

2006年

第17回 国際生物学オリンピック(IBO)

第二次国内選考試験

実習 ①「生態学と生物の多様性」

課題1 動物の個体数の推定

課題2 軟体動物の多様性

東邦大学理学部 生物学科

生態学と生物の多様性

課題1（制限時間 60分） 動物の個体数の推定

課題2（制限時間 120分） 軟体動物の多様性

各課題について実習し、それぞれの設問に答えよ（解答はすべて解答用紙に記入すること）。

課題1. 動物の個体数の推定

1. はじめに

動物個体数の測定は生態学的調査のもっとも基礎となるもので、動物の生息場所や生活様式、行動習性などに応じて、さまざまな手法が開発されている。その一つは、標識再捕法といい、運動性が比較的高い動物に適用される。

導入：

ある地域の個体群（個体数 N 頭）の一部の個体（個体数 M 頭）を捕獲し、それらすべてに何らかの方法で標識をつけて放した。しばらく後に無作為に捕獲を行ない、 n 頭の個体が得られた。それらのうち標識された個体の数が m 頭だったとすると、得られた個体のうちの標識個体の割合は、もとの個体群のうちの標識個体の割合に等しいはずであるから、 $M : N = m : n$ となる。

この単純な原理から、つぎの式によって、もとの個体群の個体数を推定することができる。

$$N = (n/m) M$$

つぎの材料を用いて、以下に示す手順にしたがって作業をしながら、各間に答えよ。

2. 準備されている道具

紙コップ、ビーズ（袋に入っている）、プラスチック・シャーレ（2組）、スプーン、フェルトペン（2色）、ピンセット、小型計算機

3. 実験

ビーズを動物の個体に見立てて（例えば小型の昆虫）、捕獲、標識、放逐、再捕獲という一連の作業を実際にない、仮想的な個体群の大きさを推定する。

計算には小型計算機を用い、 少数点以下第 1 位を四捨五入して個体数を求めよ。

- 1) 紙コップの蓋を外して、 袋に入っているビーズを紙コップに入れる（仮想個体群）。
- 2) 紙コップの中のビーズを、 スプーンで 1 回だけすくい取り（捕獲）、 得られたビーズ（[] 個）のすべてに、 フェルトペンで同じ印をつける（標識）。
- 3) 印のついたビーズを紙コップの中にもどし（放逐）、 蓋をして紙コップを振り、 ビーズをかき混ぜる。
- 4) 紙コップの蓋を外して、 スプーンでビーズを 1 回すくい取り（再捕獲）、 それらのうちの印のついているビーズの数（[] 個）と印のついていないビーズの数（[] 個）を調べる。

問題 1. これらの数字から、 紙コップの中にもともと入っていたビーズの数を推定すると、

計算式 : _____ 第 1 推定値 : _____ 個となる。

- 5) つぎに、 印のついていなかったビーズに、 第 1 回目標識とは異なる印をつけて（第 2 回標識）紙コップの中にもどし、 蓋をして紙コップを振り、 ビーズをかき混ぜる。
- 6) 紙コップの蓋を外して、 スプーンでビーズを 1 回すくい取る（第 3 回捕獲）。今回すくい取ったビーズ（[] 個）のうち第 1 回目標識の印のついたビーズの数（[] 個）と、 第 2 回目標識の印のついたビーズの数（[] 個）を調べる。

問題 2. これを再捕獲作業のくり返しだと考えて、 もともと入っていたビーズの数を推定すると、

計算式 : _____ 第 2 推定値 : _____ 個となる。

問題 3. 第 2 回目標識の印のついたビーズだけで、 もともと入っていたビーズの数を推定すると、

計算式 : _____ 第 3 推定値 : _____ 個となる。

7) 2回にわたる標識作業で印をつけたビーズの総数は [] 個で、すくい取ったビーズのうち、第1回目と第2回目のどちらかの標識がついていたビーズの合計数は [] 個になった。

問題4. 2回の標識作業によって、標識した数を増やしたと考えて、もともとのビーズの数を推定すると、

計算式 : _____ 第4推定値 : _____ 個となる。

問題5. 紙コップからすべてのビーズを取り出して、もともと紙コップの中に入っていた数を調べよ。

_____ 個

問題6. 真の値に最も近く、推定の精度がもっとも高かったのはどの推定値であったか。

第 _____ 推定値

問題7. この方法で推定精度を高めるためには、一般にどのような工夫が必要か。

問題8. 以下の仮定のうち、標識再捕法を適用する場合に必要な条件に○、そうでないものに×をしろせ。

- A. 標識は個体の識別が可能なものなければならない。
- B. 標識は耐久性があり、放逐から再捕獲までに脱落したり、消失したりしない。
- C. 標識個体は無作為に個体群中に分散する。
- D. 最初の捕獲と再捕獲の方法は同じでなければならない。
- E. 標識は個体の行動に影響せず、標識個体と無標識個体とで捕獲される確率は等しい。
- F. 放逐と再捕獲の間に、その地域内で死亡や出生がおこらない。
- G. 放逐と再捕獲の間に、その地域へ個体の侵入がない。

H. 放逐と再捕獲の間に、その地域から個体の移出がない。

A _____ B _____ C _____ D _____

E _____ F _____ G _____ H _____

課題 2. 軟体動物の多様性

1. はじめに

カタツムリやサザエ、カキ、アサリやハマグリ、イカやタコなど、われわれになじみの深い動物群は軟体動物と呼ばれ、世界で約7万種が知られている（まだ知られていないものを含めると、約20万種と推測されている）。

これらのうち、貝類と呼ばれる仲間は体の外側に硬い殻を持ち、その中に引きこもって、捕食者から身を守ったり、乾燥に耐えたりする。このようにして自身を守るので、逃げるためにすばやく動く必要はなくなり、多くの種は非常にゆっくり移動し、中には基底に固着して生活するものもいる。

一方、この動物群に含まれるイカやタコの仲間は、同じく水中で生活する魚類と同じくらいに、すばやく運動する。そのため、殻を小さくして体の中に取り込んだり、消失させてしまったりした。

2. 準備されている材料や道具類

材料

サザエ（巻貝類）、ハマグリ（二枚貝類）、スルメイカ（頭足類） 各1個体

道具

解剖用のはさみ、メス、ピンセット、解剖用バット（長方形の平皿）2枚

3. 実験手順

解剖用バットに、サザエ、ハマグリ、イカを入れ、それらを解剖して、ケント紙にそれぞれの略図を描く。なお、サザエとハマグリは、事前に処理をして、身を殻から取り出しありやすくしてある。

問題1. ケント紙に描いた略図に、つぎの部位の位置とおおまかな形を描け。

- A 身を守ったり、体を支持したりするための殻
- B 呼吸するための鰓（えら）
- C 移動や運動をするための足やひれ
- D 食物を摂取するための口
- E 光感覚により外界を認識するための眼

問題2. 3種の観察にもとづいて、つぎの文の下線部にもっとも適当な生物名を入れよ。

- 1) 3種のうち、殻がよく発達しているものは、_____と_____で、発達していないものは_____である。

2) 3種を、眼が発達している順にならべると、

_____ > _____ > _____ となる。

3) 3種を、運動能力の高い順にならべると、

_____ > _____ > _____ となる。

4) 3種のうちで、鰓がもっとも発達したものは、

_____ である。

問題3. 3種の食物のとり方について、つぎの下線部に生物名を入れよ。

1) 水中に懸濁している有機物を水流を生じさせて体内に取り込み、口器で濾し取って摂食するもの：_____

2) 硬い歯のような器官で藻類を削り取るもの：_____

3) 手のように働く足を用いて、すばやく獲物を捕まえるもの：_____

問題4. イカ類はすばやく移動するために特殊な器官を発達させた。その部位と仕組みを説明せよ。

部位 _____

仕組 _____

問題5. 軟体動物では、運動能力の高さと感覚器官・呼吸器官の発達の程度とは、どのような関係にあるか。

解答用紙

氏名 _____

課題1. 動物の個体数の推定 (15点)

問題1. 計算式 : _____ 第1推定値 : _____ 個

問題2. 計算式 : _____ 第2推定値 : _____ 個

問題3. 計算式 : _____ 第3推定値 : _____ 個

問題4. 計算式 : _____ 第4推定値 : _____ 個

問題5. _____ 個

問題6. 第 _____ 推定値

問題7.

問題8.

A _____ B _____ C _____ D _____

E _____ F _____ G _____ H _____

課題2. 軟体動物の多様性 (25点)

問題1. ケント紙に描く。

問題2. 1) _____ と _____ 、 _____

2) _____ > _____ > _____

3) _____ > _____ > _____

4) _____

問題3. 1) _____

2) _____

3) _____

問題4. 部位 _____

仕組 _____

問題5.

第17回 国際生物学オリンピック(IBO)

第二次国内選考試験

実習 ②「細胞の食作用」

課題1 貧食細胞の観察と同定

課題2 単細胞生物の食作用

課題3 溶血反応

東邦大学理学部 生物学科

細胞の食作用

- | | | |
|------|-------------|--------------|
| 課題 1 | (制限時間 30 分) | 貪食細胞の観察と同定 |
| 課題 2 | (制限時間 30 分) | 血液塗布標本の作成と観察 |
| 課題 3 | (制限時間 30 分) | 溶血反応の実験 |

各課題について実習して、提出課題を作成すること。さらに、それぞれの設問に答えよ。解答はすべて解答用紙に記入すること。

導入：細胞の食作用

生物は生命を維持するため、外界と物質の交換をする必要がある。外界から物質を取り込む「食作用」は原生動物固有の現象ではなく、昆虫や両生類の変態、ヒトの免疫反応、さらに神経グリア細胞の貪食まで、動物に共通した基本的な機能の一つである。この実習では血液細胞の食作用を実験して観察する。実習ではさらに、赤血球の溶血反応を観察して生物と環境の相互作用を理解する。

細胞の観察に必要な光学顕微鏡などの器具類や実験道具、さらに血液の塗沫標本の作製法など、生物学の基礎的な手技を習得する。

1. はじめに

実習に用いる実験装置や道具を各自で選んで課題を行うこと。また、ヒトの血液塗沫標本や説明図を参考にして血球を理解する。も助言が必要であれば自由に聞いてよい。

2. 実験材料や道具類

実験材料

血液 (血液を扱うときはかならず手袋を用いる)

装置と道具

37°C恒温槽

光学顕微鏡、対物スケール (接眼レンズ内に接眼スケールを入れてある)

鈍ピンセット、鋭ピンセット、ハサミ

スライドグラス、カバーグラス (カバーグラスは鋭ピンセットで取る)

マッペ (スライドを保管する板)

プラスチックピペット (横線の位置まで入れて約 0.5ml)

墨汁

ギムザ染色液

手袋 (ゴム、ビニール)

課題提出用

スケッチ用ケント紙と鉛筆

参考資料

血液塗沫標本

血球の説明図

課題 1 貪食細胞の観察と同定

試薬と実習用具

血液、試験管、スライドグラス、カバーガラス、墨汁

前準備

試験管に血液約 0.5m l を入れて、さらに墨汁を 2, 3 滴加えて、軽く振って攪拌する。

貪食させるため 37°C の恒温槽に約 40 分間放置する。

手順

恒温槽から試験管を取り出し、血液をピペットで吸いだして、塗沫標本を作成する。

ドライヤーで乾燥する。乾燥が不完全だと、染色中にスライド上の血液が流れる。

染色

- 1) ギムザ溶液に 10 分間浸す
- 2) 水洗して染色液を除く
- 3) さらにドライヤーで乾燥する

標本観察

最初に 10 倍の対物レンズで貪食細胞を探す。さらに 40 倍にして、血球の細部を観察する。

観察 1 貪食した細胞を観察して、提出課題 1 に描く。

観察 2 接眼スケールと対物スケールを使って、血球の大きさを測る。

提出課題 1

異物を貪食した血球の様子を描け。この細胞の種類と大きさを記入せよ。

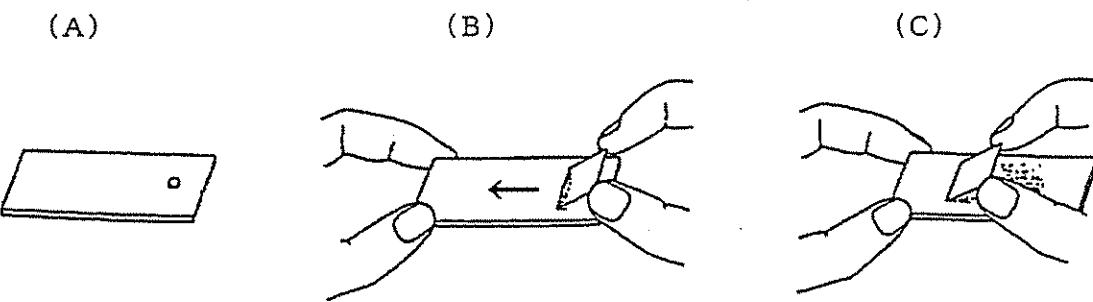
問題 1 貪食した血球の種類は何か。課題 2 の結果と比較せよ。

問題 2 貪食しなかった血球は何か。これらの血球はどのような働きがあるか。

課題 2 血液塗沫標本の作成と観察

血液に直接触れないように手袋を装着する。使用したピペット類は回収ビンに入れる。

- 1) 血液をガラス棒に一滴とり、スライドグラスの端に載せる（図A）。
- 2) カバーガラスの両端を持ち、40度位に傾けて血液をカバーガラス全体に広げる（図B）。
- 3) カバーガラスを矢印の方向に、一定の速さで血液を引き延ばす（図C）。



- 4) 標本は数枚作り、マッペに置いて乾燥させる。
- 5) スライドグラスに端に、鉛筆やマジックペンで標本名を記入しておく。

染色

課題1の染色と同じ。

標本観察

最初に10倍の対物レンズで細胞を探す。さらに40倍にして、血球の細部を観察する。

- 観察 1 ヒトの図を参考にして血球を識別する。
- 観察 2 識別できる細胞のスケッチをする。
- 観察 3 接眼スケールと対物スケールを使って、血球の大きさを測る。

提出課題 1

観察出来る細胞を描き、大きさを記入せよ。

ヒトの塗沫標本と下敷きの説明を参考に、細胞の種類を記入せよ。

- 問題 1 一番数が多い細胞は何か。種類とはたらきを答えよ。
- 問題 2 血液にはなぜこのように種類の異なる細胞があるのか。

課題 3 溶血反応の実験 (30 分)

血液は異なる塩濃度ではどうなるか。

実験材料と道具

動物血、試験管、塩水 (10%NaCl)、蒸留水、ピペット、マジックペン

手順

- 1) 最初に 10%、3%、0.9% の塩水をつくり、3 本の試験管におのおの約 1 mL を入れよ。
- 2) 各試験管には約 0.5 mL の血液を加えて、軽く振り、2 ~ 3 分間静置する。
- 3) 蒸留水約 1 mL の入った試験管 1 本にも、約 0.5 mL の血液を入れて軽く振る。
- 4) 試験管の底に溜まった血球をスライドグラスに一滴取り、塗沫標本を作る。
- 5) マッペに置いて乾燥する。スライドの端に標本名 (10%、0.9%など) を書き込む。

標本観察

各塩濃度の赤血球を観察する。染色をしなくても、コンデンサーレンズの絞りを閉めると細胞は見える。赤血球が観察できなければ、溶血したことになる。4 本の試験管の色を見ること。

海水は 3%NaCl、生理食塩水は 0.9%NaCl である。

提出課題 2

観察出来た血球をスケッチせよ。細胞の大きさを測って記入すること。

問題 1 10% 塩水ではどうなったか答えよ。

問題 2 海水ではどうなったか答えよ。海水生物はなぜこのような結果にならないかを説明せよ。

問題 3 生理食塩水ではどうなったか。生命が生じた海水より、低い塩濃度でなぜ血球は生存するのか。

問題 4 蒸留水ではどうなったか。試験管はどうなっているか答えよ。また淡水産生物にはなぜこのような結果にならないのか説明せよ。

問題 5 この実験で塩水を用いた理由を答えよ。

解答用紙

氏名 _____

課題 1： 貪食細胞の観察と同定

問題 1

問題 2

課題 2： 血液標本の作製と観察

問題 1

問題 2

課題 3： 溶血反応

問題 1

問題 2

問題 3

問題 4

問題 5

評価

実技評価 (20 点)

標本作製と溶血実験 (各 1 点、合計 5 点)

- 1) 滴下する血液は適当量であるか
- 2) 血液を均一に引き延ばせているか
- 3) 染色方法は適切か
- 4) 溶血をどのように確認しているか
- 5) 溶血のサンプルをどのように測ったか

顕微鏡操作 (各 1 点、合計 5 点)

- 1) 顕微鏡の操作を指示に従っているか
- 2) 対象物の大きさにより、対物レンズを使い分けているか
- 3) 両目を開けてスケッチする方法を習得したか
- 4) 接眼と対物スケールを使って絶対距離を出しているか
- 5) コンデンサーレンズを利用しているか

器具の操作 (5 点)

- 1) ピッチャーの操作を熟知しているか 2 点
- 2) 指示通りに適当量の液体を計量しているか 2 点
- 3) 液体の粘性の違いを理解しているか 1 点

提出課題 (各 1 点、合計 5 点)

- 1) 血液標本の赤血球、白血球を描いているか
- 2) 大きさを正確に記入してあるか
- 3) 貪食細胞を描いているか
- 4) 凝集した血球を描いているか
- 5) 溶血した血液の観察が正確か

理解度評価 (20 点)

提出課題の評価

- 問 1 顕微鏡標本の絶対値を測る
- 問 2 血球の種類を同定する
- 問 3 墨を貪食している血球の名前
- 問 4 異なる塩分濃度中における血球の変化
- 問 5 問 4 の理由

第17回 国際生物学オリンピック(IBO)

第二次国内選考試験

実習 ③ 「動物染色体の観察」

課題1 ヒト血液培養試料からの体細胞分裂染色体標本の作製と観察

課題2 チャイニーズハムスターの体細胞分裂染色体の観察

課題3 チャイニーズハムスターの減数分裂染色体の観察

動物染色体の観察

課題1を進めながら課題2、課題3の観察を実施する。

(制限時間180分)

課題1 ヒト血液培養試料からの体細胞分裂染色体標本の作成と観察

課題2 チャイニーズハムスターの体細胞分裂染色体の観察

課題3 チャイニーズハムスターの減数分裂染色体の観察

各課題について実習し、それぞれの設問に答えよ(解答はすべて解答用紙に記入すること)。

導入：染色体

染色体とは元来、真核細胞が有糸分裂する際に出現し、塩基性色素で染色される棒状の構造をいうが、現在ではDNAとそれを取り囲むタンパク質を含めた集合体を指す。ほとんどの真核生物でゲノムDNAは幾つかの染色体に分かれて存在し、その数は種に特異的である。それぞれの染色体は細胞分裂において紡錘糸の付着点である動原体（一般にくびれて観察される）をもち、そこからみて短い方を短腕、長い方を長腕とよぶ。

また真核生物の多くののは2倍体からなり、両親からそれぞれ受け継いだ相同染色体は対として存在している。生殖細胞（配偶子）では、1倍体となり、対をつくりないおのおの1種類の染色体をもつ。通常は乳類では幾つかの相同染色体対のうちの1対は性染色体で、雌ではX染色体を1対、雄はX染色体とY染色体をもち、X染色体とY染色体は大きさが異なる場合が多い。

この実習は前述の三つの課題からなり、染色体観察を通して関連分野の総合的な知識・技量を試験する。実習を始める前に、実習指導者から内容説明や諸注意がある。指示に従い、時間内に前述の三つの課題を効率よく遂行すること。

課題1. ヒト血液培養試料からの体細胞分裂染色体標本の作成と観察

1. はじめに

この実習では、培養を終了したヒト血液から染色体標本を作製し、ヒト体細胞染色体を観察する。

2. 準備されている道具や試薬類

実験材料 ヒト培養末梢血球細胞

器具・装置 心分離機、アスピレーター、顕微鏡、スピツツ、パストールピペット
炭酸ガス・インキュベーター、培養フラスコ、シリング各種

試薬類 低張液 (0.05% KCl 溶液)、カルノア固定液 (メタノール3 : 酢酸1)
培養液 (イーグル最小培地)、仔牛の血清、フィトヘマグルチニン (PHA)、
コルセミド溶液

3. 実験手順

培養

- 1) 2.5 ml のディスポーザブル・シリングに約 0.1ml のヘパリンを取り、ヒトの血液約 2ml を採取する。
- 2) 滅菌した無菌的な培養フラスコ中に イーグル最小培地 9ml (無菌 20 ml シリンジ使用)、仔牛の血清 1ml (無菌 10ml シリンジ)、PHA 0.1ml (無菌 1ml シリンジ) をシリングより分注して軽く搅拌し、全血 0.7ml を加えて搅拌する。
- 3) スクリューキャップを軽く閉めて、37°C にコントロールされた炭酸ガス・インキュベーター中で 70 時間培養する。この際、一日一回軽く搅拌する。

標本作製

- 1) 培養開始約 70 時間後に、1ml シリンジで 2 μg/ml のコルセミド (コルヒチン) 0.05 ml を各培養フラスコに入れて、約 2 時間さらに培養を続ける。

-----実際の操作はここから開始する-----

- 2) 2 時間後、培養フラスコの内容物をスピツツに移し、1,500r.p.m. で 5 分間遠心する。アスピレーターで上澄を取り去った後、0.5% KCl を約 10ml 加えて軽く搅拌した後、室温で 40 分間低張処理する (40 分の間に一度搅拌する)。メタノールと氷酢酸を 3 : 1 の割合で混合したカルノア固定液を、低張処理の終ったスピツツ内容物に数滴加える。

- 3) パスツールピペットで軽くピペッティングしながら全体を均一にし、約 10 分間室温に静置し、1,500r.p.m. で 5 分間遠心し上澄をアスピレーターで取り去る。
- 4) 固定液を加え、ピペットで強くピペッティングして遠心し、アスピレーターによって上澄を捨てる。約 0.5ml の固定液を加え、パスツールピペットの先端で、軽く攪拌して細胞を均一に固定液中に浮遊させ、2 本分を 1 本の一番底部の尖ったスピツツにまとめて、10ml 程度まで固定液を加え、もう一度 1,500r.p.m. で遠心し、上澄を除く。(この操作省略)
- 5) 固定液を少量加え、1 滴を洗浄済みのスライドグラス(磨りガラスの着いた面に)に滴下する。
- 6) スライドグラスをアルコールランプの炎に近づけ、固定液に引火したら、直ちに炎から遠ざける。スライドグラスの磨りガラスの部分に名前等を鉛筆で明記し、ギムザ染色液に約 10 分間浸し、水道水で水洗した後自然乾燥する(プレパラートは 3 枚作成する)。
- 7) 乾いたらプレパラートを顕微鏡の低倍率(10 x 10)または(10 x 40)で観察し、丸く広がった核板(分裂中期染色体)をさがす。
- 8) 対物レンズを高倍率(10 x 100)にして染色体のなるべく重なっていない、しかも染色体の形状が明瞭な核板を選んで観察する。なお、染色体観察では次の各値(a. 各染色体の全長の相対的比率、b. 染色体内の短腕と長腕の長さの比率)を的確に掴むこと。観察終了後、プレパラートは採点(配点 5 点)のため提出する。

4. 問題

- 1) なぜヘパリンを入れるのか、その理由を答えよ(配点 2 点)。
- 2) 培養液に仔牛の血清を加えるのはなぜか、予想して答えよ(配点 2 点)。
- 3) なぜコレヒチンを入れるのか、その理由を答えよ(配点 2 点)。
- 4) 観察した血液は男性由来か、女性由来か、図 1 を参考にして答えよ(配点 2 点)。
- 5) 観察した染色体は赤血球由来か、白血球由来か、その根拠と共に答えよ(配点 2 点)。

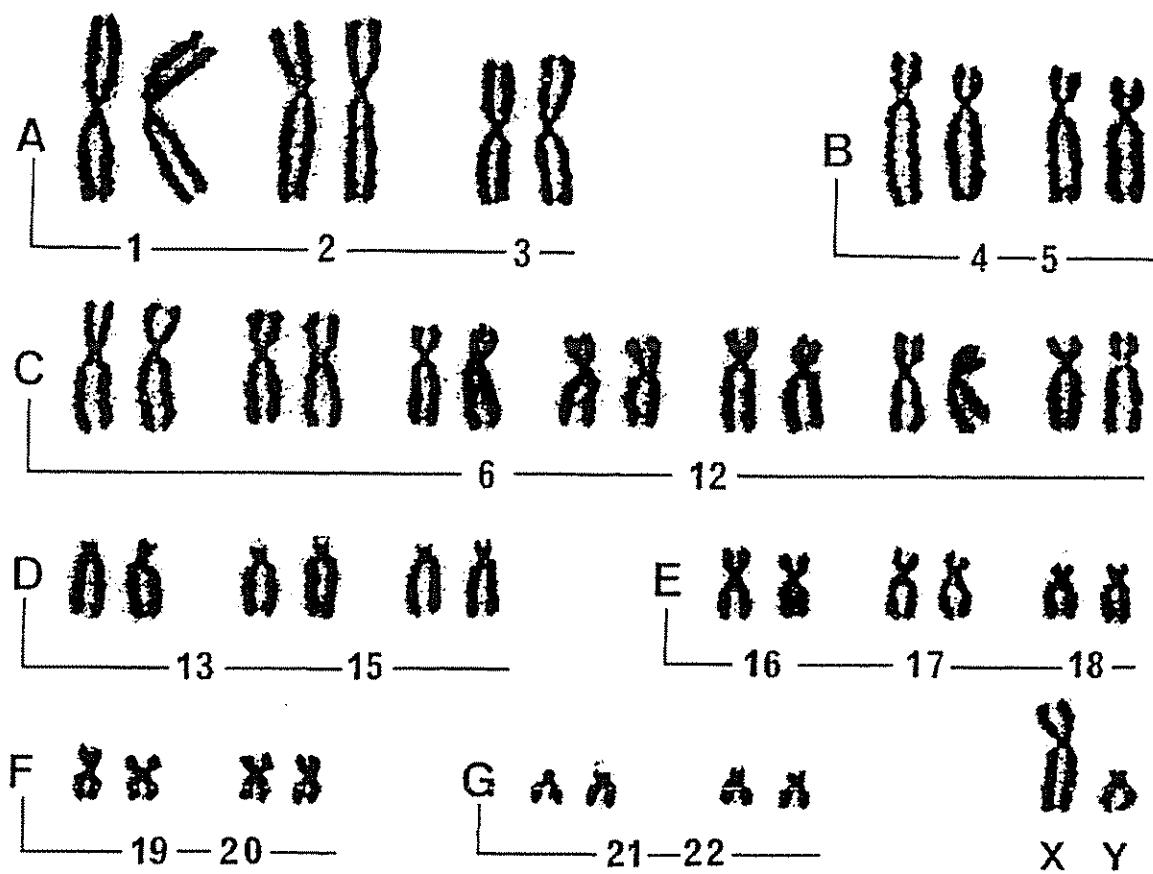


図1：ヒト正常男性の核型

(生物の科学 遺伝、57(3)110 (2005) 池内達郎 著 クイズ核型分析に挑戦 から)

課題2. チャイニーズハムスターの体細胞分裂染色体の観察

1. はじめに

この実習では、チャイニーズハムスター大腿骨骨髄細胞から作成した染色体標本を用いて、チャイニーズハムスターの体細胞分裂中期染色体を観察する。

2. 準備されている道具や試薬類

実験材料 チャイニーズハムスター大腿骨骨髄細胞染色体観察用プレパラート

装置 顕微鏡

3. 実験手順

- 1) プレパラートを顕微鏡の低倍率 (10×10) または (10×40) で観察し、丸く広がった核板をさがす。
- 2) 対物レンズを高倍率 (10×100) にして染色体のなるべく重なっていない、しかも染色体の形状が明瞭な核板を選んでスケッチ（配点 5点）し提出する。なお、スケッチは次の各値（a. 各染色体の全長の相対的比率、b. 染色体内の短腕と長腕の長さの比率）を的確に掴むこと。

4. 問題

- 1) 染色体数は何本か（配点 1点）。
- 2) 性染色体の構成はどうなっているか、スケッチ上で示せ（配点 2点）。
- 3) 大腿骨骨髄細胞を使うのはなぜか、その理由を答えよ（配点 2点）。

課題3. チャイニーズハムスターの減数分裂染色体の観察

1. はじめに

この実習では、チャイニーズハムスター精巣細胞から作成した染色体標本を用いてチャイニーズハムスターの減数分裂中期染色体を観察する。

2. 準備されている道具や試薬類

実験材料 チャイニーズハムスター精巣細胞染色体観察用プレパラート

装置 顕微鏡

3. 実験手順

- 1) プレパラートを顕微鏡の低倍率 (10×10) または (10×40) で観察し、丸く広がった核板をさがす。
- 2) 対物レンズを高倍率 (10×100) にして染色体のなるべく重なっていない、しかも染色体の形状が明瞭な核板（第一分裂と第二分裂それぞれ）を選んでスケッチ（配点 各 5 点）し、提出する。なお、図 2 のバッタの減数分裂染色体像を参考にすること。

4. 問題

- 1) 第一分裂の二価染色体の染色体数は何本か（配点 1 点）。
- 2) 性染色体をスケッチ上で示せ（配点 2 点）。
- 3) 第二分裂の染色体数は何本か（配点 1 点）。
- 4) 細胞分裂後期は観察できたか、「はい」・「いいえ」で答えよ（配点 1 点）。

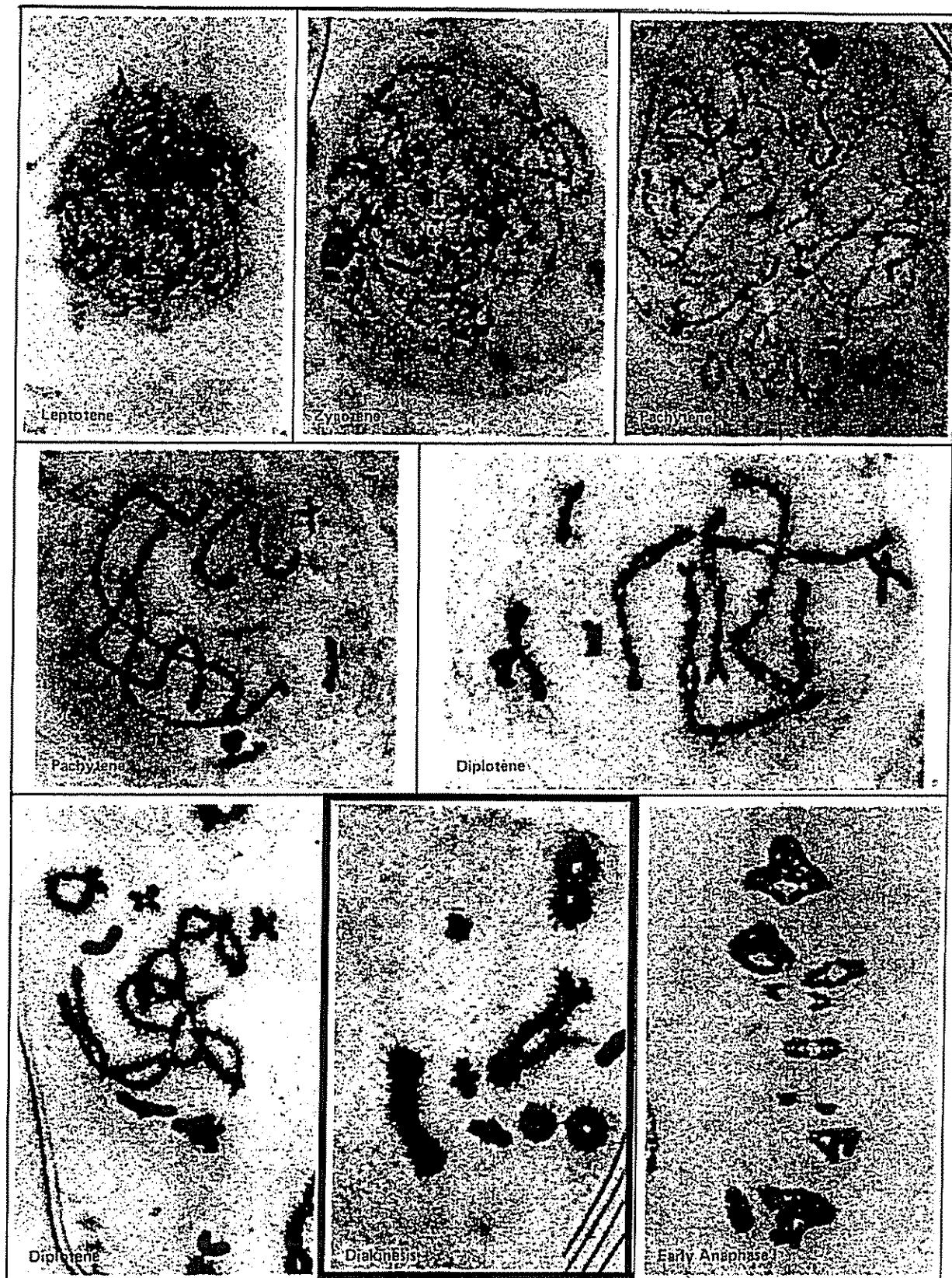


図 2 a : バッタの減数分裂染色体像 (第一分裂中期を太枠で示してある)

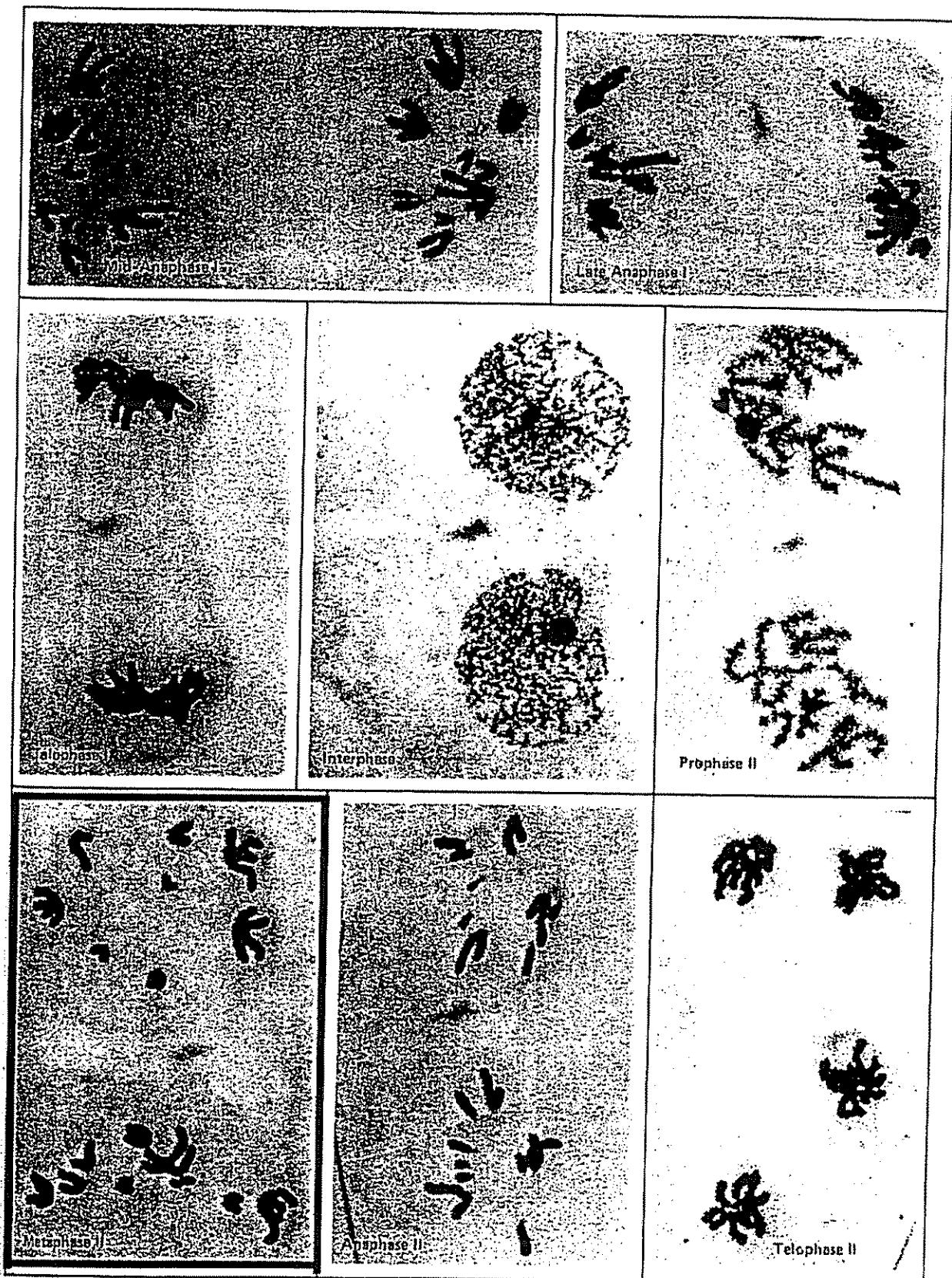


図 2 b : バッタの減数分裂染色体像（第二分裂中期を太枠で示してある）

(GENETICS 3rd ed. Ursula Goodenough (1984) p126 CBS College Publishing から)

評価
実技評価（20点）

実技試験1：作成したヒト染色体観察用プレパラートを提出する（5点）

実技試験2：スケッチ（ケント紙使用）を3枚提出する（合計15点）。

スケッチ1：チャイニーズハムスター体細胞分裂中期染色体像（5点）

スケッチ2：チャイニーズハムスター第一減数分裂中期染色体像（5点）

スケッチ3：チャイニーズハムスター第二減数分裂中期染色体像（5点）

理解度評価（20点）

筆記試験：テキスト内の問題に、テキスト末の答案用紙を用いてに答える（合計20点）

課題1：問題1～5（10点）

課題2：問題1～3（5点）

課題3：問題1～4（5点）

解答用紙

氏名 _____

課題 1：ヒト血液培養試料からの体細胞分裂染色体標本の作成と観察

問題 1

問題 2

問題 3

問題 4

問題 5

課題 2：チャイニーズハムスターの体細胞分裂染色体の観察

問題 1

問題 2

問題 3

課題 3：チャイニーズハムスターの減数分裂染色体の観察

問題 1

問題 2

問題 3

問題 4

第17回 国際生物学オリンピック(IBO)

第二次国内選考試験

実習 ④ 「遺伝子」

課題1 プラスミド pA の制限酵素による切断とアガロースゲル電気泳動によるクローン化 DNA 断片の方向決定

課題2 制限酵素切斷部位と制限酵素切斷断片のサイズの決定

遺伝子（制限時間 180 分）

課題 1 プラスミド pA の制限酵素による切断とアガロースゲル電気泳動による
クローン化 DNA 断片の方向決定

課題 2 制限酵素切断部位と制限酵素切断断片のサイズの決定

各課題について実習し、それぞれの設問に答えよ（解答はすべて解答用紙に記入すること）。

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 pA DNA 断片の電気泳動による分離とプラスミド pB 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。

最初に課題 1 からとりかかり、課題 1 の電気泳動の間に課題 2 を終えなさい。
(合計 90 分)

重要：電気泳動用の電源を使用する際に手伝いが必要な場合は、手をあげる。

導入：

プラスミドは環状の二重らせん構造を持つ DNA 分子であり、バクテリアの細胞内に存在し、染色体とは独立に複製される。制限酵素とは DNA 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、*Bam*HI という制限酵素は [5'-GGATCC-3'] という配列を認識して、これを [G / GATCC] に切断する (/ の部分で切断される)。また *Eco*RI という制限酵素は

[5'-GAATTC-3'] という配列を認識して [G / AATTC] に切断する。図 1 に示した例は、切断された DNA の末端において 5' 末端の方が 4 塩基突出した形になっている。このような末端を付着末端 (cohesive end) あるいは 5' 突出末端 (5'-protruding end) という。酵素の種類によっては、*PstI* のように 3' 突出末端を作るもの (5'-CTGCA/G-3') や、*SmaI* のように 5' 側にも 3' 側にも突出のない平滑末端 (blunt end) を作るもの (5'-CCC/GGG-3') もある。

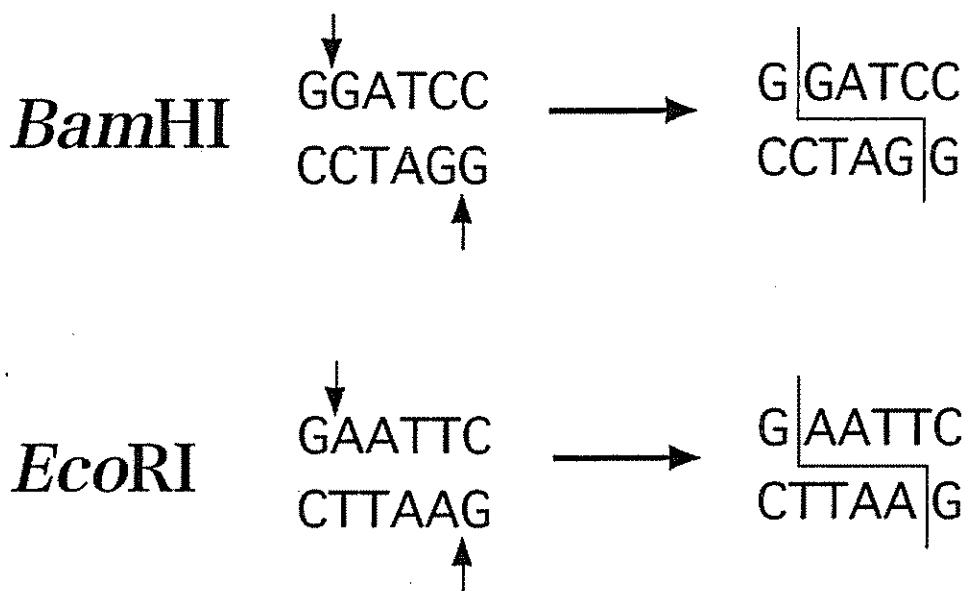


図 1 制限酵素による特異的な塩基配列の切断

この実験ではプラスミドと 3 種類の制限酵素 *BamHI*, *PstI*, *HindIII* を用いていろいろな組み合わせで予め切断されているプラスミド DNA が与えられる。これらを、アガロースゲル電気泳動で分離し、プラスミドのマップ（制限酵素地図）を決定する。

アガロースは核酸の電気泳動の媒体としてもっとも汎用されている物質である（図 2）。アガロースによって作製されたゲルは網目構造を呈しており、DNA 断片を長さや分子構造の違いで分離することができる。DNA 断片全体の荷電状態は主にリン酸基の数に依存し、ゲル中での移動度は主に DNA 断片の大きさに依存する。泳動後の

ゲルは、二本鎖 DNA にインターラート（イオン交換）する蛍光試薬（本実習では SYBR Green）で染色して DNA を検出することができる。インターラート試薬を含むゲルで泳動を行うと、DNA の構造によりインターラートする試薬量が異なるため直鎖状 DNA と環状 DNA を分離することも可能である。アガロースゲル電気泳動は、PCR 産物の確認、DNA クローニング実験、DNA 断片解析のほか、サザンハイブリダイゼーションやノーザンハイブリダイゼーションを行う上で必須の手法である。

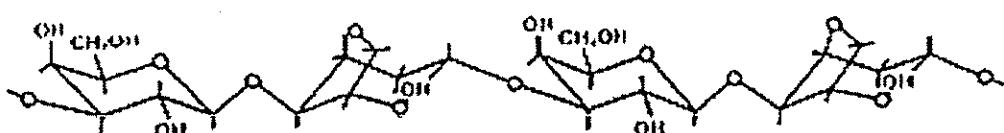


図2 アガロースの構造

この実習では、プラスミド DNA 上の各制限酵素の切断部位の位置を決め、DNA 断片の移動距離をもとに切断断片の長さを計算し、制限酵素地図を作成する。制限酵素地図を作成することをプラスミド DNA マッピングというが、これ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。プラスミド分子は 1 つの、あるいは同時に複数の制限酵素で切断することが可能である。模式図を作成するためには、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いけない。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できる。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負の相関がある。

2. 準備されている試薬や道具類

使用する試薬

1. 1 x TAE 緩衝液：トリス-酢酸-EDTA
2. 6 x DNA ゲル装填用緩衝液-スクロースとプロモフェノールブルーに加えて、泳動物のほぼ先端を確認できるオレンジ G を含む溶液
3. 制限酵素 *Bam*HI
4. 制限酵素 *Pst*I
5. 制限酵素 *Hind*III
6. 制限酵素 *Eco*RI
7. 制限酵素 *Bgl*II
8. 10 x 制限酵素緩衝液
9. プラスミド DNA pA 及び pB
10. DNA サイズマーカー
11. 蒸留水
12. DNA 染色液（蛍光色素である SYBR Green をアガロースゲルに 10,000 倍希釈して加える）

例えば、「10 x 」とは、反応液中の最終濃度に対して 10 倍の濃度（10 倍濃縮）ということを意味する。メーカーによって緩衝液組成に多少の違いがある。

使用する実験器具・装置

1. 実験用手袋
2. マーカーペン
3. 1.5 ml 遠沈管（マイクロチューブ）
4. 遠沈管のホルダー（マイクロチューブラック）
5. マイクロピペット（ピペットマン）
6. 遠心分離機
7. 恒温器（インキュベーター）
8. アガロースゲル電気泳動装置
9. ゲル染色撮影システム

実験方法と実験器具の操作

ピペットマンの使い方



図3 ピペットマンと部位の名称

1. 容量表を見ながら回転式リングを回し、目的の容量を表示させる。正しい容量設定例は以下に示されている。

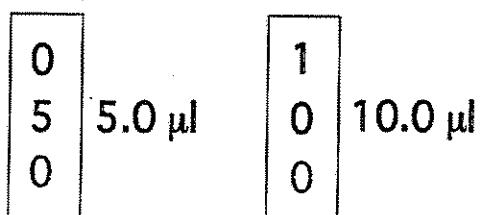


図4 ピペットマンの容量表 (5 μl と 10 μl を正しく設定した場合)

2. 白色チップをピペットの柄の先端に装着する。

(注意) チップなしで液体を取り扱ってはならない！

3. 調節ボタン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5A）。

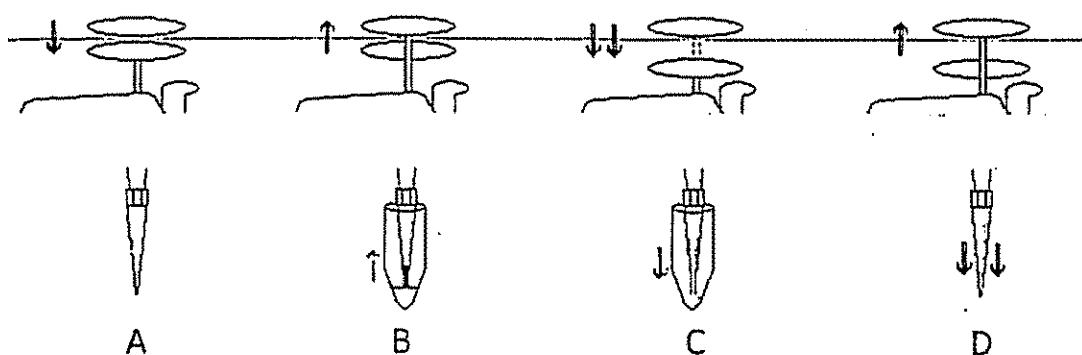


図5 液体取扱の行程

4. 調節ボタンを押す親指の力をゆっくり抜き、ボタンを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 5 B)。

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、チップから液体を出切るまでボタンをゆっくり押し込む(図 5 C)。
(注意) チップでウェルの底部を突き破らないように。
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を元の位置まで戻す。
7. イジェクトボタンを親指で押し(図 5 D)、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!

制限酵素による切断

本実習では、あるプラスミド pA にある cDNA 断片(遺伝子のうちタンパク質をコードする部分)がクローニングされたものが与えられる(図 5)。これを制限酵素で切断して電気泳動し、クローニングされた cDNA 断片の方向を判定する。(1 kbp = 1000 bp)

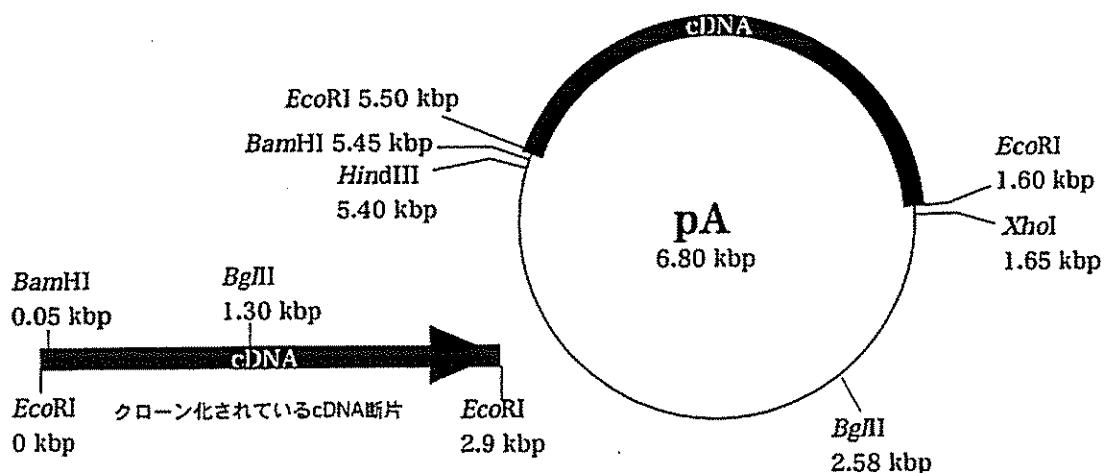


図 6 プラスミド pA のマップ(cDNA の方向は示されていない)

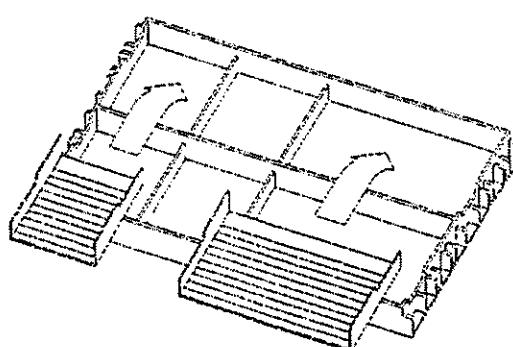
II 型と呼ばれるタイプに分類されるもっとも一般的な制限酵素は、特定の DNA 配列(回転対称配列)を認識し、その認識部位で DNA を切断する。また、この実習で

は、もう一つのプラスミド pB を異なる 3 種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Pst*I, *Hind*III) で切断して生じた DNA 断片をアガロースゲルで電気泳動した写真（テキスト中の図）をもとに、プラスミド pB の制限酵素地図を作成する。

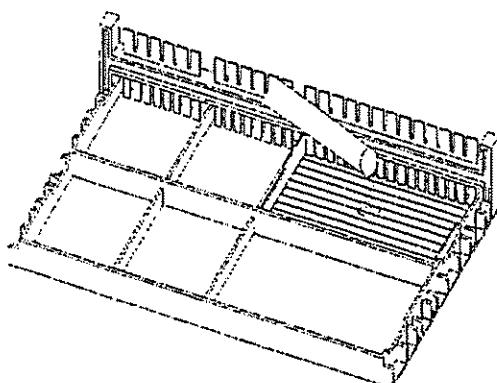
アガロースゲルの作製・電気泳動

実際には、時間の都合でゲルの調製は行わず、こちらで準備したものを用いる。

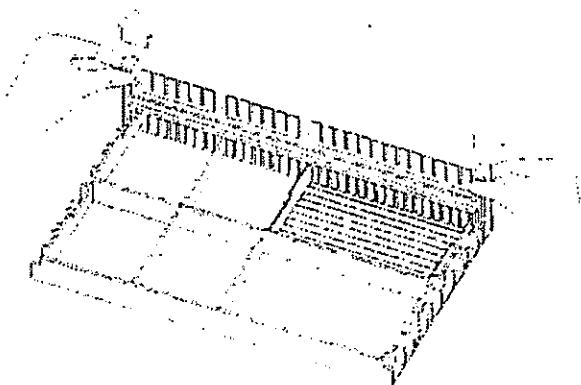
1. アガロース 0.6 g を計量して耐熱広口ビンに入れた後、60 ml の 1 x TAE 泳動緩衝液を加え、電子レンジで加熱してアガロースを完全に溶かす（最終濃度 1%）。このときに DNA を可視化するための色素として SYBR Green を 10,000 倍希釈になるように加えておく。
2. ゲル成型トレイを付属のゲル作製用の容器にセットする。



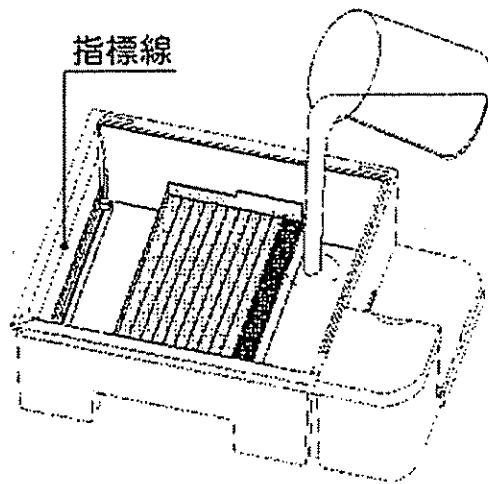
3. コームをセットし、ゲルが 50℃くらい（手で触れるくらい）まで冷めたらゲル成型トレイに流し込む。



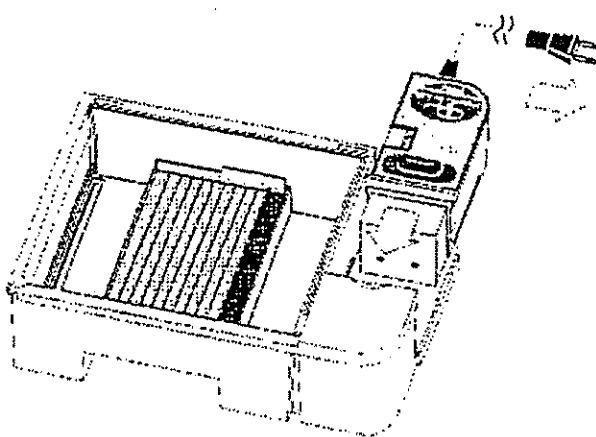
4. ゲルが固まったら専用容器から注意してゲルとトレイをはずし、コームをゆっくりと注意深く抜く。



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. 電極を取り付ける。陰極と陽極を間違えないようする。DNA は陽極へ向かって移動する。



1 x TAE 緩衝液の液面はゲルの表面より 3~4 mm ほど上になるようする。制限酵素で切断された目的の容量のプラスミド DNA と DNA ゲル装填用緩衝液 (dye) を混

合してからウェル(well)に入れる。その際ピペットのチップの先はウェルの底から1~2mm上になるようにし、ウェルの底に穴を開けずにすべてのサンプルを入れるようにする。サンプルを入れた後、電気泳動槽のふたを閉めて電源スイッチをオンにする。電源をオンにすると手を挙げて実験アシスタントを呼ぶ。電気泳動は100Vで40分間行う。電源をオフにすると手を挙げて実験アシスタントを呼ぶ。

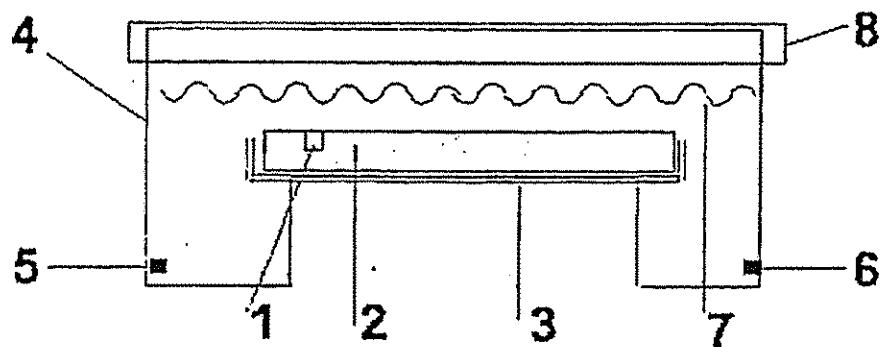


図7 ゲルを装着した電気泳動槽を横から示した図

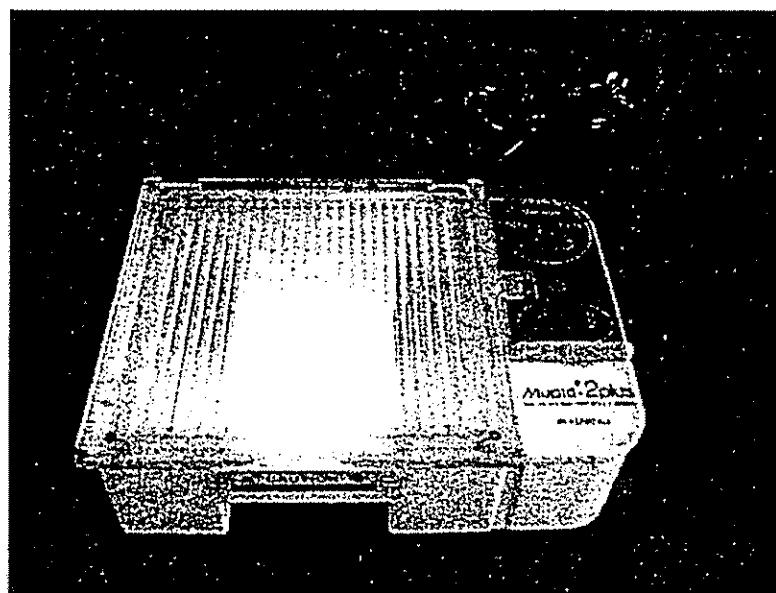


図8 この実習で用いる電気泳動槽

ゲル染色撮影システム

このシステムは実験アシスタントが操作する。アガロースゲルには DNA 断片を可視化するために DNA 断片と結合する色素（インターラート剤）が含まれている。

3. 実験手順

課題1. プラスミド pA の制限酵素による切断とアガロースゲル電気泳動による
クローン化 DNA 断片の方向決定

1) 7本のマイクロチューブが各人に与えられる。1本はDNAのサイズマーカーで
あり、チューブにMと記載されている。残りの6本には1から6までの番号が
記載されている。それぞれの中には以下の組成による制限酵素でプラスミド pA
を切断したものが入っている。

表1 制限酵素によるプラスミド DNA の切断の反応液組成

No.	プラスミド DNA (μl)	10x 緩衝液 (μl)	EcoRI (μl)	BglII (μl)	BamHI (μl)	XbaI (μl)	HindIII (μl)	滅菌水 (μl)
1	5	2	1					12
2	5	2				1	1	11
3	5	2		1				12
4	5	2			1			12
5	5	2			1	1		11
6	5	2	1	1				11

問題1 プラスミド pA にクローン化された DNA 断片の大きさを知りたい。どの制
限酵素で切断すれば良いか？ 最も良いと思われる制限酵素の名前を解答欄に
記せ。また、目的の制限酵素で切断してある反応液に、4μl の 6 x DNA ゲル装填
用緩衝液を加えて混合し、レーン 2 に混合液をのせよ。のせ方は次ページ 2)
以降を参照する。(1点)

問題2 プラスミド pA にクローン化された DNA 断片の方向を知りたい。どの制限
酵素で切断すれば良いか？ 最も良いと思われる制限酵素の名前を解答欄に記

せ。また、目的の制限酵素で切斷してある反応液に、4μl の 6 x DNA ゲル装填用緩衝液を加えて混合し、レーン 3 にサンプルをのせよ。のせ方はこのページ 2) 以降を参考する。(1 点)

- 2) チューブの中身をよく混合したときに、チューブの内側に水滴がある場合には、遠心分離機を使ってチューブの底に水滴を落としたほうがよい。遠心分離機は実験室に用意されている。
- 3) あらかじめ用意されたアガロースゲルを電気泳動槽の中に入れ、1 x TAE 緩衝液をそそぐ。1 x TAE 緩衝液の液面はゲルの表面 3~4 mm 上になるようにする。ゲルはサンプルを入れるための 10 個のウェルがあるが、なるべく中央に近いウェルを用いる。
- 4) 6μl の DNA サイズマーカー (M のチューブ) を 1 番目のウェル (一番左端ではない) に入れる。プラスミドサンプルを右隣の 2 番目のウェルと 3 番目のウェルに入れる。それぞれのサンプルごとに新しいチップを使うこと。電気泳動槽のふたをしめる。パワーサプライの電源を入れるときには手をあげて実験アシスタントを呼ぶ。電気泳動は 100V で 40 分間行う。(電気泳動の間の待ち時間に課題 2 を終える。)
- 5) 電気泳動の開始から 40 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。
- 6) DNA の染色
アガロースゲルの中に染色剤が含まれているので、電気泳動が終了した時点で、DNA は自動的に染色されている。手袋を着用してゲルをゲル支持板からはずし、受験番号の書い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 は多少の毒性があるので、ゲルは絶対に素手では触らないように注意する。

7) ゲル撮影

①実験アシスタントを呼び、ゲルの撮影を依頼する。アシスタントは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、以下は実験アシスタントが行うので、各自がゲルを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)

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

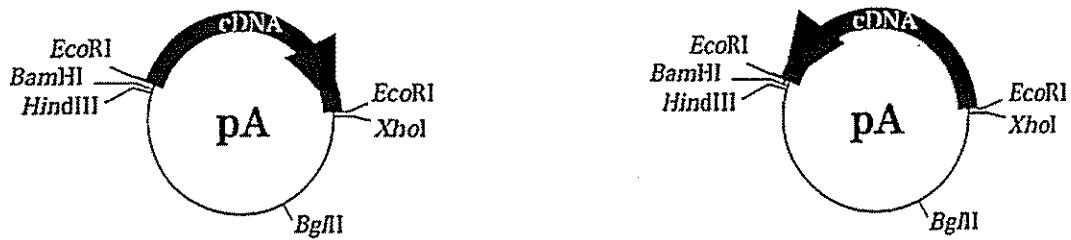
- ・UV 光がついている状態で保護シールドを開けない！

⑤DNA バンドの像を観察し、写真を撮る。

⑥UV 光のスイッチを切り、ゲルを容器に戻す。

⑦UV トランスイルミネーターを掃除し、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。

問題 3 プラスミド pA にクローン化された DNA 断片の方向はどちらか？次ページの例にならって解答欄に記せ。（3 点）

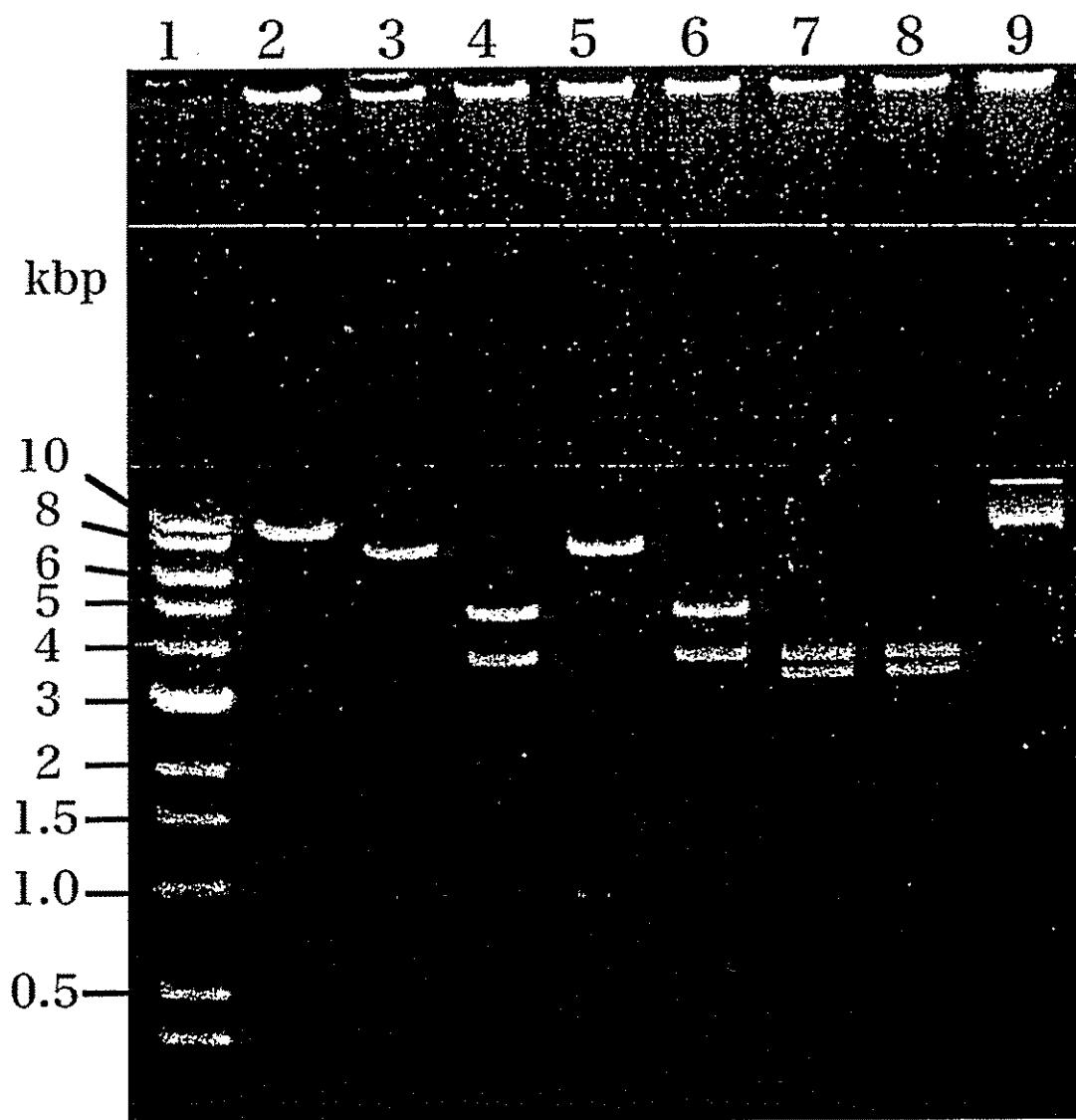


又は

問題4 電気泳動のゲルの写真を解答欄の枠に貼り付けよ(計5点)。採点基準(DNAがない場合:0点, バンドが出ているが不鮮明に広がっている場合:-1点, 間違ったサンプルが選択されている場合:-1点, バンドが薄い場合:-1点)

課題 2. 制限酵素切断部位と制限酵素切斷断片のサイズの決定

実習時間に限りがあるため、サイズ分析用に自分自身のゲルは使わない。下の図はプラスミド pB の制限酵素切斷 DNA 断片のアガロースゲル電気泳動のパターンである。



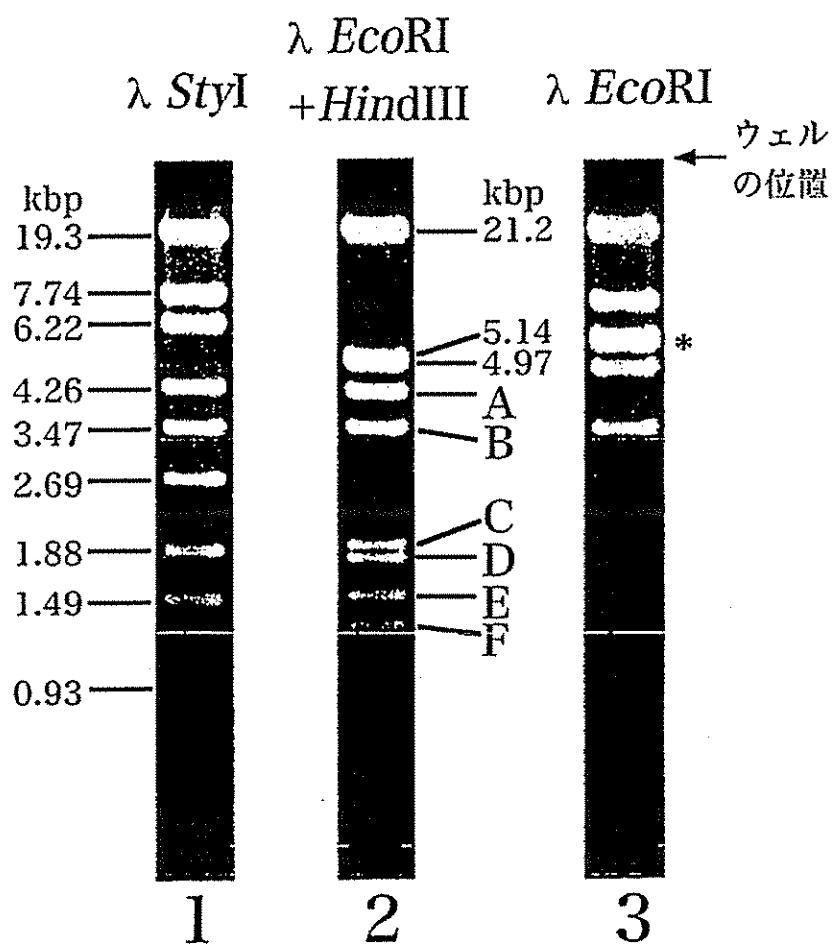
図は次ページの表に示した反応液組成で 3 種類の制限酵素で切断し、電気泳動したものである。ゲルの電気泳動のバンドパターンをもとに次ページの問題に答えよ。

表2 制限酵素によるプラスミドDNAの切断の反応液組成

レーン No.	プラスミド DNA (μl)	BamHI (μl)	PstI (μl)	HindIII (μl)	10 x 緩衝液 (μl)	滅菌水 (μl)
1	DNA サイズマーカー	6 μl				
2	5	2			2	11
3	5		2		2	11
4	5			2	2	11
5	5	2	2		2	9
6	5	2		2	2	9
7	5		2	2	2	9
8	5	2	2	2	2	7
9	5					15

問題5 このプラスミドpBにはBamHI, PstI, HindIIIで切断される部位はそれぞれいくつあるか？（各1点、計3点）

問題6 直鎖状λDNA（ラムダDNA）はしばしば、制限酵素で切断され、電気泳動におけるサイズマーカーとして使われる。次ページの写真的レーン1は制限酵素StyIで切断、レーン2はHindIIIとEcoRIで同時に切断、レーン3はEcoRIのみで切断したときのλDNA断片の電気泳動パターンである。レーン1の左側に書かれた数字は切断片のサイズを kbp（キロベースペア）で示したものである。（1 kbp = 1000 bp）



DNA 断片の移動距離はDNA 断片のサイズの常用対数と負の相関を示すことが知られている。各 DNA 断片(kbp)の常用対数とその移動距離(cm)を解答欄のグラフにプロットし、下の問題に答えよ。

問題 6-1 レーン 2 における DNA 断片 A から F のそれぞれの大きさを求めよ。(各 1 点、計 6 点)

問題 6-2 レーン 3 では上から 3 番目の DNA 断片は大きさのほぼ等しい断片が 2 つ重なっている (*印のところ)。この結果とレーン 2 の結果から、 λ DNA には HindIII で切断される部位は何か所あると考えられるか。なお、この写真に見えていない小さい DNA 断片が実際には存在するが、それらは無いものとして考える。(1 点)

問題 7—問題 9 15 ページの電気泳動パターンではレーン 1 の各 DNA 断片のサイズは図の左側に示されている。

各 DNA 断片(kbp)の常用対数とその移動距離(cm)を解答欄のグラフにプロットし、下の問題に答えよ。

問題 7. *PstI* でプラスミド pB を切断した場合のもっとも小さい DNA 断片のサイズは何 kbp か？ (1 点)

問題 8. *HindIII* と *BamHI* でプラスミド pB を切断した場合の小さい方の DNA 断片のサイズは何 kbp か？ (1 点)

問題 9. プラスミド pB の全体のサイズは何 kbp か？ (1 点)

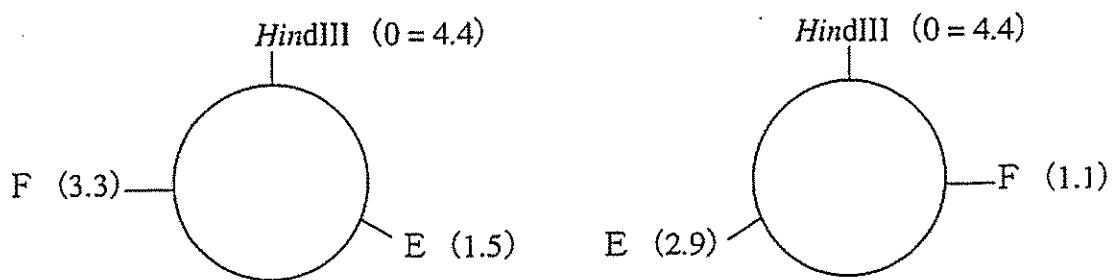
問題 10. レーン 9 の切断していないプラスミドにおいて DNA のバンドが複数観察されるのはなぜか？ (2 点)

問題 11. *HindIII* 切断部位を 0 としたときのこのプラスミドのマップを示せ。(5 点)

<書き方の例>

次ページを参照。

プラスミド全体の大きさが 4.4 kbp としたときのある制限酵素 E と F のマップ



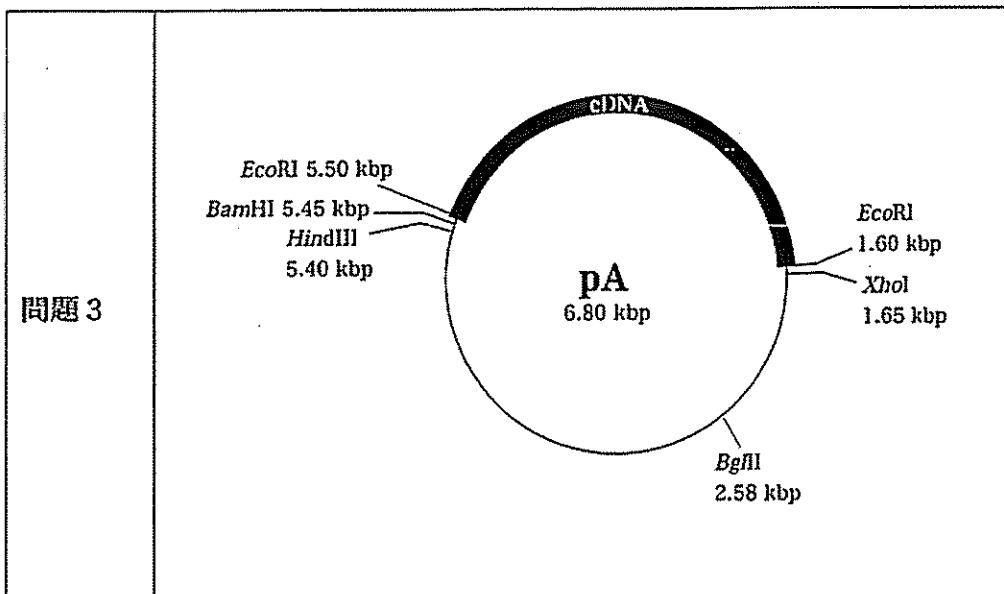
(これら 2 つは鏡像関係にあるので、いずれか 1 つを記載すればよい。)

解答用紙

氏名

問題 1	制限酵素
------	------

問題 2	制限酵素
------	------



問題 4

電気泳動の写真を貼付	

問題 5	<i>Bam</i> HI	力所
	<i>Pst</i> I	力所
	<i>Hind</i> III	力所

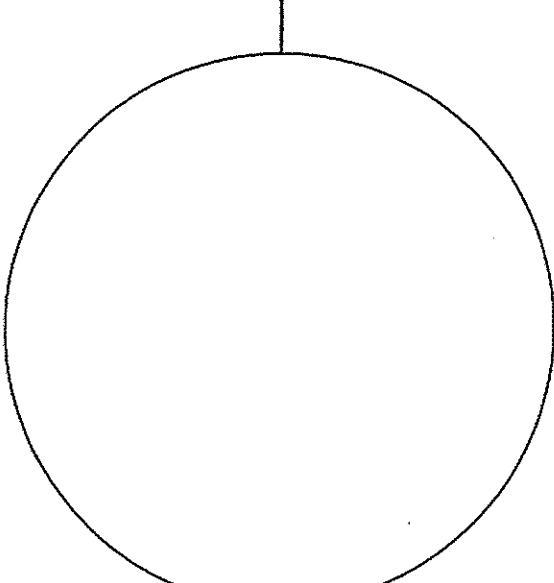
問題 6-1	断片 A	kbp
	断片 B	kbp
	断片 C	kbp
	断片 D	kbp
	断片 E	kbp
	断片 F	kbp
問題 6-2		力所

問題 7		kbp
------	--	-----

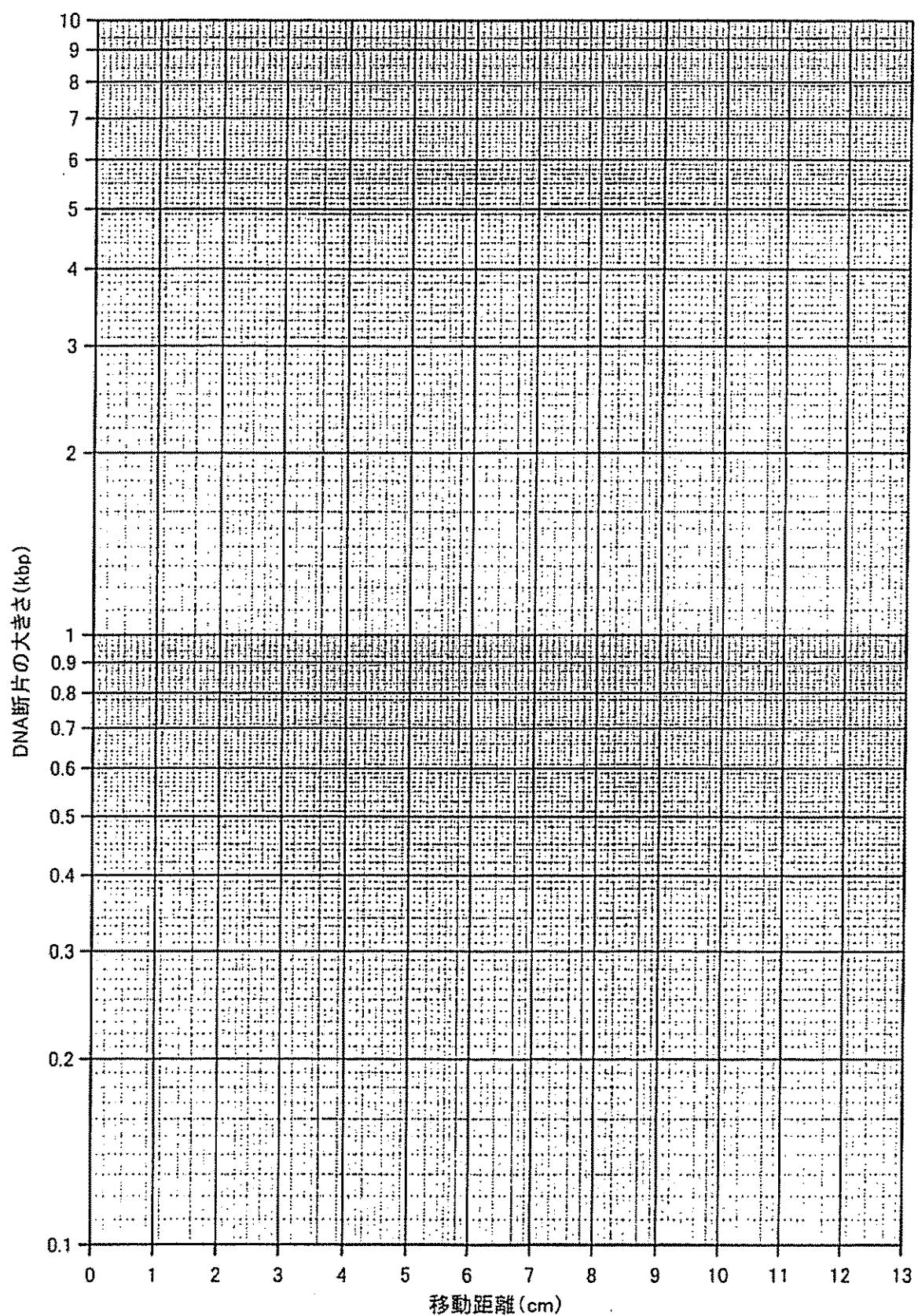
問題 8		kbp
------	--	-----

問題 9		kbp
------	--	-----

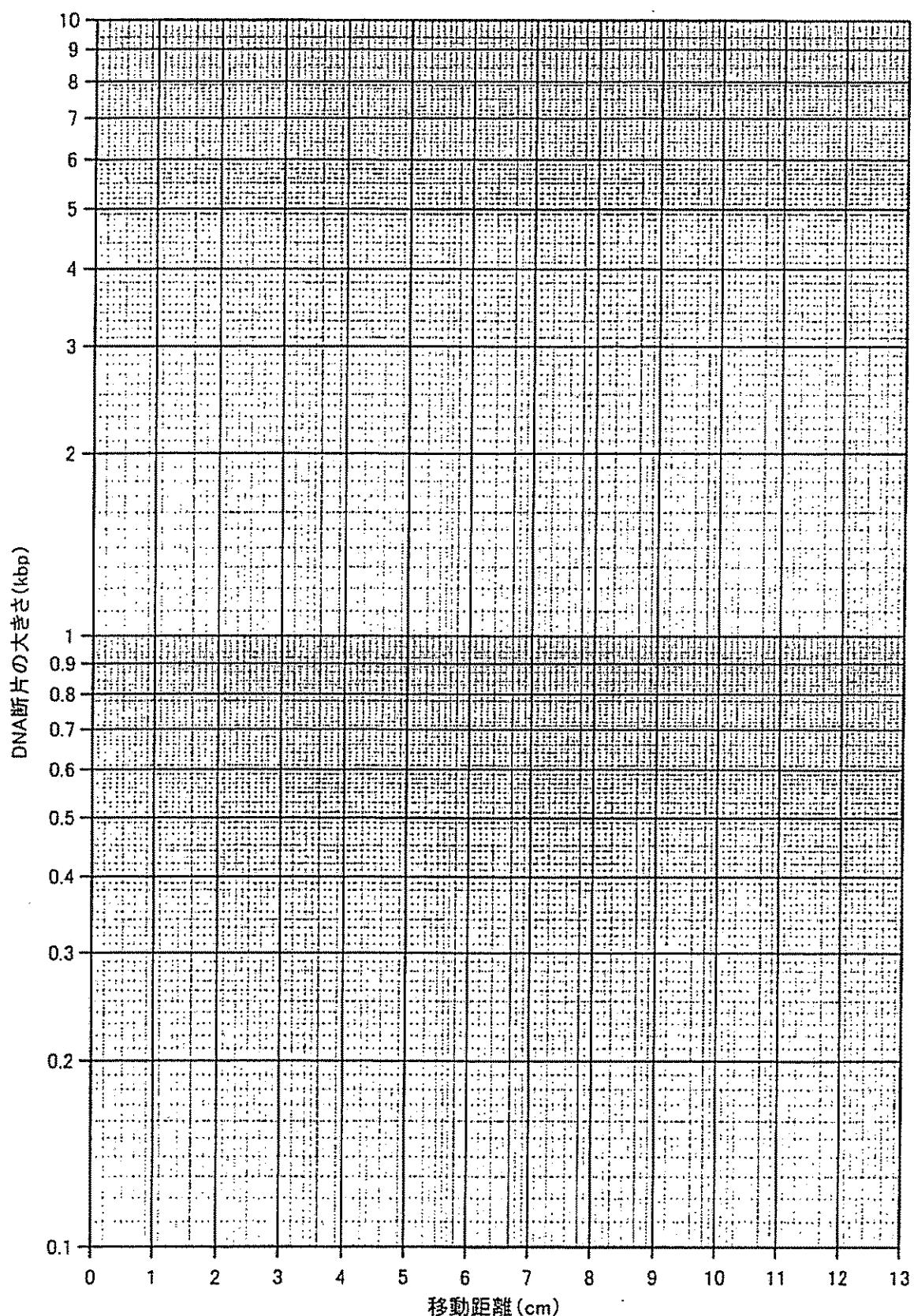
問題 10	理由：
-------	-----

問題 11	<p style="text-align: center;"><i>Hind</i>III (0 = kb)</p> 
-------	---

課題 2、問題 6 (λ DNA 断片サイズ決定のためのグラフ)



課題 2、問題 7～10 (プラスミド pB の DNA 断片サイズ決定のためのグラフ)



第17回 国際生物学オリンピック(IBO)

第二次国内選考試験

小観察 C₃植物とC₄植物の観察

東邦大学理学部 生物学科

小観察 C₃植物とC₄植物の観察 (制限時間 180分)

導入：

○光合成から見た「C₃植物」と「C₄植物」

生物の行う代謝には「同化」と「異化」とがあります。「同化」は体外から簡単な物質を体内に取り入れ、エネルギーを用いて、より複雑な物質を合成する過程で、その例として植物が行う「光合成」があげられます。「異化」は複雑な物質を分解してエネルギーを取り出す過程で、「呼吸」がその例です。

植物が行う「光合成」はCO₂とH₂Oから光エネルギーを用いて炭水化物を合成する反応で、化学反応式では、6CO₂ + 12H₂O + 光エネルギー → C₆H₁₂O₆ + 6H₂O + O₂で示されます。

この光合成の反応過程は、葉緑体内のチラコイドで行われる反応と、ストロマで行われる反応の2段階からなります。チラコイドではクロロフィルの活性化、電子の放出、H₂Oの分解による水素と酸素の生成、ATPの合成が行われます。ストロマでは大気中から吸収されたCO₂が、リブロース二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（略名Rubiscoと呼ばれる）という酵素の作用でリブロース二リン酸と反応し、C₃化合物であるホスホグリセリン酸(PGA)になります。さらにチラコイドで生成された水素とATPを用いて、グリセルアルデヒドリン酸(GAP)がつくられます。このグリセルアルデヒドリン酸(GAP)の一部から炭水化物であるグルコースが合成されます。残りのグリセルアルデヒドリン酸はリブロース二リン酸へと戻ります。このストロマで行われる一連の反応系をカルビン・ベンソン回路と呼びます。このように大気中のCO₂を直接取り入れてC₃化合物であるホスホグリセリン酸にする植物を「C₃植物」と言います。

これに対して、カルビン・ベンソン回路の反応系の前に、C₄ジカルボン酸回路という反応系を用いて大気中のCO₂を吸収し固定する植物があります。この植物はC₄化合物であるオキサロ酢酸やリンゴ酸を合成することから「C₄植物」と呼ばれています。

C₄ジカルボン酸回路では、まず大気中のCO₂を葉肉細胞の細胞質基質にあるホスホエノールピルビン酸(PEP)と反応させ、オキサロ酢酸(OAA)にします。オキサロ酢酸はさらにリンゴ酸またはアスパラギン酸になり、維管束鞘細胞に入り脱炭酸されます。リンゴ酸またはアスパラギン酸は脱炭酸されると、ピルビン酸やアラニンとなり、葉肉細胞に戻りホスホエノールピルビン酸になり、再びCO₂の吸収固定を行います。このように葉肉細胞で行われるCO₂の吸収固定と維管束鞘細胞で行われる脱炭酸の反応系を合わせてC₄ジカルボン酸回路と呼びます。

維管束鞘細胞で脱炭酸されたCO₂は、Rubiscoの触媒作用によって、カルビン・ベンソン回路のリブロース二リン酸と反応しホスホグリセリン酸に固定され、「C₃ 植物」と同じ反応系でグルコースが合成されます。

○ C₄ 植物の 3 つの型

C₄ ジカルボン酸回路は、脱炭酸に関与する酵素の違いから次の 3 つの型に区分されています。

① NADP-リンゴ酸酵素 (NADP-ME) 型

スキ、トウモロコシやサトウキビにみられる型です。葉肉細胞の細胞基質でホスホエノールピルビン酸とCO₂ からオキサロ酢酸が合成され、葉緑体中でオキサロ酢酸からリンゴ酸がつくられます。リンゴ酸は維管束鞘細胞の葉緑体中で、NADP-リンゴ酸酵素 (NADP-ME) によって脱炭酸され、ピルビン酸になります。CO₂は葉緑体のカルビン・ベンソン回路に入り、グルコースに合成されます。生成されたピルビン酸は葉肉細胞の葉緑体に移され、ホスホエノールピルビン酸になります。

② NAD-リンゴ酸酵素 (NAD-ME) 型

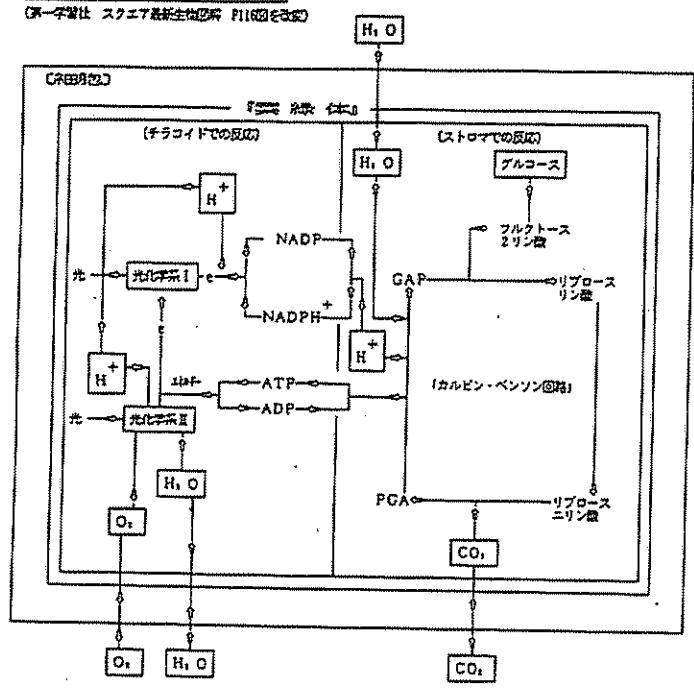
キビやスベリヒュにみられる型で、吸収されたCO₂が葉肉細胞の細胞質基質でホスホエノールピルビン酸と結合し、オキサロ酢酸を経てアスパラギン酸になります。アスパラギン酸は維管束鞘細胞のミトコンドリア内でオキサロ酢酸になり、NAD-リンゴ酸酵素 (NAD-ME) によって脱炭酸されます。脱炭酸されるとピルビン酸、アラニンへと変化します。リンゴ酸からピルビン酸になるときにできる CO₂ はカルビン・ベンソン回路に入り、グルコースに合成されます。アラニンは葉肉細胞の細胞質基質でピルビン酸に、さらに葉緑体内でホスホエノールピルビン酸になります。

③ ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEP-CK) 型

ギニアグラスやロードスグラスでみられる型です。アスパラギン酸を合成する経路とリンゴ酸を合成する経路があり、脱炭酸が 2ヶ所で行われます。吸収されたCO₂ が葉肉細胞の細胞質基質でホスホエノールピルビン酸と反応し、オキサロ酢酸を経て、アスパラギン酸になります。アスパラギン酸は維管束鞘細胞の細胞質基質でオキサロ酢酸になり、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEP-CK) によって脱炭酸され、ホスホエノールピルビン酸になり葉肉細胞へと戻ります。一方、葉肉細胞の葉緑体でオキサロ酢酸がリンゴ酸に変化し、リンゴ酸は維管束鞘細胞のミトコンドリアに入り、NAD-リンゴ酸酵素 (NAD-ME) の触媒作用で脱炭酸されピルビン酸になり、葉肉細胞で最終的にホスホエノールピルビン酸になります。この型は脱炭酸が 2ヶ所で行われCO₂ はカルビン・ベンソン回路に入ります。

C₃植物の光合成反応

(オーデザイン スクエア最新生物学 第16回)

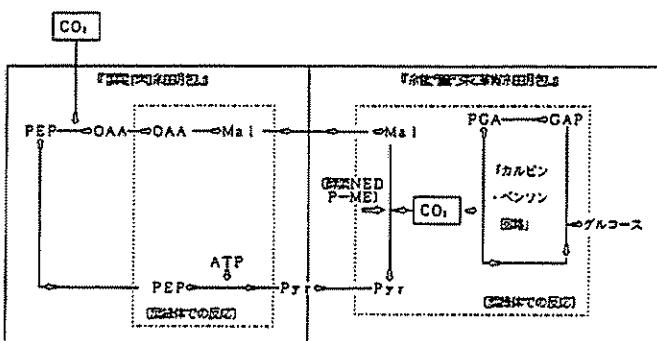


GAP: グリセラルデヒドリン酸, PGA: ホスホグリセリン酸

C₄植物のC₄シカノレボン回路

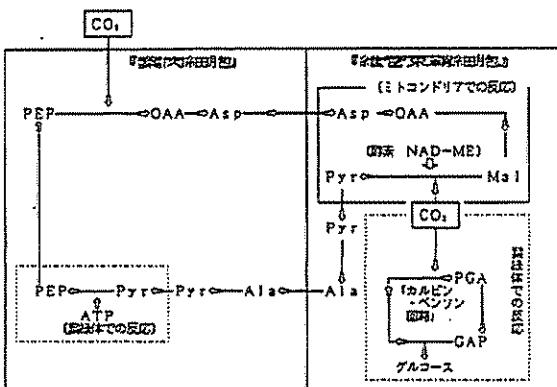
(古道学新編第4版 p71回20)

① NADP-リシン回路型 (NADP-ME型)



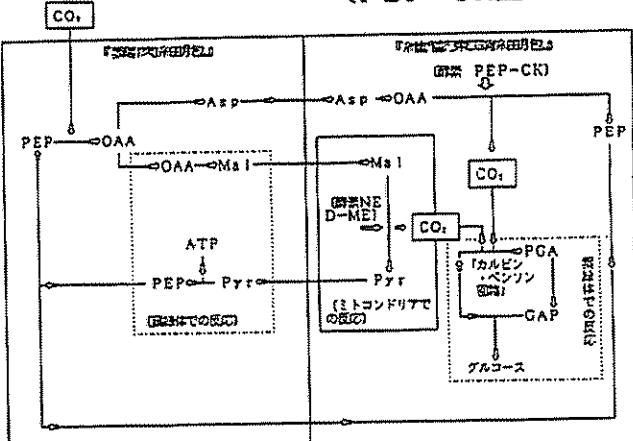
PEP: ホスホエノールビルビン酸, OAA: オキサロ酸, Mal: リンゴ酸, Pyr: ビルビン酸
PGA: ホスホグリセリン酸, GAP: グリセラルデヒドリン酸

② NAD-リシン回路型 (NAD-ME型)



PEP: ホスホエノールビルビン酸, OAA: オキサロ酸, Asp: アスパラギン酸, Mal: リンゴ酸,
Pyr: ビルビン酸, Ala: アラニン, PGA: ホスホグリセリン酸, GAP: グリセラルデヒドリン酸

③ ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ型 (PEP-CK型)



PEP: ホスホエノールビルビン酸, OAA: オキサロ酸, Asp: アスパラギン酸, Mal: リンゴ酸,
Pyr: ビルビン酸, Ala: アラニン, PGA: ホスホグリセリン酸, GAP: グリセラルデヒドリン酸

以上、①～③の3つのC₄ ジカルボン酸回路について述べましたが、C₄ 植物の光合成は葉肉細胞と維管束鞘細胞の2種類の細胞で、葉緑体・ミトコンドリア・細胞質基質が協同して行っていることになります。「C₄ 植物」はカルビン・ベンソン回路の前に、CO₂ 固定反応（C₄ ジカルボン酸回路）を行うことによってCO₂ 濃縮を行っています。「C₄ 植物」は「C₃ 植物」に比べて強光、高温、低CO₂ 濃度に適応した植物とされています。

○葉の構造からみた「C₃ 植物」と「C₄ 植物」

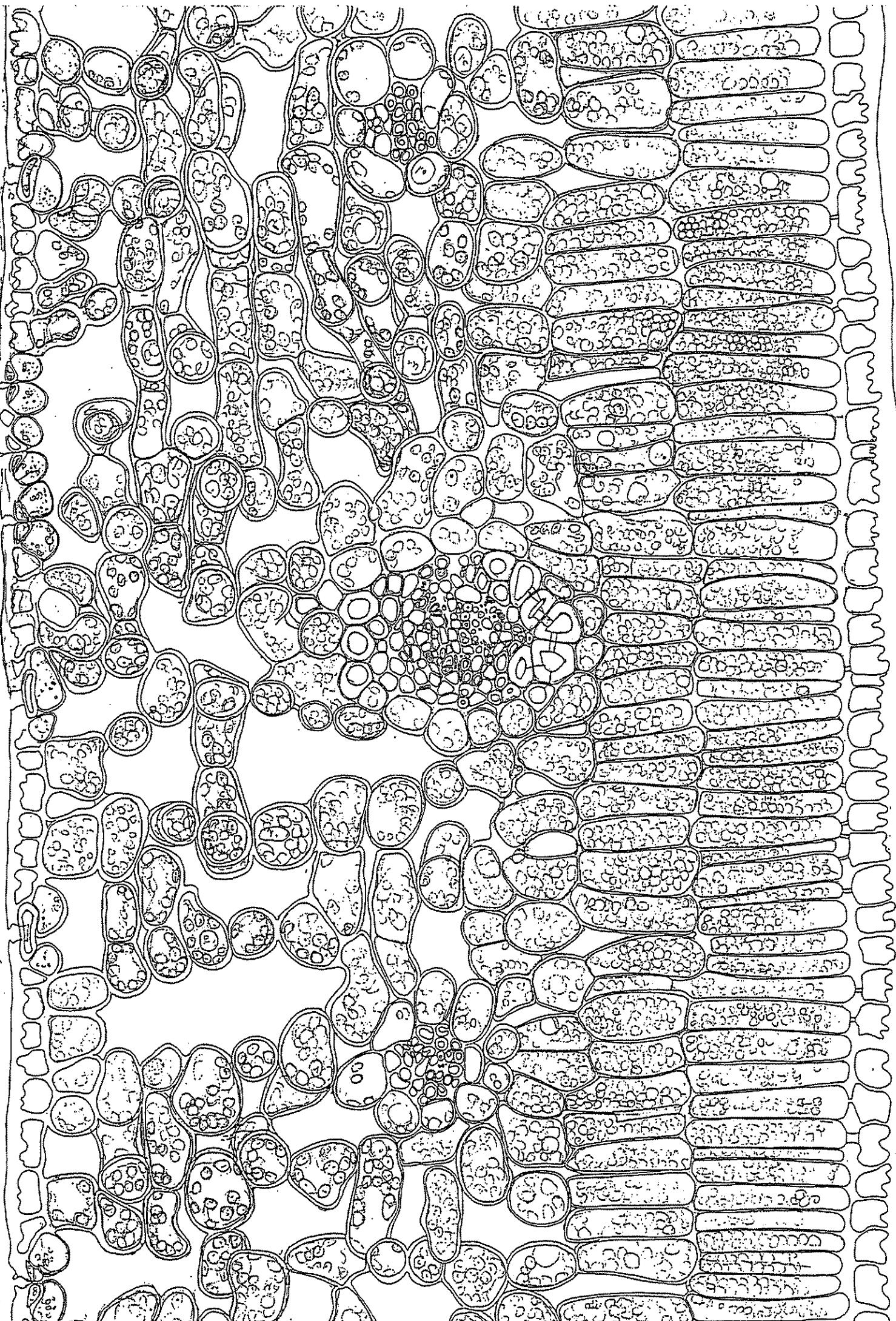
植物の基本代謝は光合成です。光合成はおもに葉で行われます。被子植物は大きく双子葉植物と、單子葉植物とに分けられます。双子葉植物の葉は基本的に橢円形や円形で、葉脈は網状であるのに対し、單子葉植物の葉は剣状で、葉脈は平行です。

ツバキの葉を切ってその断面（図）を見ると、その構造は①クチクラ層が発達した上面表皮、②びっしりと葉緑体を含む縦長円柱状の細胞からなり、これらの細胞がほぼすき間なくならんでいる柵状組織、③横長で丸みを帯びた細胞で柵状組織の細胞に比べると少數の葉緑体を含み、たくさんの空間をもつ海綿状組織、④下面表皮と気孔、さらに⑤維管束とからなります。⑥維管束を1層の柔細胞が取り囲んでいます。これを維管束鞘といいます。ツバキの葉の切片を作り、顕微鏡で観察しながらこれらの細胞に葉緑体を書き入れてみましょう。

柵状組織の細胞と、海綿状組織の細胞にはたくさんの葉緑体が含まれ、柵状組織と海綿状組織の細胞を葉肉細胞とよびます。葉肉細胞間には細胞間隙が多く、CO₂、O₂そして気体としてのH₂Oの通路となり、気孔を通じて外界と連絡しています。気孔の孔辺細胞にも、葉緑体が見られます。葉脈には維管束があり、木部が葉の上面側に、師部は葉の下面側に位置しています。

C₄ 植物は種子植物のいろいろな分類群にその存在が知られていますが、葉には共通した構造があります。それは、細胞壁のしっかりした維管束鞘が花冠のように維管束を包みこみ、その外側を環状に葉肉細胞が取りまいている構造です。この構造をクランツ構造といいます。クランツ構造の維管束鞘には葉緑体が存在します。また、C₄ 植物の環状葉肉細胞には多数の葉緑体が含まれ、柵状組織と海綿状組織の区別が明確ではありません。

單子葉植物のイネ科やカヤツリグサ科のC₄ 植物は、クランツ構造を持っていますが、双子葉植物のアカザ科にはクランツ構造を持たないC₄ 植物が見つかっています。



○CAM植物（ベンケイソウ型有機酸代謝（Crassulacean Acid Metabolism）を行う植物）

ベンケイソウ、サボテン、パイナップルの仲間達は日中に気孔を開くと水分が蒸散してしまうので昼間は気孔を閉じています。夜間に気孔を開いて取り入れたCO₂をオキサロ酢酸の形で固定し、CO₂をリンゴ酸として液胞中に蓄積します。日中、光が当たると気孔を閉じ、リンゴ酸からピルビン酸とCO₂を生じ、このCO₂をカルビン・ベンソン回路に供給しています。CAM植物には、C₄植物のような細胞間の分業は見られません。

生物学の基礎として：植物細胞の構造を描いてみよう。（5点）

小観察：

手順と観察すること

葉の構造はプレパラートを作成して、顕微鏡を使ってはじめてみることができます。カミソリ刃を使って切片を作り、面相筆を使って薄い切片をひろい、スライドガラスにのせて染色し、カバーガラスをかけて観察します。薄い切片をピンセットでつまむと、切片がこわれてしまうことがあるので、面相筆を使います。観察中に、観察する材料が乾燥しないようにグリセリン・アルコールなどをかけて観察します。このことを封緘（ふうかん）といいます。顕微鏡をのぞき、目的の観察個所を探して、その構造を理解することがこの小観察の目的です。各自が自分でプレパラートを作成して観察し、以下の設問に答えなさい。

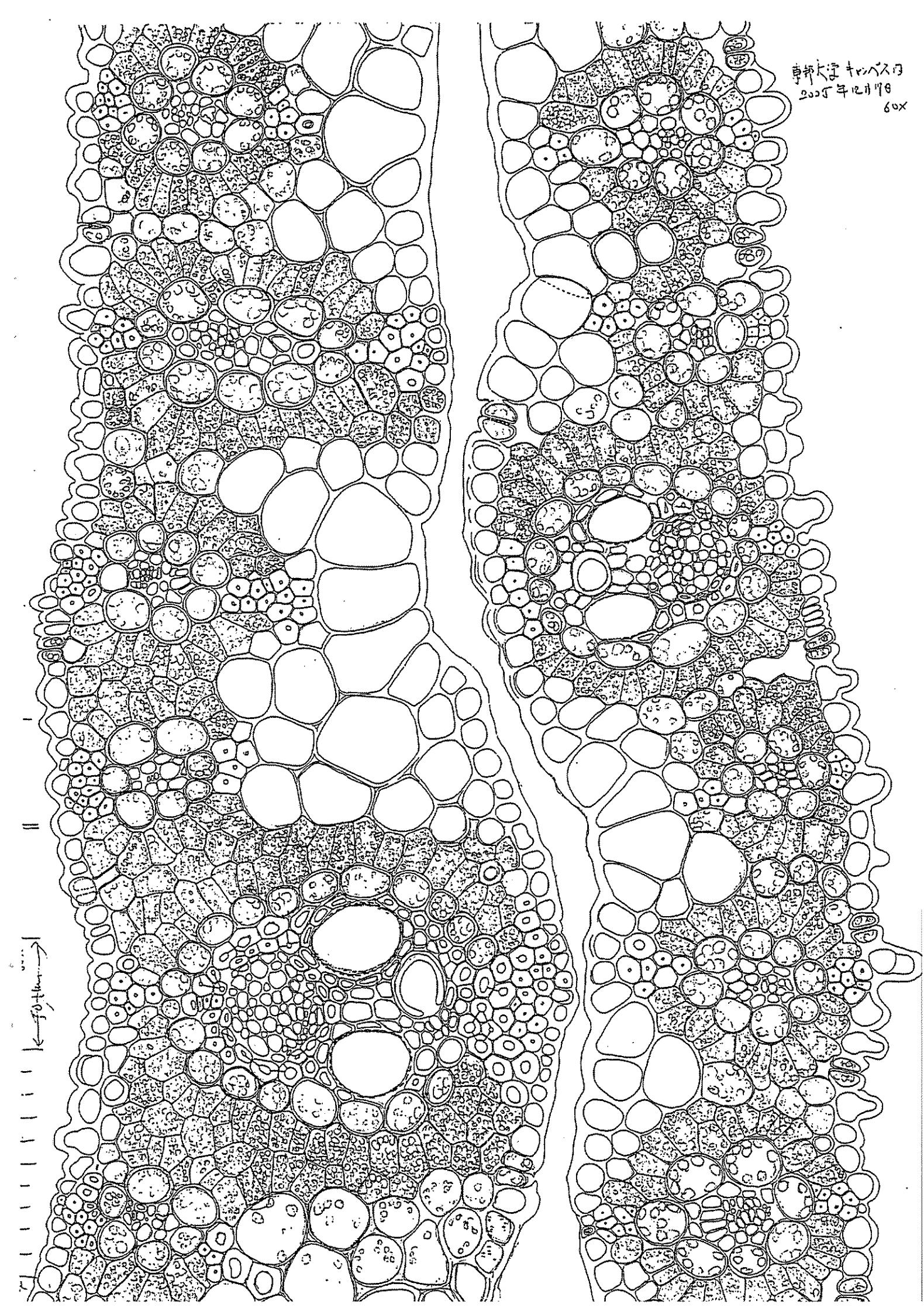
花瓶にはススキ、ノシバ、パンパスグラス、オカヒジキがさしてあります。これらの葉の切片を作成して葉の構造を顕微鏡で観察し、「C₃ 植物」と「C₄ 植物」がどのような構造を持っているかを勉強します。

机の上には、水の入ったシャーレ、水の入ったビーカー、スライドガラス、カバーガラス、ピンセット、面相筆、片刃のカミソリ、サフラニン・グリセリン・アルコール（サフラニンは赤い染色液です。これをグリセリン・アルコールに溶かして染色と、封緘の役目をします）、緑色の色鉛筆2本、鉛筆6本が用意してあります。

1) ススキの葉をとり、長い方向に2つに折り曲げて重ねます。さらに2つに折り曲げて重ねます。重ねた葉の先1cm下を左手の人差し指と親指とでしっかりとつまみます。右手にカミソリを持ち、葉を手前に引きながら指先から3mm上を切り取ります。そこには4枚の葉の断面が見えます。この断面の上を右手に持ったカミソリ刃を注意深く、手前に引きながら薄い切片を作成します。左手の指先をそぐように薄い薄い切片を作成します。作成した切片はシャーレの水の中に入れます。たくさんの切片を作ります。

シャーレの中に入っているたくさんの切片の中から、より薄いものを面相筆で拾い上げ、スライドガラスの上にとります。数個の切片をのせて、その上にサフラニン・グリセリン・アルコールを1滴落としてカバーガラスをかけて顕微鏡で観察します。

設問 1：手元にある図の中からススキの葉の断面を描いたものを探し出して、その絵にあなたが見ている切片を観察しながら葉緑体を書き入れてください。



細胞内における葉緑体の位置、葉緑体の色や大きさにも注意してください。また、それらの葉緑体の入っている細胞の組織名または細胞名はそれぞれ何と言いますか。図の中に書き入れてください。 (6点)

2) ノシバの葉をとり、ススキと同様の方法で切片を作成して顕微鏡で観察してください。

設問 2 : 手元にある図の中からノシバの葉の断面を描いたものを探し出して、その図にあなたが見ている切片を観察しながら葉緑体を書き入れてください。
(3点)

3) オカヒジキの葉を6本とり、左手の親指、人差し指と中指の間に挟んで一束とします。まず、指先3mmの上をカミソリ刃で切り落とします。この断面の上を右手に持ったカミソリ刃を注意深く、手前に引きながら薄い切片を作成します。左手の指先をそぐように薄い薄い切片を作成します。作成した切片はシャーレの水の中に入れます。たくさんの切片を作りましょう。それらの中から、ススキと同様の方法で、薄い切片をスライドガラスの上にのせて観察します。

設問 3 : 手元にある図の中からオカヒジキの葉の断面を描いたものを探し出して、その図にあなたが見ている切片を観察しながら葉緑体を書き入れてください。 (3点)

4) パンパスグラスの葉をとり、ススキと同様の方法で切片を作成して顕微鏡で観察してください。

設問 4 : 手元にある図の中からパンパスグラスの葉の断面を描いたものを探し出して、その図にあなたが見ている切片を観察しながら葉緑体を書き入れてください。 (3点)

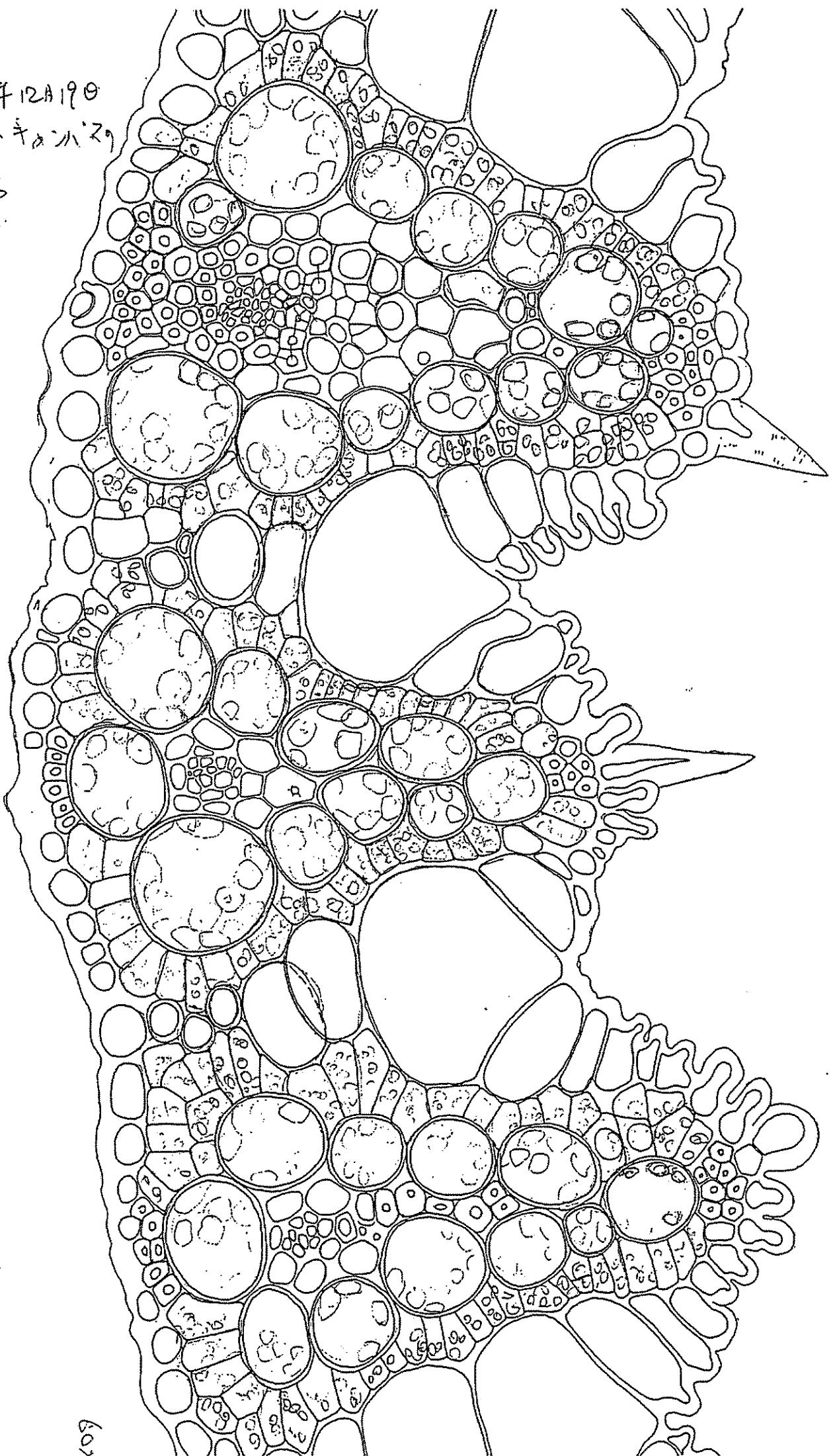
設問 5 : 4種の植物の葉の構造を観察した結果、これら4種の植物はそれぞれ「C₃植物」あるいは「C₄植物」のいずれに分類されるでしょうか。その理由も述べなさい。 (8点)

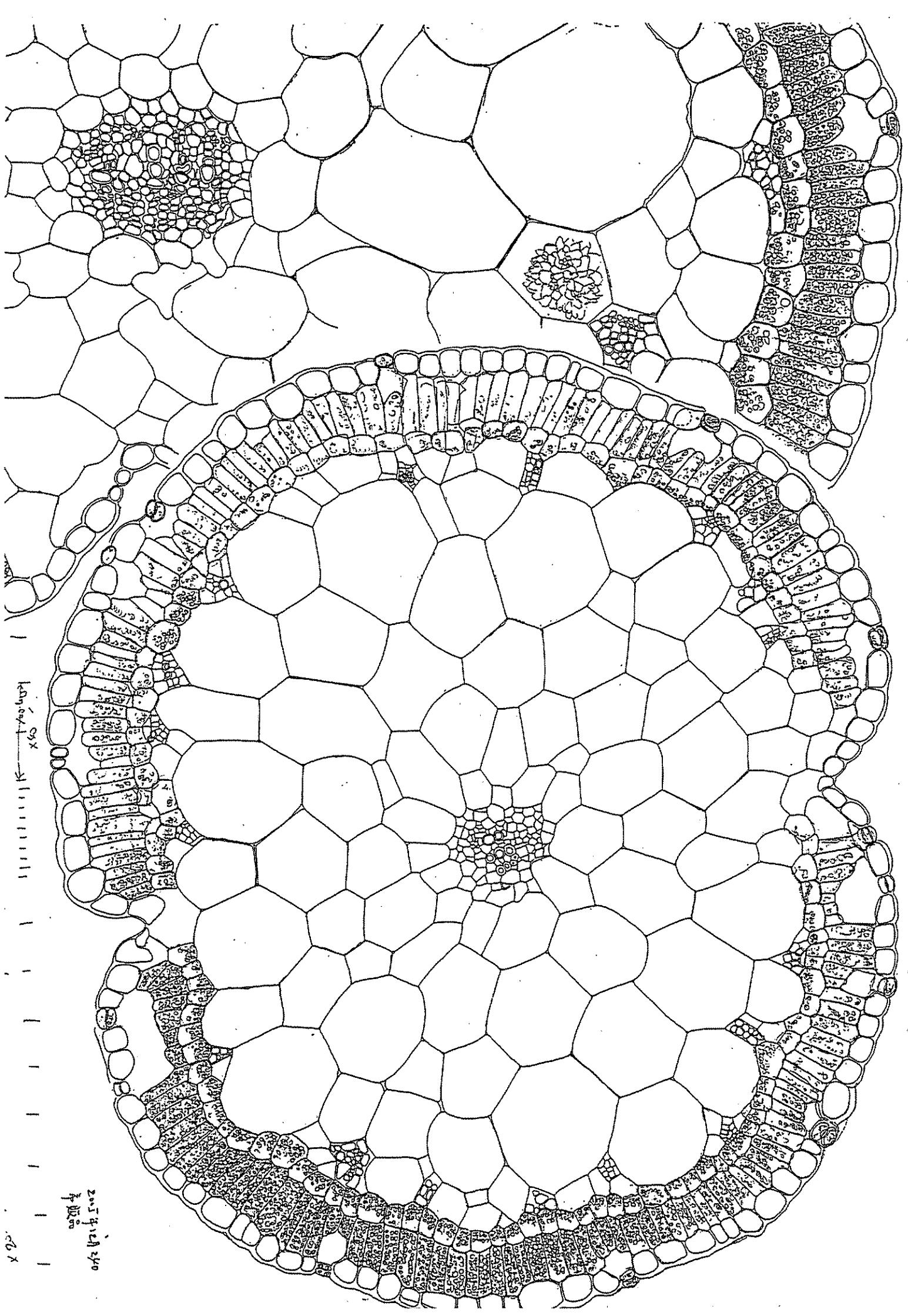
設問 6 : 下記の図はサトウキビの葉の断面です(切片が用意してあります)。

2005年12月19日

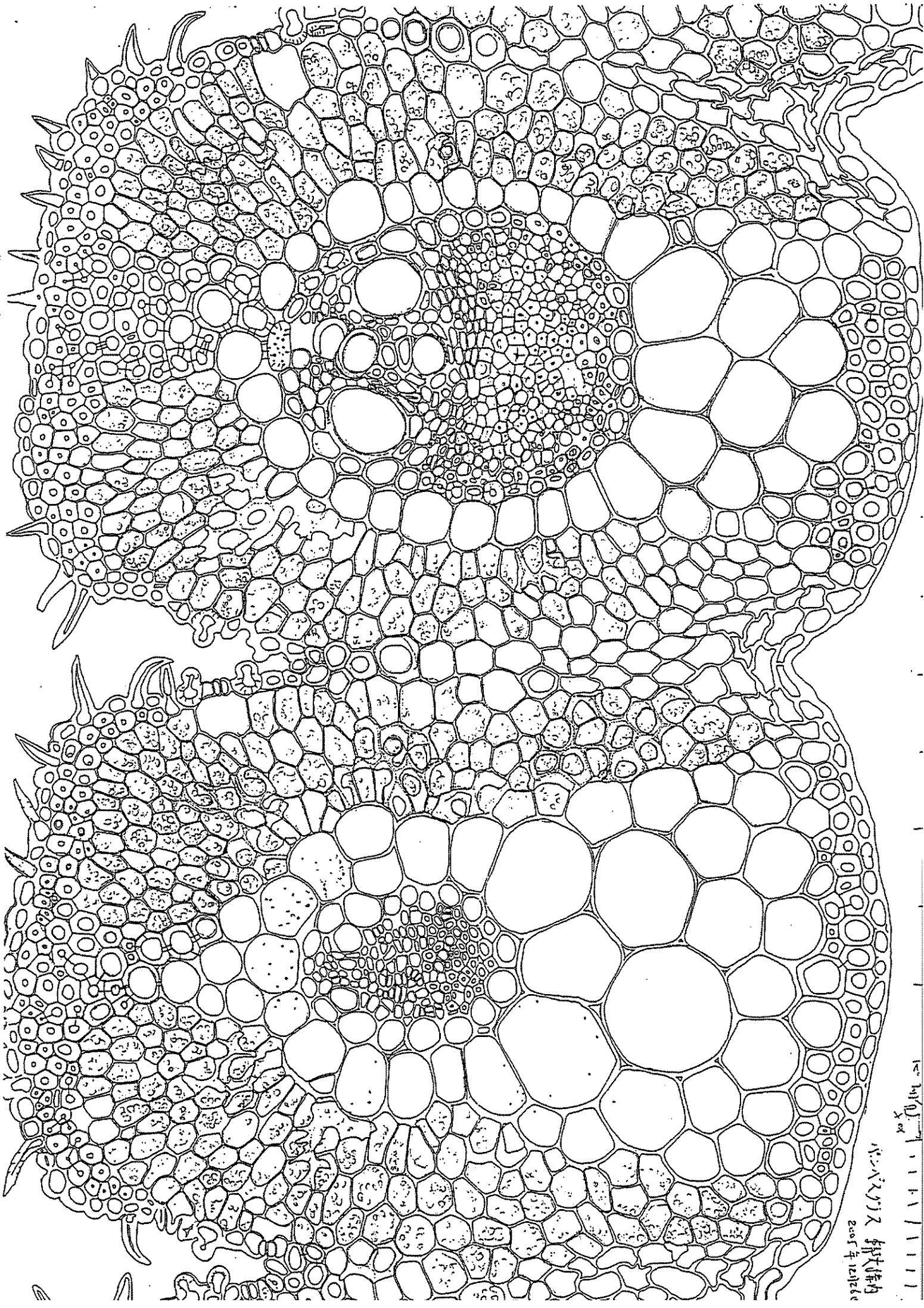
東京大・千葉・29

芝布



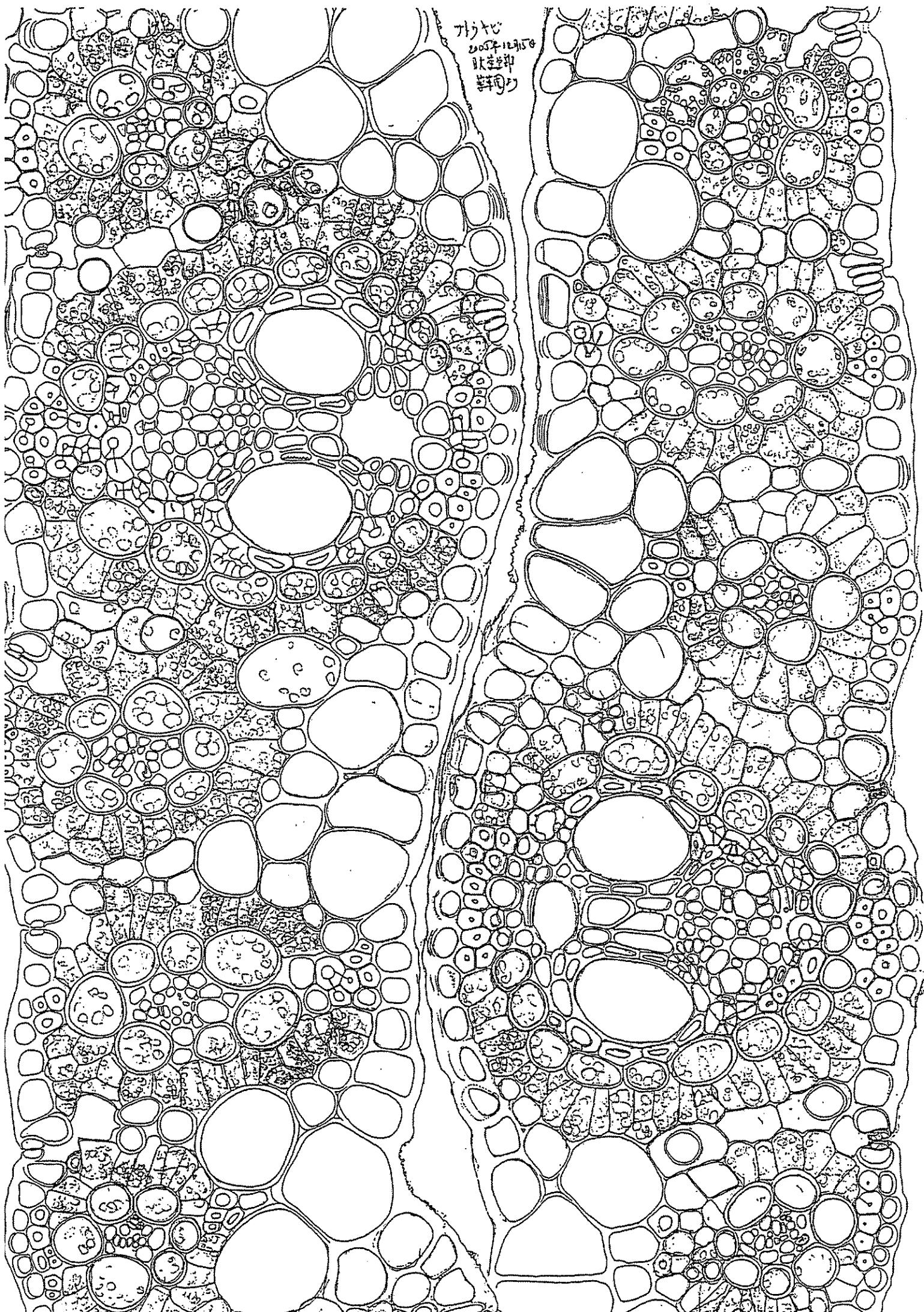


2015年12月
240



アシナガソウ
2005年12月6日

アラヒ
2005年12月5日
秋葉原
新規



それぞれ番号で示す細胞の、組織名または細胞名をあげ、葉緑体を書き入れなさい。 (8点)

設問 7 : クランツ構造とはどのようなものか、模式図を描き文章で説明しなさい。 (4点)

番外設問：「C₄植物」の多様な形態を観察してきました。「C₄植物」にはさまざまな形態の仲間があることがわかつてもらえたことでしょう。それでは野外に出かけ、3種類の植物の葉を探ってきてください。その植物の名前を記し、切片を作り、顕微鏡で観察してその植物が「C₄植物」か「C₃植物」かを判定してください。

