



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」

生徒用解説

【解説】

課題 1

実験ア

クラミドモナスは普通の環境下では正の光走性を示す。実験でもそのような結果が出ていればよい。クラミドモナスは光照射がないとランダムな方向に遊泳するが、密度が淡水より大きいので、徐々に沈降する。課題 1-実験アでは試験管中のクラミドモナスは光源に集まろうとするが、上方に光源がある場合は重力の影響で集合の仕方が弱い。一方、下方に光源がある場合は正の光走性に重力の影響が加わるので、底に集まりやすい。実験では培養液がかなり透明になるほど試験管の底に明確に堆積しているのが観察されるはずである。

実験イ

クラミドモナスの眼点のチャネルロドプシンは 470 nm の青色光に最も強く活性化されるが、実際の光に対する反応は様々な要素(葉緑体での酸化還元など)に左右され、青～緑色の光に強く反応する。実技問題の条件下では緑色 LED と青色 LED に強く集まり、赤色、黄色にはほとんど集まらない。

実験ウ

クラミドモナスにおける走性の反応は複雑である。弱い光刺激では、細胞内(鞭毛内)に Ca^{2+} が 10^{-7} M 程度流入し、正の光走性を示す。実技問題の光量はこれに相当する。一方、フラッシュのような強い光を受けると、細胞内(鞭毛内) Ca^{2+} 濃度は 10^{-4} M 程度に急上昇し、繊毛運動が鞭毛タイプの運動に変化し、光忌避反応を示す。

本実技問題で観察される正の光走性の場合、細胞内の Ca^{2+} 濃度は 10^{-7} M 程度となる必要があり、その Ca^{2+} はチャネルロドプシンを介した細胞外からの受動輸送で行われるので、細胞外 Ca^{2+} 濃度はある程度高い必要がある。本実技問題のような実験条件では濃度の正確なコントロールは難しい。そこで本実技問題では、EGTA がほんのわずか Ca^{2+} 濃度より高ければほとんどの Ca^{2+} はキレートされ、 10^{-7} M 以下になり、細胞内には流入しないとされた。実際、本実験のように EGTA が 0.76 mM で EGTA_i が少なくとも 0.01 mM 存在すれば、単純計算上は Ca^{2+} 濃度は 10^{-10} M 程度まで下がってしまう。また、 Ca^{2+} が培養液の濃度程度 (0.34 mM) あれば正の光走性を示すことはわかっているので、この程度まで Ca^{2+} 濃度を回復させ(すなわち加えた EGTA と等しい濃度の CaCl_2 を加える)、光走性が回復すれば、EGTA の Ca^{2+} をキレートする以外の EGTA 自身のもつ阻害効果ではないと考えてよい。

上述したように、細胞内 Ca^{2+} 濃度が 10^{-7} M になることが光走性反応を引き起こすために必要であるが、その濃度になるためには最低どの程度の細胞外 Ca^{2+} 濃度が必要かはここでは示されていない。よって、 Ca^{2+} 濃度が EGTA を加える前の濃度である 0.34 mM 以下でも光走性が示されることは充分考えられる。実験では、加える CaCl_2 が 0.75 mM 以下でも、

実技競技①「クラミドモナスと謎の粉末」解答例と解説

すなわち 0.45mM (0.75-0.3) 程度でも回復する可能性があり、また 0.75mM 以上でも回復すると考えられる。よって問7 の値は、実験写真内容と合わせて判断することとする。ただし根拠なく過剰の CaCl_2 を加えた場合は減点される。

課題 2

光合成色素の組成は生物群ごとに決まっており、それには生態学的な意味がある。説明文の材料の特性や、色素の特性(Rf 値や色調)などをもとに、色素や材料の同定やそれをもとにした材料の同定を行って欲しい。クロロフィル a は本来すべての光合成生物が保有するが、説明文にあったとおり、乾燥ワカメでは変性して Rf 値が異なる色素となっている。カロテンは量の差はあるものの今回用いた全ての材料が保有する。クロロフィル b は今回用いた材料の中では、緑藻のみに存在する。フコキサンチンは褐藻のみに存在する。緑藻であるクラミドモナスの色素と同じものを持つ試料としてスジアオノリが同定できる。フコキサンチンの有無、もしくはクロロフィルのバンドパターンで、褐藻であるワカメが同定できる。クロロフィル b もフコキサンチンも持たない紅藻としてスサビノリが同定できる。

今回の作業は、抽出・攪拌・遠心分離・試料の添加など、生化学的・分子生物学的な実験で行う基本的な作業である。一つ一つの作業の意味を考えながら丁寧に、また、要所要所で時間をかけることによって、有効なデータを得ることができる。色素の抽出量、展開試料からの水分の除去、TLC プレートへの丁寧なスポットがポイントとなる。

【考察問題の解答例】

問 1

正 (の光走性)

問 2

この実験で光走性に影響を与える因子としては重力が考えられる。そこで重力走性の影響を調べるため、試験管の上下両方向から光を照射することに意味がある。もし重力走性が強ければ、光走性以上にそれが働き、どちらから光を当てても底 (正の重力走性の場合) か水面 (負の重力走性の場合) に集まることが考えられる。

問 3

光を上方から照射するとクラミドモナスは上方に集まり、下方から照射すると下方に集まることから、少なくとも光走性の方が重力走性よりも強い要因として働いている。

問4

緑, もしくは 青, もしくは 緑と青
(実験結果と対応していればすべて可)

問5

光走性の実験で強く反応する光は緑色や青色である。眼点は赤褐色に見えるので、そこにあるロドプシンは赤色光以外を吸収し利用していると考えられる。葉緑体での光合成は青色と赤色の光を吸収して行われ、緑色光は吸収されない。よって、光走性は眼点のロドプシンによる緑色光およびそれに近い波長の青色光によってもたらされる可能性が高い。

問6

1	1.6×10^{-4}	2	3.4×10^{-10}
3	Ca^{2+}	4	Mg^{2+}

問7

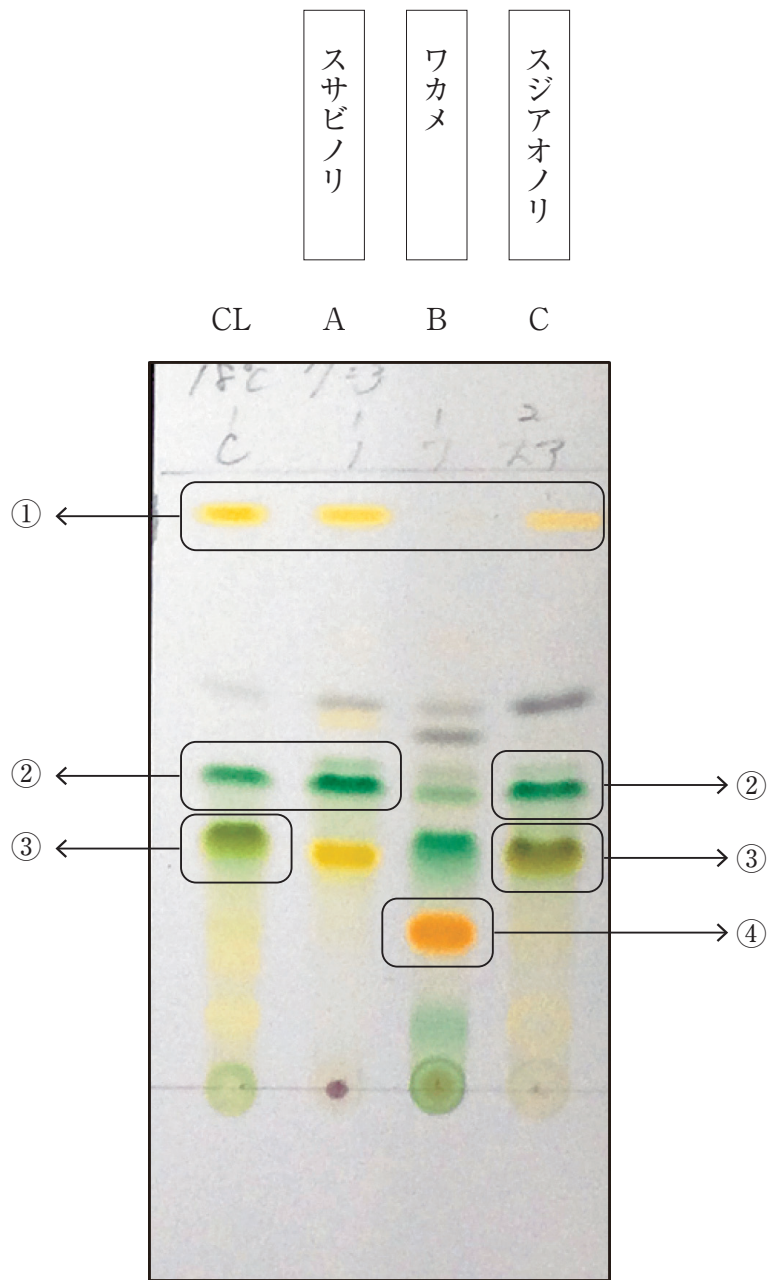
5	0.076	6	CaCl_2
7	0.076 (± 0.03)	8	Ca^{2+}

理由

加えた EGTA の量は培養液に含まれる Ca^{2+} と Mg^{2+} の和プラス 0.01 mM である。この条件では Ca^{2+} はほとんどキレートされていて非常に少ないが, Mg^{2+} は計算上 0.16 mM 存在しているので、光走性が失われる原因は Ca^{2+} の低下と考えられる。EGTA 自身による阻害作用の有無を検討するには、EGTA 存在下で Ca^{2+} 濃度を元に戻してみれば良い。

EGTA は Ca^{2+} と非常によく結合し、 Mg^{2+} が存在しても優先的に Ca^{2+} と結合するので, Ca^{2+} を EGTA を加える前の濃度に戻すためには, 0.75 mM 程度の Ca^{2+} すなわち CaCl_2 を加えて光走性が回復するかを調べればよい。

問8・問9



確認内容

- ・ 4種類の試料それぞれで主要な色素が確認できる
- ・ テーリングがない
- ・ 泳動がまっすぐ行われている
- ・ 室温に対応したRf値となっている