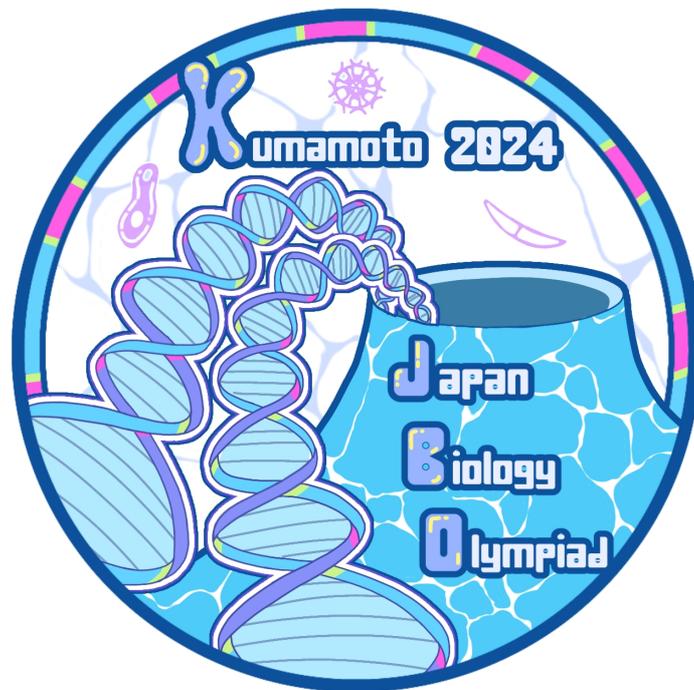


日本生物学オリンピック  
熊本大会 2024  
大問 2



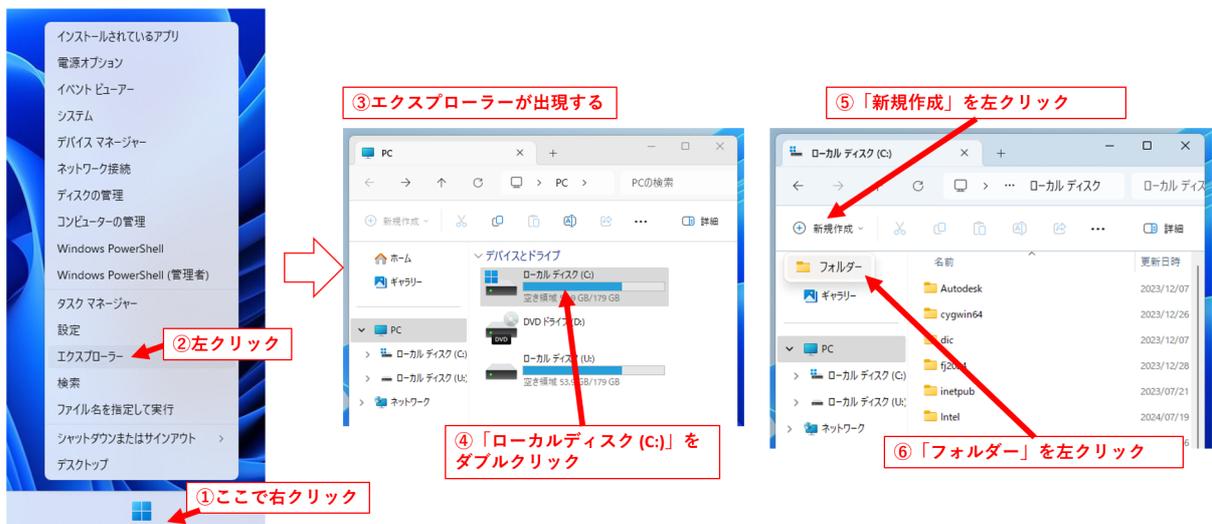
2024年8月26日  
制限時間 60分



## 【重要】予備実験

### 準備①

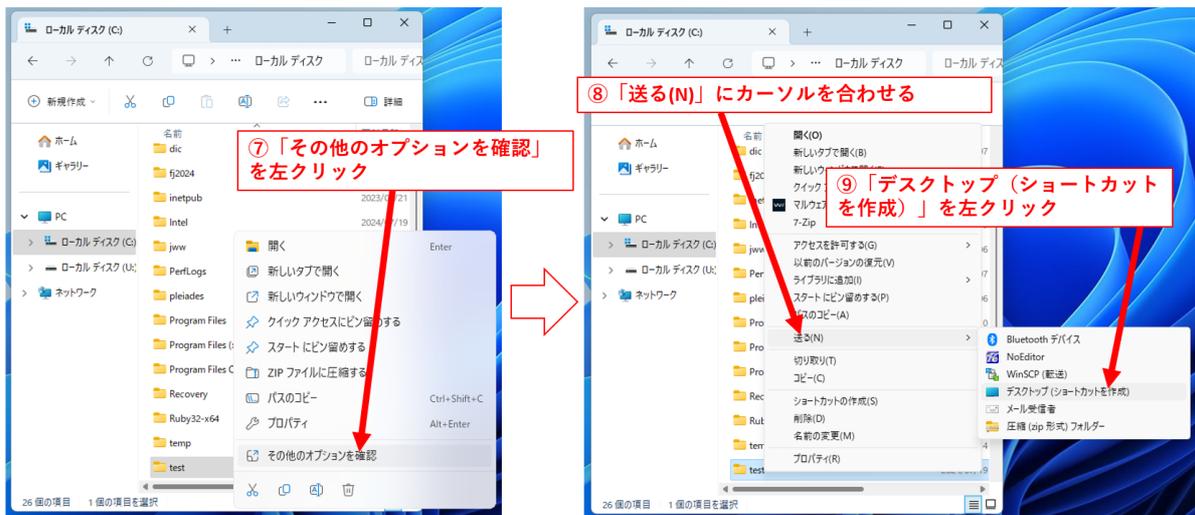
ここでは、実験に使用する作業スペースとファイルを準備する。まず、画面中央下の「スタート」の上で右クリックし、表示されるメニューから「エクスプローラー」を選択する（下図①、②）。すると、PCのエクスプローラーが表示されるので（下図③）、その中の「ローカルディスク (C:)」をダブルクリックする（下図④）。すると、「ローカルディスク (C:)」のエクスプローラーが表示される。その左上の「新規作成」を左クリックし（下図⑤）、表示された「フォルダー」を左クリックする（下図⑥）。



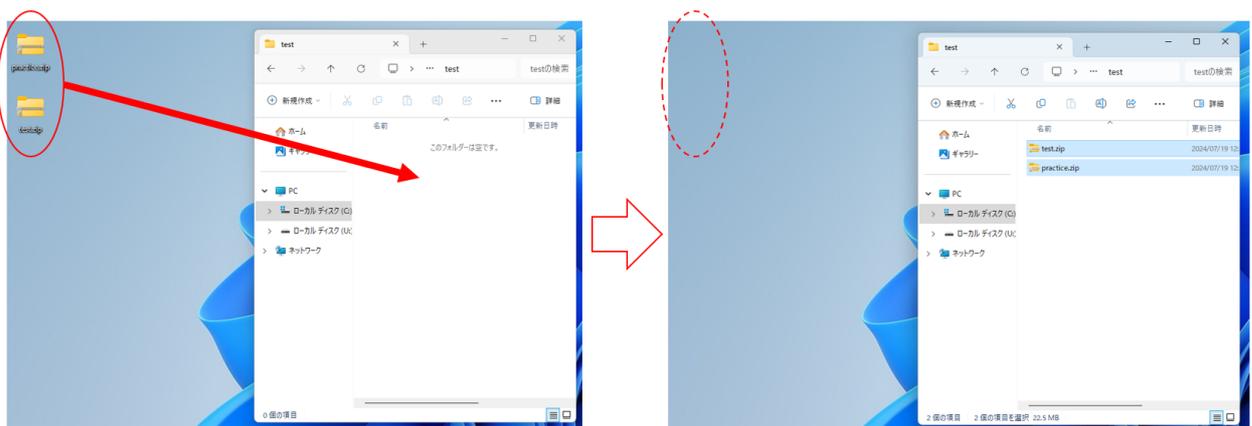
すると、「新しいフォルダー」が出現するので、「test」と入力してエンターキーを押すことで下ののようにフォルダー名を「test」に変更する。



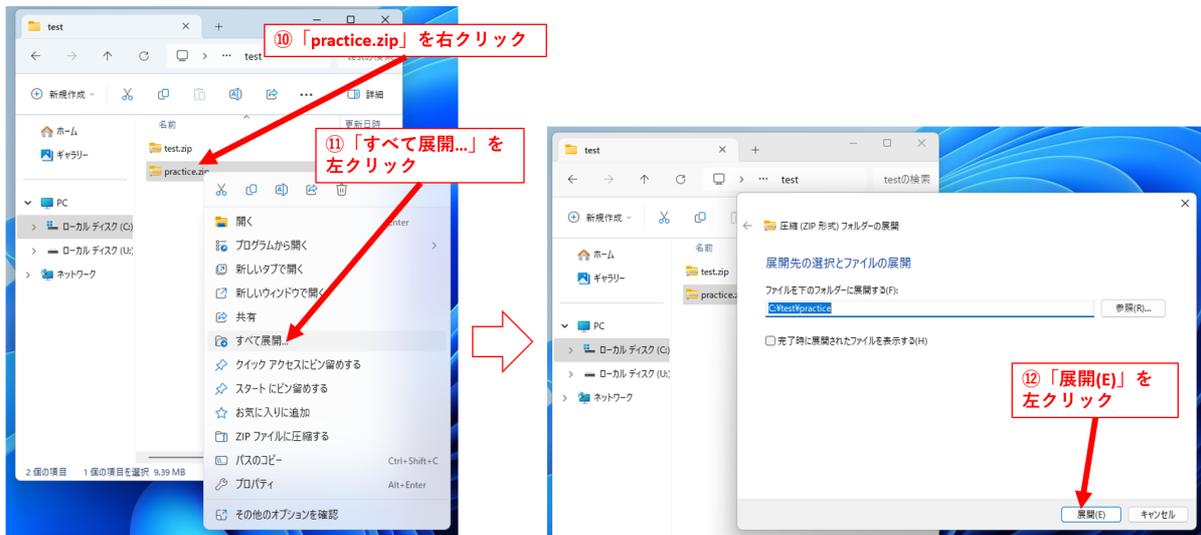
この「test」フォルダーを右クリックし、表示される「その他のオプションを確認」を左クリックする（下図⑦）。そこで表示される「送る(N)」にカーソルを合わせ（下図⑧）、表示される「デスクトップ(ショートカットを作成)」を左クリックする（下図⑨）。



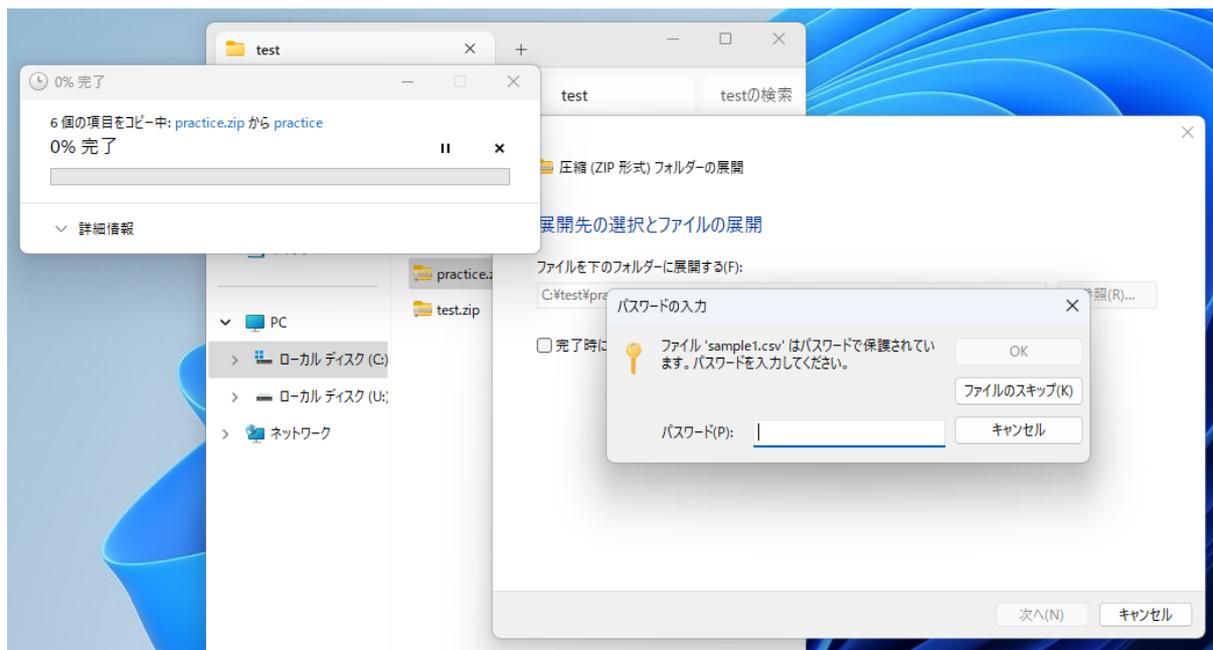
するとデスクトップに「test」フォルダーのショートカットが作成される。これをダブルクリックし、「test」フォルダーのexplorerを表示する。このフォルダーの中はまだ空である。そこで下図のように、デスクトップに置かれている「practice.zip」と「test.zip」をドラッグアンドドロップして「test」フォルダーに移動させる。



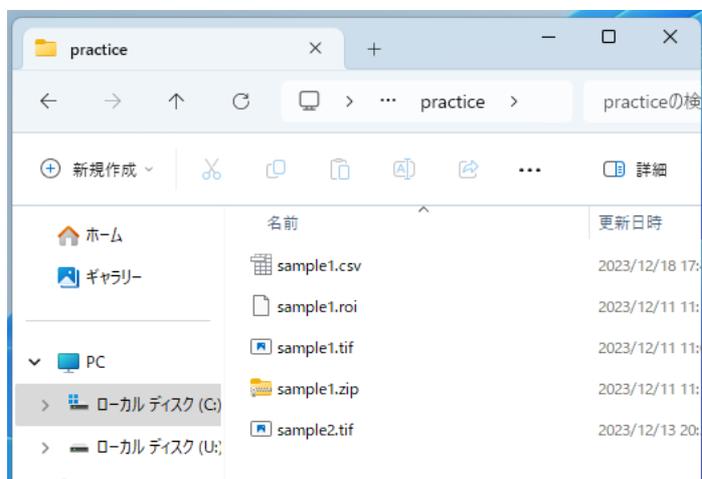
次に、先ほど移動した「practice.zip」を右クリックし（下図⑩）、表示される「すべて展開...」を左クリックする（下図⑪）。すると、「圧縮 (ZIP 形式) フォルダーの展開」ウィンドウが表示されるので、右下の「展開(E)」を左クリックする（下図⑫）。



すると、下図のように「パスワードの入力」ウィンドウが表示されるので、パスワードの記入欄に「Kumam0t0」（o（オー）ではなく、数字の0（ゼロ）であることに注意！）と入力し、「OK」を左クリックする。なお、入力するパスワードは黒丸としてしか表示されないため、慎重に入力すること。また、このときに「0% 完了」というウィンドウが出現するが、こちらは何も操作しないようにする。



パスワードを入力して「OK」を左クリックすると、「test」フォルダーの中に「practice」フォルダーが出現する。これをダブルクリックすると、また「practice」フォルダーが表示されるので、これを再度ダブルクリックすると、5つのファイル（sample1.csv、sample1.roi、sample1.tif、sample1.zip、sample2.tif）が表示されるはずである。これらは以降の予備実験で使用するもので、よく確認すること。



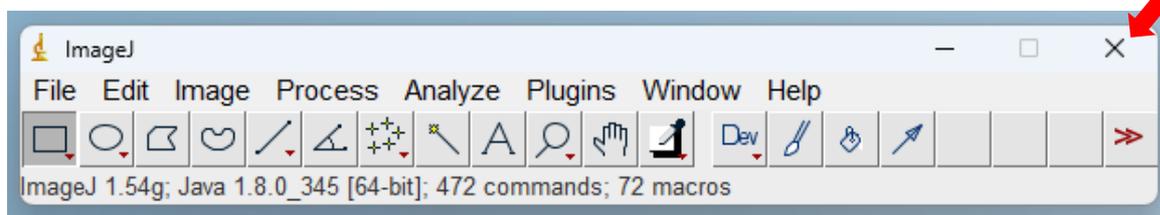
以上で準備①は終了である。

## 準備②

デスクトップ上の ImageJ のアイコンをダブルクリックして ImageJ を起動する。すると、下図のように「Windows セキュリティ」ウィンドウが表示されるので、「許可」を左クリックする。



すると、下図のように ImageJ が起動する。ImageJ を終了する場合は、右上の×マークを左クリックする。



一旦、ImageJ を終了する。以上で準備②は終了である。

## ImageJ と OpenOffice Calc の操作

本問題では生物の顕微鏡画像の解析実験を取り扱う。問題を解き始める前の予備実験として、画像解析ソフトウェア ImageJ と数値解析ソフトウェア OpenOffice Calc の操作に取り組む。以下の手順に従い、①ImageJ による注目領域内の明るさ（平均輝度）の計測、②ImageJ による直線の長さの計測、③OpenOffice Calc による数値データの分析を行いなさい。

### ① ImageJ による注目領域内の明るさ（平均輝度）の計測

まず、デスクトップ上の ImageJ のショートカットをダブルクリックして ImageJ を起動する。次に、ImageJ でサンプル画像 1 (sample1.tif) を開く。ImageJ で画像を開くには、画像ファイルを選択して ImageJ にドラッグアンドドロップすればよい（あるいは、ImageJ-File-Open... で解析対象の画像を選択してもよい）(図 1)。

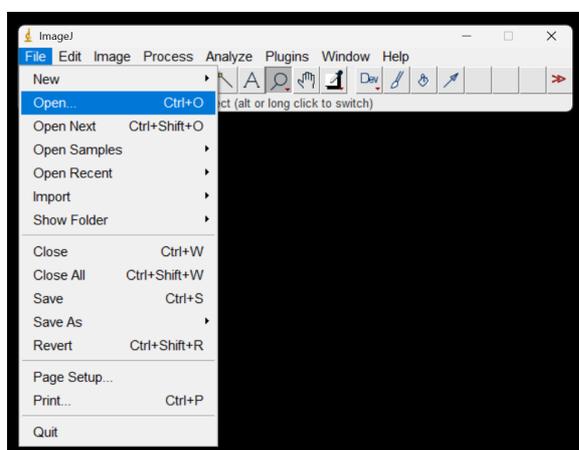


図 1.

サンプル画像 1 は細胞核に局在するヒストンを蛍光標識し、蛍光顕微鏡で撮影したものである。画像には 3 つの細胞核が写っている。画像を開いたら、まずは以降の方法に従って、画像を拡大・縮小したり、コントラストを調節したりして、解析対象の画像を丹念に観察する。

画像の拡大あるいは縮小は ImageJ-Image-Zoom-In [+]もしくは Out [-]で実行できるが、虫眼鏡 (Magnifying Glass) を使うのが便利である。ImageJ の「虫眼鏡」のアイコンを選択しておく、左クリックで拡大、右クリックで縮小できる (図 2, 赤丸)。画像の拡大を続けると、四角い画素 (ピクセル) が見えるようになる (図 2)。このようにすべてのデジタル画像は画素が配列されて構成されており、これらの画素すべてに輝度 (明るさ) の値が割り振られている。画像を拡大し続けると、いま表示されている領域が画像の中のどこか見失う場合がある。そのような場合は、画像を縮小するか、スクロールツール (Scrolling Tool) を使って表示領域を動かすとよい。ImageJ の「手」のアイコンを選択し、左クリックしたままカーソルを動かすと表示領域も動く (図 2, 赤丸)。画像ウィンドウの左上に表示される青枠も表示領域を把握する上で便利である。画像ウィンドウの左上に青枠が表示される場合、画像ウィンドウに画像全体が表示されていない。画像全体を表す青枠の中で現在表示されている領域の位置が青枠あるいは青四角で示されている

(図 2, 赤矢印)。

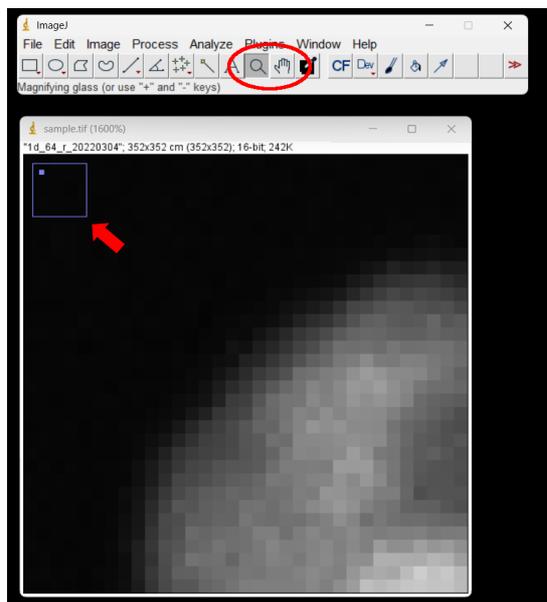


図 2.

コントラスト調節は **Ctrl+Shift+C** (あるいは **ImageJ-Image-Adjust-Brightness/Contrast...**) により実行できる。**B&C** ウィンドウが表示されるので、その中のスクロールバーを動かすことでディスプレイ上の最小輝度 (**Minimum**)、最大輝度 (**Maximum**)、明るさ (**Brightness**)、コントラスト (**Contrast**) を変更することができる (図 3)。例えば、蛍光画像の場合、上から二番目に位置する最大輝度のスライドバー (図 3, 赤矢印) を左側に動かすと表示上の最大輝度の値が低下するため、蛍光標識された構造がより明るく観えるようになる (図 3)。この操作により、例えば背景に隠れていた暗い (輝度の低い) 構造体の存在に気付くこともあるかもしれない。ここで、**B&C** ウィンドウのスライドバー操作では、あくまでディスプレイ表示の明るさを変えているだけで画素が持つ輝度の値は変化していないことに留意したい。すなわち、見た目が変わっているだけで画像ファイルに記録された明るさの情報には一切の変更が加えられていない。

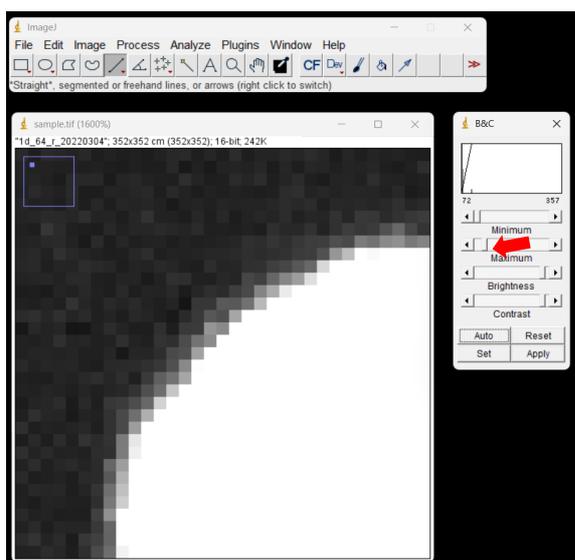


図 3.

次に、注目する領域（ここでは Region of Interest の略で、ROI と呼ぶ）における明るさ（輝度）を計測する。サンプル画像を開いたまま、画像と同様の方法で細胞領域ファイル（sample1.roi）を開く。すると、画像の左上の細胞核が黄色線で囲まれて表示される（図 4）。

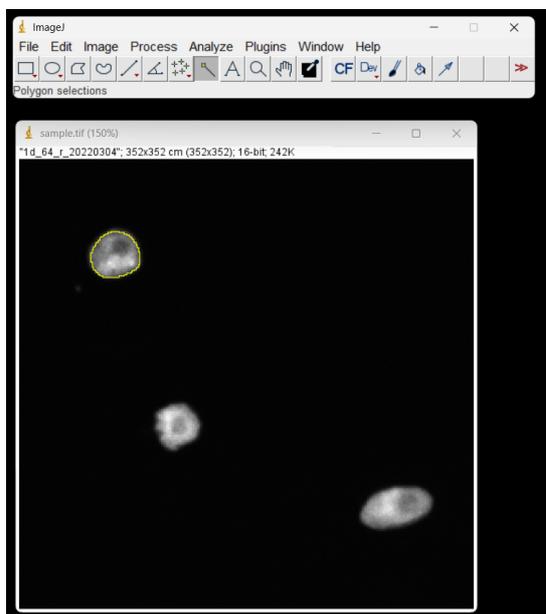


図 4.

ここで、黄色線で囲まれた領域（ROI）における平均輝度を計測する。その準備として、計測項目を設定する必要がある。ImageJ-Analyze-Set Measurements...により、Set Measurements ウィンドウが表示されるので「Mean gray value」のチェックボックスのみにチェックを入れ、「OK」を左クリックする（図 5）。

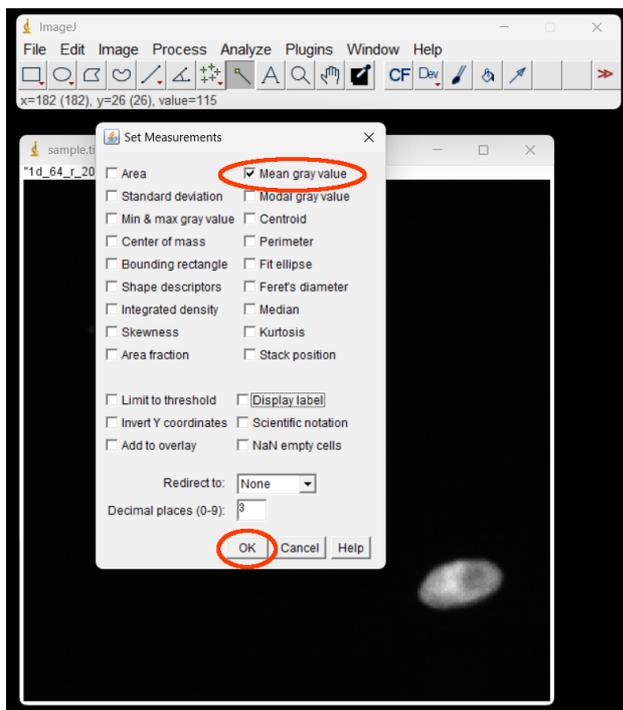


図 5.

これで ROI 内の平均輝度を計測する準備は完了である。ROI 内の平均輝度は、ImageJ-Analyze-Measure（あるいは Ctrl+M）によって計測できる。この操作により Results ウィンドウが表示され、平均輝度の値が表示される。図 6 に示すように、ROI 内の平均輝度は 1443.766 である。

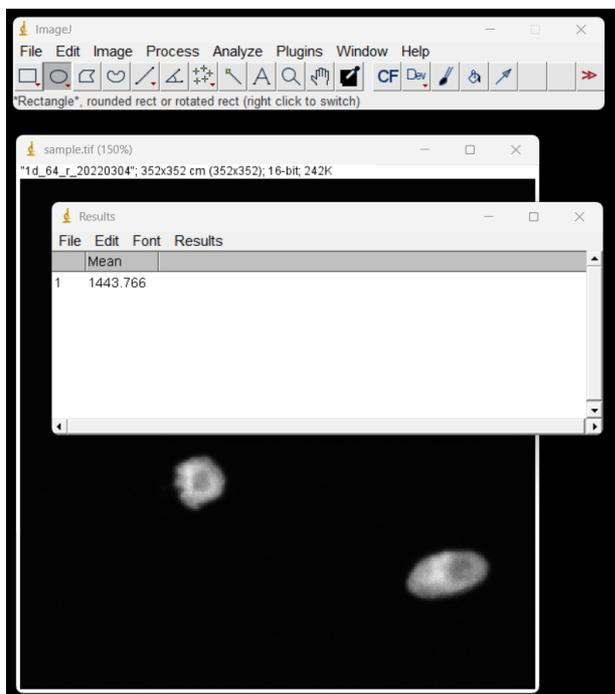


図 6.

次に、同一画像にある複数の ROI 内における平均輝度を計測する。サンプル画像 1 を開いたまま、画像と同様の方法で細胞領域群ファイル (sample1.zip) を開く。すると、ROI Manager と呼ばれるウィンドウが表示され、その中に 3 つの ROI ファイルが登録されていることに気付く (図 7)。ROI Manager に表示される文字列を左クリックすることで、特定の ROI を選択することができる (図 7)。選択された ROI は ROI Manager では青色に、画像では黄色枠として表示される (図 7)。

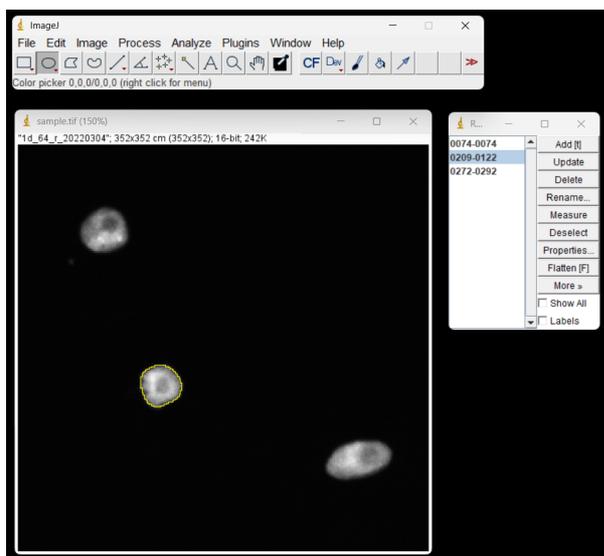


図 7.

次に、計測対象の ROI を選択し、ROI Manager の「Measure」を左クリックする。すると、選択している ROI の平均輝度が Results テーブルに表示される。この例の場合、図 8 に示すように平均輝度は上から 1443.766, 1685.551, 1569.871 であることがわかる。これらの値が出力できれば予備実験①は終了である。

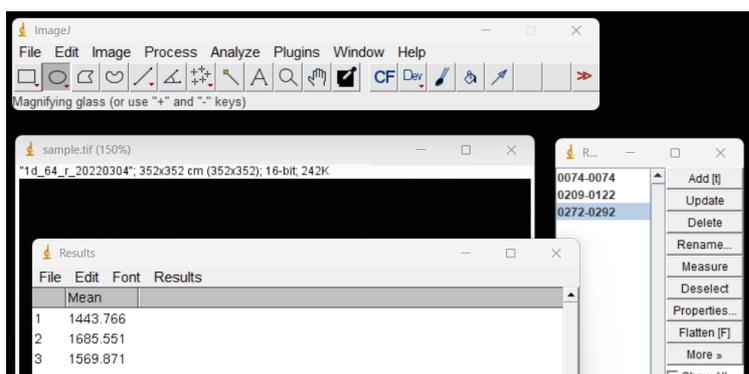


図 8.

## ② ImageJによる直線の長さの計測

既に ImageJ を起動している場合、一度 ImageJ をシャットダウンする。シャットダウンは ImageJ の右上の×マークを左クリックすればよい。再度、ImageJ のショートカットをダブルクリックして ImageJ を再起動する。次に ImageJ でサンプル画像 2 (sample2.tif) を開く。すると、画像の下にスクロールバーがあることに気付く (図 9, 赤矢印)。このサンプル画像 2 は、蛍光標識された微小管の伸長を 100 フレームの動画像として捉えたものである。画像下のスクロールバーを左から右方向に動かすと、画像の右上方向に微小管が伸びていくさまを観察することができる。なお、画像の左上に表示されている数字はフレームの総数と現在表示されているフレーム番号が分数として表示されている。図 9 のように「1/100」と表示されている場合、全 100 フレームの 1 枚目の画像が表示されていることを意味する (図 9, 赤丸)。画像下のスクロールバーを右方向に動かすと、この分数の分子の数が大きくなる。

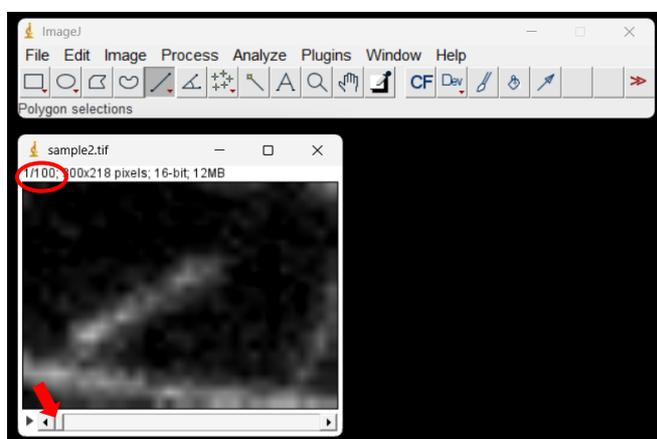


図 9.

ここで、微小管が直線であると仮定し、微小管の長さの時間変化を調べたいとする。その場合、ImageJ の直線ツール (Straight line tool) を用いて、微小管の長さを計測することができる。まず、ImageJ の「直線」のアイコンを左クリックし (図 10, 赤丸)、微小管の端点にカーソルを合わせる。次に、端点上で左クリックしたままもう一つの端点にカーソルを合わせて左クリックを解除する。この操作により、微小管上に直線を引くことができる (図 10)。操作の誤りなどで不正確な直線を引いてしまった場合は、先ほどの操作をやり直せばよい。

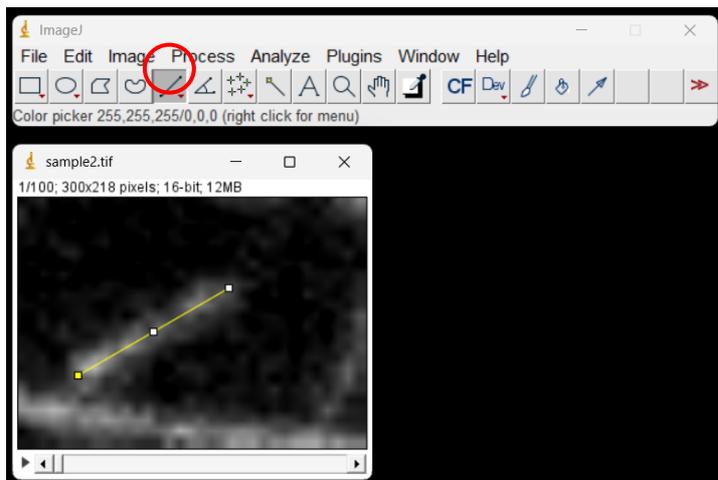


図 10.

満足のいく直線を引いたら、直線の長さを計測できる。ImageJ-Analyze-Measure... (あるいは Ctrl+M) により、Results テーブルが表示される。その中の「Length」に表示される数値が直線の長さである。この操作をフレームごとに行うと、微小管の長さの時間変化のデータを得ることができる。サンプル画像 2 (sample2.tif) の 100 フレームのうち最初の 3 フレームの微小管の長さを計測しなさい。図 11 はその計測結果の例である。値は異なるかもしれないが、図 11 赤丸のように微小管の長さが増加することが確かめられれば、予備実験②は終了である。

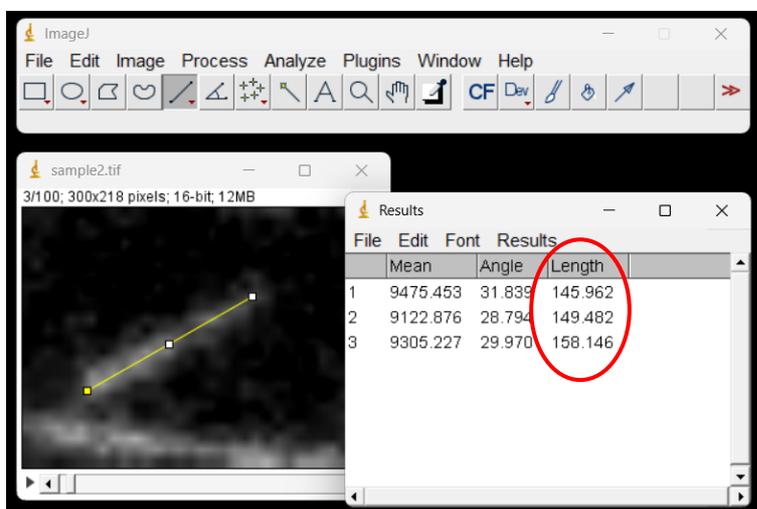


図 11.

### ③ OpenOffice Calc による数値データの分析

sample1.csv は②で計測した微小管の長さの時間変化を記録したデータである。これを OpenOffice Calc で分析する。まず、デスクトップ上の OpenOffice Calc のショートカットをダブルクリックし、OpenOffice Calc を起動する。次に、sample1.csv を OpenOffice Calc で開くため、sample1.csv を OpenOffice Calc にドラッグアンドドロップする (あるいは、ファイル-開く (または Ctrl+O) によ

り sample1.csv を選択する) (図 12)。

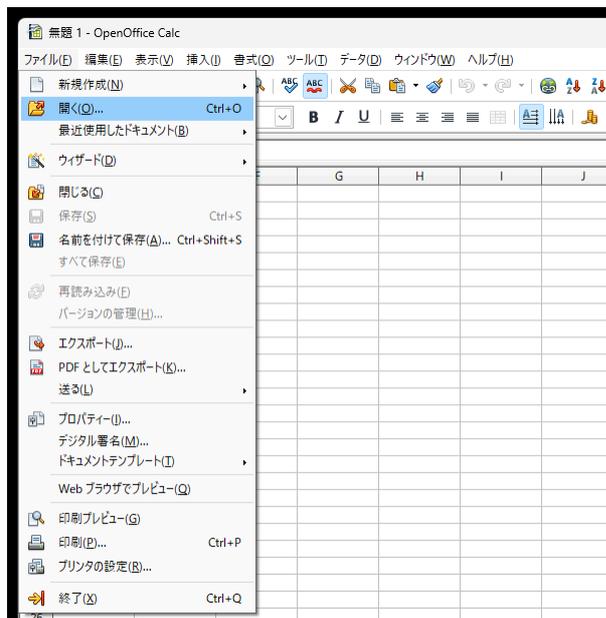


図 12.

すると、「テキストのインポート」ウィンドウが表示されるので、「区切りのオプション」の「区切る」を選択した上で、「コンマ」だけにチェックを入れ、「OK」を左クリックする (図 13)。

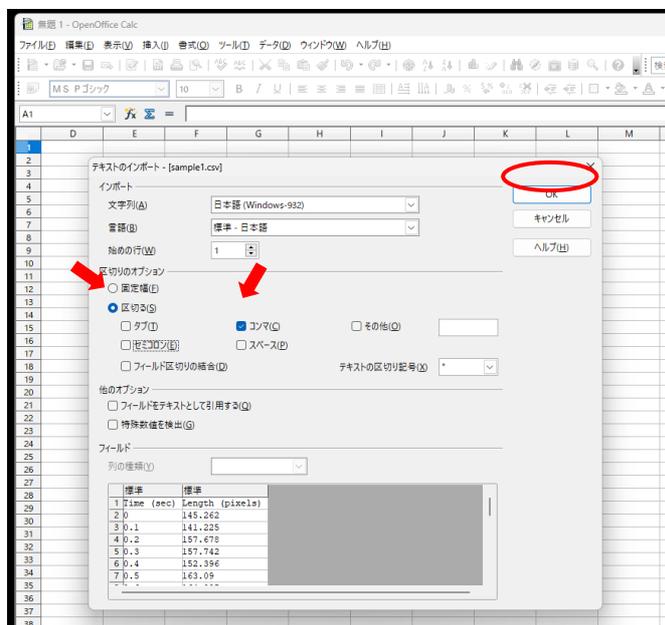


図 13.

ファイルが開いたら、A 列に時間 (Time (sec))、B 列に微小管の長さ (Length (pixels)) の情報が記録されていることを確認する。次に、横軸に時間、縦軸に長さをプロットしたグラフを作成する。まず、挿入-グラフ...を選択する (図 14)。

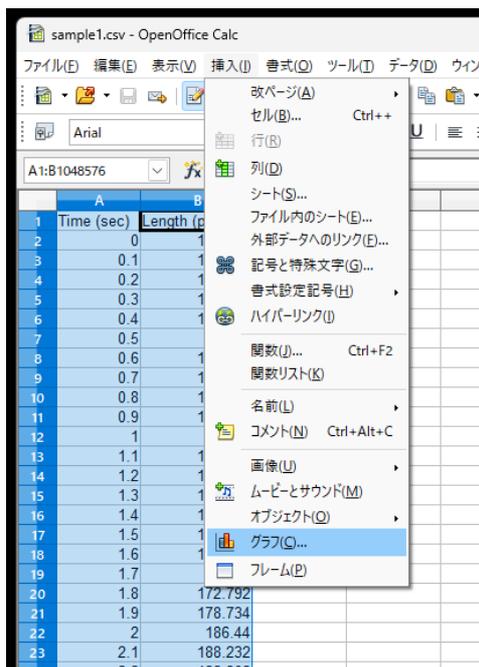


図 14.

すると、「グラフウィザード」の「グラフの種類を選択」の画面が表示されるので、「散布図」を選択し、「完了」を左クリックする（図 15）。これにより、横軸に時間、縦軸に長さをプロットした散布図が得られる。

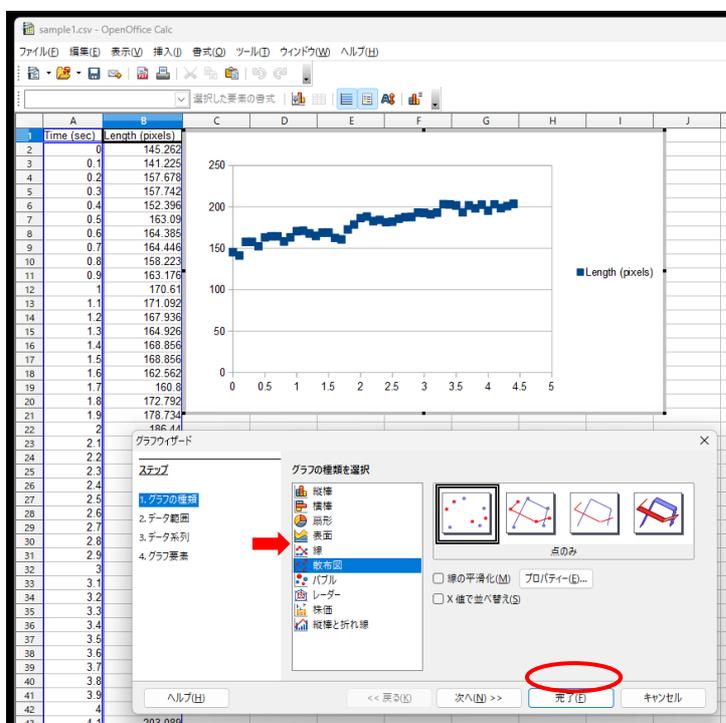


図 15.

次に、各データ点を最小二乗法により近似した回帰直線を作成する。グラフ上の任意のデータ点を右クリックし、表示された「トレンド線（回帰曲線）を挿入」を左クリックする（図 16）。

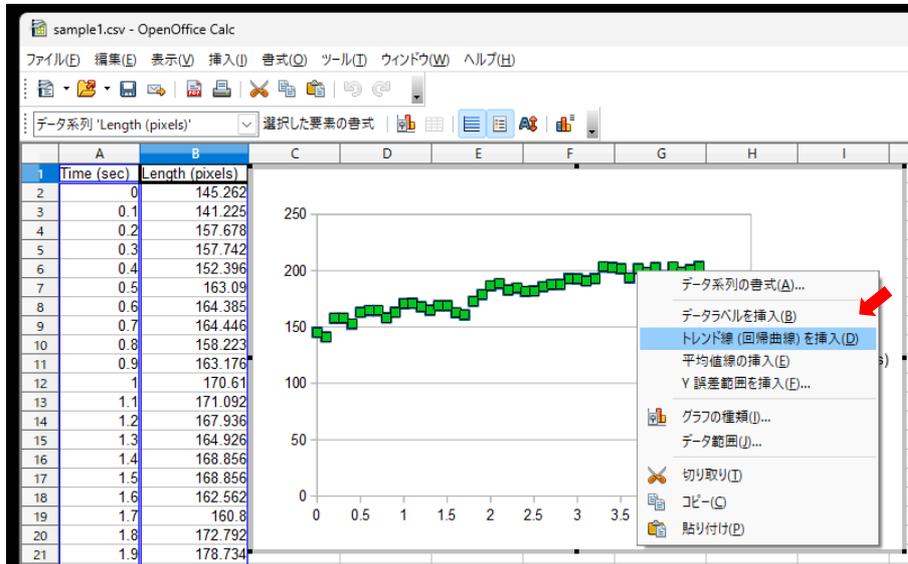


図 16.

すると、「データ系列' Length(pixels) '用トレンド線（回帰曲線）」の「回帰の種類」の画面が表示されるので「線形」を選択し、「等式を表示」にチェックを入れ、「OK」を左クリックする（図 17）。

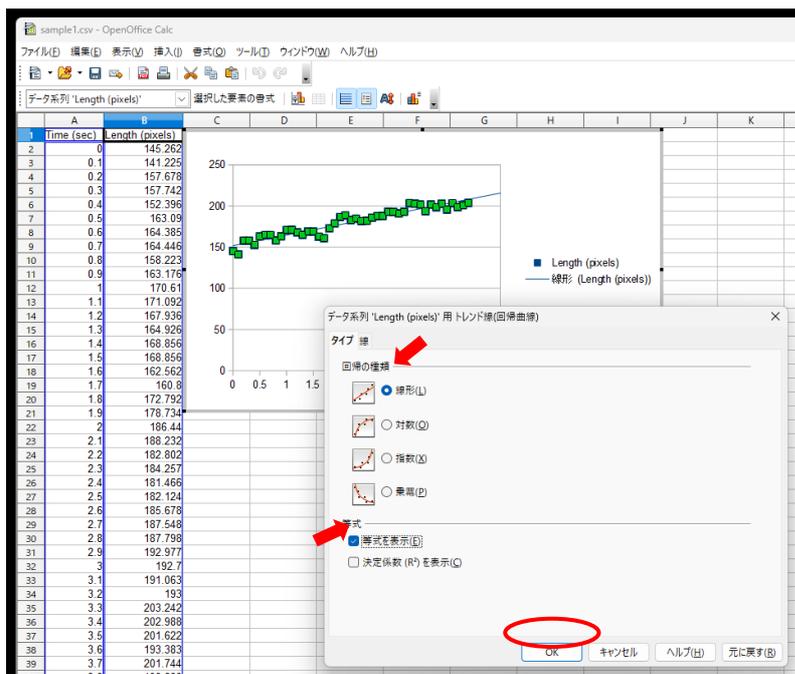


図 17.

すると、回帰直線が描画されるとともに、その数式が表示される（図 18）。この場合、 $f(x) = 12.8x + 152$ （有効数字3桁（四捨五入）で表記した）となった。この結果から、微小管の伸長速度は1秒あたりおよそ12.8画素（ピクセル）であることが読み取れる。上記の回帰式が出力できれば、予備実験③は終了である。

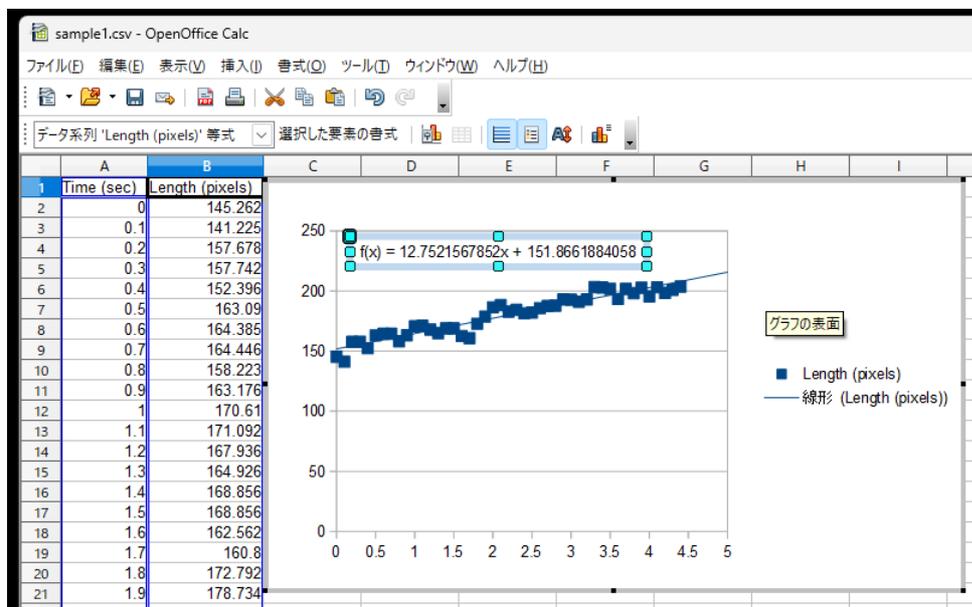


図 18.

以上で、予備実験はすべて完了です。

次頁以降は問題用紙のため、解答はじめの合図があるまで  
めくってはけません

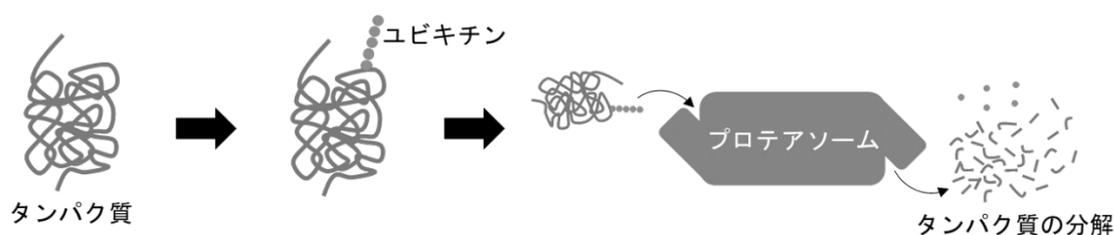
解答開始の合図の後、すべての解答用紙に本選受験番号と氏名を記入してください。

本試験に必要なファイルは予備実験で作成した「test」フォルダーの「test.zip」の中にすべて格納されています。解答開始の合図の後、監督者が直ちにパスワードを示しますので、予備実験と同様の方法でこれらのファイルを使用できる状態にして解答してください。

## 問題

下記の文章を読み、設問に答えなさい。

細胞内では常にタンパク質が作られ、壊されている。タンパク質は細胞の構造や機能に必要不可欠だが、古くなったり、間違っ作られたりしたタンパク質は細胞に害を及ぼすことがある。そのため、細胞には不要なタンパク質を取り除く機構が備わっている。タンパク質の分解機構のひとつに、ユビキチン-プロテアソーム系と呼ばれるものがある（下図参照）。ユビキチンとは小さなタンパク質のことで、分解されるべきタンパク質に「タグ付け」される。この「タグ付け」の過程はユビキチン化と呼ばれ、このタグはプロテアソームというタンパク質複合体によって分解されるための目印となる。ユビキチン化されたタンパク質がプロテアソームの内部に送られるとタンパク質は小さな断片に分解される。



プロテアソームの機能は、細胞の健康と正常な機能を維持する上で非常に重要である。プロテアソームの異常は、さまざまな病気、特に神経変性疾患やがんといった病状と関連がある。一方で、がん細胞のプロテアソームの機能を阻害する化合物は、不要になったタンパク質を細胞内へ蓄積させる作用によりがん細胞の自滅（アポトーシス）を誘導する抗がん効果を持つ分子標的薬として利用できる可能性がある。代表的なプロテアソームの阻害剤として MG-132 という化合物がある。

一方、細胞内のタンパク質や構造体を顕微鏡で観察するために緑色蛍光タンパク質（GFP）がよく用いられる。GFP はオワンクラゲから単離されたタンパク質で、青色の光を受けると緑色の光を放つという蛍光物質としての性質を持つ。蛍光顕微鏡と呼ばれる顕微鏡によって、細胞内で GFP が放つ緑色の光を撮影することができる。さらに、特定のタンパク質をコードする遺伝子と GFP 遺伝子を繋げた遺伝子を細胞に導入し、この遺伝子組換え細胞を撮影した蛍光顕微鏡画像を分析することで、特定のタンパク質の細胞内での量や分布に関する情報を得ることができる。この技術によって細胞内におけるタンパク質や構造体に関する知見は劇的に深まった。

プロテアソームの機能を阻害する化合物の活性を評価するために、ユビキチン化緑色蛍光タンパク質（Ub-GFP）が開発された。これはユビキチン遺伝子と GFP 遺伝子を繋げた遺伝子によってコードされるタンパク質である。Ub-GFP は通常の条件ではプロテアソームによって分解されてしまうが、プロテアソーム阻害剤の存在下では細胞内に残存することが期待される。すなわち、細胞内の Ub-GFP の量によってプロテアソーム阻害剤の活性の強さを評価することができる。

### 問題 1-1.

蛍光顕微鏡により撮影された細胞領域における Ub-GFP の明るさ（平均輝度）は細胞内の Ub-GFP 量と正比例の関係にあると仮定する。細胞 A（画像ファイル 1-1A.tif、細胞領域ファイル 1-1A.roi）と細胞 B（画像ファイル 1-1B.tif、細胞領域ファイル 1-1B.roi）は、MG-132 をそれぞれ異なる濃度で処理したヒト由来培養細胞における Ub-GFP の蛍光顕微鏡画像である。細胞 A および細胞 B の Ub-GFP の平均輝度を答えなさい。ただし、小数点第一位は四捨五入せよ。

### 問題 1-2.

細胞 A は 240 nmol/L の MG-132 で処理されたものである。また、MG-132 の処理濃度と細胞 A, B における Ub-GFP の分解阻害活性は正比例の関係にあると仮定する。このとき、細胞 B における MG-132 の処理濃度を答えなさい。ただし、単位は「nmol/L」とし、小数点第一位を四捨五入せよ。

### 問題 2-1.

細胞群 C（画像ファイル 2-1C.tif、細胞領域ファイル 2-1C.zip）、細胞群 D（画像ファイル 2-1D.tif、細胞領域ファイル 2-1D.zip）、細胞群 E（画像ファイル 2-1E.tif、細胞領域ファイル 2-1E.zip）は、十分な濃度の MG-132 処理によって Ub-GFP の分解を完全に抑えられていた細胞を培地の洗浄によって MG-132 を除去した後、直ちにそれぞれ 500 nmol/L、250 nmol/L、0 nmol/L（無処理）の MG-132 処理を施したものである。MG-132 の濃度を変えた時点から、80、120、210、240 分後の細胞を撮影したものが、画像ファイルでは左から順に並んでいる。細胞群 C、D、E における、80、120、210、240 分後の細胞における Ub-GFP 蛍光の平均輝度を答えなさい。ただし、小数点第一位は四捨五入せよ。

### 問題 2-2.

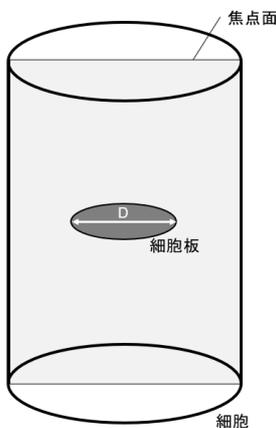
細胞群 C、D、E の分析結果に基づき、(1) 500 nmol/L MG-132 処理、(2) 250 nmol/L MG-132 処理、(3) MG-132 無処理の細胞における Ub-GFP の分解速度を答えなさい。ただし、Ub-GFP の分解速度は Ub-GFP 蛍光の平均輝度の減少を最小二乗法で近似した回帰直線の傾きとし、その単位は 1 分間における Ub-GFP の輝度の減少量をあらわす「min<sup>-1</sup>」とする。また、求める分解速度は正の値を取るものとし、小数点第二位を四捨五入せよ。

### 問題 2-3.

細胞群 C、D、E における Ub-GFP の分解速度の分析結果から、プロテアソームの活性を半分に抑えるために必要な MG-132 の濃度を答えなさい。ただし、単位を「nmol/L」とし、小数点第一位を四捨五入せよ。

### 問題 3-1.

微小管の構成タンパク質であるチューブリンの遺伝子と GFP の遺伝子をつないだ遺伝子を細胞に導入することで、細胞質分裂における微小管の様子を蛍光顕微鏡で観察することができる。また、蛍光色素により細胞板を蛍光染色することもできる。動画ファイル 3-1F.tif は、植物の細胞 F の細胞質分裂を 30 秒間隔で撮影した動画である。画像の左上には撮影開始後の時間が記録されている。ここでは GFP で標識された微小管と蛍光色素で染色された細胞板（その他の生体膜の非特異的染色もある）がそれぞれ黄色とマゼンタで表示されている。下図のように、細胞 F の形は円柱であり、細胞板は細胞 F 内部の円板と仮定する。さらに、細胞板の向きは細胞 F の円柱の底面と平行な向きを持ち、細胞板の中心は細胞の中心に位置すると仮定する。なお、動画ファイル 3-1F.tif は下図の焦点面における断層像である。



ここで、細胞板の直径を  $D$ 、時間を  $T$  とする。動画ファイル 3-1F.tif を観察、分析し、細胞板が出現して細胞質分裂が完了するまでの期間における  $D$  の時間変化を示す式として最も妥当なものを下記の中からひとつ選びなさい。

- ①  $D = aT$
- ②  $D = aT^2$
- ③  $D = a\sqrt{T}$
- ④  $D = ae^T$

### 問題 3-2.

細胞 F の細胞板の面積増加速度について、最も適切なものを下記の中からひとつ選びなさい。

- ① 細胞質分裂の進行に伴って細胞板の面積増加速度は増加する。
- ② 細胞質分裂期を通して細胞板の面積増加速度は一定である。
- ③ 細胞質分裂の進行に伴って細胞板の面積増加速度は減少する。
- ④ 細胞板の面積増加速度に目立った規則性はない。

**問題 3-3.**

細胞 F の動画像から細胞質分裂の進行に伴って微小管の分布が変化したことがわかる。植物の細胞質分裂における微小管の役割について説明し、細胞 F で観察された微小管の分布の変化から細胞板に関してどのようなことが考察されるか、120 字以内で記述せよ。

**問題 3-4.**

画像ファイル 3-3.G.tif (細胞 G) と 3-3.H.tif (細胞 H) は GFP とチューブリンの融合タンパク質を発現する植物細胞の蛍光顕微鏡画像である。なお、これらは動画像ファイル 3-1F.tif のような断層像ではなく、細胞全体のシグナルを重ね合わせて表示したものである。細胞 G は通常の細胞質分裂完了直後、細胞 H はプロテアソーム阻害剤 MG-132 を処理した細胞の細胞質分裂完了直後である。両者の違いを説明し、その観察結果から考察されることを 120 字以内で記述せよ。

以上で問題は終了です

## 諸注意

- これから日本生物学オリンピック本戦 2024 熊本大会の大問 2 を始めます。
- まず、試験に関する一般的な注意事項を説明します。
- 次に、コンピュータ端末を用いた予備実験を行います。
- 予備実験の終了後に、大問 2 を解答してもらいます。解答時間は 60 分です。
  
- それでは、一般的な注意事項を説明します。
- 机には問題冊子 1 部（本冊子）と解答用紙 2 部が配布されています。これらを確認し、不足がある場合は監督者が行くまで挙手をしてください。
- 試験中にコンピュータ端末で使用可能なソフトウェアは、予備実験で使用方法を説明する ImageJ と OpenOffice Calc のみです。インターネットを利用する Web ブラウザなど他のソフトウェアは使用してはいけません。試験中にこれらを使用した場合は不正行為となることがあります。
- 監督者からは各選手のディスプレイをリアルタイムで確認・記録できます。不正行為とみなされる行為が認められた場合は、厳正に対処します。
- 指示があるまでこのページの内容をよく読んでください。予備実験開始および試験開始の合図があるまで机の上の機材には触れないようにしてください。
- 解答開始の合図の後、すべての解答用紙に本選受験番号と氏名を記入してください。
- 試験の途中で体調が悪くなった場合、トイレに行きたい場合、水分補給をしたい場合、その他やむを得ず途中退室を希望する場合は挙手をして試験監督に知らせてください。
- 万が一、試験中にコンピュータ端末に不具合があった場合には挙手してください。
- 不具合に備えて、解答などのメモを問題冊子にこまめに取りるようにしてください。
- 試験終了後、問題冊子は持ち帰ってください。
- 最初に問題冊子のすべてのページに目を通してから、解答をはじめてください。
- 机の上には既に準備されているもののほかに、ペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ、目薬以外のものは置かないでください。
  
- ここまでで質問はありますか。質問がある方は挙手をして、試験監督がいくまで手を上げ続けてください。
  
- それでは、本冊子を用いて、コンピュータ端末を用いた予備実験を行います。机の中央にあるディスプレイあるいは前方のスクリーンを見ながら予備実験に取り組んでください。机の中央のディスプレイが見づらい場合は目隠しを多少動かしても構いません。
- 予備実験の最中、監督者の指示があるまでページをめくってはいけません。