

生物チャレンジ 2008

実験試験 問題 1

「動物の解剖と観察」

問 題

第一部「ハマグリ類の観察」(60 分)：

ハマグリ of 解剖と観察を行ない、解剖の技術と観察力を評価する

第二部「ホタテガイ類の観察」(30 分)：

ホタテガイの観察を行ない、ハマグリとの比較から観察結果に対する理解力を評価する

第三部「二枚貝に似た動物の観察」(20 分)：

二枚貝類に似た動物の観察を行ない、動物の基本体制に関する理解力と知識を評価する

第一部「ハマグリを観察」(60 分)

ハマグリを解剖して観察しなさい。また、指定のスケッチを行うとともに、設問に答えなさい。スケッチは指定の用紙に、設問に対する解答は解答用紙に記号で記入しなさい。解剖の際には以下の解説を参考にするとい。なお、スケッチの内容や設問に関する質問は原則として受け付けない。

<解説 1：二枚貝類について>

二枚貝類は体の外部と内部共に左右相称で、蝶番(ちょうつがい)のある左右 2 枚の殻により体を包んでいる。頭部は退化的で触角や眼を欠く。口部には 1 対から 2 対の唇弁がある。他の軟体動物の口内に見られる歯舌は二枚貝類では失われている。足は腹側にあり、一般的に側扁して斧(おの)のような形をしており、砂や泥を掘るのに適している。外套膜(がいとうまく)は左右の両片に分かれており、背側で体と癒合(ゆごう)している。多くの二枚貝類では外套膜(がいとうまく)の後部は筋肉質になっており、出水管と入水管を形成している。出水管と入水管の発達程度は分類群によってさまざまである。外套膜(がいとうまく)の内側には左右にそれぞれ 2 枚の同形の鰓葉(さいよう)と呼ばれる鰓(えら)がある。基本的に体の前後に閉殻筋(貝柱)があるが、前後の閉殻筋の発達程度は分類群によってさまざまである。後閉殻筋の前方背側に心囊(しんのう)につつまれた心臓がある。心臓からは前後に動脈系が続いており、これにより体内各所に血液を送ることができる。開放血管系であり、静脈系は動脈系ほどには発達しない。口から始まる消化管は足の内部に続き、後閉殻筋の背側を通して出水管の基部に開口する肛門にいたる。足の内部には消化管のほかにも消化管から分岐した中腸線や生殖巣(卵巣または精巣)がみられる。中枢神経系としては、頭部に脳神経節、足内部に足神経節、後閉殻筋近くに内臓神経節の 3 つの神経節と、それらをつなぐ神経索がある。少数を除いて雌雄異体で、海生あるいは淡水生である。世界に約 2500 種、日本に約 1500 種が知られている。

<解説 2：ハマグリ類について>

ハマグリ *Meretrix lusoria* は軟体動物門 二枚貝綱 異歯目 マルスダレガイ科の二枚貝の 1 種で、日本近海の内湾の潮間帯や浅海の砂泥底に生息している。ハマグリは主要な食用貝のひとつであるが、生息に適した干潟などの減少により絶滅が心配されている。食用ハマグリ類としては、本種のほか、近年ではチョウセンハマグリ *Meretrix lamarckii* やシナハマグリ *Meretrix petechialis* が主に利用されている。(以下ではこれらのハマグリ類を総称する名称としてハマグリを表記を用いる。)

上の二枚貝類についての解説のほとんどはハマグリ類によくあてはまっている。ハマグリ類は二枚貝類の基本的特徴を観察するのにとても適した材料だといえるだろう。

＜ハマグリを観察と解剖＞

1. 食用のハマグリを1個体配布するので観察しなさい。なお、配付するハマグリは軟体部の観察を容易にするため、事前に約45℃のお湯に5分程度浸して麻酔し、片方の殻片の内面から外套膜（がいとうまく）を剥がすとともに、前後の閉殻筋（貝柱）を殻片からはずしてある。

2. ハマグリを殻片と軟体部を観察し、次の問に答えなさい。

問1. 次のうちから正しいものを2つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：殻は、殻の内部に散在する細胞が殻の成分を分泌することによって形成される
- B：殻は、外套膜（がいとうまく）の細胞が殻の成分を分泌することによって形成される
- C：殻は、外套膜（がいとうまく）の細胞が分泌した粘液に海中浮遊物が沈着することで形成される
- D：左右の殻は、蝶番（ちょうつがい）部分も含め、完全に対称な形態である
- E：左右の殻は、蝶番（ちょうつがい）部分を除いて、おおよそ対称な形態である
- F：左右の殻は、蝶番（ちょうつがい）部分を除いても、明らかに非対称な形態である

問2. 前後の閉殻筋の収縮によって殻は閉じられるが、殻を開くにはどのような力が使われているか。

次のうちから正しいものを1つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：外套膜（がいとうまく）の力によって開く
- B：足を膨らませることで開く
- C：蝶番（ちょうつがい）の靱帯（じんたい）によって開く
- D：入水管から水を取り込むことで開く
- E：鰓（えら）を膨らませることで開く

3. スケッチ課題1：ハマグリを腹側が手前、右殻片（右側の殻）が下になるよう解剖バットに置き、以下の構造の位置と形態がわかるようにスケッチをしなさい（「スケッチ課題1用紙」を使いなさい）。スケッチは必要に応じて複数の図を描いてよい（ただし、1枚の用紙におさめること）。このとき、左側の唇弁や外套膜（がいとうまく）など不要な部分は取り除いてもよい。口や肛門は探診糸（色付釣糸）を利用して開口部を探すとよい。探診糸を挿入する際には、消化管を突き破らないよう注意深くすすめること。

- A：右唇弁 B：左内鰓葉（さいよう）と左外鰓葉（さいよう） C：右外套膜（がいとうまく）
- D：足 E：出水管 F：入水管 G：前閉殻筋 H：後閉殻筋
- I：口 J：肛門

4. ハマグリの軟体部を観察し、次の問に答えなさい。

問3. 次のうちから正しいものを全て選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：外套膜（がいとうまく）の主な機能のひとつは、砂や泥を掘ることである
- B：外套膜（がいとうまく）の主な機能のひとつは、餌を集めて口に向けて運ぶことである
- C：足の主な機能のひとつは、呼吸をすることである
- D：足の主な機能のひとつは、砂や泥を掘ることである
- E：鰓葉（さいよう）の主な機能のひとつは、餌を集めて口に向けて運ぶことである
- F：鰓葉（さいよう）の主な機能のひとつは、呼吸をすることである

5. 口と肛門から探診糸（色付釣糸）を挿入して閉殻筋と消化管の関係を観察し、次の問に答えなさい。

探診糸を挿入する際には、消化管を突き破らないよう注意深くすすめること。

問4. 次のうちから正しいものを1つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：消化管は前閉殻筋と後閉殻筋の両方の背側を通っている
- B：消化管は前閉殻筋と後閉殻筋の両方の腹側を通っている
- C：消化管は前閉殻筋の背側、後閉殻筋の腹側を通っている
- D：消化管は前閉殻筋の腹側、後閉殻筋の背側を通っている
- E：消化管は前閉殻筋と後閉殻筋の両方の内部を貫通している
- F：消化管は前後の閉殻筋のうち一方だけ内部を貫通している

6. スケッチ課題2：解剖バサミとピンセットを用いて軟体部を切開し、口から肛門までの消化管の位置や経路を観察しなさい（肛門に近い部分は切開しなくても探診糸を利用して観察できる）。また、脳神経節、足神経節、内臓神経節の3つの神経節を探しなさい。解剖の後、消化管と3つの神経節の位置と形態がわかるように1つの図としてスケッチをしなさい（「スケッチ課題2用紙」を使いなさい）。

＜補足説明＞ 解剖の際には、まず最初に左側の唇弁や外套膜（がいとうまく）および鰓葉（さいよう）など不要の部分を取り除いてから始めるとよい。不要部分の切除後、背側の殻頂に近い部分の軟体部にある少し色の濃い領域（ケーベル氏器官）を開くと胃が露出するので、そこらから消化管に沿って軟体部の切開をすすめると作業が容易である。なお、生殖巣や、消化管から分岐している中腸線は取り除いてよい。各神経節は小球状で見失いやすいが、他の組織とは色が異なり赤色あるいは濃いピンク色をしているので注意深く探すとよい。

7. 制限時間になったら合図をするので、解答用紙とスケッチ2枚は机の上に裏向きにふせなさい。試料のハマグリとスケッチ2枚は回収します。解答用紙と解剖用具は次の課題に使うので、そのまま机の上に残しておくこと。

第二部「ホタテガイの観察」(30分)

ホタテガイを観察しなさい。指定のスケッチを行うとともに、設問に答えなさい。スケッチは指定の用紙に、設問に対する解答は解答用紙に記号で記入しなさい。観察に際しては、自由に解剖をしてよい。なお、スケッチの内容や設問に関する質問は原則として受け付けない。

＜ホタテガイの観察と解剖＞

1. ホタテガイを配付するので観察しなさい。なお、配付するホタテガイは軟体部の観察を容易にするため、事前に片方の殻片の内面から外套膜（がいとうまく）を剥がすとともに、閉殻筋を殻片からはずしてある。
2. スケッチ課題3：ホタテガイの腹側が手前、右殻片（右側の殻）が下になるよう解剖バットに置き、以下の構造の位置と形態がわかるようにスケッチをしなさい（「スケッチ課題3用紙」を使いなさい）。スケッチは必要に応じて複数の図を描いてよい。このとき、必要に応じて不要な部分（例えば、左外套膜（がいとうまく）、左鰓葉（さいよう）など）を取り除いてもよい。口や肛門は探診糸（色付釣糸）を利用して開口部を探すとよい。探診糸を挿入する際には、消化管を突き破らないよう注意深くすすめること。

A：右鰓葉（さいよう） B：右外套膜（がいとうまく） C：閉殻筋
D：足 E：口 F：肛門

3. ホタテガイを観察し、次の問に答えなさい。

問5. ホタテガイの2枚の殻について、次のうちから正しいものを1つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：ハマグリが左右にあるのとは異なり、背腹にあり形が異なる
- B：ハマグリが左右にあるが、明らかに非対称な形態である
- C：ハマグリが左右にあり、蝶番（ちょうつがい）部分を除いて、ほぼ対称な形態である
- D：ハマグリが左右にあるのとは異なり、前後にあり形が異なる

問6. ホタテガイの生活の様子について、次のうちから正しいものを1つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：頭側を下にして砂にもぐって生活している
- B：頭側を上にして砂にもぐって生活している
- C：右側の殻を下にして左殻を帆のように立てて海面で生活している
- D：左側の殻を下にして右殻を帆のように立てて海面で生活している
- E：右側の殻を下にして海底によこたわって生活している
- F：左側の殻を下にして海底によこたわって生活している

問7. ホタテガイの大きな閉殻筋（貝柱）について、次のうちから正しいものを1つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：ハマグリの前閉殻筋と相同である
- B：ハマグリの後閉殻筋と相同である
- C：ハマグリの前後の閉殻筋と相同な構造が癒合（ゆごう）したものである
- D：ハマグリの前後の閉殻筋とは全く別の左右方向の筋肉である
- E：ハマグリの閉殻筋とは異なり、前後方向に向かう筋肉である
- F：ハマグリの閉殻筋とは異なり、背腹方向に向かう筋肉である

4. 制限時間になったら合図をするので、解答用紙とスケッチ1枚は机の上に裏向きにふせなさい。試料のホタテガイとスケッチ1枚は回収します。解答用紙と解剖用具は次の課題に使うので、そのまま机の上に残しておくこと。

第三部「二枚貝に似た動物の観察」(20 分)

二枚貝に似た 2 種の動物、「甲」と「乙」を配付する(下図参照)。これらを観察し、以下の設問に答えなさい。各問に対する解答は解答用紙に記号で記入しなさい。観察に際しては、自由に解剖をしてよい。なお、設問に関する質問は原則として受け付けない。

注意：試料によっては完全な状態でないものがあります(大きな損失部分はありません)。試料が壊れている場合は、下の図を参考にして全形を把握してください。

甲



乙



＜二枚貝に似た動物の観察と解剖＞

1. 「甲」「乙」の両方の動物を観察し(自由に解剖してよい)、次の問いに答えなさい。

問 8. 選択肢から「甲」「乙」に共通した特徴を全て選び、回答欄に記号を記入しなさい。

- A：体制は左右相称である
- B：体制は放射相称で、放射状にならんだ多数の触手をもっている
- C：体制は五放射相称で、5 片の殻をもっている
- D：プランクトン生活に適した体制である
- E：遊泳生活に適した体制である
- F：二枚貝類と同様に体の右左それぞれに発達した殻をもっている
- G：二枚貝類の足と相同な肉質の柄部をもっている
- H：二枚貝類の後閉殻筋と相同な閉殻筋をもっている
- I：外套膜(がいとうまく)の一部からなる発達した出水管と入水管をもっている
- J：体節に分節した体と、剛毛を多数備えた疣肢(いぼあし)状構造をもっている
- K：細い触手が多数付属する螺旋状に巻いた腕状の構造を 1 対もっている
- L：体の尾部に 1 本の発達した脊索をもっている
- M：体節に分節した体と、細かい分節のある肢(あし)状の構造をもっている
- N：背側には体を守る殻を、腹側には這い回るのに適した肉質の足をもっている
- O：複数の腕状で肉質の足と、1 対の発達した眼をもっている

問 9. 問 8 の選択肢から「甲」だけにあてはまる特徴を 1 つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

問 10. 問 8 の選択肢から「乙」だけにあてはまる特徴を 2 つ選び、回答欄に記号を記入しなさい。

問 11. 「甲」について、選択肢から正しい動物門名と動物名を選び、回答欄に記号を記入しなさい。

動物門名	動物名
A：軟体動物門	a：ミドリヒモムシ
B：環形動物門	b：ミドリユムシ
C：節足動物門	c：ミドリイガイ
D：腕足動物門	d：ミドリボヤ
E：棘皮動物門	e：ミドリシャミセンガイ

問 12. 「乙」について、選択肢から正しい動物門名と動物名を選び、回答欄に記号を記入しなさい。

動物門名	動物名
A：軟体動物門	a：エボシガイ
B：環形動物門	b：シロウリガイ
C：節足動物門	c：フナクイムシ
D：腕足動物門	d：ナミガイ（シロミル）
E：棘皮動物門	e：シロスジフジツボ

2. 制限時間になったら合図をするので、解答用紙は机の上に裏向きにふせなさい。試料の 2 種の動物と解答用紙は回収します。その後、指示に従って解剖用具を片付けなさい。

解答用紙

受験番号： _____ 氏名： _____

第一部

問 1 の答え. _____

問 2 の答え. _____

問 3 の答え. _____

問 4 の答え. _____

第二部

問 5 の答え. _____

問 6 の答え. _____

問 7 の答え. _____

第三部

問 8 の答え. _____

問 9 の答え. _____

問 10 の答え. _____

問 11 の答え. _____

問 12 の答え. _____

スケッチ課題1 用紙： 用紙は縦・横どちら向きに使ってもよい

受験番号： _____ 氏名： _____

スケッチ課題2用紙： 用紙は縦・横どちら向きに使ってもよい

受験番号： _____ 氏名： _____

スケッチ課題3用紙： 用紙は縦・横どちら向きに使ってもよい

受験番号： _____ 氏名： _____

生物チャレンジ2008

第二次試験

問題2：「植物系統分類学分野」

ー微細藻細胞の観察ー

準備されているもの

- ・微細藻3種の培養株
- ・生物顕微鏡
- ・スライドガラス(9枚)
- ・カバーガラス(10枚)
- ・パストールピペット(7本)
- ・ニップル
- ・油浸オイル
- ・マイクロメーター模型
- ・ヘマトキシリン染色液
- ・ヨウ素-ヨウ化カリウム溶液
- ・レンズクリーナー
- ・レンズペーパー
- ・キムワイプ
- ・試験管立て
- ・マイクロチューブ立て

はじめに

動物や陸上植物のような大型の多細胞生物とは異なり、微細藻のような単細胞生物の同定や分類には、高倍率の光学顕微鏡や電子顕微鏡を駆使して細胞小器官の特徴などを捉えることが不可欠である。また、遺伝子の塩基配列などを比較することも、細胞小器官の由来や種の類縁関係を調べる上で必要となる。

本実験問題では、3種の微細藻についてそれらの細胞を100倍の対物油浸レンズを用いて光学顕微鏡観察し、細胞内の特徴を比較する。観察した微細藻の1種については、さらに電子顕微鏡写真をもとに細胞内の特徴を観察する。最後に細胞小器官に着目して、遺伝子の塩基配列の比較も行なう。

課題 1

机の上に海産微細藻の培養株を3つ用意した。それらはそれぞれ *Porphyridium* sp. {紅藻 (紅色植物門)}、*Pyramimonas amyliifera* {プラシノ藻 (緑色植物門)}、*Gymnochlora stellata* {クロララクニオン藻 (クロララクニオン植物門)} である。これら3種を以下の手順で観察し、解答用紙の形質表を完成させよ。

手順

1. まず、*Porphyridium* sp.のプレパラートを作成し、ステージにのせて1,000倍の倍率で細胞にフォーカスを合わせ、対物絞りをほぼ最適な条件に調整せよ。ここでTAを呼び、良い状態で観察できているか、確認してもらう。
2. 次に*Porphyridium* sp.において最も典型的な細胞の外形を、図示せよ。図は細胞の輪郭のみでよい。(観察項目1)
3. あらかじめセットされている接眼マイクロメーターを用いて、本種の細胞の大きさを最も的確に表すように測定し、解答欄に記せ。(観察項目2)
4. 次にそのまま*Porphyridium* sp.について観察項目3〜7を観察し、形質を記せ。
5. *Pyramimonas amyliifera*、*Gymnochlora stellata*についても同様に観察し、形質を記せ。
6. 観察項目8については、各種の細胞を別紙①の手順に従ってヘマトキシリン染色液で染色後に観察し、形質を記せ。
7. 観察項目9については、各種の細胞を別紙①の手順に従ってヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色後に観察し、形質を記せ。

観察項目

- | | | | |
|-----------|--------------------|----------|-------------------|
| 1. 細胞の外形 | 2. 細胞の大きさ | 3. 運動様式 | 4. 鞭毛の数 (無い場合は0本) |
| 5. 葉緑体の色 | 6. 葉緑体の数 (無い場合は0個) | 7. 眼点の有無 | |
| 8. 核の数と位置 | 9. 貯蔵物質はデンプンか否か | | |

課題 2

紅藻（紅色植物）とプラシノ藻（綠色植物）はどちらもシアノバクテリアを細胞内に取り込み維持すること（一次共生）によって葉緑体を獲得したことが知られている。また、一次共生による葉緑体の獲得は生物進化の過程で一度しか起こらなかったと考えられている。もしこれが真実だとすれば紅藻と緑藻の葉緑体はたった一つのシアノバクテリアから進化したことになる。下の（１）～（３）に答えよ。

- （１）観察結果の表を見ると *Porphyridium* sp. と *Pyramimonas amyliifera* の葉緑体は色調が異なることが示されている。これは、葉緑体に含まれる光合成色素の組成がそれぞれ異なるためであると考えられる。各生物に含まれる主要光合成色素を２つずつ記せ。
- （２）両生物の葉緑体の祖先となったシアノバクテリアは、現生のシアノバクテリアと同じ色素をもっていたとすると、どのような光合成色素組成だったと考えられるか？主要な光合成色素を２つ記せ。
- （３）（１）と（２）をふまえて、現在見られる緑藻と紅藻の光合成色素組成の違いはどのような進化によって生じたと考えられるか、説明せよ。

課題 3

原核生物のゲノムと真核生物の核ゲノムにはさまざまな違いが存在するが、問 1 で観察したクロラクニオン藻 *Gymnochlorella stellata* の細胞には原核生物的なゲノムと真核生物的なゲノムがそれぞれ複数存在する。次ページの図 1 ～ 5 は、この生物の細胞を透過型電子顕微鏡で撮影した写真である (Phycological Research 1996 44:37-45 より改変)。これらの写真をよく観察し、下の (1) ～ (4) に答えよ。

- (1) 細胞小器官である A～D の名称を記せ。
- (2) 細胞小器官 A～D のうち、原核生物の特徴をもつゲノムを含むものおよび真核生物の特徴をもつゲノムを含むものをそれぞれ記号で記せ。
- (3) 全てのゲノムに存在する仮想的な遺伝子 g の塩基配列を、*G. stellata* の細胞小器官のゲノムにおいて調査し、既に知られているいくつかの遺伝子 g の配列と合わせて各配列間の類似度を求めた結果、下の表のようになった。遺伝子 g の塩基置換速度は常にほぼ一定であると仮定して、表の①～④に当てはまる細胞小器官を A～E から選んで、記号で記せ。

表. 各ゲノム間での遺伝子 g の塩基配列の類似度

	シアノバクテリア	好気性細菌	緑藻 (核)	①	②	③	④
シアノバクテリア	100	83	72	96	82	75	74
好気性細菌		100	74	84	95	76	75
緑藻 (核)			100	75	77	98	91
①				100	85	73	74
②					100	73	75
③						100	90
④							100

数字は類似度 (%) を示す。

- (4) 細胞内小器官 E はどのように生じたと考えられるか、記せ。

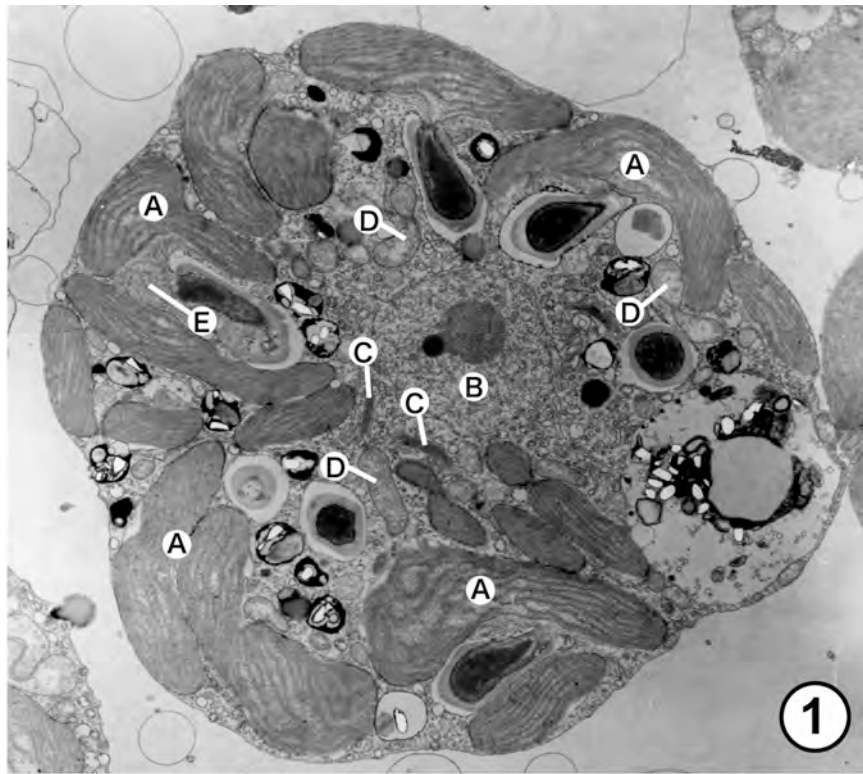


図1. *G. stellata* の細胞切片の全体像

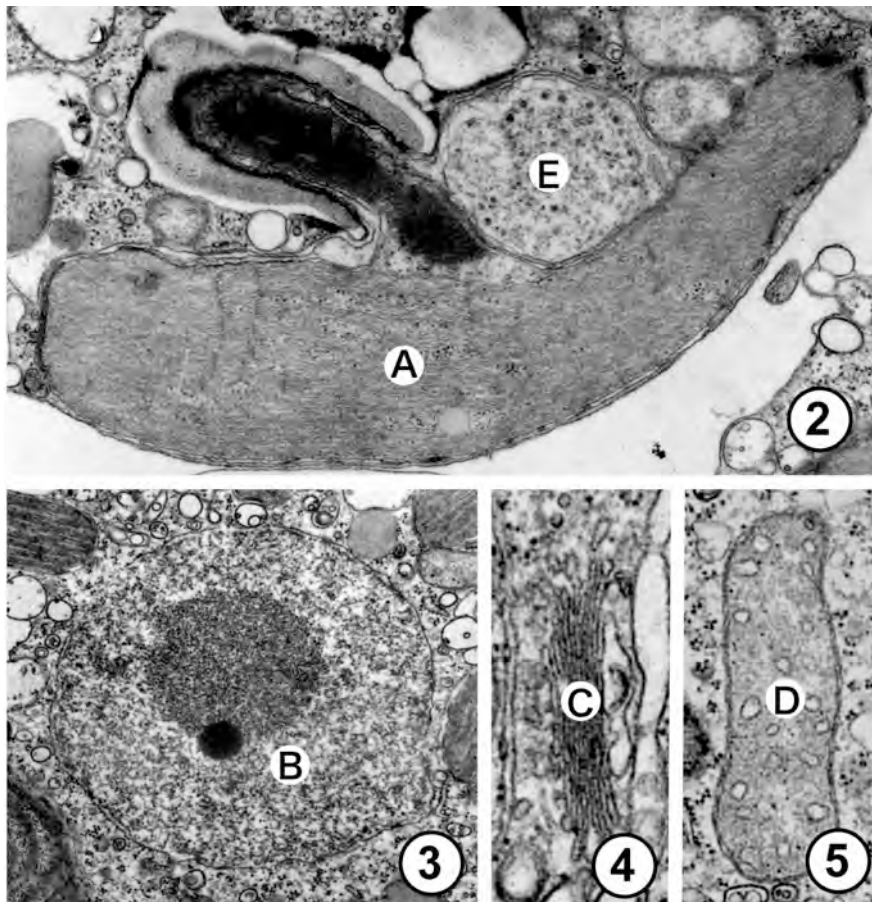


図2-5. *G. stellata* の細胞小器官の切片像

問題 2 解答用紙（1）

二次受験番号 _____ 氏 名 _____

課題 1

観察項目	<i>Porphyridium</i> sp.	<i>Pyramimonas amylifera</i>	<i>Gymnochlorella stellata</i>
1. 細胞の外形 (図示)			
2. 細胞の大きさ			
3. 運動様式			
4. 鞭毛の数 (無い場合は 0 本)	本	本	本
5. 葉緑体の色	紅色	緑色	緑色
6. 葉緑体の数 (無い場合は 0 個)	個	個	個
7. 眼点の有無			
8. 核の数と位置	1 個／細胞周縁部		
9. 貯蔵物質はデンプンか否か	デンプンである		

問題 2 解答用紙（2）

二次受験番号 _____ 氏 名 _____

課題 2

(1)

<i>Porphyridium</i> sp.		<i>Pyramimonas amylifera</i>	

(2)

--	--

(3)

--

問題 2 解答用紙 (3)

二次受験番号 _____ 氏 名 _____

課題 3

(1)

A	B	C	D
---	---	---	---

(2)

原核生物の特徴をもったゲノム	真核生物の特徴をもったゲノム

(3)

①	②	③	④
---	---	---	---

(4)

--

生物チャレンジ 実験試験 3

2008 年 8 月 22 日

筑波大学

2B401, 403

実験 1：アルコール脱水素酵素の活性染色

- Tube No. 1: ADH 標準品 (*Saccharomyces cerevisiae*) Sigma A7011-7.5KU
Tube No. 2: 酵母抽出液 (振盪培養) グルコース培地 [YPD:2%(w/v) Yeast extract, 1% (w/v) Pepton, 2%(w/v) Glucose]
Tube No. 3: 酵母抽出液 (振盪培養) グリセロール培地 [YPG:2%(w/v) Yeast extract, 1% (w/v) Pepton, 2%(w/v) Glycerol] (non-fermentable)
Tube No. 4: 酵母抽出液 (静置培養) グルコース培地 [YPD:2%(w/v) Yeast extract, 1% (w/v) Pepton, 2%(w/v) Glucose]
Tube No. 5: 酵母抽出液 (静置培養) グリセロール培地 [YPG:2%(w/v) Yeast extract, 1% (w/v) Pepton, 2%(w/v) Glycerol] (non-fermentable)

《酵母の培養》

振盪培養では 200 rpm で振り混ぜて培養に十分な酸素が与えられる様にした。
静置培養では培養容器の口をパラフィルムで覆いかつ、静置して空気中の酸素が細胞に与えられない様にした。

《細胞抽出液の調整》

細胞を遠心 (1000 x g, 10 min) により回収し、0.5 mL の抽出バッファーに懸濁した。超音波破碎機で 30 s x 10 回処理し、5000 x g, 10 min で遠心した上清を抽出液とした。Bio-Rad protein assay kit で BSA を標品としてタンパク質量を 5 µg/µL となる様にした。3.5 µl 抽出液に 3.5µL のサンプルバッファーを加えた。

- 抽出バッファー (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % glycerol)
- 2 x サンプルバッファー (100 mM Tris-Cl (6.8), 10% Glycerol, 0.1 % Bromophenol blue)

《使用する機器》

アトー電気泳動槽 コンパクトスラブ AE-7300 型
c パジエル 10 % アクリルアミドゲル

泳動用バッファー (0.129 M Glycine, 0.025 M Tris, 14.4 g Gly, 3 g Tris/L)
100 mL

活性染色用溶液 (0.2 M Tris HCl pH 8.0, 6 mg nitro blue tetrazolium, 0.4 mg phenazine methosulfate, 10 mg NAD⁺, 0.8 mL ethanol, made up to 20 mL with distilled water. 20 mL

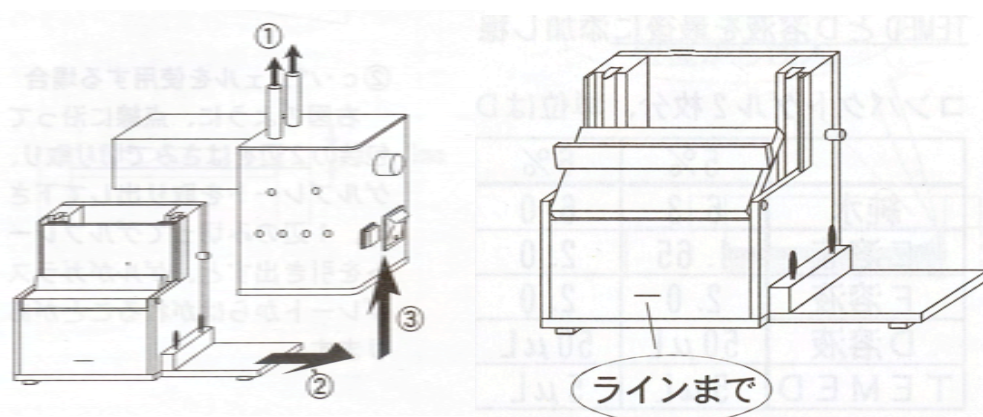
停止液 (7% v/w 酢酸) 20 mL

ピペットマン、角形シャーレ、ものさし、サランラップ、

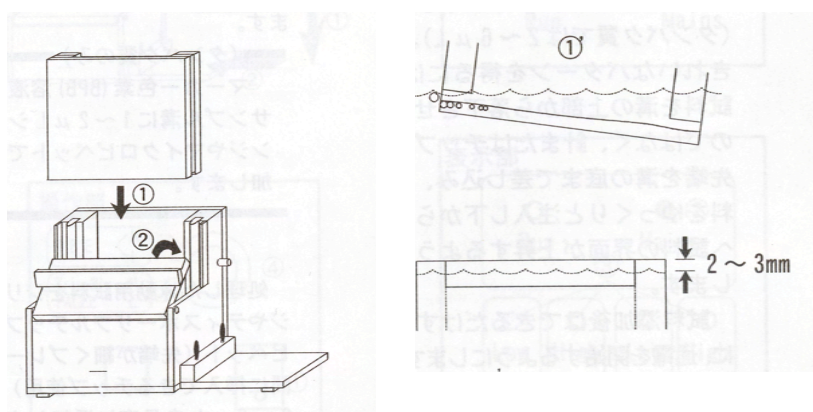
【実験操作】

1. 泳動槽下槽に線のところまで泳動バッファーを加える。

泳動槽部と電源部が合体している場合は、ACアダプターがコンセントに接続されていないことを確認し、図の様に上部のコネクターバーを上方へ引き出し（①）、電源部を右側へ滑らせ（②）、持ち上げて（③）泳動槽部から取り外します。下槽のふたを開いて泳動用バッファーをバッファーレベルラインまで約 30 mL 加える。

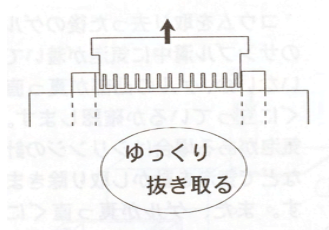


2. プレキャストゲルの切れ込みのない方を手前にして泳動槽に立て、ストッパーをいっぱいまで押してゲル板を泳動槽に固定する。ゲルの下に気泡が入っていないことを確認する。泡があるとその部分は電流が流れないので泳動が乱

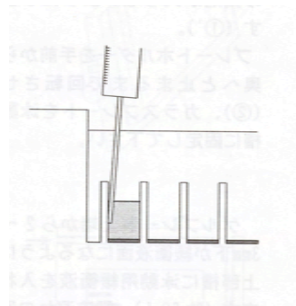


れます。

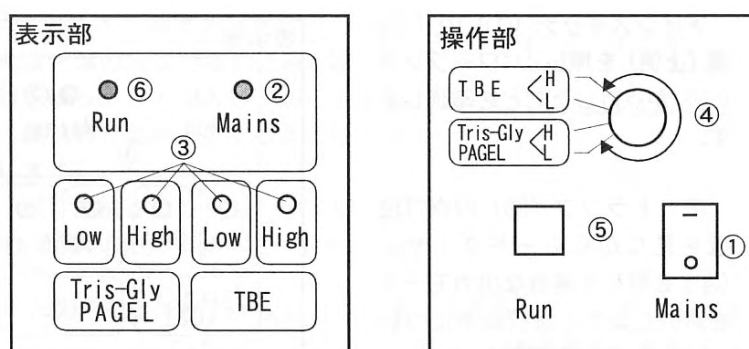
3. 泳動バッファーをゲル板の切れ込みの上まで注ぐ。約 60 mL。
4. コウムをゆっくりと抜く。



5. 各サンプルをそれぞれ 5 μ L ずつウェルにアプライする。左から、ADH1 標品、グルコース振盪培養、グリセロール振盪培養、グルコース静置培養、グリセロール静置培養の順にのせる。



6. 電極部分を差し込んで、電気泳動を開始する。(30 分)
表示部のインジケータ③が左から 2 つめが点灯していることを確認してから、⑤Run ボタンを押して泳動を開始して下さい。変更する場合は、操作部のつまみ④を Tris-Gly PAGEL-H の位置にセットして下さい。



7. 泳動後、ゲル板からゲルをはずし、速やかにゲルを活性染色用溶液に浸す。



8. 適当に発色したところで (2、3 分)、活性染色用溶液を捨て、ゲルを停止液に浸す。
9. サランラップでゲルを包んで、移動距離を測り移動度を求める。

移動度 R_f = バンドの移動距離／色素 (BPB) の移動距離
(見えなければゲルの下端までの長さ)

10. ゲルはコピーしてお渡しします。

実験 2：酵母のエタノール発酵

2 g グルコース (15 mL 遠心管に分注して配布)

2 g ドライイースト

蒸留水 (洗ビン)

ポリビーカー 10 mL 5 本

ディスポシリンジ 20mL 4 本

パラフィルム、ピペットマン、ペーパータオル

タイマー、マーカーペン、ものさし

【実験操作】

1. グルコース、ドライイーストを洗ビンの蒸留水で溶かし 10 mL とする。まず、9 mL 程度まで水を加えてよく振り混ぜ、ドライイーストやグルコースの粉末に十分水が行き渡ってから 10 mL まで水を加え、再度均一の濃度となる様に混合する。ポリビーカーの 1 つに洗ビンの水を 10 mL 程度入れておく。
2. 残りのポリビーカーに 1～4 まで番号を付け、以下の表のように蒸留水 (ポリビーカーから)、酵母溶液、グルコース溶液を 1～4 のポリビーカーに分注し、振り混ぜる。シリンジでまず 5 mL 程度各溶液を吸い上げ、つぎにシリンジを逆さまにして余分な空気を追い出しさらに溶液を 4 mL となる様溶液を押し出す。シリンジのまわりの余分な水分をペーパータオルで拭いた後、シリンジの口をパラフィルムで漏れない様にきつく覆う。

シリンジ No.	グルコース溶液 (mL)	蒸留水 (mL)	酵母溶液 (mL)
1	3	3	0
2	0	3	3
3	3	1.5	1.5
4	3	0	3

3. 4 本のシリンジの準備がそろったら、反応開始時刻とし初期値 (0 分) のシリンジの目盛の値 (シリンジのゴムのある位置) を読み取り、表に記録する。
4. 4 分ごとにそれぞれのシリンジの値を読み取り、実測値の欄に値を記録する。また、読み取った値から初期値を引いて各時間の間での CO_2 発生量を計算する。測定の前には溶液に溶け込んだ CO_2 を気化させるため、シリンジを強く振るとよい。ただしピストンにはふれないで！
5. 20 分までそれぞれのシリンジについて計測し、各時間までの CO_2 発生量を計算し、解答用紙の表・グラフを完成させる。

【参考資料】

《ピペットマンの使い方》

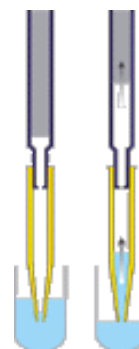
ピペットマンはピストンを押し下げて排出した空気と同量の液体を吸入・吐出を行う、エアードイスプレイスメント方式を採用した微量液体分注器です。

P-1000 は 1000 μL (1 mL) まで、P-200 は 200 μL まで、P-20 は 20 μL までの液体試料の計量・分注に用います。本体の窓の中の数字がその時分注できる容量を示しています。P-1000 では1 数字が上がる毎に 10 μL 容量が増えます。P20 では1 は 0.1 μL となります。故障の原因となりますので、容量を超えた使用はしない。チップホルダー内に溶液を吸い込まない様注意してください。

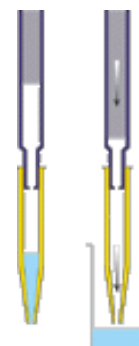
1. プッシュボタンを押し下げ、設定した容量または固定容量のエアを排出し、第一ストップ位置で固定します。



2. 計量する液体（サンプルや試薬類）の液面に浸し、ゆっくりとプッシュボタンを戻して吸入します。



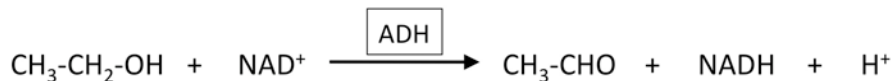
3. ピペットを容器に移動し、ゆっくりとピストンを押し下げて、液体（サンプル）を吐出します。静止後、第二ストップまで押し下げて溶液を完全に排出します。



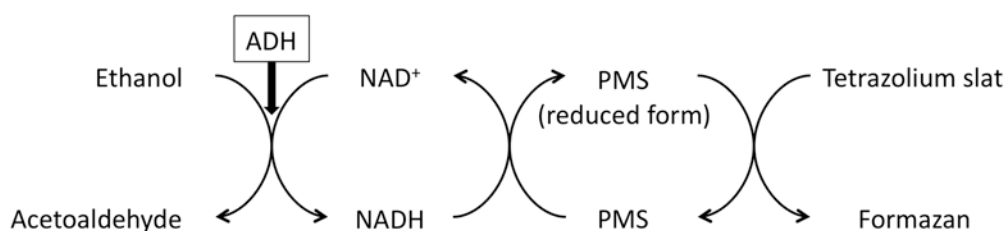
エムエス機器 (http://www.technosaurus.co.jp/product/mlh_faq.htm#1)

《アルコール脱水素酵素の活性染色の原理》

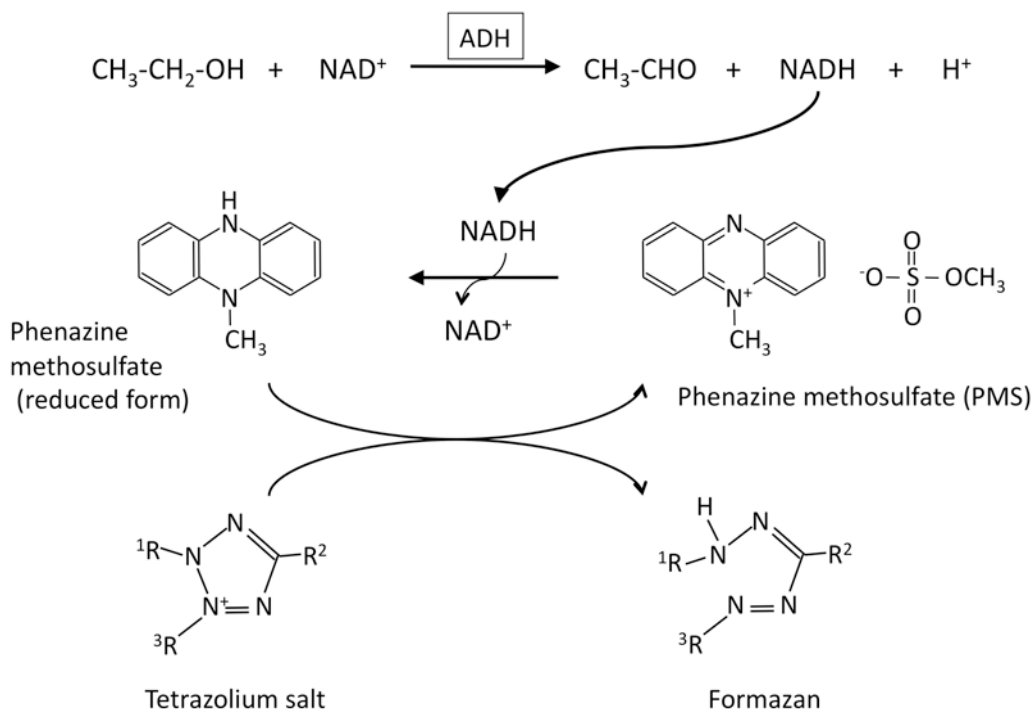
アルコール脱水素酵素はエタノールをアセトアルデヒドに分解する反応を触媒する。



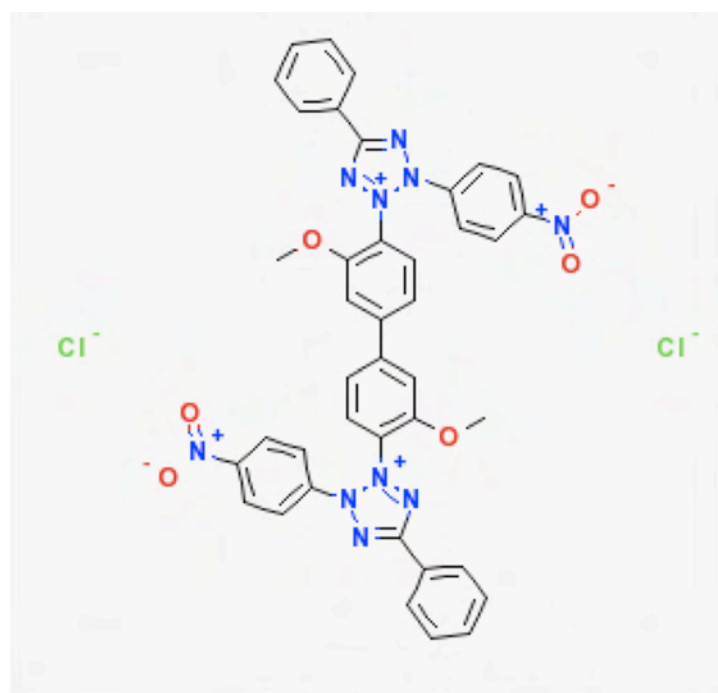
この反応で生じた NADH によりから Phenazine methosulfate (PMS) を介して Nitroblue Tetrazolium (NBT) を還元することにより、Formazan という物質を生じる。NBT から生じた Formazan は紫色を呈し、水に不溶性である。アクリルアミドゲル中の脱水素酵素により生成された NADH の存在する部分にのみ、紫色の色素が沈着することで、アルコール脱水素酵素の泳動位置を知ることができる。



より詳しくは、以下を参照してください。



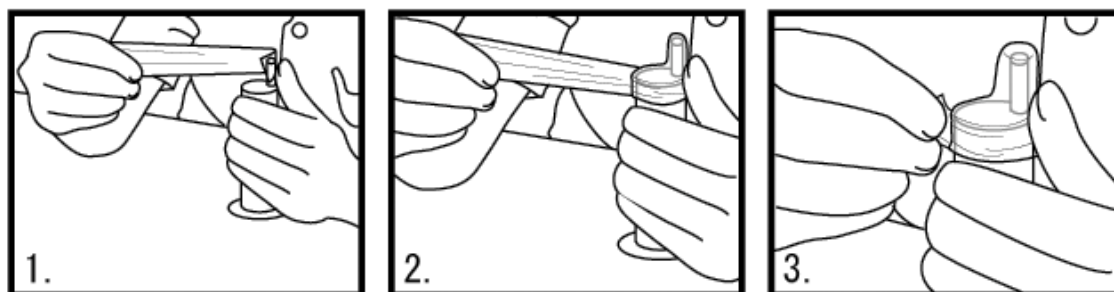
NBT の構造は、



Nitroblue Tetrazolium

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

《シリンジの先端の閉じ方、パラフィルムの使い方》



パラフィルムは引き伸ばすとその部分で粘着性が出て、ものに密着させることができるシートです。この性質を利用してシリンジの先端の穴を密閉します。ただし伸ばしすぎると切れてしまいますので、かげんしながら引き伸ばします。

1. パラフィルムは幅2～3 cmぐらいに切って渡します。まず、付いている紙をはがします。パラフィルムの端をシリンジの先端にあてて、引き伸ばしながらシリンジの先に巻き付けていきます。シリンジの穴をふさぐ様にパラフィルムで2, 3回おおう様にしながら巻き付けます。

2. さらにパラフィルムを横に引き伸ばしながら、できるだけすき間のできない様に巻き付けていきます。

3. 最後にシリンジの胴体の部分（太い部分）にしっかりと巻き付けて、密着したら出来上がりです。

問題・解答用紙【実験 1】

受験番号		氏名	
------	--	----	--

問1. それぞれのサンプルにバンドが何本見えたか記しなさい。

問2. それぞれのバンドの移動度 (R_f) を計算しなさい。

問3. アルコール脱水素酵素の活性の振盪培養と静置培養での違い、グルコース添加培地とグリセロール添加培地での活性の違いは何によるものと考えられるか記せ。

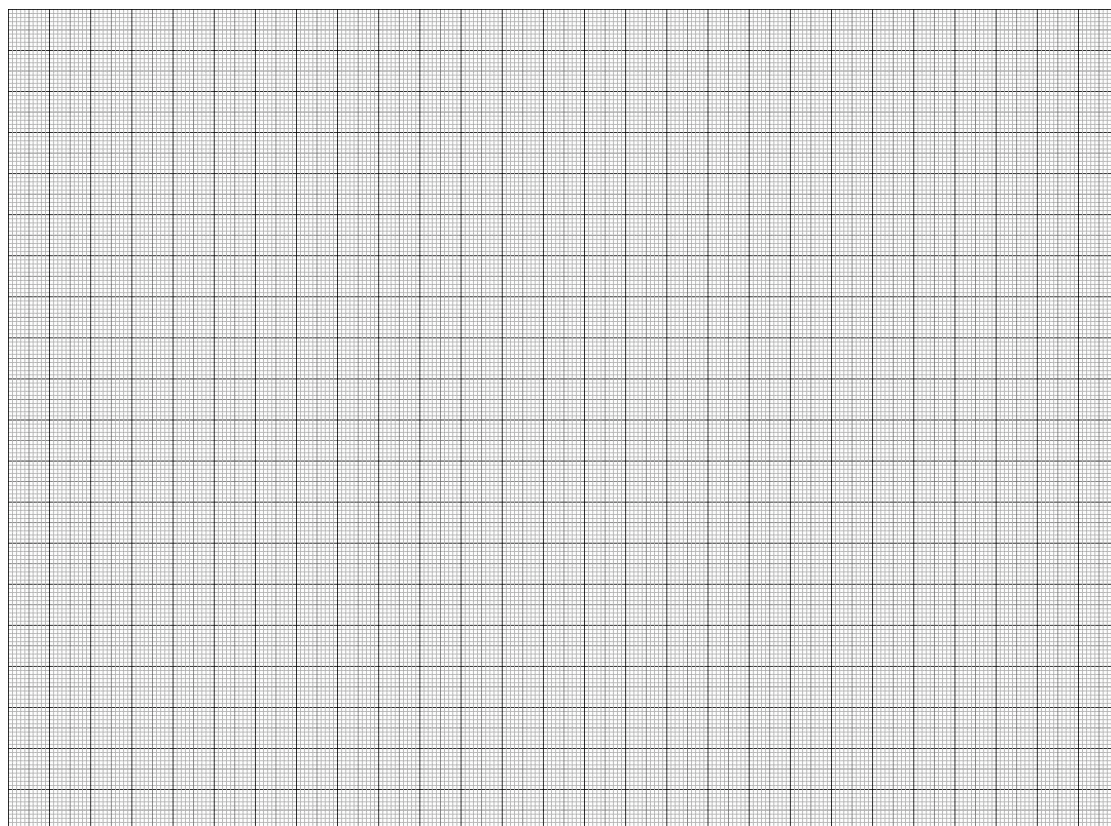
問題・解答用紙【実験 2】

受験番号		氏名	
------	--	----	--

問4. 実験を行い以下の表を完成しなさい。

	シリンジ No. 1		シリンジ No. 2		シリンジ No. 3		シリンジ No. 4	
時間(分)	実測値 (mL)	ガス発生量 (mL)	実測値 (mL)	ガス発生量 (mL)	実測値 (mL)	ガス発生量 (mL)	実測値 (mL)	ガス発生量 (mL)
0		0		0		0		0
4								
8								
12								
16								
20								

表をもとに、次ページのグラフ用紙にグラフを描きなさい。横軸、縦軸にはそれぞれ何の数値をとったらよいか、また軸の名称はどのように付けるかを考えて描きなさい。



問5. 最も発酵の速度が速かったのはどのシリンジですか。2 番目に発酵の速度が速かったのはどのシリンジですか。その理由と合わせて答えなさい

問6. シリンジ No. 2, 3, 4 で反応液に加える蒸溜水の量を変えたのは、どういう理由でそうしたか記せ。

問7. それぞれのシリンジの反応を行う意味、対照としておこなった実験はどれか等を考慮して、この実験からわかったことを記しなさい。

問題 4

魚類の色素胞の観察

【はじめに】

カメレオンが周囲の環境に合わせて体色を変化させるように、多くの動物が体内の生理的条件や外部環境によって体の色を変えることができる。多くの硬骨魚類では、背景（地面）の明暗に合わせてすばやく体の色を変える反応（背地反応）がみられる。これは個体が背景にとけ込むことで捕食者から身を隠す効果があると考えられている。

硬骨魚類の体色変化は次のようなしくみで起こることが知られている。鱗には色素胞とよばれる細胞が存在し、その中にある色素顆粒が凝集したり拡散したりすることによって体色が薄くなったり濃くなったりする。このような色素胞の運動性によって生じる速い皮膚色の変化は生理学的体色変化と呼ばれている。上記のような硬骨魚類の体色変化には神経系が関与していることが知られている。

この実験では、硬骨魚類の一種であるコイを用い、鱗に存在する色素胞（黒色素胞）の運動性が自律神経によって調節されていることを観察する。

【実験で使用するもの】

コイ

生理的塩類溶液 (NaCl 128mM, KCl 2.6mM, CaCl₂ 1.8mM, NaHCO₃ 0.002%)

High K⁺ 溶液 (KCl 130.6mM, CaCl₂ 1.8mM, NaHCO₃ 0.002%)

アドレナリン溶液（アドレナリンを 10⁻⁵M となるよう溶かした生理的塩類溶液）

アセチルコリン溶液（アセチルコリンを 10⁻⁵M となるよう溶かした生理的塩類溶液）

光学顕微鏡

ピンセット

パスツールピペット

ホールスライドガラス

【実験 1】黒色素胞の観察

- (1) 先の細いピンセットでコイの体から鱗を傷つけないように摘出し、生理的塩類溶液を入れたホールスライドガラスに乗せ検鏡する。
- (2) 広く枝分かれした小さな黒色素胞を 1 つ選びスケッチする。

【実験 2】High K^+ 溶液の効果 （注：細胞外 K^+ 濃度が高くなると細胞を興奮させる効果がある。）

- (1) 生理的塩類溶液を入れたホールスライドガラスに鱗を入れる。
- (2) 黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数(図 1)を計測する。
- (3) 広く枝分かれした小さな黒色素胞を 1 つ選ぶ。
- (4) ホールスライドガラス中の生理的塩類溶液を High K^+ 溶液に注意深く交換し、(3)で選んだ黒色素胞の変化を時間を追ってスケッチする。(溶液の交換は顕微鏡ステージ上で行う。)
- (5) それ以上変化しなくなったら、黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。
- (6) ホールスライドガラス中の High K^+ 溶液を生理的塩類溶液に注意深く交換し、(3)で選んだ黒色素胞の変化を時間を追ってスケッチする。
- (7) それ以上変化しなくなったら、黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。

図1 色素指数（色素胞の段階）

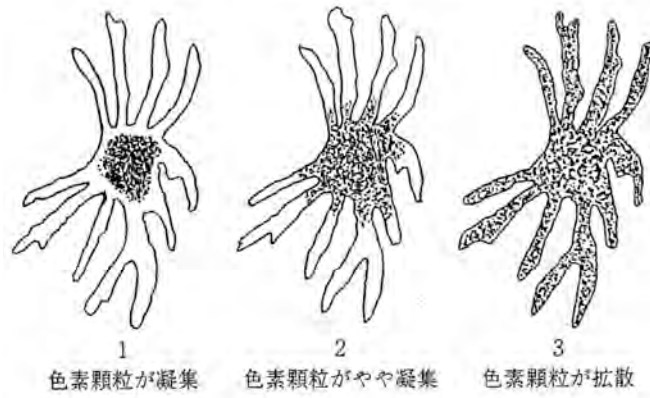


表1. 実験計算の例

色素指数	色素胞の数	
1	×	0個 = 0
2	×	7個 = 14
3	×	13個 = 39
合計	20個	= 53
平均	53/20	= 2.65
(平均色素指数 2.65)		

【実験 3】アドレナリンの効果

- (1) 生理的塩類溶液を入れたホールスライドガラスに鱗を入れる。
- (2) 黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。
- (3) 広く枝分かれした小さな黒色素胞を 1 つ選ぶ。
- (4) ホールスライドガラス中の生理的塩類溶液をアドレナリン溶液に注意深く交換し、(3)で選んだ黒色素胞の変化を時間を追ってスケッチする。(溶液の交換は顕微鏡ステージ上で行う。)
- (5) それ以上変化しなくなったら、黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。
- (6) ホールスライドガラス中のアドレナリン溶液を生理的塩類溶液に注意深く交換し、(3)で選んだ黒色素胞の変化を時間を追ってスケッチする。
- (7) それ以上変化しなくなったら、黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。

【実験 4】アセチルコリンの効果

- (1) 生理的塩類溶液を入れたホールスライドガラスに鱗を入れる。
- (2) 黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。
- (3) 広く枝分かれした小さな黒色素胞を 1 つ選ぶ。
- (4) ホールスライドガラス中の生理的塩類溶液をアセチルコリン溶液に注意深く交換し、(3)で選んだ黒色素胞の変化を時間を追ってスケッチする。(溶液の交換は顕微鏡ステージ上で行う。)
- (5) それ以上変化しなくなったら、黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。
- (6) ホールスライドガラス中のアセチルコリン溶液を生理的塩類溶液に注意深く交換し、(3)で選んだ黒色素胞の変化を時間を追ってスケッチする。
- (7) それ以上変化しなくなったら、黒色素胞を任意に 20 個選び、名々について色素指数を計測する。

課題

- (1) 実験 1 で作製したコイの黒色素胞のスケッチを提出しなさい。
- (2) 実験 2～4 で作製した黒色素胞の変化を示すスケッチを提出しなさい。（黒色素胞の変化の速度が速いのでスケッチの方法を工夫してください。）
- (3) 実験 2～4 で得られたデータから鱗の平均色素指数(表 1 参照)をそれぞれ算出し、その数値を表にするとともに、色素指数の変化に対するそれぞれの溶液の効果を示すグラフを描きなさい。
- (4) 背地反応で生じるコイの体色変化はどのような神経経路を経て生じると考えられるか、今回の各実験データから推測される体色変化のメカニズムを考察しなさい。

答案用紙

受験番号		氏名	
------	--	----	--

課題 1 (スケッチ)

課題 2

【実験 2】 (スケッチ)

受験番号		氏名	
------	--	----	--

【実験 3】 （スケッチ）

【実験 4】 （スケッチ）

受験番号		氏名	
------	--	----	--

課題 3

(表)

(グラフ)

受験番号		氏名	
------	--	----	--

課題 4