



第7回 科学の甲子園 全国大会

実技競技①「クラミドモナスと謎の粉末」

問題および実験操作

■注意事項

1. 指示があるまでは、「問題および実験操作」, 「実験の手引き」の冊子は開かないこと。
2. 競技開始の合図があったら, 「解答用紙・写真記録提出用紙」の所定の欄に, 学校名, チーム番号などを記入する。
3. 本競技では生物の実験を行う。実験中は白衣を着用し, 保護めがねをかける。特に課題1の【実験ウ】および課題2を行う際には, 実験用手袋もはめて安全に行うこと。
4. 実験で使用する試薬や器具類は注意して取り扱うこと。試薬類や器材の追加補充は原則としてできないので, 使用量を考えながら実験を行うこと。
5. 競技中に冊子の落丁や乱丁, 材料, 試薬, 器具類の不足・不具合などに気づいたときは, 競技支援員(白いブルゾン着用)に申し出ること。
6. 競技中に体調が悪くなったり, トラブルが発生したりしたときは, すぐに競技支援員に申し出ること。トイレに行くときも同様である。
7. 競技中の質問は受け付けない。
8. 競技終了の合図があるまでは, 競技支援員の許可なしに, 会場の外に出ないこと。

目 次

■はじめに	2 ページ
■課題を始めるにあたって	3～4
■課題 1	5～9
【実験ア】	5～6 (問1, 問2, 問3)
【実験イ】	7 (問4, 問5)
【実験ウ】	8～9 (問6, 問7)
■課題 2	10～11 (問8, 問9)
■採点および順位の設定方法について	12

■はじめに

クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) は、コナミドリムシとも呼ばれる緑藻類の一種の単細胞生物で、眼点を持つ。眼点は光をよく反射する厚いカロテノイド層とチャンネルロドプシンからなる。眼点が赤褐色に見えるのはこのカロテノイド層のためである。チャンネルロドプシンは細胞膜上にあり、光に反応してチャンネルが開き、その結果細胞外からイオンが流入する。

図1に示すようにクラミドモナスでは、右からの光にはチャンネルロドプシンが反応するが、左からの光はカロテノイド顆粒層に遮られるために反応しない。クラミドモナスは光合成を行う大きな葉緑体も持っているので、葉緑体を介して光に対し何らかの反応を示す可能性も考えられる。

またクラミドモナスは、2本の鞭毛を持っている。平常は2本の鞭毛が対称的に平泳ぎのような運動を行って、鞭毛のある方向に直進的に遊泳する。そして2本の鞭毛が非対称な運動をすると方向が変わる。野生型のクラミドモナスは、光照射によって遊泳方向が変化する、いわゆる「光走性」を示すが、これは光刺激によって2本の鞭毛運動に非対称性が生じるからであると考えられる。

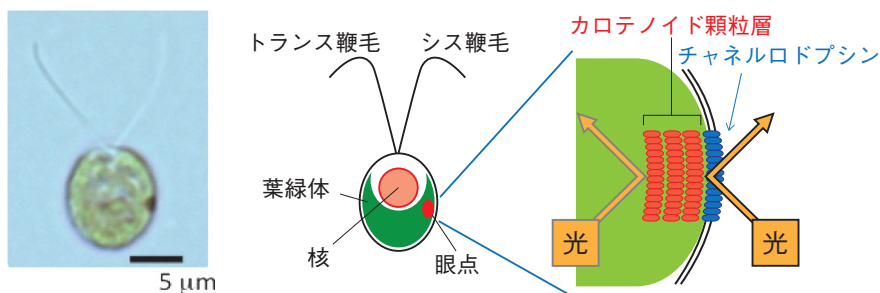


図1 クラミドモナスと眼点

■課題を始めるにあたって

課題は大きく二つに分かれる。一つは光走性の性質を調べる実験であり、もう一つはクラミドモナスや謎の粉末 A・B・C から色素を抽出する実験である。

それぞれの実験で、結果を写真 1～写真 8 として提出するとともに関連する設問に対して解答すること。また、実験前に以下のことをよく理解すること。

○LED ランプ

LED(light emitting diode)ランプ(以下LED)は電流を流すと発光する半導体である(図2)。本実験では5種類のLEDを用いる。LEDは極性を持ち、それぞれのLED色のジャンパー線が+極、黒いジャンパー線が-極で、+-を逆に接続すると光らない。

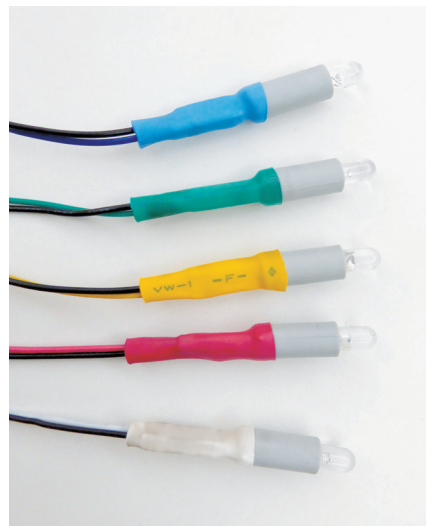


図 2

LED	ピーク波長 [nm]	+極	-極
青色	470	青	黒
緑色	525	緑	黒
黄色	590	黄	黒
赤色	625	赤	黒
白色	…	白	黒

○写真記録 (写真 1～写真 8)

課題 1, 2 ともに写真記録を提出する。写真は評価に重要なので、撮影の背景の色や光の当たり方を工夫するなど、できる限り良質の写真を提出すること。写真記録が必要な箇所は、それぞれの実験操作の文章中で、例えば(写真 1)というように記されている。解答用紙とともに添付されている写真記録提出用紙には、画像ファイル番号と写真の内容を簡潔に記入してカメラとともに審査員席に提出すること。その際、画像ファイル番号と写真の内容の確認を受けること。(11:15 から提出することができる)

○EGTA (キレート剤の一種)

金属イオンと錯体を作る物質で、錯体を作ることによってその金属イオンをキレートして(強く結合してキレート錯体を作ること)除く効果がある。結合定数は金属イオンとEGTAが錯体を生じる強さを表しており、大きい値ほど強く結合することを示し、金属イオンの種類によって異なる。

○光合成色素

光合成色素には大きく分けて、クロロフィル、カロテノイド、フィコビリンの3種類がある。熱処理されたり、日に干されたりした試料では、クロロフィルが変性したフェオフィチンが黒ずんだバンドとなって現れる。食材として売られているものを利用した場合、乾燥処理により色素の分解が進んでいることが多い。また、乾燥処理後のワカメのクロロフィルは、色調は変わらないものの、薄層クロマトグラフィーにおいて異なる Rf 値を示す色素に変化することが報告されている。

○薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography ; TLC)

TLC シートは基盤にシリカゲル粉末を塗布したもので、剥離しやすいため取り扱いに注意が必要である。試料中に含まれる水分はクロマトグラフィーの妨げになるので、シリカゲル粉末とともにすりつぶしたり、すりつぶした液にシリカゲル粉末を添加して、試料液中の水分を完全に除去する。試料を TLC プレートに付けることをスポットという。色素は展開後すぐに退色していくため、デジタルカメラで画像を取り込み、色の保存をする。スポットした円が大きすぎたり、スポットした試料液が多すぎたり、不要物がスポットされたりすると、単一バンドにならなかつたり、バンドが歪んだり(テーリングが発生)するなどのトラブルの原因となる。

○ Rf 値

TLC における物質の同定は、Rf 値によって行う(図3)。同じ物質でも、展開溶媒の組成や気温、展開容器内が展開溶媒でどれだけ飽和しているかによって Rf 値は異なる。ただし、飽和度や気温による変化は、Rf 値の順番には影響を与えない。正確な Rf 値を測定するには、展開前に容器内を充分飽和させておく必要がある。本競技で用いる展開溶媒における代表的な光合成色素の Rf 値は、次のとおりである(20℃)。

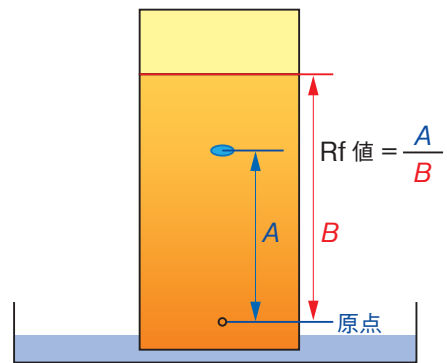


図3 Rf 値

色素名	Rf 値	色
カロテン	0.9 - 1.0	橙黄
フェオフィチン	0.6 - 0.7	黒
クロロフィル a	0.4 - 0.5	青緑
クロロフィル b	0.3 - 0.4	緑
ルテイン	0.25 - 0.35	黄
フコキサンチン	0.2 - 0.3	褐

課題 1, 課題 2 のそれぞれについて、冒頭の文章をよく読み、実験操作にしたがって実験を行い、結果を提出するとともに、設問に対して解答せよ。

なお、課題 1 は、クラミドモナスの光走性を調べる 3 つの実験ア、イ、ウから成る。

■課題 1

本実験では、実験結果を示す写真記録とともに、実験に関する問題を解き、解答用紙に記入して提出する。カメラは各グループに 1 台ある。写真記録は、写真記録提出用紙とカメラを審査員席に提出する。(11:15 から提出することができる)

【実験ア】

文章

走性を示す生物は数多く知られている。走性は刺激の種類により、光走性、化学走性、重力走性(走地性)などがある。すでに述べたように、野生型のクラミドモナスは光走性を示す。光走性には光源に向かう正の光走性、光源から遠ざかろうとする負の光走性がある。与えられたクラミドモナスはどのような光走性を示すであろうか。実験アでは、与えられた 2 つのパーツとその組み合わせ写真(図 4)を参考に実験装置を組み立てて白色光を照射し、光走性を調べる。またこの装置を使ってクラミドモナスを集め、それを課題 2 に用いる。

実験操作

- (1) 用意されているパーツ①を図 4 ②③に示されているように組み合わせて使用する。②は上方から白色光を照射する場合、③は下方から白色光を照射する場合である。いずれも筒の中に試験管を入れて、実験を行う。



図 4 実験アの装置

- (2) 脚のついた方のボードの中央部の孔から白色 LED を差し込む。+極-極を間違えないようにジャンパー線をブレッドボードに繋ぎ、点灯することを確認する。

実技競技①「クラミドモナスと謎の粉末」問題

(3) 試験管に8 mLほどのクラミドモナス培養液を入れ、クラミドモナスが均一になっていることを確かめ、写真記録する（写真1）。均一でない場合はポリスポイトでピペッティング（ピペットで溶液を軽く吸ったり出したりして溶液を混ぜること）して攪拌する。

写真1

(4) はじめに上方から照射するように試験管をセットし、LEDを点灯させてタイマーをスタートする。（10分間）

写真2

(5) 試験管を静かに取り出し、白紙などを背景にして迅速に記録写真を撮る（写真2）。

写真3

(6) 試験管のクラミドモナスを再度ピペッティングによって均一にし、今度は試験管の下方から白色光を照射する。10分間照射の後、試験管を静かに取り出し、(5)と同様に写真記録する（写真3）。

課題2をスタート

(7) 試験管からクラミドモナスが濃く集まっていない部分をポリスポイトで吸い取って、予備の試験管に捨てる。次に底部に集まったクラミドモナスをポリスポイトで注意深く吸い集め、1.5 mLのマイクロチューブに蓋が閉まる程度になるべく多く採る。これを課題2に用いる。クラミドモナスの濃縮の度合いが課題2の結果に響くので、注意深く集めること。集めたクラミドモナスを用いて課題2をスタートさせ、平行して2つの課題の実験を進めると効率的である。

問1 実験においてクラミドモナスは正負どちらの光走性を示したか。正負で答えよ。

問2 実験アでは、光を試験管の上方および下方から照射した。このように二通りの照射を行うことにはどのような意味があるか。簡潔に答えよ。

問3 これらの実験結果から、走性についてどのようなことが考察できるか。簡潔に答えよ。

【実験イ】

文章

クラミドモナスが光走性を示すことは**実験ア**で確かめられた。ところで**実験ア**で用いたのは白色光である。白色光には様々な波長成分が含まれている。そこで次にどのような波長の光（LEDの色）に反応するのかを調べることにする。なお、この**実験イ**では**実験ア**で用いた残りのクラミドモナスを用い、**実験ウ**でもそのまま用いる。10 mLのクラミドモナス培養液をシャーレに入れて用いることとする。**実験ア**で用いた装置を参考にして、黒ボードなどでシャーレを覆う装置を製作し、異なる色のLEDを照射するようにする。波長による違いを見るため、照明などの外部の光がシャーレに当たらないように製作することが、明瞭な実験結果を得るために重要である。使用するLEDとしては、青・緑・黄・赤が用意されている。これらのLEDの光量はほぼ同じである。この実験ではクラミドモナスをどれだけ集中させ、波長による違いを明瞭に示すことができるかが評価の対象となるので、製作するシャーレを覆う装置やLEDの照射方法を工夫すること。

装置の製作

実験操作

(1) 与えられた材料と工作道具を用いて、シャーレを覆って外部からの光を遮断し、LED照射を行える装置を製作する。一回の照射に使うLEDの個数などを考慮し、実験時間内に結果が出せるよう工夫せよ。作った装置の概観がわかるように写真記録する（**写真4**）。製作での工夫がわかるように写真を撮り、写真の内容を記入する欄にも記述せよ。

写真4

(2) **実験ア**で用いた残りのクラミドモナス培養液から10 mLを採り、シャーレに入れて攪拌し、均一になるようにする。それを写真記録する（**写真5**）。

写真5

(3) 製作した装置を用いてどの波長の光に強い光走性を示すかを調べ、写真の背景にLEDの色を明記したうえで写真記録する（**写真6**）。なお、光の照射時間は5～10分とする。

写真6

問4 実験イの結果から、光走性において感受性の高い波長を、LEDの色で答えよ。

問5 クラミドモナスは葉緑体で光合成を行う。この点を考慮し、**実験イ**の結果と、**課題2**の色素解析の結果などを踏まえ、光走性、光合成、眼点の関連を考察せよ。

【実験ウ】

実験ウでも文章および実験操作を読み、実験を進めていくが、それらの中に設問が置かれている。それらを解きながら実験操作を決めることになる。

文章

クラミドモナスが光を受容すると、眼点の細胞膜上にあるチャネルロドプシンが開き、培養液中の特定の2価金属イオンが流入する。そのイオンの細胞内濃度の上昇が、2本の鞭毛のうち主にシス鞭毛の運動を変化させ、その結果遊泳方向が変化し、光走性が生じると考えられている。この反応は、その2価イオンの細胞内濃度が $0.1 \mu\text{M}$ (10^{-7}M) 程度に上昇すると起こることがわかっている。

それでは培養液中のどの2価金属イオンが鞭毛の運動、ひいては光走性に関わっているのか調べることにしよう。培養液中には数種類の2価金属イオンが含まれているが、多くは微量で、高濃度のものは Mg^{2+} (0.41 mM) と Ca^{2+} (0.34 mM) の2つであった。そこでこれらのイオンをEGTAというキレート剤を用いて除去することで、そのイオン種を推定することにする。

さて、ある金属(M)とそのイオンを(M_i)として表し、簡単にするために、イオンと結合できるイオン状態のEGTAを EGTA_i 、MとEGTAが結合した複合体を $\text{M}\cdot\text{EGTA}$ と表すと、結合定数 K は

$$K \text{ (結合定数)} = \frac{[\text{M}\cdot\text{EGTA}]}{[\text{M}_i][\text{EGTA}_i]} \dots\dots\dots \text{(式1)}$$

[] は濃度(モル濃度)を表す。

K の値を調べると、 Mg^{2+} では $1.6 \times 10^5 [\text{M}^{-1}]$ 、 Ca^{2+} では $1.0 \times 10^{11} [\text{M}^{-1}]$ であった。そこで仮にEGTA濃度が0.76 mM(仮に Mg^{2+} と Ca^{2+} がすべてEGTAと結合し、さらに0.01 mMの EGTA_i が存在すると考える) となるように培養液に加えた場合、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の濃度はどうなるかを試算してみよう。まず Mg^{2+} については、(式1) から、

$$K_{\text{Mg}} = 1.6 \times 10^5 = \frac{[\text{Mg}\cdot\text{EGTA}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{EGTA}_i]}$$

ここで、 $[\text{Mg}_{\text{total}}] = [\text{Mg}\cdot\text{EGTA}] + [\text{Mg}^{2+}] = 0.41 \text{ mM} = 4.1 \times 10^{-4} [\text{M}]$

また Mg と Ca すべてがEGTAと結合していたとしてもEGTAは0.01 mM残るので

$$[\text{EGTA}_i] \geq 1 \times 10^{-5} [\text{M}]$$

となるが、

$$[\text{EGTA}_i] = 1 \times 10^{-5} [\text{M}]$$

として解いていくと、

$$1.6 \times 10^5 = \frac{[\text{Mg} \cdot \text{EGTA}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{EGTA}_i]} = \frac{[\text{Mg}_{\text{total}}] - [\text{Mg}^{2+}]}{[\text{Mg}^{2+}][\text{EGTA}_i]}$$

変形すると

$$[\text{EGTA}_i] = 1 \times 10^{-5} [\text{M}] = \frac{4.1 \times 10^{-4} - [\text{Mg}^{2+}]}{1.6 \times 10^5 [\text{Mg}^{2+}]}$$

これを計算すると

$$[\text{Mg}^{2+}] = \boxed{1} \text{ M}$$

となる。一方、同じ EGTA 濃度で Ca^{2+} について同様な計算をしてみると

$$[\text{Ca}^{2+}] = \boxed{2} \text{ M}$$

すなわち、 $\boxed{3}$ はほとんど除去されるが、 $\boxed{4}$ は残ることが予測される。

実験操作・実験結果

- (1) 実験装置は**実験イ**で用いたもの、もしくはそれを少し変えて用いればよい。
- (2) **実験イ**で用いた、シャーレに入った 10 mL のクラミドモナス培養液に、EGTA 濃度が 0.76 mM となるようにマイクロピペットを使って EGTA 溶液 (100 mM) を $\boxed{5}$ mL 加え (培養液に対して少量なので、体積変化は無視する)、ムラができないように攪拌する。
- (3) **実験イ**の結果を参考に、最も強い光走性を示した波長の LED で照射し、光走性が示されなくなることを確認せよ。
- (4) しかし(3)の実験だけでは EGTA がイオンを除去したのではなく、EGTA 自身の毒性が光走性を失わせたという可能性を排除できない。そこで(3)のクラミドモナス培養液にマイクロピペットを使って (ピペットチップは交換する) $\boxed{6}$ を $\boxed{7}$ mL 加え、再び(3)と同様に LED で照射せよ。その結果を写真記録(**写真7**)せよ。
- (5) 以上の結果から、 $\boxed{8}$ が光走性に関わっていることが明らかになった。
注：ここで用いる MgCl_2 溶液、 CaCl_2 溶液では、これらの塩がほぼ完全に Mg^{2+} イオン、 Ca^{2+} イオン、 Cl^- イオンに解離しているものとする。



問6 文章の文中の $\boxed{1}$ ~ $\boxed{4}$ に適当な文字、記号、数値を記して正しく完成させよ。

問7 実験操作の文中の $\boxed{5}$ ~ $\boxed{8}$ に文章から推測し、また実験で実際に使った値や物質名を記し完成させよ。また(4)において $\boxed{7}$ mL を加えたことについて、その理由を述べよ。

■課題2

実験操作 I～IVの順番は記載の順にしたがわなくともよい。最初に手順を終わりまで読んで、効率よく実験を進めること。解答用紙の確認内容を考慮し、必要があればやり直してもよい（各チームに TLC プレートは 3 枚用意してある）。白衣，保護めがね，実験用手袋を着用する。

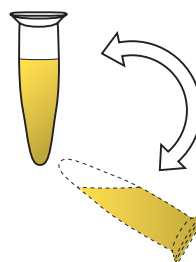
実験操作 I 光合成色素の抽出

《クラミドモナスからの光合成色素の抽出》

- (1) 課題 1 の実験 A で集めたクラミドモナス培養液について，卓上遠心機を使用し，遠心処理を 30 秒間行う。
- (2) パスツールピペットで上清（うわずみ）を吸い取り，未使用のマイクロチューブに移す。沈殿を吸い込まないように，かつ，上清をできるだけ残さないように注意する。
- (3) 1 mL の駒込ピペットでアセトンを 0.2 mL ほど沈殿に加え，蓋をしっかりと閉め，タッピング（指ではじいて攪拌すること）で沈殿を懸濁する。
- (4) 沈殿がなくなったら，シリカゲルを葉さじでマイクロチューブの底から 3 mm 程度の高さまで加える。
- (5) 蓋をしっかりと閉め，転倒混和（容器を倒しながら混ぜること）により十分に懸濁した後，遠心処理を 30 秒間行う。



タッピング



転倒混和

《試料 A・B・C からの光合成色素の抽出》

- (1) 試料 A・B・C それぞれとシリカゲルを一緒に破碎したものが入った 1.5 mL マイクロチューブに，0.5 mL のアセトンを 1 mL の駒込ピペットで添加する。
- (2) マイクロチューブの蓋をしっかりと閉め，タッピングや転倒混和によりよく混ぜる。
- (3) 遠心処理を 30 秒間行う。

実験操作Ⅱ TLCプレート(40 mm×80 mm)の準備

上から10 mm(終点), 下から20 mmの位置に鉛筆で薄く線を引き, 下の線上に原点の位置を4か所(左からクラミドモナス(CL), 試料A, 試料B, 試料C), 8 mm間隔で印を付ける(解答用紙参照)。

実験操作Ⅲ 光合成色素の分析

- (1) 4つの試料が入ったマイクロチューブの上清だけをピペットチップで吸い取り(毛細管現象を利用する), 何度かに分けて原点の位置にできるだけ小さい円(直径約5 mm以内が望ましい)になるようにスポットする。試料Cの抽出液を一度チップに吸い取った量と同じ程度の濃さになるように他のサンプルもスポットする。スポットは10~20秒ほどあけ, 溶媒が乾いてから次のスポットを行う。
- (2) すべてのサンプルのスポットを終えたら, ドライヤーで溶媒を完全に揮発させる。
- (3) 展開容器に, サンプルのスポットを終えたプレートをピンセットで静かに入れ, 蓋をする。終点の位置まで展開溶媒が到達したらピンセットでプレートを取り出す。
- (4) プレートが乾燥したら色をよく観察し, できるだけ早く分離した色素を囲むように鉛筆で印を付ける。

実験操作Ⅳ 光合成色素分析結果の記録



展開直後のTLCプレートを解答用紙の水色の四角の上に置き, セロハンテープで上端と下端をとめ, 問8, 問9を解答せよ。その後, TLCプレートができるだけ大きく写るようカメラで撮影する(写真8)。

問8 今回乾燥粉末として提供したA・B・Cの試料は, スジアオノリ(緑藻), ワカメ(褐藻), スサビノリ(紅藻)のいずれかである。A・B・Cはそれぞれどれに相当するか。A・B・Cの欄に試料名を記入せよ。ただし, 乾燥処理後のワカメのクロロフィルは色調は変わらないものの, TLCにおいて異なるRf値を示す色素に変化することが報告されている。

問9 ①カロテン ②クロロフィルa ③クロロフィルb ④フコキサンチンはそれぞれどれに相当するか, 該当する色素のバンドを線で囲み, TLCプレートの右側, もしくは左側に矢印を引き出し, ①~④の番号をつけよ。

採点および順位の決定方法について

1. 本競技では、**課題 1**と**課題 2**の結果をもとに、解答用紙に記載された解答や考察、写真記録などを総合的に評価して、240点満点で評価する。
2. 合計得点が1位または2位のチームが複数ある場合には、**課題 1**の**実験イ**に関する設問や写真記録の得点が高い方のチームを上位として、1位、2位を決定する。
3. 上記によっても決まらない場合は、**課題 1**の**実験ウ**に関する設問や写真記録、**課題 2**に関する設問や写真記録の順に評価して、1位、2位を決定する。
4. 3位以下は同順位のままとする。