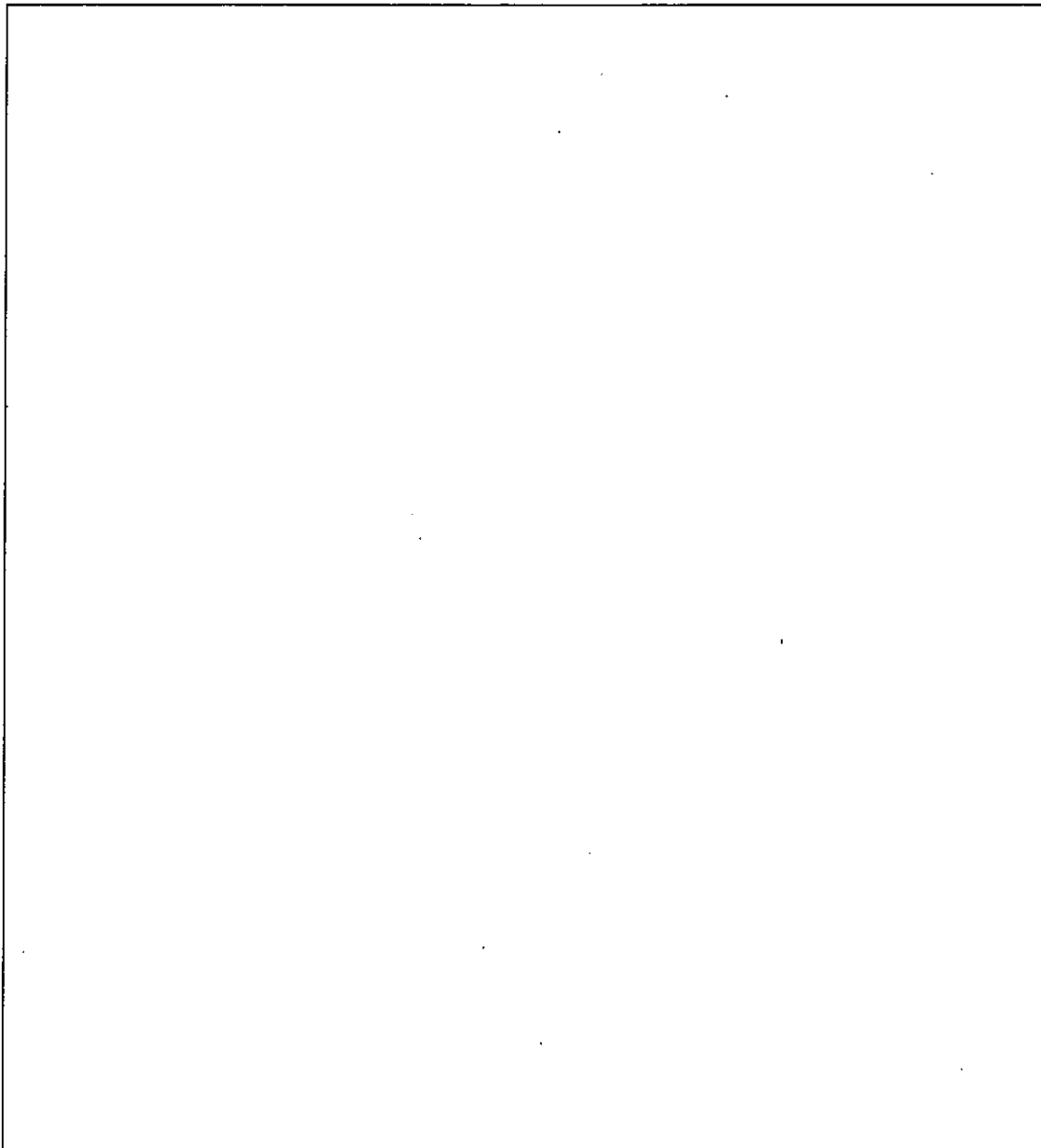
土壌の形成について、土壌動物としてササラダニが落ち葉を食べて細かく粉砕しています。それは、ササラダニ類に特有の口器の構造に関わっています。従ってこの口器を正確に描写し、その機能について考察しましょう

2. 準備されている道具等

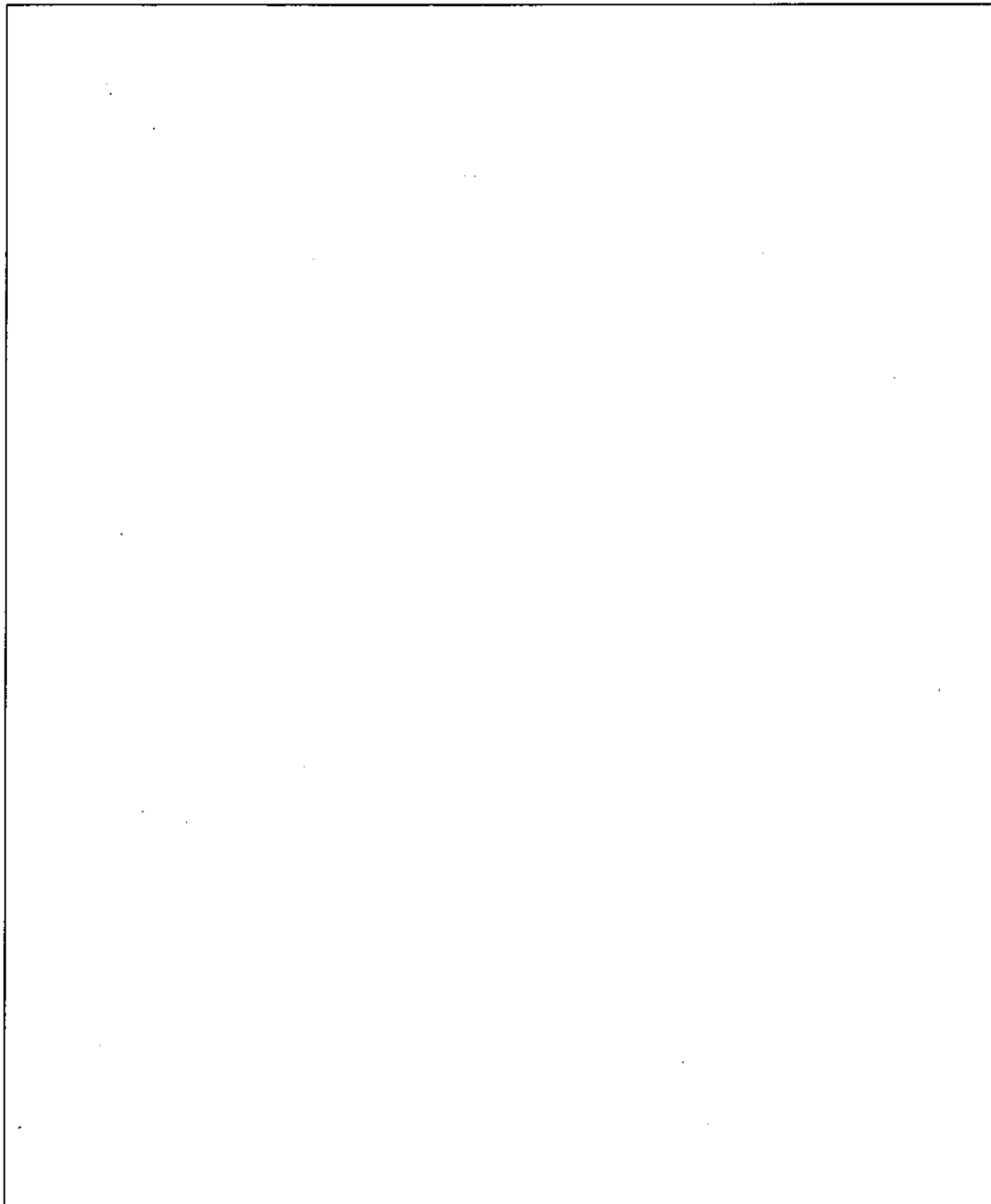
8種のササラダニのプレパラート・光学顕微鏡・スケッチ用鉛筆

3. 実験手順

用意されている8種のササラダニのプレパラートの中から、口器の形が良く見えるものを選んで、できるだけ正確にスケッチをしましょう。その位置及び構造から落葉分解の様子を考察してください。



口器から考えられる落ち葉分解の機能についての考察



問題解説

Task 1 (制限時間 60 分) : 土壌動物のソーティング実習と形態的考察

土壌動物の特徴として、狭い隙間を自由に移動出来ることから、小型であること、または細長いことが容易に理解できる。特に小型であることは、ミジンマルトビムシが観察できると理解は早い。またジムカデ類では、細長い体型に対して、歩脚が極めて短い。これらの特徴を捉えることが必要である。

体色の問題は、必ずしも言及する必要は無いことではあるが、普段見慣れていない土壌動物の世界ではこのような体色の動物が生息している事実を知ること大切ではある。欲張って考えれば、土壌環境という特殊な環境の中で生息することで、結果的に色素を失う傾向が見られる事を理解出来ると良い。

土壌の層状構造から、最上部は隙間が大きくそれに見合う形態の動物が生息しているが、A層以下からは次第に隙間が少なく、小さくなることから生息する土壌動物の形態も適応していることが分かればよい。そのためにも休憩時間にツルグレン装置をセットした部屋を用いたのである。

Task 2 (制限時間 50 分) ササラダニの検索表作成

ここでは8種類のササラダニのプレパラートが与えられている。従って同じ種類でも傾きが異なっているから、全く同じに見えるのは相当顕微鏡の使用に慣れている生徒である。今回の生徒達は、顕微鏡に関しては全くの素人であるように見える。従ってそれぞれの分類が正しく行われているということに主眼を求めず、見た物を如何に検索できる表を作成するかを評価した。従って実際の分類の際に用いる検索表とはかなり異なっていることは、今回問題としてはいいない。

Task 3 (制限時間 50 分) : ササラダニの口器の構造と落葉分解の考察

ここでは正確な図が描けるかを求めた。顕微鏡の使い方に慣れているかを知る上に必要な作業であるが、実際には期待できる図を描いた生徒はいなかった。

また口器の位置とその働きについて観察によって推定することも、顕微鏡に慣れている生徒で有れば、それ程難しくはないが、あまり顕微鏡観察に時間を使っている様子は無い。その結果として口器の位置関係と機能に関する答えは期待出来る物ではなかった。

ササラダニの中でもヒメヘソイレコダニのプレパラートを観察させた。口器は左右1対のペンチ状の鋏で上下にかみ合う部分と、左右からのペンチ状の即ち左右から挟み込む部分が1組あり、この3個のペンチで落ち葉が腐植されたものを切り分けている。従って落葉分解が効率良く行えるように出来ている。一つのプレパラートで観察することは難しいので、左右からの部分はカラー写真で、全員同じものを提示した。

国際生物学オリンピック訓練実習（第2次試験）

小観察 ②「植物の体構造と貯蔵物質」

指導責任者：吉崎 誠 生物学科教授

Task 1 植物組織の観察。

（制限時間 150 分）

東邦大学理学部 生物学科

植物組織の観察

植物組織系

◎植物の組織系 (Tissue system) には、J. Sachs(1868)の維管束に重点をおいた 1) 表皮系、2) 基本組織系、3) 維管束に分ける説、van Tieghem(1886)の中心柱に重点をおいた 1) 表皮系、2) 皮層系、3) 中心柱に分ける説、これに G. Haberlandt(1914)の生理解剖学的見地から 1) 分裂組織、2) 皮膚組織、3) 機械組織、4) 吸収組織、5) 同化組織、6) 通道組織、7) 貯蔵組織、8) 通気組織、9) 分泌組織、10) 運動組織、11) 感覚器、12) 刺激伝達組織の 12 系にわけた説があります。それぞれ、随分と古い時代に提唱されたものであるにもかかわらず、細胞や組織の起原や構造、機能や生理生化学的現象の解明にそれぞれの説が単独に取り上げられて論じられるよりも、それぞれの説を理解の上に、それぞれを使いわけて便利に使われています。

表皮系 (epidermal system)

◎表皮は体の最外層、たった 1 層の細胞から成り立っています。ここには、気孔と、表皮細胞が変形した毛があります。表皮細胞は、生活している細胞、すなわち核、細胞質、葉緑体等の原形質をもっている細胞です。外界に接していることから、細胞壁を厚くしたり、細胞壁のセルロースとクチン (cutin) が結合してクチクラ層を形成したり、スベリン (suberin) と結合してコルク化 (suberization) をおこしたりします。また、表皮の外側にワックスを分泌するものもあります。

◎表皮細胞が多細胞化したものがあります。たとえば、ラン科、サトイモ科の気根や、コルクガシのコルク形成層などです。ビンの栓に用いるコルクは、表皮の内側にコルク形成層を形成し、コルク周皮に発達したものです。

◎気孔 (stomata) は、表皮細胞が変形して 2 個の半月形の孔辺細胞 (guard cell) を形成し、体内に空気を取り込む窓口となっています。陸上植物は気孔を通じて空気の交換を行っています。クチクラ層は葉の上面に発達し、気孔は葉の下面に形成されます。

◎毛 (hair) は、表皮細胞が突出変形したもので、主として体の保護をしているものと考えられています。単細胞からなるものから多細胞になるもの、その形態や機能によって分類されています。

基本組織系 (fundamental tissue system)

◎Sachs(1868)の組織系に従うと、表皮系と維管束系をのぞく組織を基本組織系とよびます。基本組織系の中でふつうに見られるのは細胞壁が薄く、形の分化の少ない、薄膜柔組織 (thin-walled parenchyma) です。この組織細胞には葉緑体、澱粉粒、タンニン、鉱物質結晶、色素などの内容物が見られる内容物からこの組織を分類すると以下の 4 つになります。

イ. 貯蔵組織 (storage tissue) ロ. 同化組織 (assimilation tissue)

ハ. 通導組織 (aerenchyma) ニ. 分泌組織 (secretory tissue)

◎植物体を構成している組織の大部分は柔細胞か、柔細胞型のもので占められています。柔細胞からだけからなる組織は、外部からの力に弱い。そこで、組織中には丈夫な組織、すなわち器械組織が適当に分布して保護しています。柔組織の中で細胞壁の肥厚するもの

を厚膜柔組織(thick-walled parenchyma)とよび、器械組織(mechanical tissue)の一種として体の補強(保強)作用に関係しています。細胞が内側にむかって厚さを増すときに、遠心的な肥厚は、表皮、毛などの体表面におこり、点状または帯状の隆起となります。求心的に肥厚すると細胞質の入る空間が小さくなり、このような細胞を厚壁細胞(sclenchymatous cell)といいます。こういった細胞が集まって組織を形成したものを厚壁組織(sclenchyma)といいます。著しく細胞壁が肥厚し、膜孔(pit)を形成し、木化、木栓化して、補強細胞(stereid)となります。

◎厚角細胞(collenchymatous cell)とは、細胞の互いに接する角隅が特別に肥厚したもので、これのみの集まった組織を厚角組織(collenchyma)という。これには、接した角隅が共同肥厚した角隅肥厚組織(angular collenchyma)、細胞が切面的に配列している場合にはその細胞壁の内外両側面が共通に肥厚し、いわゆる板状に肥厚した組織を板状肥厚組織(lamellar collenchyma)という。細胞間に共通の大きな間隙があり、その間隙に共同の肥厚が起こるものを間隙肥厚細胞(lacunar collenchyma)という。いずれの型の肥厚のものも、肥厚していない細胞壁のところともよく連絡していて細胞相互間の養分の供給も円滑で、細胞自体の伸長は妨げられないようになっており、含水量も多い。細長く、両端がとがり、膜も厚い繊維状のものを厚膜繊維(sclerenchymatous fiber)という。

維管束と中心柱 (vascular system & central cylinder)

◎光合成をおもにクロフィルaとクロフィルbとで行なう植物を緑色植物といいます。緑色植物の中で、シダ植物と種子植物の体内には、根茎葉をつらぬいて木部と師部とからなり、水分と体内物質の移動通路となる維管束(vascular bundle)があります。維管束は木部と師部の配列様式によって、並列維管束、複並列維管束、包囲維管束、放射維管束などにわけられます。木部と師部の間に形成層が形成されるものを開放維管束(open vascular bundle)、形成層が形成されないものを閉鎖維管束(closed vascular bundle)といいます。

◎さきに述べたように、van Tieghem(1886)は組織系を 1) 表皮系、2) 皮層系、3) 中心柱に分けました。根茎葉の皮層の最内層を内皮とよび、内皮の内側の基本組織と維管束をまとめてひとつの構造とみたのが中心柱です。中心柱には原生中心柱、管状中心柱(網状中心柱、多環中心柱)、真正中心柱(退行中心柱、多条中心柱、背腹中心柱)、不斉中心柱、放射中心柱などがあります。

実際に観察した組織が、それぞれの説のどんな系に入るかを検討し、その形態と機能を勉強するのがこの訓練実習の目的です。

ジャガイモの観察(1) どんな植物なんだろう。

ジャガイモは一年中、スーパーマーケットの店頭にならぶ野菜です。私達の食生活に深く入り込んだ澱粉質の食材です。春早く、種芋が店頭にならびます。畑を耕し、肥料を鋤き込んで、買ってきた種芋を畑に植え込みます。気温が15℃をこえる頃に芋から1芽でもでているものを植え込むと、1週間ほどで土を押しつけて芽がでてきます。1ヶ月もすると、茎はどんどんのびて30cmをこえます。品種によっては、2ヶ月で1mをこえるほどに成長するものもあります。3ヶ月もすると茎の頂きに紫色の花をつけるようになります。

茎(stem)を見てみましょう。茎は丸い、すなわちどこもみな円柱状だとは思っていませんか?。土からのびている茎の最も高いところの茎は丸い。しかし、下になるにしたがい茎は4角だったり、5角形だったりします。なかには茎から翼がのびていることもあります。葉のつき方を葉序といいます。葉は茎に互生して生じます。葉は葉柄をもち、最初に出てくる葉は単葉です。次に出てくる葉は互生様複葉で、よく発達した大きな葉は対生に小複葉を生じています(羽状複葉: pinnate compound leaf)。小複葉の基部にさらに小複葉を生じています。

茎の上部に、長い花梗(かき)の上に10数個の花をつけます。花の付き方を花序といい、ジャガイモのつき方は集散花序(cymose inflorescens)といいます。1個の花をとってみましょう。花の裏を見ると、一番外側に、5枚の萼(sepal)があります。その内側にやはり5枚の花弁(petal)があり、これはそれぞれ融合して1枚の花弁を構成しています。すなわち合弁花冠(sympetalous corolla)です。その内側に5個の雄蕊(stamen)があります。中央に1本の雌蕊(pistil)があります。雌蕊を横に切ってみると、5つの部屋に分かれていることがわかるでしょう。花の各部は、雌蕊を中心として同心円状に配列し、放射相称に配列しています。これを花式であらわすと

☆K(5)C(5)A5Cp(5) となります。

☆:放射相称花、K:萼、C:花弁、A:雄蕊、Cp:雌蕊 であらわします。

()はそれぞれの器官が融合していることをあらわします。数字はそれぞれの器官の数をあらわします。雌蕊の数字にアンダーラインが引かれているのは子房上位の花であり、数字の上にバーが引かれていれば子房下位をあらわします。

花の構造をあらわすのに花式図があります。花の各部をマークを使ってあらわします。萼は山のある半月形、花弁は半月形、雄蕊は鼓形、雌蕊は円でその中がいくつの部屋に分かれているかを書き入れます。花の正面は花式図の上に○、×、○の中に×などしてあらわします。

設問1: 1) ジャガイモの花式図を描いてみよう。

1点

※訓練実習時にジャガイモの花は咲いていなかったなのでトマトの花を観察しました。

2) アブラナの花式は↓K₂₊₂C₄A₂₊₄Cp(2)です。

1点

アブラナの花式図を描いてみよう。

ジャガイモの観察（２）葉、茎、根の断面を観察しよう。

観察材料の用意

茎の断面を観察しましょう。ジャガイモをプランターごと研究室に持ち込めます。あるいは畑からジャガイモの茎をハサミで切りとって、コップに水を入れてさし、研究室に持ち込めます。野外や圃場から植物を切りとって研究室に持ち込む際には、必ずコップやフラスコに水を入れたものにさして持ち込みましょう。植物の基本代謝系は光合成で、水と光は植物にとっては不可欠であることを一時も忘れてはなりません。水あげが悪くてしておれてしまつては観察に不適です。いつも、自然に近いフレッシュな材料を観察する心掛けなしに植物の観察をしてはいけません。

用意するもの：貯蔵澱粉の観察には、新鮮で充実したイモを使います。

洗浄瓶１個、駒込ピペット（スポイトでもよい）１０本、シャーレ２０組、片刃のカミソリ刃２０枚、面相筆（マウザフ：細い筆で、人形の顔を描くのに用いたところからこの名がある）１０本。スライドガラス５０枚、カバーガラス５０枚。封緘液（顕微鏡観察にはスライドガラスに材料をのせ、水を１滴落としてからその上にカバーガラスをかけて観察します。しかし、水は容易に乾燥するので、材料が乾燥しないように工夫したものです。ここでは、グリセリン：アルコール：水を１：２：３の混合液を１００ミリリットル作ります。この混合液に１％サフラニン水溶液を半滴たらしめます（サフラニンは半滴で十分です。濃過ぎると何もかもが真っ赤に染まってしまう）。そうするとうすいピンクの容液ができます。これを封緘液として使います。混合液は液滴ビンに入れて使います。）

切片作成

葉の場合

葉は、よく成長した元気で大きな葉を選びます。葉の裏を返して、太い葉脈をさけて葉身の部分を幅５ｍｍほどの短冊をつくります。この短冊を４枚重ね親指と人差し指ではさみ、カミソリ刃で手前に引きながら薄い切片を作ります。ゆつくりと、何回ももう持ちきれないほどに切ります。葉は柔らかいので容易に薄い切片ができます。切片は、作ったらすぐにカミソリ刃ごとシャーレの水の中に入れます。たくさんの切片の中から、もっとも薄い切片を選び出して、面相筆でひろいあげてスライドガラスに乗せ、封緘液を１滴たらしめてからカバーガラスをかけて顕微鏡で観察を行います。

まず、１０倍の対物レンズと、１０倍の接眼レンズを確認し、対物レンズとプレパラートの間が接近していることを確認してから粗動ネジを調節して鏡筒を下げながら、ピントを合わせ、微動ネジでピントを合わせます（顕微鏡によっては鏡筒部でなく、ステージ部が下がるものがあります。）。このように低倍率のレンズからはじめることが顕微鏡観察の基本です。そして、最も薄く切れている切片を探します。

本訓練実習ではあらかじめ作成してあるプレパラートを観察し、すでに描いてあるスケッチを手本とします。

茎の場合

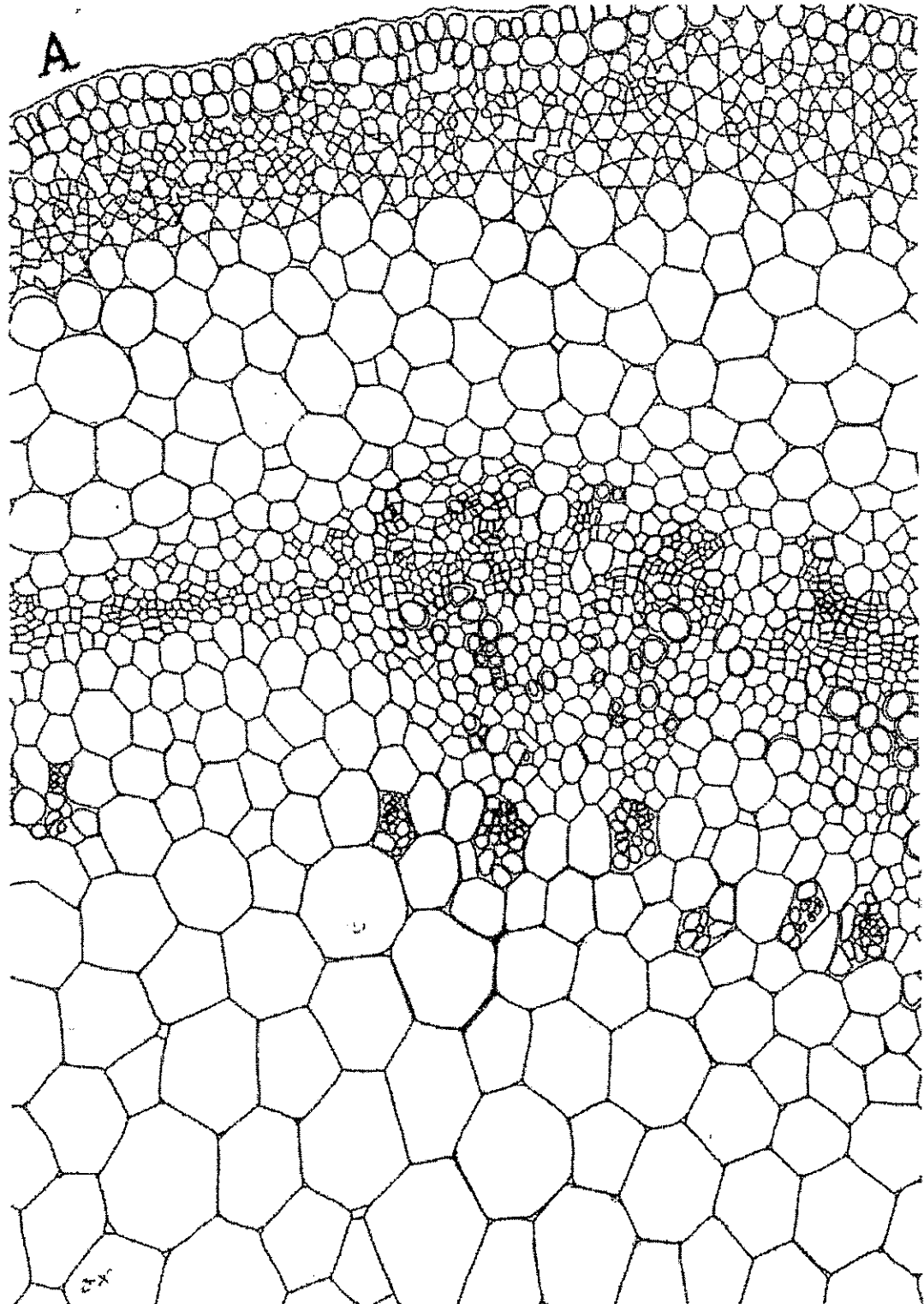
茎の切片を作成するには、よく成長して硬くなり、カミソリの刃も通らないような固い場所や、葉や枝が出ている節の部分を選んではいけません。ほどよく成長し、みずみずしく、はりのある節間部を選びましょう。太さ1 cm にみたない場所がよいでしょう。長さ2 cm ほどを切り取り、水を入れたシャーレに入れます。左手の親指、人さし指と中指で茎をつまみ、切り口を上に出します。まず、茎の成長方向に垂直にカミソリ刃を入れて、平らな切り口面を作ります。カミソリ刃を水でぬらし、切り口面のはじっこにのせ、カミソリ刃を手前に引きながら切片を作ります。切り取った切片は、カミソリの刃をシャーレの水の中で洗い落とします。これを繰り返して10～20枚の切片を作りましょう。左手の親指の爪先近くをかすめるようにカミソリ刃を引いて切ると薄い切片ができます。

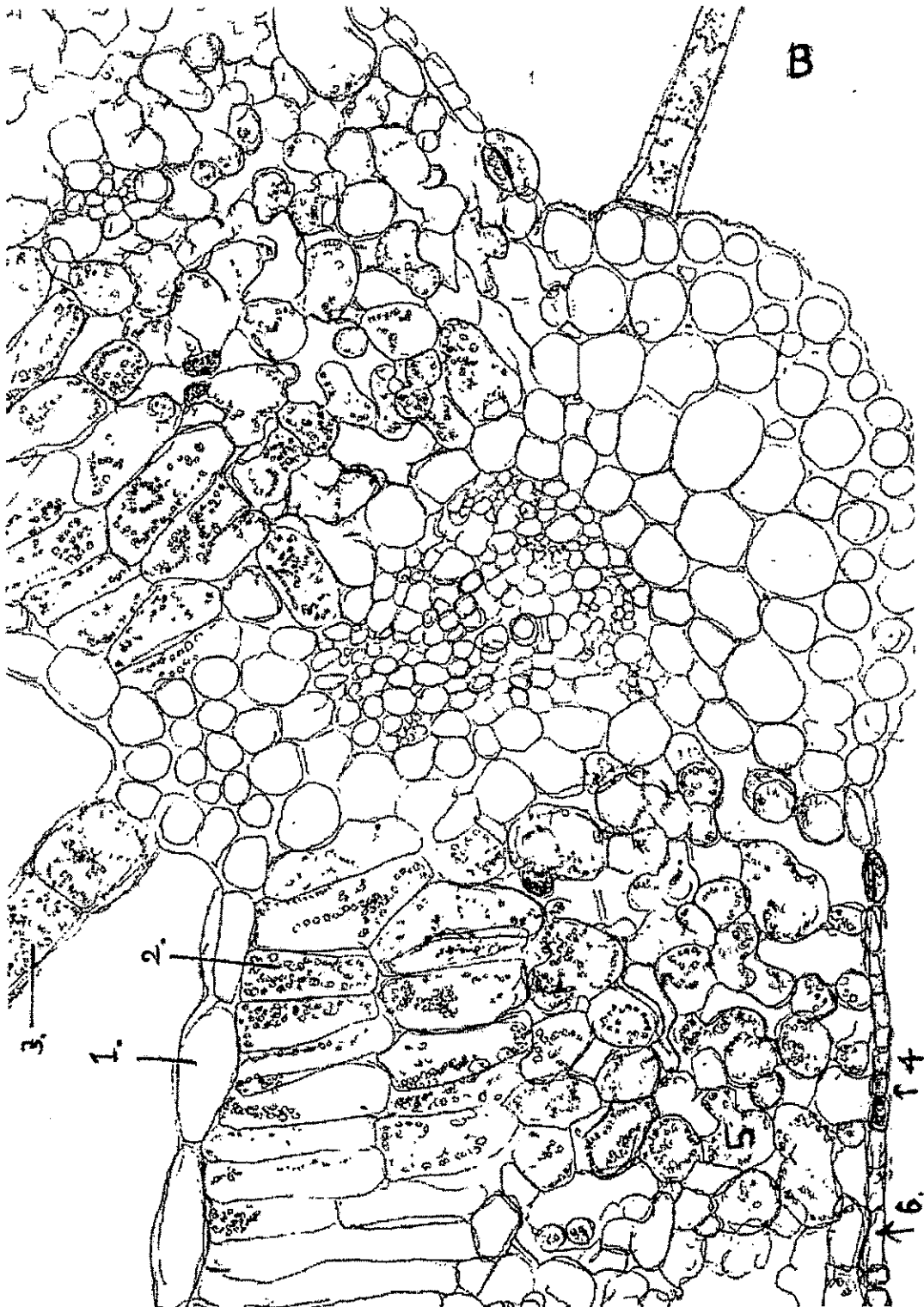
シャーレの水の中から、薄く切れた切片を面相筆でひろい、スライドガラスの上にのせます。切片は、全体が薄く切れている必要はありません。一部でも薄く切れていれば、観察には十分です。切片に、封緘液を1滴たらしめます。封緘液をたらしたら、カバーガラスをかけて、顕微鏡で観察しましょう。そして、最も薄く切れている切片を探します。探している間に、徐々にサフラニンの染色が進行し、細胞壁がピンクに染まってきます。厚い細胞壁は濃く、薄い細胞壁は薄く染まってきます。

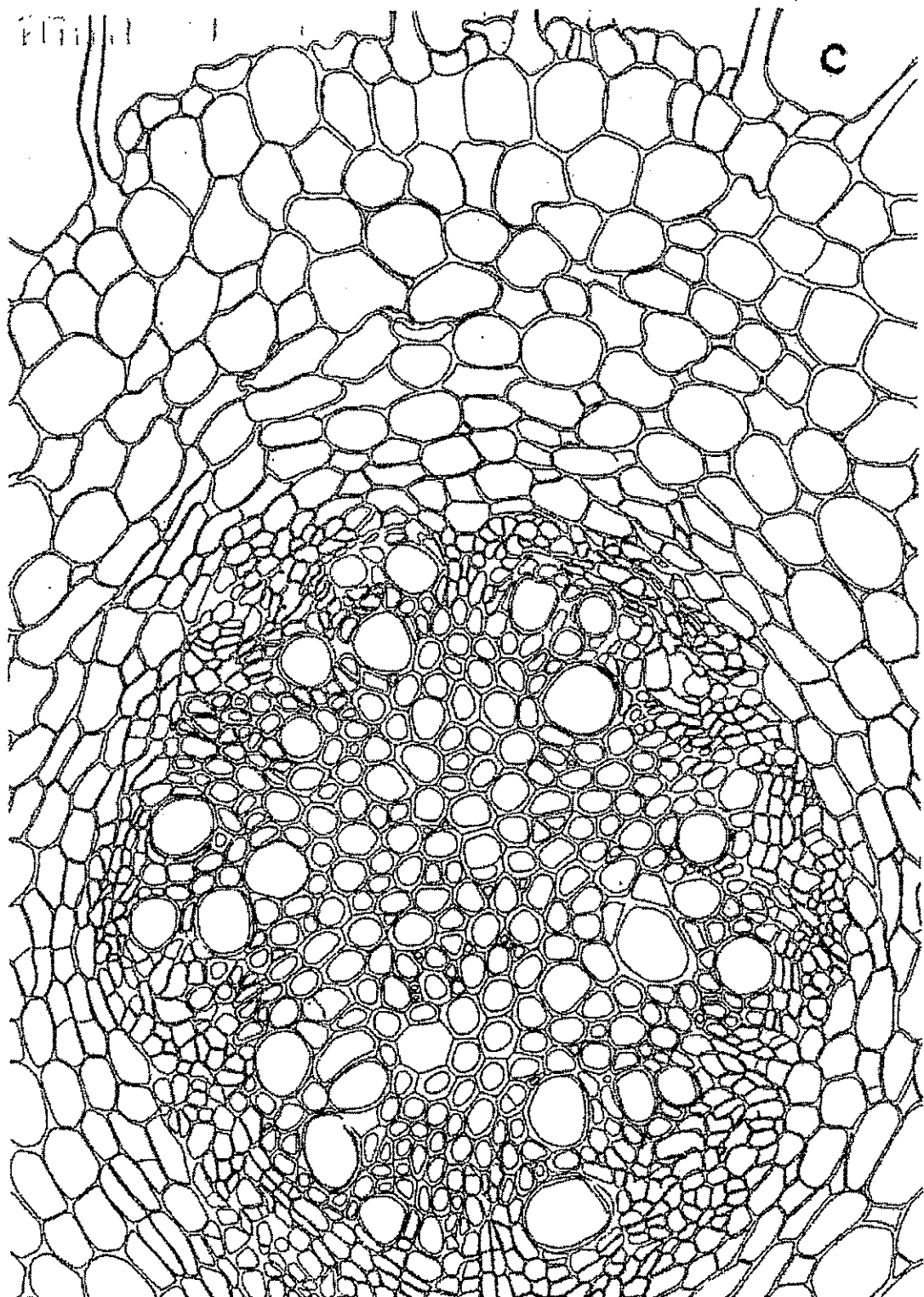
根の場合

根の場合も葉や茎と同様に切片をつくり、プレパラートとして観察します。

設問2：下の図はジャガイモのからだの切片をつくり、切片の一部を光学顕微鏡で観察してスケッチしたものです。下の問いに答えなさい。







問1 3枚の図は、ジャガイモのどこの部分の切片のスケッチか。(解答の例 花)
その理由も答えなさい。 6点

A:

B:

C:

問2 図中の1から5の各部の名称を答えなさい。(解答の例 6-根冠) 5点

1.

2.

3.

4.

5.

問3 図中の1から6の中で、葉緑体を含む細胞からなるものを3つあげ、組織名で答えなさい。 3点

1.

2.

3.

問4: ジャガイモは葉も、茎も、根も、イモもとてもみずみずしい体をしています。このように水っぽい植物が、短時間の間に1mにも成長するには、厚膜組織や、厚角組織が発達しているにちがいありません。先に作ったジャガイモの切片を観察して、1) 角隅肥厚組織、2) 板状肥厚組織を探し出さない。また、水はどのような組織細胞の中に、貯えられているのでしょうか。

3点

1) 角隅肥厚組織:

2) 板状肥厚組織:

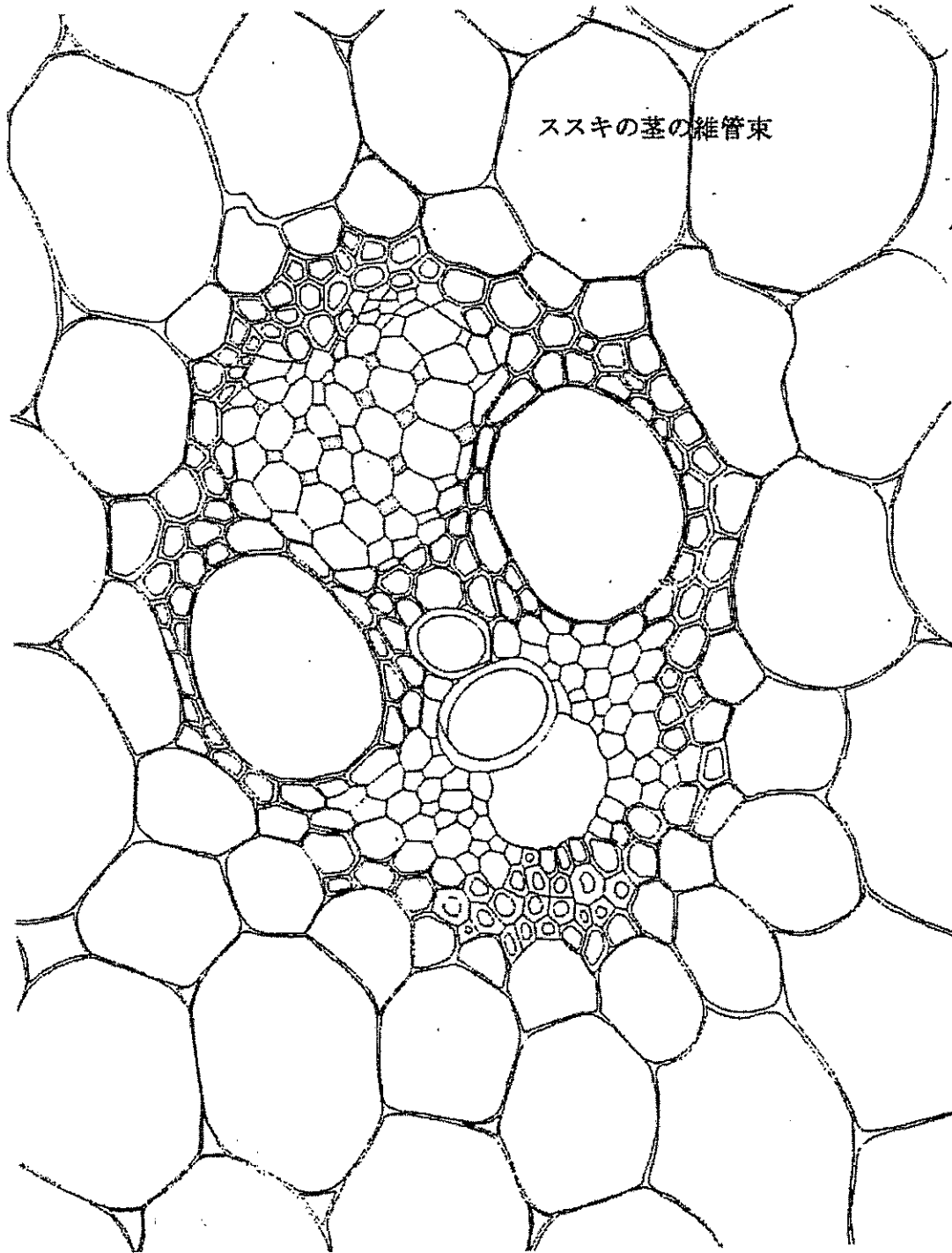
設問3: 先に作ったジャガイモの切片から、根、茎の維管束の種類は何か、また、それらはそれぞれどのような中心柱を構成しているかを答えなさい。 4点

茎の維管束	複並立維管束	茎の中心柱	真正中心柱
根の維管束	放射維管束	根の中心柱	放射中心柱

木部と師部との間に形成層があることから、解放維管束である。

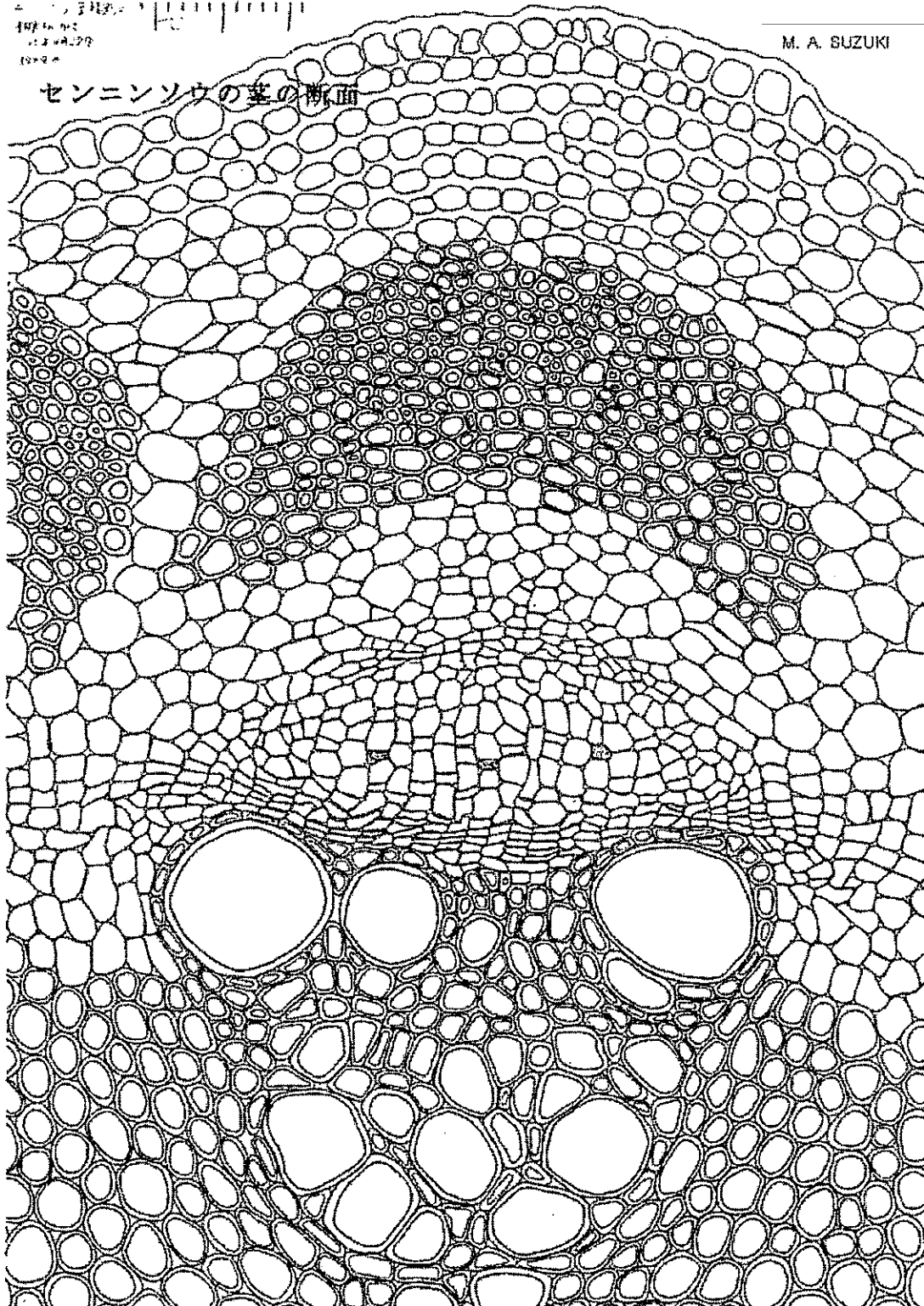
設問 4 :

問 1. ススキとセンニンソウの茎の切片を用意してあります。ススキの茎の維管束の種類はなにか。その中心柱の種類はなにか。同様に、センニンソウの茎の維管束の種類はなにか。その中心柱の種類はなにか。また、根の維管束と中心柱はなにかを答えなさい。



センニンソウの茎の断面
1972年

M. A. SUZUKI



ススキ

4 点

茎の維管束
根の維管束

茎の中心柱
根の中心柱

センニンソウ

4 点

茎の維管束
根の維管束

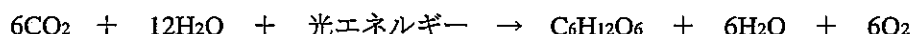
茎の中心柱
根の中心柱

ジャガイモの観察（３）貯蔵デンプンの観察をしよう。

イモを注意深く掘り起してみよう。根はヒゲ根が発達しています。土中の比較的浅いところに密に分枝しながら分布しています。そうっと土を掘り返すと、茎から直径２～３mmの白い柄のようなものが出て、その先端にイモがついています。ちょっとひっぱるとぷつんと切れてしまいます。注意深く土を落としながらすべてのイモを掘り起してみると、すべてのイモが柄の先についていることがわかります。中には、白い柄の先がふくらんで小さなイモがついているものも見つかります。この白い柄のようなものは匍匐枝(stolon)とよばれ、イモは匍匐枝の先端部分がふくらんで塊茎(tuber)となったものです。イモが茎である証拠は、イモの周囲にある芽の位置をたどってゆくと、茎と同じ位置に芽が位置していることを見いだすことでしょう。この小さな芽の部分を皮目(lenticel)といいます。イモは貯蔵組織です。イモを包丁で切ってみましょう。切り口を見ると、中央部分の髓部と外側の皮層部とからなり、その間に、周囲と色の変った、緻密な組織が見られます。ここが維管束がある部分です。皮層は最も外側を周皮とよび、褐色の皮の部分です。土から掘りあげたばかりのイモではこの周皮はよいにめくれ、とれてしまいます。デンプンは周皮の下の方にもっとも多く、内側にゆくに従い、しだいに減少し、維管束のさらに内側の中央部分は水っぽいこともわかることでしょう。

おはなし：光合成によるデンプンの形成

植物の基本代謝は光合成です。植物は光のエネルギーを利用して、二酸化炭素と水から有機物を合成し、酸素を発生します。光合成の場合は葉緑体で、陸上植物の光化学系Ⅰはクロフィルaが、光化学系Ⅱにはクロフィルbが関与し、光合成の結果生じる同化産物はデンプン(starch)です。



この反応は、葉緑体のチラコイドでおこなわれ、クロフィルが吸収した光エネルギーを利用して水の分解とATPの生成がおこなわれる明反応と、ストromaでおこなわれ、二酸化炭素を同化して糖にまで合成する暗反応とからなります。暗反応は酵素反応であり、光を必要としません。光合成の結果生成されたブドウ糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)は、葉緑体の中で澱粉($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)粒の形にかえられます。これを同化澱粉(assimilation starch)とよび、同化澱粉が葉緑体中に堆積するような葉を澱粉葉(amylophyll)とよびます。同化澱粉が葉緑体からほかの場所に輸送される時には、ふたたびブドウ糖に分解されてから、可溶性のショ糖の形にかえられて輸送されます。ショ糖は師管を通して成長のさかんな組織に運ばれて細胞壁、脂質、タンパク質の合成に使われるほかにデンプン、脂質、タンパク質などに合成されて果実、種子、根茎などに貯蔵物質として貯えられます。

貯蔵組織の細胞に運ばれて来たショ糖は、アミロプラスト(amyloplast)というデンプンを形成する能力をもつ色素体内で、 α -1,4結合のD-グルースのみからなるアミロースと、 α -1,6結合の枝分かれをもつアミロペクチンの集合体として澱粉粒の形で貯蔵されます。すなわち貯蔵澱粉(storage starch)です。澱粉粒には臍(hilum)とよばれる小粒があり、これを中心として層状の構造が見られる。層状構造は澱粉粒の形成が周期的かつ緻密であることを示すもの

です。偏光顕微鏡下では、結晶構造を示す光輝を示します。1個の amyloplast の中に、澱粉粒の層形成の中心（臍）が1個のものは、1個の amyloplast の中に1個の澱粉粒しか形成されないもので、これを単粒（simple grain）とよびます。これに対して、複数の澱粉粒が形成され、相接したまま大きくなって amyloplast の全体を占めるようになったものを複粒（compound grain）といいます。澱粉粒の形状は植物によって特徴があり、澱粉粒の形状観察からその植物を識別できるものです。貯蔵デンプンが蓄積されている細胞は基本組織系（fundamental tissue）に属し、薄膜柔組織（thin-walled parenchyma）からなる、貯蔵組織（storage tissue）に入ります。貯蔵澱粉は、種子、果実、塊茎、貯蔵根などに見られますが、どこにたくさんの澱粉を貯蔵するかは植物によって異なります。観察のしやすさ、澱粉の種類から、これまではジャガイモ、サツマイモがよく取り上げられています。細胞内にどのような形態で存在するのか、2) 澱粉粒はいかに成長して、最も成長した時にはどのような形態となるのか観察してください。

貯蔵デンプンの観察

用意するもの：貯蔵澱粉の観察には、新鮮で充実したイモを使います。

その他の用意するものはすでに、葉や茎の観察で使ったものを使います。

観察手順：

- 1) イモを包丁で5～7mm 角のブロックに切り、水を入れたシャーレに入れます。
- 2) ブロックを、親指、人さし指と中指でつまみ、切り口を上にしします。まず、平らな切り口面を作ります。カミソリ刃を水でぬらし、切り口面のはじっこにのせ、カミソリ刃を手前に引きながら薄い切片を作ります。
- 3) 切り取った切片は、カミソリの刃をシャーレの水の中に入れてやさしく洗い落とします。これを繰り返して10～20枚の切片を作ります。

コツ：左手の親指の爪先近くをかすめるようにカミソリ刃を引いて切ると、超薄い切片ができますが、たくさん作った中から最も薄い切片を探し出すのが最善です。

- 4) 切片を水で洗い、余分な澱粉を洗い流す。シャーレの水の中から、薄く切れた切片を面相筆（メンソウペ：細い筆で、人形の顔を描くのに用いたところからこの名があります）でひろい、スライドガラスの上にのせます。切片は、全体が薄く切れている必要はありません。1細胞層分の厚さの切片で、細胞内が破壊されていなければよいでしょう。切片が乾燥しないように、水を一滴たらし、カバーガラスをかけてプレパラートとします。水のかわりに、さきに作成したグリセリンアルコール混合液を使ってもいいですよ。

- 5) 顕微鏡観察で観察します。

- 6) 切片の表面の細胞に焦点を合わせて細胞の並びかたを観察してスケッチを描きます。細胞が破壊されておらず、細胞内の澱粉粒の存在が明確なものを選んでスケッチします。いつの場合でも、スケッチはできるだけ大きく、鉛筆はよく削って、線画で描きましょう。

- 7) 通常の透過光撮影のほかに、同じステージで、偏光フィルターを用いた観察も行ないます。

- 8) サツマイモの切片を用意しました。貯蔵デンプンが細胞内でどのような形で形成されるかを観察してください。

設問 5 :

問 1 光合成によって、グルコースはジャガイモのどこの何という細胞小器官でつくられるか。その細胞小器官の中でデンプンの形に変えられるが、このデンプンを何といいますか。
2 点

問 2 次の文章の空欄に適切な語を入れなさい。(解答形式 7-形成層) 6 点

維管束は「 1 」と「 2 」からなる。「 1 」は「 3 」と無機養分が移動し、「 2 」は有機養分が移動する。問 4 のデンプンは、ふたたびグルコースに分解され、ショ糖の形にかえられ、「 2 」の「 4 」を通過して貯蔵器官に運ばれる。これを「 5 」という。貯蔵器官の細胞でショ糖はデンプンに変えられる。このデンプンを「 6 」という。

1 -	2 -	3 -
4 -	5 -	6 -

問 3 ジャガイモの塊茎の 1 個の細胞の中には、ふつう何個くらいのデンプン粒が貯蔵されているでしょうか。実際に観察した結果をもとに、a から g の中から記号で答えなさい。また、1 個の細胞の中にデンプン粒の入っている状態を図示しなさい。

a 1～10 個	b 10～50 個	c 50～100 個	d 100～200 個
e 200～300 個	f 300～400 個	g 400 個以上	2 点

問 4. サツマイモのイモの 1 個の細胞の中には、デンプン粒はどのような形で形成されているかを図示しなさい。また、デンプン粒が貯蔵されるのは、根でしょうか。茎でしょうか。どうしたらそれが確かめられますか。
2 点

解答

設問 1 : 1) ジャガイモの花式図を描いてみよう。

1 点

4 重の同心円を描く。

中央に小円を書き入れ、5 室に割る。

次の円に 5 個の雄蕊を書き込む。

次の円に 5 枚の花弁を書き入れ、合弁花であることから花弁の末端をつなぐ。

次の円に 5 枚の萼片を書き入れ、これも合弁であることから末端をつなぐ。

2) アブラナの花式は $\downarrow K_{2+2}C_4A_{2+4}C_p(\underline{2})$ です。

1 点

アブラナの花式図を描いてみよう。

6 重の同心円を描く。

中央に小円を描き、2 室に割る。

次の円に 4 個の雄蕊を、さらに外側の円に 2 個の雄蕊を書き込む。

次の円に 4 枚の花弁を書き入れる。

次の円に 2 枚の萼片を書き入れ、次の円に前の萼片と十字対生に 2 枚の萼片を書き入れる。

設問 2 : 下の図はジャガイモのからだの切片をつくり、切片の一部を光学顕微鏡で観察してスケッチしたものです。下の問いに答えなさい。

問 1 3 枚の図は、ジャガイモのどこの部分の切片のスケッチか。(解答の例 花)

その理由も答えなさい。

6 点

A : 茎 理由. 真正中心柱をもつ。

B : 葉 理由. 柵状組織、海綿状組織、気孔をもつ。

C : 根 理由. 放射中心柱をもつ。表皮から単細胞生の根毛が出ている。

問 2 図中の 1 から 5 の各部の名称を答えなさい。(解答の例 6 - 根冠) 5 点

1. 上面表皮

2. 柵状組織

3. 海綿状組織

4. 下面表皮

5. 気孔

問 3 図中の 1 から 6 の中で、葉緑体を含む細胞からなるものを 3 つあげ、組織名で答えなさい。

3 点

1. 柵状組織

2. 海綿状組織

3. 気孔

問4：ジャガイモは葉も、茎も、根も、イモもとてもみずみずしい体をしています。このように水っぽい植物が、短時間の間に1mにも成長するには、厚膜組織や、厚角組織が発達しているにちがいありません。先に作ったジャガイモの切片を観察して、1) 角隅肥厚組織、2) 板状肥厚組織を探し出さない。また、水はどのような組織細胞の中に、貯えられているのでしょうか。

3点

- 1) 角隅肥厚組織：皮層に見られる。
- 2) 板状肥厚組織：突出した組織の皮層部に見られる。

水は、おもに薄膜柔組織細胞の液胞に貯えられている。

設問3：先に作ったジャガイモの切片から、根、茎の維管束の種類は何か、また、それらはそれぞれどのような中心柱を構成しているかを答えなさい。

4点

茎の維管束	複並立維管束	茎の中心柱	真正中心柱
根の維管束	放射維管束	根の中心柱	放射中心柱

木部と師部との間に形成層があることから、開放維管束である。

設問4

問1. ススキとセンニンソウの茎の切片を用意してあります。ススキの茎の維管束の種類はなにか。その中心柱の種類はなにか。同様に、センニンソウの茎の維管束の種類はなにか。その中心柱の種類はなにか。また、根の維管束と中心柱はなにかを答えなさい。

ススキ

4点

茎の維管束	並立維管束	茎の中心柱	不斉中心柱
根の維管束	放射維管束	根の中心柱	放射中心柱

茎の維管束に木部と師部との間に形成層が見られないことから、閉鎖維管束である。

センニンソウ

4点

茎の維管束	並立維管束	茎の中心柱	真正中心柱
根の維管束	放射維管束	根の中心柱	放射中心柱

茎の維管束に木部と師部との間に形成層があることから、開放維管束である。

設問 5 :

問 1 光合成によって、グルコースはジャガイモのどこの何という細胞小器官でつくられるか。その細胞小器官の中でデンプンの形に変えられるが、このデンプンを何といいますか。

2 点

葉緑体でつくられる。

光合成、すなわち炭酸同化作用によって形成される同化デンプンという。

問 2 次の文章の空欄に適切な語を入れなさい。(解答形式 7-形成層) 6 点

維管束は「 1 」と「 2 」からなる。「 1 」は「 3 」と無機養分が移動し、「 2 」は有機養分が移動する。問 4 のデンプンは、ふたたびグルコースに分解され、ショ糖の形にかえられ、「 2 」の「 4 」を通して貯蔵器官に運ばれる。これを「 5 」という。貯蔵器官の細胞でショ糖はデンプンに変えられる。このデンプンを「 6 」という。

1-木部

2-篩部

3-水

4-篩管

5-転流、

6-貯蔵デンプン

問 3 ジャガイモの塊茎の 1 個の細胞の中には、ふつう何個くらいのデンプン粒が貯蔵されているでしょうか。実際に観察した結果をもとに、a から g の中から記号で答えなさい。また、1 個の細胞の中にデンプン粒の入っている状態を図示しなさい。

a 1~10 個

b 10~50 個

c 50~100 個

d 100~200 個

e 200~300 個

f 300~400 個

g 400 個以上

2 点

答えは b である。a あるいは c と答えてもよいが、自分で観察した結果からは、間違いなく b である。1 個の細胞に 100 個以上のデンプン粒は入らない。

図は 1 個の細胞中に 10 個以上描くこと。

問 4. サツマイモのイモの 1 個の細胞の中には、デンプン粒はどのような形で形成されているかを図示しなさい。また、デンプン粒が貯蔵されるのは、根でしょうか。茎でしょうか。どうしたらそれが確かめられますか。

2 点

サツマイモのデンプンは、たくさんのデンプン粒からなる複粒である。

サツマイモのイモは根である。維管束は放射維管束、中心柱は放射中心柱である。

1. 芋
2. 芋
3. 芋
4. 芋
5. 芋
6. 芋
7. 芋
8. 芋
9. 芋
10. 芋
11. 芋
12. 芋
13. 芋
14. 芋
15. 芋
16. 芋
17. 芋
18. 芋
19. 芋
20. 芋
21. 芋
22. 芋
23. 芋
24. 芋
25. 芋
26. 芋
27. 芋
28. 芋
29. 芋
30. 芋
31. 芋
32. 芋
33. 芋
34. 芋
35. 芋
36. 芋
37. 芋
38. 芋
39. 芋
40. 芋
41. 芋
42. 芋
43. 芋
44. 芋
45. 芋
46. 芋
47. 芋
48. 芋
49. 芋
50. 芋
51. 芋
52. 芋
53. 芋
54. 芋
55. 芋
56. 芋
57. 芋
58. 芋
59. 芋
60. 芋
61. 芋
62. 芋
63. 芋
64. 芋
65. 芋
66. 芋
67. 芋
68. 芋
69. 芋
70. 芋
71. 芋
72. 芋
73. 芋
74. 芋
75. 芋
76. 芋
77. 芋
78. 芋
79. 芋
80. 芋
81. 芋
82. 芋
83. 芋
84. 芋
85. 芋
86. 芋
87. 芋
88. 芋
89. 芋
90. 芋
91. 芋
92. 芋
93. 芋
94. 芋
95. 芋
96. 芋
97. 芋
98. 芋
99. 芋
100. 芋

M. A. SUZUKI

ジャガイモの貯蔵デンプン

サツマイモの貯蔵デンプン