

はじめに

アフリカツメガエル(生物種名: *Xenopus laevis*)は南アフリカ原産の実験モデル生物です。形態や染色体の構成などについて、図2-0に示すような特徴があります。本問題では、アフリカツメガエルを研究材料として用い、いくつかの実験を行うことを仮定して、進めていきます。以下の文章を一通り読んだ上で、大問2-1に進んで下さい。

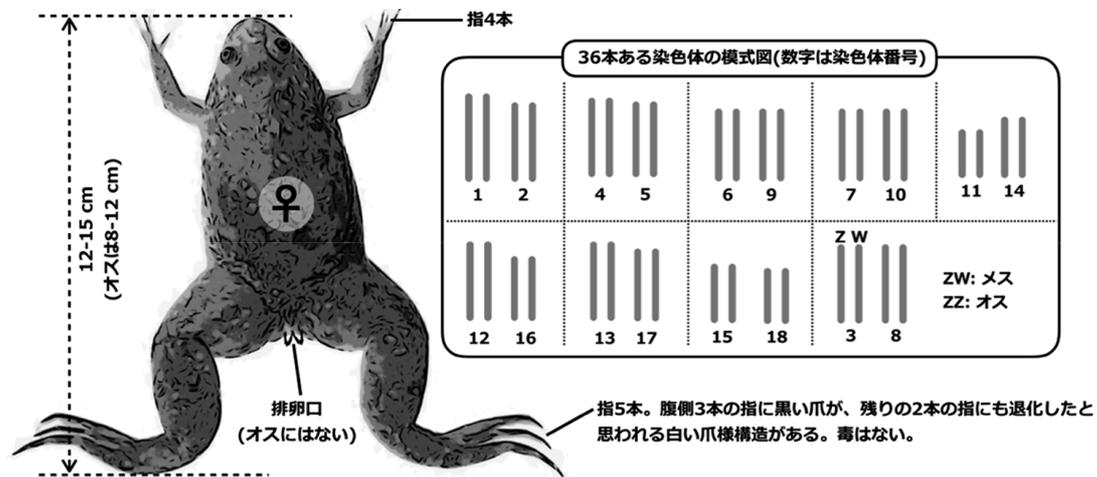


図2-0 アフリカツメガエルの特徴

- ▶メスの体長は12から15 cm程度であり、股の間に突起状の排卵口がある
- ▶オスの体長は8から12 cm程度である
- ▶前脚の指は4本、後ろ脚の指は5本ある。後ろ脚の腹側にあたる3本の指には黒い爪があり、残りの2本の指にも退化したと考えられる白い爪様構造がある
- ▶1番染色体から18番染色体まであり、それぞれが相同染色体を有す。つまり核相は複相であり、総染色体数は36本である($2n=36$)
- ▶約1800万年前に2つの祖先種の異種交配により誕生した異質4倍体種である。そのため、1番染色体と2番染色体、4番染色体と5番染色体、6番染色体と9番染色体、7番染色体と10番染色体、11番染色体と14番染色体、12番染色体と16番染色体、15番染色体と18番染色体、3番染色体と8番染色体は相似している。つまり、1番染色体上にある対立遺伝子の殆どのものについて、2番染色体上にも同祖遺伝子が存在することになる。脊椎動物の共通祖先では約5億年前に2回の全ゲノム重複が生じたと考えられているが、それと比較してはるかに最近に全ゲノム重複が生じたアフリカツメガエルは、ゲノム重複が進化に与える影響を考える上でも興味深い対象であると言える
- ▶水温20 °Cが保たれる環境で飼育することによって、一年中、メスに産卵させることができる。なお、産卵させる際には、採卵予定時刻の約12時間前にヒト絨毛性ゴナドトロピンを適量注射する

大問2-1

大問2-1(1)

アフリカツメガエルの飼育に用いるエサは直径3 mm程度の水に浮く乾燥練り餌となる(浮き餌とも呼ぶ)。基本的にこの乾燥練り餌以外に何もエサとして与える必要はない。また、この乾燥練り餌におけるタンパク質、炭水化物、そして脂質といった三大栄養素の単位重量あたりの含有割合は、それぞれ50%、2%、そして8%となる。全てエネルギー源として利用できると仮定し、これら以外にカロリー源になるものは含まれていないと仮定する。

ある高校生は、新たにアフリカツメガエルを実験動物として飼育することにした。そのために必要となる餌の量を設定する必要があるが、参考になる資料や問い合わせ先がなく、自分で考える必要がある。そこで、仮に、体重が150 gのアフリカツメガエルを体重の増減がない状態で維持するとすれば、1週間に1匹あたり何g程度の餌を与えるべきかについて、以下のように考えた。その高校生の考え方が、論理的に正しく、計算に誤りがないと仮定して、以下の「ア」から「オ」にあてはまる数値を記載しなさい。なお、解答欄の「イ」から「オ」については、小数点以下3桁目を四捨五入し、小数点以下2桁まで記載しなさい(例: 3.14、15.00)。

ある高校生の考え方: 60 kgのヒトの1日の基礎代謝と最低限の運動に必要なカロリーを1,600 kcalと仮定する。体重だけを考慮し、そのまま比例させて考えると、アフリカツメガエルを体重の増減がない状態で維持するとすれば、1日あたり「ア」 kcalを摂取させる必要がある。三大栄養素1 gを摂取したときに発生するエネルギー量の平均値はタンパク質と炭水化物は4 kcal、脂質は9 kcalと考えられる。つまり、上記の乾燥練り餌1 gを用いる場合、そこに含まれるタンパク質から「イ」 kcal、炭水化物から「ウ」 kcal、そして脂質から「エ」 kcalが供給される計算になる。つまり、1週間あたり、1匹に対して「オ」 gの乾燥練り餌を用いれば良いことになる。

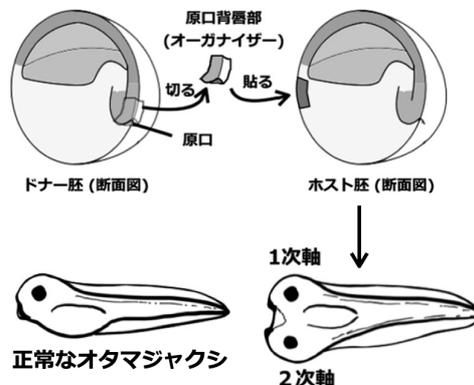
大問2-1(2)

実際には、過去の飼育に関する経験則を元にエサの量を定めることが殆どである。また、生物学的な他の要素を含めても、上記のような計算だけでエサの量を定められるものではない。例えば、ベルクマンの法則やアフリカツメガエルが変温動物であると考慮するだけでも、数値は「オ」とは異なることになる。それぞれの場合において、「オ」の値と比べてどうなるかについて、あてはまるものの組合せを下記表の選択肢1から4のなかから選び、解答欄(カ)に数字のみを記載しなさい。

	カの選択肢			
	1	2	3	4
ベルクマンの法則を考慮にいれた場合	多くなる	多くなる	少なくなる	少なくなる
変温動物であることを考慮に入れた場合	多くなる	少なくなる	多くなる	少なくなる

大問2-2

1924年、ドイツの科学者であるシュペーマンとマンゴールドらは、イモリの原腸胚を用いて、脊椎動物の初期胚には、オーガナイザー(形成体)と呼ばれる、体全体の構造を誘導できる領域が存在することを示した。この実験系は同じ両生類であるアフリカツメガエルでも再現性が得られている(図2-2)。



※イラストの出典元
Shimada et al., 2020

図2-2 アフリカツメガエル胚における原口背唇部の移植実験

イモリにおける実験では、図2-2で示す形成体を切除されたドナー胚を培養した結果は示されていない。もし、形成体が体の全体構造を誘導する領域であるのであれば、それを失った胚は正常に発生することはないはずである。アフリカツメガエル胚において、その検証を行ったところ、表2-2に示す結果が得られた。なお、アフリカツメガエルの原腸胚初期に原口背唇部を移植されたホスト胚は、全て図2-2で示されるように完全な頭部構造を含む2次軸構造を有する胚になったものとする。また、背側の原口背唇部周辺以外には図2に示すような2次軸をもつ胚を誘導できる領域はないものとする。

表2-2 原腸胚初期に原口背唇部を切除されたドナー胚が示す表現型

表現型の種類	例数
頭部構造も含めて正常に発生した胚	7
頭部構造に奇形が生じたがそれ以外はほぼ正常に発生した胚	6
頭部構造の欠損が確認された胚	8
神経管や脊索構造を含む胴尾部の体軸構造が欠失した胚	0
総数	21

表2-2に示された実験結果から読み取れる可能性に関する考察として、特に相応しいものはどれか。3つ選択し、解答欄(キ)に解答用紙の指示にしたがって記載しなさい。

- 選択肢
- 1) 切り取られた領域の周辺にも形成体と同じ活性をもつ領域が残っている
 - 2) ホスト胚ごとに、移植された形成体に対する反応性が異なっている
 - 3) 形成体には頭部構造が形成される上で重要な役割を担う領域が含まれている
 - 4) 切り取られた際にドナー胚では形成体の活性をもつ領域が失われるが、その後、形成体の活性をもつ領域がどこかに再構築される
 - 5) 移植の際の技術的な未熟さが、二次軸における頭部構造の完成度に影響を与える
 - 6) 形成体は胚の胴尾部における神経管や脊索形成に必要である
 - 7) ドナーとして用いた胚の形成体には何らかの異常があった
 - 8) 原口背唇部には将来の脊索になる領域が含まれている

受験 番号		名前	
----------	--	----	--

大問2-1

ア		イ		ウ		エ		オ	
---	--	---	--	---	--	---	--	---	--

※問題文にも書かれている通り、**イ**から**オ**については、小数点以下3桁目を四捨五入し、小数点以下2桁まで記載しなさい(例: 3.14、15.00)。

カ	
---	--

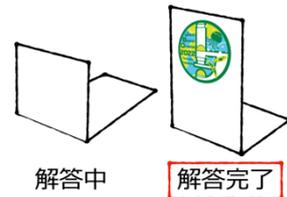
大問2-2

キ			
---	--	--	--

※3つの説について数字を記載しなさい。左ほど小さい数とすること。
 ※記載が2つ以下であった場合は採点の対象外とする。

ここまでの解答が完了した者は通知札を「解答完了」モードにしてください。

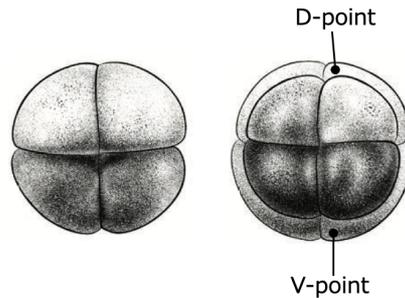
※次の問題は
大問2-3です



大問2-3

アフリカツメガエルの初期発生における特定の物質の働きを調べるためには、顕微鏡下で特定の物質を注入する研究手法(顕微注入法)が活躍する。この技術の仕組みを理解するために、まず、アフリカツメガエル胚の卵割期の特徴を伝える。

図2-3に示す通り、アフリカツメガエルの4細胞期と8細胞期の胚を動物極側から見ると、濃淡に差があることがわかる。これは、受精後に生じる表層回転の影響であり、色の薄い側を背側、濃い側を腹側と呼ぶ。発生が進み、原腸胚期になると背側には形成体がつくられる。



※イラストの出典元
Zahn et al., 2022

図2-3 アフリカツメガエル胚の4細胞期(左)と8細胞期(右)を動物極側から見た図

大問2-3(1)

8細胞期の動物極側に存在する4つの割球は、カルシウムイオンとマグネシウムイオンを取り除いた溶液中で培養すると、それぞれ別々に単離することができる。この時、背側の割球をD割球、腹側の割球をV割球と呼ぶとする。つまり、それぞれ左右2個のD割球とV割球の計4つの割球が8細胞期の胚から単離できることになる。単離したD割球とV割球の培養を続けると、それぞれ卵割を継続する。胞胚期に相当する時期に至った際に、中胚葉誘導能をもつタンパク質であるアクチビンで処理をすると、D割球の方がアクチビンに対する反応性が高いことが知られている。これが意味するところとして、以下の4つの文のうち最も相応しいものはどれか。解答用紙の(ク)の欄に数字を記載しなさい。

- 選択肢**
1. アクチビンの受容体がD割球の方が多く含まれている
 2. カルシウムイオンとマグネシウムイオンが卵割には必要不可欠である
 3. V割球にはアクチビンの働きを阻害する物質が存在する
 4. 8細胞期の時点で背側と腹側の割球の性質は異なっている

大問2-3(2)

図2-3には顕微注入の際、実際に注射針を刺すためによく用いられる地点をD-pointならびにV-pointとして示した。塩化リチウムには、背側化誘導能があることが知られている。それゆえ、胚発生の変化を観察するための顕微注入の練習として、用いることにした。今、D-pointもしくはV-pointのどちらかに0.3 mol/Lの塩化リチウム溶液を4 nl注入し、図2-2で示したような二次軸を誘導したいと考えている。あなたは、D-pointとV-pointのどちらに塩化リチウムを注入しますか？解答用紙の(ケ)の欄において、D-pointの場合はAを、V-pointの場合はBを丸で囲みなさい。また、4 nl中に含まれる、塩化リチウムの量を個体なさい。以下の選択肢1から4より最も近い数値の、5から8より相応しい単位の選択肢を選び、その選択肢の番号を掛け算した値を解答欄(コ)に記載しなさい。塩化リチウムの分子量は42とする。

- 選択肢** 1) 5 2) 50 3) 500 5) pg 7) ng 11) μg 13) mg

※例) 500 μgだと思ふ場合、選択肢3と11の組合せのため、33を解答欄(コ)に記載すること

受験 番号		名 前	
----------	--	--------	--

大問2-3

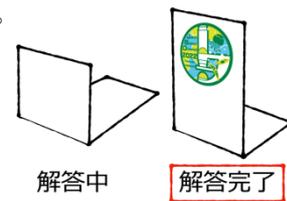
ク	
---	--

ケ	A・B
---	-----

※D-pointの場合はAを、V-pointの場合はBを丸で囲みなさい。なお、この問題は、選択した解答によって次の問題用紙が異なるため、必ず解答する必要があります。

コ	
---	--

ここまでの解答が完了した者は、通知札を「解答完了」モードにしてください。



※ケの解答の内容によって、次に配布する問題が異なる。

Aを選択した場合→大問 2-4A

Bを選択した場合→大問 2-4B

橙 A

橙 B

大問2-4A

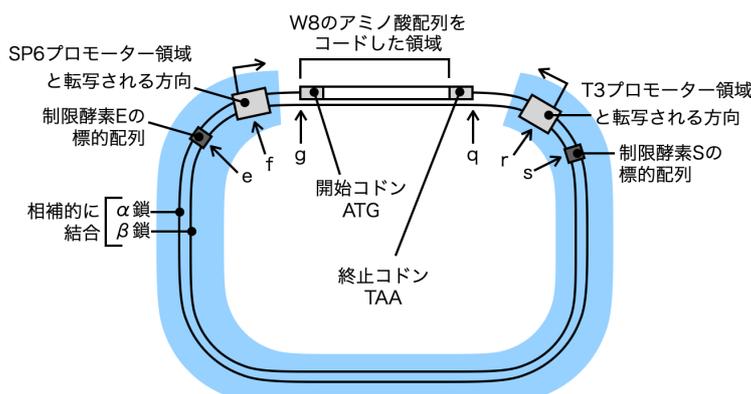
D-pointへの顕微注入を行った結果、右に示す表現型が得られた。この結果は、求めていた表現型とは異なり、胚全体が大きく背側化したものと言える。二次軸を誘導したいのであればV-pointに顕微注入する必要がある。以上を踏まえて、更なる顕微注入実験に進む。



形成体領域には今回塩化リチウムが示したものと似た活性を示すタンパク質が存在する可能性が高い。ここでは、それに該当する可能性があると思われるアフリカツメガエルが有す分泌型タンパク質のW8に着目する。なお、W8は遺伝子w8が転写されてできるw8 mRNAが翻訳されたものとする。

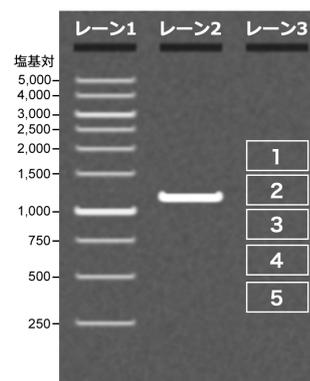
- ・w8 mRNAから翻訳されたばかりのポリペプチドは358アミノ酸から成る。
- ・8細胞期においてw8 mRNAを図2-2で示したV-pointに10 pg顕微注入すると完全な頭部構造をもつ二次軸が誘導される。

図2-4Aに示すプラスミドは遺伝子発現に特化したpXという名称のプラスミドの1箇所を切断し、そこに上に示したW8の358アミノ酸をコードした配列と、その前方と後方のそれぞれ55塩基対、68塩基対をあわせたDNA配列が挿入されている。このプラスミドを鋳型として、試験管内でmRNAを合成するとすれば、プラスミドを環状から直鎖状にした上で、適切なRNAポリメラーゼを用いて合成する必要がある。



※水色の背景部分はこのプラスミドpXが持つ独自の配列となる。
 ※eとf、fとg、qとr、rとsの間はいずれも約100塩基対の長さがある
 ※制限酵素EとSはどちらも標的配列を切断した際に5'突出末端を形成する

図2-4A W8が挿入されたプラスミド



レーン1はDNAマーカー。レーン2は図2-4Aに示されるプラスミドを鋳型にSP6ならびにT3プロモーターに結合するプライマーを用いてPCRを行った際のDNA断片とする。

図2-4B 電気泳動図

大問2-4(1)

mRNAを合成するには以下の1と2のどちらの組み合わせで進める必要があるか。以下の選択肢AとBより相応しい組み合わせを選択し、解答欄(サ)において選択したものを丸で囲みなさい。

- 選択肢 A) 制限酵素Sで切断し、SP6プロモーター領域に結合するRNAポリメラーゼを用いる
 B) 制限酵素Eで切断し、T3プロモーター領域に結合するRNAポリメラーゼを用いる

大問2-4(2)

合成したmRNAをアガロースゲルにて電気泳動した場合には、どの辺りにバンドが検出されるか。分子量に応じて泳動距離が決まると仮定した場合、右上の電気泳動図(図2-4B)のレーン3で泳動したとして、予想されるバンドの位置を図2-4Bのレーン3の枠1から5の中から選び、解答欄(シ)にその数字を記載しなさい。また、そのmRNAの塩基数はおおよそ何塩基になるか。約N×100塩基数とした場合にNに当てはまる最も相応しい正の整数を解答欄(ス)に記載しなさい。なお、ポリアデニル化は考慮しなくても良い。

大問2-4B

V-pointへの顕微注入を行った結果、以下に示す表現型が得られた。今回、狙い通りに二次軸を誘導することができた。以上を踏まえて、更なる顕微注入実験に進む。



オーガナイザー領域には今回塩化リチウムが示したものと似た活性を示すタンパク質が存在する可能性が高い。ここでは、それに該当する可能性があると思われるアフリカツメガエルが有す分泌型タンパク質のW8に着目する。なお、W8は遺伝子 *w8* が転写されてできる *w8* mRNA が翻訳されたものとする。

- *w8* mRNA から翻訳されたばかりのポリペプチドは358アミノ酸から成る。
- 8細胞期において *w8* mRNA を図2-2で示したV-pointに10 pg顕微注入すると完全な頭部構造をもつ二次軸が誘導される。

図2-4Aに示すプラスミドは遺伝子発現に特化したpXという名称のプラスミドの1箇所を切断し、そこに上に示したW8の358アミノ酸をコードした配列と、その前方と後方のそれぞれ55塩基対、68塩基対をあわせたDNA配列が挿入されている。このプラスミドを鋳型として、試験管内でmRNAを合成するとすれば、プラスミドを環状から直鎖状にした上で、適切なRNAポリメラーゼを用いて合成する必要がある。

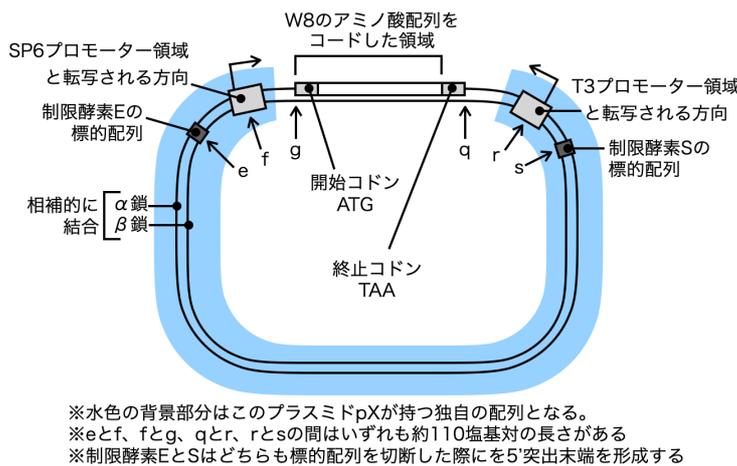
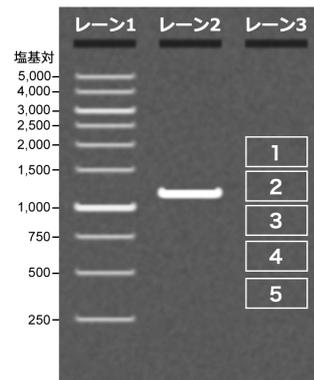


図2-4A W8が挿入されたプラスミド



レーン1はDNAマーカー。レーン2は図2-4Aに示されるプラスミドを鋳型にSP6ならびにT3プロモーターに結合するプライマーを用いてPCRを行った際のDNA断片とする。

図2-4B 電気泳動図

大問2-4(1)

mRNAを合成するには以下の1と2のどちらの組み合わせで進める必要があるか。以下の選択肢AとBより相応しい組み合わせを選択し、解答欄(サ)において選択したものを丸で囲みなさい。

- 選択肢
- A) 制限酵素Sで切断し、SP6プロモーター領域に結合するRNAポリメラーゼを用いる
 - B) 制限酵素Eで切断し、T3プロモーター領域に結合するRNAポリメラーゼを用いる

大問2-4(2)

合成したmRNAをアガロースゲルにて電気泳動した場合には、どの辺りにバンドが検出されるか。分子量に応じて泳動距離が決まると仮定した場合、右上の電気泳動図(図2-4B)のレーン3で泳動したとして、予想されるバンドの位置を図2-4Bのレーン3の枠1から5の中から選び、解答欄(シ)にその数字を記載しなさい。また、そのmRNAの塩基数はおおよそ何塩基になるか。約N×100塩基数とした場合にNに当てはまる最も相応しい正の整数を解答欄(ス)に記載しなさい。なお、ポリアデニル化は考慮しなくても良い。

受験 番号		名 前	
----------	--	--------	--

大問2-4

サ	A・B
---	-----

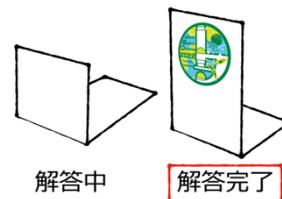
※AかBのどちらかを丸で囲みなさい。なお、この問題は、選択した解答によって次の問題用紙が異なるため、必ず解答する必要があります。

シ	
---	--

※1から5の中から適当な数字を記入してください。

ス	
---	--

ここまでの解答が完了した者は、通知札を「解答完了」モードにしてください。



※サの解答の内容によって、次に配布する問題が異なる。

Aを選択した場合→大問 2-5A

Bを選択した場合→大問 2-5B

桃 A

桃 B

大問2-5A

w8 mRNAを合成した結果、図2-5に示される電気泳動像が得られた。④の枠のあたりを中心に拡散するようなバンド(スミアなバンド)が得られたと言える。

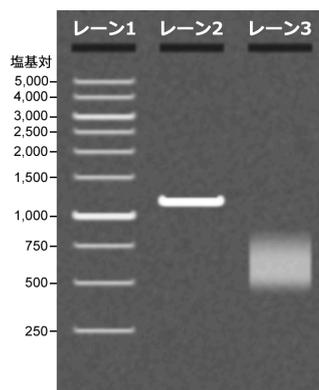


図2-5 合成したmRNAを電気泳動した結果

大問2-5(1)

今回のような泳動像が得られた理由として、最も適当なものを以下の選択肢よりひとつ選択し、(セ)に数字のみを記載しなさい。

- 選択肢**
- 1) RNAはDNAよりも遙かに多くの負の電荷を有し、分子ごとの差も大きいため
 - 2) RNAは一本鎖であるため、分子量は鋳型として用いられたDNA配列の領域の半分になる。また、分子ごとに異なる立体構造をとる傾向があるため
 - 3) RNAはDNAと比較して多様な負の電荷をもつ修飾が多く加えられる。そのため、鋳型として用いられたDNA配列の領域よりも速く、多様な流れ方をするため
 - 4) RNAはUTPを有し、五炭糖の2'の位置に水酸基がある。その影響から、DNAと同じような電気泳動像はそもそも得られないため

大問2-5(2)

紫外分光光度計を用いて、RNAの濃度を測定したところ650 ng/μlの濃度であることが判明した(これをmRNA原液とする)。続けて、このmRNAを10 pgだけ図2-3のV-pointに注入する必要がある。2 nlの液に10 pg含まれるようにするには、mRNA原液を何倍希釈する必要があるか。計算した上で、数値を解答欄(ソ)に記載しなさい。有効数字は3桁とする。なお、1000倍以上の希釈になる場合は、以下のように記載すること。1000倍未満の場合は、小数点以下第1位を四捨五入して、3桁の整数を記入すること。
記載例) 123.4ならば123。123456ならば 1.23×10^5 、3456789ならば 3.46×10^6

補足(大問2-5(1)と(2)の解答に影響は与えない)

今回の合成したRNAが有していた活性に関する最終的な結果について。このRNAを注入したところ、頭部構造を含む二次軸構造が誘導された。mRNAとして本来の目的に沿って正しく合成されたものと言える。

大問2-5B

w8 mRNAを合成した結果、図2-5に示される電気泳動像が得られた。④の枠のあたりを中心に拡散するようなバンドが得られたと言える。

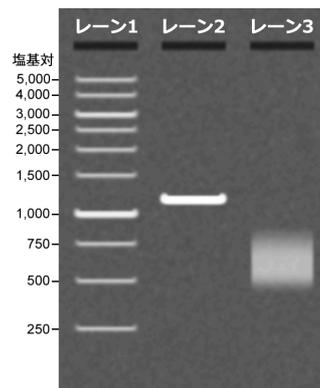


図2-5 合成したmRNAを電気泳動した結果

大問2-5(1)

今回のような泳動像が得られた理由として、最も適当なものを以下の選択肢よりひとつ選択し、(セ)に数字のみを記載しなさい。

- 選択肢**
- 1) RNAはDNAよりも遙かに多くの負の電荷を有し、分子ごとの差も大きいため
 - 2) RNAは一本鎖であるため、分子量は鋳型として用いられたDNA配列の領域の半分になる。また、分子ごとに異なる立体構造をとる傾向があるため
 - 3) RNAはDNAと比較して多様な負の電荷をもつ修飾が多く加えられる。そのため、鋳型として用いられたDNA配列の領域よりも速く、多様な流れ方をするため
 - 4) RNAはUTPを有し、五炭糖の2'の位置に水酸基がある。その影響から、DNAと同じような電気泳動像はそもそも得られないため

大問2-5(2)

紫外分光光度計を用いて、RNAの濃度を測定したところ650 ng/μlの濃度であることが判明した(これをmRNA原液とする)。続けて、このmRNAを10 pgだけ図2-3のV-pointに注入する必要がある。2 nlの液に10 pg含まれるようにするには、mRNA原液を何倍希釈する必要があるか。計算した上で、数値を解答欄(ソ)に記載しなさい。有効数字は3桁とする。なお、1000倍以上の希釈になる場合は、以下のように記載すること。1000倍未満の場合は、小数点以下第1位を四捨五入して、3桁の整数を記入すること。
記載例) 123.4ならば123。123456ならば 1.23×10^5 、3456789ならば 3.46×10^6

補足(大問2-5(1)と(2)の解答に影響は与えない)

今回の合成したRNAが有していた活性に関する最終的な結果について。このRNAを注入しても二次軸は誘導されなかった。mRNAとして本来の目的に沿って正しく合成されたものではなかったためである。

受験 番号		名 前	
----------	--	--------	--

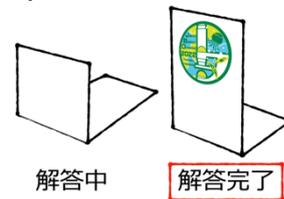
大問2-5

セ	
---	--

ソ	倍希釈
---	-----

※数値のみを記入してください。123.4ならば123。123456ならば 1.23×10^5 、3456789ならば 3.46×10^6

ここまでの解答が完了した者は、通知札を「解答完了」モードにしてください。



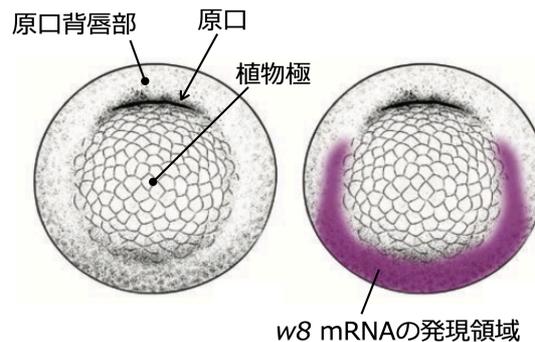
※次の問題用紙は以下となります。

大問 2-6

赤

大問2-6

*in situ*ハイブリダイゼーションと呼ばれる技術について説明する。これは、mRNAと相補的に結合するRNA (RNAプローブと呼ぶ)を活用した技術となる。RNAプローブ合成に用いるUTPの一部にはデオキシゲニンという化学薬品が結合しているため、追加の化学薬品を加えることでRNAプローブが存在する位置が紫色に染まる仕組みを利用したものになる。たとえば、原腸胚期において、*w8* mRNAをこの技術を用いて染めると、図2-6で示した領域が紫色に染まる。また、卵割期ならびに胞胚期初期や中期では紫色に染まる領域は全く確認されず、それらの時期における遺伝子発現は認められないと考えられる。



※イラストの出典元
Zahn et al., 2022

図2-6 *in situ*ハイブリダイゼーションを用いて *w8* mRNAの発現領域を確認した結果

これらの結果は、次のような考え方から説明がつく。□□に入る言葉を選択肢より選び、その数字を記載しなさい(同じ選択肢を複数回用いても構わない)。

考え方: W8は□□と似た働きを導くタンパク質であるため、原腸胚初期の□□側領域にmRNAが発現していることが期待される。しかし、実際に発現する領域は□□側領域である。両生類などの胚では、胞胚期中期にMBT (mid-blastula transition, 中期胞胚遷移)と呼ばれる現象がある。発生段階がMBTより前の胚は転写をすることができないが、MBT以降は転写をすることができる。つまり、顕微注入された*w8* mRNAはMBTより□□の段階で直ちに翻訳される一方、本来の胚の中に表れる*w8* mRNAはMBTより□□の段階で翻訳されることになる。つまり、MBTより前と後の時期を比べた場合、W8が胚発生に与える影響は□□ことが考えられる。図2-3のV-pointへの*w8* mRNAの顕微注入と塩化リチウムの顕微注入の結果から、これらはどちらもMBTより□□の段階で、同じ因子を活性化させている可能性がある。なお、本来の胚に含まれるW8が実際に初期発生において果たす役割を知りたい場合、W8の働きを□□する方向の実験を行う必要があるだろう。

- | | | | |
|-----|--------|----------|---------|
| 選択肢 | 1) 前 | 6) 植物極 | 11) 促進 |
| | 2) 後 | 7) 右 | 12) 抑制 |
| | 3) 背 | 8) 左 | 13) 形成体 |
| | 4) 腹 | 9) 変化する | 14) 誘導體 |
| | 5) 動物極 | 10) 保たれる | 15) 脊索 |

大問2-7

その後の研究から、W8と塩化リチウムは以下のシグナルトランスダクション(Wシグナル)に関わっていることが判明している(図2-7)。通常の細胞内では、 β 因子が細胞質中に存在すると直ちにキナーゼgによってリン酸化されて、それが引き金となって分解される。一方、W8がその受容体に結合すると、キナーゼgの働きが抑制されるため、 β 因子は細胞核内に移動し、標的となる遺伝子に作用する。その結果、標的遺伝子が転写される。

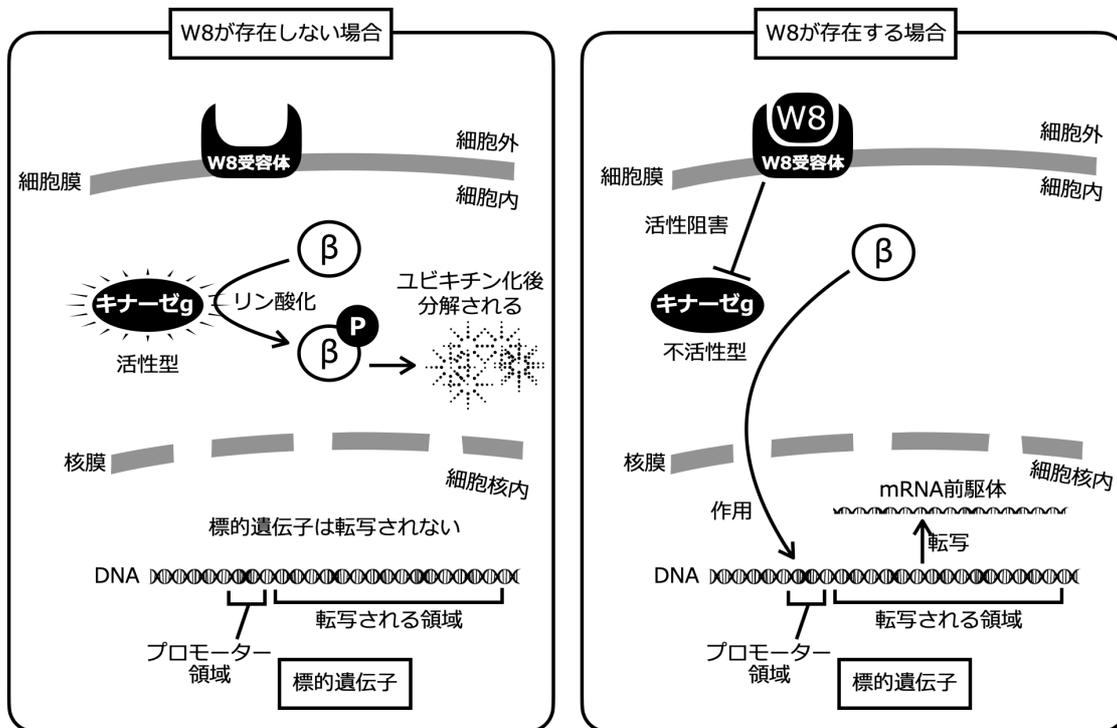


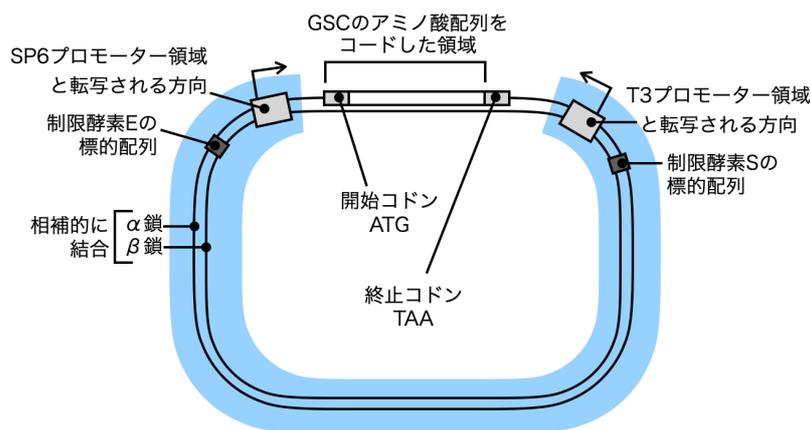
図2-7 W8がある場合とW8がない場合におけるWシグナルの働き方模式図

それでは、塩化リチウムはどのようにWシグナルに関わっていると予想されるか。以下の可能性のうち、最も正しいと思われるものを3つ選択し、解答欄(ネ)に記入しなさい。

- 選択肢**
- 1) W8受容体の活性を阻害する
 - 2) キナーゼgの働きを阻害する
 - 3) キナーゼgを細胞核内に移動させる
 - 4) Wシグナルの活性化によって転写されたmRNAに結合し、その安定度を高める
 - 5) 細胞内のオートファジー能力を促進する
 - 6) β 因子の細胞核への移動を促進させる
 - 7) 核膜孔をふさぎ、細胞核の恒常性を安定させる
 - 8) 標的遺伝子のプロモーター領域に作用し、遺伝子発現スイッチをオンにする
 - 9) カドヘリンの細胞内領域における β 因子結合を促進する

大問2-8

図2-7で示した通り、W分子シグナルが活性化することによって、特定の遺伝子が転写・翻訳され、タンパク質として表れる。ホモボックス型転写因子のひとつであるGSCもそのひとつである(この遺伝子は *gsc* として表す)。ここでは、*w8* mRNAもしくは塩化リチウムを図2-3のV-pointに顕微注入した際に、原腸胚期における *gsc* mRNAの発現する領域がどのようになるか、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて調べることにした。*gsc* mRNAに結合するRNAプローブは図2-8に示すプラスミドを用いて合成した。図2-8の水色部は、*w8* mRNAの合成に用いたものと同じ配列である。RNAプローブの合成は制限酵素Eでプラスミドを切断した上で、T3プロモーターに結合するRNAポリメラーゼを用いて行った。



※水色の背景部分はこのプラスミドpXが持つ独自の配列となる。
 ※制限酵素EとSはどちらも標的配列を切断した際に5'突出末端を形成する

図2-8 GSCが挿入されたプラスミド

大問2-8(1)

二次軸誘導活性の度合いが同じとなる量の *w8* mRNAと塩化リチウムを顕微注入に用いたとする。図2-8に示すプラスミドから合成したRNAプローブを用いて、*w8* mRNAもしくは塩化リチウムを図2-3のV-pointに顕微注入して原腸胚まで発生させた胚(前者をW8胚、後者を塩化リチウム胚と呼ぶ)に対して *in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果は、以下の選択肢のいずれになるか。W8胚について予想される結果は解答欄(ノ)に、塩化リチウム胚について予想される結果は解答欄(ハ)に記載しなさい。

- 選択肢**
- 1) *gsc* mRNAの発現量に変化はない
 - 2) 背側の *gsc* mRNAの発現量が増加する
 - 3) 腹側の *gsc* mRNAの発現量が増加する

大問2-8(2)

今回の実験における *in situ*ハイブリダイゼーションで紫色に染まる領域を比較した場合、どのような結果になると思うか。以下の選択肢1-3より適当なものを選び、解答欄(ヒ)に数字のみを記載しなさい。またその根拠を選択し4-6から選び、解答欄(フ)に数字のみを記載しなさい。

- 選択肢**
- 1) 紫色に染まる領域はW8胚と塩化リチウム胚のどちらも同じ程度である
 - 2) 紫色に染まる領域はW8胚の方が塩化リチウム胚より広い
 - 3) 紫色に染まる領域は塩化リチウム胚の方がW8胚より広い
 - 4) これまでに定められた実験条件からWシグナルの活性化量に差が出ると考えたため
 - 5) これまでに定められた実験条件からWシグナルの活性化量に差は出ないと考えたため
 - 6) RNAプローブを合成する実験系に問題があると考えたため

受験 番号		名 前	
----------	--	--------	--

大問2-6

タ		チ		ツ		テ	
ト		ナ		ニ		ヌ	

※数字のみを記入してください

大問2-7

ネ			
---	--	--	--

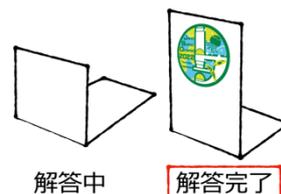
※正しいと思う3つの説を選択して、その数字を記載しなさい。左ほど小さい数とすること。

大問2-8

ノ		ハ		ヒ		フ	
---	--	---	--	---	--	---	--

※ノ、ハ、ヒは1から3の中から、フは4から6の中から適当な数字を記入しなさい

ここまでの解答が完了した者は、通知札を「解答完了」モードにしてください。



※次の問題用紙は以下となります。

大問2-9

黒

大問2-9

大問2-8で行った*in situ*ハイブリダイゼーションの結果は図2-9の左に示す通りとなった。W8胚においては塩化リチウム胚と比較して、腹側領域において紫色に染まる領域が濃く広がった(胚を切断して内部を確認した場合も同様の傾向が得られた)。なお、W8胚全体と塩化リチウム胚全体からRNAを抽出し、逆転写を行ったあと、リアルタイムPCR法を用いて*gsc* mRNAの発現量を比較した結果、図2-9の右に示す結果になった。なお、*odc* mRNAはポジティブコントロール(実験操作に技術的な問題点がなかったことを示すための対照実験)にあたる。

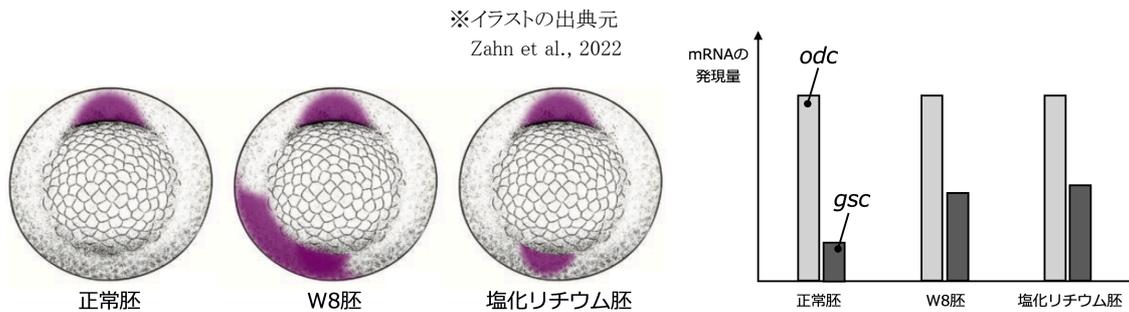


図2-9 *in situ*ハイブリダイゼーションの結果(左)とリアルタイムPCRの結果(右)

大問2-9(1)

図2-9左において、紫色に染まった領域が全て*gsc* mRNAに結合したRNAプローブに依存すると仮定した上で、図2-9左と右の結果を比較した場合、どのようなことが読み取れるか。相応しいものを以下の選択肢よりひとつ選び、数字のみを解答欄(へ)に記載しなさい。なお、正常胚において生じるmRNAの発現のことをエンドジェナス(endogenous)な発現と呼ぶ。一方、人為的な操作等によって、正常胚とは異なるところに追加的に生じるmRNAの発現のことをエクソピック(ectopic)な発現と呼ぶことにする。

	W8胚と塩化リチウム胚におけるエクソピックな <i>gsc</i> mRNAの増加量の比較	
	図2-9左	図2-9右
選択肢1	W8胚 ≒ 塩化リチウム胚	W8胚 ≒ 塩化リチウム胚
選択肢2	W8胚 < 塩化リチウム胚	W8胚 ≒ 塩化リチウム胚
選択肢3	W8胚 > 塩化リチウム胚	W8胚 < 塩化リチウム胚
選択肢4	W8胚 > 塩化リチウム胚	W8胚 > 塩化リチウム胚

大問2-9(2)

このような結果になった理由として、何が考えられるか。図2-4Aと図2-8を比較して見出される問題点を考え、理由として相応しいものを下記の選択肢より2つ選び、数字のみを解答欄(ホ)に記載しなさい。

- 選択肢**
- 1) 顕微注入に用いたmRNAの中にRNAプローブと結合する領域が存在したため
 - 2) RNAプローブの合成に用いるプロモーター領域が間違っていたため
 - 3) プラスミドを直鎖状にする際の制限酵素の位置が間違っていたため
 - 4) *in situ*ハイブリダイゼーションに用いるにはRNAプローブが長すぎたため
 - 5) *gsc*コードしたDNA配列がpXプラスミドの中に存在したため
 - 6) 塩化リチウムにはディゴキシゲニンを不活性化させる作用があるため
 - 7) 人為的に作成したmRNAには発色活性を高めるリボザイム効果が生じるため
 - 8) pXプラスミドは今回のRNAプローブの合成には適していないため
 - 9) *w8* mRNAと*gsc* mRNAには一定の長さの同じ塩基配列が存在したため

大問2-10（最終問題）

大問2-10(1)

原腸胚期に存在するW8の働きを調べることに関する以下の文の□を埋める言葉を選択肢より選び、その番号を解答欄に記載しなさい。ただし、**ヤ**については選択肢から選ぶのではなく、そこにあてはまる適切な数字を記載せよ。

文: 原腸胚期に存在するW8が初期発生にどのような影響を与えているかを知りたいければ、W8が存在しない場合の胚と正常胚の表現型を比較するのがよい。前者を人為的に導くための手法を述べる。DNA上の塩基配列を標的とした場合、**マ**を用いて遺伝子**ミ**を導くことが考えられる。また、RNA上の塩基配列を標的とするならば、RNA**ム**、アンチセンスモルフォリノオリゴマー、もしくはCRISPR-Cas7-11などを用いて遺伝子**メ**を導くことが考えられる。ただし、いずれもアフリカツメガエルが**モ**であることを考慮する必要がある。つまり、CRISPR-Cas9では標的となるDNA配列に結合するガイドRNAをデザインする場合、そのDNA配列が7番染色体にあるとすれば、**ヤ**番染色体にも存在する**ユ**を考慮する必要がある。

選択肢

- | | | | |
|----------------|------------|----------------|-------------|
| 1) CRISPR-Cas9 | 6) 障害 | 11) ノックダウン | 16) 同祖遺伝子 |
| 2) PCR | 7) 促進 | 12) マイクロアレイ | 17) 両生類 |
| 3) SNP | 8) トランスポゾン | 13) メタバーコーディング | 18) 通常2倍体種 |
| 4) TUNEL | 9) ノックアウト | 14) 対立遺伝子 | 19) 異質4倍体種 |
| 5) 干渉 | 10) ノックイン | 15) 中立遺伝子 | 20) 単為生殖型生物 |

大問2-10(2)

アフリカツメガエルの卵割期に顕微注入されたw8 mRNAには形成体と同じように二次軸を誘導する働きがあるにも関わらず、原腸胚初期においてw8 mRNAが発現している領域は形成体と重複するどころか、対極的なところに位置している。これは、1990年代に発生生物学者を悩ませたひとつのパラドックス的な課題であった。現在は、その理由はほぼ解き明かされている。ただし、ここでは、当時の研究者になった気持ちで考えてもらいたい。まず、以下の条件が仮に成り立つとする。

条件1) 原腸胚期に存在するW8はWシグナルを活性化している

条件2) 原腸胚期に存在するW8はWシグナルを活性化する以外の働きをもたない

条件3) 原腸胚期では、形成体領域のみでWシグナルが活性化されている

これらの仮条件が全て成立しているとして、どのような分子機構が介在すれば、上記のパラドックスを解決することができるか。論理的に成り立つ分子機構について自身の仮説をたて、(コ)の説明文の欄に150字程度で記載しなさい。また、仮説の全体像を捉えることができる図を(コ)の説明図の欄に描きなさい。説明図の欄にはすでに原腸胚初期の植物極側から見たイラストが描かれているので、それも活用すること。

受験 番号		名 前	
----------	--	--------	--

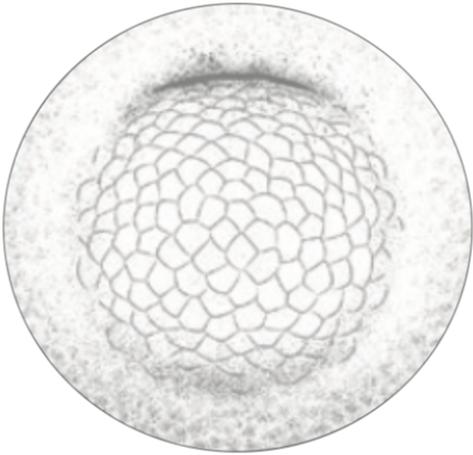
大問2-9

へ		ホ		
---	--	---	--	--

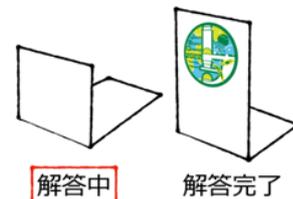
※ホには数字を2つ記載しなさい。左ほど小さい数とすること。

大問2-10

マ		ミ		ム		メ	
モ		ヤ		ユ			

ヨ	説 明 文	
	説 明 図	

以上で大問2は終了です。試験終了時間まで、通知札は「解答中」のままにして待機してください。



解答中

解答完了

出典

Shimada, K., Hara, Y., Kuroda, H. (2020) African Clawed Frog: A Model Organism for Various Studies. SFC JOURNAL, Vol. 19, p228-247.

Zahn, N., James-Zorn, C., Ponferrada, V.G., et al. (2022) Normal Table of *Xenopus* development: a new graphical resource. *Development*, Vol. 149, dev200356.

以上で大問2は終了です。