

日本生物学オリンピック 2012 本選 つくば



動物生理学

制限時間 120分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で3枚あります。

その全てに受験番号と名前を記入しなさい。

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

はじめに

今から約4億年前、古生代のデボン紀に誕生した昆虫は、ツンドラから温帯、熱帯雨林そして砂漠へと地球上のあらゆる環境へと分布域を広げてきました。現在昆虫は100万種以上が知られ、全動物種の70%を占める最大の生物群となっています。

カイコはチョウ目に属する昆虫で、卵→幼虫→蛹→成虫の生活環をもつ完全変態昆虫であり、蛹化時に形成される繭は繊維として利用できるため、昔から人による飼育（養蚕）が行われてきました。良い品質の絹を作ること、病気に強いカイコを育てることなどの目的から多くの研究が行われてきました。現在では重要なモデル生物として位置づけられ、特に日本では最も研究が活発に行われている昆虫です。本実験試験ではカイコ幼虫の行動や内部形態の観察を通して、昆虫の特徴について理解してもらいたいと思います。

課題は大きく3部に分かれています。第1部はカイコ若齢幼虫の異なる餌成分が成長に与える影響について考える問題、第2部以降はカイコの終齢である5齢幼虫を使った実験を含む問題です。第2部では幼虫1頭のもつ総血球数を求め、さらにヒトと昆虫での血球の役割について考えてもらいます。そして第3部では実体顕微鏡下で幼虫の解剖を行って神経系を観察し、脳の摘出を行ってもらいます。また昆虫の変態を制御するホルモンの役割について考察してもらいます。

サンプルと器具

解剖皿、針6本、ホールスライドとカバーガラス、チューブ立て、空チューブ2本、抗凝固液（黄色ラベル）、血球計算盤、カウンター、ピペットマン（P200、P20）、ピペットチップ、実体顕微鏡、正立顕微鏡、蒸留水（洗びん）、

始めに氷上におくことによっておとなしくさせたカイコ幼虫2頭ずつを配っています。解剖の過程でどうしても予備のカイコが必要となった場合は申し出て下さい。

予備体験に用いたピンセットと解剖バサミを使用します。なお、机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

解剖したカイコの体液のついた手で目をこすったりするとかゆみが出ることもあるので、手はこまめに洗ビンの水で拭いてください。

2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つは使用したピペットチップ用、もうひとつはカイコ及び使用したキムワイプなどを入れて下さい。

試験中に顕微鏡の光源がつかなくなったり、顕微鏡のレンズがよごれたら速やかに申し出てください。また解剖にあたり、手袋の使用を希望する人は適宜挙手して下さい。

問題は3部構成になっておりますので全体に眼を通してから作業に取りかかってください。顕微鏡の使用マニュアル、マイクロピペットの使い方及びカウンタの使い方は、問題の前に入れてあります。

試験終了後、問題用紙はお持ち帰り下さい。

それでは解答をはじめて下さい。

評価項目

- 課題1. カイコの摂食に関するデータを読み取ることができるか。
- 課題2. 血球数を正しく導き出すことができるか。
昆虫とヒトで血球種が異なる理由を説明できるか。
- 課題3. 実体顕微鏡下で正確な観察と解剖が行えるか。
変態に関わる昆虫ホルモンの役割を考察できるか。

顕微鏡使用マニュアル

眼幅、視度調整（正立・実体顕微鏡共通）

1. 眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので顕微鏡には各人の違いを補正する機能がある。
2. 眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像が一個になった位置が正常な位置になる。
3. 視度調整：左右の眼のピントが違うので、先ず右目で観察する標本にステージを上下してピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして左目で覗き接眼レンズの根本にある視度補正環を回転させピントを合わせる。

正立顕微鏡（図1、2参照）

1. 光源スイッチをONにする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
2. 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
3. レボルバーを回して対物レンズを4倍（最低倍率）にする。
4. 標本押さえにプレパラートをセットして標本押さえレバーで固定する。
5. コンデンサー上部のレンズから見えている照明光の位置に、標本の観察したい部位を、ステージ移動ハンドルを使って移動させる。
6. ステージを一番上まで上げる。
7. 接眼レンズをのぞいてピントが合う位置まで粗動ハンドルを回してステージを下げる。
8. 微動ハンドルを回してピントを微調整する。
9. コンデンサー絞りをを使ってコントラスト、焦点深度を調整する。
10. 倍率を上げて観察する場合には、レボルバーをまわして対物レンズを10倍、40倍に交換する（今回は100倍の対物レンズは使用禁止です）。

※コンデンサーの使い方

- ・コンデンサーには絞りがついており、絞りを開閉することにより標本にコントラストをつけたり焦点深度を調整することができる（以下の表を参照のこと）。

	コンデンサー絞り (開)	コンデンサー絞り (閉)
明るさ	大	小
焦点深度	浅	深
コントラスト	弱	強

注：使用中、レンズがよごれた場合には監督員(TA)まで申し出てください。

図 1 正立顕微鏡全体図

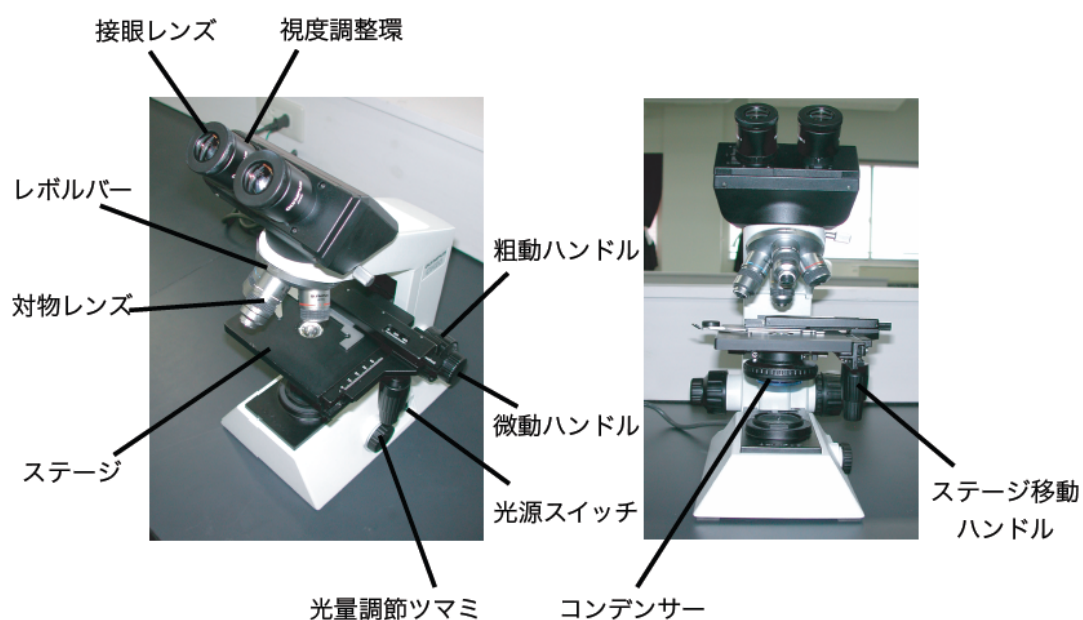


図 2 ステージへの標本のセット



実体顕微鏡 (図 3 参照)

1. 光源スイッチを ON にする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
2. 角度を調整して、飼料に光が十分当たるようにする。
3. 焦準ハンドルとズームハンドルを回して、ピントと倍率を調整する。

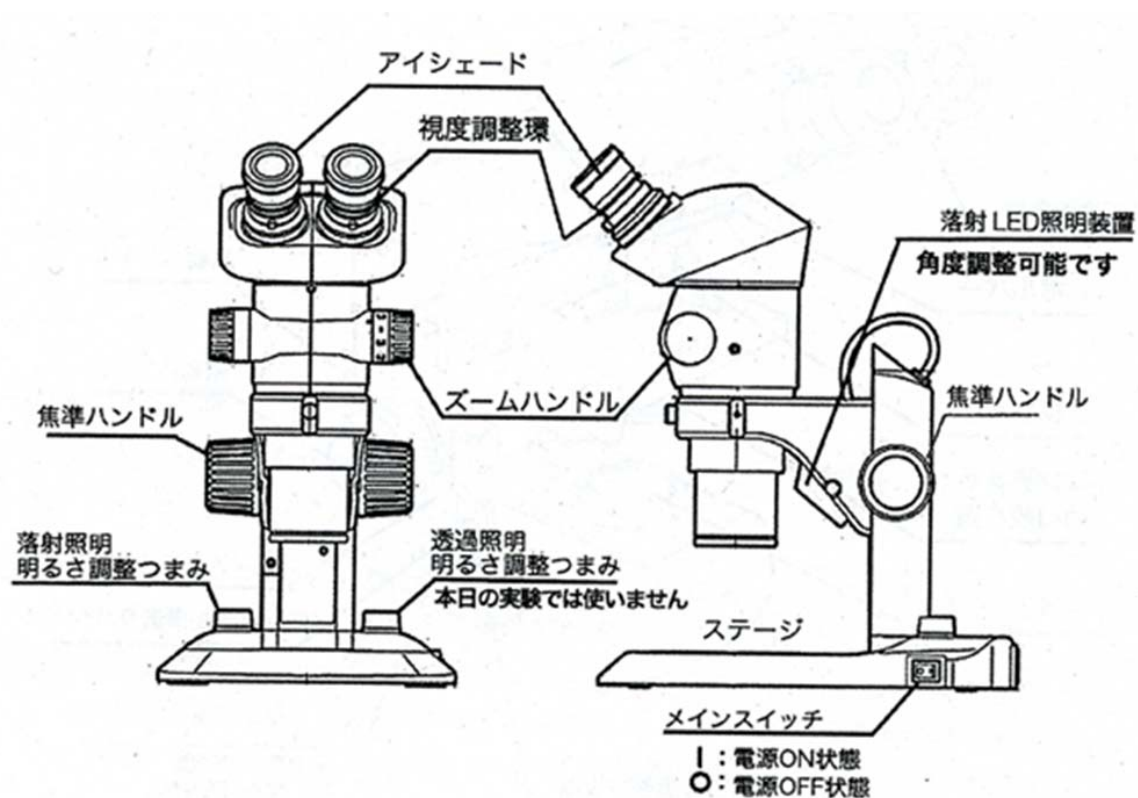


図3. 実体顕微鏡各部名称

マイクロピペットの使い方

マイクロピペット(図1)は 1.0 ml (= 1000 μ l) 以下の微量の液体を測り取る時に用います。今回使用するマイクロピペット P1000、P200、P20 (プッシュボタンに書かれています) では、それぞれ 200 μ l ~ 1000 μ l、50 μ l ~ 200 μ l、2 μ l ~ 20 μ l の容量を測り取ることができ、目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量を設定します。プッシュボタンを上下させることにより本体内の空気を動かすことで液体を吸い上げたり排出したりできる構造になっています。

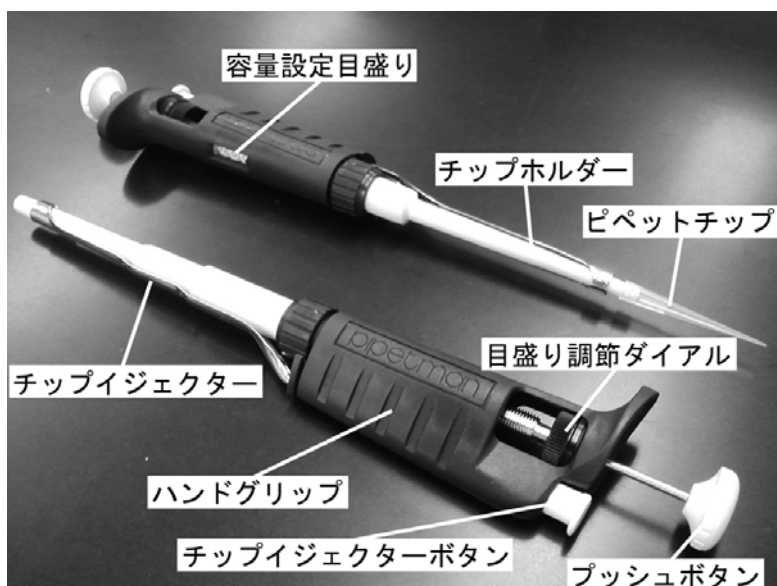


図1 マイクロピペット(手前:P1000、奥:P200 ピペットチップ装着)

- 1) 目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量にセットする(図2参照)。ダイヤルはゆっくり回す必要はないので手早く設定容量にセットする。

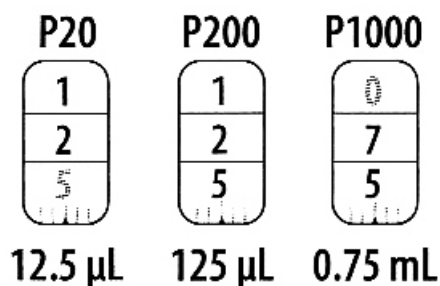


図2 マイクロピペットの容量設定目盛り

- 2) 親指でプッシュボタンを押せるように片手でハンドグリップを握る。チップイジェクターボタンが手のひら側の向きになるように握る。
- 3) ピペットチップが入った箱(チップラック、図3)のふたを開け、ピペットチップにチップホルダーの先端を差し込んで装着する。P1000は白色、P200とP20は黄色のピペットチップを使用する。ピペットチップとチップホルダーの間から空気が漏れないように、装着したピペットチップでチップラックを軽くトントンと叩くようにしてしっかりと装着する。装着後チップラックのふたを閉める。

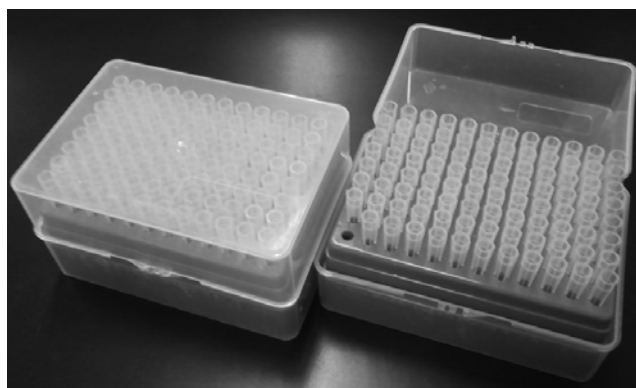


図3 チップラック

- 4) プッシュボタンを第一ストップ(図4)まで押し込み、その状態のままピペットチップの先端を液につけ、ゆっくりかつ滑らかにプッシュボタンをトップまで戻すことで液を吸い上げる。

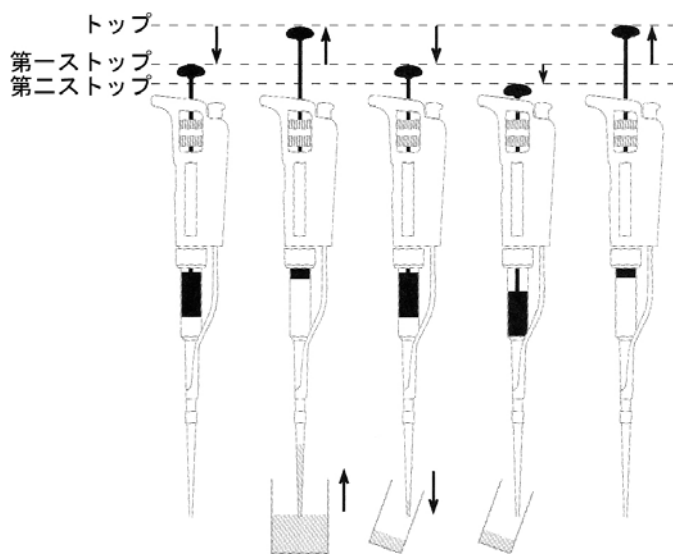


図4 プッシュボタンの動かし方

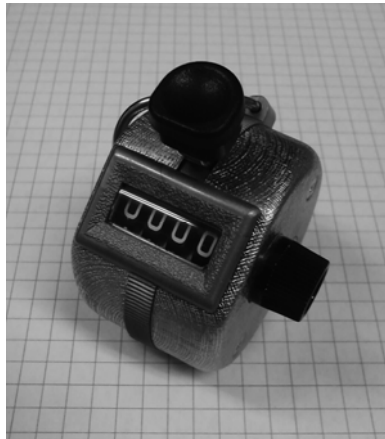
- 5) ピペットチップの先端を液を移す容器に入れ、プッシュボタンをゆっくりと第一ストップまで押し下げて液を排出する。第一ストップで一度止めたプッシュボタンを続けて第二ストップまで強く押し下げ、ピペットチップ内に残った液を完全に排出する。
- 6) プッシュボタンをトップまでゆっくりと戻す。
- 7) イジェクターボタンを親指で押してピペットチップを取り外す。ピペットチップは測りとする液体が変わるたびに使い捨てる。

注意点)

- ・ 必ずピペットチップを装着して液を吸い上げること。
- ・ 液を吸い上げた状態でマイクロピペットを逆さまにしないこと。
- ・ 液を吸い上げる際に、マイクロピペット本体まで液を吸い込まないように注意してゆっくり操作すること。特に吸い上げ途中でプッシュボタンから指を離すことは絶対にしないこと。ただし、ゆっくり動かしすぎてシリンダーの移動がスムーズでない場合は測り取る量の正確性が損なわれるので、滑らかに動かすよう注意する。吸い上げ開始から完了まで1～2秒かけるのが適正な速度である。また、マイクロピペット作業中に本体まで液を吸い込んでしまった場合は速やかに挙手し、TAに知らせること。

カウンタの使い方

- 1) 本体右側のダイヤルを時計回りに回して表示を「0000」にセットする。
- 2) 本体上部のプッシュボタンを押してカウントする。
- 3) カウントが終了したら、1)と同じ方法で表示を「0000」にリセットする。



注意点)

- ・ 本体右側のダイヤルは必ず時計回りにまわすこと。反時計回りに回転させると破損する恐れがある。

第 1 部 カイコの摂食行動

植物を食べる昆虫が寄主植物を選ぶ際には、植物中の摂食刺激因子や摂食阻害因子が関わっていることが明らかにされています。カイコ幼虫はクワの葉しか食べないのは有名ですが、これはクワにはカイコにとっての摂食刺激因子が多く、逆に摂食阻害因子が少ないことに起因しています。それでは、カイコにとって摂食刺激因子の役割とはどのようなもののでしょうか？ そこで以下のような摂食刺激因子を含む人工飼料を与えたときの体重を測定し、摂食量（排糞量から予測可能）との関係を調べてみました。

実験

下の表 1 のようにセルロース、炭酸カルシウム、スクロースを混合し、寒天で固めた人工飼料 A～D および上記の成分も含みクワの葉をベースにした市販のカイコ用人工飼料 E を同じ大きさ（1 × 1 × 1 cm）に切り、それぞれ 9 cm プラスチックシャーレに入れました。これらのシャーレそれぞれに孵化したばかりのカイコ 1 齢幼虫 50 頭（1.6 mg/10 頭）を放しました。カイコ幼虫をシャーレに入れてから 24 時間経過後、糞の数を数え体重を測定したところ下のような結果が得られました。

表 1 カイコの摂食実験に用いた人工飼料と摂食、体重への影響

追加成分 人工飼料	セルロース (10%)	炭酸カルシウム (10%)	スクロース (10%)	排糞数 ¹⁾	体重 ¹⁾ (mg)
人工飼料 A	○	－	－	0	1.9
人工飼料 B	○	○	－	31.9	2.1
人工飼料 C	○	－	○	38.4	2.3
人工飼料 D	○	○	○	98.1	3.5
人工飼料 E	○ ²⁾	○ ²⁾	○ ²⁾	126.2	10.5

¹⁾24 時間後の 10 頭あたりの平均値

²⁾含まれるが、含有率は不明。

問 1

人工飼料A～Dの結果より、炭酸カルシウム、スクロースの機能について 100 字以内（句読点を含む）で述べなさい。

問 2

人工飼料EにはDに含まれる成分以外にどのようなものが含まれていることが予想されるか、人工飼料DとEの摂食効率の比較から 120 字以内（句読点を含む）で述べなさい。

問 3

カイコにおける摂食と成長との関係について 100 字以内（句読点を含む）で述べなさい。

第2部 カイコ幼虫の血球

昆虫は私たちのような毛細血管をもつ閉鎖血管系ではなく、動脈から流れ出た体液は組織の隙間に沿って流れながら静脈へと戻る開放血管系です。昆虫の体液は、主に栄養とホルモンを体中に運ぶ役割をもっており、成虫では翅の中までも流れることが知られています。

カイコ幼虫では、その全重量の 25%を体液重量が占めています。この中には数種類の血球種が存在することが報告されています。今回はカイコ幼虫にどのくらいの血球数が存在するか計算してみましょう。

実験

5 倍濃度の抗凝集溶液を 20u μ l (0.02ml)、1.5ml チューブに P20 ピペットマンを使って入れます。

P200 ピペットマンを 80u μ l に設定しておきます。

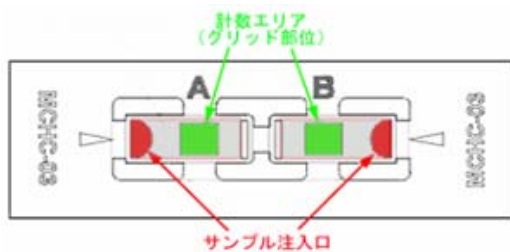
新しい 1.5ml チューブを準備した上で、氷上に乗せておいたカイコをキムタオル上で転がし、水分を取り除きます。それから第2腹脚の先端横（下図の赤丸）に針を刺して、出てくる体液を約 100u μ l（約3滴）チューブに回収します。



このカイコは氷上に戻しておいて下さい。

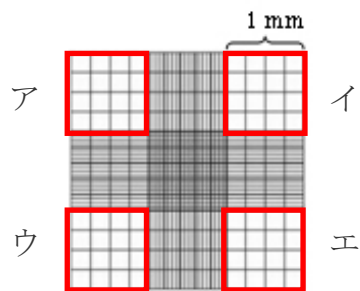
回収した体液から 80u μ l を取り、抗凝集溶液の入ったチューブに加え、ピペットマンで溶液を優しく 2-3 回ほど出し入れしながら混合します。これを血球サンプル溶液として血球密度測定に用います。

血球計算盤(スリットの厚みは 0.1mm)のサンプル注入口にサンプル溶液 (20u μ l) を P20 ピペットマンで加え、正立顕微鏡にセットします。



4 倍の対物レンズで血球計算盤のメモリにピントを合わせた後、10 倍にして細胞を観察します。カウンタ

を用いて、下図のように計数エリアの 4 カ所（3 x 3 mm のうちの 4 つ角（ア～エ）の 1 × 1 mm）で血球数をカウントして下さい（本試験では外枠と重なっている細胞はカウントしない。5 個以上まとまった細胞塊で一個ずつ判断できない血球は 5 個としてカウントする）。



問 1

4 回平均個数から血球密度を計算し、比重量=1.0、カイコ重量を 3.5g としたときのカイコ 1 頭当たりの総血球数を計算しなさい。回答は 4 回の測定値を記入後、計算過程を記述し、最終血球数は有効数字を 2 桁として $\bigcirc.\bigcirc \times 10^v$ のように表して下さい。

問 2

私たちの血液には、赤血球、白血球、そして血小板と呼ばれる血球が含まれています。そして血液が赤いのは赤血球に由来するものです。一方、一般的な陸生昆虫の体液はカイコで観察できたように透明です。なぜ昆虫の血球には赤血球にあたる細胞が存在しないのでしょうか？赤血球が赤い理由や昆虫の体のしくみから考えてみて下さい。

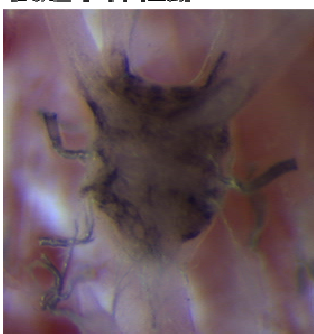
第3部 カイコ神経系の観察

動物の神経系は全身の神経細胞の連結によって形成されており、多数の神経細胞がまとまった脳や神経節などの中枢神経をもつものは集中神経系と呼ばれています。昆虫の神経系は、神経節どうしが2本の神経索で接続され体内を縦断しており、各神経節から末梢神経がのびています。カイコの頭部側中枢神経の末端である脳からは食道を囲むように線維が下に伸び、その先には大きな食道下神経節があり、さらにそこから腹側を縦断する連続した神経節へと接続し、最後の腹部末端の神経節は2個が連続した形になっています。カイコ幼虫では下図のようなそれぞれ1-2mm程度の神経節を観察することができます。

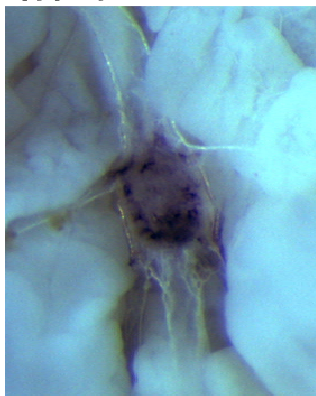
脳



食道下神経節



神経節



腹部末端神経節



昆虫の脳では、前胸腺によるエクジステロイド（脱皮ホルモン）の分泌を活性化させる前胸腺刺激ホルモンが合成され、脳に付属したアラタ体とよばれる器官を通して分泌されます。アラタ体ではJH（幼若ホルモン）の合成と分泌も行われており、ホルモン分泌の中枢となっています。カイコは、この昆虫の脱皮と変態のメカニズムの解明に大きく貢献してきました。ここでは、下図の手順に従いカイコ幼虫を解剖し、各神経節や脳及びアラタ体を観察してみましょう。

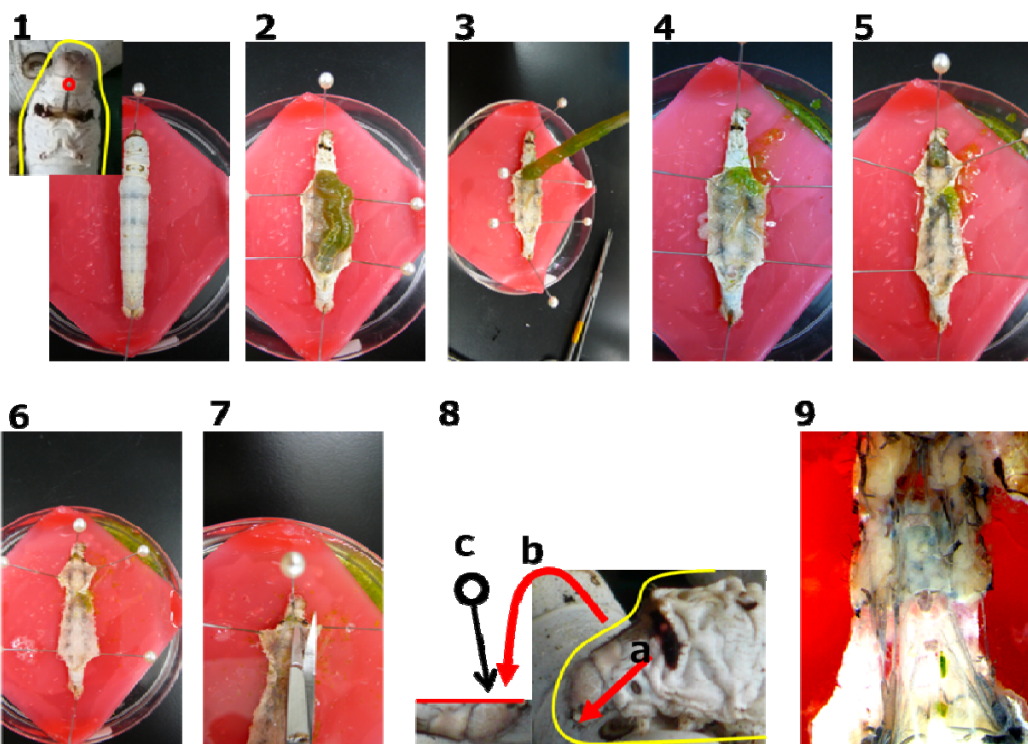
実験

写真を参照しながらカイコの解剖を行って下さい。

1. 先程から氷麻酔したカイコ幼虫を解剖皿上に置き、頭部を押さえながら根本（図の赤丸）に針を刺す。体がまっすぐになるようにして尾部（尾角よりも後ろ側）にも針を刺し固定する。

2. ハサミで尾角から頭部に向かって半月紋付近（尾角および半月紋は第2部の写真参考）まで切る。このとき深くハサミを入れると腸に傷をつけるので注意する。表皮を左右に開き、針を使って固定する。
3. 尾部付近の腸の細い部分を切り、その先端をピンセットでもちあげながら体から剥がしていく。このとき黒い管が付着しているのでハサミで切りながら進める。
4. 半月紋まで切った表皮の切れ目まで進めたら、そこで腸を切り捨てる（腸の内容物がこぼれるのですばやく行う）。
5. 標本全体が浸かるように水を加える。
6. 背中側の切り込みを頭部の根本（針を刺した場所）まで切り進め、その下に見える腸も引っ張り除く。これ以降は必要に応じて実体顕微鏡下で解剖を行う。
- 7, 8. 背中側の開いた場所から頭部の側面に切り込みを入れ、上部をひっくり返すようにして頭部を開く。

図8はイメージ。a方向から頭部の左右側面を切る（頭部の上部に脳があるので傷つけないように気をつける）。上部の皮膚をピンセットで挟みながら首部分の針を一度はずし、b方向に頭部上部を口部を支点に裏返し。裏返しになった頭部殻を再び針で固定する(c)。
9. 元の頭部のあった場所に小豆色の脳が見え、食道（腸）を囲むように2本の線維が見られ、食道下神経節に繋がっているのが観察できる。



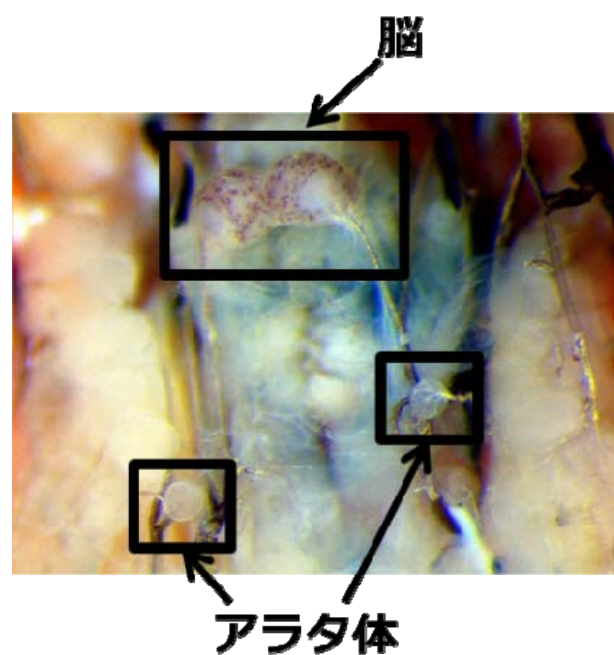
問 1

食道下神経節と腹部末端神経節（双方とも写真のような特徴がみられるので他の神経節と区別が可能）の間にある神経節（形状はほぼ同じ）の数をかぞえてください。

問 2

脳とアラタ体を摘出してみましょう。

脳と食道下神経節の間の繊維をピンセットでつまみ切断し、左右からのびた透明な線維の先にあるアラタ体を切り離さないように注意しながら、周りの器官を除いてホールスライドに移します（脳を直接ピンセットでつままないこと）。ホールスライドにはあらかじめ少量の水を滴下しておき、摘出した脳を置いた後、カバーガラスをのせたものを提出サンプルとします（脳だけでも可。うま

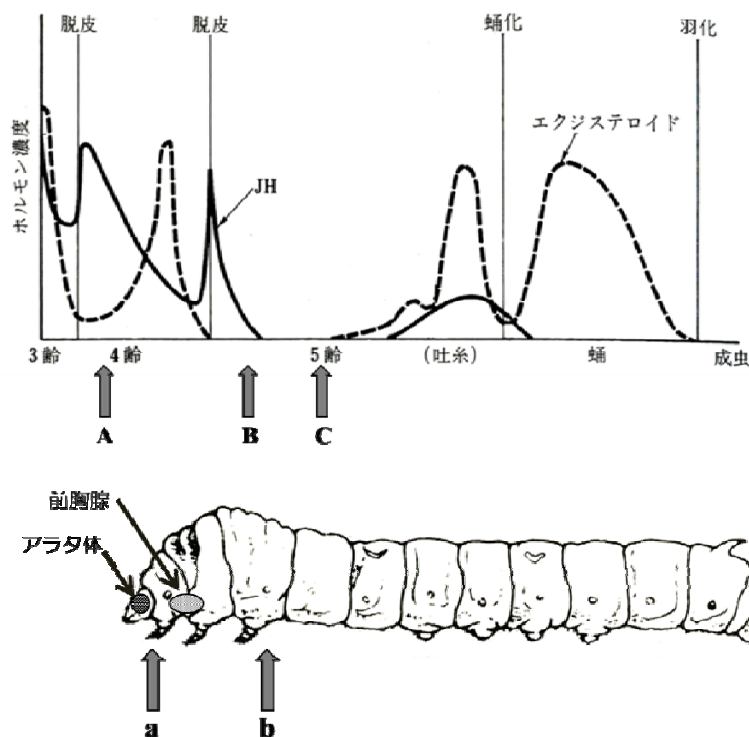


く取り出せると左右の脳をループ状につなぐ前額神経球も見られます)。

問3

昆虫では神経機能の脳への集中化が我々ほど進んでおらず各神経節に機能が分散されていることもあり、糸で体を縛って体液の交流を遮断しても生きていくことができます。この特性をもちいて結紮実験を行うことにより、昆虫の脱皮・変態現象がホルモンによる内分泌支配であることが明らかになりました。現在では、胸部にある前胸腺で合成され分泌されるエクジステロイドが脱皮を引き起こし、アラタ体で合成され分泌されるJHが脱皮の性質を決定する役割をもっていることがわかっています。

5 齢幼虫が終齢であるカイコは、通常 5 齢幼虫の終わりに繭を作り始め蛹化しその後羽化します。幼虫期においてエクジステロイドは特に脱皮直前から脱皮時に多く分泌されていますが、JH は 5 齢の中期で分泌が一度止まることが



あり、これが蛹化を引き起こします（次ページ参照）。

そこで以下の 1-5 のようにアラタ体を処置、またはカイコ幼虫を糸で結紮し体液の循環を止めてみました。その結果予想される変化について最も適切なものを、1、2 はイ～ニから、3、4、5 はホ～チから選択し、さらにそのよう

になる理由を簡単に答えなさい。

1. 4 齢になった直後の幼虫 (A) からアラタ体を摘出・除去する。
2. 5 齢になった直後の幼虫 (B) に 4 齢幼虫のアラタ体を移植する。
3. 4 齢になった直後の幼虫 (A) の頭部と胸部の間 (a) を結紮する。
4. 吐糸前の幼虫 (C) の頭部と胸部の間 (a) を結紮する。
5. 吐糸前の幼虫 (C) の胸部の後ろ (b) を結紮する。

- イ. 4 齢幼虫になる。
- ロ. 5 齢幼虫になる。
- ハ. 6 齢幼虫になる。
- ニ. 蛹になる。
- ホ. 結紮の前・後部とも幼虫のままになる。
- ヘ. 結紮の前部のみ蛹になる。
- ト. 結紮の後部のみ蛹になる。
- チ. 結紮の前・後部とも蛹になる。

日本生物学オリンピック 2012 本選 つくば



植物生理生化学

制限時間 120分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で2枚あります。

その全てに受験番号と名前を記入しなさい。

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

はじめに

果実の成熟が進行するのに伴って、果皮ではペクチンなど細胞壁を構成する成分が分解されることにより軟化が生じています。ペクチンは、セルロースなど他の細胞壁成分と結合して植物細胞をつなぎ合わせる、いわば「セメント」のような働きをしており、トマトや柑橘類の果実に多く含まれています。ペクチンは、酸性糖であるガラクトツロン酸を主鎖とし、ガラクトツロン酸1個あたり1つのカルボキシル基を有しています。隣りあったペクチン主鎖のカルボキシル基の間に、カルシウムイオンが入り込むことでペクチン間の架橋が形成され、ゲル化することが知られています（図1）。

またペクチンの性質には、カルシウムとの結合以外にも、その分子量が大きな影響を与えます。非常に長いガラクトツロン酸の鎖で構成された高分子量のペクチンは、あまり水に溶けませんが、低分子量のペクチンは水に溶けやすい性質を持っています。そのため、カルシウム架橋の形成による制御を受けるのは、水溶性のペクチンということになります。しかし、低分子化が進みすぎても架橋の形成ができなくなるため、ゲル化する能力を失ってしまいます。実際の果実を見ると、未熟な果実ではペクチンが非常に長い形態をとっているため、そのままでは水に溶けず、集まってゲルを作ることができません。一方、熟しすぎた果実では、ペクチン自体がバラバラに分解されており、こちらもゲル化することができません。

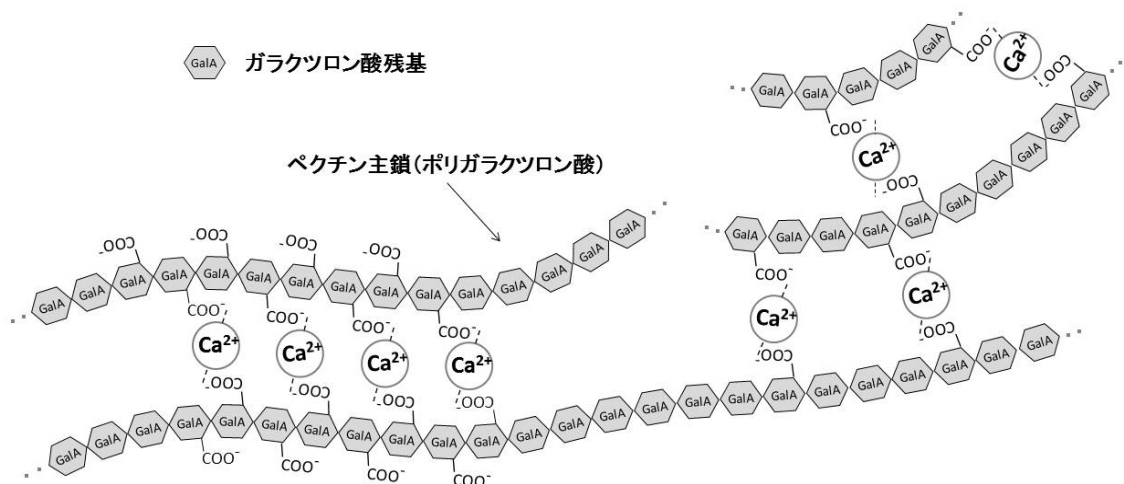


図1 ペクチンとカルシウムイオンの架橋構造

サンプルと器具類

☐にチェック✓を入れながら確認してください。不足している場合は挙手により知らせてください。

サンプル

- ☐乾燥細胞壁 A および B (各 1 本、ラベル白)
- ☐トマト (緑、赤 : 各 1 片、10 g)

器具

- ☐マイクロピペット (P1000、P200、P20 : 各 1 本)
- ☐ピペットチップ (白、黄 : 各 1 箱)
- ☐フロート (1 枚) ☐キャップロック (2 個)
- ☐先切ピペットチップ (2 本入り 1 袋) ☐キュベット (6 個)
- ☐1.5 ml マイクロチューブ (プラスチックビーカー1 杯)
- ☐乳鉢 (2 個、石英砂入り) ☐乳棒 (2 本)
- ☐洗瓶 (1 個、蒸留水入り) ☐片刃カミソリ (1 枚)
- ☐プラスチック製バット (1 個) ☐15 ml チューブ (3 本)
- ☐アイスボックス (1 個、氷入り) ☐遠心分離機 (1 台)
- ☐ストップウォッチ (1 個)
- ☐プラスチックビーカー (1 個、氷すくい用)

試薬

- ☐0.25% シュウ酸アンモニウム (1.5 ml チューブ 2 本、ラベル黄)
- ☐8.8% NaCl (15 ml チューブ 1 本)
- ☐100% エタノール (1.5 ml チューブ 2 本、ラベル緑)
- ☐0.1 M NaOH 溶液 (1.5 ml チューブ 3 本、ラベル青)
- ☐牛乳 (カルシウム添加) (1.5 ml チューブ 1 本)
- ☐0.01% BTB (ブロモチモールブルー) 溶液 (1.5 ml チューブ 1 本)
- ☐BTB 溶液色見本 (青、黄 : 各 1 個)
- ☐0.5% ペクチン溶液 (メチル化度 85%) (20 ml 容器 1 個、ラベル赤)

また、机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つはチップやカミソリなどの固体用、もうひとつは液体用です。

諸注意

問題は実験1、実験2の2部構成になっていますので実験内容と設問全体に眼を通してから作業に取りかかってください。すべての問題を順番に解く必要はなく、実験1と実験2を同時に進めてください。特に、実験2には実験をうまく行うための工夫を問う問題があるので、実験操作の待ち時間などにプランを練ってください。

試験中に手元にある試薬を使いきった場合は、挙手により知らせてください。

試験中に座席間を移動してはいけません。

解答用紙はバラバラにしないでください。

試験終了後、問題用紙は持ち帰ってください。

評価項目

1. 与えられたトマト細胞壁がどの成熟段階のトマトから抽出されたものであるかを判定し、その根拠を述べることができる。
2. トマトからペクチンメチルエステラーゼを抽出し、その酵素活性を測定することができる。
3. 果実の成熟過程において酵素が果たす役割を理解し、その機能が食品の加工時にどのように活かされているかが説明できる。

ここから先は試験開始の合図があるまで

めくってはいけません

実験1．ペクチンの抽出とゲル化

合成されたばかりのペクチンでは、ガラクトツロン酸残基のカルボキシル基はメチル化されています。このメチル化カルボキシル基はペクチンメチルエステラーゼの活性（図2）により脱メチル化されることにより、細胞壁に存在しているカルシウムイオンと結合しやすくなります。脱メチル化されたカルボキシル基を持ったペクチン同士の間にはカルシウムイオンが入り込むことで、カルシウムを介したペクチン間の架橋が形成されます。この架橋は、双方のペクチンに連続した7つ以上の脱メチル化ガラクトツロン酸が存在している場合、非常に強固なものとなります。一方、部分的にメチル基が残っているペクチンの間では、弱くゆるやかな結合となることから、メチル化の度合いで細胞壁構築の調節が行われている、とすることができます。架橋形成によるゲル化は、試験管の中でペクチンとカルシウムを反応させた場合でも観察されます。実験1ではトマトの細胞壁からペクチンを抽出し、カルシウムと反応させることで生成されるゲルの状態からペクチンの性質について考察します。

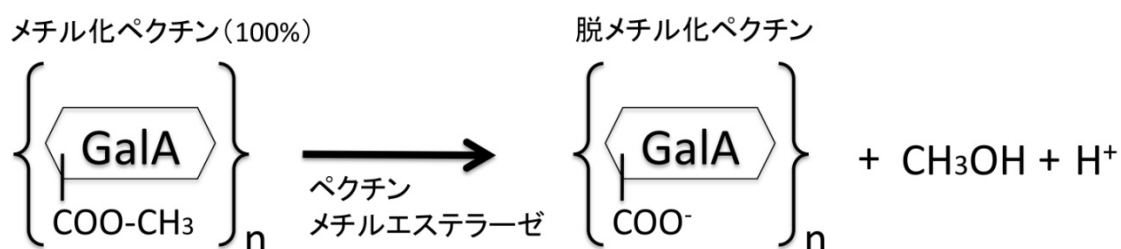


図2 ペクチンメチルエステラーゼの反応

●ペクチンの抽出

1. 配布された乾燥細胞壁 10 mg（トマトAおよびトマトB）に、1 mlの 0.25% シュウ酸アンモニウムを加え、湯煎を 20 min行う。湯煎はTAが行うので、準備ができたならそれぞれのチューブにキャップロックを取り付け、フロートに差し込んでから挙手により知らせること。湯煎の間に実験2も開始しなさい。

2. 水中で室温程度に冷ました後、遠心機を用いて遠心分離を行う(12,000 rpm、10 min、室温)。マイクロピペットを用いて上清(ペクチン画分)を回収する。この際に上清以外(沈殿物や浮遊物)を吸い込まないように注意すること。
3. 回収したペクチン画分と100% エタノールを用いて、1.5 mlマイクロチューブ内でエタノールの最終濃度が80%となる溶液を準備し、氷中に 5 min 保持する。
4. 12,000 rpm、10 min、室温で遠心分離する。
5. 上清を完全に捨て、それぞれのサンプルについて残った沈殿物(透明)を確認する。沈殿物を 400 μ lの蒸留水に完全に溶かし、ペクチンAおよびBを得る。蒸留水は洗瓶から直接取らず、一度適当な量の蒸留水を1.5 mlマイクロチューブに入れたものを用意し、そこからマイクロピペットで分取すること。

●ペクチンのゲル化

1. トマト A、トマト B それぞれから抽出したペクチン A および B について、100 μ l (室温) ずつを分取する。200 μ l の牛乳を加えた後、よく攪拌し、氷中に 5 min 置く。
2. 12,000 rpm、5 min、室温で遠心分離し、沈殿物以外をピペットで取り除く。それぞれのサンプルについて沈殿を確認する。

実験 1. 問題

問 1

配布されたトマト A とトマト B の細胞壁は、緑のトマト、赤いトマトのどちらであるか。緑、赤で答えよ。

また、そのように考えた根拠を、ペクチン抽出過程での観察結果や、ペク

チン-カルシウムゲル形成実験の結果を含めて説明せよ。

問 2

果実の成熟および軟化が進むうえで最も重要な働きをする、ある植物ホルモンが存在する。この植物ホルモンが関係する現象として適切なものを、以下のア)～カ)の中から全て選んで答えよ。

- ア) 落葉 イ) 重力屈性 ウ) ペクチンメチルエステラーゼの誘導
エ) 種子の休眠 オ) 果実の肥大 カ) 細胞伸長

実験 2. ペクチンメチルエステラーゼ活性の測定

トマト果実の細胞壁は約50%がペクチンで構成されており、果実の成熟／軟化過程が進むにつれて、ペクチンが低分子化していきます。また、果実成熟に伴って、ペクチンメチルエステラーゼが働き、ペクチンの脱メチル化が促されることで（図 2）、カルシウムを介したペクチン間の架橋が形成されます。一方、ペクチンを分解して低分子化するペクチン分解酵素は、脱メチル化ペクチンを優先的に加水分解することが知られています。そのため、ペクチンが低分子化されるためには、ペクチンメチルエステラーゼとペクチン分解酵素が協調して働く必要があります。このようにペクチンは、低分子化による水溶性の変化と、カルシウムによるゲル化の調節によって、細胞壁の性質が変化していく過程、すなわち果実の硬さの調節に関わっています。実験 2 ではペクチンメチルエステラーゼの活性を測定することで、果実成熟と酵素反応の関連性について考察します。

●ペクチンメチルエステラーゼの抽出

1. トマト 10 g に 5 ml の 8.8% NaCl を加え、乳鉢（石英砂入り）ですりつぶす。すりつぶす作業は、プラスチック製のバットに氷（一部）を移し、乳鉢の下部を氷に埋めて冷やしながら行う。うまくすりつぶせない場合は、

ラップフィルム上に戻し、その上でカミソリを用いてトマトを刻んでから乳鉢に戻すとよい。温度が上がらないように素早く行うこと。トマトは、未成熟な緑のトマトと成熟した赤いトマトの2種類を用いる。

2. 先切ピペットチップを用いて乳鉢より上澄み 2 ml を 2 本の 1.5 ml チューブに 1.0 ml ずつ集め、12,000 rpm、1 min、室温で遠心分離する。
3. 上清を 1.5 ml マイクロチューブに集め、最終的に 1 ml の溶液（酵素液）が入った 1.5 ml マイクロチューブを赤、緑各 1 本用意する。調製した酵素液と余った上清は氷上に保存する。

●ペクチンメチルエステラーゼ活性の測定

1. 用意された 0.5%※ ペクチン（メチル化度 85%）4.0 ml と、0.3 ml の 0.01% BTB（プロモチモールブルー）液、1.5 ml の蒸留水を 15 ml チューブで混合する。蒸留水は洗瓶から直接取らず、一度適当な量の蒸留水を 1.5 ml マイクロチューブに入れたものを用意し、そこからマイクロピペットで分取すること。溶液が色見本の青色と同じ色になるまで 0.1 M NaOH 溶液を 20 μ l ずつよく混ぜながら加える。同様の溶液を計 3 本準備する。

※ 溶質(g)/溶液(ml) $\times$ 100 で表されている濃度。たとえば 1% 食塩水は、1 g の食塩を含む 100 ml の水溶液のことである。

2. 作成した溶液（1 本分）を 2 個のキュベットに二等分し、それぞれを赤、緑のトマトから抽出した酵素液の試験用キュベットとする。以上の準備により 3 セット（キュベット 6 個）の酵素活性測定が可能となる。
3. 0.1 ml の酵素液をキュベットに加えた後、ピペットの先端で溶液をよくかき混ぜて反応をスタートし、溶液が青色から黄色になる（ペクチン中の全てのメチル基が加水分解された状態：図 2 参照）までに要する秒数（sec）を測定する。最大で 300 sec とし、300 sec 経過しても青色のままの場合は活性なしとする。今回の試験では、ペクチンメチルエステラーゼの活性の単位について、上記 1. ～ 3. で準備した液量で反応を行った際に、1 mg

のペクチン（メチル化度 85%）のメチル基を 1 sec 間に完全に加水分解する活性を 1 unit と定義する。

実験 2. 問題

問 3

- 1) ペクチンメチルエステラーゼ活性について、溶液が青色から黄色に変わるのに要した時間を x (sec) としたとき、 y (unit) を求めるための式を記せ。
- 2) 赤と緑のトマトのペクチンメチルエステラーゼ活性を、unit で答えよ。
また、本実験条件および方法の中で、酵素活性をできるだけ正確に求めるために行った工夫について説明せよ。実験の方法は、与えられた器具のみを用いることを条件に変更してもよい。

問 4

緑から赤のトマトに成熟する中間に、オレンジ色をしたトマトの段階が存在している。ペクチンメチルエステラーゼのオレンジのトマトでの活性は、赤いトマトのものとほぼ同程度であった。しかし、硬さの相対値は、緑：10、オレンジ：8、赤：4 となっていた。この時の、相対ペクチン分解活性について予想されるグラフを作成し、解答用紙に記述せよ。相対ペクチン分解活性が、緑：1、赤：8 であるとする。

問 5

市販されている一般的なジャム（イチゴジャムなど）と同じような粘度のジャムを、トマトを用いて作成するためには、こういったトマトを使い、どのような工夫が必要と考えられるか。自由に述べよ。

< マイクロピペットの使い方 >

マイクロピペット(図1)は 1.0 ml (= 1000 μ l) 以下の微量の液体を測り取る時に用います。今回使用するマイクロピペット P1000、P200、P20 (プッシュボタンに書かれています) では、それぞれ 200 μ l ~ 1000 μ l、50 μ l ~ 200 μ l、2 μ l ~ 20 μ l の容量を測り取ることができ、目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量を設定します。プッシュボタンを上下させることにより本体内の空気を動かすことで液体を吸い上げたり排出したりできる構造になっています。

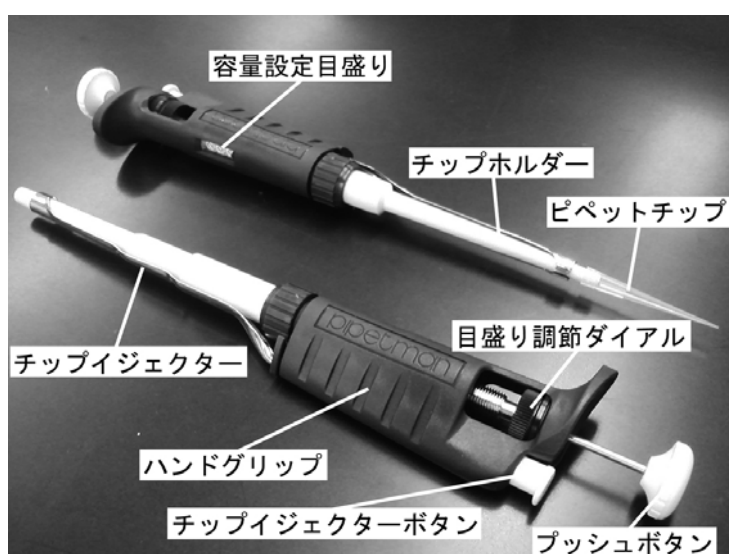


図1 マイクロピペット(手前:P1000、奥:P200 ピペットチップ装着)

- 1) 目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量にセットする(図2参照)。ダイヤルはゆっくり回す必要はないので手早く設定容量にセットする。

P20	P200	P1000
1	1	0
2	2	7
5	5	5
12.5 μ L	125 μ L	0.75 mL

図2 マイクロピペットの容量設定目盛り

- 2) 親指でプッシュボタンを押せるように片手でハンドグリップを握る。チップイジェクタ

ーボタンが手のひら側の向きになるように握る。

- 3) ピペットチップが入った箱(チップラック、図3)のふたを開け、ピペットチップにチップホルダーの先端を差し込んで装着する。P1000は白色、P200とP20は黄色のピペットチップを使用する。ピペットチップとチップホルダーの間から空気が漏れないように、装着したピペットチップでチップラックを軽くトントンと叩くようにしてしっかりと装着する。装着後チップラックのふたを閉める。

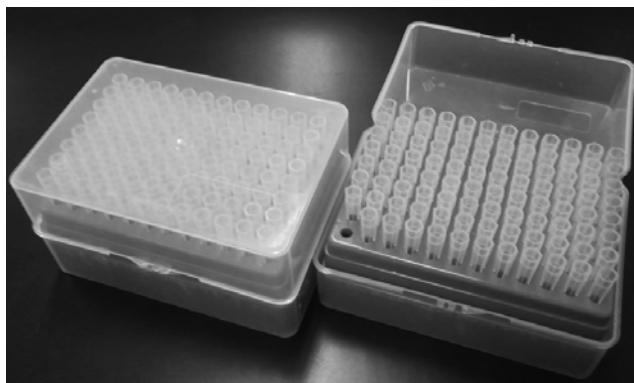


図3 チップラック

- 4) プッシュボタンを第一ストップ(図4)まで押し込み、その状態のままピペットチップの先端を液につけ、ゆっくりかつ滑らかにプッシュボタンをトップまで戻すことで液を吸い上げる。

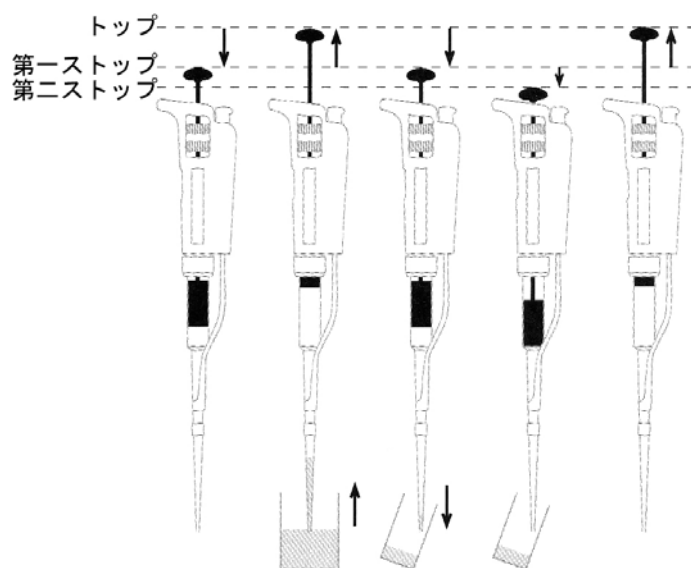


図4 プッシュボタンの動かし方

- 5) ピペットチップの先端を液を移す容器に入れ、プッシュボタンをゆっくりと第一ストップまで押し下げて液を排出する。第一ストップで一度止めたプッシュボタンを続けて第二ストップまで強く押し下げ、ピペットチップ内に残った液を完全に排出する。
- 6) プッシュボタンをトップまでゆっくりと戻す。
- 7) イジェクターボタンを親指で押してピペットチップを取り外す。ピペットチップは測りとする液体が変わるたびに使い捨てる。

注意点)

- ・ 必ずピペットチップを装着して液を吸い上げること。
- ・ 液を吸い上げた状態でマイクロピペットを逆さまにしないこと。
- ・ 液を吸い上げる際に、マイクロピペット本体まで液を吸い込まないように注意してゆっくり操作すること。特に吸い上げ途中でプッシュボタンから指を離すことは絶対にしないこと。ただし、ゆっくり動かしすぎてシリンダーの移動がスムーズでない場合は測りとする量の正確性が損なわれるので、滑らかに動かすよう注意する。吸い上げ開始から完了まで1～2秒かけるのが適正な速度である。また、マイクロピペット作業中に本体まで液を吸い込んでしまった場合は速やかに挙手し、TA に知らせること。

< 遠心分離機の使い方 >

- 1) 右上にある「OPEN」ボタン(図1)を押すとふたが開く。

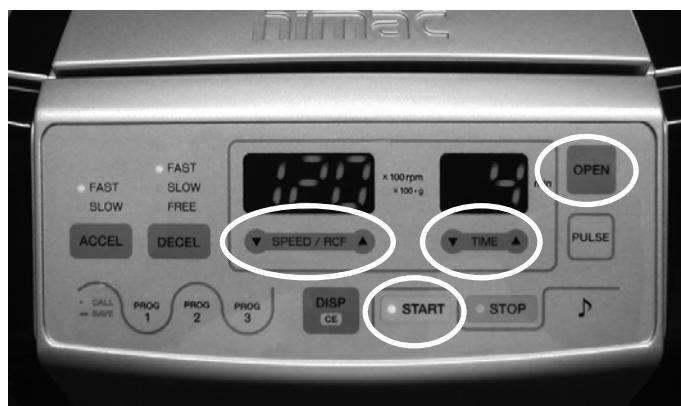


図1 遠心分離機操作パネル

- 2) 内ぶたがあるので黒いリングを回して外す。
- 3) マイクロチューブを対角線上になるようセットする。

- 4) 内ぶたをセットする。
- 5) ふたを閉める。
- 6) 中央表示下の「**SPEED/RCF**」上下ボタンを操作して希望する回転数にセットする。
- 7) 右側表示下の「**TIME**」上下ボタンを操作して希望する回転時間にセットする。
- 8) 緑色の「**START**」ボタンを押して遠心を開始する。
- 9) 設定時間が終了すると回転が停止し、ふたが開く。
- 10) 内ぶたを外してマイクロチューブをゆっくり取り出す。特に沈殿を生成させている場合は、沈殿物が崩れないよう注意しながら取り出すこと。

注意点)

- ・ 使用しないボタンには触れないこと。
- ・ マイクロチューブは必ず対角線上になるようセットすること。回転時のバランスが崩れると危険であり、エラーとなり動作が中断されることがある。チューブの数が奇数の場合はバランスが崩れないように等間隔にセットするか、バランスをとるためのマイクロチューブを蒸留水を用いて準備し、偶数にしてから対角線上にセットする。
- ・ 内ぶたは必ず装着すること。

< ストップウォッチの使い方 >

- 1) ボタンBを何度か押して画面左上の表示を「CH」にする。



- 2) ボタンAを押して表示を「00'00"00」にリセットする。
- 3) ボタンCを押して計測を開始する。ストップウォッチマークが点滅し、デジタル表示の加算がスタートする。

- 4) ボタンCを再度押して計測を終了する。ストップマークが点灯し、デジタル表示の加算がストップする。
- 5) 再度使用する場合はボタンAを何度か押して表示を「00'00"00」にリセットする。

注意点)

- ・ 計測中に間違えてボタンAを押してもデジタル表示はストップする。その際にはストップウオッチマークとスプリットマークが両方とも点滅している。計測を終了したい場合はその数値を計測時間とする。誤って計測中にボタンAを押してしまった場合は、もう一度ボタンAを押すことで復帰できる。戻るまでの時間も計測は継続されている。

日本生物学オリンピック 2012 本選 つくば



海洋生物学

制限時間 120分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で3枚あります。

その全てに受験番号と名前を記入しなさい。

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

はじめに

DNA は遺伝子の分子の実体であり、この DNA の解析手段は現在の生物学のテクノロジーの根幹を支える重要なものになっています。DNA の解析方法のうち、制限酵素を用いた DNA の部分切断や電気泳動による分離は、単一の DNA を増幅するための重要な手法となっています。本実験では、実際に制限酵素を用いて DNA を切断し、電気泳動を行うことで、DNA 実験に対する理解を深めることをねらいとしています。

また、DNA の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列は様々な情報を我々に与えます。例えば、それぞれの生物が持つ相同な遺伝子間でも、生物間で塩基配列やアミノ酸配列が少しずつ異なることが知られており、基本的には、類縁関係が遠い生物間ほど配列の差が大きくなると考えられています。つまり、配列の差の大小はその生物が進化的に近いか遠いかを表しています。このように生物間で遺伝子の配列データを比較することで、生物間の系統関係を推定することが可能であり、このような解析を分子系統解析と呼びます。そして、分子系統解析により推定された系統関係は分子系統樹と呼ばれる図で表されます。さらに得られた分子系統樹に、それぞれの生物のもっている様々な特徴（形態、発生様式、生態など）の有無や類似点、相違点を当てはめることで、それらの特徴が進化上いつ獲得されたかを推定することも可能になります。本実験では、複数種の動物の発生段階を観察し、系統樹と合わせて考えることで、動物の発生様式の多様性や進化について考察します。

サンプルと器具

1.5ml チューブ立て

10 x 緩衝液	(B)	1 本
蒸留水	(W)	1 本
ローディングダイ	(D)	1 本
サイズマーカー	(M)	1 本
プラスミド DNA	(あ)	1 本
プラスミド DNA	(い)	1 本
プラスミド DNA	(う)	1 本

空 1.5 ml チューブ 6 本

アイスボックス

制限酵素 <i>Sa</i> I	(S)	1 本
------------------	-----	-----

マイクロピペット (P2, P20, P200)	各 1 本
チップ (白, P2 用)	1 箱
チップ (黄, P20, P200 用)	1 箱
チューブ立て (小)	1 個
電気泳動装置	1 箱
アガロースゲル (泳動装置の中にあります)	1 枚
タイマー	1 台
丸形シャーレ	1 枚
遠心器	1 台
廃チップ入れ (プラスチックカップ)	1 個
正立顕微鏡	1 台
サンプル (X, Y, Z-1, Z-2) 入り 4 穴シャーレ	1 枚
ホールスライドガラス	5 枚
カバーガラス	1 箱

机の上にあるキムワイプとキムタオルは自由に使って構いません。

顕微鏡について、「光源が点灯しない」、「レンズを溶液に浸けるなどして汚してしまった」など、使用上の不都合が生じた場合は速やかに申し出てください。

問題は2部構成になっています。問題用紙全体によく目を通してから、作業に取りかかってください。解答用紙はバラバラにしないでください。また、問題文の前に「正立顕微鏡使用マニュアル」があります。

試験終了後、問題用紙はお持ち帰り下さい。

それでは解答を始めて下さい。

評価項目

- ・ 計算が正しく行えるかどうか。
- ・ 実験器具を正しく取り扱い試料の適切な量を測り取れるか。
- ・ 反応時間を正しく守れるか。
- ・ 電気泳動を正しく行えるかどうか。
- ・ 電気泳動法を理解しているかどうか。
- ・ 顕微鏡を正しく使用し、サンプルの観察が行えるか。
- ・ 動物の外部形態から生物の同定が可能か。
- ・ 系統樹を正しく理解できるか。
- ・ 系統樹と形態学的観察から、動物の生態や進化について考察が可能か。

正立顕微鏡使用マニュアル

1) 正立顕微鏡の使い方 (図 1、2 を参照のこと)

- ・ 光源スイッチを ON にし、光量調節つまみを回して適度な明るさに合わせる。
- ・ 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
- ・ レボルバーを回して対物レンズを 4 倍 (最低倍率) にする。
- ・ 標本押さえにプレパラートをセットし、標本押さえレバーで固定する。
- ・ コンデンサー上部のレンズから見えている照明光の位置に、標本の観察したい部位をステージ移動ハンドルを使って移動させる。
- ・ ステージを一番上まで上げる。この際、対物レンズとプレパラートがぶつからないように注意すること。
- ・ 接眼レンズをのぞきながら、ピントが合う位置まで粗動ハンドルを回してステージを下げる。
- ・ 微動ハンドルを回してピントを微調整する。
- ・ コンデンサー絞り、視野絞りをを使ってコントラスト、焦点深度を調整する。
- ・ 倍率を上げて観察する場合は、レボルバーを回して対物レンズを 10 倍、40 倍に交換する。

図 1 正立顕微鏡 全体図

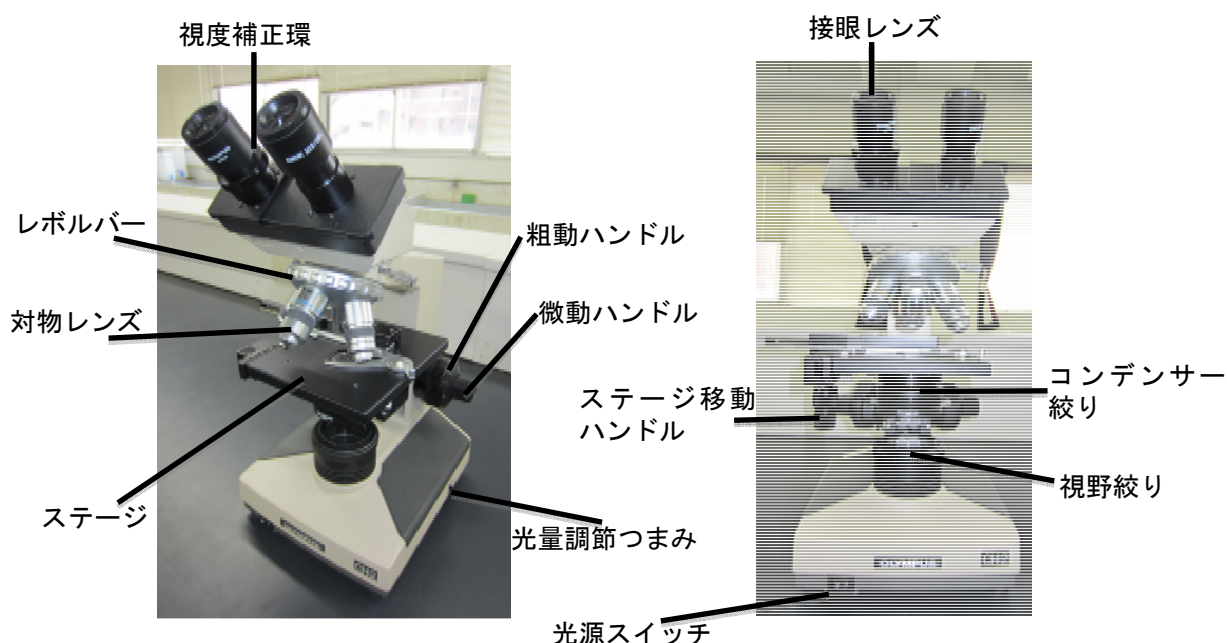
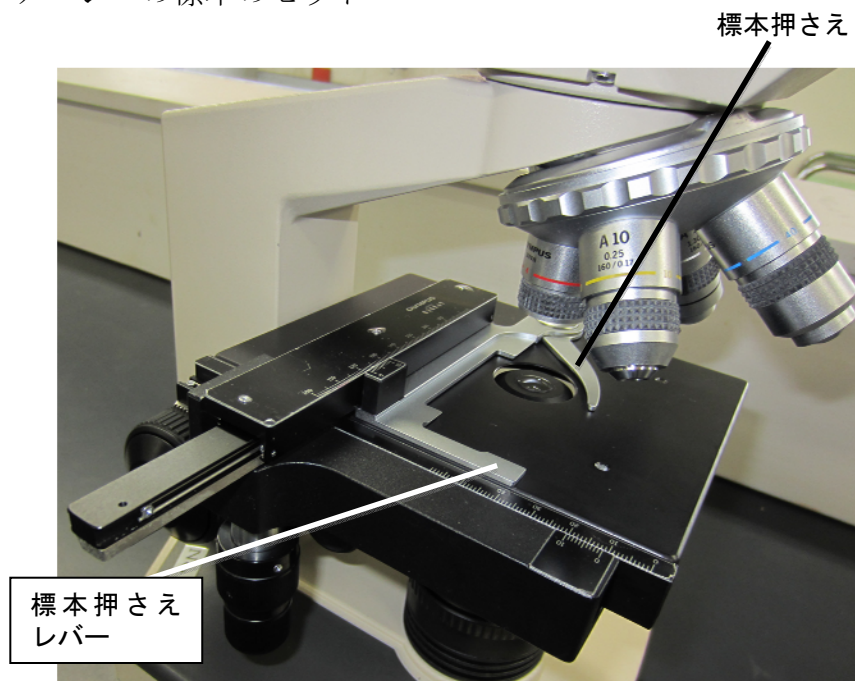


図2 ステージへの標本のセット



2) 眼幅、視度調整

眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので顕微鏡には各人の違いを補正する機能がある。

眼幅調整：接眼レンズを左右に動かし、自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像が一個になった位置が正常な位置になる。

視度調整：左右の眼のピントが違うので、まず右目で観察する標本にステージを上下してピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして左目で覗き、接眼レンズの根本にある視度補正環を回しピントを合わせる。

3) コンデンサーの使い方

コンデンサーには絞りがついており、絞りを開閉することにより標本にコントラストをつけたり、焦点深度を調整することができる。

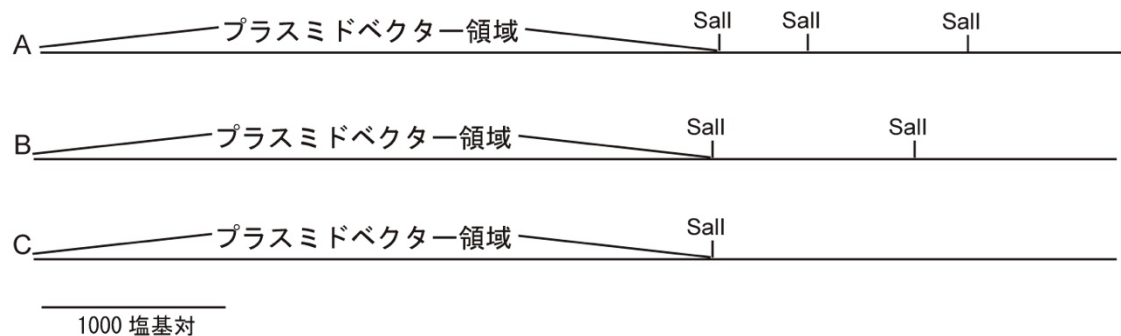
	コンデンサー絞り（開）	コンデンサー絞り（閉）
明るさ	大	小
焦点深度	浅	深
コントラスト	弱	強

問題 1 制限酵素を使った DNA の解析

遺伝子の進化について調べるため、6 種の動物からある遺伝子に関する DNA をポリメラーゼチェインリアクション(PCR)法にて単離し、プラスミドベクターを用いてそれぞれをクローニングした。クローニングの後、単離した DNA の塩基配列を決定し、また制限酵素の切断部位についてマップを作成した。

単離された 6 種類の DNA の内、3 種類 (A, B, C とする) が含まれたプラスミド DNA における制限酵素 *SaII* の切断サイトは以下の図 1 の通りである。また、それらのプラスミド DNA が含まれている溶液は「あ、い、う」のチューブに入っている。制限酵素を用いて、「あ、い、う」のそれぞれのプラスミドが「A, B, C」のどの DNA 断片を含むものかどうかを *SaII* を用いて推測したい。

図 1



(注) 図は直鎖化された状態で示されているが、実際には配布されたプラスミド DNA は環状である。

問 1

3種類のプラスミド DNA 溶液の吸光度を測定した。但し吸光度は溶液中の物質の濃度が高いと正確に測れないため、配布した DNA 溶液の $2\ \mu\text{l}$ を $998\ \mu\text{l}$ の蒸留水に溶かした希釈溶液を作製し、その希釈溶液の吸光度を測定した。その結果は「あ、い、う」の順で 0.032, 0.044, 0.021 である。その値を元に、DNA を $0.8\ \mu\text{g}$ 得るために必要な（配布した）「あ、い、う」の DNA 溶液の量を計算しなさい。解答には単位も記載してください。また、有効数字 3 桁で示しなさい。但し、DNA の波長 260nm の光に対する吸光度 A と DNA の濃度 c （単位は $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）の関係は以下の計算式で表される。

$$A = 20c$$

メモ：吸光度とは、光が均一な溶液を通過するとき、溶けている物質に依存する特定の波長の光が吸収される。その吸光の度合いは物質の濃度に比例するため、吸光度を測定することにより物質の濃度を知ることができる。

単位について： μ （マイクロ）は m （ミリ）の $1/1000$ 、 n （ナノ）はマイクロの $1/1000$ を表します。

計算用紙

問 2

プラスミド DNA を制限酵素処理するための反応液を以下の条件で作製したい。その溶液をマイクロピペットを使って準備しなさい。但し、反応条件は以下のように設定します。

- それぞれの DNA について、0.8 μg を反応させる。
- 緩衝液（酵素反応の至適塩濃度に合わせるための溶液）の最終濃度を 1 x に合わせなさい。但し、1 x を反応に最適な緩衝液濃度とすると、配布されている緩衝液はその濃度の倍数が示された濃度の高い溶液となっている。例えば 30 x と表示してある緩衝液については、反応に最適な緩衝液濃度の 30 倍の濃度である。
- 制限酵素 *SaI* 溶液は 1.0 μl を 1 つの反応液に加える。
- 蒸留水を加えて、合計の溶液量を 20 μl とする。
- *SaI* は最後に加える。
- 全ての溶液を加えたら一度そっと混合してから遠心にかけて、液を均一にする。

準備が終了したら反応液が入ったチューブをチューブ立て（小）に挿し、アシスタントに渡してください。アシスタントがチューブを 37 度の恒温器へ入れます。アシスタントにチューブを渡した時間から 30 分を測ってください。その空き時間は他の問題に取り組んで構いません。

30 分経過後、アシスタントに告げて自分のサンプルを受け取ってください。その後、電気泳動にかけなさい。

（注意）電気泳動は手袋をして作業してください。電気泳動の際に用いる核酸染色試薬には発がん性が示唆されているものもあります。本実験では、発ガン性のないとされている「ゲルレッド」という試薬を使用していますが、気を付けるに越したことはありません。ゲルや泳動槽内の液体には手を触れないこと。

泳動に利用するアガロースゲルは作成済みのものを配布しています。そのゲルには核酸染色試薬としてゲルレッドがあらかじめ加えてあります。1 つのサンプルについてローディングダイを 4 μl 加え、軽く混ぜた後にウェル（穴）の

1 つへと半分量を加えなさい。残りの半分は予備です。また、DNA のサイズを推定するためのサイズマーカー（既知の長さの DNA）溶液 5 μ l をウェルの一つに加えなさい。ウェルは 8 個ありますが、端から「あ、い、う、サイズマーカー」を加えることとします。つまり 4 つのウェルのみを使用します。全てをウェルに入れ終わったら、泳動槽のスイッチを入れ、20 分泳動しなさい。

もしサンプルを加えるのに失敗したら、予備のサンプルを余っているウェルに流しなさい。

泳動終了後はスイッチを切り、丸形シャーレにゲルを置き、蓋をして速やかにアシスタントに渡してください。蓋についている番号ははがさないでください。

アシスタントがゲルの写真を撮影するので、その写真を受け取り解答用紙の該当部分に貼り付け、どのレーンにどのサンプル（あ、い、う、サイズマーカー）を泳動したのかを簡単に示しなさい。写真撮影には時間がかかるため、続いている問題に移りなさい。

メモ：核酸の染色試薬について

核酸を染色するための試薬は分子生物学的実験に必要不可欠であり、数多くの種類があります。このような試薬として臭化エチジウムが有名です。また、今回配布したゲルにはゲルレッドという染色試薬が使われています。これらの試薬の多くには核酸、特に DNA の塩基対と塩基対の間の隙間に入り込み結合する（これをインターカレーションといいます）性質と、特定の波長の光を吸収して蛍光を発する性質があります。結果として、核酸が大量に含まれる領域にはそれらの試薬が濃縮されることになり、特定の波長の光を当てることにより試薬に特異的な蛍光が周囲よりも強く発せられるため、核酸の存在を知ることができます。また、DNA の塩基対間に入り込むという性質から、これらの物質は DNA 構造を変化させる可能性があり、発ガン性を持つものが報告されています。

問 3

単離された 6 種類の DNA の内、残りの 3 種類 (D, E, F とする) についても同様にプラスミドベクターに組み込んだ。組み込みはそれぞれの DNA を *Pst*I で切断し、プラスミドベクターの *Pst*I サイトへと連結反応により挿入させた(図 2 A-B)。

続いて組み込みがうまくいったかどうか、制限酵素を用いて確認したところ、D について不思議な現象が生じた。D の断片は 1000 塩基対であり、おおよそ 700 塩基対のところに *Eco*RI の切断サイトを 1 カ所有することが分かっている。プラスミドベクターの長さは 3000 塩基対であり、*Pst*I の認識サイトは *Eco*RI と *Xho*I の 2 種類の制限酵素の切断サイトで挟まれている。すなわち、予想されるベクターの制限酵素マップの概念図は図 2 B の通りである。

さて、D 断片を挿入させたベクターを制限酵素 *Eco*RI と *Xho*I の 2 つと同時に処理し、アガロースゲルにて電気泳動にかけ解析したところ、予想と異なり、バンドの数が 1 つ多く存在した(図 3)。調べたところ、そのバンドのサイズはおおよそ 1000 塩基対であった。得られたプラスミド DNA はどのような構造を持つと推定されるかを答えなさい。回答には図を用いても良い。

図 2

A



*Pst*I により切断された DNA 末端同士はライゲーション反応によりつなげることができる。

B DNA の制限酵素地図

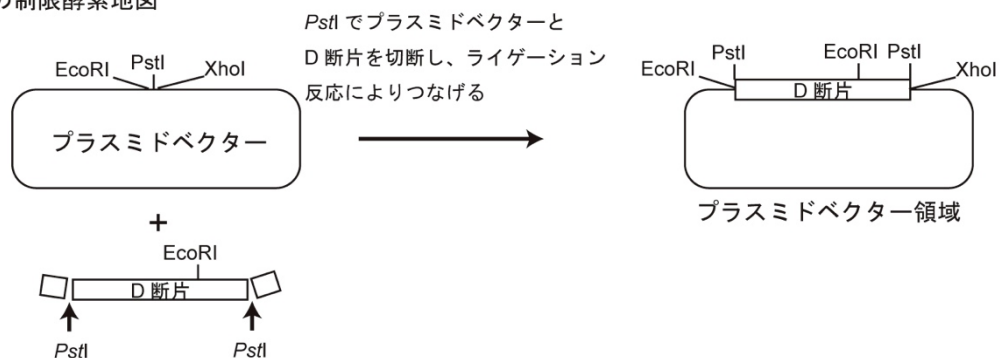
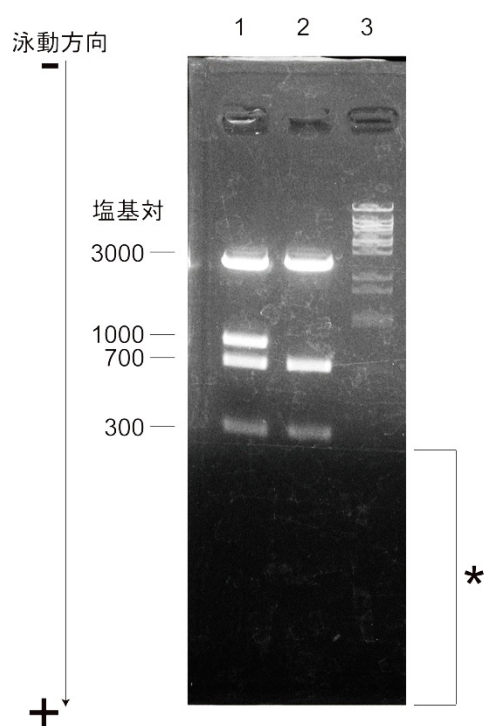


図 3



レーン 1 が上記の実験で実際に得られたバンドパターン、レーン 2 は上記の実験の後に実験をやり直して得られた DNA の切断パターンで、やり直した際には予想通りのサイズのバンドパターン (3000, 700, 300 塩基対のバンドが 1 本ずつ) が得られた。レーン 3 はサイズマーカー。右の数値はサイズマーカーを元にして推定した各バンドのサイズ。レーン 1 のバンドパターンは予想とは異なり、1000 塩基対のバンドが 1 本多く得られている。

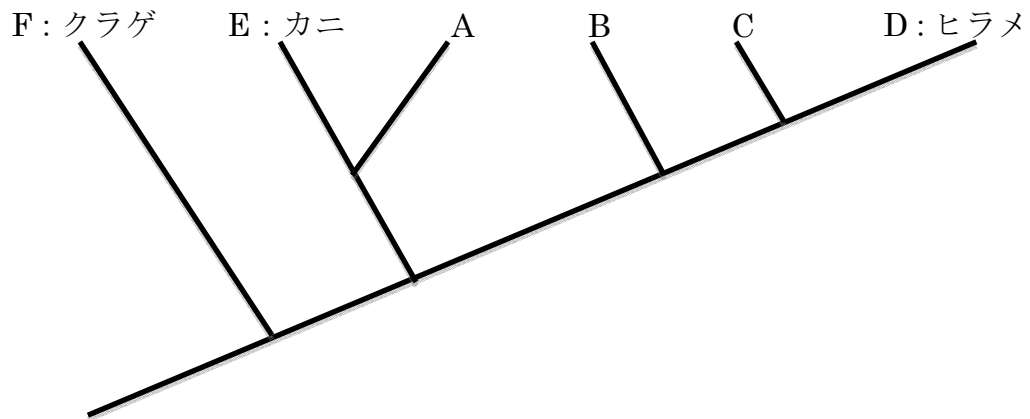
問 4

問 3 で示した電気泳動の写真を見て、以下の問 a, b に答えなさい。

- a) 問 3 で示した電気泳動の写真では、DNA だけでなく、ゲルにも白いエチジウムイオンの発光が見られますが、図の下の方ほど発光が弱く暗くなっています (* の部分)。このことから、DNA とエチジウムイオンのイオンとしての性質を簡単に説明しなさい。なお、この電気泳動については核酸検出試薬として臭化エチジウムをアガロースゲルへと電気泳動前にあらかじめ加えました。
- b) 問 3 で示した電気泳動の写真で、サイズの小さなバンド程エチジウムイオンによる発光が薄くなっています。その理由を簡潔に説明しなさい。但し、制限酵素による切断効率は 100% と仮定します。

問題2 系統樹と発生

上記の実験でクローニングした A～F の遺伝子の塩基配列を用いて分子系統解析を行ったところ、以下のような形の系統樹が得られた。また、塩基配列をデータベースに照会したところ、D はヒラメ、E はカニ、F はクラゲであることが判明した。



6 種類の生物から DNA を単離する過程で、A、B、C の 3 種類の生物は生殖シーズンであり、卵と精子が単離できた。その一部を発生させ、幼生形態を観察した。X、Y、Z-1 のシャーレ内には A、B、C のいずれかの固定した幼生が入っている。Z-2 のシャーレ内には Z-1 のシャーレ内の幼生と同種の動物の別の発生段階が入っている。

X、Y、Z-1、Z-2 のシャーレに入っているサンプルのプレパラートを以下の要領で作製し、顕微鏡観察を行い、以下の問いに答えよ。

プレパラート作製法

シャーレの底に沈んでいるサンプルを肉眼で確認しながらマイクロピペットで吸い取り、ホールスライドガラスのへこんでいる部分に液ごとサンプルを出す。観察の際には必ずカバーガラスを用いること。

問 1 X、Y、Z-1 の幼生の名称をそれぞれ答えよ。

問 2 X、Y、Z はそれぞれ A、B、C のどれか、答えよ。

問 3

幼生の種類と系統樹から A、B、C にふさわしい動物をそれぞれ一つずつ以下の選択肢から選び、その名称答えよ。

イソギンチャク ホヤ エビ イカ ナマコ カイメン ウニ マキガイ
クジラ サンゴ ギボシムシ フジツボ ウミガメ ヤツメウナギ マンボウ

問 4

いろいろな遺伝子について研究を行うため、X、Y、Z の体から DNA を抽出し、多くの遺伝子を単離した。それらの遺伝子をデータベースに照会したところ、多くはそれぞれの生物の既知の遺伝子であったが、一部植物プランクトンの遺伝子と考えられるものが含まれていた。特に同種の生物であるものの、Z-1からは多量に得られたのに対し、Z-2からは得られなかった。このように、生物の由来が全く異なると考えられる遺伝子 DNA が単離された理由を簡潔に述べよ。

問 5

研究を行ったところ、A と B の幼生には相同な器官があること、及び F の幼生はこの相同な器官を持たないという結果が得られた。この相同な器官は進化上いつ獲得されたと類推されるか、解答欄の系統樹上に○をつけよ。

日本生物学オリンピック 2012 本選 つくば



植物形態学

制限時間 120分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。

解答用紙は全部で1枚あります。

その全てに受験番号と名前を記入しなさい。

[注意]

これから試験を開始しますが、試験開始の合図があるまでは解答をはじめないでください。

はじめに

菌類（真菌類）は孢子により増える微生物の仲間で、きのこ・カビ・酵母などの生物を含んでいます。肉眼で見える大型のきのこも、食べ物などに生えるカビも、その体は基本的に同様に、細胞が糸状に連なった「菌糸」という構造からなっています。菌糸は栄養源となるもの（食べ物や培地など）の上に張りめぐらされ、酵素を分泌して、周囲のものを分解し、必要な栄養を吸収して、先端に細胞を継ぎ足すようにして成長（先端成長）していきます。やがて、菌糸の末端に孢子を作り、繁殖しますが、無性生殖によりコロニー（集落）にたくさん孢子が形成されているものを、一般に「カビ」といいます。菌糸がたくさん集まって孢子を作るために大型に発達したものが「きのこ」です。また、「酵母」は、孢子状の単細胞の体しか持たず、菌糸を作らずに、単細胞の状態で増殖しますが、これはもっとも単純な菌類の体制と考えられます。

カビや酵母の種や属は、孢子の形や、孢子がどのように作られるかという特徴により分類されます。したがって、その種や属を調べるには、一種のみを培地上に分離して培養（純粋培養）し、これを丹念に観察して、孢子の形や、孢子が作られる過程についての情報を読み取る必要があります。

この実験では、あらかじめ栄養の入った寒天培地上で、純粋培養した菌類のコロニーからプレパラートを作成して、生物顕微鏡でその特徴を観察し、カビや酵母の属を同定します。

多くのカビでは、孢子は特定の形をした細胞（孢子形成細胞）から形成されますが、孢子形成細胞が特別な形をなさず、通常の菌糸から直接、孢子が形成される場合もあります。孢子形成細胞から孢子が次々と送り出されるように連続して作られると、孢子は鎖のようにつながった状態を保ち、連鎖しますが、孢子の表面に粘り気（粘性）があると、孢子は塊をなし、さらに、コロニーに粘性を生じることもあります。孢子は単細胞であるとは限らず、多細胞の場合もあります。多細胞の孢子は、隔壁（細胞の仕切り）により仕切られており、二細胞のことも、あるいは、それ以上の細胞からなることもあります。また、孢子や菌糸は無色で透明とは限らず、褐色に着色するものもあります。なお、酵母は、体細胞が孢子と同様の機能をもつことから、本問題では、酵母の体細胞は孢子とみなします。

サンプルと器具

まず、配布されたピンセット2本とマジックペンを取り出してください。

次に、機材を確認します。手元に次のものがあるか、確認してください。スライドガラス、カバーガラス、柄付き針、マウント液をいれたスポイト瓶、カビを植えたシャーレ6枚。プラスチックビーカー2個、キムワイプ、洗瓶、キムタオル。

机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2つのプラスチックビーカーは観察を終えたプレパラートなど廃棄する物を入れるのに使ってください。1つはスライドガラスなどの固体用、もうひとつは液体用です。

観察にあたっては、次のことに注意して下さい。

第一に、顕微鏡は、目の幅、ステージの高さ、視度（ピント）、コンデンサーの絞りを一定の位置に合わせてあります。この位置では、実際の観察には不適切な場合がありますので、各自で観察に合うように調整して使用してください。特に、左右の接眼レンズの視度、コンデンサーの絞り（コントラストが変化する）を調節すると、より観察しやすい像が得られます。この問題の5～9ページに、予備体験で配布した顕微鏡観察の方法についての資料、顕微鏡の使用についてのマニュアルが、ありますので、必要なら参照して下さい。

第二に、柄付き針やピンセットには、胞子が付着します。観察しようとするプレパラートに、二種以上のカビの胞子が混在すると正しい観察ができません。一つのシャーレの観察が終わり、次のシャーレを観察する前に、かならず、洗瓶の水で湿らせたキムワイプで丁寧に拭き取るようにしてください。

試験中に顕微鏡のランプがつかなくなったり、レンズを汚してしまったら、手を挙げて、速やかに申し出てください。

問題は問 1 から問 4 までの 4 問からなっています。全体に眼を通してから作業に取りかかってください。

試験終了後、問題用紙は持ち帰って下さい。

評価項目

- 1，生物顕微鏡を正しく操作でき、必要な形態学的情報を読み取り、表現することができるか。
- 2，形態学的情報を総合して、生物の分類同定を行うことができるか。
- 3，読み取った形態学的情報をもとに、生物の生き方について、考察することができるか。

それでは解答をはじめて下さい。

顕微鏡使用マニュアル

眼幅、視度調整（正立・実体顕微鏡共通）

1. 眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので顕微鏡には各人の違いを補正する機能がある。
2. 眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像が一個になった位置が正常な位置になる。
3. 視度調整：左右の眼のピントが違うので、先ず右目で観察する標本にステージを上下してピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして左目で覗き接眼レンズの根本にある視度補正環を回転させピントを合わせる。

正立顕微鏡（図 1、2 参照）

1. 光源スイッチを ON にする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
2. 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
3. レボルバーを回して対物レンズを 4 倍（最低倍率）にする。
4. 標本押さえにプレパラートをセットして標本押さえレバーで固定する。
5. コンデンサー上部のレンズから見えている照明光の位置に、標本の観察したい部位を、ステージ移動ハンドルを使って移動させる。
6. ステージを一番上まで上げる。
7. 接眼レンズをのぞいてピントが合う位置まで粗動ハンドルを回してステージを下げる。
8. 微動ハンドルを回してピントを微調整する。
9. コンデンサー絞りをを使ってコントラスト、焦点深度を調整する。
10. 倍率を上げて観察する場合には、レボルバーをまわして対物レンズを 10 倍、40 倍に交換する（今回は 100 倍の対物レンズは使用禁止です）。

※コンデンサーの使い方

- ・コンデンサーには絞りがついており、絞りを開閉することにより標本にコントラストをつけたり焦点深度を調整することができる（以下の表を参照のこと）。

	コンデンサー絞り (開)	コンデンサー絞り (閉)
明るさ	大	小
焦点深度	浅	深
コントラスト	弱	強

注：使用中、レンズがよごれた場合には監督員(TA)まで申し出てください。

図1 正立顕微鏡全体図

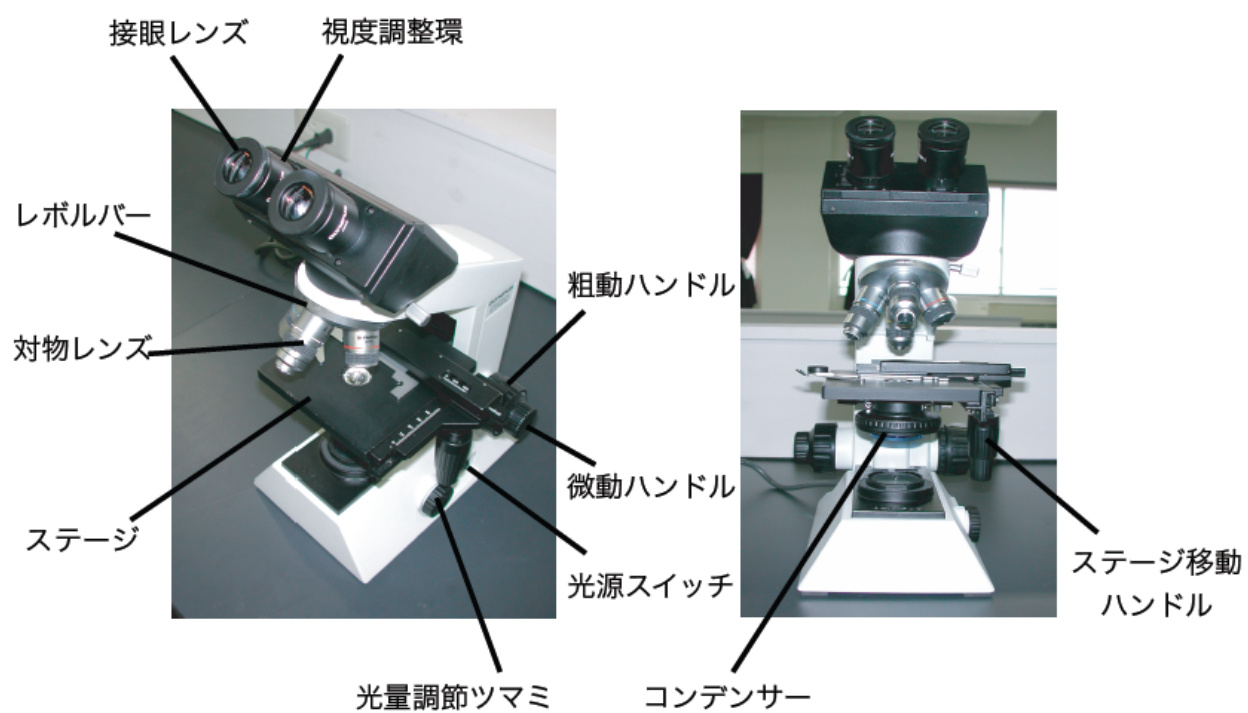


図2 ステージへの標本のセット



実体顕微鏡 (図 3 参照)

1. 光源スイッチを ON にする。光量調節つまみを回して適度な明るさに合わせる。
2. 角度を調整して、飼料に光が十分当たるようにする。
3. 焦準ハンドルとズームハンドルを回して、ピントと倍率を調整する。

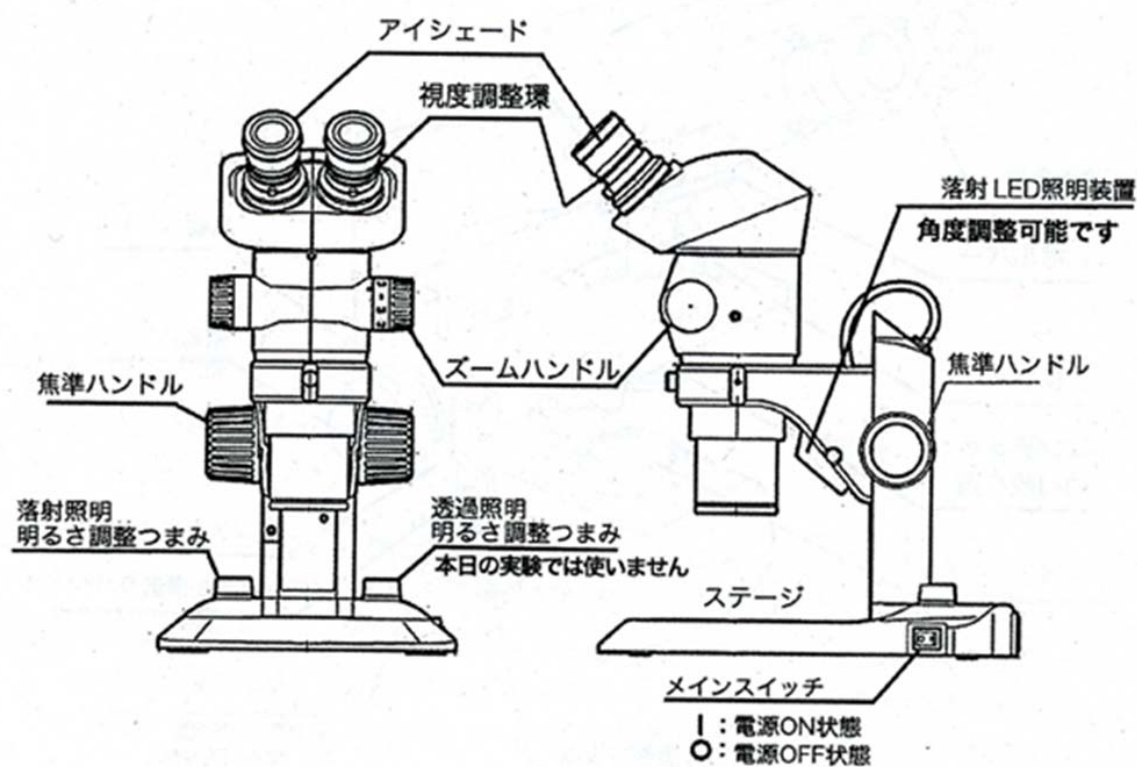


図3. 実体顕微鏡各部名称

シャーレの観察とプレパラートの作成方法

1. まず、肉眼でコロニーの色や表面の様子を観察します。菌糸や細胞は、シャーレ中央の接種点（菌を植え付けたところ）から周辺に向けて放射状に成長していくため、同心円状になります。

2. 次にシャーレを逆さまにして顕微鏡のステージに乗せ、コロニーの裏側から透過光により、菌糸の様子を観察します。低倍率（4倍か10倍）の対物レンズを、シャーレの底面ぎりぎりまで近づけ、ステージを下げながら、ピントの合うところを探します。寒天培地の内部に伸長した菌糸には隔壁が入っている様子が観察されます。寒天培地の中に潜った菌糸のところどころから孢子（分生子）が形成されている場合もあります。

3. 多くの菌はコロニーの表面に孢子を形成します。ふたをはずしたシャーレを顕微鏡のステージに乗せ、1.と同様にしてコロニー表面の様子を観察しましょう。このとき、対物レンズがコロニーに接触しないように注意してください。コロニーの中央部では成熟して孢子が作られている様子が、周辺部ではより若い状態がみられますので、観察に適した箇所を探して下さい。培地上に伸びた菌糸から柄が立ち上がって孢子が形成されている様子が観察できます。

4. より詳しく孢子形成の様子を観察するにはプレパラートを作成する必要があります。上記3.で観察された孢子と菌糸体の一部を寒天培地ごと、わずかに柄付針で切り出し、スライドガラスの上にのせます。その上に、マウント液（10%エタノール溶液）を一滴たらしめます。そして、気泡が入らないよう注意しながら丁寧にカバーガラスを試料の上にかぶせ、軽く押しつぶします。

5. プレパラートをステージに乗せ、まず、低倍率（4倍）の対物レンズで観察し、孢子が形成されている部分が見つかったら視野の中心に移動します。レボルバーを回して、より高倍率（10倍、20倍、40倍）の対物レンズで観察しましょう（今回の観察では、100倍の油浸レンズは使用しません）。孢子や菌糸に色がついているかどうか、細胞数はいくつか、孢子はどこから形成され、どのように菌糸とつながっているか、観察してください。

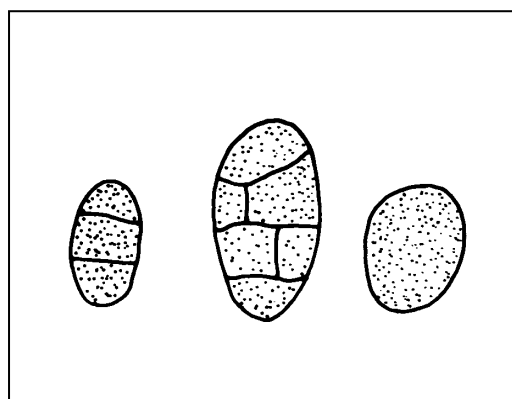
問題 カビ・酵母の観察と属の同定

A～F のシャーレは栄養の入った寒天培地に、それぞれ別の属の菌を接種し、室温で培養したものです。まず、肉眼でそれぞれのコロニーをよく観察し、次いでシャーレのふたを開けて、顕微鏡のステージの上にのせ、低倍率（4 倍か 10 倍）の対物レンズを用いて、孢子がどのように作られているか、よく観察してください。対物レンズがコロニーに接触しないように注意しましょう。次に、プレパラートを作成して、それぞれの菌の特徴を観察したうえで、以下の問いに答えなさい。

【問 1】

それぞれの菌の孢子の形態を観察し、例にならってスケッチをなさい。スケッチでは、その生物の特徴をわかりやすく表現することが大切です。細胞の内容物を書く必要はありません。例にあるように隔壁（細胞の仕切り）の有無、着色の有無などを、線と点で表現するように心がけてください（例では、褐色に着色している部分には、細点が打たれています）。また、孢子の形態に変異（大きさや細胞の数などの違い）がある場合は、いくつかの例を示すようにしてください。

例) ウロクラディウム属の孢子



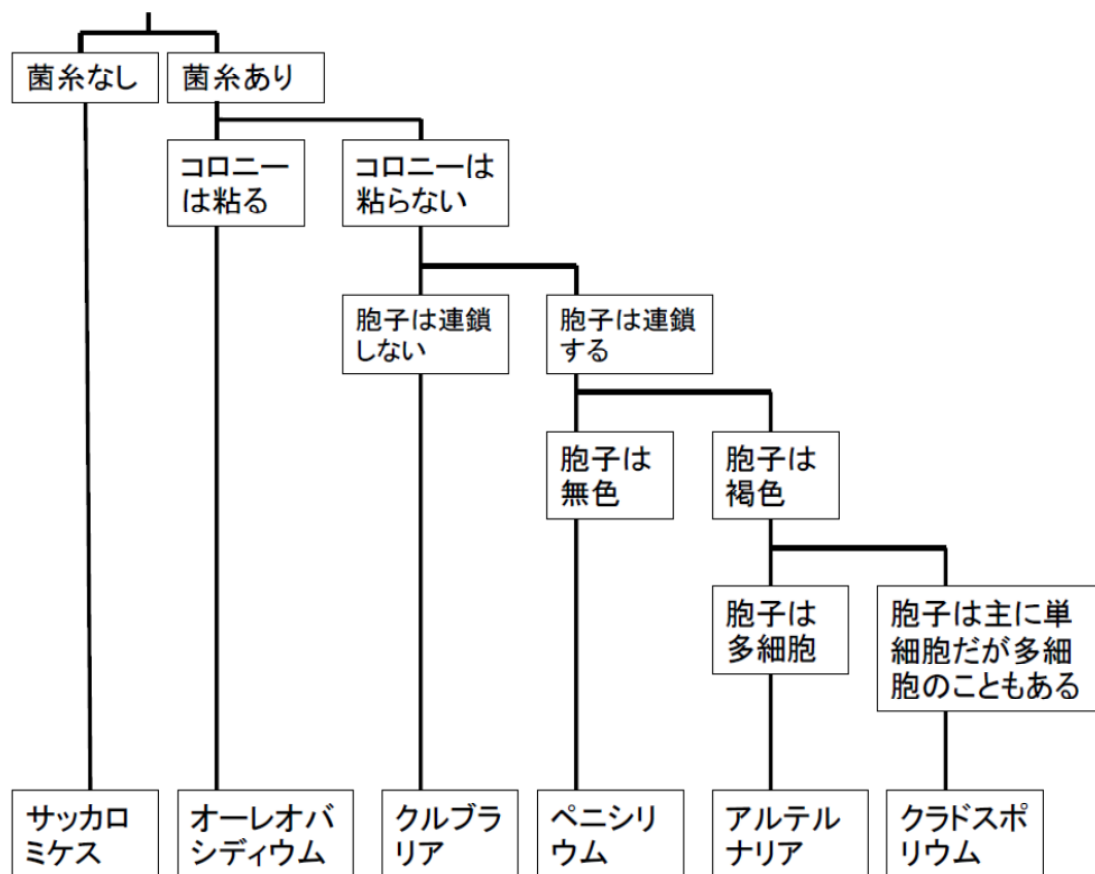
【問 2】

次の表は、これら 6 種のカビの特徴をまとめた形質の比較表です。スケッチをした孢子の形態や、その他、菌糸やコロニーについて観察した内容を基にして、空欄を埋めなさい。

番号／特徴	菌糸の有無	孢子の着色	孢子の細胞数	コロニーの粘性	孢子の連鎖	明瞭な孢子形成細胞
A	ある	ア	多細胞	ない	する	ない
B	ある	無色	単細胞	ない	エ	ある
C	ある	無色あるいは褐色	単細胞	ウ	する	ない
D	ない	無色	単細胞	ある	しない（まれにする）	ない
E	ある	褐色	単細胞あるいは多細胞	ない	する	ない
F	ある	褐色	イ	ない	しない	ない

【問 3】

二分岐型の検索表では、互いに対照的な形質を並べ、与えられた生物の特徴がどちらに合致するかを判断しながら、最終的なゴールにたどり着きます。
以上の観察結果をともに、二分岐型の検索表を用いて、それぞれの菌の属名を同定しなさい。



【問 4】

カビの胞子やコロニーには、種によって、粘り気があるもの（粘性）と、乾いているもの（乾性）とがあります。このような差はカビが胞子を散布するうえで、どのような意味があると考えられるか、述べなさい。