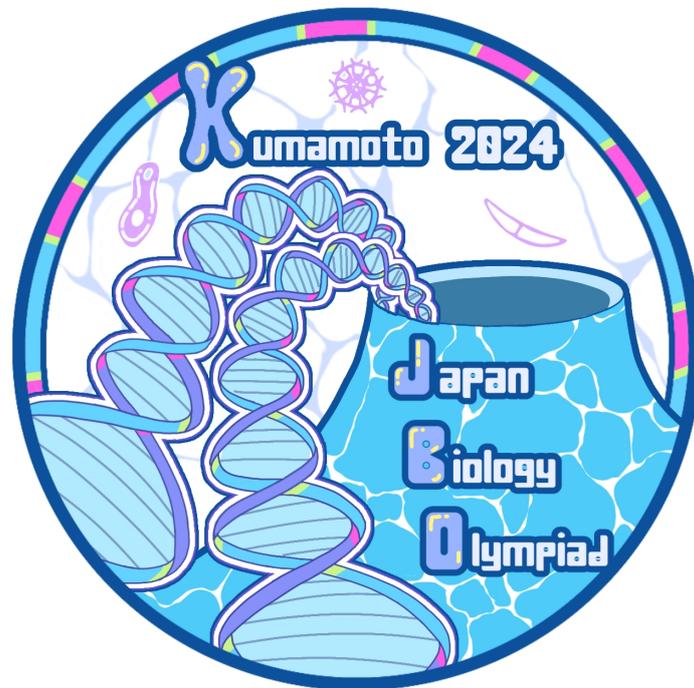


日本生物学オリンピック

熊本大会 2024

大問 1



2024年8月26日

制限時間 120分

【重要】このページに書かれた作業を完了してから、次のページへ進むこと

実験器具・試薬についての確認(5分以内に完了させること)

最初に、以下の観察器具や試薬が全て揃っているかを確認すること(確認できた項目の□に印を付けること)。揃っていない場合は、挙手にて試験監督に知らせること。なお、試験開始から5分後以降の申し出については対応できない。確認が終わり次第、次のページに進んでよい。

試料

- 生きた植物試料が入った寒天培地のシャーレ(シャーレ1)
- 固定・脱色済みの植物試料が入ったシャーレ(シャーレ2)
 - 中の液をこぼさないよう、注意して取り扱うこと。
- メダカの鱗が入った4穴シャーレ(蓋に「A、B、C、D」の表記がある)
 - 中の液をこぼさないよう、注意して取り扱うこと。

器具

- 光学顕微鏡
- LEDライト1本(点灯するかどうか確認)
- ルーペ
- ピンセット2本
- スライドグラス3枚
- カバーグラス2枚
- 2穴ホールスライド2枚
- 4穴シャーレ2枚
- 15ml チューブ2本
- スポイト4本(うち1本に油性マジックで印が付いているかどうか確認。)
- 紙ワイパー4枚
- 手袋2枚
- 油性マジック1本

試薬

- 透明化液(蓋に「と」と記載された1.5ml チューブ)
 - 皮膚腐食性及び皮膚刺激性のある成分を含むため、取扱の際は手袋を着用すること。
- ノルアドレナリン液(蓋に「Nor」と記載された1.5ml チューブ)
- アセチルコリン液(蓋に「Ach」と記載された1.5ml チューブ)
- 生理食塩水(蓋に「生食」と記載された50ml チューブ)

問題 1

下記の文章を読み、設問に答えなさい。

シロイヌナズナは孢子体の核相が $2n$ の双子葉植物であり、自家受粉によって繁殖する。野生型の遺伝子型を持つ種子から発芽した芽生えは、2つの子葉と1つの胚軸、および1つの幼根の3種類の器官からなり、体の末端部には茎頂分裂組織と根端分裂組織が存在する。葉や茎などシユート器官は、茎頂分裂組織の細胞が分裂することによって生み出される。

シャーレ1には、正常な形をしたシロイヌナズナの芽生え(以下、正常型)と、カップ状の子葉を持つ芽生え(以下、カップ型)の2種類が混在している。正常型では2つの子葉が展開し、本葉の形成も始まっている。カップ型では形態形成に関わる遺伝子の変異のため、2つの子葉が縁で融合している。

問 1

正常型の子葉の間にある部分(以下、茎頂部)の顕微鏡観察を行う。そのため、以下の方法で試料を作製する。シャーレにある限り、良好な試料ができるまで正常型をいくつ用いてもよい。

1. シャーレ1のシールを剥がし、フタを開ける。シールは以後不要なので、丸めて邪魔にならない場所に置くこと。
2. 図1を参考に、植物を観察するための試料台を作製する。シャーレ1上で植物が生えていない場所を選び、そこから1 cm 四方程度の大きさの寒天片を2つ、ピンセットの先端を用いて切り取る。多少形が崩れても問題ない。寒天片の表面を上に向けたままスライドグラス上へ載せる。以下、これをスライドグラス1とする。閉じたピンセットの先を寒天片の中央部に鉛直方向に突き刺し、深さ2~3 mm ほどの小さな穴を開ける。

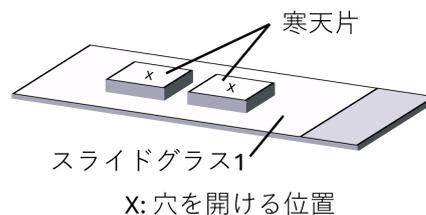


図1

3. ルーペを用いてシャーレ1を観察し、大きさも形態も平均的な正常型の個体の一つ選んだうえ、胚軸と根の接続部をピンセットでつまんで持ち上げる。根の部分は不要なので、もう一つのピンセットを使って切り離し、シャーレ1上の空いている場所に戻す。スライドグラス1上の一方の寒天片の穴に、胚軸を下に向けて差し込む。植物体ができるだけ真上を向くよう、向きを調整する。
4. シャーレ1上の植物の乾燥を防ぐため、フタを閉める。

5. 顕微鏡の対物レンズを4倍の位置に合わせ、スライドグラス1を顕微鏡のステージ上に置く。試料が対物レンズの真下になるようにステージの位置を調整した後、顕微鏡を覗いて試料に焦点を合わせる。さらにステージを動かし、茎頂部の中央を視野の真ん中の位置に合わせる。

上記の操作を行った後、4倍の対物レンズで試料をスケッチせよ。スケッチは、視野中に見える全ての器官の輪郭がわかればよい。本葉の表面には枝分かれしたトゲが多数観察されるが、各本葉につき一つのトゲだけをスケッチに加え、他のトゲは省略せよ。

問2

次にカップ型について以下の操作で試料を作製し、顕微鏡観察を行う。

1. スライドグラス1を机上へ戻す。
2. ルーペでプレート1を観察し、平均的な大きさのカップ型個体で口が大きく開いているものを選ぶ。口が開いた個体が見つからない場合は、口が閉じた個体の子葉側面をピンセットで優しく挟み、口を広げる。選んだ個体の根と胚軸の接続部をピンセットでつまんで持ち上げ、もう一方のピンセットで根を取り除く。
3. スライドグラス1のもう一つの寒天片の穴に、胚軸を下に向けて差し込む。
4. 顕微鏡の対物レンズを4倍の位置に合わせ、スライドグラス1を顕微鏡のステージ上に置く。試料が対物レンズの真下になるようにステージの位置を調整した後、顕微鏡を覗いて試料の最上部に焦点を合わせる。さらにステージを動かし、カップの中央を視野の真ん中の位置に合わせる。
5. 顕微鏡の接眼レンズからいったん目を離し、肉眼で試料を確認しながら対物レンズを10倍に切り替える。再び顕微鏡を覗き、カップの「底」に相当する部分に焦点を合わせる。

上記の操作を行った後、10倍の対物レンズで試料をスケッチせよ。その際、カップの「底」における個々の細胞の形が明瞭に分かるようにすること。スケッチする細胞数は10個程度で、残りの細胞は省略して良い。

問3

シャーレ1に播種したのは、ある1個体のシロイヌナズナの自家受粉により得られた種子ストック(以下ストックS)の一部である。以下の設問(ア)と(イ)で、ストックSの親個体の遺伝子型を推定する。

- (ア) 図2は、同じストックSからランダムに種子を選んで発芽させた芽生えの写真で、画像処理により植物体の緑色の部分だけ抽出している。この図の全ての個体について正常型かカップ型かを判別し、それぞれの個体数を求めよ。また、全個体数に対するカップ型の個体数

の割合を百分率(%)で求めよ。百分率の数値は小数第二位を四捨五入し、小数第一位まで書き記すこと。

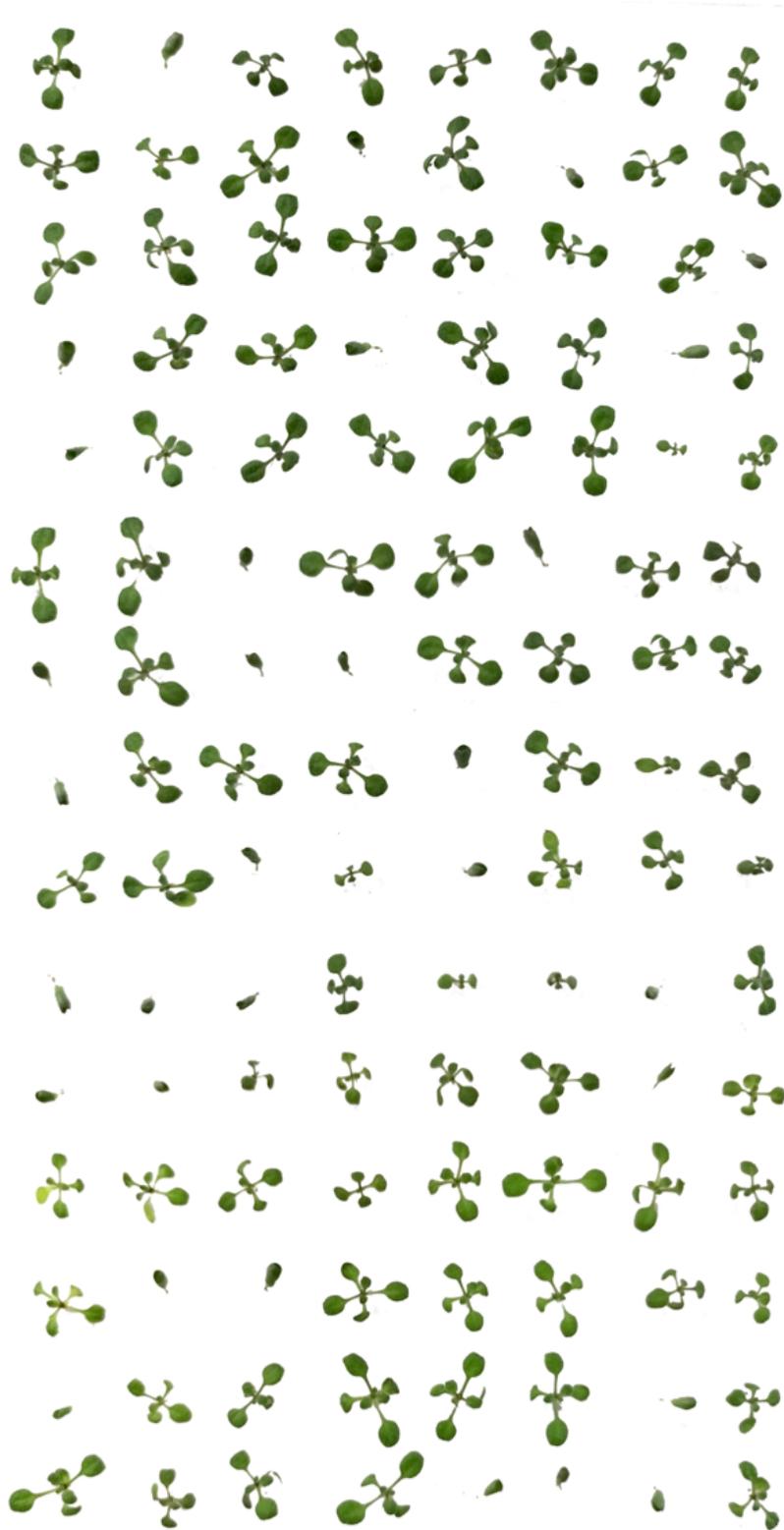


図 2

(イ) カップ型の表現型は、異なる染色体上に存在する 2 つの遺伝子座の機能欠損型変異が関係する。野生型の対立遺伝子をそれぞれ A と B、機能欠損型の対立遺伝子をそれぞれ a と b で表すとすると、aabb の遺伝子型をもつ個体のみカップ型の形状を示し、その他はすべて正常な形態を示すことがわかっている。ストック S から発芽させた芽生えのうち正常な個体を 1 つ選んで生育させ、自家受粉させた次世代の種子を 100 粒播種したところ、全ての芽生えは正常型であった。次にこの 100 個体の中から 1 個体を選び、あらかじめ遺伝子型が AAbb であることが分かっている別の個体と交配して F1 種子を得た。この F1 を播種して生育させ、自家受粉させた F2 の種子を播種したところ、カップ型の芽生えが生じた。これらの結果から、ストック S の親植物の遺伝子型を推定し、アルファベット 4 文字の組み合わせで答えよ。また、F2 種子を 250 粒発芽させた時のカップ型個体数の期待値を計算せよ。数値は小数第二位を四捨五入して小数第一位で答えよ。

問 4

A および B 遺伝子の機能を詳しく調べるため、茎頂分裂組織で特異的に発現する C 遺伝子の発現を、野生型個体とカップ型個体で比較することにする。図 3 は C 遺伝子の構造、および C の発現を調べるために作製された組み換え遺伝子 C' の構造の模式図である。

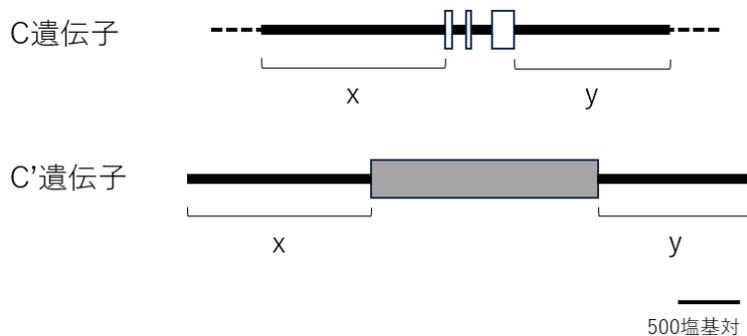


図 3

図 3 の白い四角は C がつくるタンパク質のアミノ酸配列がコードされた配列(コード配列)を示し、グレーの四角は大腸菌に由来する酵素 D のコード配列を示す。また、x と y はそれぞれ同一の DNA 配列である。いずれの模式図も、転写が左から右へ進む方向に揃えてあり、右下の 500 塩基対の線と同一の縮尺で描かれている。酵素 D は、無色の基質 X を青い色素 X'へと変換する化学反応を触媒する。C および C'に関する次の選択肢①～⑤のうち、適切なものを全て選べ。

- ① 転写の際に RNA ポリメラーゼが最初に結合する配列は、x より少し右側に存在する
- ② C から転写された mRNA 前駆体ではイントロンよりエキソンの数が多い
- ③ C の転写は、一番左のコード配列の左側末端より開始し、一番右のコード配列の右側末端で終結する
- ④ C から翻訳されるポリペプチド鎖は、C' から翻訳されるポリペプチド鎖よりも短い
- ⑤ 原核生物である大腸菌と真核生物である植物ではコドンが一部異なるため、C' をシロイヌナズナに導入したときにつくられる酵素 D は、大腸菌がつくる酵素 D と一部アミノ酸配列が異なる

問 5

組換え遺伝子 C' で形質転換した野生型シロイヌナズナを、基質 X が入った溶液に浸した状態で 12 時間反応させたところ、茎頂分裂組織の細胞のみが青く染色された。また、別の実験で C および C' が転写される部位を調べたところ、C' の形質転換体で染色が起こる部位と一致した。これらの実験結果から推測されることとして適切なものを、以下の選択肢①～⑤の中から全て選べ。なお、基質 X はシロイヌナズナのどの細胞にも均一に浸透し、C' から生じた mRNA はシロイヌナズナのどの細胞でも同じ効率で翻訳されるものとする。また、C' はシロイヌナズナのゲノム中で遺伝子が存在しない部位に挿入されており、A、B、C を含むいずれの遺伝子機能にも影響を与えないものとする。

- ① 遺伝子を茎頂分裂組織で特異的に転写するために必要なエンハンサーは、y の領域には含まれない
- ② 遺伝子を茎頂分裂組織で特異的に転写するために必要なエンハンサーは、x と y のどちらの領域にも含まれる
- ③ X から生成された X' は細胞内にとどまり、周囲の細胞への拡散は無視できる
- ④ D は大腸菌の酵素であるため、シロイヌナズナの細胞内では活性を持たない
- ⑤ 野生型のシロイヌナズナの細胞には、D と同じ活性を持つ酵素は存在しない

問 6

シャーレ 2 には、組換え遺伝子 C' が導入された野生型個体(遺伝子型 AABB)と、同じく C' が導入されたカップ型個体(遺伝子型 aabb)のそれぞれを、基質 X を含んだ溶液で 12 時間反応させた植物試料が入っている。染色部位の観察を容易にするため、反応終了後に試料からクロロフィルは取り除いている。以下の手順でこれらの植物をスライドグラス上に載せ、顕微鏡観察用の試料を作製する。

1. 透明化液が手に付着するのを防ぐため、手袋を着用する。
2. 新しいスライドガラスを1枚、机上の空きスペースに置く。以下これをスライドガラス2とする。シャーレ2から野生型の芽生えを2個体選び、両者をピンセットでスライドガラス2の中央部に並べ、向きを整える。後の操作でカバーガラスを載せたときに、はみ出さないように並べる。また、観察対象である茎頂部分は直接触れないよう注意する。余分な液は、紙ワイパーの角を使って取り除くこと。
3. 予備体験で使用したスポイト(油性マジックで印をつけたもの)を使用して、試料に透明化液を滴下する。50 μ Lの位置(図4、矢印)まで透明化液を吸い上げ、スライドガラス2の中央部に載せる。



図4

4. カバーガラスを載せる。その際、カバーガラスおよび透明化液がスライドガラス2からはみ出さないよう、細心の注意を払うこと。
5. 続いて別のスライドガラスを机上の空きスペースに置く。以下、これをスライドガラス3とする。シャーレ2よりカップ型の芽生えを2個体選び、1~4の操作を行う。
6. 作製した観察用スライド2枚について、底面および側面に液が付着していないことを確認する。付着している場合は、紙ワイパーで丁寧に拭き取る。
7. 手袋を外す。

作製した試料を顕微鏡で観察し、以下の設問(ア)~(ウ)に答えよ。

- (ア) 正常型およびカップ型それぞれについて、染色の有無を述べよ。染色が有る場合、その部位がどこであるかを、他の器官との相対的な位置関係から説明せよ。
- (イ) 上記の結果および問1-1と問1-2の観察結果から、カップ型個体では茎頂分裂組織にどのような異常が生じていると結論できるかを述べよ。
- (ウ) 遺伝子A、B、Cの間にはどのような相互関係があるかを考察し、簡潔に述べよ。

問題 2

【はじめに】

魚類や爬虫類などの変温脊椎動物では、周囲の環境や個体の緊張状態などに応じて体色に変化する。これは、体表に存在する色素をもった細胞(色素胞)の働きによるものである。色素胞は、色素の色によって大別される。例えば、メダカの鱗には、メラニン顆粒をもち、黒色に見える黒色素胞、カロチノイド顆粒をもち、黄色に見える黄色素胞、また、グアニン顆粒をもち、光を反射して白く見える白色素胞がある。これらの色素胞は、同一の色素胞の元となる細胞(幹細胞)から分化して形成されると考えられている。

メダカから鱗を摘出して生理塩類溶液に浸し、透過照明を用いて顕微鏡で観察すると、色素顆粒が拡散した状態の黒色素胞と、その周辺にある黄色素胞が見える。直接観察することはできないが、色素胞の周辺には色素胞神経の神経終末が密に分布している。また、環境状態の変化により、黒色素胞と黄色素胞は色素顆粒が色素胞の中心部に集まった状態に変化する。この反応は、色素顆粒の凝集反応であり、色素胞の輪郭は変化しないことがわかっている。一方、メダカの鱗を落射照明を用いて観察すると、色素顆粒が色素胞の中心部に集まった白色素胞が見える。また、環境状態の変化により、白色素胞は色素顆粒が拡散した状態へと変化する。

実験上の注意

* 実験液が混和すると正しい結果が得られない場合があるので、無印のスポイト 3 本を適宜使い分けること。

* ふつう、黒色素胞と黄色素胞の観察は透過照明を用い、白色素胞の観察は落射照明を用います。しかし、室内の照明によっては、とくにこれらの照明法を区別しなくても黒色素胞、黄色素胞、白色素胞を観察できる場合があります。状況に応じて観察しやすい照明方法で実験すること。

問 1

野生型メダカから採取した鱗 A と鱗 B に関して、透過照明下および落射照明下で黒色素胞と白色素胞を観察してスケッチせよ。なお、黒色素胞を矢頭、白色素胞を矢印で示し、顕微鏡観察において同じ視野の中に見られる色素胞をそれぞれ5つ程度スケッチせよ。鱗の観察方法は、以下に示した【実験方法 1-1】をよく読んで実施せよ。

問 2

自律神経系が及ぼす黒色素胞と白色素胞への作用を明らかにするため、自律神経系の神経伝達物質であるノルアドレナリンとアセチルコリンの作用を調べる。以下に示した【実験方法 1-2】をよく読んで実験を行い、ノルアドレナリンとアセチルコリンを投与して5分後に、鱗 A と鱗 B の黒色素胞

と白色素胞の変化について記入せよ。さらに、黒色素胞と白色素胞の顆粒運動を調節する自律神経系が交感神経か、あるいは副交感神経かをそれぞれ考察して記入せよ。

問 3

脊椎動物の精神状態は、主に自律神経系のバランスによりコントロールされている。鱗 A と鱗 B の黒色素胞と白色素胞の顆粒運動から判断すると、鱗 B を採取した野生型メダカはどのような自律神経系のバランスと体色になっていると推測されるか、実験結果を踏まえて以下から番号で答えよ。また、このメダカを暗い場所においた場合、どのような自律神経系のバランスと体色になると推測されるか、以下から番号で答えよ。

- ① 交感神経よりも副交感神経の方が優位に働き、体色が黒くなる
- ② 交感神経よりも副交感神経の方が優位に働き、体色が白くなる
- ③ 副交感神経よりも交感神経の方が優位に働き、体色が黒くなる
- ④ 副交感神経よりも交感神経の方が優位に働き、体色が白くなる

問 4

メダカは XX-XY 型の性決定様式をもち、Y 染色体上に存在する性決定遺伝子により性が決定し、XX 個体は雌へ、XY 個体は雄へと分化する。Y 染色体上の性決定遺伝子以外は、X 染色体でも Y 染色体でも同様の遺伝子が存在している。一方、メダカは多くの系統が存在しているが、W 系統は性染色体上の色素胞に関係する遺伝子 w に機能欠損型の劣性(潜性)突然変異を有する系統であり、X 染色体と Y 染色体のどちらか一方、または両方において、この突然変異が確認されている。

まず、W 系統の XX 個体の鱗 C と XY 個体の鱗 D の色素胞を【実験方法 1-1】に従って観察し、次に、以下に示した【実験方法 1-2】を読んで実験を行い、鱗 C と鱗 D との色素胞の違いについて記入せよ。

次に、この系統ではどの染色体上に変異があるか、以下の選択肢から選べ。

- ① X 染色体
- ② Y 染色体
- ③ X 染色体と Y 染色体の両方

また、遺伝子 w は、色素胞に関してどのような働きをしている遺伝子であると推測されるか、考察せよ。

【実験方法 1-1】

- ① 4穴シャーレに入っている鱗 1 枚を、スポイトを使って水ごと2穴ホールスライドに移し(またはピンセットで2穴ホールスライドに移し)、そのホールスライドを正立顕微鏡のステージに置き、透過照明下で鱗を観察すると、黒色素胞と黄色素胞が観察できる。
- ② 透過照明を消し、LED ライトを使って落射照明により鱗を観察すると、白色素胞が観察できる。なお、ほとんどの白色素胞は黒色素胞と上下に重なって存在するため、鱗を黒色素胞の側から観察した場合は白色素胞を観察できないことがある。白色素胞が観察できない時は、鱗を裏返して白色素胞を確認する。
- ③ 必要な事項を解答用紙の所定の欄に記入すること。

【実験方法 1-2】

- ① 用意した神経伝達物質であるノルアドレナリン液とアセチルコリン液を生理食塩水で 10 倍に希釈する(0.5ml→5ml)。希釈には、スポイトと 15ml チューブを使う。
- ② 4穴シャーレの1穴にノルアドレナリン希釈液を、そのとなりの穴にアセチルコリン希釈液を入れる。希釈液は穴の深さの 1/3 程度入れる。
- ③ 鱗 1 枚ずつを、ピンセットで4穴シャーレ内のノルアドレナリン希釈液とアセチルコリン希釈液に移す。5分以上静置した後、この鱗をスポイトを使って水ごと2穴ホールスライドに移し、正立顕微鏡により色素胞の凝集・拡散状態を判定する。
- ④ 必要な事項を解答用紙の所定の欄に記入すること。

諸注意

- 指示があるまでこのページの内容をよく読んでおくこと。試験開始の合図があるまで机の上の機材には触れないこと。
- 解答用紙は2枚ある。開始の合図の後、それぞれの解答用紙に本選受験番号と氏名を記入すること。
- 試験中、許可なく退室することは出来ない。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ること。
- 問題冊子にメモを取っても構わない。試験終了後、問題冊子は持ち帰ること。
- 実験机の上の実験器具は自由に使って構わない。実験中は位置も自由に動かして構わない。ただし解答終了後はなるべく元の位置に戻しておくこと。
- 実験机の上は既に準備されているものの他に、ペンケース、筆記用具、時計、ハンカチ、ティッシュ以外のものはおかないこと。
- 最初に、本問題冊子全体を通して読み、全体の計画を練ってから作業に移ること。
- 試料、試薬、実験器具の追加の配布は行わない。
- 顕微鏡は適切に使用しないと故障し、試料を観察できなくなる恐れがあるので注意すること。誤った使用方法により故障、破損した場合は、顕微鏡などの実験器具の交換は行わない。
- 実験液を扱うときには実験用手袋を着用し、実験液が眼、口、皮膚などに触れないようにすること。指先などに傷がある場合は、とくに注意すること。万一触れた場合は、挙手をして試験監督に知らせること。
- 試料に対して重度のアレルギーを持っていることがわかっている場合、実験を始める前に試験監督に申し出ること。