

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば



実験試験 1 分子生物学

制限時間 90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。

[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

大腸菌を用いた遺伝子クローニングでは、プラスミドとよばれる比較的小さな環状 DNA に目的の遺伝子配列を連結します。目的遺伝子が組込まれたプラスミド DNA は大腸菌細胞内で複製されるので、そのプラスミド DNA をもつ大腸菌自体を培養し、細胞からプラスミド DNA とともに目的遺伝子を大量に精製することができます。クローニングされた遺伝子は、塩基配列の決定や人工的な改変、さらにはコードするタンパク質の大腸菌内での合成など、現代の生物学でおこなわれる数多くの実験の出発材料となります。ただし、プラスミド DNA と目的遺伝子がどのように連結されているかを把握しておくことは、組換えプラスミドを材料として用いるその後の実験を行う上で重要です。この実験試験ではプラスミド DNA を対象とした解析を通じて、遺伝子クローニングについて理解を深めてもらいます。

サンプルと器具

以下のサンプルと器具がそろっていることを確認しなさい。

サンプルと試薬

プラスチックのチューブ立てに以下のサンプルがそろっていることを確認しなさい。

- ☐ ラベルのされていない空の 1.5 mL マイクロチューブ : 4 本
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ① (制限酵素 *Sac*II、3 μ L) 1 本
氷の入ったアイスボックス中で保存
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ② (制限酵素 *Sac*II 用の緩衝液 (10 倍濃縮されたもの)、4 μ L) 1 本
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ③ (プラスミド DNA 溶液、8 μ L) 1 本
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ④ (滅菌蒸留水、20 μ L) 1 本
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ⑤ (アガロースゲル電気泳動用の青色の色素液、7 μ L) 1 本
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ⑥ (アガロースゲル電気泳動用 DNA サイズマーカー、7 μ L) 1 本

チューブ⑤と⑥の内容物はともに青色なので、混同しないように注意してください。

器具

- ☐ マイクロピペット (P-20) 1 本
- ☐ ピペットチップ (P20 用、黄色) 1 箱
- ☐ 電気泳動槽 1 式 (泳動用バッファーとアガロースゲルがセットされている)
- ☐ ストップウォッチ 1 個
- ☐ 画用紙 3 枚 (白、赤、青各 1 枚)

机の上においてあるキムワイプ、キムタオル、洗ビン (蒸留水) 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 つはピペットチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

配布物から利用するもの

- ☐ 油性マジックペン 1 本
- ☐ 実験用手袋 (予備体験時にサイズを確認したもの)

注意

- ・ 問題は3問で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。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

- ・ 適切な実験操作で制限酵素 *Sac*II によるプラスミド DNA の切断を行うことができたか。
- ・ 電気泳動の結果から、外来 DNA の挿入パターンを正しく推測することができたか。
- ・ ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の原理を理解し、それを応用することができたか。
- ・ 自分の考えを論理的に説明することができたか。

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

始めの合図の後、すべての解答用紙に

受験番号と名前を記入してください。

ある目的遺伝子を大量に入手するため、以下の遺伝子クローニングを行った。以下の問題文では実験の対象となる目的遺伝子を、もともとプラスミドに存在しないことから「外来 DNA」と記述する。

- ステップ 1 大腸菌細胞内で複製されるプラスミドを用意した (図 1A)。このプラスミドには、抗生物質の一種であるアンピシリンに対する耐性遺伝子がふくまれる。またアンピシリン耐性遺伝子とは異なる部分には、制限酵素 *EcoRI* が二本鎖 DNA を認識し切断する塩基配列がある (図 1B)。
- ステップ 2 プラスミド DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断し、直鎖状にした。
- ステップ 3 外来 DNA (図 2) の両端も *EcoRI* で切断した。
- ステップ 4 *EcoRI* で切断したプラスミド DNA と外来 DNA を混ぜ合わせ、DNA リガーゼをもちいて連結した。この反応をライゲーションと呼ぶ。ライゲーション反応により、直鎖状だったプラスミド DNA は再環状化される。
- ステップ 5 ライゲーション反応後のプラスミドを大腸菌に導入することにより形質転換した。
- ステップ 6 形質転換した大腸菌を、アンピシリンとともに X-gal (β -ガラクトシダーゼにより分解されると青色を呈す化学物質) をふくむ寒天培地上で培養した。使用したプラスミドでは、外来 DNA を挿入した *EcoRI* 認識部位が β -ガラクトシダーゼ遺伝子内部に存在する。このため、外来 DNA が挿入されずプラスミド DNA が環状化 (自己環状化) した場合、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子は復元される。一方、外来 DNA が挿入され環状化したプラスミド DNA では、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子は破壊される。従って、自己環状化したプラスミドをもつ大腸菌では β -ガラクトシダーゼ活性により X-gal が分解され、コロニーは青色になる。一方、外来 DNA が挿入されたプラスミドをもつ大腸菌では β -ガラクトシダーゼ活性がないため、コロニーは白色となる。
- ステップ 7 X-gal をふくむ寒天培地上の白い大腸菌コロニーを大量に培養し、外来 DNA をふくむプラスミド DNA を回収した。

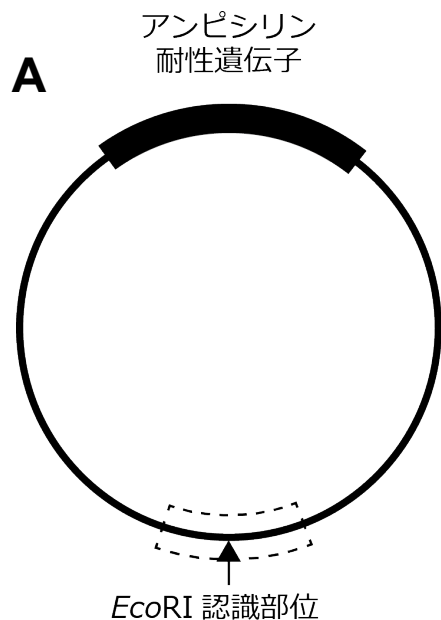


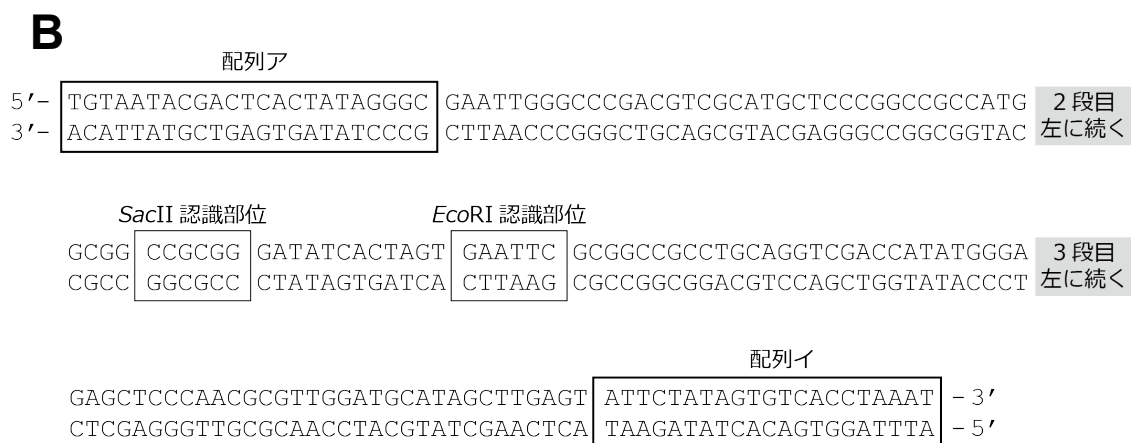
図 1. 実験に使用したプラスミド DNA

(A) プラスミド DNA の概要

このプラスミド DNA の長さは約 3,000 塩基対である。図中の黒い四角はアンピシリン耐性遺伝子を、矢印は大まかな *EcoRI* 認識配列の位置を、点線はクローニング部位周辺を示している。

(B) 図 1A 中の点線で囲ったクローニング部位周辺の塩基配列

EcoRI が認識する塩基配列を実線で囲った。なお、図中には後に登場する「*SacII* 認識部位」および「配列ア」と「配列イ」も示してある



配列ウ

```

[1]  5'-GAATTCCGAGTAGCCCCATTCGTTGTCATACCACGTCAGGATACGAACCA [50]
[51]  TGTTCCCGTCCATGACCTTGGTCTGGTCGGTCGCAAAGATCGAGCTGTGC [100]
[101] GGATCGTGGTTGAAATCCATTGAGACCAGCTTGCGGTCCGTCACGCCCAG [150]
[151] AATGCCCTTGAGAGGGCCAGAGGCTGCGGCCGCGTGGATGGCTGCGTTGA [200]
[201] TTTCTTCGACGGTGGTGTGCGGGTTGGCTTCGAACGTCAGGTCGACAACC [250]
[251] GATACATTCGGTGTGCGAACCCGGATCGCAACACCGTCCAGCTTGCCATT [300]
[301] GAGTTCTGGCAGCACCAGACCAACAGCTTTGGCCGCACCCGTTGACGTGG [350]
[351] GGATCATCGACATCGCGGCGGCACGAGCGCGGTACAGGTCCTTGTGCATG [400]
[401] GTGTCGAGCGTCGGCTGGTCACCGGTATAGCTGTGCACGGTTGTCATGAA [450]
[451] TCCACGTTTGATACCCACGGCGTCGTTTCAGAACTTTTGCGACCGGCGAAA [500]
[501] GACAGTTGGTGGTGCACGATGCATTGGAGACGACCGTGTGGTCAGAGGTC [550]
[551] AGCACGCCCATCGTTGACGCCAAATACGATCGTTGCGTCAGCGTCCTTGCC [600]
[601] AGGGGCCGAGATCAGAACGCGCTTGGAGCCATTGTCCAGATGCGCCTGGC [650]
[651] AGGCTTCCTTAGACGTAAAGATACCGGTGCACTCCATGACAACATCCACA [700]
[701] TCCGACCAAGGCAGGTCGGCTGGGTTGCGGATGGCGGTGACGCGGATCGG [750]
[751] GCCGCGGCAACGTCAATGCTGTCATCCGTATGGCTGACCTCGACCGGAAA [800]
[801] GCGCCCATGGACCGAGTCGAACTGCAGCAGGTGTGCATTTGTTTCGACGG [850]
[851] GGCCAAGATCGTTGATCGCGACAACCTCCAGATCGGTCCGACCGGACTCG [900]
[901] ATAATGGCACGCAGAACATTGCGCCCGATGCGGCCGAACCCATTGATACC [950]
[951] GACCTTGGGAATTC -3' [1000]

```

配列エ

図 2. 実験に使用した外来 DNA の塩基配列

この外来 DNA の長さは 964 塩基対である。この DNA は二本鎖 DNA であるが、図中では便宜上片方の DNA 鎖のみを示した。図中の下線は *EcoRI* が認識する配列を示している。なお、図中には後に登場する「配列ウ」と「配列エ」も示してある。

問題 1.

外来 DNA が挿入されているプラスミドをもつ大腸菌のコロニーと自己環状化したプラスミドをもつ大腸菌コロニーを寒天培地上で判別するにあたり、 β -ガラクトシダーゼ活性の有無とは異なる方法を開発したい。この場合、どのような遺伝子の内部に外来 DNA の挿入部位を設定すればよいか考え、寒天培地上での判別基準を記せ。ただしプラスミドの別領域にはアンピシリン耐性遺伝子がコードされているとする。

問題 2.

マイクロチューブ③中の組み換えプラスミド DNA は、図 2 で示した外来 DNA を図 1 A で示したプラスミド DNA に組み込んだものである。この組換えプラスミド DNA では、外来 DNA の向きは以下の 2 パターン考えられる (図 3)。

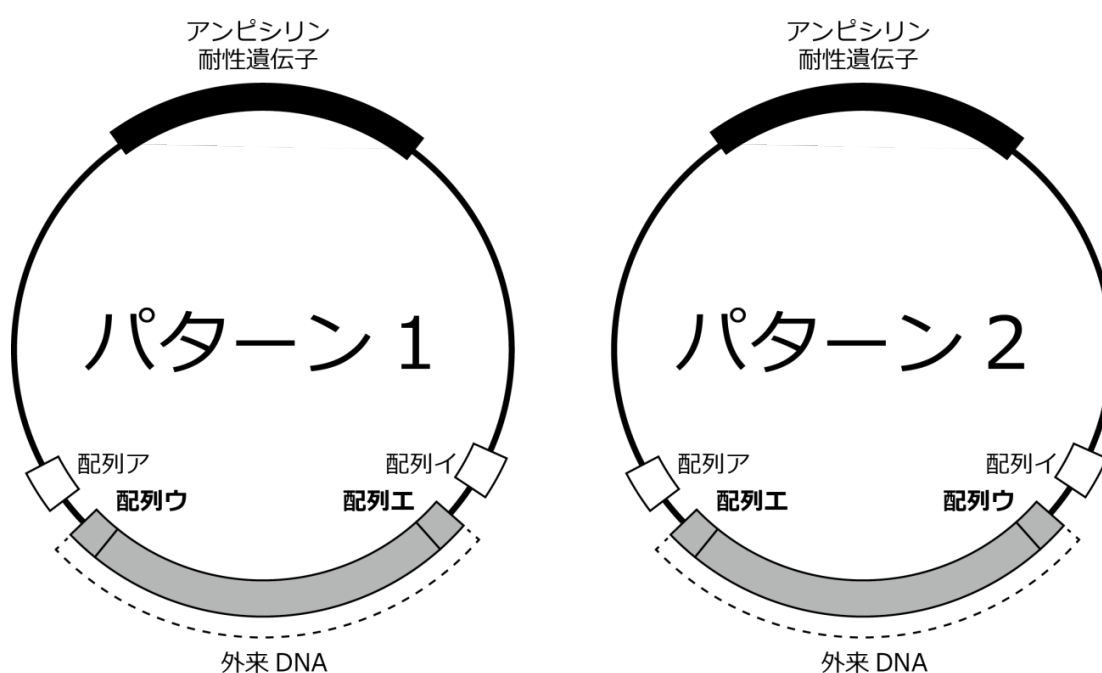


図 3. 組換えプラスミド DNA の概要

配列アとイは、図 1B に示したプラスミド DNA 上の配列である。配列ウとエは、図 2 に示したクローニングした外来 DNA の末端の配列である。

プラスミド DNA 中には制限酵素 *Sac*II が認識し二本鎖 DNA を切断する塩基配列が 1 ヶ所だけあり、図 1B 中に「*Sac*II 認識配列」として示した。また、図 2 に示した外来 DNA 配列中にも *Sac*II 認識塩基配列は 1 ヶ所だけ存在する。以下に記述する実験手順に沿って、配布した組換えプラスミド DNA を *Sac*II で切断し、その DNA 断片をアガロース電気泳動せよ。電気泳動後、検出された DNA 断片の長さから、外来 DNA が図 3 のどちらのパターンでプラスミド DNA にクローニングされているか判定し、その根拠とともに記せ。

実験手順

1. 空のマイクロチューブのふたにマーカーで自分の受験番号を記入する。また、3 枚の色画用紙にも自分の受験番号を記入する。受験番号は他人が読むことができるように丁寧に書くこと。
2. 自分の番号を書いたマイクロチューブの中に制限酵素反応液を調製する。
制限酵素 *Sac*II2 μ L (マイクロチューブ①)
*Sac*II 用の緩衝液 (10 倍濃縮されたもの)2 μ L (マイクロチューブ②)
プラスミド DNA 溶液6 μ L (マイクロチューブ③)
滅菌蒸留水10 μ L (マイクロチューブ④)
※合計は 20 μ L となるはずである。マイクロチューブを落とすなどし、反応液がチューブ内に散らばってしまった場合、すぐに手を挙げて TA を呼ぶこと。
3. 制限酵素反応液をピペットチップの先で軽く混ぜる。
4. 白い画用紙を掲げて TA に制限酵素反応液を回収してもらう (画用紙も TA が回収する)。回収された反応液は TA が 37℃で保温する。
5. 回収時を 0 分として、20 分計測する。
6. 20 分後、赤い画用紙を TA に掲げて、自分の制限酵素反応液を回収する (画用紙は TA が回収する)。
7. マイクロチューブ⑤に入ったアガロースゲル電気泳動用の青色の色素液 5 μ L を、制限酵素反応液の入ったマイクロチューブに加え、ピペットチップの先でよく混ぜる。
8. 手袋を着用する。前ステップで作成した色素液を混ぜた制限酵素反応液 20 μ L を、電気泳動槽にセットされたアガロースゲルの左から 3 番目の穴に流し込む。
9. アガロースゲルの左から 2 番目の穴に、マイクロチューブ⑥に入った DNA サイズマーカー 5 μ L を流し込む。
10. 電気泳動槽のふたを閉めた後電源を入れ、100 ボルトで 25 分間電気泳動する (電気泳動を開始した時点で手袋を外してよい)。泳動時間の計測と電気泳動の停止は自分で行うこと。

11. 25 分間の電気泳動を終えたら、青い画用紙を掲げて TA から電気泳動結果の写真
をもらうこと（画用紙は TA が回収する）。この電気泳動結果に基づき、問題 2 を
解答すること。アガロースゲルはそのまま電気泳動槽中に入れたままでよい。試験
終了後、ゲルは回収し写真撮影を行い、その結果は評価対象とする。

問題 3.

挿入された外来 DNA の向きは、PCR を用いた方法でも判定可能である。プラスミ
ド DNA 上の配列アとイ（図 1B 参照）、外来 DNA の配列ウとエ（図 2 参照）をもとに
ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に用いる DNA プライマー A、B、C、D を作成した。そ
の配列は以下のとおりである。

プライマー A：配列アをもとにしたプライマー
5'-TGTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

プライマー B：配列イをもとにしたプライマー
5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3'

プライマー C：配列ウをもとにしたプライマー
5'-CGAGTAGCCCCATTCGTTGTCATAC-3'

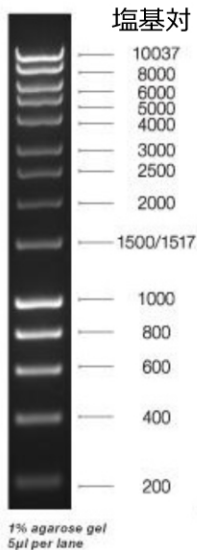
プライマー D：配列エをもとにしたプライマー
5'-CCAAGGTCGGTATCAATGGGTTCGG-3'

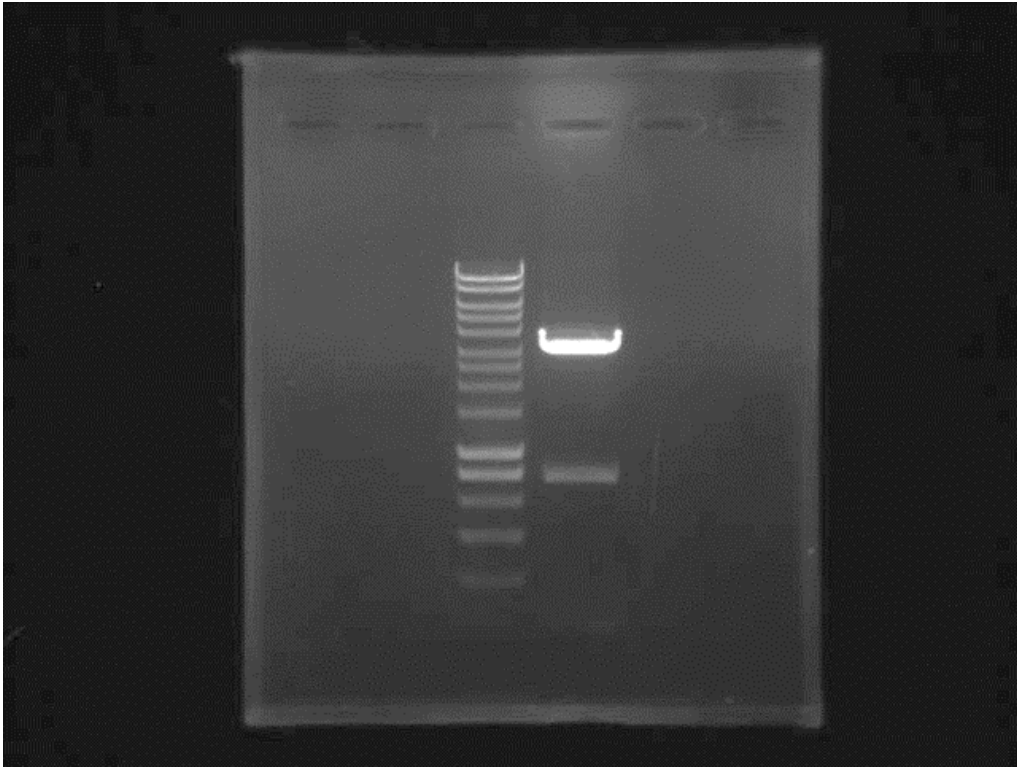
上記プライマーを組合せた PCR 実験により、プラスミド DNA にクローニングされた
外来 DNA の向きが図 3 のパターン 1 かパターン 2 かを予想することが可能である。そ
の予想のためには、どのようなプライマーの組合せで PCR 実験を行うことが必要か。
対照実験を含む実験計画を考え、予想される結果とともに記せ。ただし、実験で必ずし
もプライマー全部を使う必要はない。

注意

電気泳動結果の写真では、
左：DNAサイズマーカー
右：制限酵素反応液

DNAサイズ
マーカー →





典型的な泳動結果

実験試験 1 : 分子生物学

解答用紙 I

受験番号

氏名

問題 1

解答用紙 II

受験番号

氏名

問題 2

受験番号

氏名

問題 3

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば



実験試験 2 発生生物学

制限時間 90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。

[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

我々日本人にとって、ウニは磯遊びの時に簡単に触れることのできる動物として、また、寿司ネタなどの食材として、非常になじみの深い生き物です。一方、学問の世界において、ウニは細胞生物学や発生生物学のモデル生物として古くから世界中の研究者の間で利用されてきました。研究者が研究材料として主に利用するのは直径 100 μm 程の卵や胚で、顕微鏡下で観察し、その形や細胞の状態を実験ごと詳細に記載することで、様々な生命原理の発見につながってきました。ウニを含む海産無脊椎動物の中には、成体になる前の発生期に海中でプランクトン生活を送っているものが多数います。実際に海に行ってプランクトンネットを用いて採集することで、数えきれない種類のプランクトンを目にすることができますが、その中で様々なステージのウニの胚を目にすることができます。今回の実験試験では、“見る”学問であり、かつ“見せる”学問である生物学の基本ともいえる、顕微鏡による観察とスケッチを通じて、皆さん自身が目にした生物の特徴を、どのようにとらえ、表現すべきかについて考えていただきます。

サンプルと器具類

以下のサンプルと器具がそろっていることを確認しなさい。

サンプルと試薬

- ☐ ウニの胚が入ったマイクロチューブ A 1本
- ☐ ウニの胚が入ったマイクロチューブ B 1本
- ☐ ウニの胚が入ったマイクロチューブ C 1本
- ☐ 洗ビン（蒸留水） 1本

器具

- ☐ 正立顕微鏡 1台
- ☐ マイクロピペット（P20） 1本
- ☐ ピペットチップ（P20用、黄色）1箱
- ☐ パスツールピペットセット 1セット
- ☐ スライドガラス 1箱
- ☐ カバーガラス 1箱
- ☐ セロハンテープ 1個
- ☐ ビニールテープ 1個
- ☐ ハサミ 1個
- ☐ ケント紙 5枚

机の上においてあるキムワイプ、キムタオル、洗ビン（蒸留水）は自由に使えます。

3つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使用してください。紙・プラスチック用、ガラス用、液体用です。ゴミの分別は確実に行ってください。

配布物から利用するもの

鉛筆、鉛筆削り、消しゴム、油性マジックを出して、机の上においてください。

注意

- ・ 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りしたら速やかに申し出てください。
- ・ 100倍のレンズは使用しないでください。
- ・ スライドガラス、カバーガラスは足りなくなったら挙手をして合図してください。
- ・ ガラスを割った場合は挙手をして合図してください。
- ・ プレパラートはそのままガラスゴミ用のプラスチックビーカーに廃棄してください。カバーガラスをスライドガラスから外す必要はありません。

- ・ 問題は問題 1 から 4 まであります。全体に眼を通してから解答を始めてください。
- ・ 解答用紙はバラバラにしないでください。顕微鏡の使用マニュアルは問題の前に入れています。
- ・ 試験終了後、問題用紙は持ち帰ってください。

評価項目

- ・ 観察試料の準備、顕微鏡の使い方、スケッチまでの一連の流れをしっかりと理解し、実行できるか。
- ・ 動物の発生過程を理解しているか。
- ・ 複数の情報の中からスケッチに必要な情報を抜き出せるか。
- ・ 自分の目で見たと生き物の情報を絵と言葉で他人に伝えることができるか。

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

始めの合図の後、すべての解答用紙に

受験番号と名前を記入してください。

また、ケント紙の右上にも受験番号と名前を書いてください。

問題 1.

A、B、C のマイクロチューブの中に、ハリサンショウウニの卵や胚が入っています。それぞれのチューブから卵または胚を取り出し、プレパラートを作り観察、スケッチをしてください。その際、スケッチに描かれたものがどのチューブから取り出されたものであるかをケント紙に明記してください。さらに、発生過程の順に沿ってスケッチに数字で順番をつけてください。また、描いたスケッチ内にウニ卵または胚の特徴を書き込んでください。なお、A、B、C のどれかひとつのマイクロチューブ内には別種であるバフンウニの卵または胚が入っているので、そのスケッチをして、バフンウニの卵または胚が入っていたマイクロチューブがどれであることをスケッチ上に記してください。別種であると判断した根拠をスケッチに書き込んでください。

※ ケント紙 1 枚あたり 2 つの図を書いてください。書き直し等で枚数が足りない場合にはケント紙の裏面を使用してください。

※ スケッチしたケント紙は、解答時間終了後に解答用紙とともに回収され、評価対象となります。

※ 点描は必要ありません。

※ 生体試料の性質上、発生が悪い物も含まれます。可能な限り、正常な発生過程にあると判断できる試料を選択してスケッチを行ってください。

プレパラートの作製法（各工程はあくまで一般的な方法であるため、試料の性質を理解して適宜工夫をすること）

- 1) スライドガラスを液体廃棄用プラスチックビーカー上で軽く洗う。洗浄瓶内の水を用いる。スライドガラス上の水を拭き取る。
- 2) マイクロチューブの蓋を抑えたまま、手で軽く 2、3 回転倒混和する。
- 3) 20 μ L 用のマイクロピペットにピペットチップをつけて、チューブ内に差し込み卵または胚を保存液ごと吸い取る。液量は適宜判断すること。
- 4) スライドガラス上にのせ、カバーガラスをかけてプレパラートとする。

問題 2.

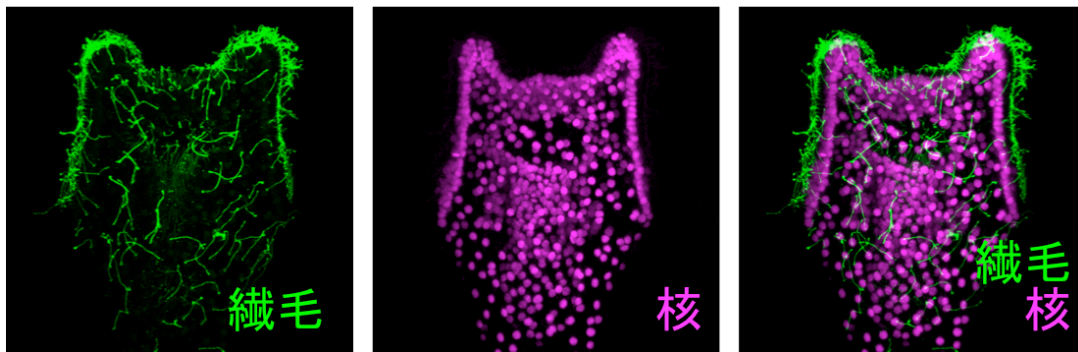
有性生殖を行う動物においては、多くの場合、卵と精子が 1 対 1 で受精することによって正常な発生を開始する。一方、複数の精子が卵内に入ることは多精と呼ばれ、この場合は正常な発生が進行しない。その理由を 2 行程度で説明せよ。また、本実験において多精を防ぐ構造体が観察できたマイクロチューブの番号とその構造体の名前を記しなさい。

問題 3.

ウニ胚の 16 細胞期に見られる最も小さな割球は小割球と呼ばれる。発生過程における小割球の役割を調べる際に、必要条件と十分条件を満たすための実験をそれぞれ記しなさい。

問題 4.

下記の図は受精後 72 時間経過したウニの胚を染色し、細胞の表面に生えている繊毛を緑色に、核をマゼンタ色に可視化したものである。繊毛を用いたウニ胚の行動を 1 例記しなさい。



実験試験 2 : 発生生物学

解答用紙 I

受験番号 _____ 氏名 _____

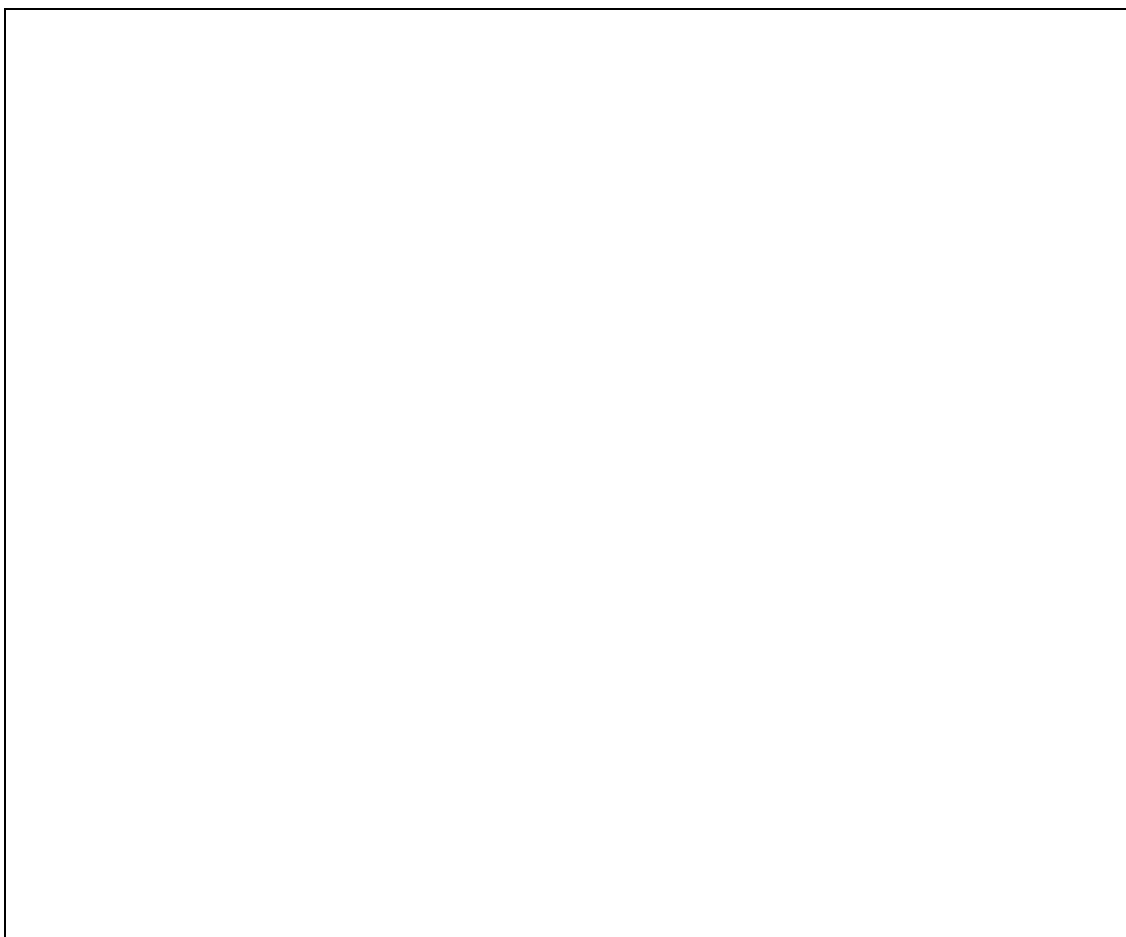
問題 1

別配のケント紙にスケッチをしてください。

問題 2



問題 3



解答用紙 II

受験番号 _____

氏名 _____

問題 4

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば



実験試験 3 動物生理学

解答時間 90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4枚あります。

[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

線虫 *Caenorhabditis elegans*（以下「シーエレガンス」）は、成虫の体長が 1 mm 程度の非常に小さな生き物ですが、幅広い生物学研究で大いに活躍している優れたモデル生物です。昨年 3 月、九州大学の研究者によって報告されたシーエレガンスを用いた早期がん診断法が、マスメディアで大きな話題となりました。動物は一般に、特定の化学物質に対して引き寄せられたり、あるいは避けたりする行動をとります。今回の発明は、がん患者の尿に含まれる何らかの化学物質に対するシーエレガンスの誘引性をうまく利用したものと言えます。今回の実験試験では、シーエレガンスの化学物質に対する応答性についての行動観察を通じて、上述の話題の科学的基盤を理解するとともに、動物の化学物質に対する感覚応答の可変性について考えます。

サンプルと器具類

以下のサンプルと器具がそろっていることを確認しなさい。サンプルと試薬は、以下の記述におけるカギ括弧「」内の文字でラベルされています。また、サンプルと試薬は実験デスクの左から右に並べてあります。

サンプルと試薬

- ☐ 「①」 化合物原液（100% 3-メチル-1-ブタノール、10 μ L） 1 本
- ☐ 「②」 100% エタノール（300 μ L） 1 本
- ☐ 「③」 50 mm 寒天プレート 4 枚（予備 2 枚を含む）
- ☐ 「④」 シーエレガンスを飼育した 50 mm 寒天プレート 1 枚
- ☐ 「⑤」 M9 緩衝液（5 mL） 1 本
- ☐ 「バランス 500 μ L」 遠心バランス 500 μ L 1 本
- ☐ 「バランス 1mL」 遠心バランス 1 mL 1 本
- ☐ ビニール袋に入った空の 1.5 mL マイクロチューブ 4 本（予備 2 本を含む）

器具

- ☐ マイクロピペット（P1000） 1 本
- ☐ マイクロピペット（P200） 1 本
- ☐ マイクロピペット（P20） 1 本
- ☐ ピペットチップ（P1000 用、白色） 1 箱
- ☐ ピペットチップ（P20 用、黄色） 1 箱
- ☐ マイクロチューブ立て（青色） 1 個
- ☐ 卓上小型遠心機 1 台
- ☐ 実体顕微鏡 1 台
- ☐ 手動式カウンタ 1 個
- ☐ ストップウォッチ 1 個

机の上においてあるキムワイプ、キムタオル、洗ビン（蒸留水）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 つはピペットチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

配布物から利用するもの

- ☐ 油性マジックペン 1 本
- ☐ 定規 1 本

注意

- ・ 試験中に顕微鏡の光源がつかない、顕微鏡のレンズがよごれている、試薬や線虫の入った溶液をこぼした等、トラブルが生じた場合には速やかに申し出てください。
- ・ 実験操作にあたって時間を計測する必要がある場合、手元のストップウォッチを用いて計測してください。
- ・ 試験終了後、問題用紙は持ち帰ってください。

評価項目

- ・ 適切な実験操作が行えたかどうか。
- ・ シーエレガンスの行動の変化を捉えられるか。
- ・ グラフや文章による適切な表現ができるか。
- ・ 持てる知識も総動員して、得られた結果からその現象の意義を議論できるか。

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

始めの合図の後、すべての解答用紙に

受験番号と名前を記入してください。

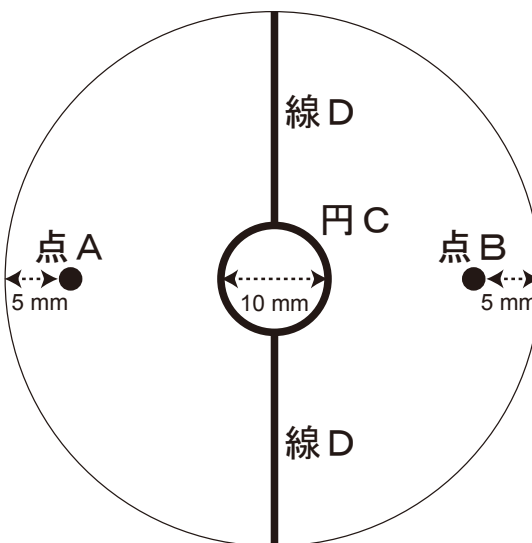
実験手順

以下の記述におけるカギ括弧「」内の囲み数字は、3 ページの「サンプルと試薬」に記載した番号に対応する。

前準備

1. 4 枚（予備を含む）の新しい 50 mm 寒天プレート（「③」）すべての裏側に、右図のような線を油性マジックペンで描く。必要に応じて、定規を用いること。

- プレートを 2 分割するように線 D を描く。
- プレートの中心に直径約 10 mm の円 C を描く。
- 線 D を挟んで対照の位置、そしてプレートの淵から約 5 mm 離れた位置に、点 A および点 B を描く。



以下の実験操作における注意

マイクロピペットを用いて寒天プレートに液体を置く際、チップの先で寒天を深く傷つけないように注意を払うこと。

もし寒天を深く傷つけた場合、必要に応じて予備のプレートを使用すること。

実験

2. 線を描いた 50 mm 寒天プレート（「③」）1 枚を取り、点 A の位置に対応する寒天上に、化合物原液（「①」）2 μL を置く。次に点 B の位置に対応する寒天上に、100% エタノール（「②」）2 μL を置く。このプレートは実験手順 16 で使用する。
3. 化合物（「①」）を 100% エタノール（「②」）で 100 倍希釈する。具体的には、「②」を 198 μL 取って空のマイクロチューブに移し、そこに「①」を 2 μL 取って 198 μL 100% エタノール中に添加する。添加後に、マイクロチューブの底を指で弾いて（タッピング）液をよく混和する。
4. 線を描いた 50 mm 寒天プレート（「③」）を新たに 1 枚取り、点 A の位置に対応する寒天上に、実験手順 3 で作製した希釈した化合物溶液 2 μL を置く。次いで、点 B の位置に対応する寒天上に、100% エタノール（「②」）2 μL を置く。このプレートは実験手順 16 で使用する。
5. シーエレガンスがいる 50 mm 寒天プレート（「④」）の上に、M9 緩衝液（「⑤」）1 mL を入れる。

6. 寒天に入れた M9 緩衝液を吸い、寒天に吹き付ける作業（ピペッティング）によってシーエレガンスを M9 緩衝液中に浮かせ、シーエレガンスを含む M9 緩衝液 500 μ L を回収して、新しいマイクロチューブに入れる。
7. 小型遠心機でシーエレガンスの入ったマイクロチューブを 30 秒間遠心する。この際、「遠心バランス 500 μ L」を用いて遠心機の重心のバランスを取る。
8. 上清 450 μ L を抜く。この際、シーエレガンスをあまり吸わないように注意する。
9. シーエレガンスの入ったマイクロチューブに、新しい M9 緩衝液（「⑤」）950 μ L を加えて、チューブを 5～10 回反転させる。
10. 再び、小型遠心機を用いて、シーエレガンスの入ったマイクロチューブを 30 秒間遠心する。この際、「遠心バランス 1 mL」を用いて遠心機の重心バランスを取る。
11. 上清 950 μ L を抜く。この際、シーエレガンスをあまり吸わないように注意する。
12. シーエレガンスの入ったマイクロチューブに、もう一度新しい M9 緩衝液（「⑤」）950 μ L を加えて、チューブを 5～10 回反転させる。
13. 再々度、小型遠心機を用いて、シーエレガンスの入ったマイクロチューブを 30 秒間遠心する。この際、「遠心バランス 1 mL」を用いて遠心機の重心バランスを取る。
14. 上清 950 μ L を抜く。この際、シーエレガンスをあまり吸わないように注意する。一連の工程により、体壁についた余計なエサやゴミを十分に取り除くことができる。この段階で、シーエレガンスを含む M9 緩衝液約 50 μ L がマイクロチューブに残っているはずである。
15. マイクロチューブの底を軽く弾いて（タッピング）、シーエレガンスを攪拌させる。
16. 実験手順 2 および 4 で作った寒天プレートの円 C の位置に対応する寒天プレート上に、実験手順 15 のシーエレガンス入り M9 緩衝液を 5 μ L 滴下する。
17. 静かに 20 分放置する。
18. 実体顕微鏡下で、プレートの線 D を境として、化合物を滴下した側とエタノールを滴下した側にいる個体数を数え、記録する。この際、円 C の中にとどまっているシーエレガンスを数える必要はない。また、様々な大きさのシーエレガンスが存在しているが、大きさや形状の違いを区別せずに数える。

問題 1.

一般に、外からの刺激に応じて生物が運動性を変えることを「走性」という。今回の実験は、シーエレガンスが特定の化合物に対して反応し、その化合物に近づいたり遠ざかったりする性質に注目しているが、化合物などの化学物質以外にはどのような刺激で走性を示す場合があるだろうか。外部刺激の種類を 1 つ挙げ、具体的な例を述べなさい。

問題 2.

実験手順 18 の数値データを用いて、適切な形式のグラフを考え、解答欄の方眼に表現しなさい。また、化合物の原液と希釈した溶液との間で、シーエレガンスの挙動に何か変化があったかについて文章で簡潔にまとめ、データから示唆される結論を述べなさい。なお、今回の実験系においては、100% エタノールはシーエレガンスの行動に対して影響を及ぼさないと仮定して良い。

問題 3.

個々のシーエレガンスが存在する寒天プレート上の位置を、点 A を起点として実験し距離によって表現した場合、化合物の濃度によって何らかの違いがあるだろうか。必要に応じて適切な形式のグラフを考え、解答欄の方眼にデータを表現しなさい。その上で、観察された違いについて文章で簡潔にまとめ、示唆される結論を述べなさい。

問題 4.

化合物の濃度に伴った行動の変化は、ヒトを含む多くの動物において一般的に観察される。化合物の濃度に応じた嗜好性の変化は、動物の生存にとってどのように有利に働くと考えられるだろうか。自由に見解を述べなさい。

問題 5.

シーエレガンスの行動と化合物の濃度の関係を観察した本実験の結果を踏まえて、シーエレガンスを用いてできるだけ正確にがん診断を行うために、使用者はどのような実験条件に留意する必要があるだろうか、見解を述べなさい。

実験試験 3 : 動物生理学

解答用紙 I

受験番号 _____

氏名 _____

問題 1

[illegible]

実験試験 3 : 動物生理学

解答用紙Ⅱ

受験番号

氏名 _____

問題 2

This image shows a full page of blank graph paper. The grid consists of small, uniform squares formed by thin, light blue lines. A single vertical line runs down the center of the page, creating two equal-width columns. The entire area is covered by this grid pattern, with no margins or other markings.[illegible]

実験試験 3 : 動物生理学

解答用紙Ⅲ

受験番号

氏名 _____

問題 3

This image shows a full page of blank graph paper. The grid consists of small, uniform squares formed by thin, light blue lines. There are no margins, text, or other markings on the page.[illegible]

実験試験 3 : 動物生理学

解答用紙Ⅳ

受験番号 _____

氏名 _____

問題 4

[illegible]

問題 5

[illegible]

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば



実験試験 4 植物生理学

制限時間 90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。

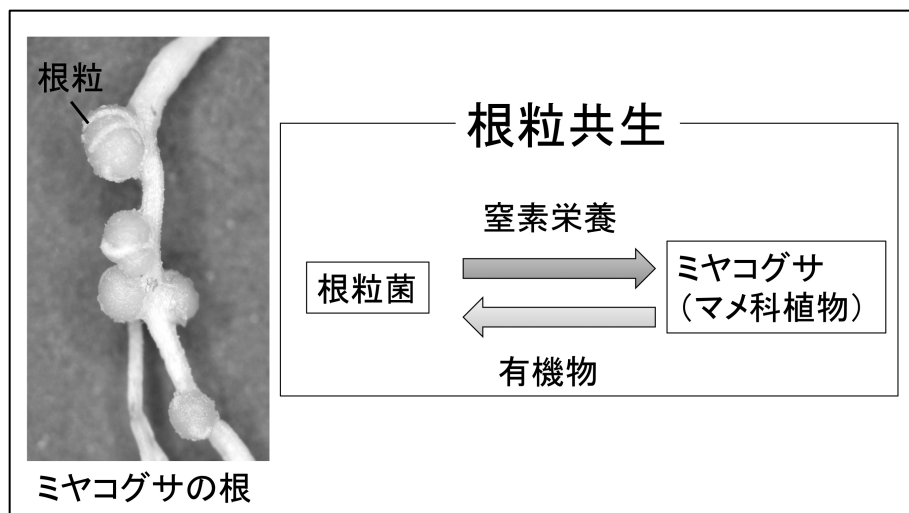
[注意]

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

植物は土壌中の様々な微生物と相互に関わり合いながら生活しています。植物と微生物の相互作用の例の1つとして、マメ科植物と土壌細菌の根粒菌は“根粒共生”と呼ばれる相利共生関係を築いていることが知られています。根粒菌は、大気中の窒素ガスを水溶性のアンモニアへと変換する窒素固定反応を行うことができる細菌です。マメ科植物は、根に根粒と呼ばれる共生器官を形成し、その中に根粒菌をすまわせることにより、根粒菌が窒素固定して作ったアンモニアを窒素栄養源として利用することができます。その一方で、植物は光合成によって作られた有機物を根粒菌の生存のエネルギー源として根粒菌に提供します。

ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) は、植物体のサイズが小さい、1世代に要する期間（種子をまき次の世代の種子がとれるまでの期間）が短い、実験室内での栽培が可能など、実験を行う上で様々な利点をもつマメ科のモデル植物です。正常な野生型のミヤコグサに化学変異原処理を行うことにより、DNAにランダムに傷をつけ、遺伝子の変異の誘発を引き起こし、作られた突然変異体の集団の中から、根粒共生を正常に行うことのできない様々な突然変異体が単離されています。それぞれの突然変異体がどのような異常を示すのかを調べ、また、その原因となる遺伝子の働きを調べることにより根粒共生の仕組みの理解が進んでいます。



サンプルと器具類

以下のサンプルと器具がそろっていることを確認しなさい。

サンプルと試薬

☐ 野生型(+)のミヤコグサが入ったシャーレ 1枚

☐ 野生型(-)のミヤコグサが入ったシャーレ 1枚

4個体ずつシャーレに入っていることを確認しなさい。

☐ 突然変異体Aのミヤコグサが入ったシャーレ 1枚

☐ 突然変異体Bのミヤコグサが入ったシャーレ 1枚

2個体ずつシャーレに入っていることを確認しなさい。

☐ 細菌染色液A 1本

☐ 細菌染色液B 1本

☐ 脱色液 1本

☐ 洗ビン（蒸留水） 1本

☐ マイクロチューブ（油浸液入り） 1本

器具

☐ 正立顕微鏡 1台

☐ スライドガラス 1箱

☐ スライドガラス台 1個

☐ カバーガラス 1箱

☐ カミソリ 1箱

☐ コピー紙 1枚

☐ スポイト 5本

☐ ガスライター 1本

☐ プラスチックシャーレ 4枚

☐ マイクロピペット（P20） 1本

☐ ピペットチップ（P20用、黄色） 1箱

☐ ハサミ 1個

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。

3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。ピペットチップなどの固体用、液体用、カミソリ用です。ゴミの分別は確実に行ってください。

配布物から利用するもの

マジックペン・物差し・ルーペ・糸切りはさみ・ピンセットを机の上に出しなさい。ただし、机の上に出した器具は、使用するのも使用しないのも自由です。

注意

- ・ 試験中、実験に使っていない植物は、植物が乾燥するのを防ぐため、水が入ったシャーレを用意し、その中に置いてください。
- ・ 問題や解答用紙の裏面は自由にメモに使うことができます。
- ・ 試験終了後、問題用紙は持ち帰ってください。

評価項目

データ処理の確実性、論理的思考、発想の柔軟性・独創性を評価します。

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

始めの合図の後、すべての解答用紙に

受験番号と名前を記入してください。

問題 1.

野生型(+)と野生型(-)は、窒素栄養を全く含んでいないバーミキュライト（人工土）で一定の期間栽培した植物です。野生型(+)を栽培したバーミキュライトには根粒菌を加え、野生型(-)を栽培したバーミキュライトには根粒菌を加えていません。

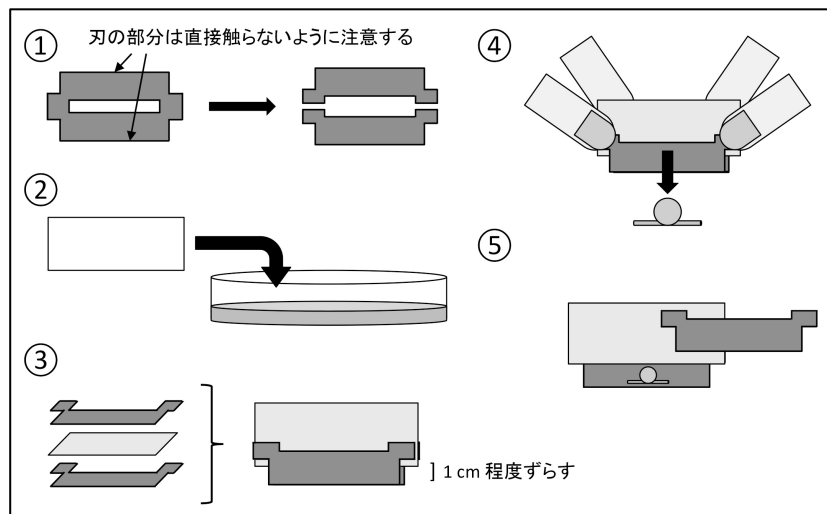
根粒共生が植物の成長にもたらす影響について、根拠となる観察・測定結果を示しつつ説明しなさい。

問題 2.

野生型(+)の根に形成されている根粒について、下記の(1)～(3)の問題に答えなさい。

(1)根粒の切片のプレパラートを下記の手順に従い作成後、正立顕微鏡で観察し、根粒の断面構造をスケッチしなさい。スケッチでは10倍の対物レンズを使いなさい。

- ① 両刃カミソリを半分に折り、二つに分ける。
- ② コピー紙を4 cm×2 cm程度の大きさに切り、蒸留水で濡らす。
- ③ 2枚のカミソリの間に濡らしたコピー紙を挟む。この時コピー紙は1 cm程度上へずらす。
- ④ 2枚のカミソリとコピー紙がずれないように両手で持ち、根粒の中央へ向かってまっすぐ刃を下す。
- ⑤ カミソリの間に切片が残るので、スライドガラスに乗せてプレパラートを作成する。



(2) 下記の手順に従い、根粒中に存在している根粒菌を固定・染色したプレパラートを作成後、正立顕微鏡で観察し、根粒菌の形態をスケッチしなさい。スケッチでは、100倍の対物レンズ（油浸対物レンズ）を使いなさい。

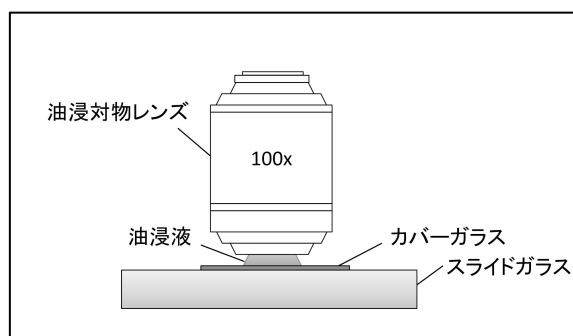
- ① ピンセットを使って、野生型(+)の根から根粒を 1 個切除し、スライドガラス上に 1 滴たらした水の中で軽くつぶす。つぶれた根粒はスライドガラス上から取り除く。
- ② スライドガラスをスライドガラス台にのせる。ガスライターを使ってスライドガラスの下を軽く炎であぶり、水分を蒸発させる。

注意：炎であぶった直後は、スライドガラス、スライドガラス台が熱くなっている可能性があるので取り扱いに注意してください。

- ③ 水分が蒸発した箇所に細菌染色液 A をスポイトで 1 滴たらし、約 1 分待つ。
- ④ 洗ビン（蒸留水）を使い、細菌染色液 A を洗い流す。
- ⑤ 細菌染色液 A の青色が溶け出さなくなるまでスポイトで脱色液を加える。
- ⑥ 洗ビン（蒸留水）を使い、脱色液を洗い流す。
- ⑦ 細菌染色液 B をスポイトで 1 滴たらし、約 1 分待つ。
- ⑧ 洗ビン（蒸留水）を使い、細菌染色液 B を洗い流す。
- ⑨ プレパラートを作成する。

油浸対物レンズの使い方

- ① 10～40 倍の対物レンズを用いて観察し、最終的に 40 倍の対物レンズを用いて観察した時に、対象（細菌が染色されている場所）のピン트가合っている状態にする。



- ② レボルバーを回して、対物レンズとプレパラートの間に空間をつくる。
- ③ マイクロチューブ（油浸液入り）からマイクロピペットを用いて油浸液 3 μL をとり、カバーガラス上面の光路の中心にのせる。
- ④ 対物レンズを 100 倍に変える。このとき、対物レンズとカバーガラスの間が、油浸液の層で満たされていることを確認する。
- ⑤ 微動ハンドルを回し、ピン트를合わせる。

(3) 1 個の根粒中に存在している根粒菌の数を効率的に推定するためには、どのような実験を設計すればよいか答えなさい（実際に実験を行う必要はありません）。

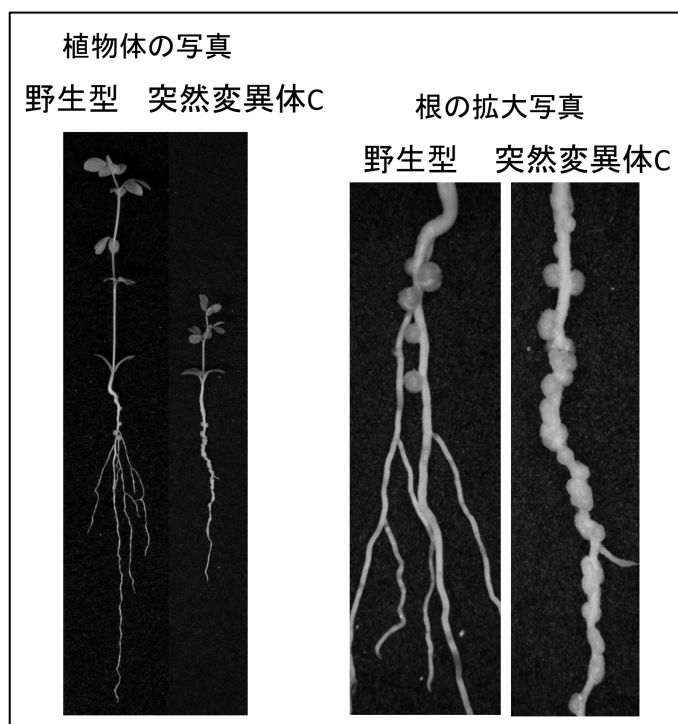
問題 3.

突然変異体 A と突然変異体 B は、それぞれ異なる 1 遺伝子の変異により根粒共生に異常が起こっています。突然変異体 A および突然変異体 B の根粒、根粒内部を観察し、それぞれの変異体の特徴を説明しなさい。

問題 4.

下図の突然変異体 C の表現型を説明するとともに、そこから考えられる根粒共生の仕組みを、次の言葉を全て用いて説明しなさい。

用いる言葉：窒素、有機物、バランス



実験試験 4：植物生理学

解答用紙 I

受験番号 _____ 氏名 _____

問題 1

解答用紙Ⅱ

受験番号 _____

氏名 _____

問題 2 (1)

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the student's answer to problem 2 (1).

問題 2 (2)

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the student's answer to problem 2 (2).

問題 2 (3)

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the student's answer to problem 2 (3).

解答用紙Ⅲ

受験番号

氏名

問題 3

問題 4