

日本生物学オリンピック 2010 つくば

生物チャレンジ 2010 第 2 次試験



実験試験 1 植物形態学

制限時間 90分

解答は全て、解答用紙に記入しなさい。また、解答用紙はすべてのページに受験番号と氏名を記入しなさい。なお、問 2-10 については、写真で判定します。

[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、問題用紙(11 ページ) 1 冊、解答用紙(4 ページ) 1 冊がそろっていることを確認してください。

実験に使用する解剖セット、両刃カミソリ 5 枚、片刃カミソリ 1 枚、濾紙 2 枚、スライドガラス 10 枚、カバーガラス 10 枚、空のシャーレ 4 枚、スポイト 2 個、サフラニン染色液、蒸留水、支持材 1 本、サンプル 5 個がそろっていることを確認してください。なお、サンプル 1 は切片の写真、サンプル 2-5 は 50% エタノールで固定したサンプルです。

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 つはカミソリなどの固体用、もうひとつは液体用です。

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。

問題は第 1 部、第 2 部の 2 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。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。

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 にする。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て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。
- ・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。
- ・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)。

図 1 正立顕微鏡全体図

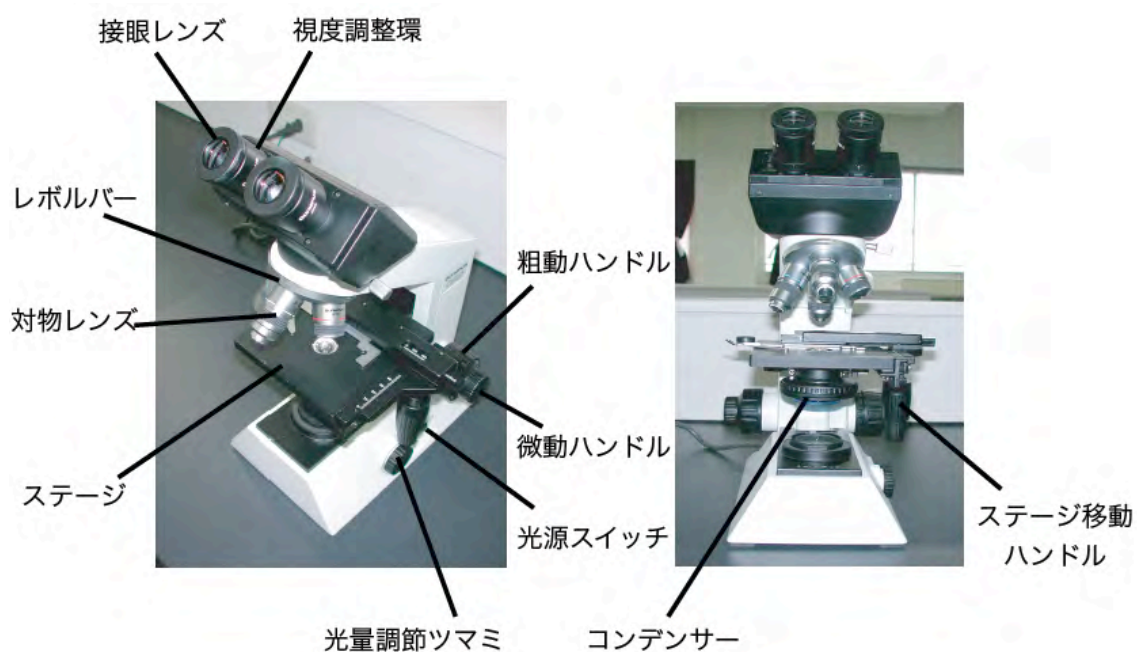
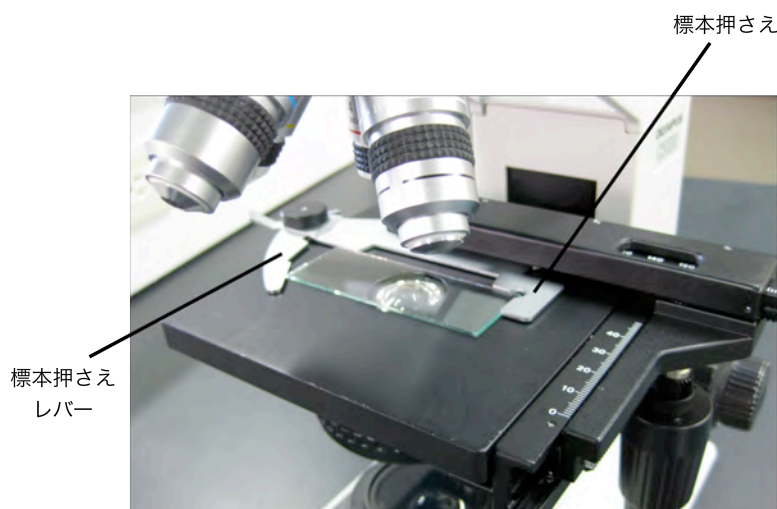


図2 ステージへの標本のセット



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。

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。

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（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まで申し出てください。

はじめに

陸上植物の中でも維管束植物が持つ葉は太陽の光を受けて光合成をおこなう主たる器官である。葉の形状、空間的な配置、表面や内部構造などの形態的特徴は植物の種類や生育環境によってさまざまである。このような葉は、陸上植物の祖先が水中から陸上に進出して以来長い時間をかけて形成されてきたものである。

器具とサンプル

器具：正立顕微鏡 1 台、実体顕微鏡 1 台、解剖セット、両刃カミソリ 5 枚、片刃カミソリ 1 枚、濾紙 2 枚、スライドガラス 10 枚、カバーガラス 10 枚、空のシャーレ 4 枚、スポイト 2 個、サフラニン染色液、蒸留水、支持材 1 本

サンプル：1 (切片の写真)、2-5 (固定標本)、なお 4 と 5 は陰葉か陽葉のいずれかである。

評価項目

1. 植物の葉を観察するための試料作製ができる。
2. 陸上植物の葉を形態学的、進化系統分類学的な観点から観察できる。
3. 葉の形態学的な特徴と与えた光 - 光合成曲線のグラフから、植物の生態学的特徴について考察できる。

手順

- ・問題によっては、サンプルの表面を観察する必要があるので、まず、実体顕微鏡でサンプルをよく観察しサンプルの構造を把握したうえで切片作成に入ってください。
- ・サンプル 2 を支持材にはさんでカミソリを使って横断面の切片をつくる。
- ・切片を蒸留水の入ったシャーレに浮かべて最も薄い切片を探す。
- ・蒸留水を 1 滴のせたスライドガラスに切片をのせて濾紙で余分な水を吸い取る。
- ・サフラニン染色液を 1 滴たらしてからカバーガラスをかける。
- ・サンプル 3~5 についても上記の手順を繰り返し行いプレパラートを作成する。

<第1部>

1～5のサンプルと自分で作成したプレパラートをそれぞれ顕微鏡などを用いて観察した後で、以下の問いに答えよ。

問1、1～3のサンプルが属する分類群を判別し、そのコード記号を回答欄に記入せよ。(2点 x 3 = 6点) また、その理由について簡単な図を描いて説明せよ(4点 x 3 = 12点)。

コード記号

A：緑藻類、B：コケ植物、C：イチョウ植物門、D：球果植物門、E：被子植物(単子葉類)、F：被子植物(双子葉類)

問2、図1(8ページ)に示した葉の構造について注意深く観察せよ。

問2-1、図1の1～10に示した部分の名称をコード記号から1つ選択せよ。

(1点 x 10 = 10点)

コード記号

A：維管束鞘細胞、B：海綿状組織、C：気孔、D：気室、E：クチクラ層、F：厚角細胞、G：厚壁異形細胞、H：細胞間隙、I：柵状組織、J：師部、K：繊維細胞、L：内鞘、M：内皮、N：表皮細胞、O：木部

問2-2、サンプル1～5の中で図1の5と6のように2つのタイプの葉肉細胞が確認されたすべてのサンプルに○をつけよ。それ以外は×をつけよ。

(1点 x 5 = 5点)

問2-3、サンプル1～5の中で図1の3に相当する部分が観察されたすべてのサンプルに○をつけよ。それ以外は×をつけよ。(1点 x 5 = 5点)

問2-4、植物体における図1の3の役割について簡単に説明せよ。(4点)

問2-5、サンプル1～5の中で図1の10に相当する部分が観察されたすべてのサンプルに○をつけよ。それ以外は×をつけよ。(1点 x 5 = 5点)

問 2-6、図 1 の 10 の植物体における役割について簡単に説明せよ。(4 点)

問 2-7、図 2 (8 ページ) は、ある植物の葉の内部の電子顕微鏡写真である。写真は図 1 の 1~10 のどの部分であるか。1 つ選び記号で示せ。(2 点)

問 2-8、図 2 の写真で示された細胞構造が観察された全てのサンプルに○をつけよ。それ以外は×をつけよ。(1 点 x 5 = 5 点)

問 2-9、図 3 (9 ページ) はある植物の葉の表面の電子顕微鏡写真である。サンプル 1~5 の中で、矢印で示した構造が観察されたすべてのサンプルに○をつけよ。それ以外は×をつけよ。(1 点 x 5 = 5 点)

問 2-10、最後に、今回作成したプレパラートの中であなたが最高と思い、且つサフラニンで染色されていることがよくわかるプレパラートを顕微鏡にセットし、対物レンズの倍率を 10 倍にしてから、その場所を顕微鏡の視野の中心にあわせてください(注: 本当に視野に真ん中に持ってこないと撮影できませんので注意してください)。準備ができれば手を挙げて監督員をよんでください。デジタルカメラがセットされたらパソコンの画面を見てフォーカスを合わせてください。撮影に少し時間がかかるので待っている間に別の作業をしても構いません。監督員がデジタルカメラで撮影してあなたの切片作成テクニックを写真から判定します。なお、フォーカスのシャープさは評価に入りません。(8 点)

图 1

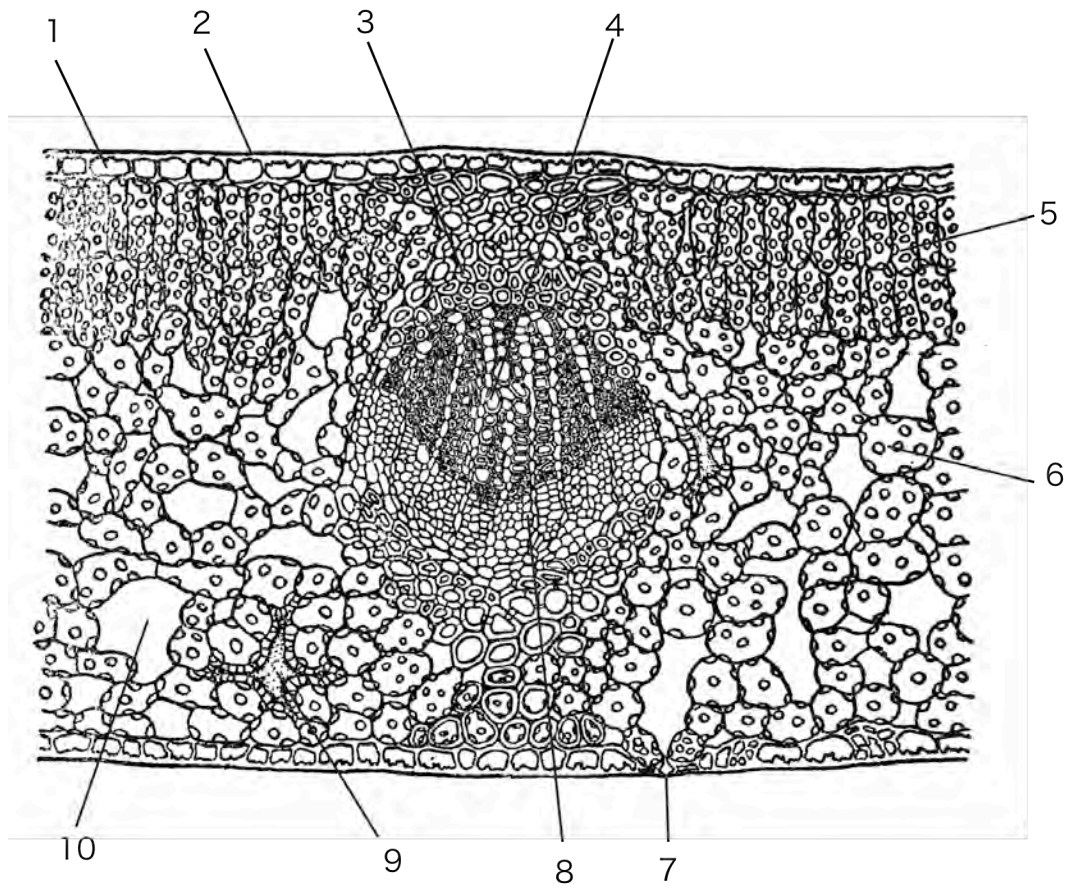


图 2

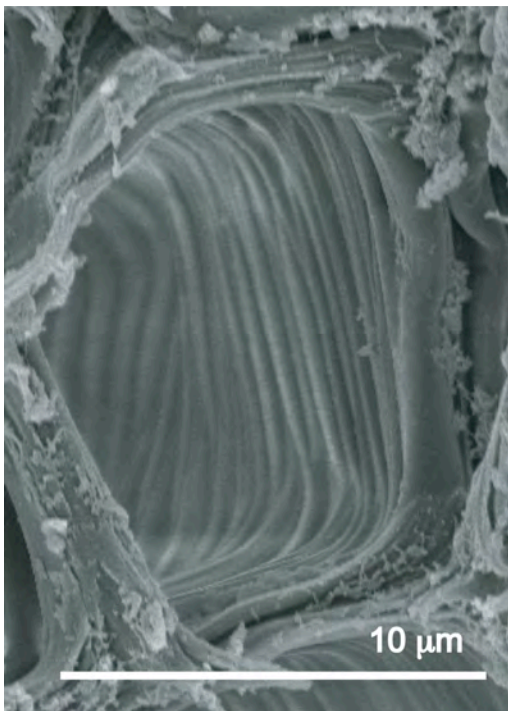
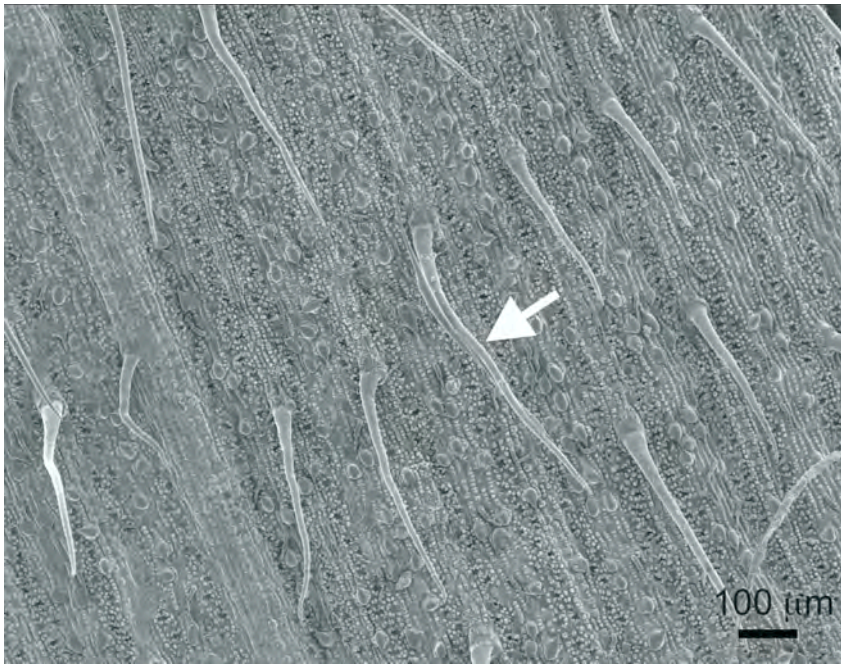


図 3



<第2部>

サンプル4と5のプレパラートに加えて、図4および図5を見て以下の2つの問いに答えよ。

図4 サンプル4と5を採集した植物と採取した場所(AとB)

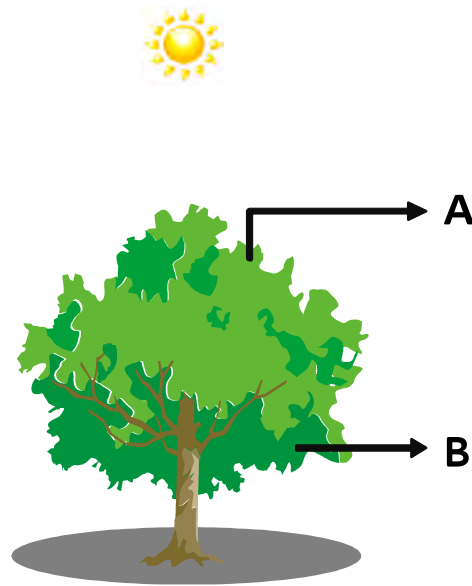
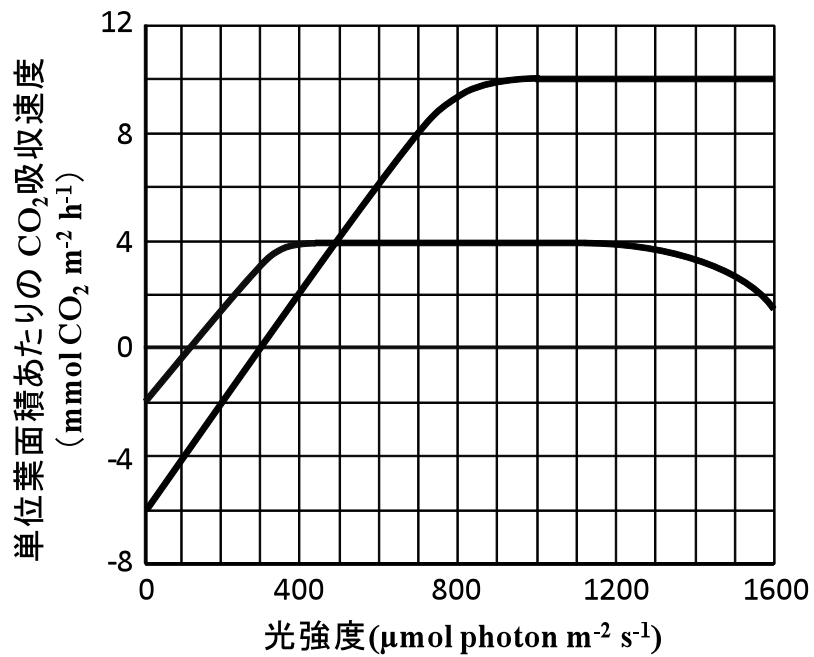


図5 サンプル4と5の光—光合成曲線



問 1、サンプル 4 および 5 は図 4 の A と B のどちらから採取したものか、そう考えた根拠とともに答えよ。(6 点)

問 2、植物が受ける光環境は時間的にも空間的にも様々である。これに対し植物の葉はそれぞれの環境において効率よく光合成を行うために形態や働きを変化させておりこれを光順化という。サンプル 4 および 5 のような違いも光順化の一つであり、光順化によって個々の葉だけでなく植物全体の生産性も最大化すると考えられている。

ここでは一本の仮想樹木の一日の生産性について考えてみよう。この仮想樹木は 4 つの葉群層からなり (図 6)、葉や枝による被陰はなく一葉群層内の光条件はどこでも同じとする。また太陽の位置は不変で、各層を透過する際に光強度は透過直前の 25% に減少することとする。さらに問題を簡略化するために次の (ア) ~ (ウ) を前提とする。

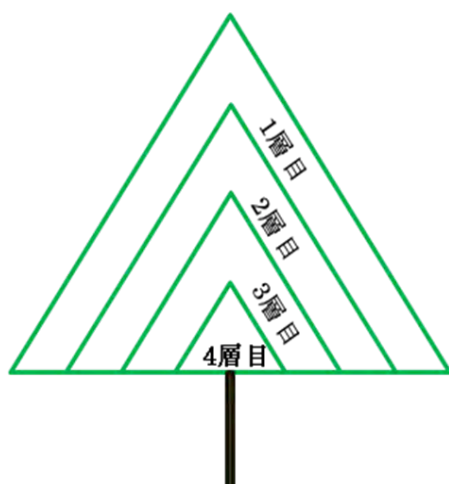
(ア) 1 日のうちの 12 時間を明状態 (常に $1600 \mu\text{mol photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) とし、それ以外の 12 時間を暗状態 (常に $0 \mu\text{mol photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) とする。

(イ) 枝の量は各層で一定でその呼吸量は全て $2 \text{ mmol CO}_2 \text{ h}^{-1}$ とする。

(ウ) 温度は常に一定とする。

これらの前提のもと光一光合成曲線が図 5 である場合の仮想樹木 1 本の生産性を最大にするには各層を葉 A、葉 B、あるいは葉を全く付けない (その場合は × と記入) のいずれにすべきか、その答えに至った根拠とともに答案用紙の表に記入せよ (14 点)。さらに、そのような葉群構造の場合の仮想樹木の 1 日の生産量 (CO_2 吸収量) を求めよ (9 点)。

図 6 4 層の葉群構造を持つ仮想樹木と各層の総葉面積 (m^2)



葉群層	葉群内の総葉面積 (m^2)
1層目 (最も大きい層)	4
2層目	3
3層目	2
4層目 (最も小さい層)	1

解答用紙は別にしてください。

次ページ参照

実験試験 植物形態学 解答用紙

受験番号	氏名

<第1部>

問1

サンプル	1	2	3
コード記号			

その理由

1) _____ ㊦

2) _____ ㊦

3) _____ ㊦

受験番号	氏 名

問 2-1

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10

問 2-2

サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5

問 2-3

サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5

問 2-4

問 2-5

サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5

問 2-6

受験番号	氏名

問 2-7 _____

問 2-8

サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5

問 2-9

サンプル 1	サンプル 2	サンプル 3	サンプル 4	サンプル 5

受験番号	氏名

<第2部>

問1

サンプル4	サンプル5

根拠： _____

問2

葉群層	最適な葉のタイプ (A、B、あるいは×を記入)
1層目(最も大きい層)	()
2層目	()
3層目	()
4層目(最も小さい層)	()

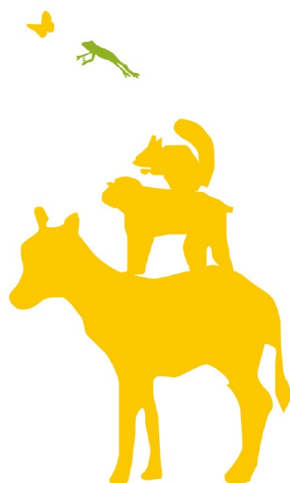
根拠： _____

この仮想樹木の最大生産量： _____ (mmol CO₂ day⁻¹)

計算欄

日本生物学オリンピック2010 つくば

生物チャレンジ2010第2次試験



生物
チャレンジ
2010
TSUKUBA

実験試験2 理論生物学

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。
その全てに受験番号と名前を記入しなさい。

はじめに

生まれてきた動物の子供が無事に育つかどうかは、親が子供にふさわしい餌を用意しているかどうか大きく依存します。餌に関して親がまったく面倒をみない動物の場合、子供達は自力で餌を探す必要があります。これとは対照的に、人間を含む哺乳類などの場合は、子供がある程度大きくなるまで、親が餌の面倒をみます。本実験では、この両極端のちょうど中間の戦略をとるマメゾウムシを材料として使います。

マメゾウムシは漢字では豆蔵虫と書き、同じコウチュウ目に属するゾウムシ（象虫）とは系統的に離れている昆虫です。その一種であるアズキゾウムシ (*Callosobruchus chinensis*) は、アズキやササゲ、リョクズ（緑豆：はるさめの原料）など、人間に重要なタンパク質を供給する豆類を食害する害虫で、雌成虫は畑においては豆の莢に、倉庫に蓄えられている状態では乾燥豆の表面に卵を産みつけます。孵化した幼虫は卵底面から豆の内部に入り込み、成虫になるまでに必要な栄養をその豆の中だけで摂取します。卵を産みつけた豆内部の餌が足りないからといって、幼虫は隣の豆に移り住むわけにはいきません。つまり親が卵を産みつけた時点で、幼虫のその後の行く末が決まるわけです。

手元に配られたのは、実験室で70年以上（約1,000世代）ずっとアズキで育てられたアズキゾウムシです。このアズキゾウムシの親虫にアズキと、アズキ以外の豆を与えた場合、果たしてどの豆に卵を産むのでしょうか？

サンプルと器具

材料と実験道具	数量
アズキゾウムシ（約100個体）が入ったプラスチックシャーレ	1
アズキが1区画に1層入ったプラスチックシャーレ	1
小粒のダイズが1区画に1層入ったプラスチックシャーレ	1
下記3種類の豆がそれぞれ2区画に1層入ったプラスチックシャーレ	
アズキ	1
リョクズ	1
小粒のダイズ	1
空のプラスチックシャーレ	5
ピンセット	1
吸虫管	1

評価項目

タスク 1. アズキゾウムシの雌雄の区別 (図示)

タスク 2. 予備実験の解釈

タスク 3. 実験デザインの作成 (図示)

タスク 4. 産卵実験の結果の提示 (図示)

タスク 5. 産卵実験の結果の解釈

予備実験

最初に、手元にあるアズキと小粒のサイズが1区画に1層入ったシャーレに、与えられたアズキゾウムシを半分ずつ入れ、15分ほどそのままにして産卵させてみましょう。この待ち時間の中に、次のタスク1に挑戦し、引き続きタスク2～5に挑戦してみましょう。

タスク1：アズキゾウムシの雌雄の区別

産卵実験をするために、アズキゾウムシのオスとメスを見分けられると、実験がスムーズに行くかも知れません。オスとメスを見分けるための、形態的、あるいは行動的特徴を図示しましょう。

タスク2：予備実験の解釈

15分ほどたったら、それぞれのシャーレからアズキゾウムシを全て取り出し、別々の空シャーレに保管しましょう。アズキに産卵させたマメゾウムシと、ダイズに産卵させたマメゾウムシを別々に保管することに注意しましょう。次に産卵させた豆の表面をチェックし、それぞれの豆にどれだけ卵がついているか調べましょう。アズキと小粒のサイズ、どちらにたくさん卵を産んだと言えるでしょうか？

タスク3：実験デザインの作成

予備実験の結果を踏まえて、「アズキゾウムシの親虫にアズキと、アズキ以外の豆を与えた場合、果たしてどの豆により多くの卵を産むか？」という問いに答えるための実験デザインを組みましょう。その際、以下の項目に注意しましょう。

- 必ずしも与えられた3種類の豆をすべて使う必要はありません。
- 予備実験の後に、それぞれの豆に産卵させたマメゾウムシを別々に保管することにはどんな意味があるのでしょうか？
- 一度に沢山の豆を入れると、産卵されない豆が多くなり、解析ができなくなります。実験をデザインするにあたり、予備実験の豆の量を参考にしましょう。
- 雌の一生の産卵数の変化は、図1のようになっています。予備実験の産卵数の結果を踏まえて、本実験に使用するマメゾウムシの個体数や産卵時間をしっかり考えましょう。
- それぞれの豆は、アズキゾウムシが育つかどうかの他に、様々な形質が異なります。産卵に重要になってくる形質として、どのようなものが考えられるのでしょうか？

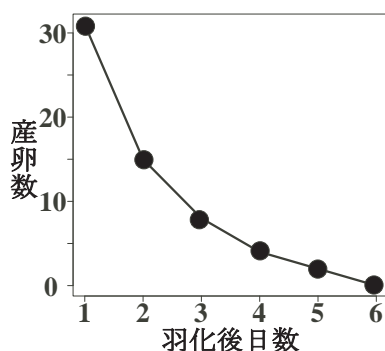


図 1: アズキゾウムシの雌の一生の産卵数

タスク4：産卵実験の結果の提示

上記の実験デザインに従って実験を行い、アズキゾウムシがどの豆に好んで産卵したか、その結果を表や図を使って示しましょう。

タスク5：産卵実験の結果の解釈

得られた実験結果から、「アズキゾウムシは生まれ育った豆に好んで産卵する」と言えるのでしょうか？そう言える場合、あるいはそう言えない場合ともに、その理由を述べましょう。また、自分の行った実験結果から、明確に結論が導き出せなかった場合は、実験デザインをどのように改良したらよいのか、そのアイデアを示して下さい。

実験試験2 理論生物学 解答用紙

受験番号	氏名

タスク 1. アズキゾウムシの雌雄の区別

--

タスク 2. 予備実験の解釈

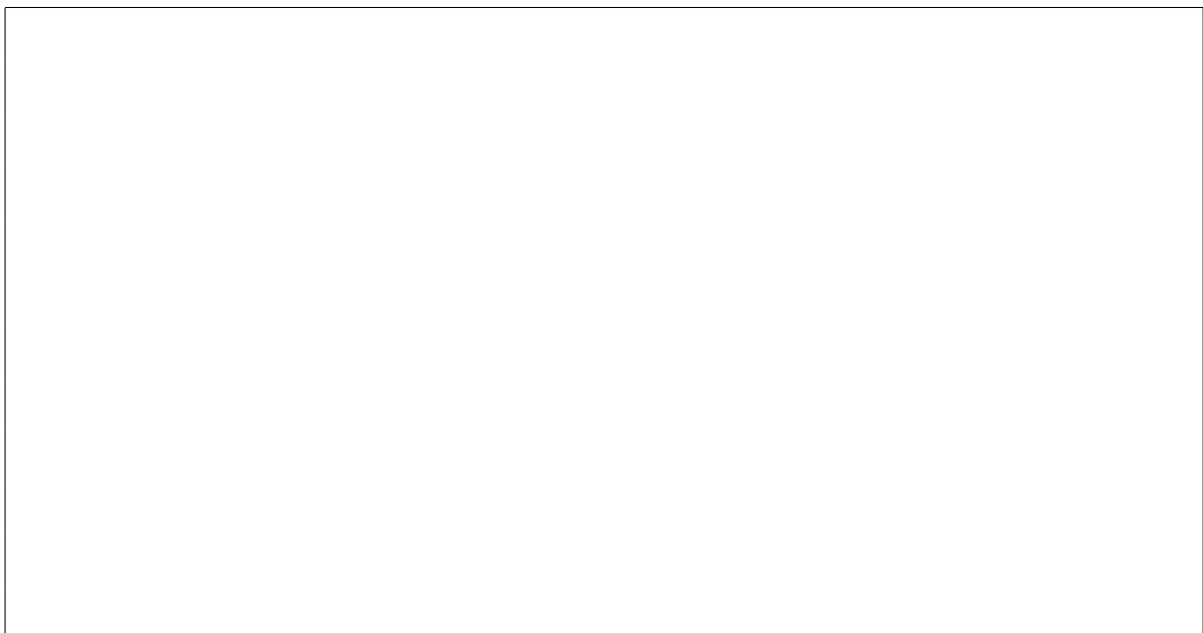
実験試験2 理論生物学 解答用紙

受験番号	氏名

タスク 3. 実験デザインの作成 (図示)



タスク 4. 産卵実験の結果の提示 (図示)



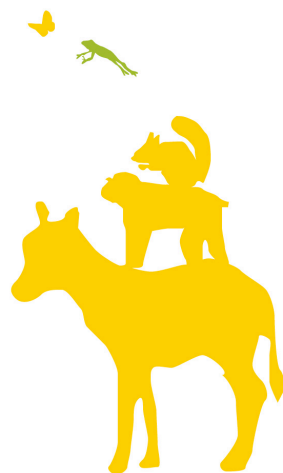
実験試験2 理論生物学 解答用紙

受験番号	氏名

タスク 5. 産卵実験の結果の解釈

日本生物学オリンピック 2010 つくば

生物チャレンジ 2010 第2次試験



生物
チャレンジ
2010
TSUKUBA

実験試験3 動物形態学

制限時間 90分

解答は全て解答用紙に記入しなさい。

(解答用紙の全てのページに受験番号と氏名を記入すること)

はじめに

地球上にはさまざまな動物が棲んでいます。私たちヒトを含む脊椎動物は6万以上の種から構成されている大きなグループであり、形状や体サイズ、生息場所なども実に多様です。本実験試験では、脊椎動物の進化や多様性を理解するために、以下の実験を行います。第一部ではキンギョ（ギンブナ）の解剖を行い、内部構造の観察とその簡単なスケッチをとおして四肢類の祖先系統である硬骨魚類の基本体制を学びます。第二部では両生類（アカハライモリとアジアウキガエル）の骨格透明標本の観察とその簡単なスケッチを行い、四肢類の基本体制を学びます。また、形態学的な情報から動物の生態や行動を考察できるかどうかを評価します。第三部では爬虫類であるトカゲ科の1種の外部形態の観察を行い、種の同定をめざします。第四部では基本的な統計やグラフからデータを読み取れるかどうかを評価します。

サンプルと器具

キンギョ1個体、アカハライモリの骨格透明標本1個体、アジアウキガエルの骨格透明標本1個体、トカゲ科の標本1個体、実体顕微鏡、バット、ゴム板、解剖セット（柄付きメス・柄付き針・ピンセット・解剖バサミ）、ラベル用まち針（4本）、シャーレ（直径9cm）1個、シャーレ（直径15cm）1個、グリセリン液（60%水溶液、50ml）、蒸留水（広口T型瓶）、問題用紙、解答用紙

評価項目

第一部：硬骨魚類の基本体制が理解できているか。

第二部：四肢類の基本体制が理解できており、形態の情報からその動物の生態や行動を考察することができるか。

第三部：動物の外部形態の観察にもとづいて種の同定ができるか。

第四部：基本的な統計やグラフからデータを読み取れるか。

-問題-

第一部

キンギョの解剖を行い、次の問いに答えなさい。

問1 配布した解剖道具を使って、キンギョを解剖し、その内部構造を観察しなさい。以下にあげる構造に対応する番号がラベルされたまち針を刺し、生体中に各構造の位置を示しなさい。(8点)

- まち針1 = 心臓
2 = 腎臓
3 = うきぶくろ
4 = しりびれ臀鰭

各構造にまち針を刺した状態で、第一部終了後に回収します。問3で^{えら}鰓の摘出があるので、注意して作業しなさい。

問2 次の文章中の(A)～(E)に該当する語句または数字を入れなさい。(10点)

水中生活を行うキンギョはうきぶくろによって浮力を調節するが、うきぶくろは四肢類がもつ(A)と相同なものであると考えられている。水中でのガス交換は鰓で行うが、キンギョの鰓は(B)対あり、その全てが外側に位置する(C)で覆われている。それぞれの鰓は^{さいきゅう}鰓弓、^{さいべん}鰓弁(鰓葉)、^{さいは}鰓耙(鰓師)とよばれる3つの構成要素から成り立っている。鰓弁は(D)に富んでおり、ガス交換に重要な働きをする。また、鰓耙は一部のクジラ類の上顎にみられる(E)と同じように餌をこし取るための機能を持っている。

問3 キンギョの鰓を1つ摘出し、その形態をスケッチしなさい。また、次の構造をスケッチ中に示しなさい。なお、スケッチは略図でかまわない。(10点)

[鰓弓、鰓弁、鰓耙]

ここまでの作業が終了したら、問1のまち針がしっかり刺さっていることを確認してから、挙手をして知らせてください。標本を回収します。一度回収した標本は返却しません。

第二部

脊椎動物の骨格に関する次の問いに答えなさい。配布した骨格透明標本において、赤紫色に染色されている部分は骨（硬骨）、青色に染色されている部分は軟骨である。観察する場合はシャーレ小（直径9cm）に配布したグリセリン液を満たし、シャーレに標本を移した後、実体顕微鏡下で行うと見やすい。なお、必要な場合は解剖道具を用いて標本を分解してもかまわない。

問4 アカハライモリとアジアウキガエルはともに両生類であるが、両者の骨格形態には「前肢の指は4本、後肢の指は5本である」といった共通点に加え、相違点も認められる。2種の骨格透明標本を見比べ、骨格における相違点を2つあげなさい。また、それらの相違点がみられる理由を、生活様式の観点から、40字以内で説明しなさい。骨の名称については図1（下記）を参照すること。（10点）

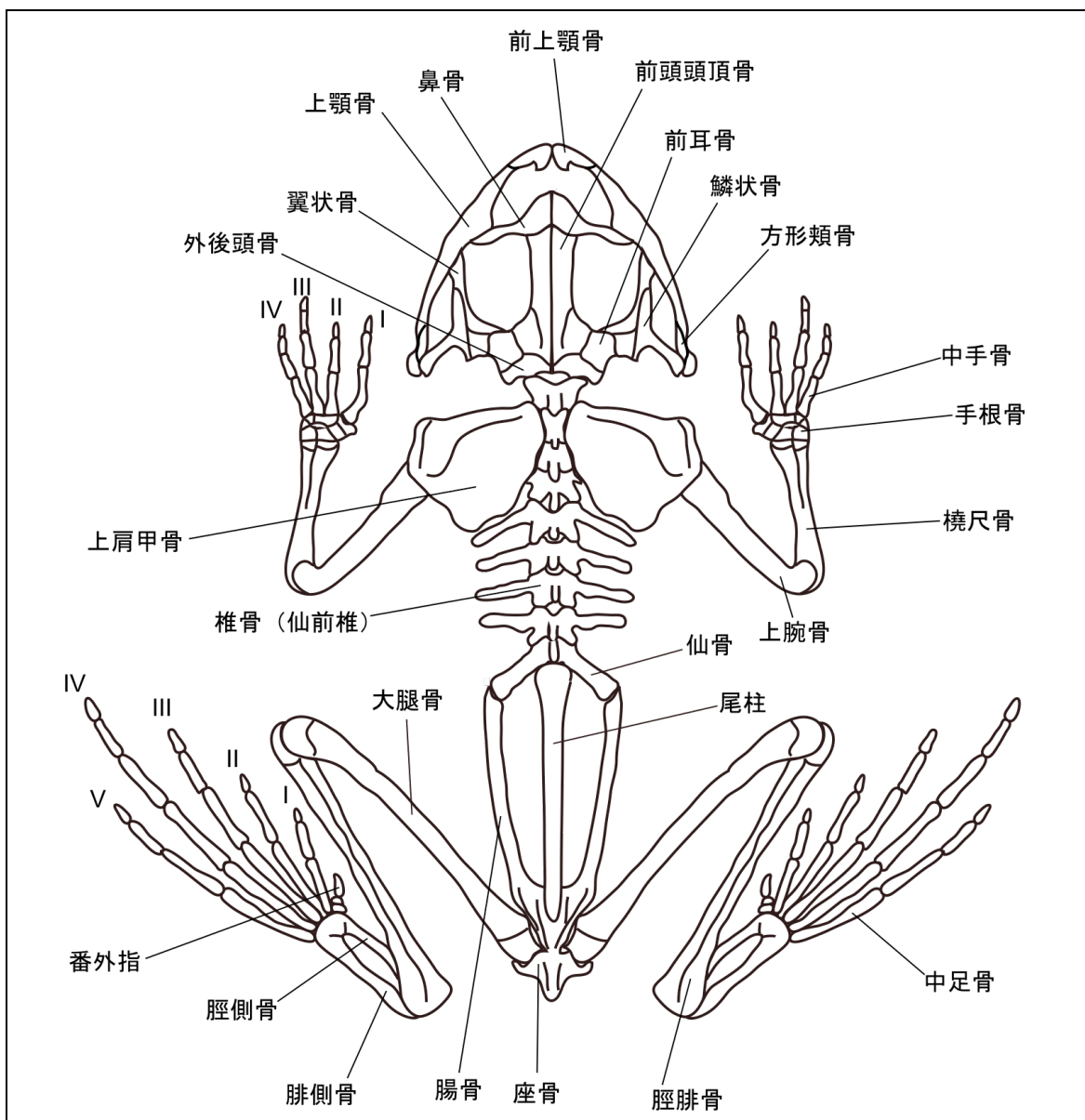


図1. カエルの骨格と骨の名称.

問5 アカハライモリの頭蓋骨を背面からスケッチし、それを構成している下記にあげる骨をスケッチ中に示しなさい。なお、スケッチは略図でかまわない。(12点)

[上顎骨、鱗状骨]

第三部

与えられた標本の観察を、実体顕微鏡等を用いて行い、次の設問に答えなさい。標本は、乾くと鱗等が破損する。適宜水に浸し、鱗を湿らせてから観察すること。また、標本の分解は行わないこと。もし、標本に腹部の解剖跡以外の破損があり観察しにくい場合は、交換するので、挙手で知らせること。

問 6 与えられたトカゲの標本の標本番号を、標本に付いているラベルを見て、記入しなさい。次に、頭部の観察を行い、次の鱗が存在した場合は○、存在していなかった場合は×を記入しなさい。鱗の名称や位置は図 2 を参考にしなさい。

(計 12 点)

- 吻端板 (吻端にある 1 枚の鱗)・・・ []
 鼻板 (鼻孔があいている左右一対の鱗)・・・ []
 上鼻板 (鼻板に上方で接している左右一対の鱗)・・・ []
 頭頂間板 (頭頂部にある 1 枚の鱗)・・・ []

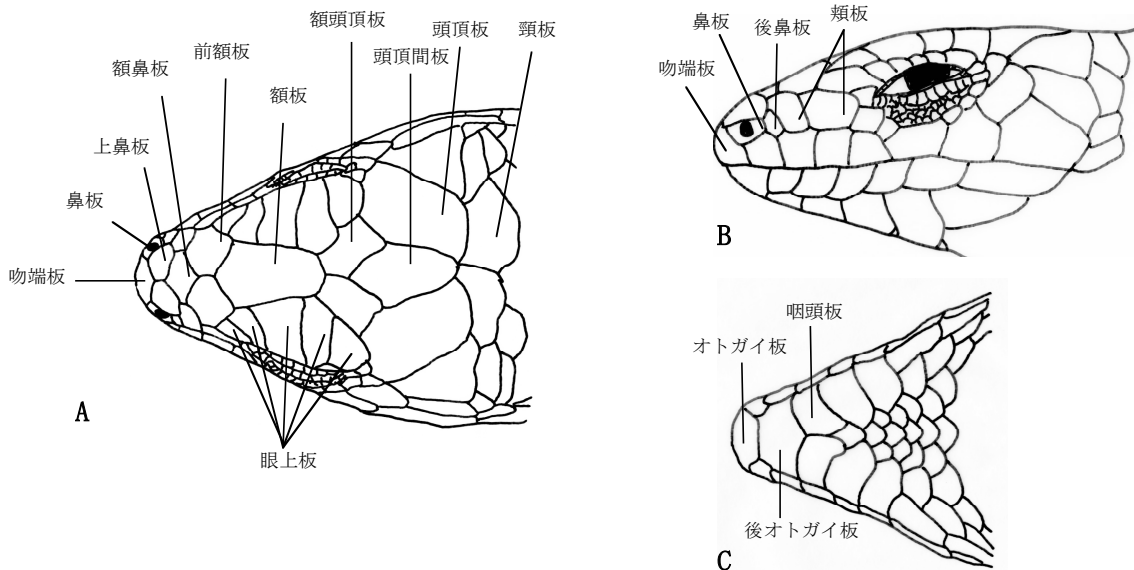


図 2. 代表的なトカゲの頭部の鱗の配置と鱗名. 背面 (A), 側面 (B), 腹面 (C).

問 7 胴中央部 (解剖跡の後端) の体鱗列数を図 3 と図 4 にしたがって数え、何列あるか答えなさい。途中で分岐があった場合は、多い方の列数を答えなさい。

(5 点)

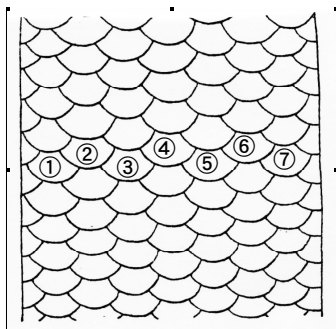


図 3. 体鱗列数の数え方. 白丸の通り、胴周りの鱗の列を数える.

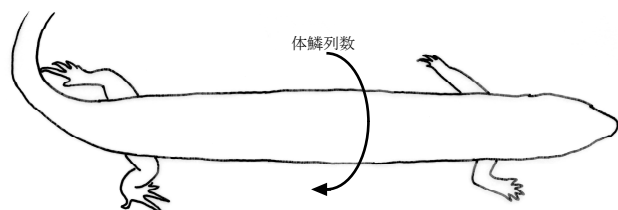


図 4. 体鱗列数の数え方の方向. 体鱗列数は胴中央部で、胴周りの鱗の列を一周数える.

問 8 下の検索表をもとに、このトカゲの種名を同定しなさい。鱗の名称や数え方等は図 2 から図 7 を参考にしなさい。(8 点)

[検索表]

上鼻板がある。

下^{まぶた} 鱗におおわれている。

後オトガイ板は 2 枚あって前後に並んでいる。……………キシノウエトカゲ

後オトガイ板は 1 枚しかない。

後鼻板がある。

体鱗列数は胴の中央部で 24～30 列ある。

体鱗列数は胴の中央部で普通 26 列、時には 24 列ある。……………ニホントカゲ

体鱗列数は胴の中央部で普通 28 列、時には 30 列ある。……………オカダトカゲ

体鱗列数は胴の中央部で 22 列ある。……………バーバートカゲ

後鼻板がない。

体鱗列数は胴の中央部で 26 列ある。……………オキナワトカゲ

体鱗列数は胴の中央部で 28 列ある。……………オオシマトカゲ

下^{まぶた} 鱗は 1 枚の透明な膜で出来ていて、鱗におおわれていない。……………ミヤコトカゲ

上鼻板がない。

額板は後方で狭まり、常に単一であり、頭頂板はよく分化している。

体は比較的太く、頸^{けい}板から後肢の基部までの間の鱗(背中線上鱗数)が 59～66 枚くらいある。

後肢第四指に 14～16 枚の指下板をそなえている。……………サキシマスベトカゲ

体は比較的細長く、頸^{けい}板から後肢の基部までの間の鱗(背中線上鱗数)が 66～70 枚くらいある。

後肢第四指に 11～13 枚の指下板をそなえている。……………ツシマスベトカゲ

額板は非常に長くて後方でも幅が広く、中央部でくびれているかあるいは前後 2 枚の鱗板に分かれていて、頭頂板はないかあるいは小形である。……………ヘリグロヒメトカゲ

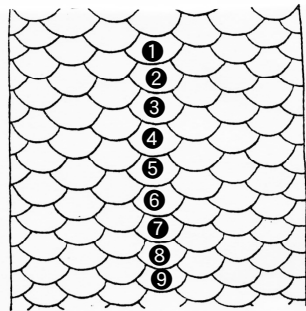


図 5. 背中線上鱗数の数え方. 黒丸の通り数える.

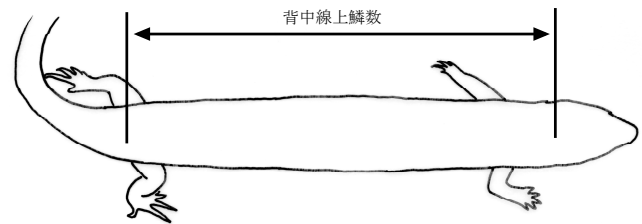


図 6. 背中線上鱗数の数え方の方向. 頸板から後肢の基部の上の鱗まで、背中の中の中央の鱗を縦に数える.

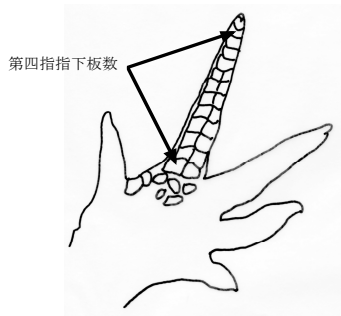


図 7. 指下板数の数え方. 後肢の場合は、第四指が一番長くなるので、その指の裏の鱗を矢印から矢印まで数える.

第四部

トカゲ類の種の同定では、鱗の状態の他に、肢や指の長さ等も使用する場合があります。いま、A種とB種という2種のトカゲの後肢の長さとお後肢の第四指の長さを計測すると、以下の表のようになった。単位はミリメートルである。実際の生物学では、得られたデータに対して様々な統計処理を行い、その結果に基づいて判断することが必要であるが、ここでは平均、分散、グラフからわかる範囲で解答せよ。

表1. トカゲ2種の後肢長とお後肢の第四指長

A種		B種	
後肢長	第四指長	後肢長	第四指長
15.5	4.8	13.2	3.8
13.2	3.2	14.6	5.1
16.9	5.9	13.8	4.6
12.0	2.4	12.4	3.3
15.7	4.9	15.7	5.6
18.0	7.0	14.3	4.8
13.0	3.0	13.4	3.6
14.1	4.0	13.0	3.6

問9 後肢長を横軸に、後肢の第四指長を縦軸にしてグラフを描け。ただし、A種は○、B種は×で描くこと。(8点)

問10 データのばらつきの程度は分散という値で表され、分散の値が大きいほどばらつきが大きいと判断する。分散は、以下の式で求められる。いま、A種の第四指長の分散を計算すると、以下のようになった。同様に、B種の第四指長の分散を四捨五入して小数第1位まで求めよ。ただし、A種の後肢長の平均は14.8 mm、A種の第四指長の平均は4.4 mm、B種の後肢長の平均は13.8 mm、B種の第四指長の平均は4.3 mmである。(5点)

$$\begin{aligned} & \text{A種の第四指長の分散} \\ & = (\text{データ}-\text{平均値})^2 \text{の総和} \div (\text{データ数}-1) \\ & = \{(4.8-4.4)^2 + (3.2-4.4)^2 + (5.9-4.4)^2 + (2.4-4.4)^2 + (4.9-4.4)^2 + (7.0-4.4)^2 + (3.0-4.4)^2 + (4.0-4.4)^2\} \div (8-1) \\ & = 2.4 \end{aligned}$$

問11 次の例に習い、平均、分散、グラフからわかることを、簡潔な箇条書きで3つ述べよ。(計12点)

<例> A種はB種より、後肢長の平均と第四指長の平均が大きい。

実験試験 動物形態学 解答用紙

受験番号	氏名

第一部

問 1

キンギョを解剖し、各構造に対応する番号がラベルされたまち針を刺しなさい。
なお、採点は解剖標本の写真と審査員による実際の標本の確認に基づいて行います。

問 2

A []

B []

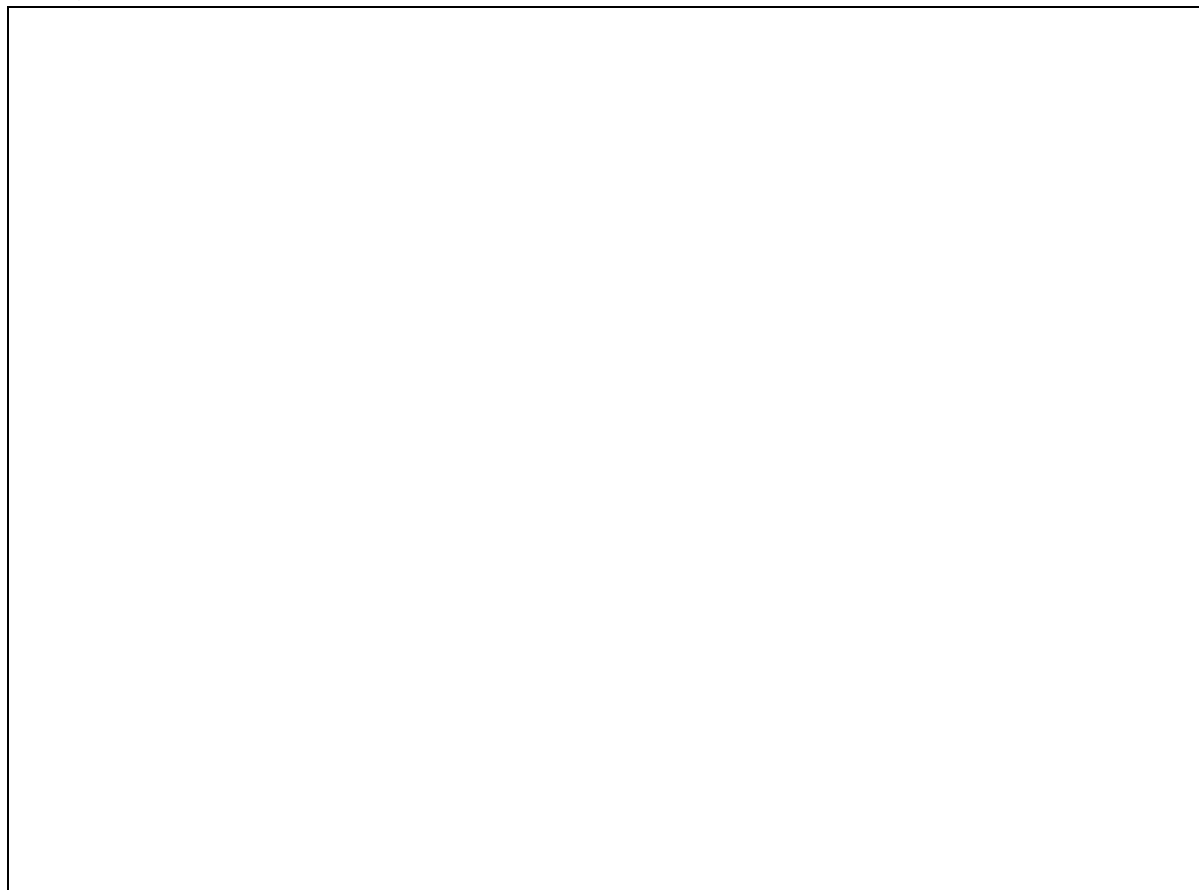
C []

D []

E []

問 3

下の枠内にスケッチを描きなさい



実験試験 動物形態学 解答用紙

受験番号	氏名

第二部

問 4

相違点 1 []

相違点 2 []

相違点がみられる理由 (40 字以内)

問 5

下の枠内にスケッチを描きなさい

実験試験 動物形態学 解答用紙

受験番号	氏名

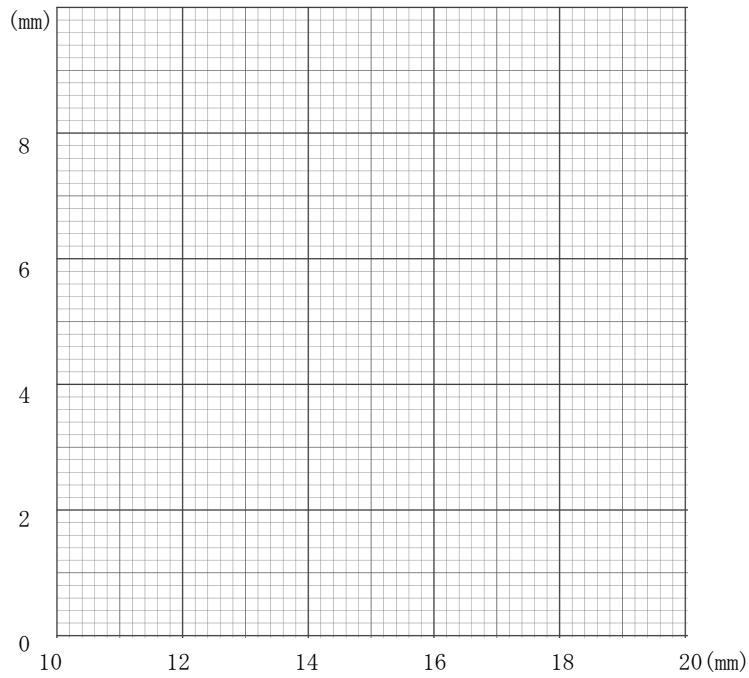
第三部
問 6

標本番号	吻端板	鼻板	上鼻板	頭頂間板
KUZ R				

問 7

問 8

第四部
問 9



問 1 0

問 1 1

日本生物学オリンピック2010 つくば

生物チャレンジ2010第2次試験



生物
チャレンジ
2010
TSUKUBA

実験試験4 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3枚です。

解答用紙の全てに受験番号、氏名を記入しなさい。

はじめに

我々のからだを流れる血液には赤血球、白血球など様々な種類の血球が存在します。これらの血球には寿命があり、一定期間機能した後は死んでゆきます。その一方で、血球は骨髄の造血幹細胞から絶えず供給されており、その数は保たれています。

造血幹細胞は様々な血球へと分化することのできる多能性のある細胞で、その増殖および各血球系への分化は、様々な液性因子によって制御されています。液性因子の一つである顆粒球コロニー刺激因子(GM-CSF)は、細菌感染などのストレスによって分泌が促進され、様々な免疫担当細胞の増殖と分化そして生存を制御します。一方、これらの細胞はGM-CSF非存在下ではプログラム細胞死を起こします。このプログラム細胞死ではヌクレアーゼが活性化され、細胞自らのDNAを切断します。

本実験試験では、GM-CSF 依存性の血球細胞を、GM-CSF と増殖因子の存在下で培養し、細胞の生存と増殖がどのように制御されるのか調べます。また、プログラム細胞死を起こした細胞から DNA を精製し、その切断パターンをアガロースゲル電気泳動で調べます。

以下のタスクを時間内に正確に行えたか評価します。

- タスク 1 生細胞と死細胞を見分けて、それぞれの数を数える。
- タスク 2 細胞の総数を計算し、DNA 精製に必要な数を分取する。
- タスク 3 DNA を精製する。
- タスク 4 精製した DNA を電気泳動する。

<実験はおおよそ90分かかります。実験1の間1c)まで進んだら、実験2を開始し、その実験の待ち時間を利用して、問1d)、および問2を解答しなさい。>

以下の実験材料と機器が揃っているか確認しなさい。
ないものがあつたら手を挙げなさい。

材料と実験器具

15ml チューブ立て

培養細胞 (3種類) 15ml チューブ(1-3)	3本
血球計算盤 (C-Chip)	2枚 (4サンプル分)
カウンター	1個

1.5ml、2.2ml チューブ立て

1列目	トリパンプルー溶液 (TB)	1本
	バランス用チューブ (Ba)	1本
2列目	細胞溶解液 (1)	1本
	タンパク質沈殿液 (2)	1本
	RNase (RN)	1本
	イソプロパノール (Iso)	1本
	70%エタノール (E)	1本
	DNA溶解液 (3)	1本
	ローディングバッファー (L)	1本
	分子量マーカー (M)	1本
3列目	空チューブ 1.5ml チューブ	10本
	2.2ml チューブ	6本
ピペットマン (P20, P200, P1000)		各1本
チップ (黄色)、フィルター付きチップ (白)		各1箱
フロート (番号が記入されてことを確認しなさい)		1枚
定規		1本
付箋		1綴
電気泳動装置		1台
アガロースゲル (泳動装置の中にあります)		1枚
顕微鏡		1台
遠心機		1台

試験時間は 90 分です。「はじめ」の合図までページを開いてはいけません。
「はじめ」の合図で、解答用紙の全てに受験番号と氏名を書きなさい。

実験 1 生細胞と死細胞の観察と計数

15mlチューブ(1-3)には、 2.5×10^6 個の細胞を3種類の培地(表1)で18時間培養したものが5mlずつ入っています。この実験では、各チューブ内の生細胞と死細胞の数を数え、各チューブがどの条件で培養されたものであるか答えます。

表1 培養条件

条件	GM-CSF	増殖因子
✓	あり○	あり○
✓	あり○	なし×
✓	なし×	あり○

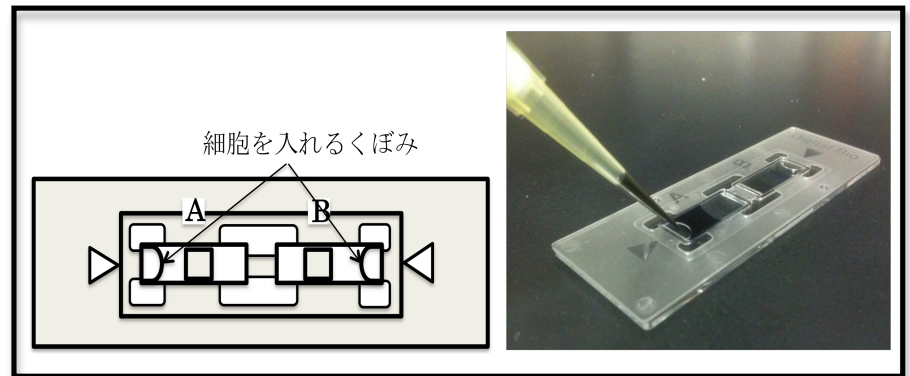


図1 血球計算盤

細胞の数を数えるため、まず15mlチューブ1の細胞を均一に混ぜなさい。細胞はチューブの底に沈んでいるため、チューブを逆さにしながら底を軽く叩き、2-3回転倒混和（上下を逆にしながら混ぜ合わせる）しなさい。細胞25 μ lを1.5mlの空チューブに取り、トリパンブルー溶液(TB)を等量加えなさい。数回ピペッティング（一部を軽く吸ったり吐いたりして攪拌すること）し、細胞を均一に混ぜなさい。

血球計算盤 C-Chipを袋から出し、染色した細胞（30 μ l分）を矢じり（ Δ ）の先にある半円のくぼみから入れなさい（図1）。なお血球計算盤1枚で2サンプル分の細胞を計数できます。細胞は長時間染色液中におくと死んでいくので、チューブ1の計数が終了するまでは、チューブ2の染色はしないで下さい。

顕微鏡（4倍の対物レンズ）で、血球計算盤の標準目盛（図2）にピントを合わせなさい。次いで10倍の対物レンズで細胞を観察しなさい。生きている細胞はトリパンブルーを排除するため染色されず、死んでいる細胞は青く染色されます（図3）。

なお顕微鏡のコンデンサー絞りは一番閉じてあります。各自、標準目盛と細胞が見えやすい位置に絞りを調整しなさい。

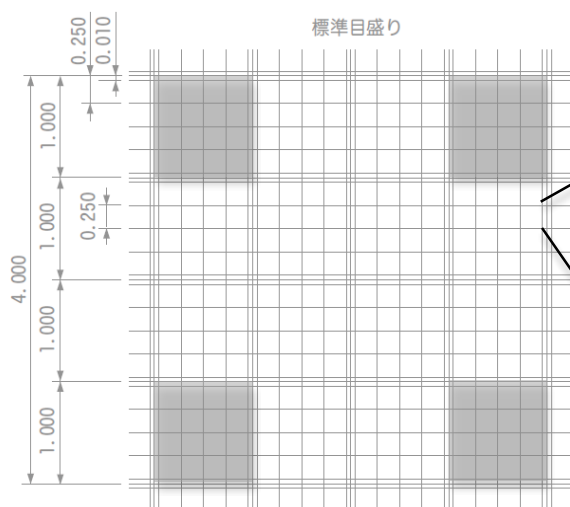


図2 標準目盛 (mm)

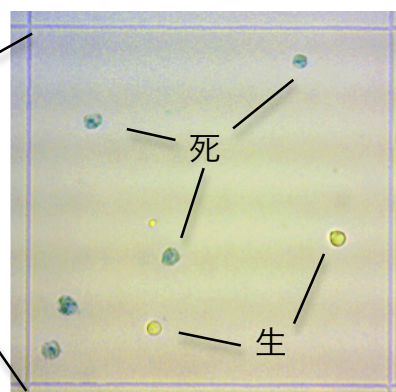


図3 生細胞 (白) と死細胞 (青)

問1 細胞の計数

- a) 1mmx1mm四方 (図2 : 灰色部分) の区画に存在する生細胞と死細胞の数を数え、4区画の平均値を求めなさい。チューブ1の計数が終わったら、同様にチューブ2、3についても、それぞれ生細胞と死細胞の数の平均値を求めなさい。各サンプルの生存率 (生存率[%]=生細胞/[生細胞+死細胞]x100) を計算しなさい。
- b) この血球計算盤の厚さは0.2mmです。上記1区画の細胞数がN個だった場合に、5ml中に存在する細胞の総数を求める計算式を答えなさい。また各サンプルの総数を計算し、有効数字を2桁として $X \times 10^Y$ のように表しなさい。(例: 2.5×10^7)
- c) 15mlチューブ1、2、3の細胞は、表1のどの条件で培養されたものでしょうか。
- d) 血球細胞がプログラム細胞死を起こすことの重要性は何でしょうか。

実験 2 DNAの調整

問1cで「GM-CSF○/増殖因子○」および「GM-CSF×/増殖因子○」と判断した細胞からDNAを精製します。前者をサンプルA、後者をサンプルBとして、各15mlチューブから 2.0×10^6 個相当の細胞（細胞の生死は区別しない）を分取し、それぞれ空の2.2mlチューブ（サンプル名は各自で記入しなさい）に移しなさい。1サンプルが2.2ml以上になる場合はチューブを複数本使ってかまいません。サンプルA、Bとした15mlチューブ番号(1-3)と、分取した量（ml）を記入しなさい。

以下の手順に従って、サンプルA、BのDNAを精製します。手順1の開始時刻を解答用紙に記入しなさい。

手順：

1. チューブA、Bを遠心（14000rpm10秒）して細胞を集めなさい。

チューブが奇数本の場合はバランス用チューブ(Ba)を作成して遠心すること。

2. 沈殿した細胞塊を崩さないように注意深くピペットで上清を取り除きなさい。上清の残りは10-20 μ l以内になるようにしなさい。なお、サンプルが複数本ある場合は、細胞塊を300 μ l程度の上清に懸濁し直し、1本にまとめた後に再度遠心しなさい。

3. チューブの底を叩いて細胞塊をほぐし、細胞溶解液(1) 300 μ lを加えなさい。1-2回ピペッティングし、細胞を均一かつ完全に溶解させなさい。

4. RNase(RN)を2 μ l加えて、20回転倒混和しなさい。フロートにチューブを挿し、付箋にフロートの番号、受験番号、時刻を記入して、手を挙げてサンプルと付箋をTAに渡しなさい。TAが37 $^{\circ}$ Cで5分間反応させます。反応終了後、TAがサンプルを氷冷し、返却します。

5. 各チューブにタンパク質沈殿溶液(2) 100 μ lを加え、15秒間激しく振り、遠心(14000rpm2分) 下さい。
6. この時点でタンパク質が固く沈殿しますが、沈殿は見えない場合もあります。上清を全て新しい1.5mlチューブに移して下さい。タンパク質の沈殿を混ぜないように注意して下さい。
7. 上清にイソプロパノール(Iso) 300 μ lを加えて、25回転倒混和し、遠心(14000rpm 3分) 下さい。なおDNAは遠心力によってチューブ底の遠位に沈殿するため、チューブの向きを決めて遠心すると良い。
8. 上清のイソプロパノール溶液を捨て(イソプロパノール溶液は10 μ l程度残っていても構わない)、DNAの沈殿に70%エタノール(E) 400 μ lを加え下さい。数回転倒混和し、再度遠心(14000rpm 1分) 下さい。
9. 遠心後、手順8と同様に上清のエタノールを捨て下さい。このステップではDNAを乾燥させるため、エタノール溶液を完全に除去する必要があります。チューブに残っている溶液は遠心(14000rpm 2秒) で沈殿させ、最後の一滴まで抜き取り下さい。(DNAが見えなくともチューブ底(遠位)にDNAがあることを信じて行いましょう！)
10. DNAが乾燥したら、DNA溶解液(3)をチューブAに90 μ l、チューブBに18 μ l加えて、溶解させ下さい。
11. ローディングバッファー(L)が1/10容量となるよう各サンプルに加え下さい。

実験3 DNAのアガロースゲル電気泳動

精製したDNAをアガロースゲル電気泳動します。DNAは負の電荷をもつため、アガロースゲルに入れて電流を流すとゲル内を移動し、その分子量に従って分離されます。

ゲルの左端のウェル（穴）にDNAの分子量マーカー(M) 5 μ l、次いでサンプルAおよびBを10 μ lずつ入れて、100V定電圧で20分間通電しなさい。

通電開始時間を解答用紙に記入しなさい。また付箋に受験番号と通電開始時刻を記入し、電気泳動槽のフタに貼りなさい。20分後あるいは実験終了の合図で、電源を切りなさい。通電開始時間を目安にTAが追加泳動し、ゲルの写真を撮ります。

実験は以上です。写真（図4）は、上記と同様に調整したDNAを電気泳動したものです。以下の問に答えなさい。

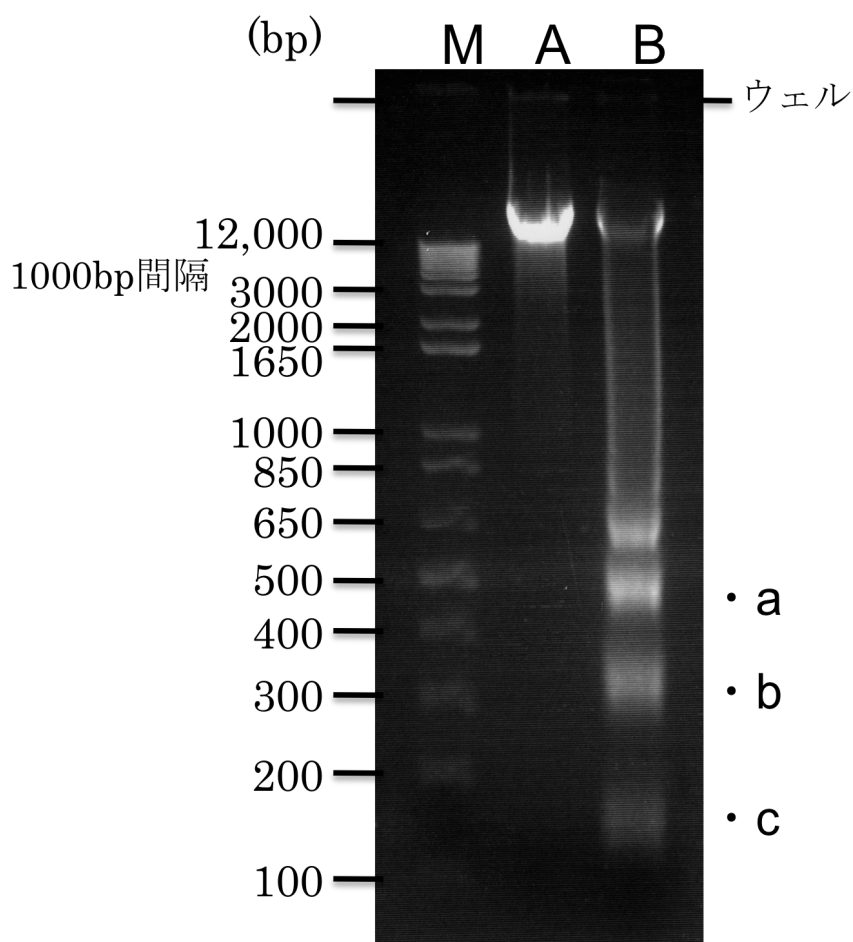


図4 電気泳動写真

問2 DNAのアガロース電気泳動

- a) 分子量マーカーの DNA 長(塩基対数)を片対数グラフの縦軸に、泳動距離(cm)を横軸にプロットして、検量線を書きなさい。なおグラフ目盛の数值は各自で記入しなさい。
- b) 検量線をもとにサンプル B の DNA バンド (a,b,c) のおおよその長さ (塩基対数 (bp)) を測定しなさい。また ab 間および bc 間の長さの差(a-b, b-c)を計算し、その平均値を求めなさい。
- c) プログラム細胞死では、ヌクレアーゼが活性化されて DNA を切断します。このヌクレアーゼが切断する塩基配列は頻繁に存在するため、精製された DNA であれば 100bp 以下にまでバラバラに DNA を切断します。しかし、サンプル B の DNA はある特徴をもって切断されています。その特徴および理由 (100bp 以下にならず特徴的に切断される理由) を説明しなさい。