

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol. 32 2021

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

Science Journal of Kanagawa University

Vol. 32

目 次

原 著

Electron Microscope Studies on the Structural Complex of Transverse Tubules and Sarcoplasmic Reticulum in Scorpionfish Swimbladder Muscles Risa Hatakeyama, Yoshioki Shimizu, Minori Tuji, Kouhei Kuroda, Mayu Akimoto, Juri Tanaka, Masayo Kato, Chin Nin, Masako Soutome, Shu Iguchi, Ryouji Ushizawa, Takayuki Kaneko, Takashi Murayama and Suechika Suzuki	1
Crystallization of Amorphous Si Layer Assisted by Quantum Beam Irradiation Studied by Rutherford Backscattering Channeling Method Yasushi Hoshino and Jyoji Nakata	11
Examination of Phytoplankton Cells by Isolated Cultured Cell Images as Teacher Data Yongjie Yu, Yoshihiro Suzuki and Shanjun Zhang	17
Characterization of <i>Cuscuta campestris</i> Cell Wall Genes Responsible for the Haustorial Invasion of Host Plants Ryusuke Yokoyama, Toshiya Yokoyama, Yuki Kaga, Yutaka Oono and Kazuhiko Nishitani	21
全卵ホイップ泡状生地の電極式ケーキの特性とまとめ 青木 孝	27
時間分解 ESR 法による無水マレイン酸と無水フタル酸誘導体に対するラジカル反応中間体の同定 高橋広奈、平野弘樹、河合明雄	35
ラット精巣におけるオキシトシン・オキシトシン受容体の局在 鄭 美帆、伊藤隆志、坂本竜哉、小谷 享、坂本浩隆、越智拓海	41
ソメイヨシノの花粉母細胞の減数分裂期染色体の顕微鏡観察 安積良隆、早津 学	47
アメリカネナシカズラ (<i>Cuscuta campestris</i>) 回旋転頭運動の定量化解析 横山俊哉、水本 侑、浅岡真理子、西谷和彦	55
DNA メタバーコーディング解析で推定されたニホンジカの採食植物：神奈川県湘南ひらつか キャンパスの例 岩崎貴也、奥田真未、安藤温子、松尾 歩、陶山佳久、中濱直之、泉 進	59
相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 8 河川水への災害的降雨の影響と海水濃度に対 する河川水流入の影響 石渡大策、青柳佑希、鈴木祥弘、金澤謙一、西本右子	69

相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 8 降雨量が非生物的・生物的環境へ与える影響 酒井駿輔、川延京子、金沢謙一、西本右子、鈴木祥弘	73
---	----

テクニカルノート

コルヒチンを用いたシロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 4 倍体及び 8 倍体の効率的な作出方法 菊池涼夏、岩元明敏	81
--	----

教育論文

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (8) 加部義夫	87
反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (9) 加部義夫	97

2020 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	107
-------------------------------	-----

Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	109
---	-----

Author Index	113
--------------------	-----

編集後記	114
------------	-----

■ Full-Length Paper ■

Electron Microscope Studies on the Structural Complex of Transverse Tubules and Sarcoplasmic Reticulum in Scorpionfish Swimbladder Muscles

Risa Hatakeyama¹, Yoshioki Shimizu¹, Minori Tuji², Kouhei Kuroda², Mayu Akimoto², Juri Tanaka², Masayo Kato², Chin Nin², Masako Soutome², Shu Iguchi², Ryouji Ushizawa², Takayuki Kaneko², Takashi Murayama³ and Suechika Suzuki^{1, 2, 4, 5}

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Department of Pharmacology, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

⁴ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To clarify the distribution of transverse tubule-sarcoplasmic reticulum (T-SR) complexes in the swimbladder muscle (SBM) of the scorpionfish (*Sebastiscus marmoratus*), electron microscope observations were performed. In the anterior part of the SBM, Z-type triads were exclusively observed, in contrast to the regular distribution of AI- and Z-type triads with pentads and heptads in the posterior part of the SBM reported in our previous paper. Various body muscles of scorpionfish contained only Z-type triads. Furthermore, SBM and body wall muscles (BWM) in other sound-producing fishes each contained only one type of triadic contacts. In the posterior fibers of scorpionfish SBM, feet on the junctional SR membrane formed a square lattice with three or more vertical lines and numerous horizontal rows. Isolation and identification of ryanodine receptor (RyR) revealed that α RyR and β RyR coexist in the SBM and BWM of scorpionfish. Anti- α RyR and β RyR antibodies were produced in rabbits, and immunoelectron microscopy with these antibodies demonstrated that both α RyR and β RyR form parallel lines respectively on the same junctional membrane as AI- and Z-type triads. The results are discussed in connection with the anatomical features and function of the swimbladder.

Keywords: swimbladder muscle, fish body muscles, distribution of triadic contact, feet array, coexistence of α and β ryanodine receptor isoforms

Introduction

Triadic contacts between the transverse (T) tubule and the sarcoplasmic reticulum (SR) are very significant for ensuring excitation-contraction (E-C) coupling in the skeletal muscles¹⁻⁴. Generally, two types of triadic contact are found in the skeletal muscles of vertebrates⁵. One is the AI-type triad located around the boundary between the A- and I-bands of the sarcomere, and the other is the Z-type triad found around the Z-band of the sarcomere. Furthermore, it has been believed that each muscle fiber contains

only one type of triadic contact⁵. However, in 2003, the authors found newly that, in scorpionfish swimbladder muscles (SBM), two types of triadic contact together with the other T-SR complexes (pentads and heptads) are distributed regularly within single fibers⁶. The previous study also clarified that the SBM is anatomically constructed with the anterior and posterior parts connected by a layer of tendon at the middle of the muscle, as also reported for the toadfish SBM⁷, and the new finding on the distribu-

tion of triadic contacts was made in the posterior part of the SBM. In the present study, electron microscope observations were performed to examine whether the unique distribution of triadic contacts is also found in the anterior part of the SBM and other body muscles of scorpionfish, and in the BWM and body muscles of other sound-producing fish.

It has been believed that, in the E-C coupling of skeletal muscles, the signal transmission from T tubules to SR is completed by the membrane proteins located respectively in those junctional membranes, namely dihydropyridine receptor (DHPR) in T tubules and ryanodine receptor (RyR) in SR, and that the RyR corresponds to feet found electron microscopically in triadic junction⁸⁾. In the present study, a two-dimensional array of feet was analyzed by measuring their dimensions and distances.

It is also well known that, in some amphibian and fish skeletal muscles, two kinds of RyR isoform, α RyR and β RyR, are arrayed alternatively in the junctional membrane of the terminal cisternae of SR to ensure efficient Ca release for contraction⁹⁾. Since little information is available at present on the RyR isoform in the scorpionfish SBM, biochemical isolation and identification of RyR and immunoelectron microscopy using anti-RyR antibodies produced from the identified RyR were performed. To give an ultrastructural basis for the analysis of RyR isoform distribution, the foot considered to be the real structure of RyR was observed by electron microscope, and the dimensions and factors of the two-dimensional array were measured. Furthermore, to identify the Ca-binding protein in the T-SR complex of the scorpionfish SBM, additional immunoelectron microscopy using anti-calsequestrin (CSQ) antibody was performed.

Materials and Methods

Muscle fiber preparation

Adult scorpionfish, *S. marmoratus* (body length 16–20 cm), were collected at Sagami Bay or obtained from a commercial source, and kept in a natural seawater tank at 17°C. Other sound-producing fish for comparative studies, gurnard (*Chelidonichthys spinosus*, body length ~40 cm) and white croaker (*Argyrosomus argentatus*, body length ~30 cm), were obtained at Odawara Fish Market. The procedure for preparing the scorpionfish SBM was described

precisely in our previous paper⁶⁾. Briefly, a bundle of 3–5 fibers (*in situ* length) with tendons was dissected from the anterior and posterior parts of the SBM in a fish Ringer's solution. They were mounted horizontally in an acrylic chamber filled with the Ringer's solution; both ends were mechanically fixed with pins on a silicone rubber plate put on the bottom of chamber. In the case of various body muscles used for swimming, fiber bundles were also prepared, and fixed mechanically with pins by using tendons. For the gurnard and white croaker, fiber bundles of SBM and body wall muscles (BWM) were prepared in the same way.

Electron microscopy

For conventional electron microscopy, muscle fibers of *in situ* length were fixed with a 2.5% glutaraldehyde solution, post-fixed with a 1% osmium tetroxide solution, dehydrated, and embedded in Quetol 812. To observe the distribution of triadic contacts in the anterior part of the scorpionfish SBM, the single fiber was divided into 12 longitudinal segments prior to the embedding. In the body muscles of scorpionfish and various muscles of gurnard and white croaker, no segmentation was performed before embedding. Ultrathin sections of the fixed preparations were cut on an Ultracut N ultramicrotome (Reichert, Vienna, Austria), and stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were examined by using a transmission electron microscope (JEM2000EX: JEOL, Akishima, Tokyo, Japan).

For immunoelectron microscopy, the muscle fibers were fixed with a 4% paraformaldehyde solution, and treated with 50 mM glycine solution to neutralize the aldehyde groups^{10, 11)}. After dehydration, they were embedded in Lowicryl K4M resin, and polymerized by illumination with ultraviolet light at -20°C. Ultrathin sections treated previously with 20 mM glycine and 1% bovine serum albumin (BSA) were immunostained with anti- α RyR antibody, anti- β RyR antibody and anti-CSQ antibody. Then they were stained secondary with AuroProbe EM goat anti-rabbit IgG conjugated with colloid gold particles of diameter 5 nm for anti- α RyR antibodies or diameter 10 nm for anti- β RyR antibodies and anti-CSQ antibodies. Anti-RyR antibodies were produced in the present study as described later, and anti-CSQ antibody was obtained from a commercial source.

Immunostained sections were observed with the same electron microscope as described above.

Production of anti-RyR antibodies and their specificities

Purification and characterization of α and β RyR and their antibodies from SBM and BWM of scorpionfish were conducted as described by Murayama and Ogawa (1992)¹². Scorpionfish muscles were homogenized and centrifuged at 4,700 *g* for 20 min. The SR fractions were obtained from the pellet of centrifugation after centrifuging twice at 27,000 *g* for 70 min. The fractions were then solubilized in 4% CHAPS solution, and centrifuged at 100,000 *g* for 30 min. The supernatant was layered onto tubes of 5–20% linear sucrose density gradient, and centrifuged at 69,000 *g* for 20 h. The resulting fractions (5 ml each) were analyzed for protein composition by SDS-PAGE and for [³H] ryanodine binding by means of scintillation counting.

To identify RyR isoforms, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and western blotting were performed. In SDS-PAGE, SR fractions of *Xenopus laevis* were also used as a marker, together with the standard marker obtained from a commercial source. Proteins separated by SDS-PAGE were treated with western blotting, using a pan-RyR primary antibody¹³ and the secondary antibody (per-

oxidase conjugated goat anti-rabbit IgG antibody).

Polyclonal antibodies against RyR (α and β) purified from the scorpionfish body muscles were produced in rabbits. Rabbit serum was collected after five immunizations with the emulsion (including complete/incomplete Freund's adjuvant) by intradermal injection at two-week intervals. Antigens separated by SDS-PAGE were electro-phoretically transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Using these membranes as a purification tool by reacting with anti-serum, anti-BWM RyR (α and β) antibodies and anti-SBM RyR (α and β) antibodies were obtained.

Results

Distribution of various triadic contacts in fish muscles

To confirm the distribution of triadic contacts or T-SR complexes, SBM and body muscles of scorpionfish and two kinds of sound-producing fishes were examined by electron microscopy. Longitudinal sections of 12 segments divided from the anterior part of scorpionfish SBM fibers were observed. In contrast with the diversified distribution of T-SR complexes in the posterior part⁶, the T-SR complex almost exclusively contained the Z-type triad in the anterior SBM fibers, as shown in Fig. 1. Only one triadic contact (pentad and/or heptad) was excep-

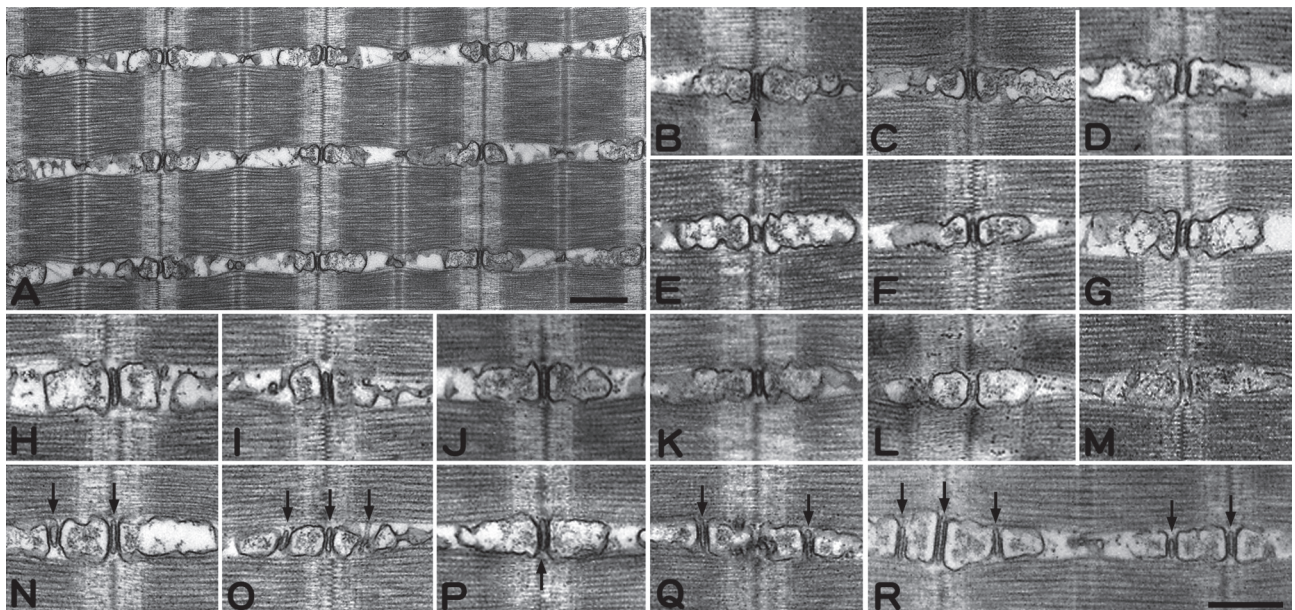


Fig. 1. Triadic contacts of scorpionfish SBM. A. Typical electron micrograph of myofibrils in the anterior part of SBM, showing Z-type triads. Scale bar, 1 μ m. B–M. Z-type triads in 12 segments (the 1st ~ the 12th) of anterior SBM fibers. N and O. Pentad and heptad rarely found in the 5th segment. P. Typical Z-type triad in both end regions of posterior SBM fibers. Q. AI-type triad in the central region of posterior SBM fibers. R. Heptad and pentad in the mixture region between the both fiber ends and its central region of posterior SBM fibers. Arrows indicate T tubules. Scale bar, 0.5 μ m (B–R).

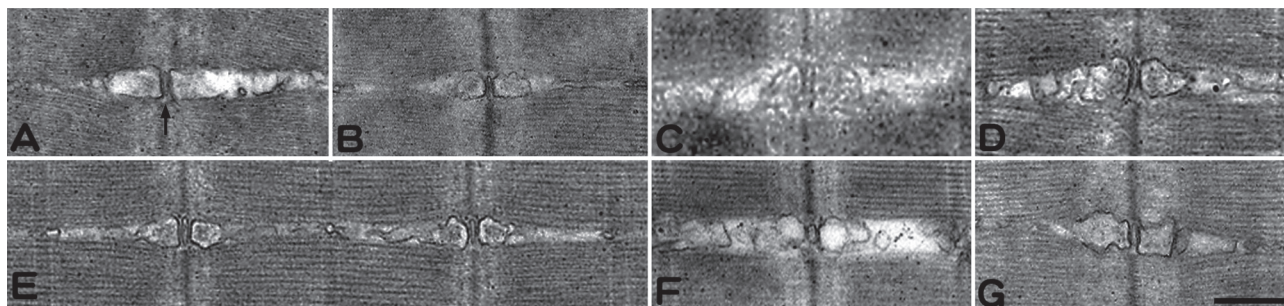


Fig. 2. Triadic contacts of scorpionfish body muscles. Electron micrographs of Z-type triads in supracarinalis posterior muscle (A), infracarinalis posterior muscle (B), abductor superficialis muscle (C), inclinor analis muscle (D), arrector dorsalis pelvis muscle (E), hypochordal longitudinalis muscle (F), and interradians muscle (G). Arrow indicates T tubule. Scale bar, 0.5 μ m.

tionally observed in the 5th segment of the anterior part (Fig. 1M, O). In contrast, the diversified distribution of T-SR complexes⁶⁾ was re-confirmed by observing 12 segments of the posterior SMB fibers.

For comparative morphology, seven body muscles of scorpionfish were observed: supracarinalis posterior, infracarinalis, posterior, abductor superficialis, arrector dorsalis pelvis, inclinor analis, hypochordal longitudinalis, and interradians. All triadic contacts in these muscles were the Z-type triad (Fig. 2).

The SBM and body wall muscles of two other sound-producing fishes which are different from the scorpionfish were also observed. In gurnard, the triadic contacts were the AI-type triad in SBM (Fig. 3A), and the Z-type in the pectoral fin muscle and the BWM (Fig. 3B). In white croaker, the triadic contacts were the Z-type triad in SBM and BWM (Fig. 3C, D).

Two-dimensional array of feet

The feet of triads were observed in the posterior part

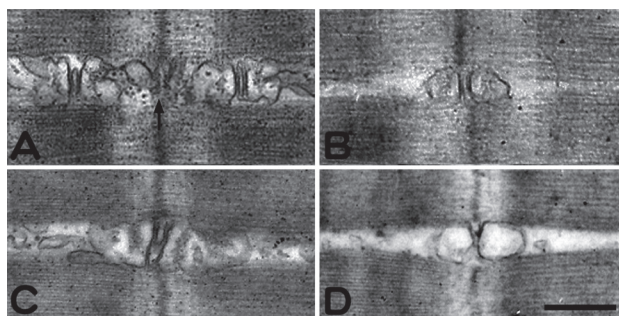


Fig. 3. Triadic contacts observed in muscles of sound-producing fishes (gurnard and white croaker). A. AI type triads in gurnard SBM. B. Z-type triads in gurnard pectoral fin muscles. C and D. Z-type triads in SBM and BWM of white croaker. Arrow indicates T tubule. Scale bar, 0.5 μ m.

of scorpionfish SBM fibers. In longitudinal sections cut parallel to the myofibril axis, feet were detected as a row with a regular interval along the triadic junction (Fig. 4A, C). On the other hand, in transverse sections cut in perpendicular to the myofibril axis, feet were arrayed as a square lattice (Fig. 4B, D), constructed with three or more vertical lines and numerous horizontal rows. The overall shape of each foot was a square with a concave center on the side. These structural views of feet were not fundamentally different between AI-type and Z-type triads. Various dimensions and distances of the arrayed feet were measured. The measured values were summarized in Table 1.

In longitudinal sections, the inner and outer diameters of T tubules were approximately 24 and 45 nm, respectively. There was no difference in the measured values between AI- and Z-type triads. The gap distance of T-SR junctions in AI-type triads was 11.6 nm, and slightly wider than that measured in Z-type triads. The long and short diameters of feet found in the junctional gap were approximately 16.5 and 9.5 nm in AI- and Z-type triads, respectively. The center-to-center distance between feet was 33.7 nm in AI-type triads, and larger than the value measured in Z-type triads (32.5 nm).

In transverse sections, the center-to-center distance between feet was approximately 36.5 nm along the vertical lines in AI- and Z-type triads. Along the horizontal rows, it was 39.3 nm in AI type triads, and shorter than that measured in Z-type triads (42.7 nm). The side lengths of each foot found in AI- and Z-type triads were 27.7 and 29.3 nm respectively.

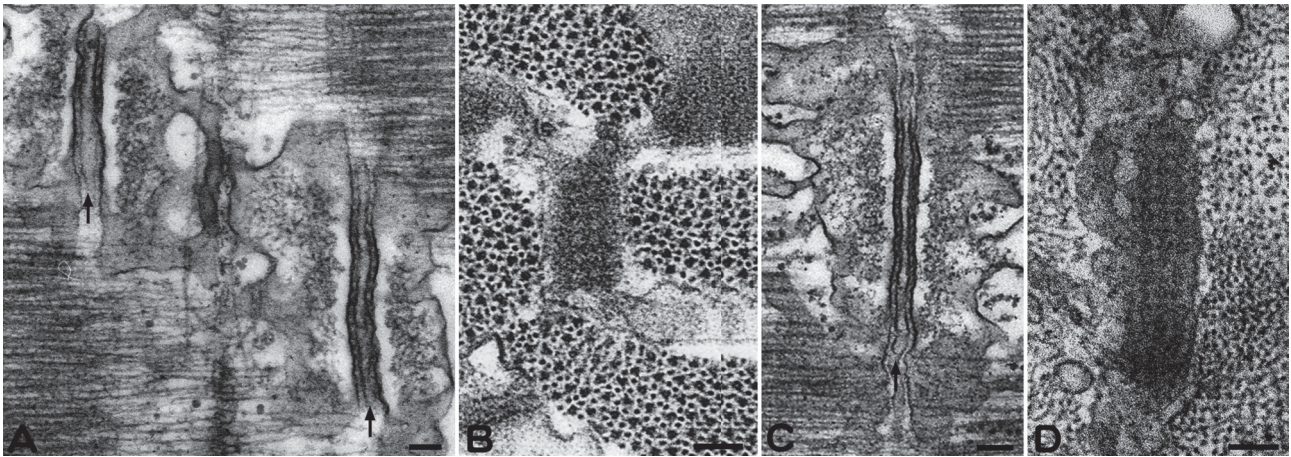


Fig. 4. Feet array in triadic contacts of scorpionfish SBM. A and B. Cross-sectional views of A-I type triads, showing a feet row with regular intervals (A) and a square lattice of feet (B). C and D. Cross-sectional views of Z-type triads, showing a feet row with regular intervals (C) and a square lattice of feet (D). Arrows indicate T tubule. Scale bars, 100 nm.

Table 1. Dimensions and distances of structural components of triadic contacts in scorpionfish swimbladder muscles

#	Structural components	AI-type triad nm (n=)	Z-type triad nm (n=)	Level of significance
A	Inner diameter of T tubule	24.1 ± 7.8 (51)	24.4 ± 6.9 (52)	> 0.5
	Outer diameter of T tubule	45.1 ± 10.0 (51)	44.6 ± 8.6 (52)	> 0.5
	Junctional gap distance	11.6 ± 1.7 (88)	11.0 ± 1.3 (111)	< 0.001
	C-C D* between feet	33.7 ± 4.0 (129)	32.5 ± 2.3 (121)	< 0.001
	Long diameter of foot	16.7 ± 3.4 (159)	16.3 ± 3.0 (318)	> 0.5
	Short diameter of foot	9.7 ± 1.8 (159)	9.6 ± 1.2 (117)	> 0.4
	C-C D* between horizontal rows	36.3 ± 3.6 (32)	36.8 ± 3.7 (33)	> 0.5
B	C-C D* between vertical rows	39.3 ± 2.4 (18)	42.7 ± 4.1 (27)	> 0.01
	Side length of foot	27.7 ± 2.3 (31)	29.3 ± 2.6 (30)	> 0.01

A, B : Measurements in EM images of longitudinal (A) and transverse (B) sections.

C - C D* : Center-to-center distance.

Values are the mean ± SD.

Production of anti-RyR antibodies

To purify RyR (α and β) of scorpionfish muscles, the solubilized SR from SBM and BWM was fractionated by sucrose density-gradient centrifugation. The resulting 16 fractions were analyzed for composition by SDS-PAGE and for [3 H]ryanodine-binding activity. The 12th and 13th fractions from SBM and BWM strongly revealed the presence of proteins corresponding to RyR used as the standard marker, and [3 H] ryanodine-binding activity.

SDS-PAGE for SR fractions of scorpion fish muscles indicated two bands corresponding to the α RyR and β RyR bands exhibited in SR fractions of *Xenopus* (Fig. 5A). Western blotting for these two bands using anti-RyR antibodies derived from synthetic peptide demonstrated strong binding activity (Fig. 5B), indicating that scorpionfish SBM and BWM

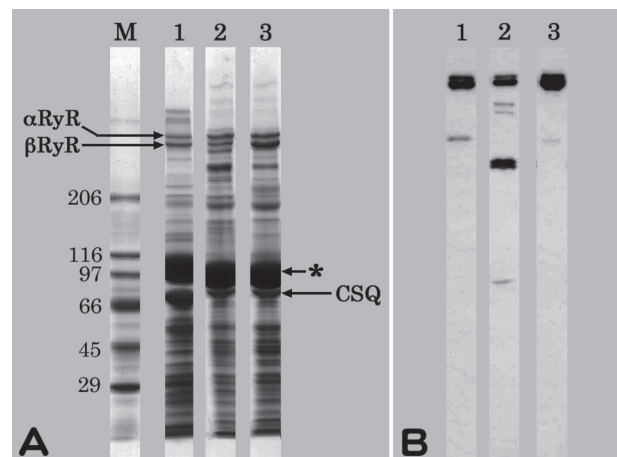


Fig. 5. Analysis of SR fractions of scorpionfish muscles on SDS-PAGE (A) and western blotting using anti-RyR antibodies derived from synthetic peptide (B). Lane M, markers. Lane 1, SR fractions of *Xenopus*. Lane 2, scorpionfish SBM. Lane 3, scorpionfish BWM. *, Ca-ATPase.

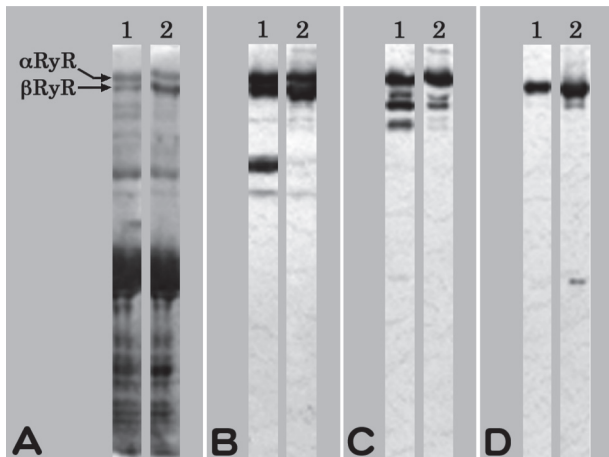


Fig. 6. Specificity of the isoform-specific antibodies against α RyR and β RyR. A. Purified α RyR and β RyR from SR fractions of scorpionfish SBM (Lane 1) and BWM (Lane 2), separated by SDS-PAGE, transferred electrophoretically onto a PVDF membrane, and stained with Coomassie Brilliant Blue. B-D. Immunoblotting against RyR (shown in A) by using the anti-RyR antibody derived from synthesized peptide (B), the anti-SBW α RyR antibody (C) and the anti-SBM β RyR antibody (D). Lane 1, scorpionfish SBM. Lane 2, scorpionfish BWM.

contain both α RyR and β RyR. In SDS-PAGE, bands derived from Ca-ATPase and CSQ were also detected.

The specificity of the isoform-specific anti- bodies

derived from rabbit serum against α RyR and β RyR of SBM and BWM was examined. As shown in Fig. 6, RyR proteins on the PVDF membrane were immunostained well, indicating the successful production of anti-SBM and BWM RyR (α and β) antibodies.

Immunoelectron microscope observation

The distribution of α RyR and β RyR in the scorpionfish SBM was examined by immunoelectron microscopy. To visualize the localization of RyR isoforms, secondary antibodies conjugated with gold particles of diameter 5 and 10 nm were used against the primary anti- α RyR antibody and anti- β RyR antibody, respectively. Typical results are shown in Fig. 7. No gold particles were observed when SBM was treated without the primary antibodies in whole fibers including AI-type (Fig. 7A, E) and Z-type triads (Fig. 7I), indicating that no specific reaction was caused by process of immunostaining. In the sections stained with primary and secondary antibodies, gold particles with both small and large diameters were observed as clusters at triadic junctions, especially on the junctional membrane of SR, in AI-

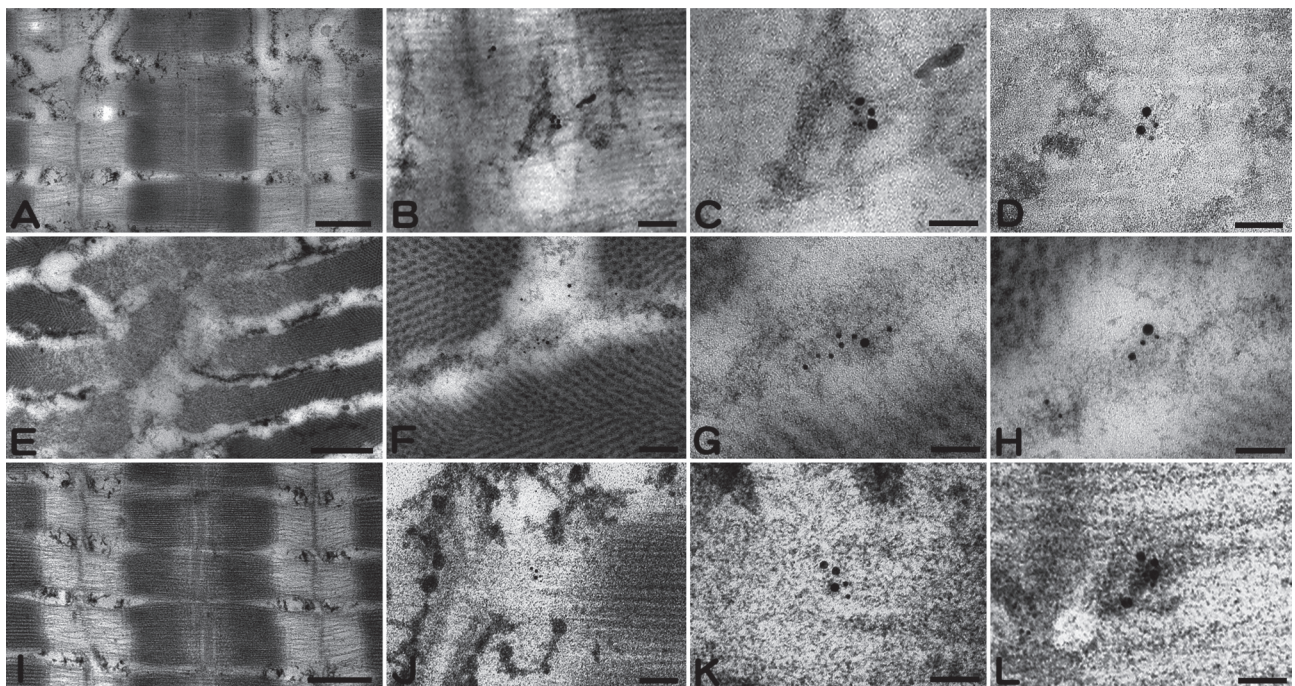


Fig. 7. Immunoelectron microscope images for RyR isoforms labeled with anti-SBM α RyR and β RyR antibodies in scorpionfish SBM. A-H. Cross-sectional views of AI-type triads in longitudinal sections (A-D) and transverse sections (E-H). I-L. Cross-sectional views of Z-type triads in longitudinal sections. Antibodies conjugated with gold particles (small for α RyR and large for β RyR), indicating localization of RyR isoforms, are never detected in sections treated without antibodies (A, E, I), and found together in the junctional region of triadic contact in sections treated with antibodies (B-D, F-H, J-L). C, G and K are enlarged views of B, F and J, respectively. Other enlarged views are also shown in D, H and L. Note the array of gold particles. Scale bars, 500 nm (A, E, I); 100 nm (B, F, J); 50 nm (C, D, G, H, K, L).

type triads (Fig. 7B, C, D, F, G, H) and Z-type triads (Fig. 7J, K, L). In Fig. 7C showing the longitudinal view of AI-type triads, three large particles are arrayed linearly with roughly equal spacing along the junctional membrane, and four small particles are arrayed in parallel with the row of large particles. In Fig. 7G showing the transverse view of AI-type triads, seven small particles are arrayed roughly linearly with one large particle. In Fig. 7K showing the longitudinal view of Z-type triads, three large particle and two small particles appear closely side-by-side. In the observations of particle arrays, small and large particles were never found along the same lines; they were segregated from each other to form the respective lines.

To consider the arrangement of RyR isoforms on the junctional SR membrane of triads, center-to-center distances between gold particles were measured. In the A-I type triad, distances were 19.2 ± 9.6 nm ($n=66$) between small particles, 24.8 ± 14.2 nm ($n=55$) between large particles, and 21.2 ± 7.6 nm ($n=96$) between small and large particles. In the Z-type triad, distances were 29.0 ± 22.1 nm ($n=40$) between small particles, 36.3 ± 21.7 nm ($n=43$) between large particles, and 30.2 ± 16.9 nm ($n=58$) between small and large particles.

Immunoelectron microscopy was also applied to detect Ca-binding protein, CSQ, in the scorpionfish SBM. Gold particles were detected in the terminal cisternae of SR (Fig. 8), as suggested previously by the existence of the CQS band on SDS-PAGE (Fig. 5A).

Discussion

Distribution of triadic contacts

As revealed in the previous study, in posterior SBM fibers, AI-type triads and Z-type triads are regularly

located respectively in the middle and both ends of the fiber⁶⁾. In contrast, precise observations clarified that the triadic contacts were only Z-type triads in the anterior SBM fibers, although other triadic contact (pentad and/or heptad) was observed exceptionally. Furthermore, the triadic contacts were Z-type triads exclusively in seven kinds of body muscles. In addition, SBM and body muscles of other sound-producing fish respectively contained only one type of triadic contacts. The present results reconfirmed that the coexistence of two different types of triad in the posterior SBM of scorpionfish is an extremely rare example among vertebrates, and suggested that the different distribution of triadic type between anterior and posterior parts in SBM is meaningful for sound production in the swimbladder.

Two-dimensional array of feet

The measured dimensions of feet and the center-to-center distance between them in longitudinal sections coincided well with values reported in previous papers^{8, 14, 15)}. In transverse sections, feet were arrayed as a square lattice on the junctional SR membrane as found in the SBM of toadfish¹⁴⁾. The lattice array was generally constructed with a few vertical lines and numerous horizontal rows. Since they were observed in the same plane, it was difficult to identify whether the outside lines corresponded to the row of parajunctional feet proposed in another paper¹⁵⁾. The side lengths of each foot comprising the array were approximately 28 nm and 29 nm in AI- and Z-type triads respectively, agreeing well with the established values¹⁶⁾.

The center-to-center distances of feet located on the vertical lines in lattice arrays were approximately 36 nm in AI- and Z-type triads, and shorter than the diagonal length (~40 nm) of square feet with 25 nm side length. This result means that feet are arrayed at an angle to the vertical axis in the lattice array; the angle was estimated to 5~8 degrees by means of geometric figure analysis on papers. In contrast, the center-to-center distances of feet located on the horizontal rows in lattice arrays were approximately 39 and 43 nm in AI- and Z-type triads, respectively, and the values roughly corresponded to the diagonal length (~40 nm) of the square foot. However, if the respective foot is arranged on the vertical line of the lattice at 5~8° angles to the line axis, horizon-

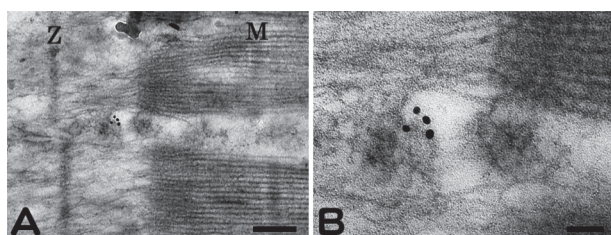


Fig. 8. Immunoelectron microscope images for CSQ labeled with anti-CSQ antibodies in scorpionfish SBM. Antibodies conjugated with gold particles, indicating localization of CSQ, are found in the region of SR terminal cisternae. Scale bars, 200 nm (A); 50 nm (B).



Fig. 9. Schematic drawing of feet array in scorpionfish SBM. Numbers of horizontal lattice rows and vertical lattice lines are not real. Center-to-center distances between feet ($a \approx 40$ nm, $b \approx 36$ nm).

tal rows may form with a space of 3~4 nm between them, as shown in Fig. 9. This fact may support the orthogonal array of feet proposed previously^{15, 17)}.

Localization and two-dimensional array of α RyR and β RyR

Isolation and identification of SR membrane proteins revealed that, in scorpionfish, two kinds of RyR isoforms (α and β) are contained not only in SBM but also in BWM. Immunoelectron microscope observations demonstrated their localization on the junctional SR membrane in both AI- and Z-type triads of SBM. Regarding the existence of RyR isoforms, the present results contrasted with the case of toadfish; it has been reported that the SBM of toadfish contains only α RyR¹⁸⁾. The discrepancy may be due to specific differences among fish and/or muscle type.

The center-to-center distances between gold particles suggested that RyR were roughly arrayed on the junctional membrane. However, using only this measurement, it is difficult to know the precise arrangement on the square lattice expected from the section view as shown in Fig. 4, because the length of IgG antibody and particle size may disturb the real position of membrane proteins. On the other hand, the pattern of the particle array was significant. Although small and large particles were arrayed linearly, they were never observed along the same line. This means that each RyR isoform forms an inherent line, excluding other isoforms, and supports a similar idea of segregated array proposed elsewhere¹⁵⁾. Since α RyR is believed to be the electrically-sensitive Ca-release channel (foot)⁹⁾, it seems likely that the line including α RyR occupies the central position in the square lattice of feet, exactly opposing the T tubule membrane including DHPR.

References

- 1) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. mol. Biol.* **18**: 123-183.
- 2) Gordon AM (1982) Muscle. In: *Physiology and Biophysics IV. Excitable Tissues and Reflex Control of Muscle*. Ruch T and Patton HD, eds., WB Saunders Company, Philadelphia. pp.170- 260.
- 3) Bagshaw CR (1994) *Muscle Contraction*. Chapman & Hall, London.
- 4) Franzini-Armstrong C and Jorgensen AO (1994) Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **56**: 509- 234.
- 5) Bloom W and Fawcett DW (1975) *A Textbook of Histology, 10th Ed.* WB Saunders Company, Philadelphia.
- 6) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
- 7) Tower RW (1908) The production of sound in the drumfishes, the searobin and the toad fishes. *Ann. New York Acad. Sci.* **18**: 149-180.
- 8) Franzini-Armstrong C and Jorgensen AO (1994) Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **56**: 509- 534.
- 9) O'Brien J, Valdivia HH and Block BA (1995) Physiological differences between the α and β ryanodine receptors of fish skeletal muscle. *Biophysical. J.* **68**: 471-482.
- 10) Funabara D, Hamamoto C, Yamamoto K, Inoue A, Ueda M, Osawa R, Kanoh S, Hartshorne DJ, Suzuki S and Watabe S (2007) Unphosphorylated twitchin forms a complex with actin and myosin that may contribute to tension maintenance in catch. *J. Exp. Biol.* **210**: 4399-4410.
- 11) Suzuki S, Hatakeyama R, Hamamoto C, Nomura K, Ishii Naonori, Ono Yuriko, Yamanaka Y, Itoh A, Hachisuka M, Murayama N, Tanno Y, Hanyuu M, Murofushi Narumi, Yamamoto T and Kajino A (2020) Physiological and ultrastructural studies on the origin of activator calcium in body wall muscles of spoon worms. *Sci. J. Kanagawa. Univ.* **31**: 1-10.
- 12) Murayama T and Ogawa Y (1992) Purification and characterization of two ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle. *J. Biochem.* **112**: 514-522.
- 13) Chugun A, Taniguchi K, Murayama T, Uchide T, Hara Y, Temma K, Ogawa Y and Akere T (2003) Subcellular distribution of ryanodine receptors in the cardiac muscle of carp (*Cyprinus carpio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**: R601-609.
- 14) Franzini-Armstrong C (1970) Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* **47**: 489-499.
- 15) Felder E and Franzini-Armstrong C (2002) Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**: 1695-1700.
- 16) Franzini-Armstrong C (1972) Studies of the triad. III. Structure of the junction in fast twitch fibers. *Tiss. Cell* **4**: 469-478.
- 17) Block BA, Imagawa T, Campbell KP and Franzini-

Armstrong C (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **107**: 2587-2600.

18) O'Brien J, Meissner G and Block BA (1993) The fastest contacting muscles of nonmammalian vertebrates express only one isoform of the ryanodine receptor. *Biophysical. J.* **65**: 2418-2427.

■ Full-Length Paper ■ By a grant from Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

Crystallization of Amorphous Si Layer Assisted by Quantum Beam Irradiation Studied by Rutherford Backscattering Channeling Method

Yasushi Hoshino^{1,2,3} and Jyoji Nakata^{1,2}

¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed: E-mail: yhoshino@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We investigated the crystallization of an amorphous Si layer grown on single crystalline Si substrates enhanced by irradiation with various energetic particles. We comprehensively compared the crystallization rate on 150-keV proton beam irradiation with that on 8-MeV electron beam irradiation under the same condition of displaced atom density to examine the effect of inelastic energy deposition on crystallization, since the electronic energy loss in Si for a 150-keV proton is significantly different from that for an 8-MeV electron. The crystallization rate was quantitatively analyzed by the Rutherford backscattering channeling method. Consequently, recrystallization of the amorphous Si layer was only observed in the case of proton beam irradiation. We proposed some factors to explain the beam induced crystallization process observed with high-energy proton and electron irradiation.

Keywords: ion beam induced epitaxial crystallization, electron beam induced epitaxial crystallization, nuclear energy deposition, electronic energy deposition, Rutherford backscattering spectroscopy

Introduction

Quantum beam irradiation is one of the essential techniques for fabrication of functional materials as well as characterization of material properties. It is well recognized that ion implantation has in particular succeeded in highly controlled selective impurity doping in materials and widely applied to fabrication of semiconductor devices today. It is previously reported that annealing under ion beam irradiation enhances the epitaxial crystallization of amorphous Si layer synthesized on a single crystalline Si substrate at low substrate temperatures at which the crystallization could not take place by conventional annealing under thermal equilibrium condition¹⁻⁹⁾. Such an epitaxial crystallization at low temperatures was also observed in electron beam irradiation so far¹⁰⁻¹³⁾. Here, beam induced epitaxial crystallization by ion and electron beam is respectively known as IBIEC (ion beam induced epitaxial crystallization) and EBIEC (electron beam induced epitaxial crystallization). Here, the energy deposition process

from energetic particles to lattice system is categorized into two contributions of inelastic energy deposition of electron excitation/ionization and elastic energy deposition by direct collision between incident and target nuclei. It has been widely recognized that the creation of vacancies and interstitials induced by elastic collisions primarily plays the most important role in the beam induced crystallization processes. Some researchers however pointed out that the electron-hole pairs generated by electronic energy deposition due to inelastic scattering also greatly contribute to the enhancement of recrystallization, though the reliable verification on the role of inelastic energy deposition in the recrystallization process has not been found yet¹⁴⁻¹⁷⁾. To clarify the recrystallization mechanism, the irradiation of different types of energetic particles, which provide different energy deposition and defect formation in a lattice system, should be valuable.

We performed EBIEC and IBIEC treatments to

amorphized Si(100) samples at 400°C, and compared the results under the same conditions of substrate temperature and the nucleation density of displaced atom. We comprehensively investigated EBIEC and proton-IBIEC, in which the electronic energy loss is predominant process in ion-solid interactions rather than nuclear energy loss, and discuss the role of inelastic energy deposition in the radiation enhanced crystallization.

Materials and Methods

We prepared a 4-inch *n*-type Si(100) ($1-10\ \Omega\text{ cm}$) wafer and cleaved it to small $6 \times 6\text{ mm}^2$ pieces. These samples were then self-irradiated by 190-keV Si^+ ions with ion fluences of 2.0×10^{15} and $5.0 \times 10^{15}\text{ cm}^{-2}$ at room temperature (RT) to form surficial amorphous Si layer.

Electron beam irradiation was performed by electron linear accelerator (LINAC) facility at the Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University. Pulsed electron beam of 8-MeV energy was irradiated to the samples at the substrate temperature of 400°C with a beam fluence of $4.2 \times 10^{19}\text{ cm}^{-2}$ in He gas ambient. The irradiation time was about 46 h. The fluence was determined so that the atomic displacement density of $4.5 \times 10^{20}\text{ cm}^{-3}$ ($\sim 0.01\text{ dpa}$: displacement per atom) coincides with that in the previous neutron irradiation experiments¹⁸⁾. Here, the cross section for atomic displacement of Si in irradiation of 8-MeV electron was obtained by interpolation in numerically calculated values reported by Oen, to be about $3 \times 10^{-22}\text{ cm}^2$ ¹⁹⁾. The sample temperature was monitored by K-type thermocouples contacting the back-surface of samples via an ultra-thin mica film. During the EBIEC treatment, we carefully adjusted the beam current and air flow intensity of a blower set outside the irradiation chamber to keep the substrate temperature at 400°C.

To substantially distinguish the crystallization by electron beam irradiation from that by the thermal effect, we annealed another piece of amorphized samples in a conventional electrical furnace in He ambient without beam irradiation at the same temperature and durations as the conditions of EBIEC treatments.

Ion irradiation was carried out with a 200-kV medium-current ion implanter at Shonan Hirat-

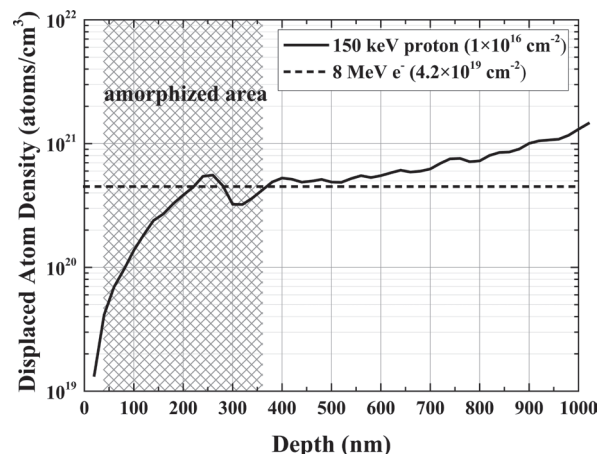


Fig. 1. The atomic displacement density for 150-keV proton and 8-MeV electron with the respective fluences of 1.0×10^{16} and $4.2 \times 10^{19}\text{ cm}^{-2}$ as a function of depth.

suka Campus, Kanagawa University. The proton beam with an incident energy of 150-keV was irradiated at 400°C with a fluence of $1 \times 10^{16}\text{ cm}^{-2}$. The beam flux was $\sim 2 \times 10^{11}\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$. According to TRIM Monte-Carlo simulation²⁰⁾, the atomic displacement density around the interesting region with a fluence of $1.0 \times 10^{16}\text{ cm}^{-2}$ is estimated to be $4.5 \times 10^{20}\text{ cm}^{-3}$, which is comparable to that by the EBIEC treatment of $4.2 \times 10^{19}\text{ cm}^{-2}$ fluence. The atomic displacement density for 150-keV proton and 8-MeV electron with the respective fluences of 1.0×10^{16} and $4.2 \times 10^{19}\text{ cm}^{-2}$ as a function of depth is shown in Fig. 1. In order to evaluate the actual IBIEC effect on recrystallization, we covered half area of the sample surface with another small Si piece; accordingly, the masked area can be a good monitor for thermal annealing effect at 400°C without beam irradiation.

The crystallized thickness and quality of irradiated

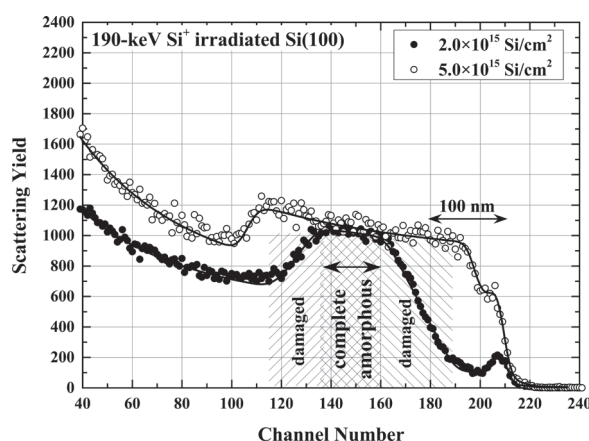


Fig. 2. RBS-channeling spectra for prepared as-amorphized specimens by self-bombardment with 2×10^{15} and $5 \times 10^{15}\text{ cm}^{-2}$ fluences.

area were analyzed by Rutherford backscattering (RBS) channeling method using 2.0 MeV Li^{2+} projectiles at the scattering angle of 120° .

Figure 2 shows RBS-channeling spectra for prepared as-amorphized specimens by self-bombardment with 2×10^{15} and $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ fluences. It is clearly found in RBS spectrum for the as-amorphized sample with $2.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ fluence that an embedded amorphous Si layer with $\sim 100 \text{ nm}$ (Fig. 2A) width was sandwiched with damaged Si layers. After the Si^+ irradiation of $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ fluence, the embedded amorphous region grew significantly toward the surface and deeper substrate, though very thin surface and interface regions were not completely amorphized and remained as damaged layers, probably consisting of amorphous-like structure incorporating small crystalline Si grains.

Results

Figure 3 shows RBS-channeling spectra for the samples of as-amorphized (red), EBIEC (green), and furnace-annealed (blue) for different self-bombarded samples with Si fluences of (A) 2.0×10^{15} and (B) $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$. As clearly seen in the spectra with green

and blue colors depicted in Fig. 3A, the recrystallization took place from both sides of the upper and deeper interfaces by EBIEC as well as by FA treatment. The recrystallization rate was however significantly slow down near the embedded complete amorphous layer. The remarkable difference in the crystallization between EBIEC and FA treatments was not confirmed. The observed recrystallization was therefore attributed to only the thermal effect at 400°C temperature. In Fig. 3B, the crystallization in thin damaged layer existing very near the surface and the deeper interface was observed by both EBIEC and FA treatments, but the crystallization almost stopped in front of the complete amorphous region. The *a/c* interfaces did not move even though the fluence further increased. Small crystalline grains remaining in the heavily damaged regions are presumably involved in the recrystallization. Consequently, the significant enhancement of the crystallization of amorphized Si layer by EBIEC treatment was not clearly confirmed in the annealing treatments at 400°C .

We next show the effect of IBIEC treatment by 150 keV proton irradiation on the recrystallization of

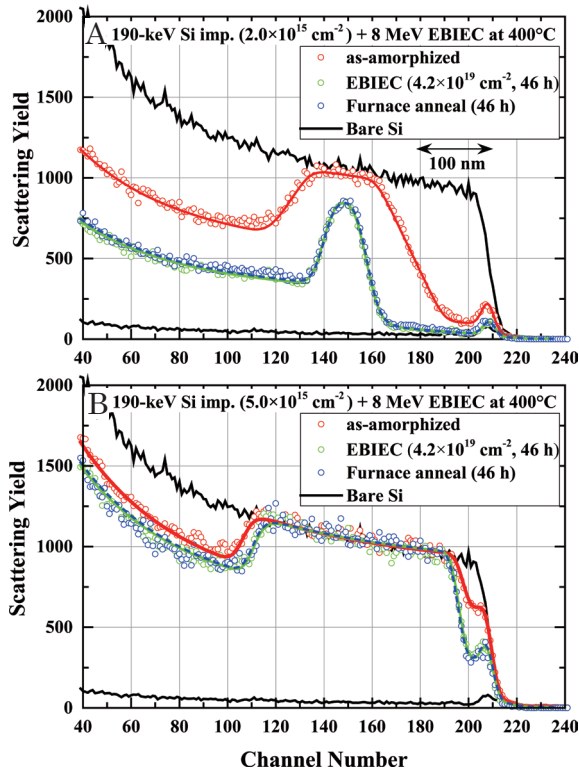


Fig. 3. RBS-channeling spectra for the samples of as-amorphized (red), EBIEC (green), and furnace-annealed (blue) at 400°C for different self-bombarded samples with Si fluences of (A) 2.0×10^{15} and (B) $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$.

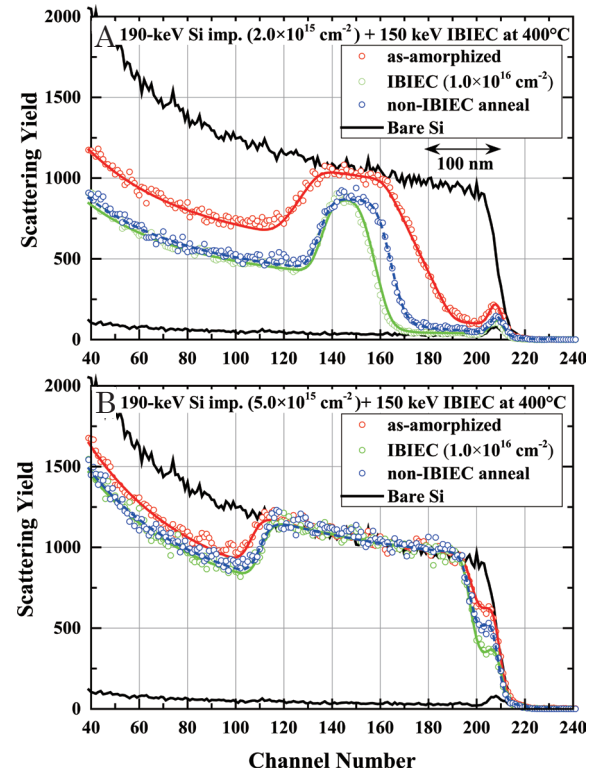


Fig. 4. RBS-channeling spectra for the samples of as-amorphized (red), proton-IBIEC (green), and furnace-annealed (blue) at 400°C for different self-bombarded samples with Si fluences of (A) 2.0×10^{15} and (B) $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$.

amorphous Si layer embedded in Si(100) substrates synthesized by self-bombardment. Figure 4 shows RBS-channeling spectra for the samples of as-amorphized (red), proton-IBIEC (green), and furnace-annealed (blue) for different self-bombarded samples with Si fluences of (A) 2.0×10^{15} and (B) $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$. The crystallization by non-IBIEC annealing was almost stopped in front of the embedded amorphous region (see blue curve), as already observed in the EBIEC samples shown in Fig. 3. It is found on the other hand that the recrystallization by proton IBIEC treatment progressed from the upper *c/a* interface overcoming the depth near which the crystallization stopped for the non-IBIEC sample (compare green curve to blue one). The front *c/a* interface moved toward deeper direction as further increasing IBIEC fluence by proton, which was not observed in the EBIEC treatments. After Si^+ irradiation of $5.0 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ fluence, the recrystallization took place from the damaged region located near both deeper and shallower *a/c* interfaces, as already mentioned in EBIEC and FA samples (Fig. 3). In the deeper damaged layer, recrystallization proceeded up to the amorphous region, but completely stopped in front of the complete amorphous region ($\sim 350 \text{ nm}$ depth). In the shallower damaged layer ($< 40 \text{ nm}$ depth), the recrystallization was initially developed laterally and then vertically proceeded. It is consequently suggested that ion beam irradiation significantly assists the epitaxial recrystallization.

Discussion

As described above, electron beam irradiation did not show annealing effect of amorphous Si. However, proton beam annealing effectively enhanced the epitaxial recrystallization. As already mentioned in Fig. 1, the atomic displacement density around the focused depth region generated by H-irradiation of $1.0 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ fluence was estimated to be $4.5 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$, which is comparable to that by EBIEC treatment of $4.2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$ fluence.

The electronically deposited energy (A) and the total number of created electron-hole pairs (B) by 150-keV proton ($1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$) and 8-MeV electron ($4.2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$) in Si are shown in Fig. 5. The data for proton was referred from SRIM table²⁰⁾ and those for electron was from a data table edited by Berger and Seltzer²¹⁾. Here, the two contributions of energy

transfer from high-energy electron beam: direct collision and Bremsstrahlung were considered, though 8-MeV electrons employed in this study predominantly lose the kinetic energy via the direct collision processes of electron excitation and ionization. The inelastic energy loss of 150-keV proton and 8-MeV electron in Si material is thus estimated to be about 100 eV/nm and 0.4 eV/nm, respectively. It is clearly found that total electron-hole pairs by the electron beam irradiation is about one order higher than those by proton beam irradiation, indicating that large energy deposition by inelastic effect from 8-MeV electron is more expected. As shown in Figs. 4 and 5, however, the enhancement of recrystallization was not observed for the EBIEC process, suggesting that the recrystallization occurred in the IBIEC process cannot be demonstrated by only inelastic energy effect. We thus consider possible three factors for accounting for observed results. It is firstly known that electron beam irradiation to Si did not form collision cascade, resulting in differ-

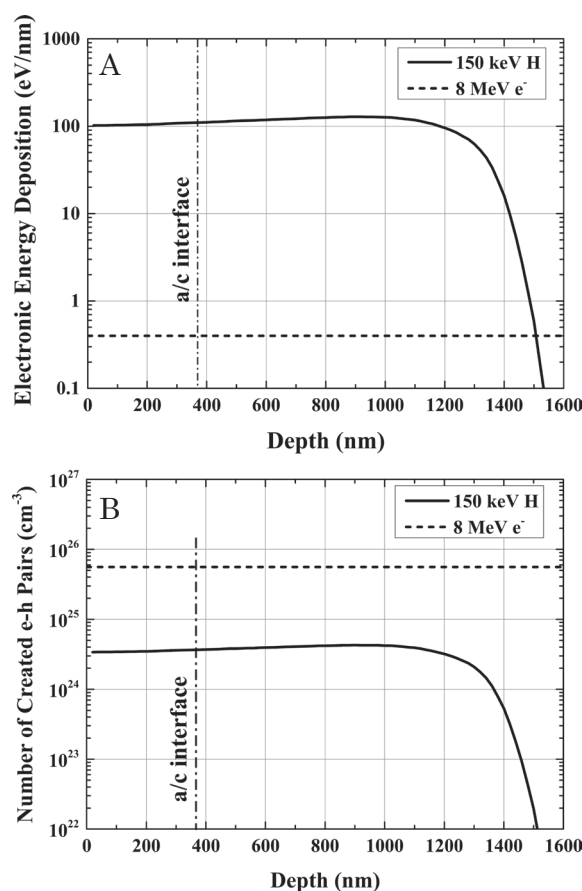


Fig. 5. electronically deposited energy (A) and the total number of created electron-hole pairs (B) from 150-keV proton ($1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$) and 8-MeV electron ($4.2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$) in Si.

ent defect profiles in solid materials. Secondly, the actual dpa rate was significantly different between them. Thirdly, we may consider the H incorporation near a/c interface during H-IBIEC process, which probably affect the crystallization behavior. According to the previously proposed IBIEC mechanism, the crystallization rate is only dominated by the number of atomic displacements near the a/c interface, indicating that the rate can be scaled by nuclear stopping power^{7, 22, 23}. However, the present results clearly suggest that another factor should be considered to demonstrate the beam-induced recrystallization processes.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Mr. T. Iha, Dr. A. Yabuuchi, and Prof. A. Kinomura for their great supports in beam irradiation experiments. We also thank to Mr. Y. Saito for his help to maintenance of experimental apparatus. This research was partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University.

References

- 1) Kool WH, Roosendaal E, Wiggers LW and Saris FW (1978) Production and beam annealing of damage in carbon implanted silicon. II. *Radiat. Eff.* **36**: 41-48.
- 2) Golecki I, Chapman GE, Lau SS, Tsaur BY and Mayr JW (1979) Ion-beam induced epitaxy of silicon. *Phys. Lett. A* **71**: 267-269.
- 3) Nakata J, Takahashi M and Kajiyama K (1981) In situ self ion beam annealing of damage in Si during high energy (0.53 MeV-2.56 MeV) As⁺ ion implantation. *Jpn. J. Appl. Phys.* **22**: 2211-2221.
- 4) Elliman RG, Williams JS, Brown WL, Leiberich A, Maher DM and Kneol RV (1987) Ion-beam-induced crystallization and amorphization of silicon. *Nucl. Instrum. Method B* **19/20**: 435-442.
- 5) Holland OW (1989) Interaction of MeV ions with pre-existing damage in Si: A new ion beam annealing mechanism. *Appl. Phys. Lett.* **54**: 320-322.
- 6) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam-induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon. *Mater. Sci. Rep.* **5**: 319-379.
- 7) Linnros J, Holmén G and Svensson B (1985) Proportionality between ion-beam-induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev. B* **32**: 2770-2777.
- 8) Williams JS, Elliman RG, Brown WL and Seidel TE (1985) Dominant influence of beam-induced interface rearrangement on solid-phase epitaxial crystallization of amorphous silicon. *Phys. Rev. Lett.* **55**: 1482-1485.
- 9) Kinomura A, Williams JS and Fujii K (1999) Mass effects on regrowth rates and activation energies of solid-phase epitaxy induced by ion beams in silicon. *Phys. Rev. B* **59**: 15214-15224.
- 10) Lulli G and Merli PG (1987) Solid-phase epitaxy of amorphous silicon induced by electron irradiation at room temperature. *Phys. Rev. B* **36**: 8038-8042.
- 11) Corbett JW and Bourgoin JC (1975) *Point Defects in Solids: Vol. 2*. Plenum, New York.
- 12) Lulli G and Merli PG (1993) Comparison of results and models of solid-phase epitaxial growth of implanted Si layers induced by electron- and ion-beam irradiation. *Phys. Rev. B* **47**: 14023-14031.
- 13) Hoehl D, Heera V, Bartsch H, Wollschläger K, Skorupa W and Voelskow M (1990) Temperature dependence of electron beam induced epitaxial crystallization of silicon. *Phys. Status Solidi A* **122**: K35-K37.
- 14) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature ($\leq 300^\circ\text{C}$) crystallization and amorphization for the amorphous Si layer on the crystalline Si substrate by high-energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev. B* **43**: 14643-14668.
- 15) Nakata J (1996) Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion-beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **79**: 682-698.
- 16) Sahoo PK, Mohanty T, Kanjilal D, Pradhan A and Kulkarni VN (2007) Epitaxial recrystallization of amorphous Si layers by swift heavy ions *Nucl. Instrum. Methods B* **257**: 244-248.
- 17) Sahoo PK, Som T, Kanjilal D and Kulkarni VN (2005) Swift heavy ion beam induced recrystallization of amorphous Si layers. *Nucl. Instrum. Methods B* **240**: 239-244.
- 18) Kinomura A, Yoshiie T, Chayahara A, Mokuno Y, Tsubouchi N, Horino Y, Xu Q, Sato K, Yasuda K and Ishigami R (2014) Neutron-enhanced annealing of ion-implantation induced damage in silicon heated by nuclear reactions. *Nucl. Instrum. Methods B* **334**: 48-51.
- 19) Oen OS (1973) *Cross sections for atomic displacements in solids by fast electrons*. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge.
- 20) Ziegler JF, Biersack JP and Littmark U (1985) *The Stopping and Ranges of Ions in Solids*. Pergamon, New York.
- 21) Berger MJ and Seltzer SM (1982) *Stopping powers and Ranges of Electrons and Positrons*. National Bureau of Standards, Washington D.C.
- 22) Williams JS, Young IM and Conway MJ (2000) Ion beam induced epitaxy experiments in silicon under channeling and random alignments. *Nucl. Instrum. Methods B* **161-163**: 505-509.
- 23) Azevedo GdM, Williams JS, Young IM, Conway MJ and Kinomura A (2002) In situ measurements of the channeling dependence of ion-beam-induced recrystallization in silicon. *Nucl. Instrum. Methods B* **190**: 772-776.

■ Full-Length Paper ■ By a grant from Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

Examination of Phytoplankton Cells by Isolated Cultured Cell Images as Teacher Data

Yongjie Yu¹, Yoshihiro Suzuki² and Shanjun Zhang^{3,4}

¹ Graduate School of Sci. Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, the Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Department of Computer Science, the Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: zhang@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Analysis of the species composition of phytoplankton communities (analysis of community structure), which is indispensable for analysis of photosynthesis and CO₂ absorption, requires long-term image authentication work by skilled researchers. If this work becomes possible through image processing with high accuracy and in large quantities, research on photosynthesis and CO₂ absorption in aquatic ecosystems will markedly advance. In this study, high-quality teacher data are created using isolated cultured cells by biological methods. Using these data, we developed an automatic system to analyze the phytoplankton community structure by deep learning.

Keywords: phytoplankton cells, segmentation, classification, mathematical morphology, convolutional neural networks, deep learning

Introduction

In considering the ecosystem of the Sagami River estuary, it is important to clarify the trends of phytoplankton, which is responsible for primary production¹⁾. Determining the species composition of phytoplankton communities and the accurate count of phytoplankton cells in a unit amount of water in different site is critical in evaluating the ecosystem of the Sagami River. This task is usually done manually with time-consuming and labor-intensive efforts of skilled person. This may lead to eye fatigue easily through continuous distinguishing and counting of the cells in microscopic image. With the development of computer vision technology, using automatic counting instead of manual counting becomes urgent. Lots of researchers are resorting on the capabilities of image processing to provide automatic leukocyte segmentation and counting methods based on microscopic blood images²⁻⁸⁾. Traditional methods such as thresholding, FCM (Fuzzy C Means), snake and active contour, watershed methods, support vector machine, mathematical morphology and region growing are proposed to improve the identification

and counting of cells in the microscope images⁹⁻¹¹⁾. But, most of the existing automatic cell counting methods can get the number of cells roughly and usually they are used for calculating the number of certain cell and are difficult to be widely applicable for varied cell image. There is no method for different shapes, size and morphology, and when many different types of cells are mixed in the same image, it is difficult to perform automatic counting of these cells. Nowadays, Machine learning techniques are developed to autonomously learn from mass data and then to identify particular patterns from image with high precision. It is widely used in computer vision tasks such as face detection, face recognition, person tracking, etc. The performance of machine learning heavily rely on annotations of a big set of prepared training data, which is labor-intensive. In this study, we use isolated cultured cell images as teaching data to simplify the annotation process. Then we use one of the “state of the arts” deep learning scheme YOLO (you only look once) to train and classify the phytoplankton cells^{12, 13)}. Though

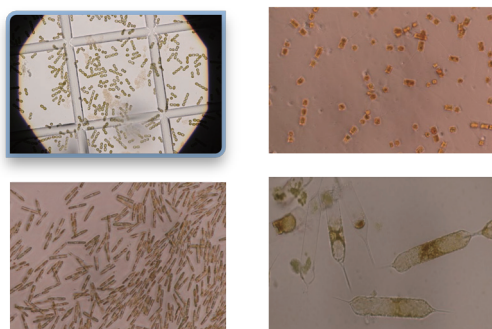


Fig. 1. Samples of homogeneous cells.

the final object is to classify multiple cells from one microscopic image, in the training stage, we can ensure the cells in the image belong to a typical same species by using biological methods. Then we can segment and mark the special cells in the training image through automatic image processing methods. After that, we can train the YOLO network separately for various phytoplankton cells. Finally, we can combine the pre-trained system into one.

Methods

Acquisition of sample data

There are about 20 dominant species of phytoplankton cells in the Sagami River estuary, each of the cells are with different structures and shapes. It is very difficult to segment and identify the cells when they are mixed together. The collected phytoplankton cells are isolated and cultured for each species from the plankton community, and are incubated for several months to grow one cell into thousands of cells. Then the microscopic images of the homogeneous cells are taken from various angles with fluorescence emitted by UV light, some of the images are taken under natural light. Figure 1 shows a set of samples of the images.

Pre-processing and segmentation

The original images are first divided from 5184×3456 into a set of 642×432 for the sake of reduction of data size. Then the images are segmented after contrast enhancement, thresholding, noise extraction, augmentation, and morphological modification. The mask images are made for individual images. With the use of these mask images, we can annotate the particular cell images automatically to get the labeled training sets. The steps of the preprocessing are summarized as follows in Fig.2.

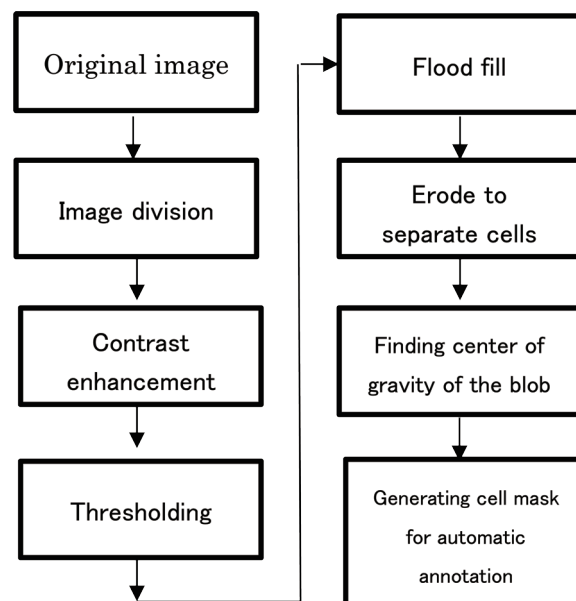


Fig. 2. Pre-processing steps for annotation.

Deep learning by SOLOv3.

Through pre-processing, we can get many cell candidates, but not all of the cells can be extracted from the original image. We will use the parts of the annotated cells to train a network to extract the features for cells of different species. VGGNet, ResNet, U-net, Fast RCNN, Faster RCNN and YOLO are well known deep learning architectures. We have tried some of the above methods and find that YOLOv3 is suitable for our purpose.

YOLOv3 algorithm is an improving algorithm which refers to the network structure of SSD and ResNet, and designs the feature extraction network Darknet-53 with 53 convolution layers as backbone. Originally, the number and value of anchor priors in YOLOv3 are clustered by VOC20 and COCO80 data sets. In this study, we modified the YOLO structure by adaptively training tiny-darknet with our own datasets. First, we train the network with a datasets which contains only one type of cells. Then we add another types of cells to adapt the system which is focused on phytoplankton cells with various shapes or cell under different growing stages. Fig. 3 shows the original network architecture¹¹⁾. Then the phytoplankton cells can be detected by the trained YOLOv3 network. Because only one type of cells is existed in the image, the detected cells can be used as training data for further improvement of the YOLOv3 network. The network is then used for detection of unknown images. After detection, it is easy

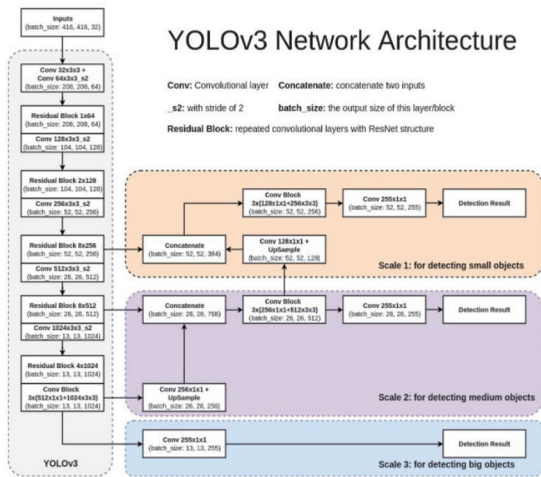


Fig. 3. YOLOv3 Network Architecture.

for us to count the number of the cells in any image with the trained cells.

Results and Discussion

To assess the performance of the methodology, 64 images of the same type of cells are used as training data. Fig. 4A shows an example of the cell image. The image is first transformed into gray scale image, and then it is converted into binary image by Otsu method. The result is shown in Fig. 4B. To fill in the holes in the binary image, we first extend the side of image with dark value, and then perform a flood fill process as shown in Fig. 4C and D. After that, Mathematical morphology filter is applied to erode the cells in the image. As shown in Fig. 4E, the connected cells are separated. The connected white pixels can be viewed as the core of the cell. By computing the moments of each of the connected parts of the image, we can get the gravity center of the candidate cells. Then, we can generate the bounding box of the cells automatically.

Finally, the original image data and the annotation information are used to train the YOLO network. Fig.5 shows some recognition results by the trained YOLOv3 network. We can see that the features of the cell was well caught by the network system. And the YOLO system can be improved by adding the identified cells into the training samples. As for different type of cells, we can also use the same scheme to train the single isolated types of the cells without manual work. In this way, we can collect large number of accurate training data for various types of cells with low labor work.

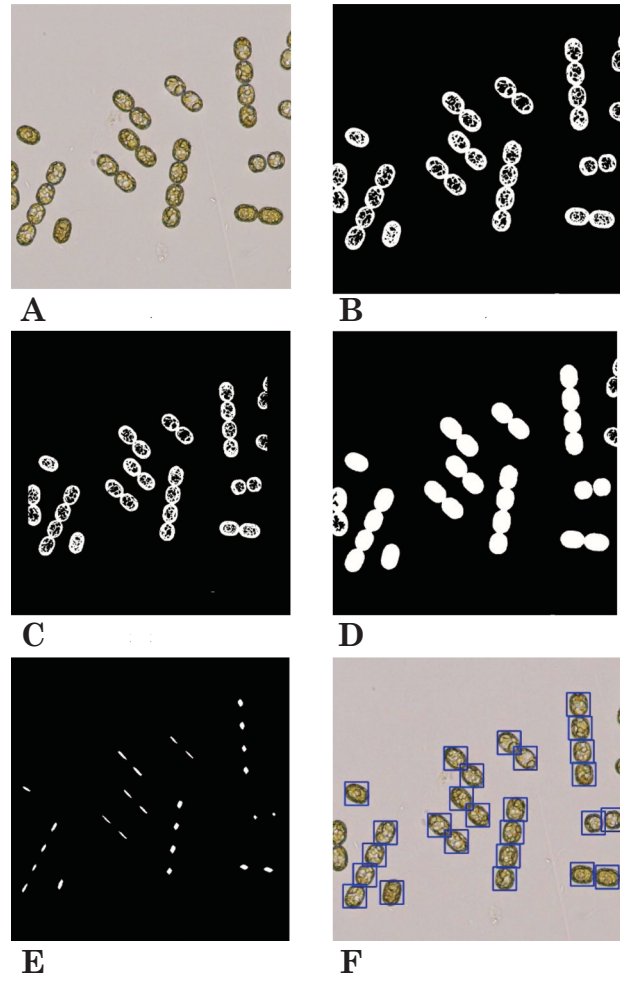


Fig. 4. Automatic annotation.

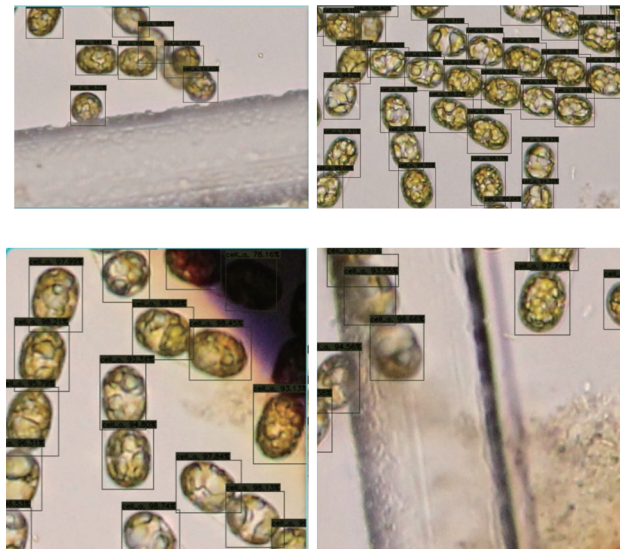


Fig. 5. Cell recognition and counting.

Conclusion remarks

In this paper, we proposed a hybrid methods, which use the biological method and computer vision techniques, to explore the phytoplankton cells in Sagami

River estuary. We take the advance of techniques of the both fields to try to alleviate the burdens of the process. When many different types of cells are mixed together, it is difficult to annotate them automatically. Segmentations of the cells with different textures and shapes may vary for different cell types. Still, the experimental results show the efficiency of the proposed method. In the future, we will complement more segmentation method to automatically generate the bounding box for particular types of cells. Our proposed scheme has a good property for evaluation. When more and more cells are used in the system, the precision of the identification ability will get higher.

References

- 1) Hiraga Y and Suzuki Y (2013) Seasonal changes in phytoplankton distribution in the Sagami River estuary. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **24**:55-62
- 2) Malpica N, de Solorzano CO, Vaquero JJ, Santos A, Vallcorba I, Garcia-Sagredo JM and del Pozo F (1997) Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. *Cytometry* **28**: 289-297
- 3) Piuri V and Scotti F (2004) Morphological classification of blood leucocytes by microscope images. In: *2004 IEEE International Conference on Computational Intelligence for Measurement Systems and Applications, 2004*. CIMS A ed. pp. 103-108.
- 4) Cheng ED, Challa S and Chakravorty R (2009) Microscopic cell segmentation and dead cell detection based on CFSE and PI images by using distance and watershed transforms. In: *2009 Digital Image Computing: Techniques and Applications*. pp. 32-39.
- 5) Usaj M, Torkar D, Kanduser M and Miklavcic D (2011) Cell counting tool parameters optimization approach for electroporation efficiency determination of attached cells in phase contrast images. *J. of Microsc.* **241**: 303-314.
- 6) Agaian S, Madhukar M and Chronopoulos AT (2014) Automated screening system for acute myelogenous leukemia detection in blood. *Microscopic Images, IEEE Systems Journal* **8**: 995-1004.
- 7) Khobragade S, Mor DD and Patil CY (2015) Detection of leukemia in microscopic white blood cell images. In: *2015 International Conference on Information Processing (ICIP)*. pp. 435-440.
- 8) Ullah A, Xie H, Farooq MO and Sun Z (2018) Pedestrian detection in infrared images using fast RCNN. In: *2018 Eighth International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA)*. pp. 1-6.
- 9) Jakkrich L and Chamnongthai K (2018) Classification of acute leukemia using medical-knowledge-based morphology and CD marker. *Biomed. Signal Process.* **44**: 127-137.
- 10) Zubiolo A, Harb K, Studer M, Debreuve E and Descombes X (2015) Morphological analysis and feature extraction of neurons from mouse cortices multiscale 3D microscopic images. In: *2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. pp. 7466-7469.
- 11) Braiki M, Benzinou A, Nasreddine K, Labidi S and Hymery N (2016) Segmentation of dendritic cells from microscopic images using mathematical morphology. In: *2016 2nd International Conference on Advanced Technologies for Signal and Image Processing (ATSIP)*. pp. 282-287.
- 12) Redmon J and Farhadi A (2017) YOLO9000: Better, faster, stronger. In: *2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 6517-6525.
- 13) Redmon J and Farhadi A (2018) YOLOv3: An incremental improvement. [[arXiv](https://arxiv.org/abs/1804.02767) preprint arXiv: 1804.02767, 2018 - arxiv.org.]

■ Full-Length Paper ■

Characterization of *Cuscuta campestris* Cell Wall Genes Responsible for the Haustorial Invasion of Host Plants

Ryusuke Yokoyama¹, Toshiya Yokoyama², Yuki Kaga^{1,2}, Yutaka Oono³
and Kazuhiko Nishitani^{2,4}

¹ Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai city, Miyagi 980-8578, Japan

² Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka city, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Department of Radiation-Applied Biology Research, TARRI, QST, Takasaki city, Gunma 370-1292, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: nishitani@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: *Cuscuta* is one of the most widespread genera of parasitic plants that subsist on various types of herbaceous angiosperms. Since their hosts include economically important crops, understanding the molecular basis of parasitism in *Cuscuta* species is critical for crop production. Despite the advances in biology and agriculture, the mechanisms of host plant infection by parasitic plants remain largely unknown. To gain insight into the mechanism of parasitism, we focused on *Cuscuta campestris* genes encoding enzymes involved in the degradation and modification of host cell walls. Analysis of previously published RNA-seq data showed that certain genes encoding pectin methylesterases, polygalacturonases, and cellulase-like enzymes, which can potentially enzymatically weaken cell-to-cell adhesion, were correlated with the haustorial invasion of host tissues. These data confirm that haustorial invasion by *Cuscuta* species is facilitated not only by mechanical action but also by specific biochemical degradation and modification of host cell walls.

Keywords: parasitic plant, haustorium, cell wall, gene family, CAZyme

Introduction

Cuscuta species represent obligate plant stem parasites, characterized by thin stems, almost no roots and leaves, and little or no photosynthetic activity¹⁾. The stems of *Cuscuta* plants coil around those of host plants and penetrate into the host tissue using an invasive organ, called a haustorium. The haustorium contains vascular tissue, which connects with the host vascular bundles and draws most of the nutrients from the host plant. Thus, *Cuscuta* species are heterotrophic and potentially harmful to host plants, which encompass a wide range of angiosperms, including economically important crop plants. Therefore, understanding the molecular basis of parasitism by *Cuscuta* species is not only of interest from the biological perspective but also of critical importance from the crop production viewpoint.

A recent significant breakthrough in molecular ge-

netics of *Cuscuta* species has come from the whole-genome sequencing of *Cuscuta australis* and *Cuscuta campestris*, which are phylogenetically closely related to each other. *C. australis* has a relatively smaller genome (272 Mb) and harbors fewer protein-coding genes (19,671)²⁾ than *C. campestris* (581-Mb genome, 44,303 protein-coding genes)³⁾. *C. campestris* genome contains a high proportion of gene duplicates and recently proliferated long terminal repeat (LTR) retrotransposons, suggesting a recent genome duplication event in the *C. campestris* lineage³⁾. Notably, *C. campestris* is broadly sympatric in the world and therefore has been studied more intensively than other *Cuscuta* species¹⁾. Therefore, considering *C. campestris* as a representative species for the genus *Cuscuta*, we generated genetically identical homozygous lines of *C. campestris* by repeated self-pollination, and sequenced its genome to

establish our own *C. campestris* genome database (unpublished).

To facilitate the investigation of the molecular basis of parasitism and haustorium development in *C. campestris*, we previously developed two experimental procedures. The first procedure entails the microscopic evaluation of live haustorial tissue sectioned vertically relative to the host stem, thus preserving the host–parasite interface. Using this experimental procedure, we demonstrated that *C. campestris* utilizes host-produced ethylene for the proper growth of search hyphae, which finally differentiate into xylem to connect with the host vasculature during haustorium development⁴⁾. The second experimental procedure utilizes rosette leaves detached from *Arabidopsis thaliana* as the host tissue for the analysis of haustorium development *in vitro*. Using this *in vitro* system, we showed that direct contact of the parasitic hyphal cells with the host xylem is required for their differentiation into xylem vessel cells during haustorium development⁵⁾.

Within the developing *C. campestris* haustorium, search hyphae elongate to invade the host plant, thus reaching the host vascular bundles. It has been proposed that these invasion processes are facilitated not only by a simple mechanical stimulus but also by the degradation and/or modification of host cell walls^{6,7)}. It has been shown that the cell wall of the host cell directly in front of the growing tip of search hypha undergoes stretching and thinning to facilitate the entry of the hypha⁸⁾. However, little is known about the mechanisms underlying the biological degradation and modification of host cell walls.

To gain insight into the cell wall changes involved in the regulation of hyphae elongation, we characterized the expression patterns of *C. campestris* cell wall genes during haustorial invasion of the host tissue. The results showed that the expression of genes encoding pectin metabolic enzymes and glucanases were closely correlated to the haustorial invasion event.

Materials and Methods

Data availability

All protein sequence datasets of *Cuscuta campestris* and morning glory (*Ipomoea nil*), a close relative of *C. campestris*, were obtained from the plaBi database (<http://plabipd.de/portal/cuscuta-campestris>)

and *Ipomoea nil* Genome Project database (<http://viewer.shigen.info/asagao/index.php>), respectively. Additional protein sequence data for the GH9 family of *Arabidopsis thaliana*, tomato (*Solanum lycopersicum*), and *Chlamydomonas reinhardtii* were retrieved from Phytozome v13.0 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>). The *C. campestris* RNA-seq data, generated previously by our group⁵⁾, are available from the DNA Data Bank of Japan Sequenced Read Archive database (https://trace.ddbj.nig.ac.jp/dra/index_e.html/) under the accession number DRA009453.

Bioinformatic analysis

Genes encoding Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) were identified by running HMMER3 scans using the hidden Markov model (HMM) profile downloaded from the dbCAN2 HMMdb (<http://ccb.unl.edu/dbCAN2/index.php>)⁹⁾. The e-value and coverage cutoffs were 1e-15 and > 0.35, respectively.

Differentially expressed genes (DEGs) were identified using TCC¹⁰⁾ packages in R. Transcript expression levels were expressed as transcripts per million (TPM), and genes with q-value < 0.05 were designated as DEGs. Clustering analysis of DEGs was performed using the MBOCluster package in R. Venn diagrams were constructed using the VennDiagram package in R.

To conduct phylogenetic analysis, amino acid sequences of CAZymes were aligned using the DDBJ ClustalW 2.1 online freeware (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>), and phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method in MEGAX¹¹⁾.

Results

Identification and classification of CAZyme-encoding genes in *C. campestris*

Most of the cell wall-related enzymes in plants are commonly designated as CAZymes, which are categorized and listed in the CAZy database (<http://www.cazy.org>)¹²⁾. Using a protocol of dbCAN⁹⁾, we identified all CAZyme-encoding genes in *C. campestris*, including 479 *glycoside hydrolases* (GHs), 613 *glycosyl transferases* (GTs), 133 *carbohydrate esterases* (CEs), and 49 *polysaccharide lyases* (PLs). The CAZyme-encoding gene composition of *C. campestris* was highly similar to that of *I. nil* (Fig. 1). The results suggest that the genomes of *Cuscuta* species

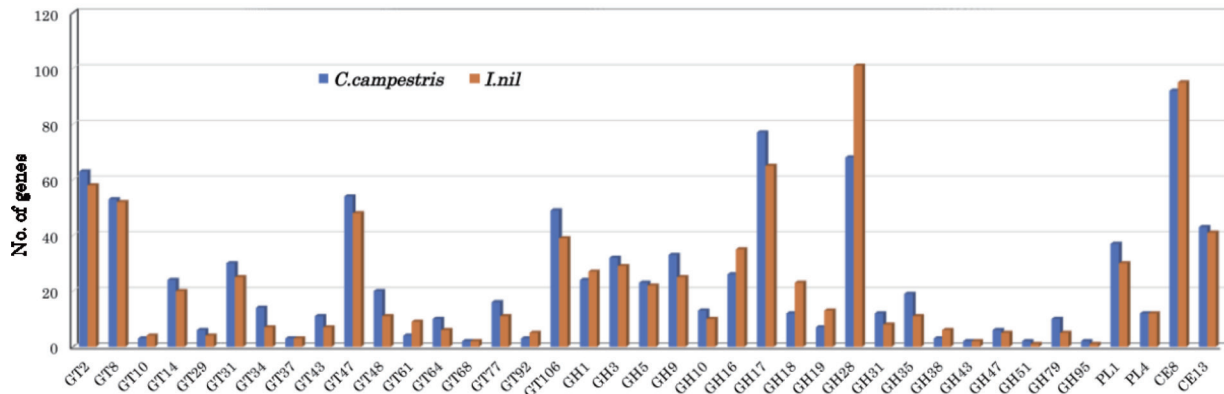


Fig. 1. Numbers of genes in each cell wall-related CAZyme family in *Cuscuta campestris* and *Ipomoea nil*. The cell wall-related families¹³⁾ were selected among the CAZyme-encoding gene families classified using dbCAN2.

have not undergone reconstruction of the CAZyme-encoding gene sets, despite the massive changes in its body plan, including haustorium formation.

Expression profiles of CAZyme-encoding genes during haustorial invasion of the host

Next, we focused on CAZyme-encoding genes whose expression profiles were temporarily correlated with the specific stages of haustorial development or host invasion. We previously performed a comprehensive RNA-seq analysis of gene expression patterns in *C. campestris* haustoria at 0, 12, 42, and 54 h after coiling (hac) on an intact *Arabidopsis* stem⁵⁾. The haustorium invaded the host tissue at 12 hac, and vascular differentiation (involved in secondary cell wall assembly) occurred from 42 to 54 hac. We focused on CAZyme-encoding genes predominantly expressed at 12 hac because the degradation and modification of host cell walls mainly occur during this phase. A heatmap of CAZyme-encoding genes extracted from the previously published RNA-seq data showed differences in the expression patterns of CAZyme-encoding genes among the different developmental stages, generating three clusters (clusters 1, 2, and 3), each containing CAZyme-encoding genes predominantly expressed at 12 hac (Fig. 2). Clusters 1 and 2 included CAZyme-encoding genes (17 *GHs*, two *GTs*, six *CEs*, and two *PLs*) principally expressed at 12 hac, but the expression of these genes was almost undetectable in the epidermal and cortical cells of uninfected (control) *C. campestris* stems (Table 1). Ten of the 17 *GHs* belonged to the *GH28* gene family, which are involved in the degradation of homogalacturonans (HGs). Five of the six

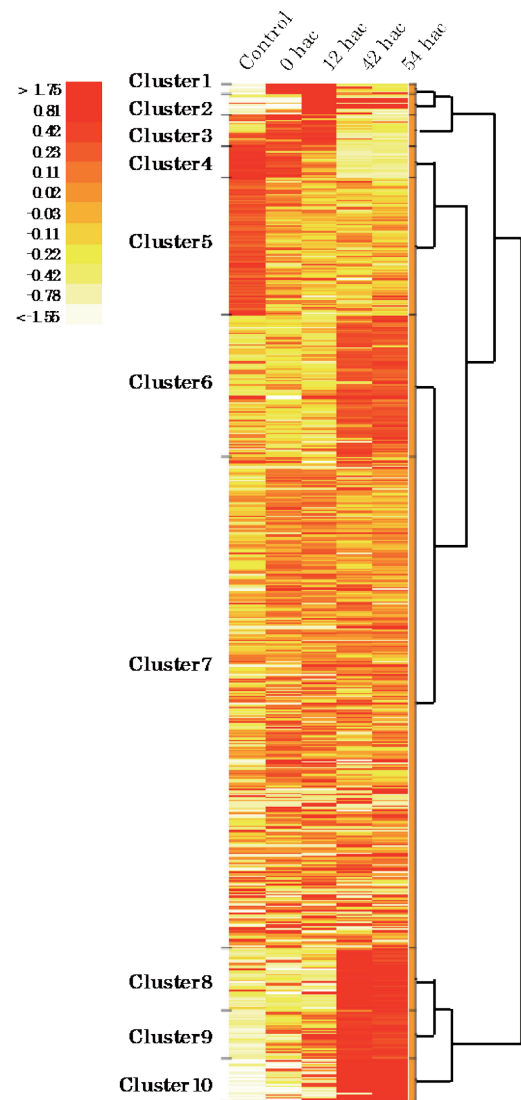


Fig. 2. Hierarchical clustering analysis of CAZyme-encoding genes. The heat map shows the relative expression levels of genes in five samples (haustoria at 0, 12, 42 and 54 hac, and the epidermal and cortical cells of uninfected stems). The color scale is shown on the left. hac, hours after coiling around the host stem.

ens cell-to-cell connections, which leads to cell separation, thus facilitating haustorial invasion of the host tissue.

The GH9 family is also identified as one of the major CAZyme families involved in haustorial invasion. *GH9* genes are thought to encode endo - 1,4 - β - glucanases that hydrolyze 1,4 - β - glucosidic linkages in glucans. Although their enzymatic function remains unclear, GH9 proteins perform important structural roles in cell adhesion and have been linked to processes such as organ abscission and fruit ripening^{16,17}. In tomato, two GH9s, *Cel1* and *Cel2*, have been implicated in tissue abscission and fruit ripening¹⁸. In this study, we found that the *C. campestris* orthologs of tomato *Cel1* and *Cel2* were principally expressed during haustorial invasion (Fig. 4). In addition to GH9s, CE8s and GH28s are also involved in tissue abscission and fruit ripening¹⁹. Taken together, these data suggest that the evolutionary acquisition of the degradation and modification process of host cell walls for haustorial invasion may be related to changes in the expression of genes involved in tissue abscission and fruit ripening.

Recently, Kurotani *et al.*²⁰ reported that in *Phtheirospermum japonicum* (Orobanchaceae), which is a root parasitic plant, a gene encoding a secreted type of β -1,4-glucanase, classified in the

GH9 family, plays an important role in plant parasitism. Furthermore, a member of the *GH9* family is required for cell-to-cell adhesion in *Nicotiana* inter-family grafting²¹.

The results of this study could be interpreted in several different ways. For example, it is possible that CE8s, GH28s, and GH9s are not involved in the degradation and modification of host cell walls but instead contribute to the elongation of search hyphae during haustorium development. Until now, it has been difficult to assign a precise role to each CAZyme-encoding gene during haustorial invasion, mainly because there has been a lack of practical transformation techniques for *Cuscuta* species. One way to overcome this difficulty might be to genetically screen mutants defective in haustorial development and parasitizing capability. Accordingly, we have now begun to mutate a large population of *C. campestris* seeds by ion-beam irradiation, and have obtained mutagenized seeds suitable for the screening of phenotypes defective in various steps of haustorium development. Identification of mutations associated with particular defects in haustorium development in the mutant plants, together with the characterization of haustorial function using the *in vitro* parasitizing system, will help elucidate the function of CAZymes during haustorial development and invasion into host plants.

Acknowledgments

This research was supported partly by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS202008), and partly by Grants-in-Aid for Challenging Research (17K19374 to K.N.) and for Scientific Research on Innovative Areas (24114005 and 18H05489 to K.N.) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- 1) Dawson JH, Musselman LJ and Wolswinkel P (1994) Biology and control of *Cuscuta*. *Rev. Weed. Sci.* **6**: 265-317.
- 2) Sun G, Xu Y and Liu H (2018) Large-scale gene losses underlie the genome evolution of parasitic plant *Cuscuta australis*. *Nat. Commun.* **9**: 2683.
- 3) Vogel A, Schwacke R and Denton AK (2018) Footprints of parasitism in the genome of the parasitic flowering plant *Cuscuta campestris*. *Nat. Commun.* **9**: 2515.
- 4) Narukawa H, Yokoyama R and Kuroha T (2021) Host-produced ethylene is required for marked cell

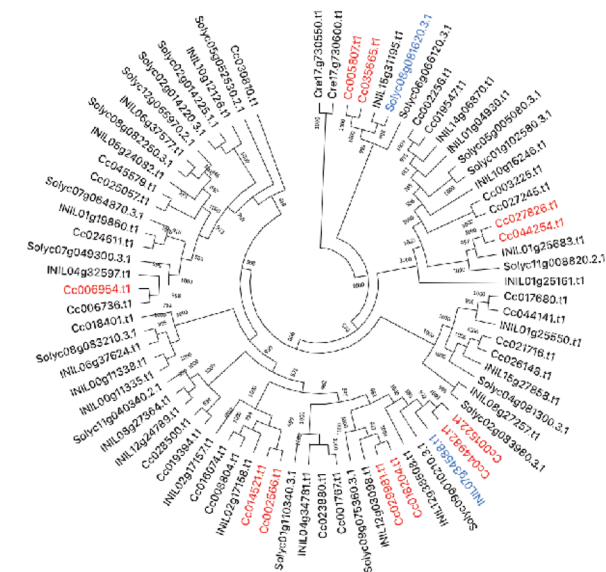


Fig. 4. Phylogenetic analysis of GH9s. The CAZyme-encoding genes predominantly expressed at 12 hac are shown in red. *Cel1* (Solyc08g081620.3.1) and *Cel2* (Solyc09g010210.3.1) are highlighted in blue. Cc, *C. campestris*; INIL, *I. nil*; Solyc, *S. lycopersicum*; At, *A. thaliana*, Cre, *C. reinhardtii*.

- expansion and endoreduplication in dodder search hyphae. *Plant Physiol.* **185**: 491-502.
- 5) Kaga Y, Yokoyama R and Sano R (2020) Interspecific signaling between the parasitic plant and the host plants regulate xylem vessel cell differentiation in haustoria of *Cuscuta campestris*. *Front. Plant Sci.* **11**: 193.
 - 6) Nagar R, Singh M and Sanwal GG (1984) Cell wall degrading enzymes in *Cuscuta reflexa* and its hosts. *J. Exp. Bot.* **35**: 1104-1112.
 - 7) Vaughn KC (2002) Attachment of the parasitic weed dodder to the host. *Protoplasma* **219**: 227-237.
 - 8) Johnsen HR, Striberny B and Olsen S (2015) Cell wall composition profiling of parasitic giant dodder (*Cuscuta reflexa*) and its hosts: a priori differences and induced changes. *New Phytol.* **207**: 805-816.
 - 9) Zhang H, Yohe T and Huang L (2018) dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* **46**: W95-W101.
 - 10) Sun J, Nishiyama T and Shimizu K (2013). TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinf.* **14**: 219.
 - 11) Kumar S, Stecher G and Li M (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 1547-1549.
 - 12) Lombard V, Golaconda Ramulu H and Drula E (2013) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**: D490-D495.
 - 13) Yokoyama R (2020) A genomic perspective on the evolutionary diversity of the plant cell wall. *Plants* **9**: 1195.
 - 14) Peaucelle A, Braybrook S and Höfte H (2012) Cell wall mechanics and growth control in plants: The role of pectins revisited. *Front. Plant Sci.* **3**: 121.
 - 15) Bou Daher F and Braybrook SA (2015) How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Front. Plant Sci.* **6**: 523.
 - 16) Lashbrook CC, Gonzalez-Bosch C and Bennett AB (1994) Two divergent endo-1,4- β -D-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* **6**: 1485-1493.
 - 17) del Campillo E and Bennett AB (1996) Pedicel break-strength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol.* **111**: 813-820.
 - 18) Rose JKC and Bennett AB (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* **4**: 176-183.
 - 19) Phetsirikoon S, Paull RE and Chen N (2016) Increased hydrolase gene expression and hydrolase activity in the abscission zone involved in chilling-induced abscission of *Dendrobium* flowers. *Postharvest Biol. Technol.* **117**: 217-229.
 - 20) Kurotani K, Wakatake T and Ichihashi Y (2020) Host-parasite tissue adhesion by a secreted type of β -1,4-glucanase in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Commun. Biol.* **3**: 407.
 - 21) Notaguchi M, Kurotani K, and Sato Y (2020) Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by β -1,4-glucanases. *Science* **369**: 698-702.

■原 著■

全卵ホイップ泡状生地 of 電極式ケーキの特性とまとめ

青木 孝^{1,2}

Experimental Evaluation of the Electrical Characteristics of “Denki-Cake”

Takashi Aoki^{1,2}

¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: u17aok@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We improved “Denki-Pan” (bread baked using electrode bread machine) as “Denki-Cake” baked by dough whipped with whole eggs. We compared Denki-Cake and Denki-Pan. Then, we summarized the cooking on electrode plates.

Keywords: Denki/Pan, enki/Rice, panko, titanium, gelatinization, starch, granule yeast

序論

神奈川県立理学部では、第2次世界大戦後、各家庭で自作され広く用いられた、電極式（極板型）パン焼き器の性能評価をさせる物理学学生実験を、学部開設の1990年からパン焼き器を自作して行ってきた。その事と2016年のきっかけから、まず、電極式パン焼き器で炊飯実験を行い、電極式の特性を明らかにした¹⁾。その後、電極式調理の発明から電極式炊飯器を経て電極式パン粉へ続く歴史を調べ、その再現実験を通して、可能な限り電極式の機器の特性を実証した^{2,3)}。現在も続いている電極式イースト発酵パンを加工した、電極式パン粉に使われる、安全面から全国パン粉工業協同組合連合会が1988年に国に新極板と認めさせた純チタン極板についても、ステンレス極板との特性差として調べた²⁾。この論文では、これまでの電極式の知見から、文献がなく新しい、全卵をホイップした泡状生地による「電極式ケーキ」を作り、特性を調べたので報告する。さらに、一連の電極式調理の整理もしておく。

これまでの研究は、およそ20年前に、東京の昭和のくらし博物館で、電極式パン焼き器の再現展示を見て、大学のパン焼きケースを寄贈した縁で、2016年8月の昭和のくらし博物館の企画展「パンと昭和」における電極式パン焼き再現実験を突然に、小泉和子館長から依頼されたことに始まり⁴⁾、その実験解説のために電極式関連を調べたところ、大阪市立科学館の2013年の長谷川能三学芸員の電極式「たからおはち」の再現実験で、対向極板では炊飯できないという指摘に挑戦したことがきっかけである。

その後すぐ、電極式パン粉を知り、三重大学の松岡守教授からパン粉メーカーの調査を提案され、貴重なご指導が論文につながった⁵⁾。その結果、現在でも電極式が残っていることに加え、全国パン粉工業協同組合連合会のご協力により、電極式パン焼き装置の発明が、昭和10年の陸軍の阿久津正蔵氏によることが分かり、それ以前の電極式炊飯器（立てた対向）の極板を兼用に改良しパン焼きも組み込んだ97式炊事車の実用化も確認した。チタン板に至る、極板についての安全性確保の歴史も教えていただいた。昭和18年の阿久津氏の「パン科学」の著書により紹介された陸軍のパン焼き器が、戦後昭和21年5月には、主婦の友に紹介され、広まった⁴⁾。この同昭和21年には「手製のパン焼き器でパンを焼くこども」として毎日新聞社の写真が残っている。

さらにまた、2018年3月、TV朝日の「超イッテンモノ」という番組で、三好日出一氏が所蔵する、戦後、平塚市の旧火薬廠（現横浜ゴム）の地下倉庫にあった電極式炊飯器が旧陸軍のものとして紹介されたことを、昭和のくらし博物館の渡辺由美子氏に教えていただいた。2018年10月には、Wikipediaの海瀬氏が連絡を取り、同伴して三好日出一氏に、おひつの底置き唯一現存する「厚生式電気炊飯器」と取扱説明書を見せていただき、戦後、国民栄養協会により昭和9年の日高特許が製品化されたことが判明した。旧火薬廠は1947年1月に残務整理完了につき消滅し、進駐軍が接収した後、1955年に横浜ゴムに払い下げられる。この厚生式炊飯器は、三好



図1. 実験用電極式パン焼きケースの構成.

日出一氏の友人が1970年頃、横浜ゴムから地下倉庫の処分を依頼された時に、新品の厚生式炊飯器を100個ほど見つけ、その一つを個人的に保管し、後に三好日出一氏に譲ったものである。東京薬科大学の内田隆講師の調査によれば、この厚生式炊飯器は、1946年5月に市販された。2019年4月には、昭和14年版4月期の陸軍糧秣本廠による給養器具取扱説明綴りを、内田隆講師が連絡を取り、同伴して軍装研究家の高橋昇氏に見せていただいた。その結果、兼用できるよう作ったが、実際には97式炊事車の綴りの中にある取説には、パン焼きの取説はなく限定的だったことが判明した。日高周蔵の素性、陸軍や阿久津氏との関係は不明のままである。2020年7月には、平塚市博物館の寄贈品の中に、旧火薬廠の倉庫にあったもう1つの「厚生式電気炊飯器」を内田隆講師が見つけた。

学生実験用パン焼き器は、ケースが木製で割れ易かったが、耐久性を持つように木組みの改良を重ねて、ケーエム工場の溝口潔氏に作って頂いた。パン焼きケースの底板は、蒸しパン等が取り出し易いように、はずせるようになっている。その後のパン焼きケースの改良およびチタン極板の製作は、(株)三矢製作所の小原美千代氏にお願いした。パン焼きケース底板のパッキンについては、スケーター(株)営業部の奥田歩氏に適切なパッキンを探していただいた。なお、本学のパン焼き学生実験は、寺本俊彦教授が発案し、宮澤弘成教授が始めた(図1)。

方法

蒸しパンに全卵を混ぜたホットケーキ

基本の蒸しパン(小麦粉150g、塩0.4g、ふくらし粉6g、砂糖25g)に、全卵50g(M玉1個殻なし)と水180g、牛乳10ccを加えた液状生地を自前のホットケーキの電流特性は、図2の○印となる。基本の蒸しパンでは、水のみで190gとしていたところを、水を180gに牛乳10ccを加えた。全卵50g入りと、この基本の蒸しパン(図2の*印)を比較すると、全卵は、糊化の進行と析出に伴う2山ピークの電流特性には全く影響しないことが分かる。全卵を入れると、食味はホットケーキのようになり、電流ピーク値は1.2倍になる。

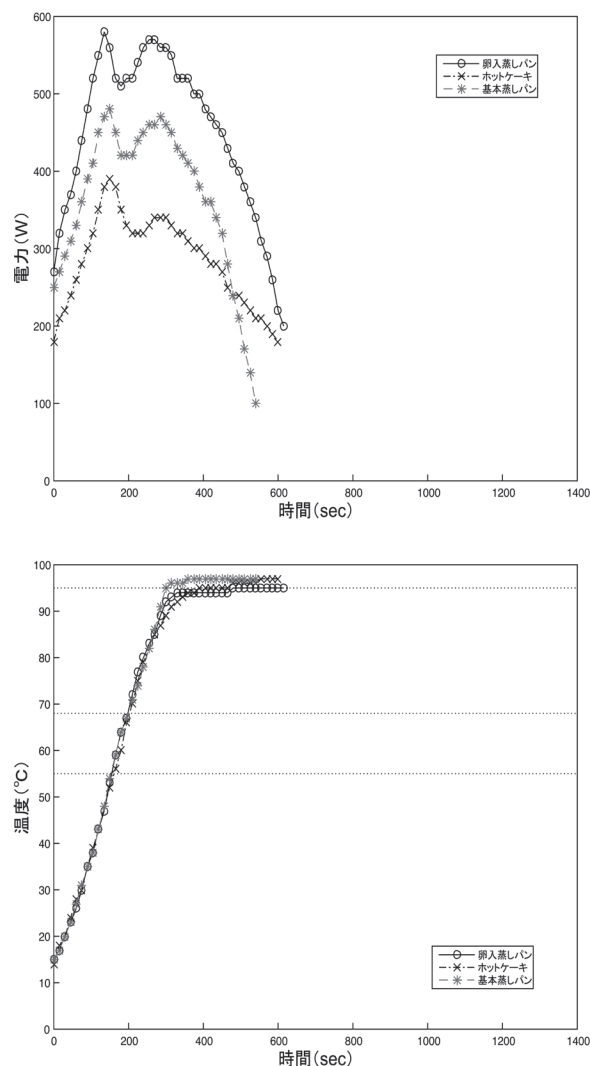


図2. (上) 全卵入り蒸しパン(○印: 塩0.4g)と全卵を混ぜた日清ホットケーキミックス(×印: 塩1.5g相当)と基本蒸しパン(*印: 塩0.4g)の電力値. (下) 水温の温度変化.

また、市販の日清ホットケーキミックスのレシピ通り、ミックス粉150g、全卵37g、水102g、牛乳10ccを生地とした、市販ホットケーキの電流特性は、図2の×印となる。この時、取説仕様から食塩は、1.5g相当となっている。実際には、全卵の水分で濃度が薄まっている。図2によればちょうど、市販ホットケーキミックスの電流値は、基本の蒸しパン配合に全卵と牛乳(10cc分)を入れた○印の電流値の0.7倍となり、電流特性は両者全く同様の、糊化の進行と析出に伴う2山となり、卵なしの基本蒸しパン(*印)とも変わらず、蒸しパンにおいては、2山電流特性に全卵の影響はない。

結果と討論

全卵をホイップした電極式ケーキの特性

おひつの底に極板を置くような底置き型は電流上昇

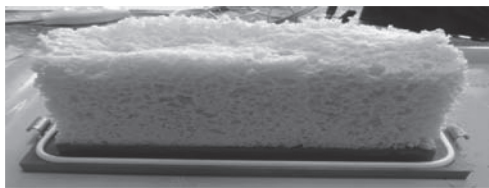


図 3. 全卵のホイップ生地に通電した「電極式ケーキ」。

が急で下がるのも急である。対向立て型はゆっくり電流上昇しゆっくり下がる上、側面からの均等熱源であるので、ふくらし粉、発酵、卵のホイップによる泡などの手段により膨らませて食べる小麦粉食には向く。これまで文献のない、全卵をホイップした泡状生地に通電した「電極式ケーキ」(図 3) も、対向立て型ならば 22 分通電して完成することを確認した。この時、泡状生地の電極式ケーキでは、全卵を入れた液状生地の蒸しパンにおける糊化の進行に伴う 2 山電流特性とは異なり、第 1 ピークのみ現れる 1 山となる。実際には、糊化終了で電流下降は一旦止まり、そこから徐々に電流が下がるようになり、蒸発とともに急に下がり出す。電極式ケーキの基本配合は、全卵 100 g (M 玉 2 個殻なし)、薄力小麦粉 50 g、砂糖 40 g、塩 0.6 g、ふくらし粉 1.0 g、牛乳 9 cc、無塩バター 13 g とする。牛乳は、通電時に金属の析出がないよう成分無調整を使う。

電極式ケーキの手順は、まず、全卵 100 g (M 玉 2 個殻なし) に、砂糖 40 g、塩 0.6 g を入れ、ミキサーで中速 3 分、低速 9 分ホイップし、振った小麦粉 (薄力粉) 50 g とふくらし粉 1.0 g を少しずつ混ぜる。無塩バター 13 g を 50℃ の牛乳 9 cc で溶かした中に、ホイップ生地の少量を入れ混ぜ、戻す。これを泡状生地として立て型の対向電極ケースに入れ、22 分間通電する。家庭用オーブンで焼く場合には、予熱 10 分で 180℃ まで上げ、180℃ で 25 分間、向きを変え 5 分間焼き合計 40 分かかる。電極式ケーキの電流特性は、図 4 の○印となる。全卵を入れた蒸しパンは (卵を入れない場合と同様の液状生地)、2 山となるが、全卵をホイップした泡状生地では、蒸発に伴う第 2 ピークは現れず、糊化開始に伴う第 1 ピークのみ現れる 1 山の電流特性になることが分かった。

さらに、電極式ケーキの基本配合に、塩を 0.6 g から 1.2 g に増やし、全卵 120 g、小麦 60 g、砂糖 50 g、無塩バター 15 g、牛乳 10 cc、ふくらし粉 2.0 g とすると、塩を 2 倍にした影響で、電流ピークもほぼ 2 倍になる。その時、電流特性は、基本配合と変わらず、糊化開始に伴う第 1 ピークしか現れない 1 山となる (図 4 の×印)。ここで、基本配合から無塩 (塩 0.0 g、ふくらし粉 1.5 g、牛乳 10 cc、無塩バター 15 g、全卵 100 g、薄力粉 50 g、砂糖 40 g) にする

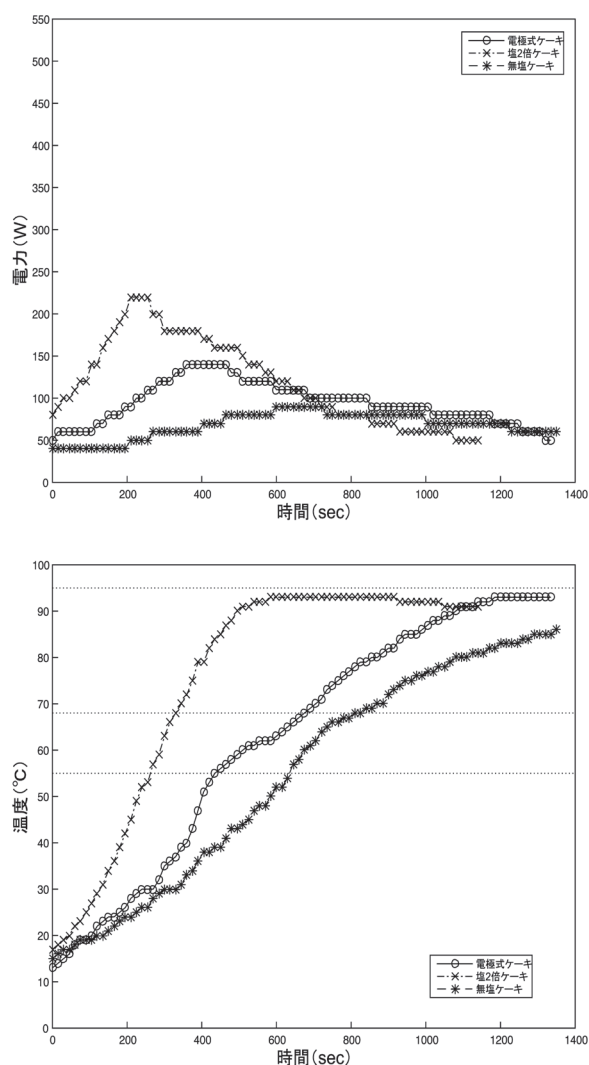


図 4. (上) 全卵をホイップした泡状生地の基本電極式ケーキ (○印: 全卵 100 g、小麦粉 50 g、塩 0.6 g、ふくらし粉 1.0 g) と塩 2 倍電極式ケーキ (×印: 全卵 120 g、小麦粉 60 g、塩 1.2 g、ふくらし粉 2.0 g) と無塩電極式ケーキ (*印: 全卵 100 g、小麦粉 50 g、塩 0.0 g、ふくらし粉 1.5 g) の電力値。(下) 水温の時間変化。

と、図 4 の*印となる。この時、無塩ふくらし粉のみの電流ピークは 90 W と下がるが、電流特性は第 1 ピークのみの 1 山特性となり変わらない。第 1 ピークのみの 1 山特性の原因は、量が少ない小麦粉 (50 g) の全卵ホイップによる泡状生地のために、糊化終了時と蒸発時に生地のスポンジ構造が固形化されてしまっていることに関係している。また、水分が全卵 (100 g) に含まれるものであることで、その蒸発に必要な熱エネルギーも算定できないため、電極式ケーキの熱効率、従来の方法では計算できない。

ヨーグルト入ホットケーキと強力粉の特性

基本の蒸しパン (図 5 の×印) と、基本蒸しパンの配合の水 190 cc の代わりに、全卵 50 g とヨーグ

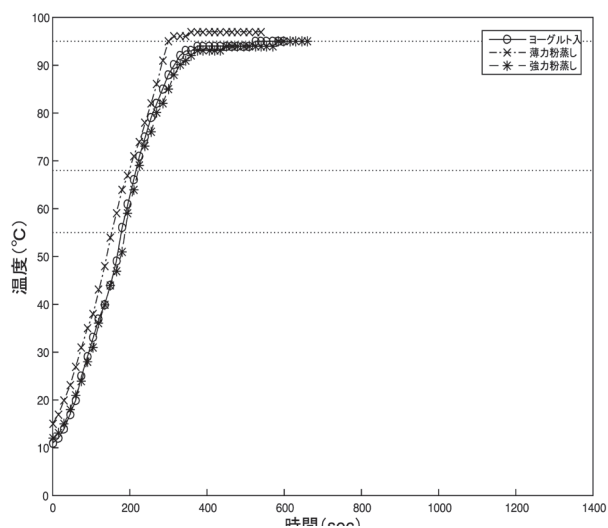
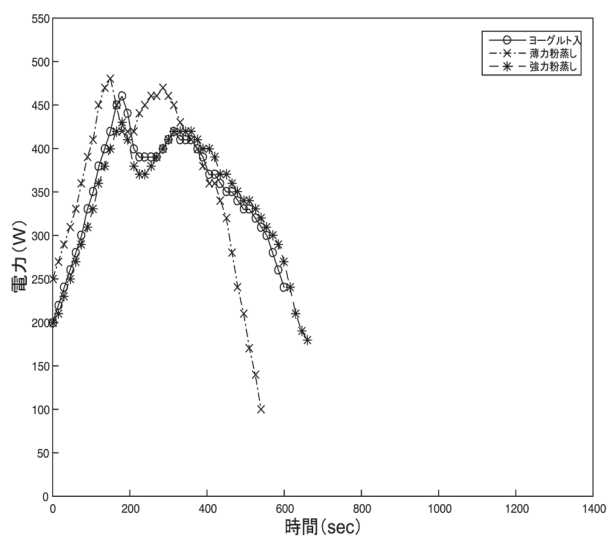


図5. (上) 基本蒸しパン (×印) と全卵とヨーグルトを混ぜたホットケーキ (○印) と強力粉の蒸しパン (*印) の電力値. (下) 水温の時間変化.

ルト 40 g と牛乳 75 cc をホイップせずただ混ぜたヨーグルト入りホットケーキ (図5の○印) は、基本の蒸しパンと全く同様に、薄力粉の糊化の進行に伴って、開始温度 55°C で電流第1ピーク、終了温度 68°C で電流最底となる。ホットケーキにおいて、ヨーグルも蒸しパンに対する電流特性に影響しないことが分かった。完成時間も変わらない。

また、基本の蒸しパンを薄力粉ではなく、同じ分量 150 g の強力粉で作ると、電流特性は図5の*印となる。強力粉では、糊化の開始と終了温度が薄力粉に比べ、5°C 低くシフトするので、電流第1ピークは開始の 50°C、電流最底は終了の 63°C となっていることが確認できる。

リコッタチーズ入り電極式ケーキの特性

電極式ケーキの基本配合である、全卵 100 g、小麦薄力粉 50 g、砂糖 40 g、無塩バター 13 g、無添加牛

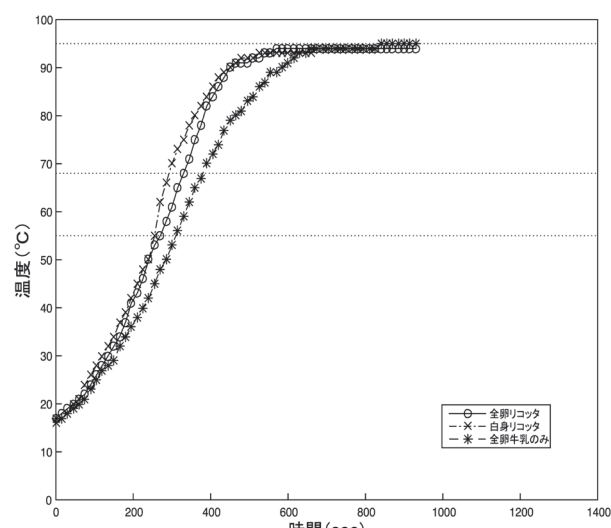
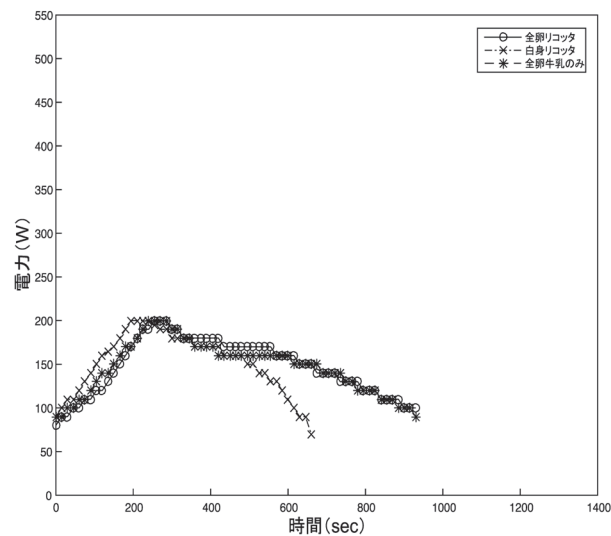


図6. (上) 全卵ホイップリコッタ入り電極式ケーキ (○印) と白身ホイップリコッタ入り電極式ケーキ (×印) と全卵ホイップ牛乳のみ電極式ケーキ (*印) の電力値. (下) 水温の時間変化.

乳 9 cc、ふくらし粉 1.0 g、塩 0.6 g に、bills のパンケーキのように、リコッタチーズを 20 g 入れると、さらにおいしくなる。リコッタチーズは、無塩バターと牛乳と一緒に溶かし、ホイップ生地少量と混ぜ、ホイップ生地全体に戻す。電流特性は、リコッタチーズを入れる前と同様に、糊化開始に伴う第1ピークのみが現れる1山に見える (図6の○印)。第1ピーク電流は、リコッタチーズによる水分が増すので 150 W から 200 W へ上がる。出来上がり時間も 22 分から 14 分へ短縮する。途中、生地が膨らんだらフタをする。リコッタチーズを入れる代わりに、牛乳を 9 cc から 24 cc に増量すると、同様に水分が増えるので、リコッタチーズ入りの場合とほぼ同様な電流特性になる (図6の*印)。

また、全卵をホイップする代わりに、黄身と卵白を分けて、卵白だけをメレンゲにしてから黄見を混

ぜると、通電した生地がシフォンケーキ（黄身とメレンゲを分ける）のように縮む。この時、電流特性は、全卵の場合と同じで、第1ピークが糊化の開始により現れるだけの1山に見える（図6の×印）。第1ピーク電流値は全卵の場合と変わらず同様の電流推移をたどるが、蒸発温度に達してからすぐに縮むので急に電流低下が起こる。この全卵を分けてメレンゲによる電極式ケーキの手順は、次のようになる。黄身と塩とリコッタチーズを混ぜる。無塩バターを50℃の無添加牛乳で溶かし、黄身の生地に入れ混ぜる。この黄身の生地 to 小麦薄力粉とふくらし粉を振るいながらさっくり混ぜる。次に、卵白をツノが立つまで、ミキサーの中速3分その後低速9分でホイップしメレンゲにして、その間3回に分けて砂糖を混ぜる。このメレンゲを2回に分けて、黄身の生地にさっくり混ぜてケーキ生地を作り通電する。電極式においては、分けないで全卵ホイップの方が扱いやすくおいしい。全卵はスポンジケーキで、メレンゲに分けるとパンケーキのようになる。

小麦粉水（薄力、強力）の灰分電解質特性

これまで、米粒150gを浸した水道水230gでは、極板間隔6cmの実験用パン焼き器において初期電力が6Wしか電流が流れず炊飯ができないこと¹⁾、一方、小麦薄力粉150gを水道水190gに溶かした場合には、初期電力が60Wも電流が流れ、いろいろなような小麦粉水パンが焼けることをあきらかにした³⁾。このように、小麦粉水において、60Wも初期電流が流れる理由は、小麦粒を製粉し水道水に溶かすと灰分（ミネラル分）が流れやすくなるためである。このため、小麦粉水パンは、一見すると、1山に見えるが、実際には、詳しく電流特性を見ると、小麦粉の成分から溶け出した電解質によって、糊化の進行と蒸発にともない2山の電流特性になっている。日清フラワー薄力粉の結果である図7×印の場合には、糊化の開始にともなう第1ピークが130W、糊化終了時の最底では120W、蒸発による第2ピークは140Wとなり2山があらわれる。電解質が少ないために、糊化の開始が電流変化に大きく影響せず、第1ピークより第2ピークの方が大きくなるうえ、第1ピークの山の高さは10Wしかなく、第1ピークから第2ピークまで高原のようになり、高い第2ピークが1山のように見えているのである。水道水でも炊飯できるように工夫した、極板間隔1cmの極板を底面に設置して行う水道水による炊飯では、水道水の電解質はほとんどなく、糊化は起こるが、糊化開始にともなう第1ピークは現れず1山になるので、小麦粉水の場合とは異なる。この第2ピーク

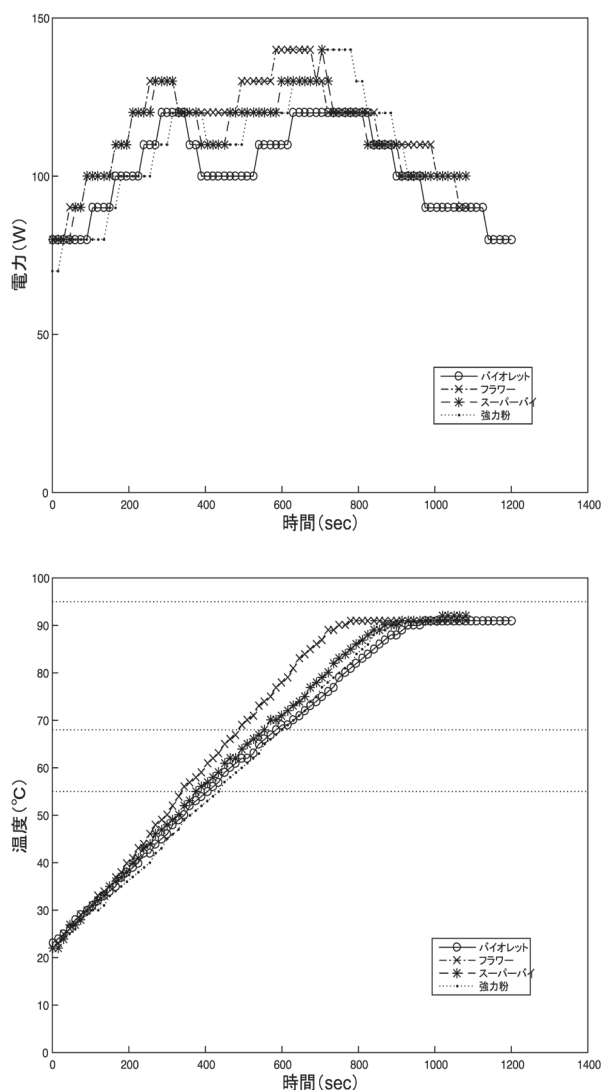


図7. (上) 小麦粉水（小麦粉150g、水190g）：バイオレット（○印）とフラワー（×印）とスーパーバイオレット（*印）と強力粉ひまわり（●印）の電力値. (下) 水温の時間変化.

表1. 小麦粉と米の糊化温度帯と析出開始温度

	糊化開始	糊化終了	析出開始
小麦粉（薄）	55℃	68℃	95℃
小麦粉（強）	50℃	63℃	95℃
米	60℃	93℃	95℃
餅米	64℃	95℃	95℃

の方が大きく1山のように見える電流特性の傾向は、初期電力値や第2ピークの電流値等も含め、他の薄力粉である日清バイオレット（図7○印）、スーパーバイオレット（*印）、さらに、木下製粉の強力粉（ひまわり●印）においてもほぼ変わらなかった。これらそれぞれの小麦粉の成分に含まれる電解質の違いが、水温上昇の速さの違いにあらわれ、その水温上昇の違いによって、それぞれのデンプン種の糊化温度帯（表1）と蒸発温度であらわれる2山のピーク位置（時刻）をずらすだけである。いずれも16分程

度で焼き上がり、熱効率 70% 程度である。

また、米粒を製粉した上新粉 150 g を浸した水道水では、実験用パン焼き器において、初期電力が 30 W 流れる。小麦粉水の精白した小麦粉（薄力、強力）と上新粉のミネラル分の比は、同グラム当たり、 $2:1$ 程度なので、この成分値比とも良く合う、妥当な初期電流値の比になっている。自作で製粉した、上新粉と全粒粉の強力小麦粉（春よ恋）による初期電流は、 24 W と 80 W だった。

うるち米と上新粉と餅米の糊化の特性

うるち米の代わりに、餅米で、実験用パン焼きケースで炊飯する場合には、塩 0.4 g はそのまま、水を 180 g に減らし、浸さないで通電する。図8×印のように餅米は、うるち米(図8○印)よりも第1ピーク電流は 15% 小さく 340 W になる。初期電流値は

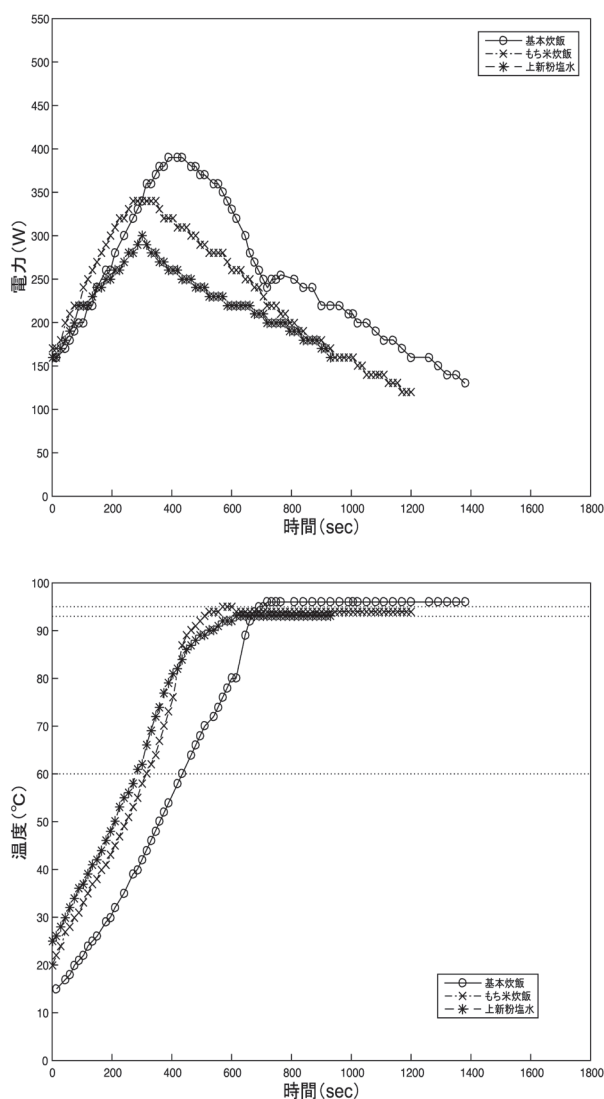


図8. (上) 基本うるち米炊飯(○印)と餅米炊飯(×印)と上新粉(塩 0.5 g , 水 230 g , *印)の電力値. (下) 水温の温度変化.

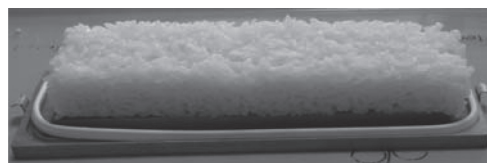


図9. 餅米炊飯の炊き上がり(20分).

ほぼ変わらないが、電流上昇が速いため水温上昇も速くなるので、糊化の進行が速く、餅米の炊飯は20分で、うるち米よりも早く炊ける。

餅米では、糊化の温度帯が、うるち米よりも 4°C 高くずれる($64 \sim 95^{\circ}\text{C}$)ことがわかった(表1)。そのため、餅米では、糊化終了温度(最底電流)と蒸発温度が等しいため、第2ピークが見かけ上現れず、1山のような特性になる。熱効率は 70% 程度である。炊飯した餅米は、図9となる。

また、山本貢資商店の上新粉(タンパク質 6.2%) 150 g に、塩 0.5 g を 230 g の水に溶かして通電した団子の電流特性を見た(図8×印)。米は、粉にしても糊化温度帯が変わらず、糊化開始温度 60°C で第1ピークとなった。水温が、糊化終了温度 93°C まで上がらなかったのも、そのまま蒸発し、第2ピークが現れないまま、電流が下降して1山のように見えている。15分で完成し、熱効率も 70% である。

まとめ

液状生地(のど)の蒸しパンに、全卵を混ぜることは、糊化に伴い2山となる電流特性に影響を与えないが、全卵をホイップした泡状生地では、蒸発に伴う第2ピークは現れず、糊化開始に伴う第1ピークのみ現れる1山の電流特性になることが分かった。

新しく開発した電極式ケーキも含め、それぞれ再現実験した電極式調理の電流特性を、糊化の進行と蒸発による析出に伴う2山ピークのメカニズムを基本として整理すると表2となる。配合や調理によっては、見かけ上、1山の電流特性になることがあることを明確にした。

電極式調理は、水の蒸発熱が熱源であるので、

表2. それぞれの電極式調理のピーク(第1, 第2)特性

	糊化 開始 第1	糊化 終了 最低	析出 開始 第2	電流ピーク
塩水パン・炊飯	○	○	○	2山
塩水発酵パン	○	○	○	2山
ふくらしパン炊	○	△	△	1山(第1)
無塩発酵パン	×	×	○	1山(第2)
模擬練りパン	○	△	△	1山(第1)
水道水炊飯	×	×	○	1山(第2)
水道水パン	△	△	○	2山(第2)
電極式ケーキ	○	×	×	1山(第1)

100℃以上に上がらない。発酵パンの場合は、焼かないので白いパンで、かえってイーストの香りがきわだつ。川島四郎氏は「炊く」という最後には釜底に一滴の水も残さず狐色に色づけるこの炊飯法は、世界に類例のない日本だけの独特の炊事法であると言う。電極式炊飯では、底面設置極板の先端において放電で焦げることはあっても、狐色にはならないが、糊化の進行に伴う電流変化が、羽釜で行っていた理想的な熱源火力変化を自発的に生み、蒸発により最後は勝手に電流が切れる。熱効率も、生地自体が発熱するので、70%程度と良い。反面、塩などによる、調理にかかる適切な電流調整が難しいこと、感電の危険という欠点がある。

これまでの基本蒸しパンから始まる、電極式調理の電流特性をまとめると表3となる。表3で、タンパク質を重量比で13%含む強力粉を使ったイースト発酵パンに対して、これまでの基本のタンパク質を8.9%しか含まない薄力粉による液状（蒸し）パンと、同じ薄力粉を捏ねてタンパク質をグルテンに変え、イースト発酵パンの参考とした模擬練りパンについて、水量に対する小麦粉量や塩量に関して比較したものが、上の3つとなる。小麦量に対して水が多いと、塩に対して電流値は敏感に反応する。捏ねてグルテンを出すと、電流値は上がる。蒸発して減った水の量が、調理に使われた熱量と考え熱効率を計算しているが、全体の水の量が少ないと、熱効率は10%程度下がる傾向にある。電流値も小さくなる。小麦量は、蒸しパンと発酵パンは150 g、模擬練りパンは225 gである。水の量は、蒸しパンが190 g、模擬練りパンが170 g、発酵パンが100 gである。したがって、 $\frac{\text{水}}{\text{小麦}}$ の比は、蒸しパンで1.27、練りパンで0.76、発酵パンで0.67となる。塩は、蒸しパンで0.4 g、練りパンで1.8 g、イースト発酵パンで2.0 gなので、 $\frac{\text{塩}}{\text{小麦}} \times 100$ の比は、蒸しパンで0.21、練りパンで1.06、イースト発酵パンで2.0となる。

下の4つは、電極式炊飯の、対向立て型（塩入り）とそれを折り曲げ底置き of 櫛の歯形極板にしたものと、おひつ底置き型（櫛の歯形と同心円形極板）を比較している。対向立て型ケースは、熱効率が70%程度で、ケースの内容積が狭くなるおひつ底置きは80%程度に上がる。電流ピーク値が上がれば、蒸発し減る水の量は多くなるが、熱効率は電流ピーク値によっては決まらない。炊飯では、対向立て型でも、おひつでも、水の量は230 cc、米は150 g共通である。したがって、 $\frac{\text{米}}{\text{水}}$ の比は、すべて1.53となる。対向立て型炊飯のみが、塩0.4 g入れるので、 $\frac{\text{塩}}{\text{水}} \times 100$ の比は、0.17となり、それ以外の底置き櫛の歯形（対向極板を折り曲げたものも含む）と底置き同

表3. 電極式調理の各特性比較

	塩／水	効率	ピーク	蒸発水	完成
蒸しパン	0.21	69 %	480 W	16 %	8 分
練りパン	1.06	62 %	780 W	21 %	13 分
発酵パン	2.0	59 %	190 W	13 %	11 分
立型炊飯	0.17	71 %	390 W	30 %	23 分
立型櫛炊	0.0	72 %	160 W	13 %	29 分
櫛型櫛炊	0.0	84 %	200 W	10 %	33 分
櫛型同炊	0.0	82 %	240 W	10 %	23 分

心円形は、0.0である（表3）。次に整理する。

(1) 実験した電極式調理では、糊化の進行と蒸発に伴って、2コブの電流特性になる。糊化の開始で第1ピーク、糊化の終了で最底電流、上がり始めて蒸発に伴い第2ピークをとる。2コブの形は、でんぷんの種類による糊化の温度帯（開始と終了）により変わる。加えた電力に対する調理に使われたエネルギー（蒸発した水の量と仮定）の比で計算した、熱効率は、電極式調理では、ほぼ70%になる。強力粉のイースト発酵パンの場合は、2次発酵までは同じ過程で、オープン（焙焼式）の場合には10分間で190℃まで予熱し、同190℃で2次発酵させた生地を19分間焼き、合計29分かかるのに対し、電極式の場合は、余熱なしで11分だけで焼ける。これは、電極式が、生地自体がジュール熱により発熱するので熱効率が良いことを示す。蒸発に伴い、電離したイオンが析出するので、勝手に電流が流れなくなるという優れた性質をもつ。調理温度は100℃までしか上がらない。

(2) チタン極板を使えば、現在も続く業務用電極式パン粉に対する食品衛生法の規定に準ずる食品安全性が保てる。チタン1種極板厚0.5 mmとステンレス極板0.6 mmの電流特性は、ほぼ同等である。三重大学教育学部の松岡守教授は、2017年に理科教育現場における「電気パン」（蒸しパン）実験についても、チタン極板を使えば、業務用として現在も続く電極式パン粉と同等の食品衛生法基準の安全性が保てると再評価し、報告した⁹⁾。

(3) 水道水で炊飯するために極板間隔を1 cm程度にした、底面設置型極板による電極式調理では、沸騰した泡が極板にふれ、電流を阻害するために、電流値が50%程度もふらつき不安定になる。対向立置型の極板（陸軍仕様）では、そのような不安定になることはなく、側面から均等に加熱でき、ムラにならない。水道水では、イオンが少ないので糊化の進行による電流の増減が明確に現れず、蒸発による第2ピークのみ表に現れるので見かけ上1コブに見える。

(4) これまで文献のない全卵をホイップして薄力粉に混ぜたホイップ生地 of 「電極式ケーキ」の電流特性は、練った薄力粉の練り状生地である模擬練りパンの電流特性と似た、糊化の開始に伴う第1電流ピー

クが顕著に表れる特性となることが分かった。電極式調理の2山電流特性は、糊化の進行と蒸発により起こるが、水道水だけのようにイオンが少ない調理では、糊化は起こるが、それが電流変化に影響せず、蒸発による第2ピークが現れず、1山電流特性になる。また、電極式ケーキのように、生地を泡状にした場合には、糊化開始の第1ピークしか現れず、生地の構造により蒸発に伴ってスポンジ状が固化され、糊化の終了が電流に影響せず、1山電流特性になる。小麦水蒸しパンは、小麦粉のミネラル分のために2山電流特性になる。

開発した標準レシピを一部まとめておく。

1. イースト発酵食パン(図10):()内はパン粉用(練り)

- (1) 小麦粉(強力粉): 150 g
- (2) ドライイースト: 4.5 g
- (3) 塩: 2.0 g (1.5 g)
- (4) 砂糖: 10.0 g (2.5 g)
- (5) 無塩バター: 15 g (5 g)
- (6) 水(33℃): 100 g
- (7) 捏ねた後、25(20)分間42℃で1次発酵。
- (8) ガス抜き3等分し丸めて成型、パンケースに入れる。
- (9) パンケースごと、25(26)分間(63)℃で2次発酵。
- (10) 11分経過後0.3Aとなり、14分までは通電しフタをして蒸らす(0.2A)。

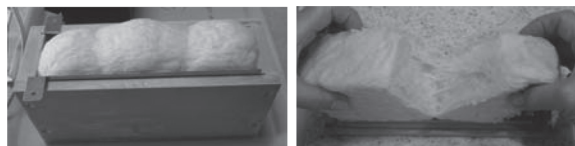


図10. イースト発酵食パン(11分)。

2. 電極式ケーキ(図11):全卵をホイップ

- (1) 全卵M玉: 2個(100 g 殻なし)
- (2) 小麦粉(薄力粉): 50 g
- (3) 砂糖: 40 g
- (4) 無塩バター: 13 g
- (5) 牛乳(成分無調整): 15 g または 24 g (または、リコッタチーズ 20 g + 牛乳 9 g)
- (6) ふくらし粉: 1.0 g
- (7) 塩: 0.6 g
- (8) 全卵と砂糖と塩をホイップし、そこに小麦粉とふくらし粉を混ぜ、溶かした無塩バターと牛乳を入れ生地を作りフタをして14分通電する。

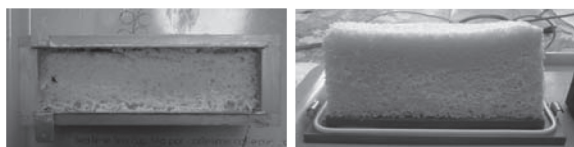


図11. 電極式ケーキ(14分)。

3. 水道水炊飯(図12):お櫃ケース

- (1) 米: 150 g、水切り後14 g 増える。
- (2) 塩: 0.0 g
- (3) 水: 230 g、30分浸す(餅米は水180 g 浸さない)。
- (4) 糊化終了温度93℃に達した時最少電流の少し前でフタをする。
- (5) 23分で1Aまで下がった後、電源を切り5分間蒸らす(餅米は糊化進行が速く20分で炊ける)。

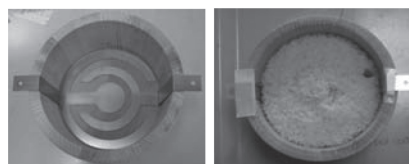


図12. 水道水炊飯(同心円形:23分)。

謝辞

NHK 番組「ためしてガッテン」の「パン粉」特集(2020年10月14日放送)に当たり、2020年1月に取材を受け、ディレクターの大石寛人氏と鈴木志穂子氏にお世話になった。映画「この世界の片隅に」に関わった昭和の暮らし博物館の小泉和子館長が監修する、平凡社別冊太陽の「戦時下の暮らし」を発行(2020年8月)するに当たり、担当編集者の金丸裕子氏から電気パン焼き器について取材を受けた⁶⁾。また、東京薬科大学の生命科学部の内田隆講師の提案で、共著で、「電気パンの歴史・教育・科学—陸軍炊事自動車起源としパン製造に続く日本の電極式調理の研究—」として本にまとめることになった。三重大学の教育学部の松岡守特任教授にもお世話になった⁷⁾。ここに感謝いたします。

文献

- 1) 青木 孝(2018)電極式パン焼き器を使った炊飯実験の特性理解. 神奈川大学理学誌 29: 5-12.
- 2) 青木 孝(2019)電極式調理の発明からパン粉へ続く歴史および再現実験. 神奈川大学理学誌 30: 9-16.
- 3) 青木 孝(2020)電極式底置き炊飯とイースト発酵食パンの性能評価実験. 神奈川大学理学誌 31: 25-32.
- 4) 小泉和子(2017)パンと昭和. 河出書房新社, 東京.
- 5) 松岡 守, 青木 孝(2017)「電気パン」実験における食品としての安全性の再評価. 日本産業技術教育学会東海支部第35回研究発表会論文.
- 6) 青木 孝(2020)陸軍から家庭へ広がった電気パン焼き器. 別冊太陽「戦時下の暮らし」. 小泉和子監修, 平凡社, 東京. pp.100-101.
- 7) 松岡 守(2021)「電気パン」の由来調査と食品としての安全性の再評価. 三重大学教育学部研究紀要自然科学. 72: 69-74.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

時間分解 ESR 法による無水マレイン酸と 無水フタル酸誘導体に対するラジカル反応中間体の同定

高橋広奈^{1,2} 平野弘樹³ 河合明雄^{1,3,4}

Time-Resolved ESR Study on Assignments of Intermediates
in Radical Reaction with Maleic Anhydride
and Phthalic Anhydride Derivative

Hirona Takahashi^{1,2}, Hiroki Hirano³ and Akio Kawai^{1,3,4}

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University of Science, Okayama city, Okayama 700-0005, Japan

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: akawai@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Radical reactions with maleic anhydride and methylhexahydrophthalic acid were investigated by observing short-lifetime reaction intermediate radicals to learn the graft polymerization process. Time-resolved (TR-) ESR spectroscopy was utilized to obtain hyperfine coupling constants (hfcc's) of the intermediate radicals. From analysis of the hfcc's with the aid of quantum chemical calculations, the structure of these intermediate radicals was determined. As for maleic anhydride, the reaction with the hydroxycyclohexyl radical was examined. The TR-ESR spectrum shows dual peaks, which were attributed to the isomers with different configurations probably at the moiety of the cyclohexane ring. Methylhexahydrophthalic acid was studied as a model compound for one of the important non-radical intermediates in the graft polymerization starting with maleic anhydride. Hydrogen abstraction by phenyl radicals was used to measure radical reaction products of methylhexahydrophthalic acid. Although the hyperfine lines of this intermediate radical were broad, the splitting of 33 G derived by two hydrogen atoms with a nearly equivalent hfcc was recognized, which enables us to determine the structure. From this information about intermediate radicals, we propose the initial process of graft polymerization of polypropylene with maleic anhydride.

Keywords: time-resolved ESR, maleic anhydride, methylhexahydrophthalic acid, radical addition reaction, graft polymerization

序論

無水マレイン酸やその誘導体は、機能性ポリマーの一種である酸変性樹脂を作る際の材料として、広く利用されている。このような樹脂生成では、グラフト重合を利用することが多い¹⁾。一般的な樹脂のグラフト重合では、単純なポリオレフィンなどの直鎖中に、機能性の官能基を持つ側鎖を導入させて機能性樹脂とする。このような官能基の導入では、ポリオレフィンを放射線照射などによってラジカル開裂させ、反応性の高いポリオレフィンラジカルを生成

させ、その付加反応を利用する。ポリオレフィンラジカルのようなアルカン系のラジカルが、無水マレイン酸のような部位を持つ化合物と付加反応すると、この部位を側鎖あるいは末端に持つポリオレフィンが作られる。無水マレイン酸は、酸無水物を形成する5員環に二重結合を有するため、このようなグラフト重合にあずかることが容易である。

グラフト重合の機構解明は、最終的な生成物の観測による推測によってなされるのが一般的である。

しかしながら、このような時間分解能の低い観測手段では、付加反応で生成する中間体ラジカルなどの情報は与えられておらず、反応機構は推測の域をでていない。反応中間体は、可視紫外吸収を時間分解して観測するレーザーフラッシュ法で同定することが可能である。しかし、アルカンラジカルなどは、可視紫外波長域に強い電子吸収バンドを持たないため、レーザーフラッシュ法の観測対象にならなかった。ラジカルを選択的に捉える ESR を用いる方法もあるが、時間分解能が低く、中間体を直接観測するのが難しい。そのため、スピントラップなど特殊な技術を用いた観測で中間体を推測している¹⁾。

これに対し、近年、安価なパルスレーザー装置の開拓と、高速デジタル信号処理技術の向上により、ESR 計測をマイクロ秒オーダーで行うことが容易になってきた。ESR は、常磁性種のみに感度をもつ磁気共鳴分光法であり、本来、ラジカルの構造決定で力を発揮できる。しかし、その測定感度が可視紫外や赤外のような光学的な観測法に比べて低いため、短い寿命のラジカルをとらえることは困難であった。この壁を越えるのに貢献したのが、光分解によるラジカル生成過程における、電子スピン分極発生現象である。ラジカルは、光重合反応などで知られるように、芳香族ケトンなどの紫外光照射で光分解反応によって生成させることができる。このような光分解過程では、分子内のエネルギー緩和過程において、分子内の電子スピンと電子軌道角運動量の相互作用によって、電子スピンの α または β 状態にかたよる非熱分布状態が現れることが多い。このような異常な電子スピン分布は、角運動量保存則に従って分解した後のラジカルのスピン分布に受け継がれる。そのため、生成したラジカルは、電子スピンが異常分布（非熱分布）となる²⁾。このような状態のラジカルは、動的電子スピン分極（DEP）をもつ。ESR 信号は、熱分布のスピンを観測する場合が一般的である。この場合は α と β の分布数差がボルツマン分布を仮定すると極めて小さいため、信号感度が低くなる。しかし、もしスピンの異常分布して DEP をもつと、 α と β の分布数差が大きくなるため、ESR 信号が強くなる。この信号増強は、ESR 計測をマイクロ秒以内程度の高速で行うことを可能にする。従って、光分解で生じたラジカルやそれが付加反応を起こした生成物ラジカルについては、マイクロ秒オーダーの時間分解 ESR 観測が可能になる場合がある。

本研究では、この時間分解 ESR 法を用い、酸変性樹脂を作るグラフト重合に資する知見を得ることを目指した。そのために、(1) 無水マレイン酸へのラジカル付加反応の観測、(2) 無水マレイン酸が付加反応

して生成する官能基のモデルとして無水フタル酸誘導体のラジカルとの反応中間体に対する観測を行い、グラフト重合の初期過程で起こる反応機構を考察した。図 1 に、上述の化合物の構造式を示した。これらのラジカル反応中間体について、時間分解 ESR スペクトルの解析による同定を行った。

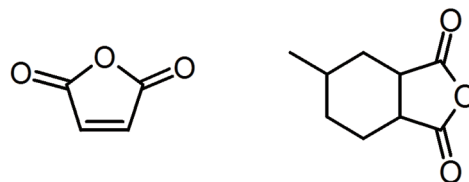


図 1. ラジカルとの反応試薬として用いた酸無水物の構造式 (左) 無水マレイン酸 (右) メチルヘキサヒドロ無水フタル酸。

材料と方法

時間分解 ESR スペクトルは、YAG レーザー照射後 $1 \mu\text{s}$ 程度の ESR 信号を積算しながら磁場掃引することで得た。試薬はすべて市販品をそのまま用いた。

結果と討論

無水マレイン酸へのラジカル付加

本研究では、ラジカル生成法として光重合反応でよく使われる芳香族ケトンやオキシムエステル化合物の紫外線レーザー (355nm) 光分解反応を利用した。図 2(a) に、この様な光分解の例として IRG184 の光分解反応スキームを示した。IRG184 は、カルボニル基の α 解裂反応によって Hydroxycyclohexanyl (Hy-CyH) ラジカルおよびベンゾイルラジカルを生成することが知られる。このような反応経路で生じる Hy-CyH ラジカルやベンゾイルラジカルは、強くスピン分極（DEP）することが報告されており³⁾、マイクロ秒オーダーでの時間分解 ESR 計測が可能な観測対象である。

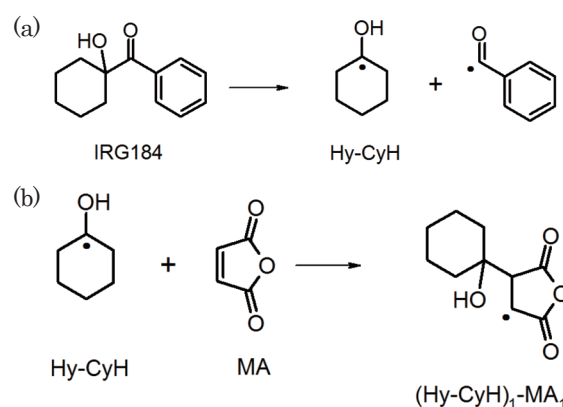


図 2. (a) IRG184 の光分解反応式および (b) 生じた Hy-CyH ラジカルの無水マレイン酸への付加反応。

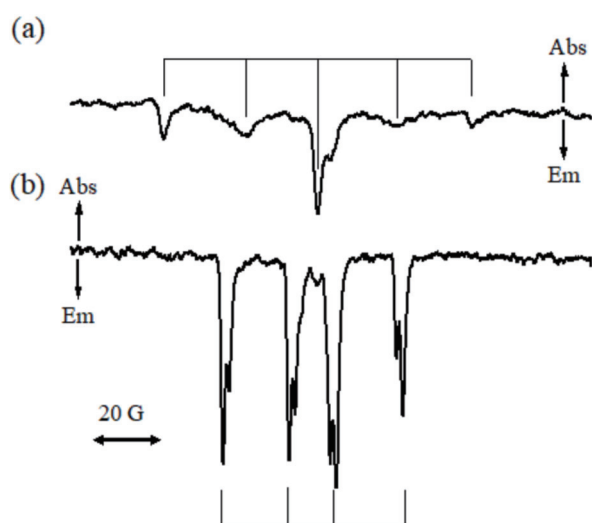


図 3. 355nm レーザー照射後 1.0~1.5 μ s で観測した短寿命ラジカルの時間分解 ESR スペクトル. (a) IRG184 の光分解で生じた Hy-CyH ラジカル. (b) 無水マレイン酸を添加して生成した Hy-CyH への付加ラジカル.

図 3 は IRG184 のナノ秒 YAG レーザー (355 nm, 10 ns パルス) による光分解で得られた時間分解 ESR スペクトルである。図 3 (a) は IRG184 のみ、図 3 (b) は IRG184 に無水マレイン酸を添加したトルエン溶液試料である。試料溶液は Ar バブリングによって脱酸素処理を施している。IRG184 のみの場合は、図 2 (a) で示した光分解スキームで予測される通り、Hy-CyH の 5 本ピークとベンゾイルの 1 本ピーク（中心付近の強いピークの右肩ピーク）が観測されている。いずれもマイクロ波発光の信号が得られており、 α スピンに分極した DEP を持っていることがわかる。Hy-CyH ラジカルは、不対電子を持つ炭素から見て β 位にほぼ等価な 4 つの水素原子があり、これが時間分解 ESR スペクトルの 5 本ピークとなって表れている。一部のピークの線幅が広がっているが、これは 6 員環のフネ型とイス型の間の異性化反応による線幅増大効果で説明できる。

一方図 3(b) は無水マレイン酸を加えた系で、スペクトルが図 3(a) とは大きく異なっている。この系では、図 2(b) で予測されるような Hy-CyH ラジカルの無水マレイン酸への付加反応が起こり、主に 4 本に分裂したスペクトルパターンが観測されている。一方で、ベンゾイルラジカルは一般にアルカン系ラジカルよりもオレフィンへの反応性が低く、付加生成物の時間的な立ち上がりは遅くなると推察される。図 3(b) のスペクトルを観測した照射後 1.0~1.5 マイクロ秒の時間帯では、ベンゾイルの付加生成物は見られない。

無水マレイン酸への付加反応で生じた (Hy-CyH)₁-MA₁ ラジカルは、不対電子のある α 炭素およびその

β 炭素にそれぞれ 1 つの水素原子をもち、これらが大きな超微細構造分裂を示すと考えられる。4 本のほぼ等強度な分裂は、これら 2 つの水素原子の値が大きく異なることを表す。また、この 4 本ピークは各ピークに小さな強度のピークが隣接している。これは、2 つの水素による 4 本分裂幅が若干ことなる異性体が存在することを表すと解釈できる。このラジカルではシクロヘキサン環の配座異性体が存在すると考えられるため、それらのうち比較的安定なもの 2 つが観測されたと解釈した。スペクトルから得られた超微細構造定数を表 1 にまとめた。

表 1. 時間分解 ESR スペクトルから決定した (Hy-CyH)₁-MA₁ ラジカルの超微細構造定数

水素原子	超微細構造定数 /G
異性体 1	
α	20.5
β	35.0
異性体 2	
α	20.2
β	31.1

メチルヘキサヒドロ無水フタル酸へのラジカル反応

無水マレイン酸は、ラジカルのトラップ能が高いことが知られている。最近の我々の研究では、アクリル酸エステルやメタクリル酸エステルのような一般的に用いられる反応性の高いモノマーに比べ、一桁程度速度定数が大きいことが示されている³⁾。従って、ポリオレフィンなどをラジカルにして官能基を導入するグラフト重合において、有効な試薬である。一方で、無水マレイン酸にラジカルが付加したあとの分子構造では、酸無水物の官能基に共役する二重結合が消失するため、付加反応にあずかりやすい部位はなくなっている。しかし、グラフト重合では残留するラジカルが、無水マレイン酸の付加で導入された官能基において、更なる反応を起こすと推察される。このようなポリオレフィン側鎖部位を想定したモデル分子として、ここではメチルヘキサヒドロ無水フタル酸 (図 1) を用いた。この化合物は、エポキシ樹脂硬化剤として広く用いられる液体化合物で、入手が容易である。このようなモデル分子を用い、ポリマーのグラフト重合で生じると推測される無水マレイン酸付加部位に対する残留ラジカルの反応過程について、知見を得た。

本研究では、無水マレイン酸付加部位において、どのサイトの反応活性が高いか調べるため、反応させるラジカルとしてフェニルラジカルを用いた。フェニルは、水素引き抜き反応が速いため、試験的な研究での反応ラジカルとして都合がよい。また、光重

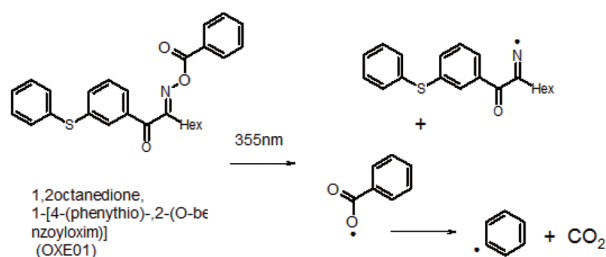


図4. OXE01の紫外光分解によるラジカル生成の反応スキーム.

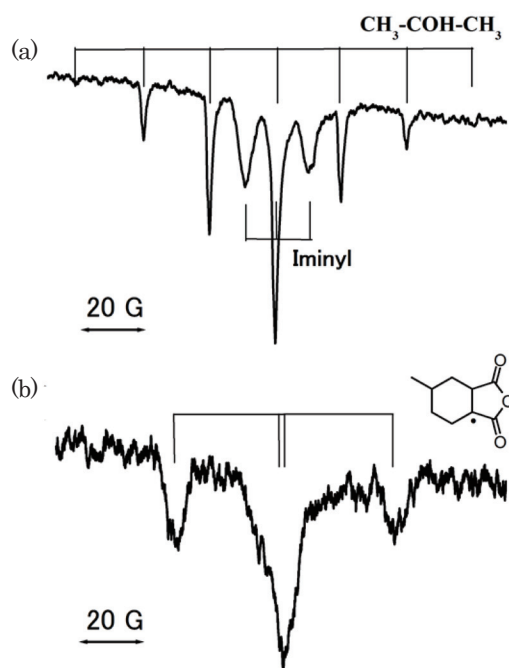


図5. OXE01 光分解で生じたフェニルラジカルと溶媒分子間の水素引き抜き反応生成ラジカルに対する時間分解 ESR スペクトル. (a) 2プロパノールの溶液中. (b) メチルヘキサヒドロ無水フタル酸の溶液中.

合開始剤の一種であるオキシムエステル (OXE01) の光反応を利用すれば、強くスピン分極したフェニルラジカルを簡単に発生させることができ、時間分解 ESR の測定感度を高くすることができる⁴⁾。このフェニルラジカルが反応した中間体ラジカルの観測も、スピン分極の恩恵で容易に行うことができる。

図4に、オキシムエステル化合物として本研究でとりあげた OXE01 について、その 355 nm 紫外光分解反応によるフェニルラジカル生成のスキームを示した。オキシムエステルでは、N-O 結合が開裂し、N 中心ラジカルであるイミニルラジカルおよび安息香酸ラジカルが生じる。後者は不安定で、すみやかに更なる分解を起こして CO_2 が脱離し、フェニルラジカルを生じる。フェニルラジカルは極めて反応性が高く、溶媒や溶質分子から水素原子を引き抜いて自身がベンゼンとなると推察される。

図5には、OXE01 の光分解過程を観測して得られ

た中間体ラジカルの時間分解 ESR スペクトルを示した。図5(a)は2プロパノール中での結果である。フェニルは2プロパノールから水素原子を引き抜き、自身はベンゼンとなる。一方、水素を引き抜かれた2プロパノールは、図5(a)に記したようなラジカルとなる。このラジカルは、不対電子のある炭素からみてβ位の2つの炭素に合計6個の等価な水素原子があるため、7本分裂した超微細構造を示す⁵⁾。この同定を図5(a)中に棒線でしめした。一方、OXE01の光分解では、フェニルと同時にイミニルラジカルも生成する。これは図5(a)中に3本ピークとして観測されている。フェニルはスペクトルに現れていないことを考慮すると、イミニルはフェニルに比べて反応性が低いことがわかる。ここで重要なことは、フェニルラジカルが、その反応性の高さから溶媒分子の水素を引き抜き、溶媒分子ラジカルを与えていることである。さらには、生成したラジカルもスピン分極を保持しているため、その時間分解 ESR スペクトル観測が容易であることを強調したい。

図5(b)は、OXE01のメチルヘキサヒドロ無水フタル酸溶液中で光分解させた際に得られた時間分解 ESR スペクトルである。強度比 1:2:1 の3本ピークがおおよそ 33 G の等間隔で現れているため、ほぼ同じ超微細構造定数をもつ2つの水素原子を、β炭素上にもっているラジカルが観測されたと考えられる。この観測結果は、グラフトによって生成する無水マレイン酸が付加したポリオレフィンが、他の残留するラジカルとどのような反応生成物を与えるかのヒントを与える。従って、観測されたラジカルの同定を試みた。メチルヘキサヒドロ無水フタル酸の様々な水素について、引き抜かれたあとのラジカルをいくつか仮定し、それらの構造を量子化学計算により求めた。各々の構造における超微細構造定数をもとに、観測されたスペクトルを再現できるか判断した。量子化学計算は、B3LYP/631Gdの理論レベルで密度汎関数法を用い、計算ソフト Gaussian 2016 で実行した。

図6に、スペクトルを再現できるラジカルの最有力候補の構造を示した。このラジカルは、メチルヘキサヒドロ無水フタル酸の5番炭素から水素原子1つが引き抜かれた構造をもつ。引き抜かれる可能性のある水素原子はいくつかあるが、図6の構造がもっともエネルギーの低いものであった。この量子化学計算で得られた最適化構造のラジカルが示す超微細構造定数を、表2にまとめた。この計算結果によれば、生じたラジカルは、不対電子をもつ5番炭素に対し、β位の水素が3つ存在する(9,12,13番水素)。この中で、12番水素は5番炭素の2p軌道に近い不

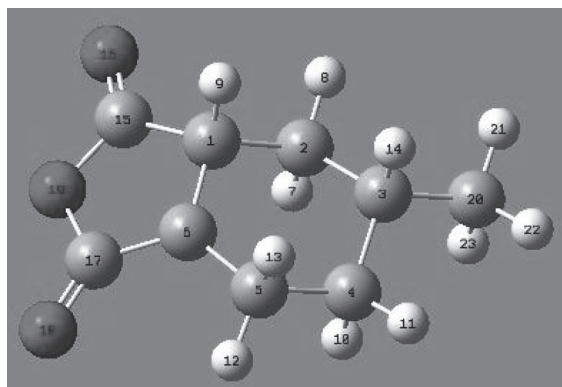


図 6. 量子化学計算 (B3LYP/631Gd 理論レベル) で得られたメチルヘキサヒドロフタル酸ラジカル最適化構造.

対電子軌道に対し、重なり積分がほぼゼロになるような立体配座をとっている。そのため、超微細構造定数は 1.5 G 程度と小さい。一方、9 番と 13 番の β 水素は不対電子の 2p 軌道と重なり積分が大きくなる配座をしており、超微細構造定数は各々 29.9G および 32.6G と大きな値を示している。この値は、実測のスペクトルの分裂をよく再現したため、観測されたラジカルが図 6 のもの (図 5(b) スペクトル中の化学構造式を参照) と結論した。

表 2. メチルヘキサヒドロ無水フタル酸ラジカル超微細構造定数

水素原子 (図 6 参照)	超微細構造定数 / G	
	計算値 (B3LYP/6-31Gd)	実測値
7	-0.941	-
8	1.586	-
9	29.903	33
10	-0.948	-
11	1.613	-
12	1.596	-
13	32.584	33
14	0.275	-
21	0.022	-
22	0.034	-
23	-0.021	-

無水マレイン酸によるグラフト重合

今回得られたメチルヘキサヒドロ無水フタル酸とフェニルの反応で生成したラジカルでは、不対電子が局在する炭素が、無水マレイン酸がラジカルと反応してできたラジカルにおけるものと同様の炭素であった。いずれも、酸無水物の部位を形成する炭素から見て β 位に存在する。この実験データをもとに、無水マレイン酸をもちいたポリプロピレン (PP) の

グラフト重合 (酸変性) について図 7 の概念的なスキームをもとに考察する。

放射線や光照射などで発生する PP 中に不対電子をもったラジカルは、無水マレイン酸との付加反応によって無水マレイン酸由来の置換基を側鎖としてとりこむ。この段階で不対電子は無水マレイン酸部位に移る。このラジカルは、反応系に残留するラジカル R と反応し、不対電子は消失する。ラジカル R としては、PP 由来のラジカル他、無水マレイン酸にラジカルが付加して生成したラジカル、PP が分解して生成する分子量の小さいアルカン系のラジカルなどが考えられる。

他のラジカル R との反応が起こると、無水マレイン酸部位の同じ炭素上に不対電子をもつラジカルが、改めて形成される。このラジカルはさらに後続の反応によってラジカルと結合し、不対電子を失うこととなる。これ以外にも無水マレイン酸自体がオリゴマーを形成する過程も起こるであろう。

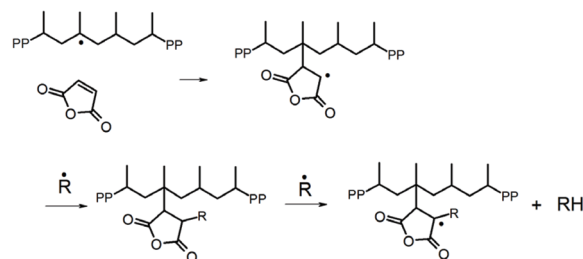


図 7. 無水マレイン酸を用いたポリプロピレン (PP) のグラフト重合に対するスキーム. R はグラフト重合中に存在するラジカル総称。

おわりに

今回の研究では、ポリオレフィンなどのグラフト重合がどのように進むか理解することを目的とし、無水マレイン酸の導入過程を題材にした研究を行った。グラフト重合初期過程を直接観測することは、複合反応による多種多様な中間体の存在により、極めて難しい。ここでは、グラフト重合初期過程を推測するに資するモデル系の反応を、マイクロ秒の時間分解能をもつ時間分解 ESR 法によって観測した。反応試薬として、無水マレイン酸およびメチルヘキサヒドロ無水フタル酸をモデル分子として用いた。また、ポリオレフィン中に生じるアルカン系のラジカルモデルとしては、IRG184 の光分解で生じる Hy-CyH を用いた。無水マレイン酸が置換されたあとのポリオレフィンに対するラジカル反応過程を推測するためには、OXE01 の光分解で生じるフェニルラジカルを用いた。これらの反応系に対する時間分解 ESR 観測により、反応中間体ラジカル超微細構造定数をもとに、量子化学計算の結果と合わせて構

造に関する知見を得た。これらの情報をもとに、ポリプロピレンの無水マレイン酸を用いたグラフト重合の初期過程を推測した。

今後の課題は、より PP のグラフト重合に近いモデル系として、アルカン系のラジカルを用いた反応系を探索し、そのような系での時間分解 ESR 法による観測と解析を行うことである。また、近年、開拓が著しいパルス ESR を用いた反応速度定数の決定法^{2,3,6)}を用い、モデル系の速度論的な議論を進めることも重要であろう。

謝辞

本研究は、研究課題「誘導体共振器を用いた時間分解 ESR 法による新規な常磁性種の反応速度測定法開発」に対する 2020 年度総合理学研究所の共同研究助成 (RIIS202003) によって行なわれた。酸変性について、古河電工 (株) の中島康雄博士から貴重な助言をいただいた。

文献

- 1) Nishihara Y, Matsui K, Kuwabara K, Murata N, Yamaguchi T, Miyake Y, Ikegami T, Kanaori K and Tajima K, (2017) Molecular structure of poly (vinyl alcohol)-derived carbon-centered radicals studied by rapid-flow and spin-trapping ESR measurements: A short-lived intermediate radical in the initial stage of the graft polymerization reaction. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **90**: 244-253.
- 2) 河合明雄, 高橋広奈 (2018) 光で誘起する動的電子スピン分極～最近の進展～. *光化学*. **49**: 9-16.
- 3) Takahashi H, Hagiwara K and Kawai A (2018) Measurements for addition reaction rate constants of organic free radicals to maleic anhydride by means of pulsed EPR spectroscopy with laser excitation. *Appl. Magn. Reson.* **49**: 813-824.
- 4) Miyake Y, Takahashi H, Akai N, Shibuya K and Kawai A, (2014) Structure and reactivity of radicals produced by photocleavage of oxime ester compounds studied by time-resolved electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Chem. Lett.* **43**: 1275-1277.
- 5) Atherton NM (1993) *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Harwood, Chichester. Chap.9.
- 6) Takahashi H, Hirano H, Nomura K, Hagiwara K and Kawai A (2021) Rate constant measurements for radical addition reactions with C60 by means of time-resolved EPR and spin-echo detected pulsed EPR spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **763**: 138205-138211.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ラット精巣におけるオキシトシン・オキシトシン受容体の局在

鄭 美帆¹ 伊藤隆志² 坂本竜哉² 小谷 享¹ 坂本浩隆² 越智拓海^{1, 2, 3}

Localization of Oxytocin and Oxytocin Receptors in the Rat Testis

Miho Zun¹, Takashi Ito², Tatsuya Sakamoto², Susumu Kotani^{1, 3},
Hirotaka Sakamoto² and Takumi Oti^{1, 2, 3, 4}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

² Ushimado Marine Institute (UMI), Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Ushimado, Setouchi, Okayama 701-4303, Japan

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: oti-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A hormone oxytocin (OXT) is known to regulate female reproductive functions, such as milk ejection and parturition, thereby it is generally termed the 'female hormone'. Recently, it was reported that *Oxt* and *OXT receptor (Oxtr)* mRNA are expressed in the rat testis, and OXT promotes sperm transport and androgen synthesis. It has been suggested that OXT, which is locally synthesized in the testis, is involved in the male reproductive function. However, the localization of OXT or OXTR-expressing cells in the testis is unknown. The purpose of this study was to clarify the localization of OXT- and OXT receptor-expressing cells in the rat testis using OXTR-related mutant rats. First, using RT-PCR, it was confirmed that both *Oxt* and *Oxtr* mRNA were expressed in the wild-type rat testis, although the expression level of *OXT* mRNA was very low. In addition, OXT immunostaining in the wild-type rat testis showed that OXT-immunoreactivity was found in sertoli cells of some seminiferous tubules. Furthermore, OXT immunostaining with the *Oxtr*-td Tomato rat testis showed that OXT-immunoreactivity and tdTomato signals were found in different Sertoli cells of the same seminiferous tubules. These results suggest that OXT and OXTR are simultaneously, but heterotropically, expressed in rat testis Sertoli cells. Sertoli cell OXT may act in a paracrine manner *via* OXTR expressed in nearby Sertoli cells.

Keywords: oxytocin, oxytocin receptor, testis, rat, paracrine

序論

神経ペプチドホルモンの一つであるオキシトシン (OXT) は、視床下部に存在する視索上核と室傍核の神経分泌ニューロンで合成され、下垂体後葉の軸索末端まで輸送されたのち、血中へと放出される。下垂体後葉から放出された OXT は雌の射乳や分娩時の子宮筋収縮に関わるなど¹⁾、雌のホルモンとして知られている。一方で近年、OXT が雄の性機能の調節に関わるなど OXT の雄での機能も着目されている²⁻⁵⁾。

先行研究において、マウスの精子へ OXT を添加すると、精子の運動性が刺激されることから、OXT が

受精に重要な作用を及ぼすと考えられている⁶⁾。ラット精巣内に OXT を投与すると、精巣および精巣上体の重量が増加し、排精時に精子から脱離する残余小体の数が増加する⁷⁾。また、ラットやヤギの精巣組織片に OXT を添加すると、培養液中のテストステロン濃度が減少し、テストステロンの代謝物であり、精巣内のアンドロゲン受容体を介して精子形成に作用する 5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) 濃度が増加する⁸⁻¹⁰⁾。さらに、ラットやヒトの精巣、精巣上体、前立腺において、OXT がテストステロンを DHT へと代謝させる酵素の一つである 5 α -リダクターゼ

の発現や活性を促進する^{8, 11, 12)}。これらのことから、OXT が 5α -リダクターゼの発現や活性を増加させることで精子形成に必要な DHT の合成量を増加させ、精子形成に関与すると考えられている^{13, 14)}。また、ラット精巣において *Oxt* および OXT 受容体 (*Oxtr*) mRNA が発現する¹⁵⁾ ことから、精巣で合成される OXT が 5α -リダクターゼ活性に作用し、精子形成に関わることが示唆されるものの、OXT 発現細胞や作用部位である OXTR 発現細胞の局在はいまだ不明である。

そこで本研究では、*Oxtr* 遺伝子改変ラットを用いて、精巣における OXT 発現細胞および OXTR 発現細胞の局在を免疫組織化学的に解析し、精巣における OXT の作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

実験動物

成熟雄ラット (Wistar 系統; 7 - 11 週齢) と *Oxtr*-Cre ノックインラットと ROSA26 Bacterial artificial chromosome (BAC) 内に CAG-loxP-flanked Neo/STOP cassette- 赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を挿入したレポーターラットを掛け合わせ、OXTR 発現細胞が赤色蛍光シグナルで標識される遺伝子改変ラット [*Oxtr*-tdTomato ラット (Long-Evans 系統; 8 - 10 週齢) (岡山大学より供与)] を用いた。明期 12 時間 / 暗期 12 時間の環境で、餌と水は自由に摂取できる状態で飼育した。動物実験は、文部科学省の「研究機関における動物実験に関する基本指針」に基づいて行い、岡山大学動物実験委員会、神奈川大学理学部動物実験安全要綱、神奈川大学理学部動物実験委員会の承認を受けて実施した。

Oxt, *Oxtr*, *Gapdh* に対する Reverse Transcriptional-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ラットをイソフルラン深麻酔下で失血死させ、脳と精巣を摘出した。脳はドライアイスで凍結させたのち、 -80°C のディープフリーザーで保管した。その後、18 G 針 (Terumo, NN-1838S) を用いて、室傍核を含む領域をパンチアウトした。一方で、精巣は精

巣鞘膜を取り除き、氷上でホモジェナイズし、RNA 抽出を行った。RNA 抽出は NucleoSpin RNA Kit (Takara bio, Tokyo, Japan) を用い、プロトコルに従って行った。Total RNA の濃度はナンドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。この Total RNA から Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Strassell, 40724 Hilden, Germany) を用いて、最終濃度 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ になるように一本鎖 cDNA を合成した。Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (Takara bio) と *Oxt* (PCR 産物のサイズ: 378 bp)、*Oxtr* (PCR 産物のサイズ: 559 bp) 特異的にデザインしたプライマーを用いて表のように PCR を行った (表 1)。内部標準としてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の遺伝子 (*Gapdh*) (PCR 産物のサイズ: 497 bp) を使用した。PCR を行ったサンプルは 2% アガロースゲルで泳動し、Ez-Capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。Second PCR は First PCR 産物を 100 倍希釈し、First PCR と同条件で反応させ、アガロースゲルで電気泳動を行った。

灌流固定およびパラフィン切片・凍結切片作製

成熟雄ラットに三種混合麻酔 (ドミトール 0.3 mg/kg 、ミダゾラム 4.0 mg/kg 、ベトルファール 5.0 mg/kg) を腹腔内投与し、深麻酔下で左心室から生理食塩水を灌流して脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Phosphate-buffer (PB) (pH 7.4) 溶液を灌流し、固定した。精巣を摘出した後、4% PFA in 0.1 M PB を用いて 4°C 、一晩で後固定を行なった。組織の一部をトリミングし、エタノールからレモゾールへと置換し、パラフィンへの包埋を行い、マイクロームで $10\text{ }\mu\text{m}$ 厚のパラフィン切片を作製した。パラフィン除去を行った後、HE 染色し、封入・構造の観察を行った。また、一部は 25% スクロース in Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) 溶液に移し、 4°C 、48 時間以上かけて置換し、凍結保護を行った。トリミング後、炭酸ガスで急速冷凍し、クリオスタット (CM1850, Leica, Nussloch, Germany) を用いて、 $30\text{ }\mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作製した。作製した凍結切片はスライドガラスに張り付けし、乾燥させた後、 -20°C で保存した。

表 1. プライマーと PCR 条件

Target gene	Forward primer	Reverse primer	PCR condition (cycle)
<i>Oxt</i>	CTTGGCCTACTGGCTCTGAC	GCGCCCTAAAGGTATCATCA	(94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec)x40
<i>Oxtr</i>	TGCTCTTTGAGAAGCTAACAAGATT	AGGTTGGAAAGTAGGAAGAGACATT	(94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec)x38
<i>Gapdh</i>	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CAAAGTTGTCATGGATGACC	(94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec)x30

免疫組織化学法

OXT 免疫染色

切片を 0.3% Triton X-100 in PBS (T-PBS pH 7.4) で洗浄した。次いで、内因性ペルオキシダーゼを失活させるために、1.0% 過酸化水素 / 60% メタノール溶液に 20 分間浸漬し、その後 T-PBS で洗浄した。さらに、0.3% Triton X-100、1% 正常ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミン、0.05% NaN₃ を用いて室温で 30 分反応させ、ブロッキングした。抗 OXT-ニューロフィジン (NP) 抗体 (PS60; mouse monoclonal, ATCC, RRID: CVCL_G254; ブロッキングバッファーで 1:1,000 に希釈) あるいは抗 OXT 抗体 (Merck, 4G11, Sigma-Aldrich mouse monoclonal; 1:10,000 希釈) を用いて室温で 1 時間反応させたのち、4℃ で 1 晩反応させた。T-PBS で洗浄後、Biotinylated goat anti-mouse IgG antibody (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて室温で 1 時間反応させた。Streptavidin (SAB)-HRP (Nichirei, Tokyo, Japan) で室温、1 時間反応させ、免疫反応産物を 3-3'-ジミノベンジジン (DAB) を用いて可視化した。脱水透徹を行ったのち、マウントクイック (Daido Sangyo CO., LTD. Japan) で封入した。光学顕微鏡 (BX53; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて画像を取得した。

また、蛍光免疫染色法では、抗 OXT-NP 抗体 (1:1000 希釈) を使用し、Alexa Fluor 488-linked anti-mouse IgG raised in goats (1:1,000 希釈; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて室温で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄した後、DAPI 入り Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) を用いて封入した。染色した切片は蛍光顕微鏡 (BX53, Olympus) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察し、画像を取得した。

抗体の特異性解析

OXT 抗体の特異性を解析するため、抗 OXT 抗体 (1:10,000 希釈) と抗原ペプチドである OXT ペプチド (50 µg/ml; Anaspec Inc., Fremont, CA, USA) を室温で 1 時間反応させた吸収抗体を用いて免疫染色を行った。抗原ペプチドの代わりに同量の蒸留水を加えて室温で 1 時間反応させた抗体を用いて免疫染色を同時に行った。免疫反応産物は DAB で可視化した。

結果

精巣における *Oxt* / *Oxtr* 受容体 mRNA の発現

野生型ラット室傍核および精巣における *Oxt*、*Oxtr* mRNA の発現を調べた (図 1)。結果、First PCR

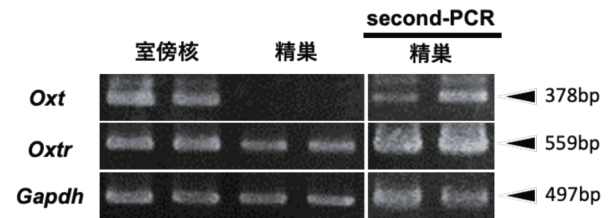


図 1. 室傍核および精巣における *Oxt*、*Oxtr*、*Gapdh* mRNA の発現。精巣において *Oxt*、*Oxtr* mRNA が発現していた。Second PCR は First PCR 産物を 100 倍希釈し、First PCR と同条件で反応させた。

にて *Oxt* mRNA を示すバンドは室傍核でのみ観察された。*Oxtr* mRNA を示すバンドは室傍核と精巣の両方で観察された。内部標準である *Gapdh* mRNA を示すバンドも室傍核と精巣の両方で観察された。Second PCR により、*Oxt* mRNA を示すバンドが精巣でも観察され、*Oxtr* mRNA を示すバンド、*Gapdh* mRNA を示すバンドも室傍核、精巣ともに First PCR よりも強く観察された。これらのことから、野生型ラット精巣において、*Oxt*、*Oxtr*、*Gapdh* mRNA が発現することを明らかにした。

精巣の HE 染色

精巣の構造を確認する目的で HE 染色を行った (図 2)。精巣の HE 染色により、精巣の精細管で、精細胞の支持、栄養供給、精子の輸送に関わるセルトリ細胞の核が精上皮の基底側に精祖細胞と並び存在し、精上皮の基底側から管腔側にかけて細胞が伸長している。また、男性ホルモンであるアンドロゲンなどを産生するライディッヒ細胞が精巣の精細管同士の間に観察された。

精巣における OXT 発現細胞の同定

野生型ラット精巣において OXT に対する免疫染色を行い、OXT 発現細胞の局在を解析した。結果、一

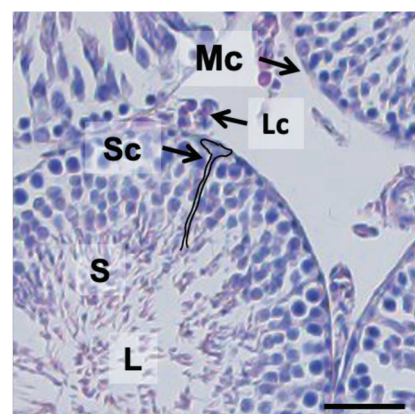


図 2. 精巣の HE 染色。セルトリ細胞を黒線で囲って示した。Lc: ライディッヒ細胞, Sc: セルトリ細胞, Mc: 筋様細胞, S: 精子細胞, L: 内腔。スケールバー: 25 µm。

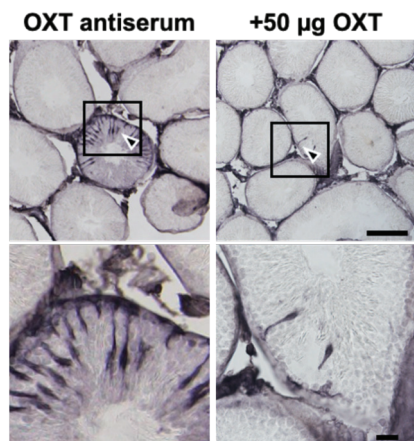


図 3. OXT に対する免疫染色と抗体の特異性. 左: OXT 免疫染色, 右: OXT ペプチドを用いた吸収抗体での免疫染色. 線で囲った領域を拡大した. スケールバー: 200 μm (上図), 50 μm (下図).

部の精細管においてセルトリ細胞で OXT 免疫陽性反応が観察された. OXT ペプチドで吸収した抗体を反応させると OXT 陽性反応が著しく減弱した. このことから、OXT がセルトリ細胞で発現することを明らかにした (図 3).

精巣における OXT 発現細胞と OXT 受容体発現細胞の局在

次に精巣における OXTR 発現細胞を同定するため、*Oxtr*-tdTomato ラットを用いて、赤色蛍光シグナル (tdTomato) の局在を解析した. その結果、一部の精細管のセルトリ細胞において、赤色蛍光シグナルが観察された (図 4) ことから、OXTR がセルトリ細

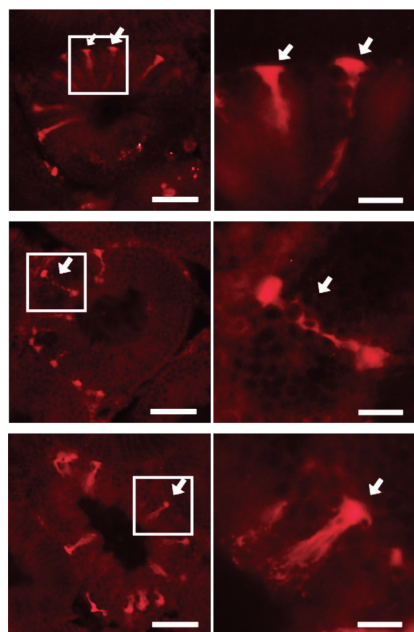


図 4. *Oxtr*-tdTomato ラット精巣における tdTomato (OXTR) 発現細胞の局在. 線で囲った領域を拡大した. 矢印: tdTomato 発現細胞. スケールバー: 100 μm (左図), 25 μm (右図).

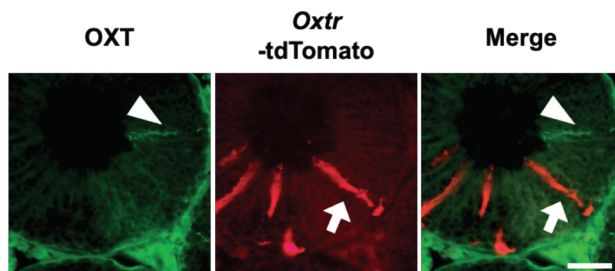


図 5. *Oxtr*-tdTomato ラット精巣における OXT 免疫染色. 矢頭: OXT 陽性細胞. 矢印: tdTomato (OXTR) 発現細胞. スケールバー: 50 μm .

胞で発現することが明らかになった. 最後に、OXT 発現細胞と OXTR 発現細胞の局在を比較するため、*Oxtr*-tdTomato ラット精巣において OXT 蛍光免疫染色を行った. その結果、OXT 陽性反応 (緑蛍光) のみが観察された精細管と OXTR の発現を表す赤色蛍光シグナルのみが観察された精細管、あるいは OXT 陽性反応と赤色蛍光シグナルの両方が観察された精細管の 3 パターンが確認された (図 5). また、OXT 陽性反応と赤色蛍光シグナルがともに観察された精細管では、OXT 陽性反応と赤色蛍光シグナルは異なるセルトリ細胞で観察された (図 5).

討論

ラット精巣において *Oxt*、*Oxtr* mRNA が発現したことから、精巣で局所的に OXT、OXTR が合成されることを明らかにした. また、精巣における OXT 免疫染色の結果、精巣のセルトリ細胞に OXT 免疫陽性反応が観察されたことから、精子形成や精子の輸送に係わる精巣セルトリ細胞において OXT が発現・合成されることが示唆された. また、OXT を発現するセルトリ細胞とは異なるセルトリ細胞で OXTR を示すシグナルが観察されたことから、セルトリ細胞で合成される OXT が近傍のセルトリ細胞で発現する OXTR を介して傍分泌的に作用することが示唆された (図 6).

ラット精巣に OXTR アンタゴニストを投与すると精子の輸送が遅延される^{9, 16, 17)}. また、精巣において、OXT が 5α -リダクターゼの活性や発現を高め、精子形成を促進する^{8, 11-14)}. 今回、OXT と OXTR は異なるセルトリ細胞で発現していたことから、セルトリ細胞で発現する OXT は近傍のセルトリ細胞で発現する OXTR に作用し、 5α -リダクターゼの活性や発現を高めることで精子形成を促進し、精子の輸送を調節するのかもしれない.

今回、OXT と OXTR が、一部のセルトリ細胞でのみ観察された. セルトリ細胞には精子形成の段階に伴って、I ~ XIV のステージが存在する^{18, 19)}. またヒツジにおいて、*Oxt* と *Oxtr* mRNA の発現がこ

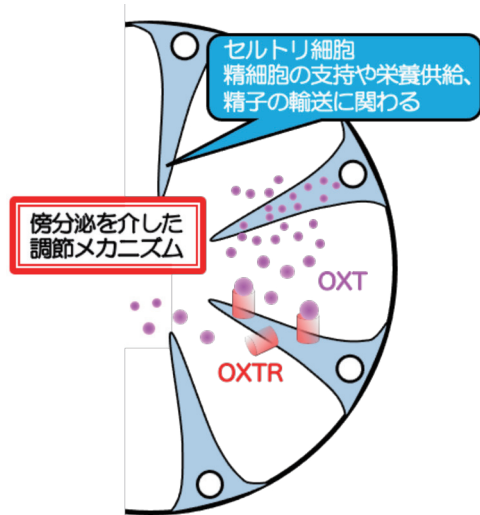


図 6. ラット精巣における OXT 作用機序の模式図. セルトリ細胞で合成される OXT は近傍のセルトリ細胞で発現する OXTR を介して傍分泌的に作用する可能性が示された.

の精子形成のステージに依存的であることが報告されている²⁰⁾. OXT は精細管から精巣上体に精子を放出する排精の促進に関わり^{16, 21)}、ラットのセルトリ細胞上の精子形成段階において、排精は VII～VIII ステージで起こることが知られている¹⁸⁾. 排精が起こる VII～VIII ステージのセルトリ細胞でアンドロゲン受容体 (AR) が発現する²²⁾. *Oxtr-tdTomato* ラット精巣において、AR に対する免疫染色を行うことで、OXTR の発現が排精が起こる VII～VIII ステージで発現することを明らかにできるかもしれない。さらに、近年、ラット精巣において OXT がアンドロゲン結合タンパク質 (ABP) と共発現する可能性が示唆されている²³⁾. 下垂体から分泌される卵巣刺激ホルモン (FSH) の作用により、ABP が産生され、FSH は XIV～I のステージで分泌量が上昇することが報告されている²²⁾. ライディッヒ細胞から分泌されたテストステロンはセルトリ細胞に取り組み、ABP と結合し、精子成熟に必要な高濃度のテストステロンを精子に提供する。これらのことから、OXT と ABP に対する二重免疫染色を行うことで、OXT が XIV～I のステージのセルトリ細胞で発現することを明らかにできるかもしれない。

ヒト、マーモセット、ヒツジのセルトリ細胞やライディッヒ細胞にて、OXTR 免疫陽性反応がみられることが報告されている^{9, 24)}. 今回、ライディッヒ細胞においては OXT、OXTR とともに特異的なシグナルは観察されなかった。OXTR 発現が精子形成段階や個体の発達段階に依存している可能性がある²⁰⁾ ことから、精子形成段階や発達段階ごとに OXT や OXTR の発現を調べることで、ライディッヒ細胞における OXT や OXTR の発現を明らかにできるかも

しれない。また、ラット精巣において、精細管収縮を引き起こす筋様細胞にて OXT がバソプレシン受容体 (V1a) を介して作用し、精子の輸送に関わることも報告されている²⁵⁾. 今後は V1a の発現局在も解析する必要があるかもしれない。

謝辞

本研究は、研究課題「ラット抹梢臓器における神経ペプチド系の局在」に対する 2020 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202007) を受けて行われた。記して感謝する。

文献

- 1) Freund-Mercier MJ, Moos F, Poulain DA, Richard P, Rodriguez F, Theodosis DT and Vincent JD (1988) Role of central oxytocin in the control of the milk ejection reflex. *Brain Res. Bull.* **20**: 737-741.
- 2) Dalmazzo A, Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira IVA, Goissis MD, Francischini MCP, Lopes E, Minazaki CK, Blank MH, Cogliati B, Pereira RJG, Barnabe VH and Nichi M (2019) Immunolocalisation and expression of oxytocin receptors and sex hormone-binding globulin in the testis and epididymis of dogs: correlation with sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* **31**: 1434-1443.
- 3) Oti T, Sakamoto T and Sakamoto H (2021) Systemic effects of oxytocin on male sexual activity via the spinal ejaculation generator in rats. *Commun. Integr. Biol.* **14**: 55-60.
- 4) Oti T, Satoh K, Uta D, Nagafuchi J, Tateishi S, Ueda R, Takanami K, Young LJ, Galione A, Morris JF, Sakamoto T and Sakamoto H (2021) Oxytocin influences male sexual activity via non-synaptic axonal release in the spinal cord. *Curr. Biol.* **31**: 103-114 e105.
- 5) Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R and Einspanier A (1997) Oxytocin and male reproductive function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **424**: 253-264.
- 6) Vongpralub T and Fukashi K (1994) Effects of Oxytocin on Sperm Motility and In Vitro Fertilization in the Mouse. *Nihon Chikusan Gakkaiho* **65**: 695-700.
- 7) Frayne J, Townsend D and Nicholson HD (1996) Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat. *J. Reprod. Fertil.* **107**: 299-306.
- 8) Frayne J and Nicholson HD (1995) Effect of oxytocin on testosterone production by isolated rat Leydig cells is mediated via a specific oxytocin receptor. *Biol. Reprod.* **52**: 1268-1273.
- 9) Inaba T, Nakayama Y, Tani H, Tamada H, Kawate N and Sawada T (1999) Oxytocin gene expression and action in goat testis. *Theriogenology* **52**: 425-434.
- 10) Sawada T, Uemura K, Tamada H, Inaba T and Mori J (1998) Effects of oxytocin and prostaglandin F2 α on androgen production of adult rat testis in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **55**: 121-126.
- 11) Assinder SJ (2008) Oxytocin increases 5 α -reductase activity of human prostate epithelial cells, but not stromal cells. *Prostate* **68**: 115-121.

- 12) Assinder SJ, Johnson C, King K and Nicholson HD (2004) Regulation of 5alpha-reductase isoforms by oxytocin in the rat ventral prostate. *Endocrinology* **145**: 5767-5773.
- 13) Killian J, Pratis K, Clifton RJ, Stanton PG, Robertson DM and O'Donnell L (2003) 5alpha-reductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. *Biol. Reprod.* **68**: 1711-1718.
- 14) Nicholson HD and Jenkin L (1994) 5α-Reductase activity increased by oxytocin in the rat testis. In: *Function of Somatic Cells in the Testis*. Barke A, ed. Springer. pp.278-285.
- 15) Assinder SJ, Carey M, Parkinson T and Nicholson HD (2000) Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **63**: 448-456.
- 16) Assinder SJ, Rezvani A and Nicholson HD (2002) Oxytocin promotes spermiation and sperm transfer in the mouse. *Int. J. Androl.* **25**: 19-27.
- 17) Thackare H, Nicholson HD and Whittington K (2006) Oxytocin: its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum. Reprod. Update.* **12**: 437-448.
- 18) Shima Y, Miyabayashi K, Matsuzaki S, Inoue M and Morohashi K (2014) 出生後の精巣における胎仔型ライディッヒ細胞の細胞運命と生理機能の解明. 日本生殖内分泌学会雑誌 **19**: 45-50.
- 19) 石田仁男 (1987) ラット精細管の電顕的細胞化学的研究: 発育段階におけるホスファターゼ局在の変化. 日本泌尿器科学会雑誌 **78**: 973-981.
- 20) Whittington K, Assinder SJ, Parkinson T, Lapwood KR and Nicholson HD (2001) Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction* **122**: 317-325.
- 21) Anjum S, Anuradha A and Krishna A (2018) A possible direct action of oxytocin on spermatogenesis and steroidogenesis in pre-pubertal mouse. *Andrologia*.
- 22) Kumar A, Raut S and Balasinar NH (2018) Endocrine regulation of sperm release. *Reprod. Fertil. Dev.* **30**: 1595-1603.
- 23) Herbert Z, Weigel S, Sendemir E, Marshall A, Caldwell JD, Petrusz P, Peuckert C and Jirikowski GF (2005) Androgen-binding protein is co-expressed with oxytocin in the male reproductive tract. *Anat. Histol. Embryol.* **34**: 286-293.
- 24) Einspanier A and Ivell R (1997) Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biol. Reprod.* **56**: 416-422.
- 25) Howl J, Rudge SA, Lavis RA, Davies AR, Parslow RA, Hughes PJ, Kirk CJ, Michell RH and Wheatley M (1995) Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: receptor structure, signal transduction, and developmental regulation. *Endocrinology* **136**: 2206-2213.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ソメイヨシノの花粉母細胞の減数分裂期染色体の顕微鏡観察

安積良隆^{1,2,4} 早津 学³

Microscopic Observation of Pollen Mother Cell Chromosomes at Meiosis of Flowering Cherry 'Somei-yoshino'

Yoshitaka Azumi^{1,2,4} and Manabu Hayatsu³

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata City, Niigata 951-8510, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Flowering cherry 'Somei-yoshino' was obtained as a hybrid between 'Edo-higan' and 'Ohshima-sakura' about 150 years ago, and since then it has been a very popular plant in Japan. In addition to cherry-blossom viewing, Somei-yoshino trees contribute foodstuffs, fuel, smoking material, etc. Because of its popularity and resource value, a wide variety of biological analyses of this tree have been conducted. Regarding its chromosome organization, the chromosome number and genome DNA sequence have already been determined. However, meiotic chromosome behavior in their meiocytes with two genomes of different species remains to be revealed. In this research, we collected and enzymatically digested their buds, and spread chromosomes on glass slides. The chromosomes were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and we observed them using a fluorescent microscope. As the results of observation of the pollen mother cells at meiosis, we found totally paired chromosomes at pachytene and eight bivalents at metaphase I, suggesting that homeologous chromosomes paired normally in Somei-yoshino meiocytes after about 5.5 million years of independent evolution.

Keywords: Somei-yoshino, meiosis, chromosome, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

序論

日本のサクラの野生種は、2018年に報告されたクマノサクラを含めて10又は11種類が認められている^{1,2)}。これらの変異種である自生種が約100種、日本国内に生育している。これ以外に、交配によって作成された栽培種が200種以上知られている。日本ではサクラは非常に人気の高い樹木である。観賞用、あるいは食材、燻製の燻材などの用途のために里山や公園など、あちこちに植えられる。ソメイヨシノ（染井吉野、学名 *Cerasus* × *yedoensis* (Matsum.) Masam. et Suzuki 'Somei-yoshino') は母株をエドヒガン（江戸彼岸、*Cerasus itosakura* (Sieb.) Masam. & Suzuki f. *ascendens* (Makino) H. Ohba & H. Ikeda)、父株をオオシマザクラ（大島

桜、*Cerasus speciosa* (Koidz.) H. Ohba, 1992) とする交配によって作出された栽培品種である。江戸時代末期から明治時代初期にかけて、現在の東京都豊島区にあった染井村で育成されたと考えられている。現在、日本及び諸外国でソメイヨシノとして植栽されているサクラは、この交配によって作成されたソメイヨシノが原木で、これから接ぎ木や挿し木で殖やされたクローンであることが判明している³⁾。

サクラではその有効性のため、細胞生物学的な研究が数多く行われている。細胞分裂には体細胞分裂と減数分裂があるが、体細胞分裂の解析から、ソメイヨシノの染色体数は $2n=16$ であることが明らかにされている⁴⁾。また、ソメイヨシノ以外の200種余



図 1. 本研究で用いたソメイヨシノ. 2021 年 3 月 31 日に撮影したもの.

りのサクラの染色体数も調べられている⁵⁾。さらに、ソメイヨシノのゲノム DNA の塩基配列も解読されている⁶⁾。減数分裂は減数第一分裂前期、中期、後期、終期、減数第二分裂前期、中期、後期、終期、四分分子期に分けられ、さらに減数第一分裂前期は、細糸期、合糸期、太糸期、複糸期、移動期に分けられる。合糸期には相同染色体が対合し始め、太糸期には相同染色体がシナプトネマ複合体を介して全長にわたって対合するのが通常の 2 倍体で見られる現象である。ソメイヨシノではエドヒガンの染色体とオオシマザクラの染色体の、同祖関係にある染色体が対合することになる。これまでのところ、ソメイヨシノで減数分裂期の各ステージの染色体の様子が観察されたことはない。本研究では、ソメイヨシノの花粉母細胞における減数分裂期染色体の観察法を検討し、細胞壁を消化後に蛍光染色する方法で染色体の観察に成功したので、それについて報告する。

材料と方法

材料の調製

ソメイヨシノは神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの陸上競技場南東に植栽されたものを使用した(図 1)。2021 年 3 月 3 日、6 日、10 日、15 日、20 日に図 2A に示すような花枝(本研究では多くの花序をつけている短枝を花枝と呼ぶ)を切り取り、実験室に持ち帰った。花枝から通常、4、5 個付いている花序を切り離して、実体顕微鏡下で花序の先端から 3 分の 1 のところと 3 分の 2 のところで剃刀で輪切りにし、その中央部分からピンセットで花芽(蕾)を取り出した(図 3)。花芽をファーナー液(75%エタノール、25%酢酸)中に移し、室温で一晩固定した。その後はファーナー液中 -15℃で保存した。

染色体標本の作製

固定された花芽を超純水(Milli-Q 水)中に移し、15

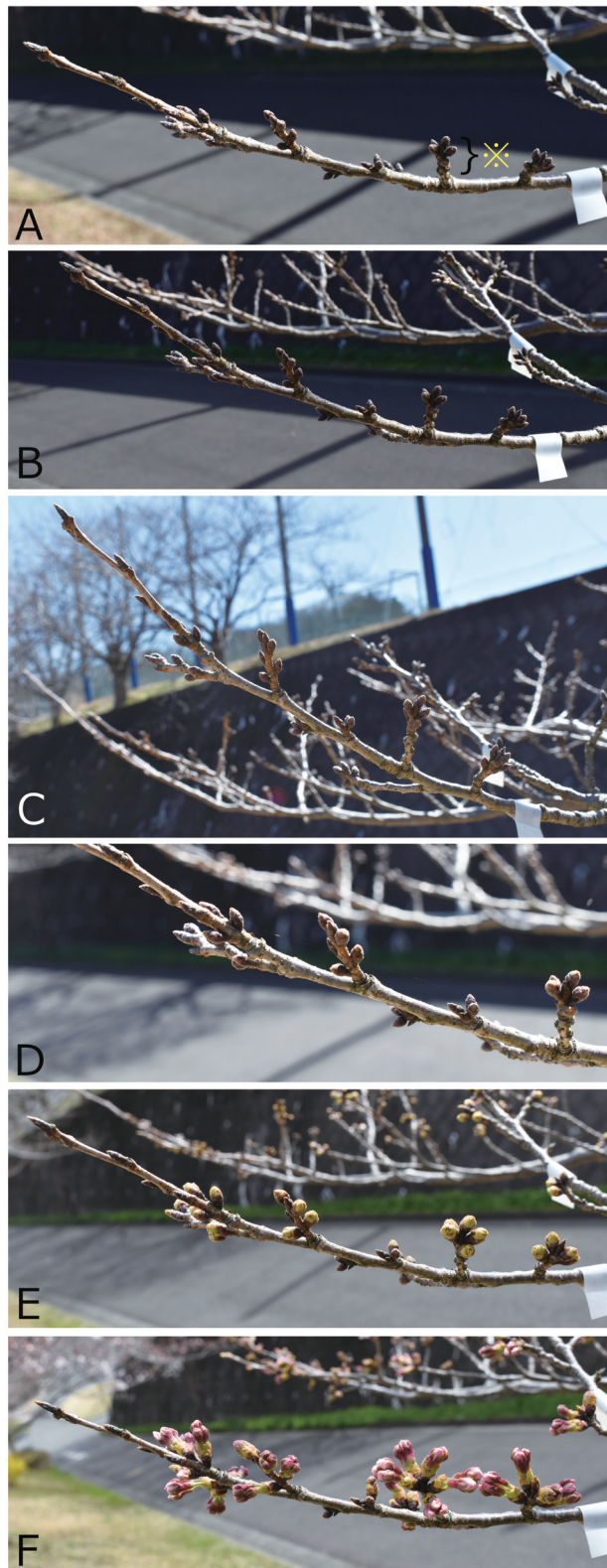


図 2. 図 1 とは別のソメイヨシノの花芽の開花までの様子. A. 2021 年 2 月 16 日. B. 2 月 25 日. C. 3 月 3 日. D. 3 月 10 日. E. 3 月 20 日. F. 3 月 26 日. ※のような花序をつけた花枝を切り取って実験に用いた.

分間静置して、固定液を洗浄した。もう一度、超純水で洗浄後、10 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)の溶液中に移し、15 分間静置した。もう一度、新たな

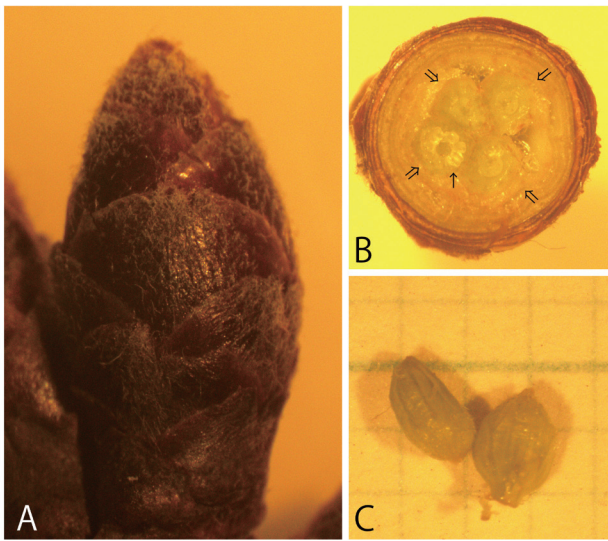


図3. 花芽の取り出し過程。A. 2021年3月3日に切りとった花枝の花序の1つ。B. 花序を中央付近で輪切りにしたもの。この花序には4つの花芽が含まれていた。4つの⇒は4つの花芽を指す。→は花芽の中の葯の一つを指している。C. 同じ花枝の別の花序から取り出した花芽。

クエン酸緩衝液に15分間静置した後、花芽を酵素液（0.4%セルラーゼ”onozuka”RS (YAKULT)、ペクトリアーゼ Y23 (協和化成)、サイトヘリカーゼ (Sigma)、800 u/mL β -グルクロニダーゼ (FUJIFILM)) 中に移した。15分間の脱気を2度行った後、37°Cに2時間静置した。この後、15分間の脱気と37°Cで2時間静置を2回繰り返した。酵素液をクエン酸緩衝液に置換し、15分間静置した。さらに新しいクエン酸緩衝液中に15分間静置したのち、もう一度新しいクエン酸緩衝液に置換し、冷蔵庫で保存した。

消化された花芽の1つをスライドガラス上の30 μ Lの60%酢酸中に移し、実体顕微鏡下で解体し、雄蕊をがく片、花弁、雌蕊から分離し、雄蕊以外の部分を60%酢酸ごと、キムワイプで拭き取った。20 μ Lの60%酢酸をもう一度滴下し、葯をつぶして花粉母細胞を放出させた。45°Cのホットプレート上に1分間保温した後、氷冷したファーマー液をスライドガラス上の試料を囲むように滴下して、細胞をスライドガラスに付着させ、ファーマー液をキムタオル上に捨てた後、スライドガラスをスライドガラス立てに立てかけて室温で風乾させた。7 μ Lの1.5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, VECTOR) を滴下し、カバーガラスをかけた後、蛍光顕微鏡（オリンパス BX60）を用いて観察した。デジタルカメラ（オリンパス DP80）で画像を取得し、Photoshop CC2018 (Adobe) で作図を行った。

結果

ソメイヨシノの減数分裂の時期

図1に示すソメイヨシノから2021年3月3日、6日、10日、15日、20日に花枝（図2A）を切り取って採集し、花芽（蕾）の固定を行った。2021年の場合、3月中旬まで花序は鱗片に包まれていたが（図2A-D）、3月20日ごろ花序が開き始め（図2E）、3月26日ごろ、それぞれの花序から多くの場合3つ、あるいは4つの花が展開し始めた（図2F）。それぞれの日に採集した花枝から花序（図3A）を切り離し、輪切りにして（図3B）、中から花芽を取り出した（図3C）。3月3日に採集したものでは、花芽の軸方向の大きさは1.2～1.8 mmで、平均1.49 mmであった。実体顕微鏡での観察では葯は未熟な状態であった。3月6日のものでは、花芽の大きさは1.8～2.5 mmで、平均2.00 mmであった。3月10日のものでは、花芽の大きさは2.0～2.5 mmで平均2.34 mmであった。3月15日の花芽は、花序を切断した時に花芽の一部を切ってしまっていたため、大きさの測定はできなかった。葯は黄色身を帯びており、すでに花粉ができていたことが予想された。

消化した細胞を観察すると、3月3日のものでは、減数分裂前間期の核（図4A, B）が非常に多く観察され、ごく一部に減数第一分裂（第一分裂）前期の細糸期、合糸期、太糸期、複糸期の染色体（図4C-J）が観察された。3月6日のものでは、減数分裂前間期の核も見られたが、第一分裂前期の細糸期、合糸期、太糸期、複糸期、移動期、第一分裂中期、後期、終期の染色体が多く観察された（図5A-E）。3月10日のものでは、減数分裂前間期の核はほとんど観察されなかった。稀に合糸期の染色体や花粉も観察されたが、第一分裂中期から減数第二分裂（第二分裂）終期の染色体が中心であった。3月15日のものでは、ごく稀に第一分裂後期や第二分裂前期の染色体も観察されたが、ほとんど全て花粉となっていた。

花粉母細胞の減数分裂期染色体

サクラは1つの花に30以上の雄蕊を有するためか、1つの蕾からの1枚のスライド標本をつくるが、ソメイヨシノの場合、1枚のスライド標本中に非常に多くの花粉母細胞とタペート細胞が観察された。そのため、おそらくサクラは全般に、花粉母細胞の減数分裂期染色体の観察は、時期さえ分かれば、比較的容易と言える。また、消化に関しては、もっと良い組合せがあるかも知れないが、今回用いた消化酵素の組合せで良好な結果が得られた。減数分裂前間期の花粉母細胞の核では、染色体は網目状に観

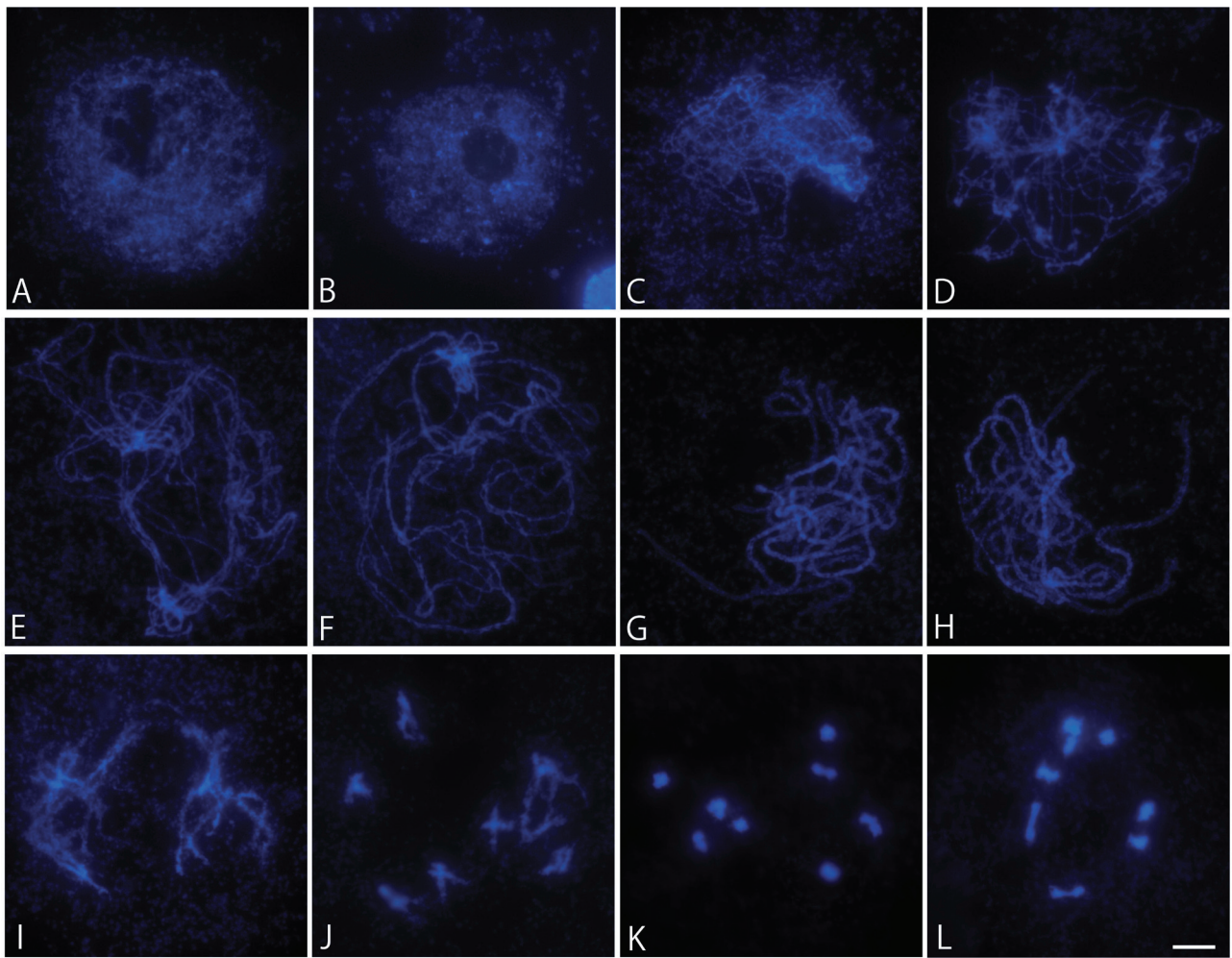


図4. 花粉母細胞の減数分裂前中期の核と減数第一分裂前期の染色体. A, B. 減数分裂前中期の核. C, D. 細糸期. E, F. 合糸期. G, H. 太糸期. I, J. 複糸期. K, L. 移動期. スケールバー, 5 μ m.

察された。通常1つの核に1つの核小体と思われる、染色体が存在しない領域が観察された（図4A, B）。花粉母細胞は花芽を構成する他の細胞と比べると大きな核を有しているが、ソメイヨシノの場合、花粉母細胞を取り囲むタペート細胞も大きな核を有しており、識別に注意が必要であった。図4C, Dのような細い糸状の染色体が観察されるものは細糸期と判断した。部分的に染色体が対合しているものは合糸期と判断した（図4E, F）。染色体の片方の末端からもう一方の末端まで全体で対合している染色体が見られるものは太糸期と判断した（図4G, H）。部分的に不對合を起こしているような領域は観察されなかった。対を成しながら凝縮している様子が観察されたものは複糸期と判断した（図4I, J）。8つの凝縮した二価染色体が分散して観察されるものを移動期と判断した（図4K, L）。8つの二価染色体が反対方向に引っ張られながら、ほぼ中央辺りに帯状に並んでいるものは第一分裂中期と判断した（図5A, B）。太糸期から第一分裂中期までの間に相同染色体が離れてしまう異常は観察されなかった。8つ

ずつの染色体が反対方向に分かれていく様子が観察されるものは第一分裂後期と判断した（図5C, D）。もっと多くの染色体が個別に凝縮したり、中央付近に並んだり、分離しているものは、それぞれ体細胞分裂の前期、中期、後期と判断した。8つずつの染色体が紡錘体の極付近に移動し終えたものは第一分裂終期と判断した（図5E）。1つの細胞内に2つの核あるいは染色体グループがあるものを第二分裂前期と判断した（図5F, G, H）。8つ染色体を含む2つの染色体グループが集合しているものを第二分裂中期と判断した（図5I, J）。それぞれの染色体グループで染色体が姉妹染色体に分離し、移動している途中のものを第二分裂後期と判断した（図5K, L）。細胞内の4カ所で、染色体が脱凝縮して核を形成しつつあるものを第二分裂終期と判断した（図5M）。他にも、1つの細胞壁の中に4つの花粉小胞子が含まれる四分子期のものや、その小胞子が放出されて花粉へと成熟段階にあるものなどが観察された。

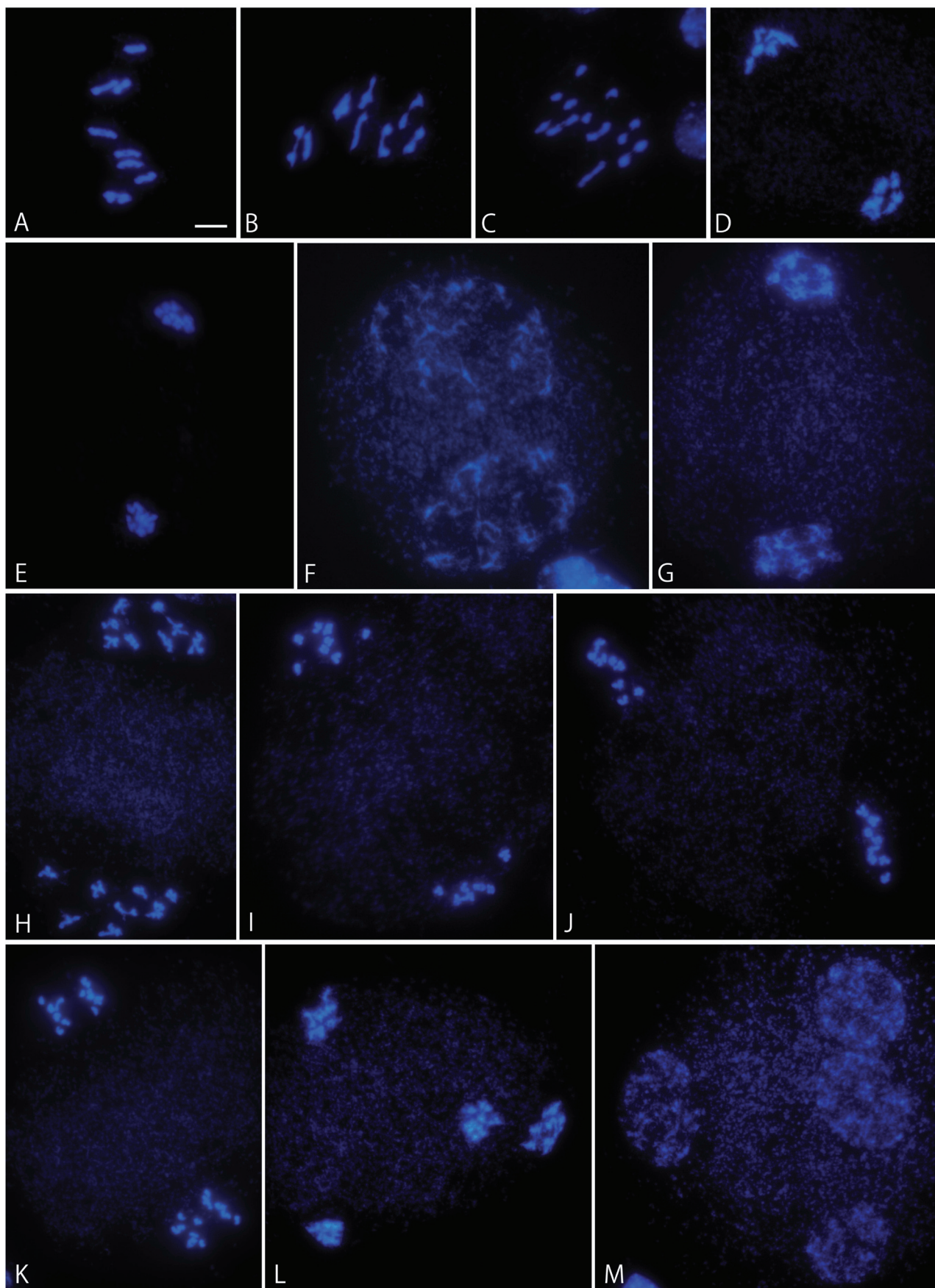


図 5. 花粉母細胞の減数第一分裂中期から減数第二分裂終期の花粉母細胞の染色体. A, B. 第一分裂中期. C, D. 第一分裂後期. E. 第一分裂終期. F, G, H. 第二分裂前期. I, J. 第二分裂中期. K. 第二分裂後期. L, M. 第二分裂終期. スケールバー, 5 μ m.

討論

試料採集日とその花芽で起きている減数分裂の時期をまとめると表1のようになった。3月3日に採集した花枝の花芽の葯では、減数分裂前間期の細胞が多くみられ、3月6日の花芽の葯では主に第一分裂期の花粉母細胞が見られた。3月10日のものでは第二分裂の細胞が多く、3月15日のものでは花粉ばかりが観察された。これらの観察から、2021年の神奈川県平塚市近辺のソメイヨシノでは3月6日から10日ぐらいの間に花粉母細胞の減数分裂が盛んに行われていたと考えられる。3月20日頃に開花していたので、開花の2週間以上前から減数分裂は開始しているものもあると思われる。さらなる検証が必要であるが、花粉母細胞の減数分裂を観察する場合は、開花予想日の2週間以上前から試料採集を始めることが必要と考えられる。天候などの関係で、開花予想日にずれが生じる可能性も考えられるので、ソメイヨシノの場合、3月1日ぐらいから3月15日ぐらいの間に、2日ないし3日おき程度で試料を採集すれば、減数分裂を詳しく観察できると予想される。

花芽の大きさと減数分裂のステージの関係では、花芽の大きさが1.4 mm以下では、ほとんどの花粉母細胞は減数分裂前間期であった。1.5～1.9 mmのものでは、減数分裂前間期のものから複糸期のものが主に観察された。2.0～2.5 mmのものでは太糸期から減数第二分裂終期までの様々なステージの染色体を観察することができた。1つの花芽由来のスライド標本で様々なステージの花粉母細胞が観察されたので、一つの花芽の中にある30以上の雄蕊の間では減数分裂の進み具合には差があるものと推測される。しかし、同じ雄蕊由来と思われる密集した花粉母細胞では同じステージのものが見られたので、葯内では同調性は高いと考えられる。

連鎖地図による解析からもっと複雑な過程をたどったのではないかという説もあるが⁷⁾、ソメイヨシノは約150年前に、母株エドヒガンと父株オオシマザクラの交雑種として誕生したとされる。その際に、エドヒガンのゲノムとオオシマザクラのゲノムが受精を通じて融合してソメイヨシノの細胞核が形成された。エドヒガンのゲノムとオオシマザクラのゲノムは約550万年前に種分化を起こしたことが示されており⁸⁾、ゲノムを構成するDNAの塩基配列は、550万年分の変異を蓄積していたはずである。交雑時、エドヒガンとオオシマザクラの対応する染色体同士は相同染色体ではなく、同祖染色体の関係にあったといえる。ソメイヨシノは誕生時に、これらの同祖関係の染色体を1つの核内に持ったわけであるが、それ以来ソメイヨシノは接ぎ木などの無性生殖で殖

表1. 各試料採集日の花芽の大きさと、その中で観察されるステージ

	花芽の大きさ		観察されるステージ	
	範囲	平均	範囲	多く見られるステージ
3月3日	1.2～1.8	1.49	減数分裂前間期～複糸期	減数分裂前間期
3月6日	1.8～2.5	2.00	減数分裂前間期～第一分裂終期	細糸期～太糸期
3月10日	2.0～2.5	2.34	合糸期～第二分裂終期	第一分裂中期～第二分裂終期

花芽の大きさの単位は範囲も平均も mm である。

やされてきたので、現存しているソメイヨシノの細胞は体細胞分裂のみ行っており、減数分裂は経験していない。6倍体コムギのように3つの同祖関係のゲノムが核内に存在する場合、減数分裂時に同祖染色体間では対合は起こらず、相同染色体間でのみ対合が起きる。同祖染色体間の対合を抑制する遺伝子も報告されており⁹⁾、異質倍数体では同祖染色体間対合を防ぐしくみがあるのかも知れない。本研究のソメイヨシノの減数分裂期染色体の観察では、対合に異常は見られなかったので、ソメイヨシノのようなサクラの雑種では同祖染色体の対合を排除するしくみは働いていないのかも知れない。ソメイヨシノでは少なくとも花粉母細胞での減数分裂は正常に進行し、形態的には問題のない花粉が形成されているようであった。胚嚢母細胞での減数分裂がどのように進行しているかは今回の研究では調べていない。約550万年の間、別々に進化した同祖染色体が、およそ150年前にソメイヨシノの細胞の中で同居することになりながら、それ以来、対合することのない体細胞分裂だけを経験していても、毎年、雄蕊の中で花粉母細胞が分化し減数分裂が起きた時、同祖関係にある染色体が正確に対合することは非常に興味深い。この対合のしやすさがサクラで雑種ができやすい理由の一つかも知れない。他のオオシマザクラとエドヒガンの交配種や、他のサクラの交配種についても減数分裂の様子を調べてみたい。

謝辞

本研究は、研究課題「高等植物の減数分裂期染色体の電子顕微鏡等を用いた形態解析」に対する2020年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS202005)を受けて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Katsuki T (2017) Taxonomy and identification by

- morphology for Japanese flowering cherries. *Tree and Forest Health* **21**: 93-104.
- 2) Katsuki T (2018) A New species, *Cerasus kumanoensis* from the Southern Kii Peninsula. Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* **69**: 119-133.
 - 3) Innan H, Terauchi R, Miyashita NT and Tsunewaki K (1995) DNA fingerprinting study on the intraspecific variation and the origin of *Prunus yedoensis* (Someiyoshino). *Jpn. J. Gene.* **70**: 185-196.
 - 4) Oginuma K and Tanaka R (1976) Karyomorphological studies on some cherry trees in Japan. *J. Jpn. Bot.* **51**: 104-109.
 - 5) Iwatsubo Y, Kawasaki T and Naruhashi N (2002) Chromosome numbers of 193 cultivated taxa of *Prunus* subg. *Cerasus* in Japan. *Journal of Phytogeography and Taxonomy* **50**: 21-34.
 - 6) Shirasawa K, Esumi T, Hirakawa H, Tanaka H, Itai A, Ghelfi A, Nagasaki H and Isobe S (2019) Phased genome sequence of an interspecific hybrid flowering cherry, 'Somei-Yoshino' (*Cerasus yedoensis*). *DNA Res.* **26**: 379-389.
 - 7) 鶴田燃海, 王 成, 加藤珠理, 向井 譲 (2017) 連鎖地図を利用した染色体ごとの解析による「染井吉野」の起源推定の試み. *日林誌* **99**: 210-214.
 - 8) Gill KS, Gill BS, Endo TR and Mukai Y (1993) Fine physical mapping of Ph1, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics* **134**: 1231-1236.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

アメリカネナシカズラ (*Cuscuta campestris*) 回旋転頭運動の 定量化解析

横山俊哉¹ 水本 侑¹ 浅岡真理子¹ 西谷和彦^{1,2}

Quantitative Analysis of the Circumnutation of *Cuscuta campestris*

Toshiya Yokoyama¹, Yu Mizumoto¹, Mariko Asaoka¹ and Kazuhiko Nishitani^{1,2}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: nishitani@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Autonomous helical movement of plant organs, originally termed circumnutation by Charles Darwin in the 19th century, is ubiquitously observed in land plants. In *Cuscuta campestris*, a stem parasitic plant whose stems coil around the host stem during parasitization, this movement plays a critical role in searching for a host. Although patterns of circumnutation have been extensively investigated in several species under different environmental conditions, such as variable light and temperature, and after chemical exposure, the mechanisms underpinning this movement remain largely unknown. This is partly due to the lack of suitable methods for acquiring high-resolution spatio-temporal images of plant organs during circumnutation. To address this issue, we designed a time-lapse image acquisition system with two video cameras: one positioned to capture images from above and the other to capture images from the side of the plant. Using this camera system, images of circumnutating *C. campestris* shoots were captured under different light conditions, and the effects of light quality on the winding angle and rotation rate of circumnutation were quantified. The results indicate the utility of this imaging system in evaluating the effects of light quality on circumnutation, and highlight the need for improvements in data resolution for 3D image analysis.

Keywords: circumnutation, *Cuscuta campestris*, growth movement, time-lapse video, parasitic plant

序論

回旋転頭運動は植物の茎や根などの各組織で見られる内在性成長運動である。被子植物が成長する過程で茎の先端が円を描くように「首を振る」現象が典型的な回旋転頭運動である。回旋転頭運動の研究は19世紀末に Charles Darwin により記載され¹⁾て以来、その周期や軌跡の形状、光や温度などの環境要因による影響などが、様々な側面から精力的に研究されてきた^{2,3)}。

回旋転頭運動は陸上植物では広くみられ、シロイヌナズナ、エンドウ、ヒマワリ、ネナシカズラ、コムギなど多くの植物で解析されている⁴⁾。つる性の植物や寄生植物では、回旋転頭運動により、支柱となる植物の探索や、宿主となる植物の探索に有効な

成長運動であると考えられている。一方、つる性でも寄生性でもない大多数の種子植物における回旋転頭運動の生物学的な意味については、現時点では明確ではない。

アメリカネナシカズラ *Cuscuta campestris* Yuncker はヒルガオ科の1年生植物で、他の被子植物の茎や葉に寄生して、宿主より水と栄養素などを吸収して生きる完全寄生植物である。アメリカネナシカズラは発芽すると茎を伸ばしながら回旋転頭運動を行い、宿主となる植物を探索する。茎が物体に接触すると、宿主になりうる植物か否かに関わらず巻き付く。巻きついた後の寄生過程の進行には接触刺激以外に光条件や宿主植物由来の因子が関係していることが分かっている⁵⁾。

宿主になることができる植物に巻き付いた時には、接触部分に吸器と呼ばれる分裂組織が発生する。吸器の先端に位置する探索糸と呼ばれる細胞は先端成長により急速に伸長し、宿主組織内に侵入し、宿主の維管束組織内に到達すると管状要素に分化し、最終的に宿主とアメリカネナシカズラの道管が接続し、寄生が成立する。

アメリカネナシカズラの寄生過程は、青色光により促進され、回旋転頭運動も光質により影響を受けることが報告されている⁶⁾。一方、回旋転頭運動そのものの解析法は、シロイヌナズナの芽生えを用いた方法が報告されている²⁾。しかし、高い分解能で定量的に解析する実験系は確立されていない。そのため、環境シグナルによる回旋転頭運動の変化を高い精度で定量的に評価した研究はほとんどない。

そこで本研究ではアメリカネナシカズラの寄生過程に至るまでの回旋転頭運動の解析法の確立を目指した。そのために、シロイヌナズナ芽生えの回旋転頭運動を解析した先行研究²⁾を参考にして、二台のタイムラプスカメラを用いて、アメリカネナシカズラ茎の回旋転頭運動を二次元的に定量化する実験系を開発した。この方法により、光質（青色光、赤色光、緑色光）を変えることにより、回旋転頭運動に対する光の影響を定量的に解析した。

材料と方法

実験植物

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0 の種子を MGRL 培地⁷⁾を加えたロックウール (Rockwool B.V., Grodan) に蒔き、22°C 連続白色光下 ($45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) で育成した。アメリカネナシカズラは本研究室で7回の自殖により順化させた種子を用いた。種子発芽を促進するために22°Cの濃硫酸に25分間浸した後、室温で多量の純水で5回濯ぎ、硫酸を除いた。硫酸処理をした種子は、深型シャーレ (滅菌シャーレ深型、IWAKI) 内で、3 mL の純水で湿らせたろ紙 (No.5A 90 mm, 東洋濾紙) 上に蒔き、連続白色光 22°C で育成した。

寄生誘導

発芽後5日齢、茎全長が5 cm 以上のアメリカネナシカズラ芽生えを選抜し、花茎が10 cm 以上に伸びた4~5週齢のシロイヌナズナの花茎にサージカルテープ (マイクロボア TM サージカルテープ 24, 3 M) で軽く接着させ、青色光下 (波長 444 nm、光量 $7 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、22°C で48時間静置し、寄生を誘導した。寄生を確認した後、連続白色光下 (光量 $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、22°C に移して育成し、成長した側枝

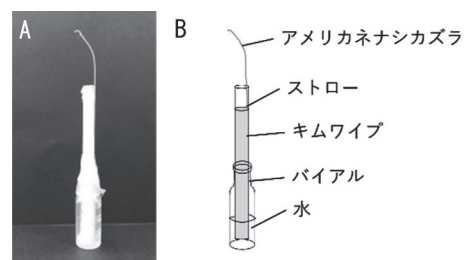


図1. 回旋転頭運動の撮影用バイアル装置. A. バイアル写真. B. バイアル模式図.

を実験に供した。

実験装置

水道水を1 mL 含む1.5 mL バイアル (screw top vial, La-Pha-Pack) にプラスチック性ストロー (長さ8 cm、直径6 mm) を差し、水で濡らしたキムワイプ (キムワイプ、日本製紙クレシア) を詰めて、ストローを固定した。アメリカネナシカズラの側枝を茎頂から3 cm 下の部位で切断し、頂端から2 cm の茎が突出するようにストローに固定した。ストロー開口部とストローとバイアルの境界面の隙間はパラフィルムを張り、水の蒸発を防ぐ工夫をして、回旋転頭運動の測定に供した (図1)。

アメリカネナシカズラ茎を固定したバイアルを人工気象器 (LH-80LED-DT、日本医科器械) 内のステージに載せて固定した。人工気象器の天井には、青、赤、緑の三色の異なる波長特性を持つLEDランプの照射を切り替えることができる照明装置を設置し、人工気象器の外部より光の波長と強度を制御した。人工気象器内の側方と真上にそれぞれ1台のカメラ (WG-6, RICOH) を設置し、インターバル撮影モードで、アメリカネナシカズラ茎を5分間隔で24時間に亘りタイムラプス撮影を行った。

各光条件下での回旋転頭運動の撮影

単色光条件はそれぞれ青色光 (波長 445 nm、光量 $8.61 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、赤色光 (波長 660 nm、光量 $8.59 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、微弱な緑色光 (波長 520 nm、光量 $0.21 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) の3条件に設定した。

光条件を切り替える実験では、それぞれの単色光の強度を変えず、青色光から赤色光、赤色光から青



図2. 回旋転頭運動の傾き角度 θ .

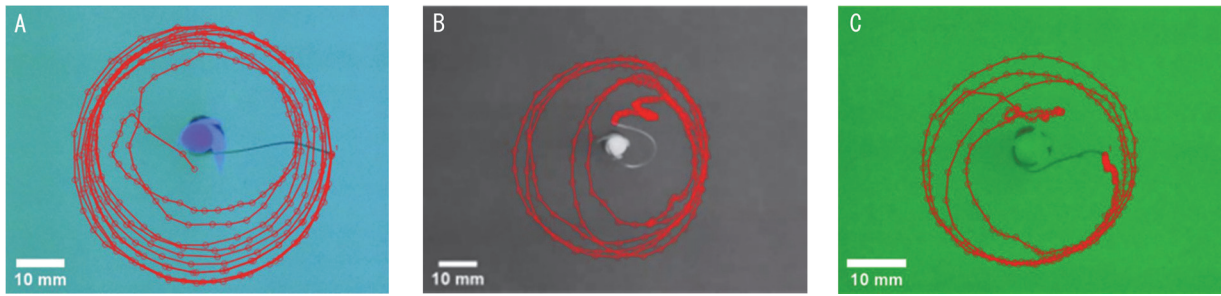


図 3. 各単色光条件下の回旋転頭運動の軌跡. A. 青色光条件. B. 赤色光条件. C. 緑色光条件.

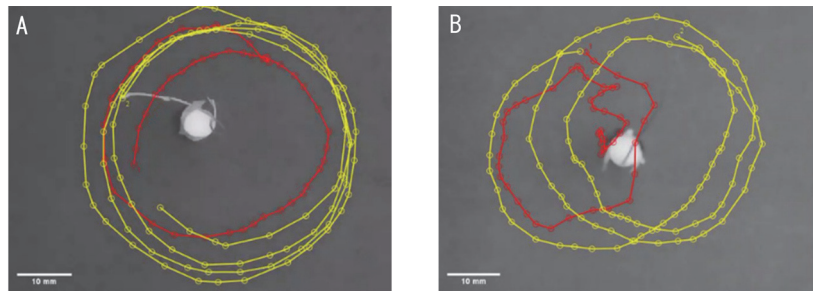


図 4. 光条件の切り替えに伴う回旋転頭運動の軌跡. A. 青色光条件から赤色光条件への切り替えた時の回旋転頭運動の軌跡. B. 赤色光条件から青色光条件への切り替えた時の回旋転頭運動の軌跡. 赤色の折れ線：切り替え前，黄色の折れ線：切り替え後.

色光に波長のみを切り替え、切り替える前の 4 時間、切り替えた後の 8 時間、合計 12 時間に亘り、5 分間隔でのタイムラプス撮影を行った。

画像解析

連続撮影後、画像データを画像処理ソフト ImageJ (NIH) により解析し、側方より撮影した画像スタックデータから回旋転頭の角度の計測が可能な画像を選び、頂端の接線と垂線のなす角 θ を傾き角度を計測した (図 2)。茎頂の回転角速度は上部より撮影した画像スタックデータを ImageJ で解析し、外部プラグインである MTrackJ (<https://imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>) を用いて、アメリカネナシカズラの茎頂の軌跡より回転角速度 rad/s を算出した。

統計処理

傾き角度、角速度のデータは表計算ソフト Excel を用いて計算し、平均と標準偏差で示した。単色光条件の各群について一元配置分散分析を行った。光条件を切り替えた時の実験データは、光条件切り替えの前後で対応のない t 検定を行った。すべての統計処理について有意水準を 5% 未満とした。

結果

単色光条件での回旋転頭運動

青色光、赤色光、緑色光、いずれの条件でもアメリ

カネナシカズラの 3 cm の茎切片で回旋転頭運動が観測された (図 3)。それぞれの条件下での傾き角度と角速度について計測結果を表 1 上部に示す。各単色条件間の傾き角度、角速度は一元配置分散分析で有意差が認められなかった (傾き角度 $P = 0.37$ 、角速度 $P = 0.20$)。

光条件の切り替えに伴う回旋転頭運動の変化

光条件を切り替える実験では、切り替え後に軌跡のゆがみが観察された (図 4)。傾き角度は、青色光が赤色光に比べ小さくなる傾向が観察されたが (表 1 下部)、有意な差は認められなかった ($P = 0.14$)。角速度についても光条件の切り替えによる有意な変

表 1. 回旋転頭運動の傾き角度と角速度. 上部. 単色光条件での傾き角度と角速度. 下部. 光条件を切り替えた時の傾き角度と角速度

単色光条件		
	傾き角度 deg	角速度 rad/s
青色光	105.36 ± 10.40	$6.97 \times 10^{-4} \pm 1.26 \times 10^{-4}$
赤色光	104.95 ± 10.95	$5.78 \times 10^{-4} \pm 0.49 \times 10^{-4}$
緑色光	116.69 ± 10.55	$5.14 \times 10^{-4} \pm 1.34 \times 10^{-4}$
$N = 3$		
光を切り替えた条件		
	傾き角度 deg	角速度 rad/s
青色光 (前)	105.30 ± 27.13	$5.52 \times 10^{-4} \pm 1.16 \times 10^{-4}$
赤色光 (後)	120.49 ± 5.97	$7.09 \times 10^{-4} \pm 0.90 \times 10^{-4}$
赤色光 (前)	111.63 ± 19.13	$5.98 \times 10^{-4} \pm 1.42 \times 10^{-4}$
青色光 (後)	88.75 ± 13.67	$6.02 \times 10^{-4} \pm 0.14 \times 10^{-4}$
$N = 3$		

化は認められなかった ($P=0.97$)。

討論

本研究では開発した実験系により、アメリカネナシカズラの茎の回旋転頭運動を上方、および側方からのタイムラプス撮影を行うことで、明瞭な回旋転頭運動の動画を得られた。回旋転頭運動を評価できる実験系は確立されておらず、新たな実験系として本実験系を提案したい。また、カメラの台数を追加することで、カメラの座標推定、画像計測の技術が適用可能になり、回旋転頭運動の三次元データが得られると期待される。三次元データを利用した回旋転頭運動の詳細な定量化は今後の研究課題である。また、本研究を進めるにあたって、アメリカネナシカズラの側枝の個体差が測定精度に大きく影響していることが明らかとなった。今後この実験系にて回旋転頭運動の解析をする際には芽生えを用いることにより、発生過程での個体差を少なくし、個体間のばらつきについての課題を解消したい。

回旋転頭運動の定量化にあたって、回旋転頭運動の傾き角度と角速度について定量化を行った。単色光条件下での回旋転頭運動の傾き角度と角速度については統計的差異が見られず、青色光では回旋転頭運動が強化されるとする先行研究⁸⁾とは異なる結果となった。これは先行研究が材料としてアメリカネナシカズラの芽生えを使用していたのに対し、本研究ではアメリカネナシカズラの側枝を使用していたことが原因である可能性が考えられる。もう一つの可能性として、傾き角度と角速度には光条件以外の別の要素が大きく影響している可能性が考えられる。三つ目の可能性として、今回用いた側方と上方からのタイムラプス撮影では捉えられない茎の成長運動が、光に依存して変化していることも考えられる。これら傾き角度、角速度以外の要素についてのより精度の高い定量化は今後三次元データの取得、計測

を行い多角的なデータを取得し、より分解能の高い時空間測定により可能になると考え、現在、分解能の高い時空間測定を進めているところである。

謝辞

本研究の一部は、研究課題「重イオンビーム商照射によるネナシカズラ変異体の作出と変異体を用いた寄生機構の解析」に対する 2020 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS2002008)、一部は JSPS/MEXT 科 研 費 JP17K19374, JP24114005, JP18H05489 の助成を受けて行われた。

文献

- 1) Darwin, C (1880) *The power of movement in plants*. John Murray, London, UK.
- 2) Schuster J and Engelmann W (1997) Circumnutations of *Arabidopsis thaliana* seedling. *Biol. Rhythm Res.* **28**: 422-440.
- 3) Millet B and Badot PM (1996) The revolving movement mechanism in *Phaseolus*: New approaches to old questions. In: *Vistas on Biorhythmicity*. Greppin H, Degli Agosti R, Bonzon M, eds, University of Geneva. pp. 77-98.
- 4) Maria Stolarz (2009) Circumnutation as a visible plant action and reaction. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 380-387
- 5) Tada Y, Sugai M and Furuhashi K (1996) Haustoria of *Cuscuta japonica*, a holoparasitic flowering plant, are induced by cooperative effect of far-red light and tactile stimuli. *Plant Cell Physiol.* **37**: 1049-1053.
- 6) Furuhashi T, Furuhashi K and Weckwerth W (2011) The parasitic mechanism of the holostemparasitic plant *Cuscuta*. *J. plant Interact.* **6**: 207-219
- 7) Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M and Komeda Y (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic arabidopsis. *Plant Physiol.* **97**: 1414-21.
- 8) Lane HC and Kasperbauer MJ (1965) Photomorphogenic responses of dodder seedlings. *Plant Physiol.* **40**: 109-116.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

DNA メタバーコーディング解析で推定されたニホンジカの 採食植物：神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの例

岩崎貴也^{1,2,3,7} 奥田真未² 安藤温子⁴ 松尾 歩⁵ 陶山佳久⁵ 中濱直之⁶
泉 進^{1,2}

Foraging Plants of Japanese Deer Estimated by DNA Metabarcoding
Analysis: Examples from the Shonan Hiratsuka Campus
of Kanagawa University

Takaya Iwasaki^{1,2,3,7}, Mami Okuda², Haruko Ando⁴, Ayumi Matsuo⁵,
Yoshihisa Suyama⁵, Naoyuki Nakahama⁶ and Susumu Izumi^{1,2}

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Natural Science Division, Faculty of Core Research, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

⁴ Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba City, Ibaraki 305-8506, Japan

⁵ Kawatabi Field Science Center, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Osaki City, Miyagi 989-6711, Japan

⁶ Institute of Natural and Environmental Sciences, University of Hyogo, Sanda City, Hyogo 669-1546, Japan

⁷ To whom correspondence should be addressed. E-mail: iwasaki.takaya@ocha.ac.jp

Abstract: Vegetation damage caused by the rapid increase of Japanese sika deer (*Cervus nippon*) has become a major problem in many areas of Japan. Deer have preferences for plant species, which change according to the region, season, and surrounding vegetation. Therefore, to clarify the impact of deer on local vegetation, it is important to understand the overall trend in other areas and then further investigate the behavior and feeding habits of deer in those areas. The Shonan Hiratsuka Campus of Kanagawa University is a place with a high plant diversity where the pre-construction satoyama environment still remains. However, deer have begun to invade this area. In this study, we used DNA metabarcoding technology on deer feces to identify the foraging plants of deer in this area with two cpDNA regions (*rbcL* and *trnL*). In total, OTUs identified as Fagaceae, Asteraceae, Poaceae, and Oxalidaceae were detected with many sequence reads. These groups contain many species that are considered to be deer-preferred plants, which is consistent with the results of this study. In addition, the species that we could identify such as *Impatiens textorii*, *Persicaria thunbergi*, *Pueraria lobata*, and *Carex japonica*, were also known to be deer-preferred plants. While spring sample included a variety of families such as Poaceae, Rosaceae, and Urticaceae, half of the reads from the early summer sample were identified as Asteraceae, and half of the reads from the autumn sample were Fagaceae, showing seasonal differences. This result suggests that deer may use new buds and new leaves in spring, flowers in early summer, and nuts and litter in autumn as a guide when selecting plants to feed on.

Keywords: sika deer, DNA metabarcoding, foraging plants, *rbcL*, *trnL*

序論

近年、ニホンジカ *Cervus nippon* (以下、シカ) の個体数が急増し、その過度な採食による植生被害が日本各地で報告されている¹⁾。過去 20 年間でシカの分布範囲は 70% 近く拡大したとされており、多種多様な植物を摂食し、かつ群れで行動する²⁾。そのため、天然林や人工林、高山植物、湿原といった様々な植生に大きな影響を与えている³⁾。一般に、植物には、シカに嗜好されやすい種 (嗜好性植物) から、ほとんど採食の対象にならない種 (不嗜好性植物) が存在することが知られている³⁻⁵⁾。全国の文献をまとめた研究では、キク科やバラ科、イネ科などにシカの嗜好性植物が多く含まれている一方で、同じくキク科、そしてサトイモ科、シソ科に不嗜好性植物が多く含まれていたことが報告されている⁶⁾。一方で、北日本では笹やイネ科などを採食する grazer で、南西日本では常緑樹の葉や果実を採食する browser といったように、大きな地域差が存在することも指摘されている⁷⁾。また、嗜好性植物として報告される場合と不嗜好性植物として報告される場合の両方が混在する植物種が少なからずみられること⁷⁾も、シカの嗜好性には大きな地域差が存在することを示唆している。また、群馬県赤城山では、春から秋にかけて草本類とグラミノイドを、秋から春にかけてはグラミノイドと広葉樹の枯葉、堅果類、液果類を多く利用しており、こうした食性の季節変化は各地でも同様に報告されている⁸⁻¹¹⁾。さらに、過度の採食圧によって変化した植生に応じて、嗜好性の高い植物から低い植物へと食性を柔軟に変化させることも知られている^{12, 13)}。したがってシカの食性は一概にはまとめることは困難である。対象地域の植生に対するシカの影響を明らかにするためには、他地域での全体的な傾向を把握した上で、さらにその場所でのシカの行動や食性を個別に調べることも重要であると思われる。

神奈川県平塚市土屋にある神奈川大学湘南ひらつかキャンパスは、キャンパスの外縁部の多くが建設前から維持された雑木林になっており、周辺の森林とも繋がった自然豊かな里山環境が現在も残されている。キャンパス建設前の 1986 年に行われた環境影響予測評価ではシカの生息は確認されていなかったが¹⁴⁾、2019 年のカメラトラップ法による調査により、キャンパス内へシカがしばしば侵入してきていることが報告されている¹⁵⁾。カメラトラップでの撮影頻度から推測したところ、シカの侵入は比較的低頻度とされ、キャンパス内において明らかな植生被害はまだ観察されていない¹⁵⁾。一般的に、これまでにシカの食性を調べた多くの研究は、高密度にシカが生

息している場所や、シカによる植生被害が深刻化しつつある場所で行われていることが多い。したがって、このようなシカの侵入初期段階にある場所で、どのような植物が採食されているかという情報は、シカ個体群の増加に伴う植生変化の経過を調べていくための重要な基礎情報となることが考えられる。

近年、自然界で動物が何を食べているかを調べる方法として、その糞の中に残る餌の DNA を抽出し、その餌 DNA の塩基配列情報から種を同定する糞の DNA メタバーコーディングと呼ばれる手法が広く用いられるようになってきている¹⁶⁻¹⁸⁾。シカについても既にいくつかの研究が行われており、その有用性が確かめられている^{11, 19)}。メタバーコーディング解析は比較的容易に植物種の同定まで行うことができるため、今後、様々な地域で研究例が蓄積していくと期待される。

そこで本研究では、シカによる植生被害がまだ深刻化していない神奈川大学湘南ひらつかキャンパスを対象に、メタバーコーディング解析によってシカの採食植物を明らかにし、この場所におけるシカの植物嗜好性を明らかにする。また、シカの糞をすり潰した後の実験手法についての検討も行い、今後の解析のためのより良い手法を確立する。

材料と方法

シカ糞の採集

2019 年 4 月 15 日、6 月 26 日、10 月 9 日に、神奈川大学湘南ひらつかキャンパス内の東の湿地近くにある乾いた草地で、各日にそれぞれ 1 つの新鮮な糞塊 (Sample-0415, Sample-0626, Sample-1009) から、各 10 粒のシカ糞を採集した。調査は早朝から朝のうちにやり、採集したシカ糞はできるだけ速やかに -30℃ の冷凍庫で冷凍保存した。採取時に用いるピンセットは、事前に滅菌しておいた上で、さらにエタノールによる消毒と、ライターによる火炎滅菌を頻繁に行い、外来 DNA の混入が最小限になるように注意した。

シカ糞からの植物 DNA 抽出

-30℃ で冷凍保存していたシカ糞を取り出し、液体窒素で凍結状態を維持しながら、滅菌したメスを用いて表面を削ぎ取った。これは、野外で採集前に糞が触れていた土や植物からのコンタミネーションを防ぐためである。その上で、糞の中心部だけを 10 粒分集め、継続して液体窒素で凍結状態を維持しながら、すり鉢の中で完全な粉状になるまで乳棒ですり潰した。粉状になった糞塊から薬さじ 1 杯分を 2.0 ml チューブに移し、再度、-30℃ で保存した。その際に

は、すり潰した糞塊の中のばらつきを評価するため、Sample-0415 と Sample-0626 については 3 サンプル (rep-1、rep-2、rep3)、Sample-1009 については 2 サンプル (rep-1、rep-2) のチューブを独立に用意し、糞塊段階での反復とした。

DNA 抽出は、冷凍しておいた粉碎済みの糞入りのチューブに、滅菌済みの 4 mm のステンレスビーズを 1 つ追加した上で、ビーズ破砕機 μ T-12 (TAITEC 社) を用いて完全に粉々になるまで粉碎した。その後、DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN 社) を用い、キット標準のプロトコルに従って DNA を抽出した。得られた DNA 溶液は、次の実験に用いるまで -30°C 冷凍庫で保存した。

メタバーコーディング解析

シカ糞中の植物 DNA は、シカ体内の消化酵素などによって断片化されていることが考えられる。そこで我々は、断片化された植物 DNA からの PCR 増幅の成功率を高めるため、比較的短い領域をバーコーディング領域として用いることにした。植物 DNA バーコーディングでよく用いられる *rbcL* 遺伝子と、短い領域の中に多くの変異がみられることが知られている *trnL* (UAA) intron の P6loop 領域では、それぞれ 263 bp、10–143 bp の比較的短い断片を増幅するためのプライマーが既に開発されている^{20, 21)}。本研究では、ゲノムワイドな塩基多型情報の解析のために考案された MIG-seq 法²²⁾の 2nd PCR 用プライマーを活用することを前提として 1st PCR 用プライマーを設計した。具体的には、先行研究のプライマーの 5' 末端側に、MIG-seq 法と共通の配列を付加したものを 1st PCR 増幅に用いた (表 1)。最初の 1st PCR の条件は、プライマーが本研究用のセットであること以外は、基本的に MIG-seq²²⁾のものと同じだが、アニーリング温度は 55°C に、サイクル数は 33 に変更した。*rbcL* 領域と *trnL* 領域の増幅は別々に行い、PCR 後にはアガロースゲル電気泳動を行うことで増幅を確認した。また、PCR 増幅によるバイアスを評価するため、それぞれの DNA サンプルについて、同じ DNA からの独立した 1st PCR を 3 回行い、それぞれを混ぜずにそのまま 2nd PCR 以降の

操作を行った。1st PCR 後には、Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter Life Sciences) を用いて、PCR 産物の濃度の標準化と短い断片の除去を行った。2nd PCR 以降の操作は、MIG-seq²²⁾と同じ方法で行った。ラン前には、ライブラリの DNA 濃度測定を行い、同じランの中で DNA 濃度ができるだけ均一になるように調整した。作製した *rbcL* 領域のライブラリは MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 Cycle) を、*trnL* 領域のライブラリは MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 Cycle) を用い、それぞれ MiSeq (illumina) の Paired-end ラン 1 回で、フォワードとリバースでオーバーラップするように塩基配列データを得た。

データ解析

得られた塩基配列データは、それぞれの領域データについて、ソフトウェア Claident ver.0.2.2019.05.10 (<https://www.claident.org/>) を用いて、タグ配列によるサンプルごとのデータ振り分け、フォワード配列とリバース配列の連結、低品質配列の除去 (minqual = 30)、キメラ配列の除去 (*trnL* ではエラー回避のために実施せず)、類似性の高い配列のクラスタリング (類似度 97% 基準) による OTU (Operation Taxonomic Unit) への分類など、種同定の前の処理を行った。また、Sample-0415 の rep2、Sample-0626 の rep2 と rep3 については、PCR 反復 3 回のうちの 1 回で十分なデータが得られなかったために、2 回分のデータのみで解析を行った。最終的に反復を含めて 21 サンプルを解析に用い、得られた OTU の中で、リード数が全 21 サンプルの合計で 30 に満たないもの、1 サンプルでしか検出されないものについては、コンタミネーションや増幅エラーの可能性が高いと判断し、その後の解析から除外した。

得られた OTU 配列については、Claident に実装されている Lowest common ancestor (LCA) algothm^{23, 24)}を用いて、植物種を同定した。この際、植物の科レベルで同定できなかった OTU については、コンタミネーションや増幅エラーの可能性が高いと判断し、その後の解析から除外した。最終的に、*rbcL* と *trnL*

表 1. 本研究で用いた *rbcL* および *trnL* (UAA) intron 領域の情報

領域	プライマー配列 ¹⁾	長さ (bp)	Original information
<i>rbcL</i>	Fw: 5'-CGCTCTTCCGATCTCTG(N*)TATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCC-3'	263	<i>rbcL</i> -F3 ²⁰⁾
	Rv: 5'-TGCTCTTCCGATCTGAC(N*)GATTCGCAGATCCTCCAGACGTAGAGC-3'		<i>rbcL</i> -R3 ²⁰⁾
<i>trnL</i> (UAA) intron	Fw: 5'-CGCTCTTCCGATCTCTG(N*)GGGCAATCCTGAGCCAA-3'	10–143	<i>trnL</i> -g ²¹⁾
	Rv: 5'-TGCTCTTCCGATCTGAC(N*)CCATTGAGTCTCTGCACCTATC-3'		<i>trnL</i> -h ²¹⁾

¹⁾ (N*)部分は、増幅したい領域とのミスマッチを防ぐために、Nを0~3個付加した。5'末端から(N*)までの間は、2nd PCR以降にアダプターを結合させるための共通配列。

それぞれの結果について、種・属・科レベルで同定できた OTU を、得られたリード数とともに集計した。その際、同じ DNA から独立に 1st PCR を行った反復については、得られた結果がほぼ同じであったため、集計時に糞塊の反復 (rep-1、rep-2、rep-3) のレベルまでデータをまとめた。種まで同定できた場合の学名は、Y-List (<http://ylist.info>) に従った。また、それぞれの領域について、OTU を科レベルでまとめた集計も行った。

結果

rbcL 領域を用いた採食植物の推定結果

rbcL 領域を用いた解析の結果、合計 161,007 リードのデータに基づき、全部で 33 の OTU が検出された (表 2)。最もリード数が多かったのはブナ科と同定された OTU (29,773 リード、全体の 18.5%) で、次

いでキク科 OTU (27,684 リード、17.2%)、セリ科のオキシボリス属 OTU (18,651 リード、11.6.2%)、タデ科のスイバ属 OTU (17,156 リード、10.7%)、イネ科 OTU (12,756 リード、7.9%)、イラクサ科 (11,912 リード、7.4%)、カタバミ科 (10,229 リード、6.4%) タデ科イヌタデ属のミゾソバ *Persicaria thunbergii* (Siebold et Zucc.) H.Gross (9,438 リード、5.9%) の順で多かった。種まで同定できたのはミゾソバ、クワ科クワクサ属のクワクサ *Fatoua villosa* (Thunb.) Nakai、ツリフネソウ科ツリフネソウ属のツリフネソウ *Impatiens textorii* Miq. の 3 種のみであったが、33 の OTU のうちの 16 で、属以上のレベルまで同定することができた。

糞塊からの反復では、低頻度の OTU の一部では反復間で食い違いがみられたが、比較的高頻度の OTU ではほとんど同じ結果が得られた。

表 2. *rbcL* 領域の塩基配列情報から推定されたニホンジカの採食植物リスト

<i>rbcL</i> ID	Species	和名 ¹	Total reads	Number of reads							
				Sample-0415			Sample-0626			Sample-1009	
				Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2
1	Fagaceae sp.1	ブナ科 sp.1	29773			5	5635	2641	2878	9757	8857
2	Asteraceae sp.1	キク科 sp.1	27684	325	287	527					
3	<i>Oxypholis</i> sp.1	オキシボリス属 sp.1 (セリ科)	18651	5348	4852	8441				9	1
4	<i>Rumex</i> sp.1	スイバ属 sp.1 (タデ科)	17156	5083	4287	7783	2		1		
5	Poaceae sp.1	イネ科 sp.1	12756	3813	2516	6379		48			
6	Urticaceae sp.1	イラクサ科 sp.1	11912	3396	3033	3314				910	1259
7	Oxalidaceae sp.1	カタバミ科 sp.1	10299				3671	1344	4412	653	219
8	<i>Persicaria thunbergii</i> (Siebold et Zucc.) H.Gross	ミゾソバ (タデ科イヌタデ属)	9438							4330	5108
9	Rosaceae sp.1	バラ科 sp.1	4566	2322	1129	1103				12	
10	Fabaceae sp.1	マメ科 sp.1	2874				1408	416	794	256	
11	<i>Fatoua villosa</i> (Thunb.) Nakai	クワクサ (クワ科クワクサ属)	2338							1098	1240
12	Euphorbiaceae sp.1	トウダイグサ科 sp.1	2254				724	318	1164	48	
13	<i>Potentilla</i> sp.1	キジムシロ属 sp.1 (バラ科)	1955	510	476	969					
14	<i>Vicia</i> sp.1	ソラマメ属 sp.1 (マメ科)	1387	504	233	650					
15	<i>Impatiens textorii</i> Miq.	ツリフネソウ (ツリフネソウ科ツリフネソウ属)	1202							876	326
16	<i>Lotus</i> sp.1	ミヤコグサ属 sp.1 (マメ科)	976	6			349		193		428
17	Asparagaceae sp.1	キジカクシ科 sp.1	765	4	5		229	316	178	33	
18	Poaceae sp.2	イネ科 sp.2	605	91	90	38	118	76	192		
19	<i>Eurya</i> sp.1	ヒサカキ属 sp.1 (サカキ科)	590							175	415
20	<i>Veronica</i> sp.1	クワガタソウ属 sp.1 (オオバコ科)	548	193	145	210					
21	Lardizabalaceae sp.1	アケビ科 sp.1	494	115	152	227					
22	<i>Toxicodendron</i> sp.1	ウルシ属 sp.1 (ウルシ科)	492							177	315
23	Fabaceae sp.2	マメ科 sp.2	427				60		367		
24	Arecaceae sp.1	ヤシ科 sp.1	385	133	133	119					
25	<i>Cornus</i> sp.1	ミズキ属 sp.1 (ミズキ科)	311	3	1	1	85	7	62	23	129
26	<i>Aucuba</i> sp.1	アオキ属 sp.1 (アオキ科)	286	13	6	43		83		141	
27	Sapindaceae sp.1	ムクロジ科 sp.1	229	4		7	94			124	
28	Amaranthaceae sp.1	ヒユ科 sp.1	147				109	14		24	
29	<i>Plantago</i> sp.1	オオバコ属 sp.1 (オオバコ科)	131			9	122				
30	<i>Stachyurus</i> sp.1	キブシ属 sp.1 (キブシ科)	130					5	53	72	
31	Vitaceae sp.1	ブドウ科 sp.1	102		1					101	
32	Smilacaceae sp.1	シオデ科 sp.1	83		3		80				
33	<i>Cardamine</i> sp.1	タネツケバナ属 sp.1 (アブラナ科)	61	17	20	24					

¹ 属あるいは種のレベルまで同定できた場合は、括弧内に科や属の情報を記した。

科ごとに OTU を集計した結果、全体ではブナ科 (18.5%)、キク科 (17.2%)、タデ科 (16.5%)、イネ科 (8.3%)、イラクサ科 (7.4%) の割合が高かった (図 1)。Sample-0415 では、セリ科 (27.0%)、タデ科 (24.8%)、イネ科 (18.7%)、イラクサ科 (14.1%)、バラ科 (9.4%) の割合が高かった。Sample-0626 ではキク科 (48.4%) が半分近くを占めており、ブナ科 (20.4%)、カタバミ科 (17.2%)、マメ科 (6.5%) などの割合も比較的高かった (図 1)。Sample-1009 では、ブナ科 (50.2%) が半分以上を占めており、残りの更に半分がタデ科 (25.4%) で、クワ科 (6.3%) やイラクサ科 (5.8%) など比較的多かった (図 1)。

trnL 領域を用いた採食植物の推定結果

rbcL 領域を用いた解析では、合計 11,147 リードのデータに基づき、全部で 30 の OTU が検出された

(表 3)。最もリード数が多かったのはキク科と同定された OTU (2,370 リード、全体の 21.3%) で、次いでカタバミ科のカタバミ属 OTU (1,333 リード、12.0%)、ブナ科 sp.1 (1,291 リード、11.6%)、ブナ科 sp.2 (890 リード、8.0%)、イラクサ科 OTU (743 リード、6.7%)、ブナ科 sp.3 (563 リード、5.1%) の順で多かった。種まで同定できたのはマメ科クズ属のクズ *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi、カヤツリグサ科スゲ属のヒゴクサ *Carex japonica* Thunb. の 2 種のみであった。30 の OTU のうち、6 のみで、属以上のレベルまでの同定を行うことができた。

糞塊からの反復では、低頻度の OTU の一部では反復間で食い違いがみられたが、比較的高頻度の OTU ではほとんど同じ結果が得られた。

科ごとに OTU を集計したところ、全体ではブナ科 (24.6%)、キク科 (24.5%)、カタバミ科 (12.4%)

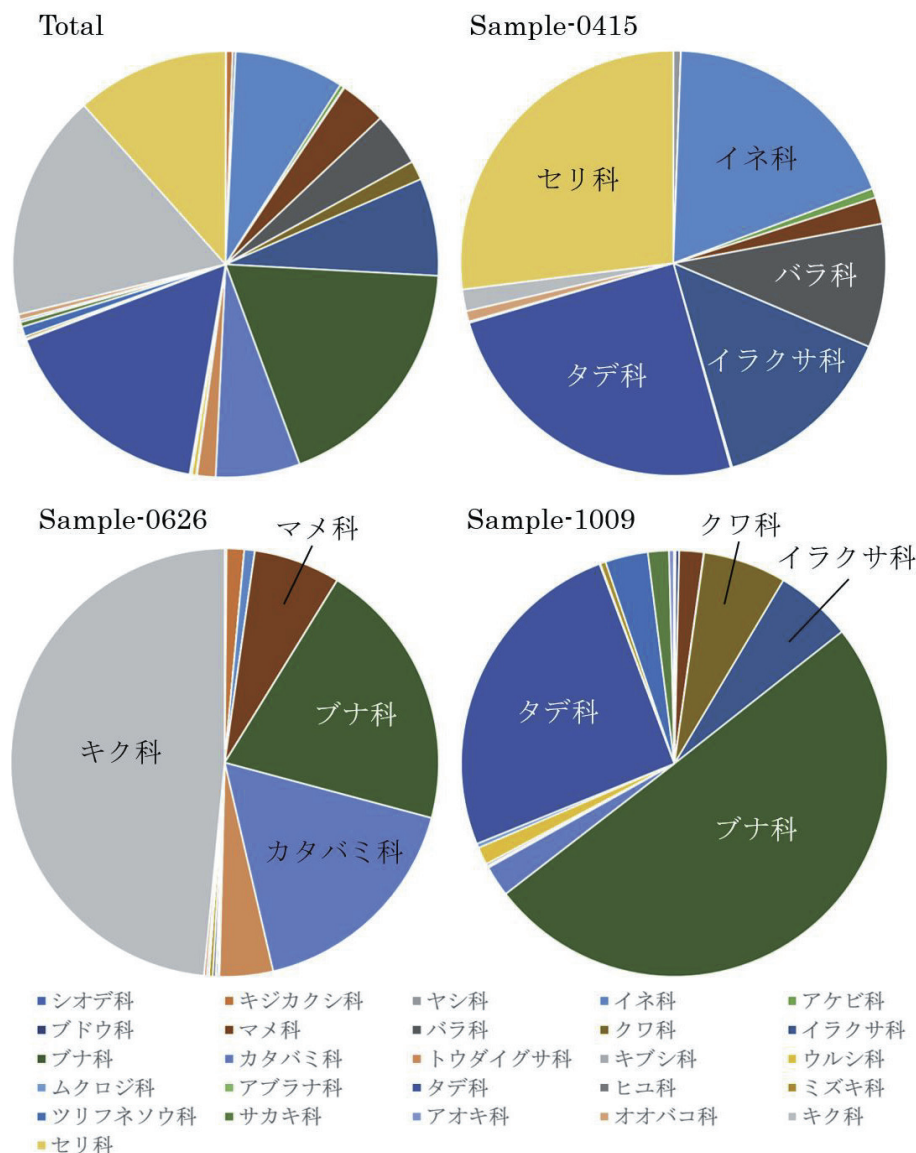


図 1. *rbcL* 領域を用いて推定されたシカ採食植物について科ごとに集計したリードの割合。

の3科の割合が特に高く、残りはかなりばらけた構成となっていた(図2)。Sample-0415では、イラクサ科(32.6%)、イネ科(22.4%)、カヤツリグサ科(21.9%)、バラ科(14.3%)の割合が高かった。Sample-0626ではキク科(50.3%)が半分以上を占めていたが、カタバミ科(25.1%)、ブナ科(11.5%)、マメ科(10.0%)の割合も比較的高かった(図2)。Sample-1009では、ブナ科(59.0%)が半分以上を占め、残りの中ではツリフネソウ科(10.7%)、バラ科(7.9%)、クワ科(6.6%)、マメ科(6.0%)、イラクサ科(5.4%)が比較的高頻度であった(図2)

討論

シカの採食植物

本研究で得られた *rbcL* と *trnL* の2領域による採食

植物の同定結果は、一部の植物グループで違いがみられたものの、全体としてはよく似た傾向を示した。全体として、採食植物はどちらもブナ科、キク科、イネ科、カタバミ科などが多かった。また、バラ科やマメ科も比較的高い割合であった。イネ科やキク科、バラ科には、嗜好性植物とされる種が多く含まれていることが知られており⁶⁾、今回の結果はこれまでの知見とも一致する。ブナ科についても、秋にシカガリターや堅果をよく利用することが報告されており^{25, 26)}、本研究対象のキャンパス内にもブナ科樹木が多く生育していることから、妥当な結果であると思われる。カタバミ科についても、少ない数ではあるが、嗜好性植物としての報告があり⁶⁾、本研究の結果と矛盾はみられない。

種まで同定できたツリフネソウ、ミゾソバ、クズ、

表 3. *trnL* (UAA) intron 領域の塩基配列情報から推定されたニホンジカの採食植物リスト

<i>trnL</i> ID	Species	和名 ¹	Total reads	Number of reads							
				Sample-0415			Sample-0626			Sample-1009	
				Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2	Rep-3	Rep-1	Rep-2
1	Asteraceae sp.1	キク科 sp.1	2370				910	834	626		
2	<i>Oxalis</i> sp.1	カタバミ属 sp.1 (カタバミ科)	1333				430	547	290	56	10
3	Fagaceae sp.1	ブナ科 sp.1	1291				255	230	111	346	349
4	Fagaceae sp.2	ブナ科 sp.2	890			1				476	413
5	Urticaceae sp.1	イラクサ科 sp.1	743	325	187	230				1	
6	Fagaceae sp.3	ブナ科 sp.3	563				4	2	2	294	261
7	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	クズ (マメ科クズ属)	531				211	153	158	4	5
8	<i>Carex japonica</i> Thunb.	ヒゴクサ (カヤツリグサ科スゲ属)	498	180	154	164					
9	<i>Impatiens</i> sp.1	ツリフネソウ属 sp.1 (ツリフネソウ科)	388							216	172
10	Poaceae sp.1	イネ科 sp.1	379	122	84	138	5	14	16		
11	Rosaceae sp.1	バラ科 sp.1	331	11	8	5	7		14	163	123
12	Asteraceae sp.2	キク科 sp.2	315	12	12	15	97	95	75	2	7
13	Urticaceae sp.2	イラクサ科 sp.2	193							109	84
14	Moraceae sp.1	クワ科 sp.1	189							115	74
15	Rosaceae sp.2	バラ科 sp.2	133	61	29	43					
16	Caryophyllaceae sp.1	ナデシコ科 sp.1	117	50	35	32					
17	Fabaceae sp.1	マメ科 sp.1	116							53	63
18	Rosaceae sp.3	バラ科 sp.3	108	57	23	28					
19	Poaceae sp.2	イネ科 sp.2	106	51	12	27	3	5	8		
20	Poaceae sp.3	イネ科 sp.3	71	22	15	34					
21	Rosaceae sp.4	バラ科 sp.4	60	20	13	27					
22	Poaceae sp.4	イネ科 sp.4	58				26	13	16	1	2
23	Fabaceae sp.2	マメ科 sp.2	55							27	28
24	Moraceae sp.2	クワ科 sp.2	52							28	24
25	<i>Oxalis</i> sp.2	カタバミ属 sp.2 (カタバミ科)	49				15	19	13	2	
26	<i>Stachyurus</i> sp.1	キブシ属 sp.1 (キブシ科)	46							25	21
27	Asteraceae sp.3	キク科 sp.3	44	16	15	12		1			
28	Poaceae sp.5	イネ科 sp.5	44	1	1	4	13	18	7		
29	Fabaceae sp.3	マメ科 sp.3	38							23	15
30	Vitaceae sp.1	ブドウ科 sp.1	36		1	1	1			15	18

¹ 属あるいは種のレベルまで同定できた場合は、括弧内に科や属の情報を記した。

ヒゴクサ、キブシ（バーコーディングではキブシ属とまでしか同定できていないが、分布状況からこの種と推測できる）についても、既に複数の研究でシカの嗜好性植物であることが示唆されているものであった⁶⁾。特にツリフネソウは、キャンパス内で限られた湿地にしか生育しておらず、侵入してくるシカの個体数が急増した場合には、すぐに消失してしまう可能性があるため、注意が必要である。クワクサについては、これまでに採食植物としての報告がされておらず、新規の発見であると思われる。

一方、タデ科やセリ科などの一部の科は *rbcL* 領域だけで、カヤツリグサ科とナデシコ科は *trnL* 領域だけで検出された。また、*rbcL* 領域の方が、属や種などの深い階層まで同定しやすい傾向がみられた。これらの原因としては、参考にしたデータベースへの

登録状況が領域によって異なることが影響した可能性が考えられる。対象地域の全植物について、DNAメタバーコーディングで使用する領域を事前にシーケンスし、ローカルなデータベースを作成すれば、種同定の精度は大きく向上することが期待される¹⁸⁾。また、今回用いた *trnL* 領域は、分類群によって断片長が大きく異なることが知られており、それによってPCR時の増幅効率にばらつきが生じた可能性も考えられる。これらの結果は、1領域だけを用いて解析を行うと、一部の植物グループについては過小評価してしまう可能性があることを示唆している。自身が研究対象とする場所や目的に合わせて、慎重に使用領域を選択する、あるいは今回のように複数の領域を同時に使用していく必要があると思われる。

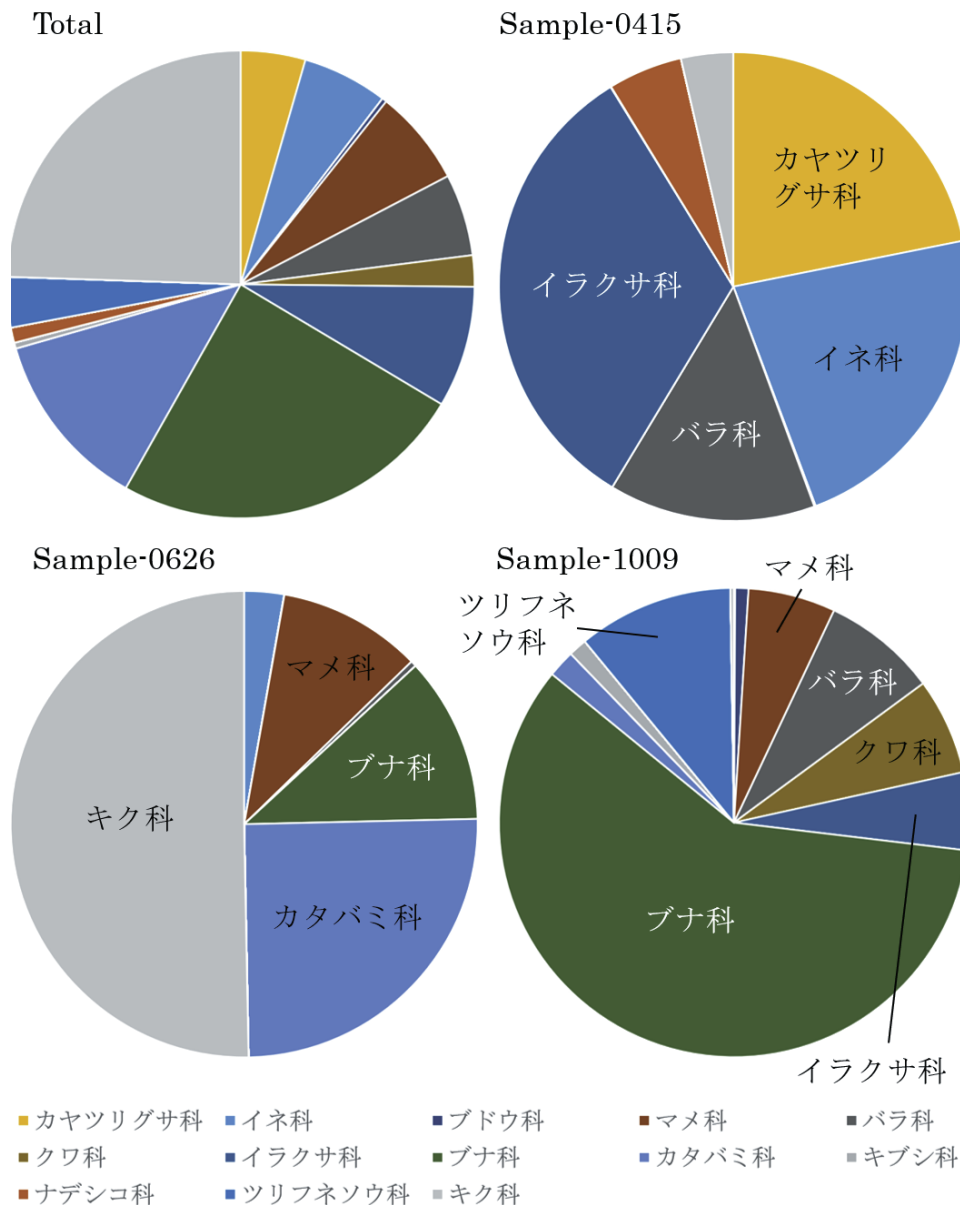


図 2. *trnL* 領域を用いて推定されたシカ採食植物について科ごとに集計したリードの割合。

シカの嗜好性の季節変化

本研究は各季節1サンプルしか糞塊を解析していないため、厳密には季節変化を見ているのか、単に糞塊間のばらつきを見ているだけなのかを判断できない。しかし、本研究結果とキャンパスの植生情報からは、次のようなシカの嗜好性の季節変化を予測することができる。春(4月)にシカは、イネ科やバラ科、イラクサ科、タデ科、セリ科、カヤツリグサ科などの多様な植物をバランスよく食べている。新葉や新芽が出て、おそらくシカにとって食べやすい状態ではあるものの、量自体が少ないために様々なグループの植物を食べていると考えられる。初夏(6月)の前後には、キク科やカタバミ科の花が多数咲くため、その花を目安に食べている可能性がある。秋(10月)には、キャンパス内のブナ科(コナラ、クヌギなど)が落葉してリターとなるほか、堅果も多数落とすため、主にブナ科に栄養を依存する。また、湿地のツリフネソウもキャンパス周辺ではちょうど花期であり、主に花を目安に食べていると思われる。これらは全てまだ予測に過ぎず、今後、サンプル数や調査時期を増やして検証する必要があるだろう。

手法の検討と今後について

本研究のDNAメタバーコーディング解析で用いた糞塊反復、PCR反復は、両方でかなり高い再現性を示した。反復無しで解析した場合、一部の低頻度OTUはばらついてしまう可能性があるが、主要な高頻度OTUの変化は完全に追うことができると考えられる。従って、特に高頻度のもので地域間や季節間での違いや傾向を見るのであれば、実験上の反復を増やすよりも、シカの糞塊自体の採集数を増やした方が得られる情報は大きくなる可能性が高いと思われる。

謝辞

本研究は、研究課題「ニホンジカの植物への嗜好性の季節変化と植物フェノロジーとの関係」に対する2020年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS202006)の支援を受けて行われました。ここに深く謝意を表します。

シカ糞の採取時には、神奈川大学の志村映実氏にサポートをして頂きました。また、シカ糞からのDNA抽出時には、同じく神奈川大学の海老澤梓氏に多くのサポートをして頂きました。これらの方々にも心より感謝申し上げます。

文献

- 1) 植生学会企画委員会 (2011) ニホンジカによる日本の植生への影響—シカ影響アンケート調査 (2009～2019) 結果—。 *植生情報* **15**: 9-30.
- 2) Takatsuki S (2009) Effects of sika deer on vegetation in Japan: a review. *Biol. Conserv.* **142**: 1922-1929.
- 3) 高槻成紀 (1989) 植物および群落に及ぼすシカの影響. *日本生態学会誌* **39**: 67-80.
- 4) 辻野 亮, 松井 淳, 丑丸敦史, 瀬尾明弘, 川瀬大樹, 内橋尚妙, 鈴木健司, 高橋淳子, 湯本貴和, 竹門康弘 (2007) 深泥池湿原へのニホンジカの侵入と植生に対する採食圧. *保全生態学研究* **12**: 20-27.
- 5) 阪口翔太, 藤木大介, 井上みずき, 山崎理正, 福島慶太郎, 高柳敦 (2012) 日本海側冷温帯性針広混交林におけるニホンジカの植物嗜好性. *森林研究* **78**: 71-80.
- 6) 橋本佳延, 藤木大介 (2014). 日本におけるニホンジカの採食植物・不嗜好性植物リスト. *人と自然* **25**: 133-160.
- 7) Takatsuki S (2009) Geographical variations in food habits of sika deer: the northern grazer vs. the southern browser. In: *Sika Deer: Biology and Management of Native and Introduced Populations*. McCullough D R, Takatsuki S and Kaji K, eds., Springer, Japan. pp. 231-237.
- 8) 丸山直樹, 遠竹行俊, 片井信之 (1975) 表日光に生息するシカの食性の季節性. *哺乳動物学雑誌* **6**: 163-73.
- 9) 姉崎智子 (2015) 群馬県赤城山におけるニホンジカの食性の季節変化. *群馬県立自然史博物館研究報告* **19**: 5-9.
- 10) 姉崎智子 (2017) 群馬県片品村におけるニホンジカの食性変化. *群馬県立自然史博物館研究報告* **21**: 101-04.
- 11) Nakahama N, Furuta T, Ando H, Setsuko S, Takayanagi A and Isagi Y (2021) DNA metabarcoding revealed that sika deer foraging strategies vary with season in a forest with degraded understory vegetation. *Forest Ecol. Manag.* **484**: 118637.
- 12) 藤木大介 (2017) 兵庫県におけるニホンジカの嗜好性植物・不嗜好性植物リスト. *兵庫 ワイルドライフモノグラフ* **9**: 118-34.
- 13) 高槻成紀, 梶谷敏夫 (2019) 丹沢山地のシカの食性—長期的に強い採食圧を受けた生息地の事例—. *保全生態学研究* **24**: 1-12.
- 14) 神奈川大学 (1987) *神奈川大学湘南平塚キャンパス建設計画環境影響予測評価書*. 神奈川大学, 神奈川.
- 15) 岩崎貴也, 奥田真未, 渡部凌我, 斎藤昌幸, 土田彩加, 志村映実, 泉 進 (2021) カメラトラップで確認された神奈川大学湘南ひらつかキャンパスにおける哺乳類相とキャンパス建設前後の変化. *神奈川自然誌資料* **42**: 71-75.
- 16) Ando H, Setsuko S, Horikoshi K, Suzuki H, Umehara S, Inoue-Murayama M and Isagi Y (2013) Diet analysis by next-generation sequencing indicates the frequent consumption of introduced plants by the critically endangered red-headed wood pigeon (*Columba janthina nitens*) in oceanic island habitats. *Ecol. Evol.* **3**: 4057-4069.
- 17) 安藤温子, 小村健人, 向井喜果, 安藤正規, 井鷲裕司 (2020) 趣旨説明: DNAメタバーコーディングによる野生動物の食性解析手法. *日本生態学会誌* **70**: 71-75.
- 18) 安藤温子, 安藤正規, 井鷲裕司 (2020) 植物食性動物

- を対象とした食性解析手法. *日本生態学会誌* **70**: 77-89.
- 19) Nakahara F, Ando H, Ito H, Murakami A, Morimoto N, Yamasaki M, Takayanagi A and Isagi Y (2015) The applicability of DNA barcoding for dietary analysis of sika deer. *DNA Barcodes* **3**: 200-206.
 - 20) 松木吏弓, 阿部聖哉, 竹内 亨, 梨本 真, 島野光司, 矢竹一穂 (2004) ノウサギ糞からの DNA 解析による餌植物同定. *DNA 多型* **12**: 20-26.
 - 21) Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Brochmann C and Willerslev E (2007) Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* **35**: e14.
 - 22) Suyama Y and Matsuki Y (2015) MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Sci. Rep.* **5**:16963.
 - 23) Huson D H, Auch A F, Qi J and Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.* **17**: 377-386.
 - 24) Tanabe AS and Toju H (2013) Two New computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLoS ONE* **8**: e76910.
 - 25) Miyaki M and Kaji K (2004) Summer forage biomass and the importance of litterfall for a high-density sika deer population. *Ecol. Res.* **19**: 405-409.
 - 26) 岡崎重史, 辻野 亮 (2017) 奈良公園におけるニホンジカの空間分布の季節変動. *奈良教育大学自然環境教育センター紀要* **18**: 45-54.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 8 河川水への災害的降雨の影響と海水濃度に対する河川水流入の影響

石渡大策² 青柳佑希² 鈴木祥弘^{1,3} 金澤謙一^{1,3} 西本右子^{1,2,4}

Long-Term Monitoring of Environmental Change
in Sagami Bay Estuary 8
-Impact of Heavy Rainfall on River Water
and River Water Inflow on Seawater-

Daisaku Ishiwata², Yuki Aoyanagi², Yoshihiro Suzuki^{1,3},
Ken'ichi Kanazawa^{1,3} and Yuko Nishimoto^{1,2,4}

¹ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka city, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka city, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka city, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: y24moto@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The element concentrations of three rivers flowing into Sagami Bay were compared. In all three rivers measured, the element concentration remained high for more than half month due to the direct impact of a large typhoon. The effect of river water inflow on the seawater concentration was observed up to about 500 m from the estuary, and after that, the element concentration was mostly constant.

Keywords: river water, sea water, elemental analysis, impact of disaster rainfall

序論

著者らが継続して測定を行っている相模湾の平塚市周辺の海域で採取した海水及び相模湾への流入河川である金目川の河川水を使用した結果を報告した¹⁾。相模湾河口域の海水では、冬期に流入した河川水の影響で、表層に塩濃度の低下が観測されている^{2,3)}。またこれまで継続して測定してきた相模湾流入河川である相模川及び金目川（花水川）の河川水を同日にサンプリングし、両河川水の分析結果の差異を検討した。その結果上流から下流にいくに従って各元素濃度が増加する傾向は共通するが全体的に金目川の方が元素濃度が高いことがわかった⁴⁾。また近年の大型台風の直撃が相模湾の平塚市周辺海域や相模湾への流入河川に大きな影響を与えていると考えられた。今年度は相模湾流入河川の影響が海域に与える影響に加えて、台風の影響に注目した。対象河川は早川、金目川、相模川である。

材料と方法

河川水及び海水試料の採取

河川水の試料は、金目川（上流：秦野市内、国道 246 号線との交差点付近、中流：平塚市内土屋橋付近、下流：平塚市内花水橋付近）及び早川（上流：箱根町強羅、宮城野駐在所近く、中流（須雲川）：箱根町湯本、箱根湯本駅近く、下流：小田原市早川、早川橋下）で採取しているが、2019 年度は台風の影響により例年と同じ地点での 12 月の早川中流・下流サンプリングを実施できなかったため、中流では数百 m 下流に地点を移動し、下流でのサンプリングは断念した。早川中流には早川に流入する排水口があり、水量も多い。今回は併せて排水口からも採水した。

海水試料の採取

海水試料は、相模川河口周辺において沖より南 5 km の地点までサンプリングした。各地点は相模川河口から南方に 100 m (N-1), 200 m (N-2), 500 m (N-3), 1

km (A-1), 2 km (S-1), 3 km (S-2), 5 km (S-3) である。さらに河口から 1 km の地点では東方向に 1 km (E-1), 2 km (E-2), 3 km (E-3), 及び西方向に 1 km (W-1), 2 km (W-2), 3 km (W-3) でもサンプリングした。この地域は沿岸より 1 km を超えると急に深くなる地域である。採取時の水温はいずれも 15~17°C、pH は 8.4 付近であった。

採水した試料を、No.1 及び No.5C のろ紙 (Advantec) でろ過後シリンジフィルター (Minisart RC15, Sartorius) でろ過した。測定には ICP-AES (日立ハイテクサイエンス SPS3500) を使用し、キャリアガス : 0.35 L/min、プラズマガス : 14.0 L/min、補助ガス : 0.40 L/min (いずれも Ar)、吸い込み量 : 1.70~1.90 mL/min の条件で測定した。

結果と討論

表 1~3 に各河川の定量分析結果を示した。全ての河川において多くの元素濃度が、春季から夏季にかけ低くなり、秋季にかけ高くなった。2017, 2018 年度と同様の傾向であるが、秋季の増加傾向は例年に比較して大きく、この時期に直撃した 2 つの台風の影響が考えられた。表 4 に 9 月 5 日に南鳥島付近で発生し、9 日 3 時前に三浦半島付近を通過後東京湾を北上し、千葉市に上陸後茨城沖に抜けた台風 15 号の位置、中心気圧、最大風速、表 5 には 10 月 6 日に南鳥島近海で発生し、12 日 19 時前に伊豆半島に上陸後、関東地方を北上、福島沖に抜けた台風 19 号の位置、中心気圧、最大風速を示した。台風 15 号

はコンパクトな台風であったが高波浪による被害が大きかったとの報告がある⁶⁾。9 月 25 日の測定値はいずれの河川においてもほとんどの元素で高い値を示し、12 月 4 日には例年の値に戻っていることがわかる。このことから河川水の水質に対する台風の影響は少なくとも半月程度は持続することがわかった。

表 6 には相模湾河口付近の海水の測定結果を示した。河口から離れるに従って各元素濃度は高い値となり、500 m を超えるとほぼ一定の値を示すことがわかった。この傾向は同年 2 月にサンプリングした際とほぼ同様の傾向であった。また河口から 1 km 地点での東西方向では、目立った際はないが、西側 3 km の地点で若干低濃度である以外はほぼ一定濃度であった。11 月 20 日のサンプリングにおいては西側 2 km の地点で若干低濃度となっており、相模湾河口西側 2~3 km 付近に元素濃度が低い地域があるとも考えられた。今後さらなる検討を考えている。海水では表層と水深 3 m の差異は少ないと考えられた。

以上より、相模湾流入河川においては、大型台風による元素濃度の変化が少なくとも半月程度はみられることがわかった。相模川河口付近では、河口から 500 m 程度までは河川の流入の影響で海水の元素濃度が低くなるが、1 km 以上ではほぼ一定となることが明らかとなった。

謝辞

本研究は、2020 年度度神奈川大学総合理学研究所共

表 1. 金目川の定量分析結果

date	point	Ca	Na	Si	Mg	K	Sr	B	Fe	Mn	Cd	Zn
2019 4/4	上流	21.49	12.12	14.14	7.86	1.64	0.07	0.02	—	—	—	—
	中流	23.86	21.51	13.17	8.09	4.91	0.07	0.03	0.01	—	—	0.01
	下流	27.37	25.17	12.81	9.52	5.36	0.08	0.03	0.05	0.02	—	0.01
2019 5/28	上流	15.71	8.35	11.18	5.60	1.34	0.07	0.02	—	—	—	—
	中流	21.62	16.59	12.40	7.05	3.72	0.08	0.02	—	—	—	0.01
	下流	20.46	15.17	10.89	6.80	3.59	0.09	0.02	0.05	—	—	0.01
2019 7/11	上流	17.40	8.60	11.95	6.04	1.52	0.06	0.01	0.01	—	—	—
	中流	21.23	16.95	12.49	6.90	3.46	0.07	0.02	0.01	—	—	0.01
	下流	21.35	14.96	9.87	7.06	3.54	0.08	0.02	0.11	0.01	—	—
2019 8/15	上流	18.20	10.26	14.46	7.43	2.50	0.06	0.02	—	—	—	—
	中流	20.74	13.46	12.70	6.94	3.03	0.07	0.02	0.01	—	—	0.01
	下流	18.13	12.82	9.15	6.08	3.23	0.07	0.02	0.04	—	—	—
2019 9/25	上流	24.86	9.50	17.19	6.50	1.30	0.06	0.02	—	—	—	—
	中流	21.04	17.05	17.53	7.18	3.62	0.07	0.02	—	—	—	0.01
	下流	24.54	16.94	17.74	7.65	3.58	0.08	0.03	0.05	—	—	—
2019 12/4	上流	19.91	9.02	11.87	6.56	1.83	0.06	0.01	0.01	—	—	—
	中流	21.37	14.64	12.49	7.29	3.45	0.07	0.02	0.01	—	—	0.01
	下流	27.56	17.69	13.80	9.05	3.92	0.09	0.02	0.05	0.02	—	—

数値の単位 : mg/L.

表 2. 相模川の定量分析結果

date	point	Ca	Na	Si	Mg	K	Sr	B	Fe	Mn	Cd	Zn
2019 4/4	上流	14.49	9.76	9.56	4.73	2.30	0.05	0.01	—	—	—	—
	中流	12.42	9.33	9.03	5.44	1.73	0.05	0.01	—	—	—	—
	下流	144	2685	7.71	338	157	3.73	0.95	—	0.05	—	0.02
2019 5/28	上流	13.00	5.54	6.88	3.35	1.20	0.06	0.01	0.02	—	—	—
	中流	17.31	9.02	10.29	7.18	1.57	0.07	0.02	—	—	—	—
	下流	30.32	429	10.54	32.0	43.5	0.39	0.19	0.01	—	—	0.04
2019 7/11	上流	9.45	5.96	8.84	3.25	1.55	0.05	0.01	0.05	—	—	—
	中流	9.94	6.00	8.75	3.48	1.43	0.05	0.01	0.04	—	—	—
	下流	10.67	21.61	8.91	4.60	2.78	0.05	0.02	0.05	—	—	—
2019 8/15	上流	9.85	5.83	9.08	3.43	1.37	0.04	0.01	0.01	—	—	—
	中流	10.78	6.11	9.31	3.58	1.58	0.05	0.01	0.01	—	—	—
	下流	15.83	91.7	10.29	13.8	9.72	0.10	0.06	0.01	—	—	0.01
2019 9/25	上流	10.20	6.75	14.80	3.94	1.57	0.05	0.01	0.02	—	—	—
	中流	15.23	7.38	15.23	4.72	1.58	0.05	0.01	0.01	—	—	—
	下流	25.56	157.6	15.74	21.2	14.3	0.15	0.09	0.01	—	—	0.01
2019 12/4	上流	12.31	6.41	9.54	4.16	1.73	0.05	0.01	0.02	—	—	—
	中流	11.31	6.70	9.12	4.05	1.76	0.05	0.01	0.03	—	—	—
	下流	15.81	31.4	9.54	6.75	3.36	0.06	0.02	0.04	0.01	—	—

数値の単位：mg/L.

表 3. 早川の定量分析結果

date	point	Ca	Na	Si	Mg	K	Sr	B	Fe	Mn	Cd	Zn
2019 4/4	上流	29.38	20.38	24.72	12.19	3.45	0.13	0.11	0.10	0.03	—	—
	中流	20.96	37.76	22.02	5.98	4.18	0.09	0.47	0.03	—	—	—
	下流	19.16	29.09	21.39	6.07	3.94	0.08	0.35	0.02	—	—	—
2019 5/28	上流	32.46	16.38	21.65	9.83	3.12	0.10	0.11	0.07	—	—	—
	中流	17.62	28.63	18.86	4.35	3.19	0.09	0.31	0.02	—	—	0.01
	下流	15.84	24.49	19.44	4.91	3.28	0.09	0.26	0.02	—	—	—
2019 7/11	上流	32.55	16.93	23.18	10.83	3.15	0.13	0.11	0.06	0.10	—	—
	中流	12.50	20.85	18.25	3.68	2.64	0.06	0.21	0.05	0.01	—	—
	下流	16.20	18.91	18.71	4.66	3.04	0.07	0.21	0.11	0.01	—	—
2019 9/25	上流	30.14	16.40	27.54	10.5	3.09	0.11	0.20	0.07	0.06	—	—
	中流	17.61	22.73	24.57	4.67	2.91	0.07	0.34	0.10	0.01	—	—
	下流	19.05	19.65	24.48	5.12	3.08	0.07	0.29	0.08	0.01	—	—
2019 12/4	上流	32.00	15.73	21.67	10.18	3.14	0.13	0.11	0.05	0.06	—	—
	中流 A	18.84	18.24	18.75	5.07	2.95	0.09	0.19	0.06	0.02	—	—
	中流 B	73.15	157.2	18.80	3.52	10.49	0.51	2.33	0.02	0.02	—	—
	下流											

中流 A：例年のサンプリング地点より約 500 m 下流.

中流 B：早川へ流入する排水口より採水.

数値の単位：mg/L.

表 4. 台風 15 号の位置，中心気圧，最大風速⁵⁾

日時	緯度	経度	中心気圧(hPa)	最大風速(m/s)
9 月 8 日 3 時	30.2	140.5	955	45
9 時	31.5	139.5	955	45
15 時	33.0	139.0	955	45
21 時	34.1	139.0	955	45
9 月 9 日 3 時	35.3	139.7	960	40
9 時	36.4	140.9	970	40
15 時	37.4	142.4	980	35
21 時	38.3	144.3	985	30

*：平塚市の緯度：35.335，経度：139.35

表 5. 台風 19 号の位置, 中心気圧, 最大風速⁵⁾

日時	緯度	経度	中心気圧(hPa)	最大風速(m/s)
10 月 11 日 15 時	28.8	137.5	935	45
21 時	29.9	137.1	945	45
10 月 12 日 3 時	30.8	137.1	945	45
9 時	32.0	137.4	945	45
15 時	33.7	138.2	950	40
21 時	35.6	139.6	965	35
10 月 13 日 3 時	38.2	141.8	975	30
9 時	39.5	143.5	975	30

表 6. 2019 年 12 月 19 日 (N-1 ~ S-3), 12 月 20 日 (E-1 ~ W-3) 相模湾海水の定量結果

point distance*	depth (m)	Na ($\times 10^3$)	Mg ($\times 10^2$)	Ca ($\times 10^2$)	K ($\times 10^3$)	Sr	B	Maximum depth (m)
N-1 100 m, 0	0	9.29	10.81	3.51	0.53	7.47	4.42	6
	3	9.27	10.99	3.64	0.54	7.48	4.16	
N-2 200 m, 0	0	8.98	10.58	3.39	0.51	7.33	3.98	4
	3	9.72	11.18	3.61	0.55	7.65	4.26	
N-3 500 m, 0	0	10.51	12.06	3.97	0.61	8.21	4.57	13
	3	10.37	11.83	3.91	0.61	8.07	4.40	
A-1 1 km, 0	0	10.51	11.96	3.91	0.60	8.12	4.63	38
	3	10.66	12.04	4.05	0.60	8.15	4.60	
S-1 2 km, 0	0	10.36	12.01	3.81	0.61	8.17	4.43	231
	3	10.51	12.00	3.94	0.62	8.12	4.51	
S-2 3 km, 0	0	10.59	12.07	3.81	0.60	8.26	4.60	376
	3	10.83	12.18	3.94	0.62	8.28	4.59	
S-3 5 km, 0	0	10.35	11.95	3.75	0.61	8.09	4.46	617
	3	10.75	12.13	3.97	0.62	8.29	4.64	
E-1 1 km, 1 km	0	10.38	12.03	3.75	0.62	8.47	4.35	32
	3	10.68	12.06	3.76	0.60	8.50	4.43	
E-2 1 km, 2 km	0	10.79	11.92	3.72	0.62	8.36	4.34	20
	3	10.48	11.97	3.76	0.58	8.36	4.28	
E-3 1 km, 3 km	0	10.49	11.95	3.74	0.62	8.41	4.31	18
	3	10.37	12.02	3.81	0.60	8.36	4.25	
W-1 1 km, -1 km	0	10.55	12.11	3.79	0.63	8.42	4.34	30
	3	10.23	11.83	3.74	0.59	8.37	4.19	
W-2 1 km, -2 km	0	10.15	11.66	3.70	0.59	8.25	4.32	30
	3	10.48	11.96	3.85	0.62	8.37	4.30	
W-3 1 km, -3 km	0	9.97	11.66	3.73	0.57	8.15	4.12	25
	3	10.57	12.00	3.74	0.62	8.40	4.29	

* 岸からの距離: 南方 Am, 東方 Bm で記載.

数値の単位: mg/L.

同研究助成 (RIIS202004) を受けて行った。ここに謝意を表します。

文献

- 1) 平賀義路, 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2011) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.*, **23**: 59-66.
- 2) 野木大輔, 平賀義路, 金澤謙一, 西本右子, 武井尊也, 鈴木祥弘 (2015) 相模川河口域プランクトン生物量の周年変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.*, **26**: 91-96.
- 3) 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2016) 相模川河口域海水及び流入河川水の元素濃度. *Sci. J. Kanagawa Univ.*, **27**: 81-84.
- 4) 荒井 健, 島川涼太, 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2017) 相模川河口域における長期環境モニタリング 4-流入河川水の元素濃縮. *Sci. J. Kanagawa Univ.*, **28**: 109-112.
- 5) 気象庁 HP, 台風経路図. [<https://www.jma.go.jp/jma/index.html>].
- 6) 鈴木崇之 (2020) 2019 年台風 15 号 (Faxai) による沿岸災害の概要. *消防防災の科学* **140**: 27-32.

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 8 降雨量が非生物的・生物的環境へ与える影響

酒井駿輔¹ 川延京子³ 金沢謙一^{1,3} 西本右子² 鈴木祥弘^{1,3}

Long-Term Monitoring of Environmental Changes in the Sagami
River estuary
IIX. Impact of Low Precipitation on Biotic and Abiotic Environments

Shunsuke Sakai¹, Kyoko Kawanobe³, Ken'ichi Kanazawa^{1,3},
Yuko Nishimoto² and Yoshihiro Suzuki^{1,3,4}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuki03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The amount of precipitation around the Sagami River estuary in autumn 2020 was 38% of that in autumn 2019 and this was expected to reduce the inflow of river-water to the estuary. To estimate the effects of the decreased precipitation, the abiotic and biotic environments were measured in the estuary in January 2021 and were compared with those in December 2019. The reduced precipitation clearly affected the abiotic environment. The coastal water-mass derived from river water, which was observed in December 2019, was not observed in this study. The open sea water-mass covered the estuary and the salinities measured in this study were ca. 0.4‰ higher than those of December 2019. The reduced precipitation also affected the biotic environment. The phytoplankton biomass was significantly lower and the accumulation of phytoplankton on the seafloor was not observed in this study. Corresponding to the lower biomass, the surface densities of the dominant diatom species (*Skeletonema costatum* complex) in this study decreased to ca. 40% of those in December 2019, although decreases in cell density were not observed in the dominant haptophyte species (*Gephyrocapsa oceanica*). The effects of lower precipitation varied from species to species, resulting in significant changes in the species composition of phytoplankton communities. This study showed that decreased precipitation has a marked impact not only on abiotic environments in the estuary but also on biotic ones.

Keywords: biomass, *Gephyrocapsa oceanica*, Sagami River estuary, *Skeletonema costatum* complex, species composition

序論

相模湾は伊豆半島から三浦半島を経て房総半島に至る、太平洋にむかって開かれた湾である。この湾の沖合には黒潮が流れる一方で、複数の河川から淡水が流入し、湾内には複雑な環境が形成されている¹⁾。中でも平塚市周辺の海域は、相模川からの淡水の流入にくわえて、平塚海谷と呼ばれる特異な海底地形

が存在し、環境が複雑に変動している²⁾。このように変動する環境にあっても、様々な生物が植物プランクトンの行なう光合成・一次生産に支えられて棲息していることに変わりはない。この海域で植物プランクトンを解析し、生息環境と対応付けて考えることはこの海域の生態系を理解するために重要であ

る^{2,4)}。さらに、近年の地球温暖化とそれに伴う気候変動は、この海域にも様々な影響を与えることが予想される。海域に普遍的な特性と地球温暖化にともなう生じる現象とを分けて捉え、影響を正確に把握するためには、この海域での複数年にわたる測定が重要であり、我々は2010年以来継続した調査を実施している。本研究では、秋季の降雨量が極めて少ない本年度の気象に着目した。この気象条件が海況に与えた影響を明らかにし、河口域の生態系がどのように変化したかを検討するために、去年の海況・植物プランクトン群集の観測結果と比較した。

材料と方法

環境要因と植物プランクトン生物量の測定

非生物的環境要因と植物プランクトン生物量の測定を2021年1月15日に行った。相模川河口から南に向かって沖合に1000 m、1200 m、1500 m、2000 m、3000 m、4000 m、5000 mの7測点を南北直線上に設定して測定した(図1)。さらに、1月28日に相模川河口周辺について、河口から南に向かって沖合に1000 mまで100 mずつ11測点を南北直線上に設定して測定した。GPSを用いて緯度経度を求め、各測点の河口からの距離を得た。測点の水深は音響測定器を用いて測定した。各側点では、調査船舷側より直読式総合水質計(AAQ126, JFEアドバンテック株式会社)を垂下して、電気伝導度、温度、圧力、さらに、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力は、測定器付属のソフトウェアにより塩分濃度(‰)と水深(m)に換算した。海水の密度指標(σ)は、塩分濃度と温度、圧力から算出した海水密度(kg m^{-3})より1000を引いて求めた。クロロフィル

蛍光強度は、観測と同時に採水した海水試料から求めたクロロフィルa濃度で校正し、クロロフィルa濃度($\mu\text{g l}^{-1}$)に換算した。海水試料はガラス濾紙(GF/F, Whatman)に濾過し、濾紙に残った粒子よりN,N-ジメチルホルムアミド(富士フイルム和光純薬株式会社)でクロロフィルaを抽出した。溶液中のクロロフィルa濃度は蛍光分光器(TD-700, Turner Designs)を用いて蛍光法で求めた。同時に測定された圧力から測定点の水深をもとめ、これと対応付けて、各測点での塩濃度、海水密度指数、クロロフィルa濃度の鉛直分布を求めた⁵⁾。さらに、観測点の河口からの距離とあわせて計算し、測定点の水深を境界条件として設定した上で、コンターマップを作成した(G-sharp, 日本電子株式会社)。

硝酸態無機窒素濃度

河口と沖合200 m、400 m、1000 m付近の4測点(1月28日)、沖合1000 m、1500 m、2000 m、4000 m、5500 m付近の5測点(1月15日)の南北直線上の合計9測点(図1)で採水を行なった。バンドーン採水器(OSK12XL010, オガワ精機株式会社)を用い水深1 mと10 mから採水し、遮光した保冷庫に入れて実験室まで輸送した。試料は測定まで5°C、暗所で保存した。試料中の硝酸態窒素の濃度はカドミウム還元法による呈色反応で求めた(Marine Checker HI781, HANA Ins.)。

植物プランクトンの群集構造の解析

相模川河口から南に向かって沖合に100 m、1000 m、5000 mの南北直線上の3測点(図1)で水深1 mと10 mからバンドーン採水器を用いてした。海水試料は250 ml 黒色ポリびんに入れ、速やかに0.1% 中性ホルマリン・0.025% グルタルアルデヒド固定液を添加した。固定試料は、黒ビニール袋で遮光の上、保冷剤を入れたクーラーバックで保存し、固定試料の濃縮と光学顕微鏡による観察まで、暗所・冷蔵庫(5°C)に保管した。固定試料250 mlは、引圧せずに膜フィルター(孔径0.2 μm) (ISOPORE, Millipore)で約30 mlまで濃縮後、utermöhl法により倒立光学顕微鏡(DMIL, Leica社)を用いて観察した。Edler L. and Malte E. (2010)⁶⁾に従い細胞密度を推定した。微小な細胞は、チャンバー視野面積を分割して高倍率の対物レンズで観察し、全視野面積は低倍レンズで確認した。プランクトンの同定(属名と種名)は、Tomas C. R. (ed.) (1997)⁷⁾およびTakuo O. et al. (2012)⁸⁾に従った。複数種が混在し、光学顕微鏡下では判別できない種群は、種名の後にcomplexとして記載した。

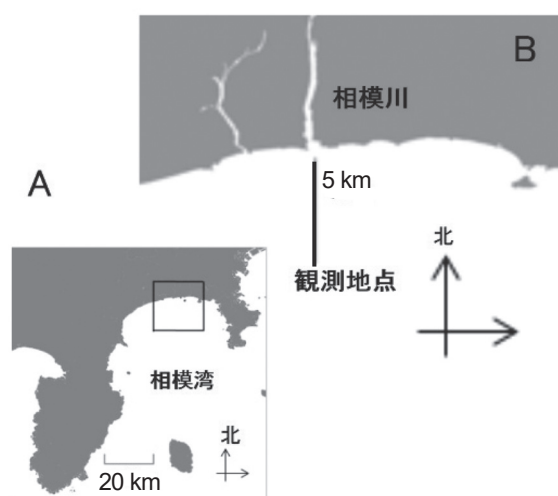


図1. 観測海域。相模川河口から南方沖合5 kmの線上に測点を設けた。A. 相模湾全景。図中の四角形は図Bの位置を示す。B. 観測海域。図中直線は調査した観測点を設けた南北の線を示す。

結果 海況

観測期間中の河口付近の水温は $17.4 \sim 17.7^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。表層付近の水温が最も低く 17.5°C 以下であり、水深 5 m 付近で 17.7°C に上昇した。沖合で測定した表層の水温は、沖合 1000 m で 17.4°C で、沖へ向かうにつれてわずかながら上昇し、2000 m で 17.6°C 、3000 m で 17.7°C となった。場所によりわずかに変化した。全体として水深 50 m までの水温は表層の水温と等しくほぼ一定であった (図 2A)。河口付近の塩分濃度は表層で 33.1‰ であった。しかし、塩分濃度は水深とともに急激に上昇し、水深 5 m では 34.6‰ となった (図 2B)。沖合で測定した塩分濃度には河口の表層に見られた低塩分濃度の水塊は認められず、沖合 5000 m まで 34.8 ~ 34.9‰ の範囲でほぼ一定であった。また、水深による変化は殆ど認められなかった (図 2B)。塩濃度、水温、圧力から各測定点の密度指標 σ を求めた。河口付近では、表層の低塩分濃度の水塊のため、水深 0 ~ 3 m の範

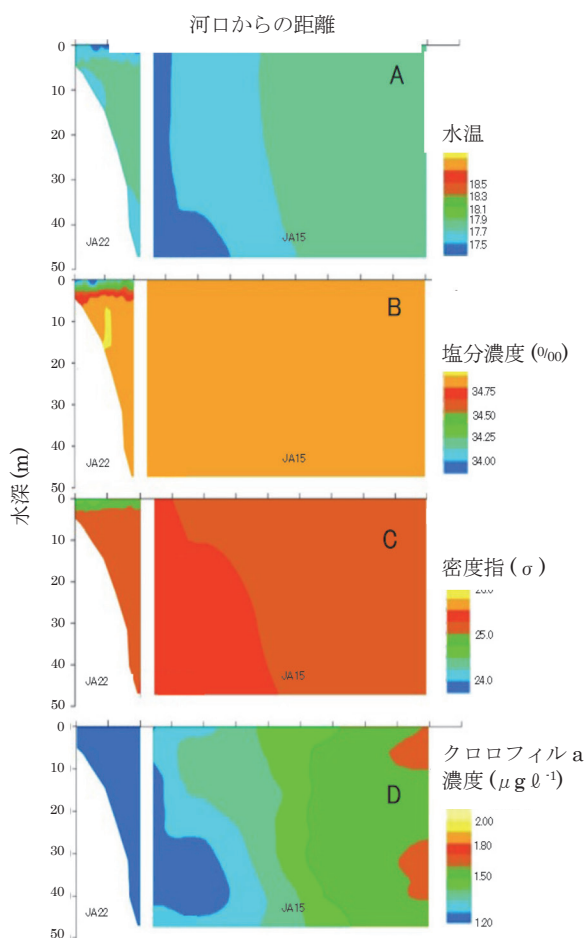


図 2. 相模川河口域の海況と植物プランクトンの分布. 河口から沖合に向かって南北方向に設定した測定線上で測定し、河口からの距離と水深で表した水塊断面上に水温 (A)、塩分濃度 (B)、密度の指数 σ (C) およびクロロフィル *a* 濃度 (D) の分布を示した。

囲で、 $24.3 \sim 25.5$ の低密度の水塊が認められた。しかし、3 m 以深の σ は $25.0 \sim 25.3$ でほぼ一定であった。沖合の表層で σ は 25.8 であった。沖に向かって水温が高くなるため、2000-5000 m の表層で σ は低下し 25.5 となった。2000-3000 m の範囲では、水深とともに密度が僅かながら上昇した (図 2C)。これらの非生物的要因とともに測定した蛍光強度からクロロフィル *a* 濃度を推定した。表層のクロロフィル *a* 濃度は河口付近で最も低く $1.2 \mu\text{g l}^{-1}$ であり、沖合に向かって徐々に上昇し、2500 m で $1.3 \mu\text{g l}^{-1}$ 、5000 m で $1.6 \mu\text{g l}^{-1}$ を超える値が確認された。海中でも表層とほぼ等しい値が認められたが、その値は水深とともに僅かに変動した。沖合 2000 m では、表層から水深 10 m でクロロフィル *a* 濃度が上昇したが、10 ~ 40 m では水深とともに低下し、さらに 40 m から 50 m の間でクロロフィル *a* 濃度が僅かに上昇する複雑な変化を示した (図 2D)。

硝酸態無機窒素濃度

硝酸態窒素濃度を水深 1 m と 10 m で測定した (図 3)。水深 1 m の硝酸態無機窒素濃度は、河口で 2.56 mg l^{-1} であり、河口から沖合に向かって、125、444、1065、1534 m でそれぞれ 1.13、1.17、0.66、0.21 mg l^{-1} と急激に低下し、3825 m では、 0.02 mg l^{-1} に低下した。一方、深度 10 m の硝酸塩濃度は表層に比べて低く、河口で 0.19 mg l^{-1} であり、沖合に向かってわずかに低下し、5486 m で 0.05 mg l^{-1} となった (図 3)。

植物プランクトンの群集構造

河口付近の表層に形成された低塩分濃度の水塊には淡水に生息する珪藻種が多く認められた (表 1)。

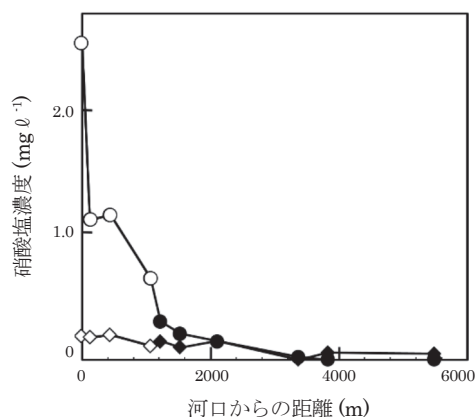


図 3. 河口付近の表層 1 m と水深 10 m で測定された硝酸態窒素濃度. 白丸 (○) と黒丸 (●) は水深 1 m で 1 月 28 日と 1 月 15 日に採水した海水中の濃度、白菱 (◇) と黒菱 (◆) は水深 10 m で 1 月 28 日と 1 月 15 日に採水した海水中の濃度を示す。

表 1. 海水試料中の植物プランクトン群集の種組成

Species	CH	表層 (0 m)			水深 10 m 層		
		100 m	1000 m	5000 m	100 m	1000 m	5000 m
diatoms							
<i>Detonula pumila</i>	<w				82		
<i>Lauderia annulata</i>	w	8	4	32	32		132
<i>Skeletonema costatum</i> complex		2,938	3,590	27,418	3,074	3,318	30,845
<i>Thalassiosira diporocyclis</i>				363			
<i>Thalassiosira</i> spp.			326	1,224	816	1,795	
<i>Melosira nummuloides</i>	f	204	82				
<i>Melosira varians</i>	f	367	122				
<i>Leptocylindrus danicus</i>			163	775	32	1,061	
<i>Leptocylindrus minimus</i>				428		163	
<i>Corethron criophilum</i>				163		122	
<i>Corethron pelagicum</i>							4
<i>Coscinodiscus</i> spp.			4				
<i>Asteromphalus</i> sp.			41				
<i>Cyclotella</i> spp.	f	2,938					
<i>Stephanodiscus</i> sp.	f	1,306	653	245	653		
<i>Aulacoseira granulata</i>	f	1,061	204				
<i>Rhizosolenia bergonii</i>	w	8			8		
<i>Rhizosolenia robusta</i>	w		4				
<i>Rhizosolenia setigera</i>			20		20		
<i>Guinardia striata</i>					204		
<i>Dactyliosolen phuketensis</i>				184			
<i>Cerataulina pelagica</i>			326	347		326	530
<i>Eucampia cornuta</i>			326		82	41	
<i>Eucampia zodiacus</i>				82			612
<i>Bacteriastrum elongatum</i>	<w					122	898
<i>Bacteriastrum</i> spp.				898			
<i>Hemiaulus hauckii</i>	<w			82			286
<i>Chaetoceros atlanticus</i>			82	36			367
<i>Chaetoceros borealis</i>				56			
<i>Chaetoceros danicus</i>		122	204	367	82	122	408
<i>Chaetoceros peruvianus</i>	<w			4			
<i>Chaetoceros affinis</i>			52	120			20
<i>Chaetoceros affinis</i> var. <i>willei</i>			163	163			
<i>Chaetoceros compressus</i>	<w	136	32	60		326	326
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	<w		163	1,856	163	1,142	3,631
<i>Chaetoceros diadema</i>		56					
<i>Chaetoceros didymus</i>	<w	265		36			122
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	w	408	143	265	122	82	612
<i>Chaetoceros radicans</i>				64		326	
<i>Chaetoceros subtilis</i>	b					163	
<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	ib		326	571			326
<i>Ditylum brightwellii</i>		122	82	449	41	82	204
<i>Lithodesmium undulatum</i>	<w						4
<i>Lithodesmium variabile</i>					653		
<i>Odontella mobiliensis</i>		82	41		326	326	
<i>Odontella rhombus</i>		8					
<i>Neodelphineis pelagica</i>				775			898
<i>Thalassionema nitzschioides</i>		367	41	1,367	408	1,469	122
<i>Thalassiothrix</i> spp.		286	82	224	82	82	82
<i>Nanoneis hasleae</i>	wo	326	326	653			1,306
<i>Fragilaria</i> spp.	f	1,795	163		653		
<i>Meuniera membranacea</i>				102			
<i>Licmophora abbreviata</i>		326	82				
<i>Cymbella minuta</i>	f	816	163				
<i>Cymbella</i> sp.	f	163	82				
<i>Gomphonema</i> sp.	f	326	163				
<i>Navicula cryptocephala</i>	f	163.2	40.8				
<i>Navicula gregaria</i>	f	816	326		163		
<i>Navicula pupula</i>	f	653	122		163		
<i>Navicula</i> spp.	f	13,382	1,469	326	4,733	326	41
<i>Amphora</i> sp.	f	653	82				
<i>Diproneis</i> sp.		653	204		163		
<i>Cocconeis placentula</i>	f	163					
<i>Amphipleura</i> spp.			82		41	41	
<i>Pleurosigma/Gyrosigma</i> sp.		82	4	41		41	
<i>Cylindrotheca closterium</i>		1,469	326	2,366	979	653	1,795
<i>Fragilariopsis</i> spp.		4,080	326	326	490		979
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex		204	41	2,387	408	326	163
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.				61	163		
<i>Nitzschia palea</i>	f	490	326				
<i>Nitzschia sigma</i>	f	4					
<i>Nitzschia</i> spp.		10,118	1,958		326	41	
Total (cells · l ⁻¹)		47,364	13,564	44,917	14,345	10,173	47,855

Species	CH	表層 (0 m)			水深 10 m 層		
		100 m	1000 m	5000 m	100 m	1000 m	5000 m
flagellates							
Cryptophyceae		326	653	2,366	653	653	2,448
Dinophyceae							
<i>Prorocentrum dentatum</i>		163	41		163		
<i>Prorocentrum triestinum</i>		163				163	
<i>Prorocentrum</i> sp.		163					
Gymnodiniaceae		326	979	1,795	816	653	2,285
<i>Ceratium fusus</i>			8			4	
<i>Ceratium penatogonum</i>	wo				4		
<i>Ceratium tripos</i>			4			4	
<i>Coxitoxum</i> spp.		163		245		653	41
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	ib	163					
<i>Heterocapsa</i> spp.		326	326		163	163	163
Peridinales		326		734	163	326	163
<i>Pronoctiluca spinifera</i>			163				
Haptophyceae							
<i>Emiliania huxleyi</i>				1,224		326	1,142
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>		16,973	22,685	35,904	18,115	29,213	24,317
<i>Discosphaera tubifer</i>					163		
<i>Coccolithophorid</i> type 1				122			163
Dictyochophyceae							
<i>Dictyocha fibula</i>	o		41	122		41	41
<i>Dictyocha speculum</i>							41
Euglenophyceae		490					
Chlorophyceae							
<i>Scenedesmus</i> spp.	f	653					
<i>Mougeotia</i> sp.	f	367					
Prasinophyceae							
<i>Pyramimonas</i> spp.		490	979	2,774	163	979	1,632
Total (cells · l ⁻¹)		21,094	25,879	45,288	20,404	33,178	32,436

細胞密度 (cells l⁻¹)

表中の CH 列は各種について以下の特性をしめす。

b: 汽水域生息種。

c: 寒冷域生息種。

f: 淡水域生息種。

i: 内海・沿岸域生息種。

w: 暖海域生息種。

o: 外洋生息種。

<: 上述の傾向を持つ種。

河口から沖合 100 m の表層水では *Navicula* spp. や *Cyclotella* spp.、*Fragilariopsis* spp.、*Stephanodiscus* sp. の羽状目の珪藻種が認められた。これらの種をはじめとする淡水棲珪藻種（表 1）の密度は非常に高く、この海水試料中の全ての珪藻種の細胞数の半数（54.1%）を占めていた。同じ採水点（沖合 100 m）の水深 10 m 層でも *Navicula* spp. や *Stephanodiscus* sp. が高い密度（それぞれ 4733 と 653 cells l⁻¹）で認められ、これらの種をはじめとする淡水棲珪藻種の細胞数は、この海水試料中の全珪藻種の細胞数の半数（50.3%）を占めていた。珪藻以外の藻類種に着目すると、淡水に生息する種はほとんど認められなかった（表 1）。100 m 沖合の表層海水試料にわずかに認められた緑藻類 *Scenedesmus* sp. や *Mougeotia* sp. もその密度は低

く、珪藻以外の藻類種に占める割合は 5% 足らずであった。沖合 1000 m から採水した海水試料中にも淡水に生息する珪藻種が認められたが、その割合は小さく、表層と 10 m 層でそれぞれ 29.8% と 3.6% であった。河川水に由来すると考えられる低塩分濃度の水塊の影響はこの測点では小さくなったことが示唆された。この測点では珪藻種以外の淡水に生息する藻類種は認められなかった (表 1)。沖合 5000 m の海水試料中にも淡水に生息する珪藻種がわずかに認められたが、その割合は、表層と 10 m 層でそれぞれ 1.4% と 0.1% であった。この測点では珪藻種以外の淡水に生息する藻類種は認められなかった (表 1)。河川水に由来すると考えられる低塩分濃度の水塊の影響はこの測点ではさらに小さくなったことが示唆された。これらの淡水に棲息する藻類は、顕微鏡観察で葉緑体などの細胞構造が明瞭に認められた。これら藻類の細胞は有機物を含み、この海域の生態系を支えるエネルギー源として機能している可能性が高い。しかし、海水試料中の塩分濃度が低くない (最低でも 33.1‰) ことを考えると、この海域で増殖して一次生産を行なうことは難しいと推定される。

海水に棲息する珪藻種の中で優占していたのは、*Skeletonema costatum* complex で 沖 合 100、1000、5000 m の採水点の表層で、それぞれ 2938、3590、37418 cells ℓ^{-1} 、水深 10 m 層で、それぞれ 3074、3318、30845 cells ℓ^{-1} であった。*S. costatum* complex は 沖 合 100、1000、5000 m の採水点の表層で、それぞれ 13、38、62 %、水深 10 m 層で、それぞれ 43、34、65% を占めていた。一方、珪藻類以外の藻類ではハプト藻類の *Gephyrocapsa oceanica* が優占していた。*G. oceanica* の密度は 沖 合 100、1000、5000 m の採水点の表層で、それぞれ 16973、22685、35904 cells ℓ^{-1} 、水深 10 m 層で、それぞれ 18115、29213、24317 cells ℓ^{-1} であった。*G. oceanica* は 沖 合 100、1000、5000 m の採水点の表層で、珪藻以外の藻類全体の細胞数のそれぞれ 84、88、79%、水深 10 m 層で、それぞれ 89、88、75% の細胞数を占めていた。測定から明らかになった優占度 (全藻類の細胞数に占める各種藻類の細胞数の割合) を考えると、これらの優占種が、この時期の相模川河口域生態系の一次生産に与える影響は極めて高いと考えられる。また、珪藻種 *S. costatum* complex の細胞容積が、ハプト藻種 *G. oceanica* に比較して極めて大きいことを考慮すると、特に珪藻類優占種がこの海域の一次生産者として重要であると考えられた。

考察

非生物的環境

1 月 15 日に測定された水温、塩分濃度、密度指標 σ は、鉛直方向に均一であり、沖合 1000 m から 5000 m の範囲で大きな変化はなかった (図 2)。水温は陸に近づくにつれてわずかに低下したが、これは浅い水深の海域で、低温大気により海水が早く冷却されたためと推定される (図 2A)。塩分濃度は水深に伴う変化は小さく、この範囲でほぼ均一であった (図 2B)。水温低下に対応して、沿岸付近の海水密度は僅かに高かった (図 2C)。一方、1 月 28 日の塩分濃度、密度指標 σ は、一定水深以上の水塊で、鉛直方向にも、沖合に向かって南北方向にもほぼ一定であった (図 2)。しかし、水深 5 m 以浅の表層に低温、低塩分濃度、低密度の特徴的な水塊が認められた。1 月 28 日の測定で水深 5 m 以浅の表層に認められた特徴的な水塊は、降雨に対応したものと推定される。測定海域付近の平塚市の降水量は、1 月 15 日までの一週間で 0.5 mm であったの対し、1 月 28 日までの一週間で 30.5 mm であった⁹⁾。相模川河口域では 30 mm 程度の降雨による河川水の流入で特徴的な水塊が生じ、厚さ数 m、沖合 1000 m の範囲で塩分濃度が生じたことが推定される。1 月 28 日の測定ではこの水塊と対応した高い硝酸態窒素濃度が認められた。河口表層の硝酸態窒素濃度は、同時に測定した水深 10 m の濃度の 10 倍以上の濃度であった。降雨前の 1 月 15 日に測定された沖合 1500 m 以遠の硝酸態窒素濃度に対しても、河口表層の濃度が 10 倍以上であったことを考えると、硝酸態窒素が河川水に由来する水塊と対応することは明らかである。降雨と河川水の流入が、硝酸態窒素の供給に重要であることが示めされた。長期的な降雨の違いはこの海域の海況にさらに大きな影響を与えている可能性がある。降雨の違いの海況への影響を検討するため、降水量が特徴的に少なかった本研究の結果を昨年度の同時期に測定された海況と比較した。降雨量を気象庁のデータ⁹⁾を用いて、平塚市で観測された降水量をみると、台風による降雨が無かったことで 2019 年 9 月から 2020 年 1 月の降水量と 2020 年 9 月から 2021 年 1 月の降水量に大きな違いが生じていたことが分かる (図 4)。特に 2020 年 10 月の降水量は 150 mm 程度で、2019 年の 38% に過ぎず、全体の降水量を低くしていた。2020 年には 11 月以降も降水量が少なく、11 月から 1 月の降水量は、前年の 11%、20%、42% に過ぎなかった。この期間の全降水量を比較すると、2020 年度の降水量は 2019 年度の 38% に過ぎなかった (図 4)。この降水量の違いは河口域の塩分濃度の測定結果と良く対応していた。2019 年 12 月に測定された

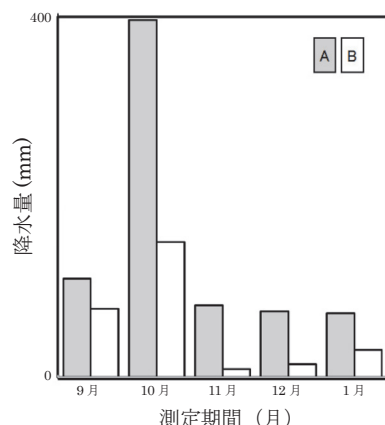


図4. 秋期相模川河口付近（平塚市）の降水量. 日本気象協会ホームページ過去の気象データより作成. 観測前4半期, 2019年9月～2020年1月 (A) と2020年9月～2021年1月 (B) を比較.

この海域の塩分濃度の分布¹⁰⁾と比較すると、長期間降水量の低かった2021年1月の塩分濃度は平均で約0.4‰高くなっていた(図5)。また、冬期に沿岸の海底付近に認められる低温・低塩分濃度の水塊(図5A)が2021年1月の測定では観測されなかった。

生物的環境

2019年12月に測定されたこの海域のクロロフィルa濃度の分布¹⁰⁾と本研究で明らかになった2021年1月の分布を比較すると明瞭な差が認められた(図6)。2019年12月に測定されたクロロフィルa濃度の分布には、表層で高く深層で低い鉛直方向の勾配が認められたが、本研究の測定結果には認められなかった。2019年12月に沿岸の海底付近に認められた低温・低塩分濃度の水塊(図5A)は、鉛直混合の深度を浅くし、これにより表層付近での光合成を維持され易くすると推定される。2019年12月に測定されたクロロフィルa濃度の鉛直方向の勾配とこの水塊の存在は対応していた。2021年1月の植物プランクトン生物量が、2019年12月に比較して低くなったことは、先に示された、硝酸態窒素の供給に降雨とそれに伴う河川水の流入が重要であることと良く対応していた。さらに、2019年12月に先立つ5ヶ月の間に、降雨に伴って河川から淡水が流入したことは、2021年1月の先立つ期間に比較して大量の栄養塩を供給し、植物プランクトンを増殖させたと予想される。2019年12月には認められた河口付近の海底への植物プランクトンの集積が2021年1月には認められなかったことは、降水量の違いと良く対応していると考えられる。本研究では、測定直前に降雨のあった2021年1月28日には河口付近で高い硝酸態窒素濃度が認められた。それに関わらず、河口付近に高いクロロフィルa濃度が認められ

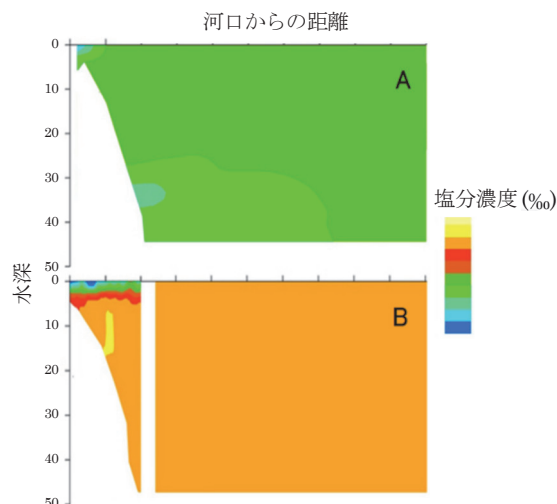


図5. 相模川河口域の塩分濃度分布の降水量にともなう変化. 河口から沖合に向かって南北方向に設定した測定線上で測定し、河口からの距離と水深で表した水塊断面上に塩分濃度の分布を示した. 2019年12月 (A) と2021年1月に測定 (B).

なかったことは、測定が降雨直後(3～0日)であり、植物プランクトンの増殖が不十分であったためと考えられた。

降水量の長期間の変動に起因する海況の変化は、生物量の違いのみならず、植物プランクトン群集の群集構造にも大きな違いを生じさせていた。優占種である*S. costatum*の表層海水試料中の細胞密度は2019年12月にも計測されている¹⁰⁾。この結果と本研究で2021年1月に計測を行なった結果を比較すると、大きな違いが認められた。2019年12月に河口から100、1000、5000 m 沖合で採水された海水試料中の密度はそれぞれ57038、13437、12458 cells ℓ^{-1} であったのに対し、2021年に河口から同様の測点で採水された海水試料中の密度はそれぞれ2938、3590、27418 cells ℓ^{-1} であった(表1)。2019年*S. costatum*の密度は河口から沖合100 m 付近で最も高く、沖合1000 m、5000 m で低くなっていたのに対し、2021年12月の密度は100 m 付近で最も低く、沖合1000 m、5000 m にむかって高くなっていた。このため、2019年に計測された細胞密度に対する2021年に測定された細胞密度は100 m 沖合で5.4%、1000 m 沖合で27%に過ぎなかったが、5000 m 沖合では220%となった。また、2021年1月の3点での平均は2019年12月の平均の41%に過ぎなかった。この結果は、2021年のクロロフィルa濃度が2019年に比較して低い値を示したこと(図6)と対応していた。一方、珪藻以外の藻類で優占していたハプト藻類*G. oceanica*でも2019年12月には2021年12月に測定された密度と同様に河口付近で小さく沖合に向かって大きくなる傾向が認められたが、年度

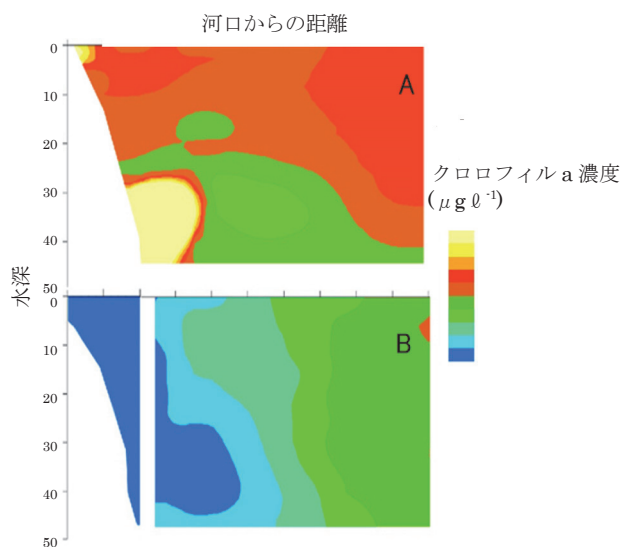


図 6. 相模川河口域のクロロフィル *a* 濃度分布の降水量にともなう変化。河口から沖合に向かって南北方向に設定した測定線上で測定し、河口からの距離と水深で表した水塊断面上にクロロフィル *a* 濃度の分布を示した。2019 年 12 月 (A) と 2021 年 1 月に測定 (B)。

間の差異は珪藻優占種ほど大きくはなかった。2019 年 12 月に河口から 100、1000、5000 m 沖合で採水された海水試料中の密度はそれぞれ 21057、18185、20400 cells ℓ^{-1} であったのに対し、2021 年に河口から同様の測点で採水された海水試料中の密度はそれぞれ 16973、22685、35904 cells ℓ^{-1} であった (表 1)。2021 年 1 月の 3 点での平均は 2019 年 12 月の平均に比べて 27% 上昇していた。海域全体で見ると、細胞の大きな珪藻優占種の細胞密度が大きく減少していたのに対し、細胞の小さなハプト藻優占種が増加していたことは、降雨の減少に伴って予想される栄養塩供給の低下と対応していた。降雨の減少は植物プランクトン生物量の減少ばかりでなく、植物プランクトン群集の群集構造を大きく変化させる可能性を強く示唆していた。また、クロロフィル *a* 濃度でみた、生物量の変化は、細胞体積の小さいハプト藻類より、珪藻類の細胞密度の変化と良く対応していた。

結論

相模川河口付近の 2020 年 9 月から 2021 年 1 月の降水量は 2019 年 9 月から 2020 年 1 月の 38% であった。河川水の流入量を低下させたことが予想される。少ない降水量と対応して、2019 年 12 月に認められた河川水に由来することが予想される沿岸水塊は本研究の測定では認められなかった。このため、2019 年 12 月に比較して 0.4‰ 高い塩分濃度が観測された。

生物的環境にも違いが認められた。本研究の測定ではクロロフィル *a* 濃度から推定される植物プランクトン生物量が大きく低下し、1 km 沖合海底にしばしば認められる植物プランクトンの集積が認められなかった。生物量の低下と対応して、本研究で測定された珪藻類優占種 (*S. costatum* complex) の細胞密度が 2019 年 12 月の約 40% に低下した。一方、ハプト藻類の優占種 (*G. oceanica*) には細胞密度の低下は認められなかった。少ない降水量の影響は種ごとに異なり、その結果、植物プランクトン群集の種組成も大きく変化させていた。本研究の結果は、降水量の低下が相模川河口域の非生物的環境のみならず、生物的環境に大きな影響を与えることを示していた。

謝辞

相模川河口域の継続的調査研究の一環として、プランクトン群集形成の解析を行なった本研究は、神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202004) をうけて実施された。研究にご理解を頂き、支援いただいた神奈川大学理学部総合理学研究所の所員の皆さんに深くお礼申し上げる。

文献

- 1) 日本海洋学会編 (1985) 日本全国沿岸海洋誌。東海大学出版会、東京。
- 2) 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2010) 相模川河口域の海況と植物プランクトンの分布. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **21**: 65-69.
- 3) 平賀義路, 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2011) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**: 59-66.
- 4) 栗飯原海人, 平賀義路, 鈴木祥弘 (2014) 相模川河口域海況の日変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**: 111-116.
- 5) Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements (1994 UNESCO)
- 6) Edler L and Malte E (2010) The utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis*. Bengt K, Caroline C and Eileen B, eds., UNESCO. pp. 13-20.
- 7) Tomas CR (1997) *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic press.
- 8) Takuo O, Mitunori I, Valeriano MB, Haruyoshi T and Yasuo F (2012) *Marine Phytoplankton of the Western Pacific*. Kouseisha Kouseikaku, Tokyo.
- 9) 日本気象協会 tenki.jp [https://tenki.jp/]
- 10) 酒井駿輔, 川延京子, 多田雅章, 金沢謙一, 西本右子, 鈴木祥弘 (2020) 相模川河口域における長期環境変動のモニタリング (冬期相模川河口域の特徴的水塊中に認められた植物プランクトンの群集構造). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **31**: 83-88.

■テクニカルノート■

コルヒチンを用いたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 4 倍体及び 8 倍体の効率的な作出方法

菊池涼夏¹ 岩元明敏^{1, 2, 3, 4}

An Efficient Method of Tetraploid and Octaploid Induction in *Arabidopsis thaliana* Using Colchicine Treatment

Suzuka Kikuchi¹ and Akitoshi Iwamoto^{1, 2, 3, 4}

¹ Field of Biological Sciences, Course of Science, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: akitoshi@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Colchicine gel treatment is one of the major methods used to induce polyploid strains in plants. In this study, we examined several conditions of colchicine gel treatment in the diploid and tetraploid of *Arabidopsis thaliana* (ecotype: Columbia) to establish the most efficient method of tetraploid and octaploid induction, and compared the induction efficiency with that of one-drop colchicine solution treatment, which was previously reported. The shoot apex of diploid and tetraploid seedlings was treated with colchicine gel (0.5% or 1.0% colchicine dissolved in 1.0% agarose) for several days. Thus, 0.5% colchicine gel treatment of the diploid for two days induced tetraploid (7.5% of treated seedlings) most efficiently under all examined conditions, suggesting that one-drop colchicine solution treatment of the diploid is more efficient than colchicine gel treatment. 0.5% colchicine gel treatment of the tetraploid for two days induced octaploid (5.0% of treated seedlings) most efficiently, which is similar to the one-drop colchicine solution treatment of the diploid. The survival rate of colchicine gel-treated seedlings was much lower than that of one-drop colchicine-solution-treated seedlings. The survival rate difference resulted in a lower efficiency of polyploid induction by colchicine gel treatment. These results suggest that one-drop colchicine solution treatment of the tetraploid can most efficiently induce octaploid.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, tetraploid, octaploid, colchicine, flow cytometry

序論

ゲノム倍数化（全ゲノム重複）は、染色体のセット数が倍化する現象であり、生物の進化の過程で繰り返して生じてきたと考えられている。特に、植物においてはこのゲノム倍数化が普遍的に起こり、倍数化に伴う環境適応能力の向上が植物の種分化の大きな推進力になってきたとされている¹⁾。また、ゲノム倍数化を経て4倍体化した植物は、根、花、葉などの各器官の成長が促進される傾向があり²⁻⁵⁾、このことを利用した倍数体育種も盛んに行われている⁶⁾。しかし、一方では人工的に作出した高次倍数体（6

倍体及び8倍体）において、成長が抑制される現象も報告されている^{7, 8)}。以上のことから、ゲノム倍数化は植物の成長に対して正負両面の影響を及ぼすと考えられる。しかし、高次倍数化による抑制を含めたゲノム倍数化にともなう成長変化の定量的な解析、及びその変化のメカニズムの解析は未だに行われていない。

ゲノム倍数化が成長に及ぼす影響の解析には、高次倍数体を含む人工同質倍数体系列を安定して作出するための手法の確立が必要不可欠である。同質倍

数体とは、雑種起源と考えられる複数のゲノムを含む異質倍数体ではなく、同質なゲノムの重複に由来する倍数体のことであり、近年その重要性が認識されつつある^{9, 10)}。人工同質倍数体の作出はこれまでに園芸品種や作物を中心に多く行われてきたものの¹¹⁻¹³⁾、その多くが4倍体の作出を目的としており、高次倍数体の作出について詳細に記述した例は少ない。倍数化が器官成長に及ぼす影響について解析が進められてきたモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の同質倍数体の作出についても、細胞分裂阻害剤水溶液への植物体全体の浸漬^{14, 15)} (以下、浸漬法)、茎頂への細胞分裂阻害剤水溶液の滴下^{3, 15)} (以下、滴下法)、細胞分裂阻害剤を含んだゲルによる茎頂の被覆¹⁶⁾ (以下、ゲル法) などいくつかの手法が様々な処理条件で用いられてきた。しかし、どの手法をどのような条件で用いることが倍数体作出のために最適であるかについての比較は十分ではなく、特に高次倍数体の作出についてはほとんど検討がされていない。

そこで、本研究では主要な倍数体作出方法の1つであるゲル法を用いて、複数の条件で2倍体及び4倍体シロイヌナズナに対して倍数化処理を行い、4倍体及び高次倍数体である8倍体の作出に最適な処理条件の検討を行った。これまでに行われてきた倍数体の作出では、コルヒチン、オリザリン、トリフルレイン、笑気ガス (N_2O)、カフェインなど様々な細胞分裂阻害剤が用いられているが¹⁷⁾、本研究では最も一般的で幅広い植物種で利用されているコルヒチンを阻害剤として採用した。また、コルヒチンを用いた浸漬法及び滴下法によるシロイヌナズナ倍数体作出の結果¹⁵⁾ との比較も行い、どの手法が効率的であるかについての検討も行った。

材料と方法

使用した植物

植物材料には、神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの植物育成棟で育成した野生型シロイヌナズナ (Columbia 系統) 及び本研究室で作出したシロイヌナズナ4倍体 (野生型シロイヌナズナをコルヒチン処理により倍数化した系統) から採取した種子を用いた。

種子の滅菌・吸水・低温処理

培地に播種した際にカビ等が繁殖することを防ぐため、使用する種子は全て滅菌水 (次亜塩素酸ナトリウム 1% (w/v) 以上, Triton X-100 0.1% (v/v) を含む) に 10 分間浸漬し、表面を滅菌した。滅菌処理後の種子は逆浸透膜処理水 (RO 水) で 5 回 (1 回 5 分)

洗浄し、RO 水に浸漬した状態で 4℃で 3 日間静置した。なお、この際に使用した RO 水は、オートクレーブ滅菌済みのものを使用した。

コルヒチンゲルの作成

1.0% (w/v) 低融点アガロース (NuSieve™ GTG™ Agarose, Lonza) にコルヒチン (Sigma) を 0.5% または 1.0% の濃度 (w/v) で溶かし込み、コルヒチンゲルを作成した。作成後は、使用まで 4℃で遮光保存した。

コルヒチン処理 (ゲル法) と倍数体の予備選抜

滅菌済み角型シャーレに入れた GMA 培地 (1.5% 寒天を含む 1/2 Murashige & Skoog 培地) 上に、滅菌・吸水・低温処理を行ったシロイヌナズナ2倍体及び4倍体の種子を無菌的に播種した。播種後、プレートの蓋を閉じ、蓋との間に生じた空隙をサージカルテープ (Micropore™ Surgical Tape, 3M) で覆った上で (周縁部を3周分サージカルテープで巻いて覆った)、LED インキュベータ (LH-241PFD-SS, 日本医化機械製作所) 内で温度一定 ($22 \pm 0.5^\circ\text{C}$)、連続光 ($90 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、湿度 $70 \pm 10\%$ の条件で育成した。

3枚目の本葉 (子葉を入れて5枚目の葉) が展開し始めた発達段階 (今回の育成条件では播種後9日目) で、無菌的に植物体の茎頂にコルヒチンゲルを

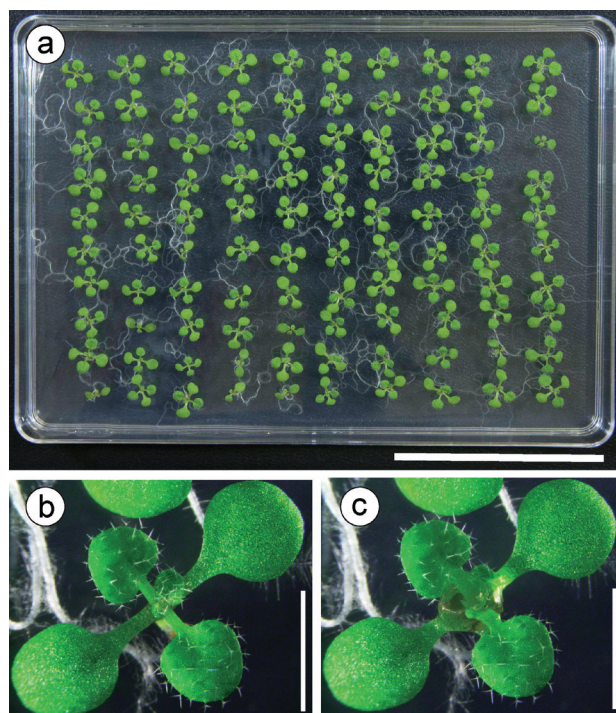


図1. コルヒチンゲルを用いた倍数化処理の様子. a. 角型プレート上で育成した播種後9日目のシロイヌナズナ. b. コルヒチンゲルをのせる前の植物体. c. コルヒチンゲルを茎頂にのせた様子. Scale bars = 5 cm (a), 3 mm (b, c).

5 μ L ずつのせた (図 1)。その後、プレートの蓋を閉じて再度サージカルテープで覆い、ゲルが脱落しないように注意しながら引き続き LED インキュベータ内で 1–4 日間静置した。

処理終了時には、茎頂を傷つけないように留意しながらピンセットでコルヒチンゲルを除去し、RO 水で茎頂を洗浄した。その後、それぞれの個体をロックウール (Grodan) に植え替え、20–30 日程度育成した。植え替え後の植物の育成条件は、温度一定 ($22 \pm 0.5^\circ\text{C}$)、16 時間明期、8 時間暗期 ($90 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、湿度 $70 \pm 10\%$ とした。また、過去の研究において、倍数体シロイヌナズナは葉表面に存在するトライコームの分岐数が野生型と比較して増加する (野生型では主に 3 又分岐であるが、倍数体では 4 又以上に分岐したトライコームが多く見られる) ことが報告されている¹⁵⁾。このことから、実体顕微鏡 (SMZ745T, Nikon) を用いてコルヒチン処理後個体におけるロゼット葉表面のトライコームの形態を観察し、分岐数が増加したトライコームが多く見られる個体について予備的な選抜を行った (図 2)。続いて、選抜した個体についてフローサイトメトリーによる倍数性の確認を行った。

倍数性の確認 (フローサイトメトリー解析)

予備選抜後の個体について、チョッピング法¹⁸⁾により細胞核を遊離させ、フローサイトメーター (CyFlow SL/UV, Partec) を用いて倍数性の確認を行った。まず、各コルヒチン処理後個体の葉をそれぞれ 2–3

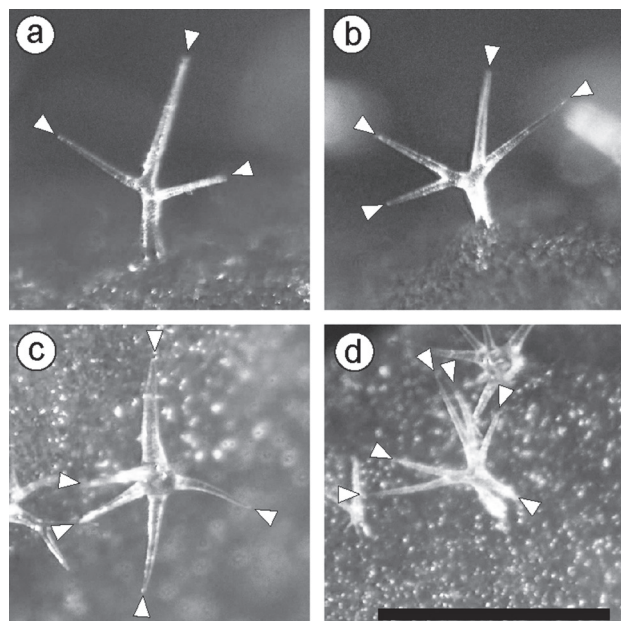


図 2. トライコームの分岐数と倍数性の関係。倍数化すると、四又以上に分岐するトライコームの割合が増える。8 倍体では、六又などに多分岐したトライコームも見られる。a. 三又分岐 (2 倍体), b. 四又分岐 (4 倍体), c. 五又分岐 (5 倍体), d. 六又分岐 (8 倍体)。Scale bar = 1 mm。

枚ずつプラスチックシャーレに採取し、核抽出液 (Quantum Stain NA UV 2A 植物 DNA 分析試薬 A 液, サイトテックス) を 200 μ L 添加した後に、カミソリで葉一枚あたり約 10 回程度細かく刻んだ。続いて、刻んだ葉サンプルをプラスチックシャーレごと氷上に 1 分程度静置し、核の抽出を行った。その後、フィルター (Cell TricsTM 20 μ m, sysmex) でろ過を行い、プラスチック試験管にろ過後の細胞核懸濁液を入れた。測定直前に DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride) を含む核染色液 (Quantum Stain NA UV 2A 植物 DNA 分析試薬 B 液, サイトテックス) を 800 μ L 添加して核を蛍光染色し、フローサイトメーターで蛍光強度別に核の数を測定した。なお、対照として同じ条件で育成した 2 倍体についても倍数性を確認した (図 3)。

結果と討論

2 倍体のコルヒチン処理について

2 倍体を対象に行ったコルヒチン処理の結果、0.5% コルヒチンで 2 日間処理する条件において最も効率よく 4 倍体が作出できることが分かった (処理個体数の約 7.5%)。また、0.5% コルヒチンで 3 日間処理した条件においては、1 個体のみ (処理個体数の約

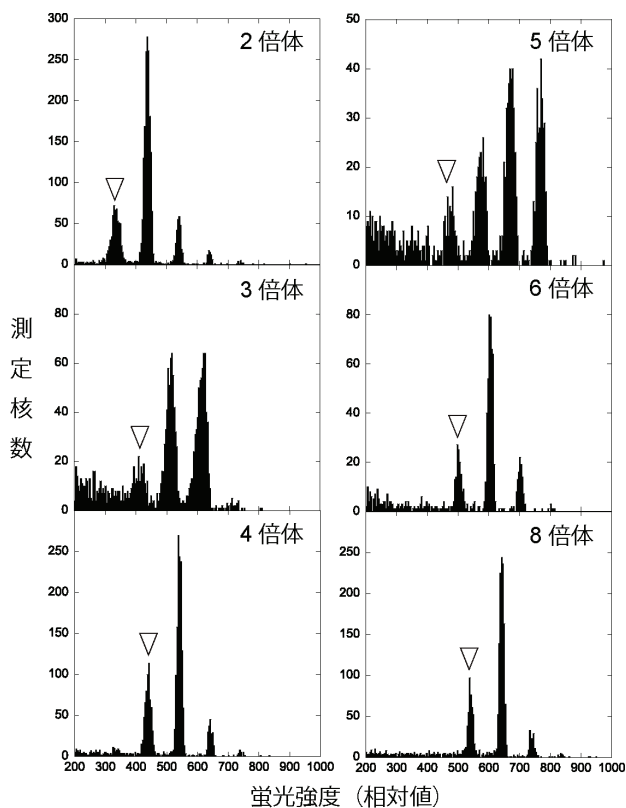


図 3. フローサイトメトリー解析の結果。核内倍化により、複数の蛍光強度にピークが見られる。コルヒチン処理後個体について、基本ゲノムの DNA 量 (矢頭) を 2 倍体と比較し、倍数性の判定を行った。

表 1. コルヒチンゲルを用いた倍数化処理による倍数体作出効率

系統	コルヒチン濃度, 処理期間	処理個体数	生存個体数 (※1)	予備選抜 個体数 (※2)	2倍体 (※2)	3倍体 (※2)	4倍体 (※2)	5倍体 (※2)	6倍体 (※2)	8倍体 (※2)
2倍体	0.5%, 2days	40	8 (20.0)	3 (37.5 / 7.5)	-	-	3 (37.5 / 7.5)	-	-	-
	0.5%, 3days	80	14 (17.5)	10 (71.4 / 12.5)	5 (35.7 / 6.3)	1 (7.1 / 1.3)	3 (21.4 / 3.8)	-	-	1 (7.5 / 1.3)
	0.5%, 4days	40	9 (22.5)	-	-	-	-	-	-	-
	1.0%, 2days	80	8 (10.0)	-	-	-	-	-	-	-
	1.0%, 3days	80	8 (10.0)	8 (100.0 / 10.0)	3 (37.5 / 3.8)	-	5 (62.5 / 6.3)	-	-	-
	1.0%, 4days	40	4 (10.0)	-	-	-	-	-	-	-
4倍体	0.5%, 1day	40	5 (12.5)	N/A	-	-	4 (80.0 / 10.0)	1 (20.0 / 2.5)	-	-
	0.5%, 2days	40	9 (22.5)	N/A	-	-	5 (55.6 / 12.5)	1 (11.1 / 2.5)	1 (11.1 / 2.5)	2 (22.2 / 5.0)
	1.0%, 1day	40	5 (12.5)	N/A	-	-	4 (80.0 / 10.0)	-	-	1 (20.0 / 2.5)
	1.0%, 2days	80	1 (1.3)	N/A	-	-	1 (100.0 / 1.3)	-	-	-
	1.0%, 3days	80	3 (3.8)	N/A	-	-	3 (100.0 / 3.8)	-	-	-
	1.0%, 4days	40	4 (10.0)	N/A	-	-	4 (100.0 / 10.0)	-	-	-

※1 括弧内は処理個体数に対する割合 (%)。

※2 括弧内は処理個体数に対する割合 (%) / 生存個体数に対する割合 (%)。

1.3%) ではあるが 8 倍体を作出することができた (表 1)。各処理条件における倍数体の作出効率の詳細を以下に示す。

0.5% コルヒチンでそれぞれ 2, 3, 4 日間倍数化処理を行なった結果、2 日間及び 3 日間の処理条件下で 4 倍体の作出が確認された。このうち 2 日間処理では、トライコームの分岐数に基づいて予備選抜された 3 個体のうち、全てが 4 倍体であった。また、3 日間処理の条件では、予備選抜された 10 個体のうち、1 個体が 3 倍体、3 個体が 4 倍体、1 個体が 8 倍体であった。

次に、1.0% コルヒチンでそれぞれ 2, 3, 4 日間倍数化処理を行なった結果、いずれの条件下でも処理後の生存率が 10% となり、0.5% コルヒチンで 2, 3, 4 日間処理をした場合の生存率 (17.5 - 22.5%) と比較して低くなることが分かった。トライコームの分岐数から倍数化していると判断されたのは 3 日間処理の条件の 8 個体のみで、そのうちの 5 個体が 4 倍体であり、8 倍体は作出されなかった。

なお、2 倍体を倍数化処理した 6 条件の中では、0.5% コルヒチンで 4 日間処理した場合の生存率が最も高くなっている。しかし、この処理条件における生存個体を観察したところ、元々コルヒチンゲルが茎頂を適切に被覆できていなかったと結論づけられた。すなわち、通常コルヒチン処理が行われた (コルヒチンゲルによって適切に茎頂が被覆された) 個体では、全体的な成長の遅れや色の濃いロゼット葉が密集して展開するなどの定性的な成長変化が見られる。しかし、上記の生存個体は成長速度及びロゼット葉の形状がコルヒチンゲル未処理の 2 倍体とほぼ同様であり、トライコームの分岐数に基づく予備選抜においても全て倍数化していないと判定されている。

また、今回の 0.5% コルヒチンゲルで処理した個体の生存率を、Yu ら (2009)¹⁵⁾ が報告した他の手法

での 0.5% コルヒチン処理後の Columbia 系統 2 倍体の生存率と比較した。その結果、今回用いたゲル法はいずれの条件でも、浸漬法 (0.5% コルヒチン溶液に 4 時間浸漬) の生存率 12% は上回る一方、滴下法 (0.5% コルヒチン溶液を茎頂に 1 回滴下) の生存率 83.3% は大幅に下回っていた。生存個体に占める倍数化した個体の割合は、それぞれの手法の間に顕著な差がなかった。

以上のことから、シロイヌナズナ Columbia 系統の 2 倍体から倍数体を作出するためには、生存率の高い低濃度 (0.5%) コルヒチン処理が適切であり、また比較した 3 つの手法の中で最も生存率が高い滴下法を用いることが効率的であると考えられる。

4 倍体のコルヒチン処理について

高次倍数体をより効率よく作出することを目指し、シロイヌナズナ 4 倍体についても倍数化処理を行なった。なお、4 倍体では既に 2 倍体と比較してトライコームの分岐数が増加している (4 又以上のトライコームの割合が多い) ため予備選抜は行わず、処理後に生存していた全ての個体についてフローサイトメトリーを用いて倍数性を確認した。その結果、0.5% コルヒチンで 2 日間処理した条件及び 1.0% コルヒチンで 1 日間処理の条件で 8 倍体が出作され、その作出効率は 2 倍体よりも高かった (表 1)。各処理条件における高次倍数体の作出効率の詳細を以下に示す。

0.5% コルヒチンでそれぞれ 1, 2 日間の倍数化処理を行なった結果、1 日間処理の条件では生存 5 個体中 1 個体が 5 倍体化していたのに対し、2 日間処理の条件では生存 9 個体のうち 1 個体が 5 倍体、1 個体が 6 倍体、2 個体が 8 倍体と半数近くの個体で倍数化が確認できた。2 倍体の倍数化処理では、0.5% コルヒチンで 3 日間処理した条件でのみ 8 倍体が 1

個体作出されたが、4 倍体ではそれよりも短い 2 日間で 8 倍体を作出することができた。このことは、8 倍体化に要するゲノム倍数化の回数、すなわち 2 倍体では 2 回のゲノム倍数化が必要だが、4 倍体では 1 回のみで十分であることと関連していると考えられる。

また、1.0% コルヒチンでそれぞれ 1, 2, 3, 4 日間処理した場合、1 日間処理の条件でのみ 8 倍体が得られた（生存 5 個体中 1 個体）。2 日間以上の処理条件では生存個体数が少なく、倍数化個体も確認されなかった。2 倍体の場合と同様、4 倍体においても 1.0% コルヒチン処理での生存率が低いことから、低濃度（0.5%）のコルヒチン処理の方が適切であると考えられる。

4 倍体及び 8 倍体の作出効率について

コルヒチンゲルを用いてシロイヌナズナ Columbia 系統 2 倍体を材料に 4 倍体を作出する場合、0.5% コルヒチンで 2 日間処理する条件が最も効率的であった（処理個体数の 7.5%）（表 1）。高次倍数体については、今回の倍数化処理では合計で 6 倍体を 1 個体、8 倍体は 3 個体作出することができた。特に 4 倍体を 0.5% コルヒチンで 2 日間処理した条件では、6 倍体を 1 個体（処理個体数の 2.5%）、8 倍体を 2 個体（処理個体数の 5.0%）作出することができ、最も効率的であった（表 1）。したがって、高次倍数体の作出効率は、2 倍体よりも 4 倍体を処理した方が高い。

0.5% コルヒチンを用いた浸漬法、滴下法での 2 倍体の倍数化処理の結果¹⁵⁾との比較から、ゲル法は処理後の生存率が滴下法よりも低く、生存個体数における倍数体の占める割合に大きな違いがないことを考慮すると、コルヒチンを用いた 4 倍体及び 8 倍体の作出効率について以下のような結論が得られる。いずれの倍数体についても、低濃度（0.5%）のコルヒチンの方が処理後の生存率が高く、作出効率は高い。4 倍体については、ゲル法よりも滴下法の方が作出効率が高い。8 倍体についても同様にゲル法よりも滴下法の方が作出効率が高い。それに加えて、今回のゲル法による処理の結果、2 倍体よりも 4 倍体を処理した場合の方が作出効率が高かったことから、高次倍数体を作出するためには 4 倍体を滴下法で処理することが最も効率的であると考えられる。

謝辞

本研究は、科学研究費研究（基盤研究 C）「植物の高次倍数化による根端成長と染色体動態の変化の解析」（課題番号 19K06718）の助成を受けて実施された。

文献

- 1) Otto SP and Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Ann. Rev. Genet.* **34**: 401-437.
- 2) Iwamoto A, Satoh D, Furutani M, Maruyama S, Ohba H and Sugiyama M (2006) Insight into the basis of root growth in *Arabidopsis thaliana* provided by a simple mathematical model. *J. Plant Res.* **119**: 85-93.
- 3) 岩元明敏, 杉山宗隆 (2013) 顕微鏡画像を用いた根端成長の数理モデル解析. *Plant Morphology* **25**: 67-71.
- 4) Robinson DO, Coate JE, Singh A, Hong L, Bush M, Doyle JJ and Roeder AH (2018) Ploidy and size at multiple scales in the *Arabidopsis* sepal. *The Plant Cell* **30**: 2308-2329.
- 5) Corneillie S, Storme NDe, Acker RVan, Fangel JU, Bruyne MDe, Rycke RDe, Geelen D, et al. (2019) Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiol.* **179**: 74-87.
- 6) Sattler MC, Carvalho CR and Clarindo WR (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* **243**: 281-296.
- 7) Tsukaya H (2008) Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf. *PLoS Biology* **6**: e174.
- 8) Kikuchi S and Iwamoto A (2020) Quantitative analysis of chromosome polytenization in synthetic autopolyploids of *Arabidopsis thaliana*. *Cytologia* **85**: 189-195.
- 9) Barker MS, Arrigo N, Baniaga AE, Li Z and Levin DA (2016) On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytol.* **210**: 391-398.
- 10) Spoelhof JP, Soltis PS and Soltis DE (2017) Pure polyploidy: closing the gaps in autopolyploid research. *J. Syst and Evol.* **55**: 340-352.
- 11) Chavez DJ and Lyrene PM (2009) Production and identification of colchicine-derived tetraploid *Vaccinium darrowii* and its use in breeding. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **134**: 356-363.
- 12) Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S and Das PK (2011) Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. *Sciella*. *Plant Cell Tiss. Org.* **106**: 485-493.
- 13) Limera C, Wang K, Xu L, Wang Y, Zhu X, Feng H, Sha Y et al. (2016) Induction of autotetraploidy using colchicine and its identification in radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Hortic. Sci. Biotech.* **91**: 63-70.
- 14) Storme ND and Geelen D (2011) The *Arabidopsis* mutant *jason* produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II. *Plant Physiol.* **155**: 1403-1415.
- 15) Yu Z, Haage K, Streit VE, Gierl A and Ruiz RAT (2009) A large number of tetraploid *Arabidopsis thaliana* lines, generated by a rapid strategy, reveal high stability of neo-tetraploids during consecutive generations. *Theor. Appl. Genet.* **118**: 1107-1119.
- 16) Breuer C, Stacey NJ, West CE, Zhao Y, Chory J, Tsukaya H, Azumi Y, et al. (2007) BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 3655-3668.
- 17) Touchell DH, Palmer IE and Ranney TG (2020) *In vi-*

- tro* ploidy manipulation for crop improvement. *Front. Plant Sci.* **11**: 722.
- 18) Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith DW and Price HJ (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am. J. Bot.* **86**: 609-613.

■教育論文■

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (8)

加部義夫^{1,2}

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdote of Discoveries (8)

Yoshio Kabe^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan,

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: kabe@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since the 19th century and have been widely used to modify synthetic transformation in modern organic chemistry. It is considered that many educational benefits could result in the use of reaction types and discovery for undergraduates and graduate classes in organic and organometallic chemistry. Since ancient times, the history of mercury has been closely connected with that of alchemy. Greek philosophers were the initiators of the idea of the four elements : earth, air, water, and fire, which encouraged the hope of transmuting metal to gold. Greek alchemy was started in Alexandria, Egypt in the 4th century BC. When Arabian countries, China and Japan learned of Greek alchemy by Nestrians, they introduced cinnabar (HgS) and sublimate (HgCl₂) other than mercury metal. A major break through in science was the discovery of oxygen by Priestly in the late 18th century. Priestly heated the oxide of mercury (HgO) and examined the gas and thereafter, Lavoisier recognized the combustion involved in oxygen oxidation contrary to phlogiston theory. In middle of the 19th century, Frankland identified dialkylzinc as the first organometallic compound and a variety of alkyl metals involving organomercury as a highly toxic compound, which established the valence theory of chemical compounds. In the late 19th century, the Russian chemist, Kurcherov discovered mercury-catalyzed hydration of acetylene to acetaldehyde. The reaction was applied to industrial chemistry based on coal in the early 20th century. However between World Wars I and II, the main energy resource changed from coal to petroleum oil, with modern industrial processes using organometallic catalysts such as Wacker, Oxo and Ziegler-Natta methods. Finally, reaction types of organomercurials are summarized.

Keywords: mercury, alchemy, Kurcherov, acetylene, organomercurials

はじめに

現在の有機金属化学のもとになっている 1930-1960 年代にかけてドイツで開発された 3 つの工業プロセスには (1) オキシ法、(2) Ziegler-Natta 触媒重合、(3) Wacker 法がある¹⁻⁶⁾。しかし有機金属化学の起源をたどると、18 世紀に有機化学が確立する過程でも深くかかわってきている。一方 18-19 世紀初頭までの Bunsen や Frankland などの有機金属化学の歴史をアメリカ化学会の Organometallics 誌を創刊し、

長年編集長をした Seyferth が cover essay として Organometallics 誌上に連載している。その essay を参考に引用しつつ、第 2 次大戦後 3 つのプロセスが登場するまでの歴史について今は失われてしまった「水銀 (Hg) の化学」を中心に解説する。

Hg の化学 (1)

Hg は錬金術の元素と言っても過言ではない。そのた

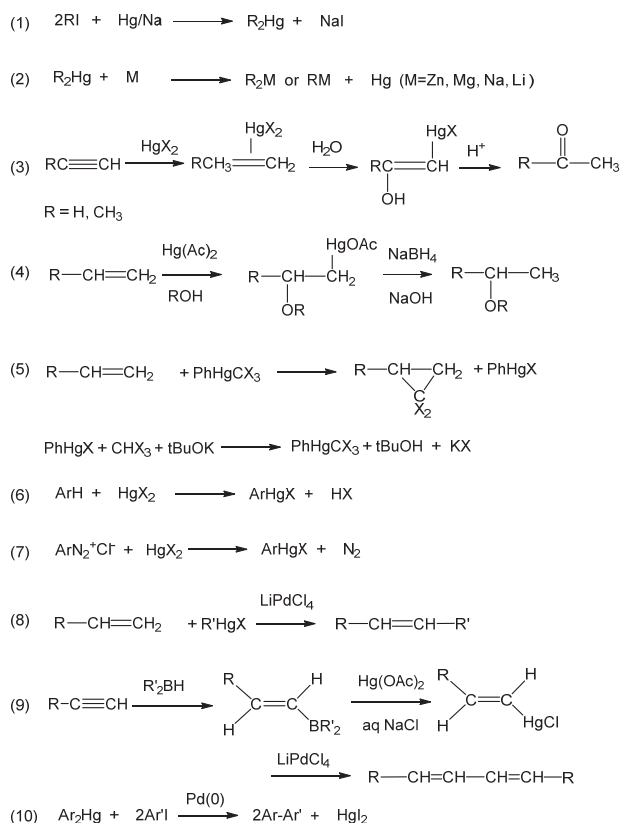


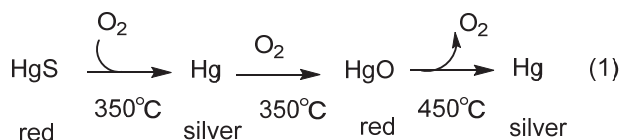
図 1. 水銀の反応. (1) Flankland の合成. (2) トランスメタル化反応. (3) アセチレンの水和反応 ($\text{R} = \text{H}$ Kucherov 反応). (4) オキシ水銀化反応. (5) カルベノイド反応 (Seyferth). (6) 芳香族のメタル化反応. (7) Nesmeyanov 反応 (8) Hg-Pd トランスメタル化反応. (9) B-Hg トランスメタル化反応. (10) クロスカップリング.

めに錬金術についてみる。詳しくは化学史の関連書籍を参照されたいが、ここでは概略を述べる^{7, 8)}。錬金術は紀元前 4 世紀にエジプトのアレキサンドリアで勃興した。ギリシャ哲学のアリストテレスの四元素説（火、空気、水、土）によると、あらゆる金属は他の金属へ変換することができると考えられ、これが錬金術の淵源になっている。錬金術はアレキサンドリアからサラセン（東ローマ、ビザンツ帝国）、そしてシリアとペルシャなどアラブ世界にネストリウス派のキリスト教徒により伝搬された。6 世紀に入るとインドから中国さらには日本までネストリウス派（景教）とともに広まった。中国とインドではもっぱら「丹薬（辰砂）」として不老不死の薬として用いられていたが、漢・唐代の歴代の皇帝が 6 人も服用して死亡したために、鉱物由来の薬剤の服用は行われなくなった^{9, 10)}。日本の奈良の大仏を塗金するための水銀の製法やアマルガム法は渡来した景教徒の宣教師によってもたらされた。一方アラビア世界の錬金術師ゲーベル（アラビア語、ジャビール、イブン、ハイ、ヤーン 8-9 世紀）は鉱物と金属は水銀と硫黄という 2 種類の前質の異なる組み合わせから生じる

二原質説を唱えた。それを理論的根拠としてヨーロッパでは後述する Newton の時代まで金属変性の試みが盛んに行こなわれることになる⁷⁾。とりわけペルシャ（アラビア）からイスラム全土に広まった錬金術は精神的な錬金術（ヘルメス思想）を否定し、物質的な錬金術が大きく発展し医学と数学（ゼロの利用、代数学）とともに近代化学の源流をつくった¹¹⁾。錬金術はギリシャ・ローマの古典とともに 2 つのルートで西欧に伝搬する。1 つは 12 世紀にスペインのイベリア半島経由で（12 世紀のルネサンス）、もう一つは 15-16 世紀ビザンツ帝国がオスマン帝国に滅ばされ多くのギリシャ人学者がイタリアに亡命した（イタリア）ルネサンスである¹²⁾。前者のときは西欧ではアラビア語文献からラテン語に翻訳するために大学が各地につくられ、ギリシャ、アリストテレスの四元素説がキリスト教に取り入れられた思弁的なスコラ哲学（科学）が講じられた。後者のときは、グーテンベルグの文化（印刷）革命と重なり、ギリシャ以来の職人やギルドにより伝えられた技芸「アルス・メカニカ」が俗語の活版印刷で広く出版されるようになる。たとえば Agricola の「デ・レ・メタリカ」や Biringuccio の「ピロテクニア」の鉱山学・錬金術や冶金学が知られている¹³⁾。この時代化学はまだ医学から分離されておらず、もっぱら錬金術者が薬剤を医療に提供してきた。Paracelsus はスコラ科学にもとづく医学書を否定し、自ら西欧中を放浪して薬として使える薬剤と治療法を探し歩いた（医療化学）¹³⁾。Stahl は硫黄原質に注目し金属灰から硫黄原質（フロジストン）を取り金属が再生するというフロジストン説を提唱した⁷⁾。燃焼に関してこのフロジストン説の立場で説明したのが Priestly で、それを否定して化学革命を担ったのが Lavoisier になる。一方聖職者や知識人の間で教育された技芸「アルス・リベラル」に満足せず実験や観察にもとづいてアリストテレス以来のスコラ科学への反論をはじめた人物たちが登場し近代科学が誕生する。たとえば物理では 16-17 世紀、Copernicus、Kepler、Galileo、Newton である。Galileo の望遠鏡はレンズ職人の知識でもって作成された。化学の分野では Priestly, Lavoisier, Boyle, Dalton らである。医学では現在の外科手術は大学では教えられず外科職人が遺体保存（ミイラ）や見世物として行っていたものを人体解剖として大学の医学に取り込んだのが Vesalius である¹⁴⁾。

水銀は赤色の丹砂（辰砂）を仮焼することで容易に得られ、水銀鉱山でその蒸気を吸引し中毒症状になることから古くからその強い毒性が知られていた。銀色の水銀はさらに空気酸化すると酸化水銀の赤色

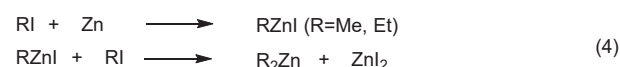
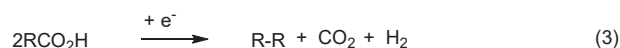
にもどり、より高温で仮焼すると再び銀色の水銀にくりかえしもどるため、復活再生、不老不死の金属とみなされたい(式1)。近代化学の発端となった Priestly と Lavoisier による酸素の発見と燃焼に



関する質量保存の法則による化学革命も酸化水銀からの酸素発生が利用されたことは注目に値する^{10, 15, 16)}。丹砂や甘コウ(HgCl₂)は結膜炎の治療薬や下剤として早くから医療で使われて、15・16世紀大航海時代に新大陸から持ち込まれた梅毒の治療薬として近代 Ehrlich のサルバルサンが使われるまで利用された¹⁶⁾。すでに16世紀西欧イギリスの Beacon は実験や観察を通して自然法則や一般原理を帰納的に導く方法論を提唱し、Boyle や Newton にその流れが及んでいる。しかし Boyle や Newton もアメリカ人の錬金術師から手ほどきされ、Newton はその錬金術師の書いた本にもっとも大きく影響されていることが化学史研究者により明らかにされている⁷⁾。そして Boyle は「懐疑的化学者」の中で、実験によって元素原質の存在を否定し、近代的元素観を確立した⁷⁾。Dalton により原子説が唱えられると、Newton の機械論的力学と補い合って粒子論的物質観が形成されることになる¹⁵⁾。一方 Newton は「光学」の31ヶの疑問の中で物質的粒子論を展開するために自ら膨大な錬金術の実験を行った。そのため彼の遺髪の中からは高濃度の水銀が検出されている。経済学者 Keynes は Newton をして最後の錬金術師と呼んだ。17世紀科学革命の後に、従来の大学とは別にアカデミア(学士院)が西欧各地に設けられ、大学人・知識人が専門職業化した。イギリスでは王立科学協会の設立に Boyle と Newton も参画している¹⁷⁻¹⁹⁾。アカデミアを支えた制度が学術誌の発行と専門学会の形成である。西欧で科学革命が起きたひとつの大きな理由と考えられている。この2つの制度は東洋の学問的な伝統からはついに生まれなかった。

近代的元素の概念と原子説が確立されると、元素の組み合わせで生じる化合物を理解するのにスウェーデンの Berzerius は電気化学的二元論を提唱した。しかし無機化合物は理解できたが、有機化合物には適用できず一元論としてフランスの Dumas のエチレン基と置換説、ドイツの Liebig と Wohler の根(ラジカル)説、同じフランスの Laurent と Gerhard らの基型説が提唱された²⁰⁾。このうち Liebig と Wohler そして後述する Bunsen はドイツ

に化学興隆をもたらした3本柱である。Liebig はフランスで Lavoisier が育てた Berthollet の弟子の GayLussac のところに留学し Dumas と一緒だった²¹⁾。Wohler は Berzerius の所に留学している。この当時錬金術で金属の化合物から金属を遊離することができるように、有機化合物も有機ラジカルを遊離の状態に取り出すことができるのではないかと考えられた。1842年 Bunsen は塩化カコジルを金属亜鉛や水銀と加熱して液体物質(b.p.170°C)を得て、これがカコジルであると考えた(式2)²²⁻²⁴⁾。当時



Bunsen の助手をしていた Kolbe もカルボン酸の水溶液の電気分解を試み、陽極から発生する気体を分析して CO₂ とともに用いられたカルボン酸からアルキルラジカル(R)を遊離できたと考えた(式3)。Bunsen の弟子のイギリスの Frankland はさらに有機ラジカルを遊離を企て、封管中でヨウ化メチルおよびエチルを亜鉛とともに加熱し得られた気体をメチル(エチル)ラジカルと主張した^{25, 26)}。これらに対して Laurent と Gerhardt らは有機ラジカルは分子の一部として存在する原子団であって遊離しようとすればラジカル同志が2個ずつ結合すると主張した。当時原子と分子がまだ区別されておらず、原子量の値も研究者によって違っていた。1860年 Liebig の弟子の Kekule と Dumas の弟子の Wurtz が第1回カールスルーエ国際会議を開催した²⁷⁾。その会議の中でイタリアの Cannizzaro が Avogadro の分子説に基づいて蒸気密度の測定から分子量が求められることを指摘した。それによって H₂、O₂、Cl₂ のような単体は2原子分子として存在し、遊離ラジカルとして考えられたカコジルやアルキルラジカルも実際は2個ずつ結合した化合物であることが明らかになった。Frankland はヨウ化アルキルに亜鉛を作用させたときに封管中に白色の結晶性物質(RZnI)と液体(R₂Zn)が生成していることに気がついた。これらの物質が空気に触れると発火し酸化亜鉛を生じ、水と反応しても酸化亜鉛と炭化水素を生成することを確かめた。最初の有機金属化合物であるジアルキル亜鉛化合物の発見である(式4)。その後 Frankland はアルキル亜鉛と種々の典型元素のハロゲン化物などとの反応を検討しアルキル金属化合物を合成した(式5-9)。このときアルキル亜鉛と同じくヨウ化アルキルと水銀ナトリウムアマルガムの直

接法で有機水銀化合物がはじめて合成された。(図 1 (1)) 有機水銀化合物は有機亜鉛化合物が熱的に安定であるけれども空気中で発火し加水分解するのに対して、熱的に不安定である以外は、空気中でも加水分解せずに取り扱えることが特徴である。しかしその毒性は甚だしく Flankland の助手がメチル水銀中毒で亡くなっている²⁸⁾。さらに有機水銀化合物は陽性な金属と容易にトランスメタル化することで別な他の有機金属化合物に変換できる(図 1 (2))。この方法で Frankland は新たな有機亜鉛化合物の合成法を見出した(図 1(2) M = Zn)。Frankland 以外の研究者も加わり、多くのアルキル金属化合物の合成がハロゲン化物との反応や金属との直接法により実現した(式 5-9)^{29, 30)}。それらアルキル金属の組



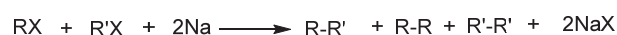
成を見るとカコジル(As)を含め種々の金属によって一定の比で結合することが示され、はじめて原子価の概念が導入された。有機ケイ素化合物も後年、Kipping により Grignard 試薬とクロロシランから合成されるより以前に、Friedel と Craft により有機亜鉛化合物から合成され、ケイ素の原子量の決定とケイ素の原子価が IV 価であることが決められた(式 6)²²⁾。すでに Kekule の弟子の Hoffman によるアミン化合物の研究や、イギリスの Williamson のアルコール・エーテル化合物の研究から窒素と酸素が III 価と II 価であることが実証されつつあった。そしてついに Kekule と Wurtz の弟子の Cooper、さらにロシアの Butlerov によって炭素の原子価が IV 価であることが明らかにされ有機化学の構造論が確立した。

Grignard 試薬が発見される以前にジメチル水銀と Mg のトランスメタル化でジアルキルマグネシウムも合成されている(図 1 (2) M = Mg)^{22, 29, 31-33)}。しかしジアルキルマグネシウムはジアルキル亜鉛化合物と同じく、空気中で発火する化合物で、とても有機合成試薬として使えるものではなかった。この点に関して Grignard は後年、Frankland が有機亜鉛化合物の合成にエーテルを溶剤として用いて調整した溶液は空気中で発火しないことに注目し、エーテルを溶媒に用いた。そして当時 Zaitsev 法と呼ばれていたヨウ化アルキルと金属亜鉛からアルキル亜鉛を反応系中で調整する方法に切り替えて Grignard

試薬の開発に成功した³¹⁾。Zaitsev はハロゲン化物の脱離のオレフィン選択性の Zaitsev 則でも知られており、前述の Butlerov の弟子にあたる。Butlerov が有機構造論を展開するのにアルコールの構造異性体を研究、Zaitsev はアルキル亜鉛を系中で調整する方法を開発し、3 級、2 級アルコールを合成した(式 10)。Zaitsev の学生が Reformatsky で α -ハロエステルから Zaitsev 法で亜鉛エノレートを生成させ、ケトン類と反応させる Reformatsky 反応を開発した(式 11)。Zaitsev の後継者がオレフィンの付加反応の位置選択性についての Markovnikov 則で知られる Markovnikov である³⁴⁾。これら一連のロシアの研究者によって Grignard 以前の有機金属化学が大きく発展した³⁵⁻³⁷⁾。



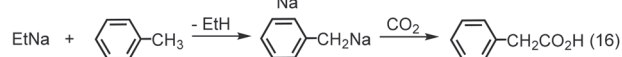
1847 年、Frankland はヨウ化エチルと金属カリウムを封管中で反応を検討したが、アルキルカリウムを確認できなかった。彼の助手の Wanklyn は同じアルカリ金属のナトリウムで試み、エーテルを溶媒として加えると反応することを確認したがエチルナトリウムではなく、当時アール錯体の概念はまだなかったが、求核性の高い亜鉛アール錯体が生成したと考えられた(式 12)^{38, 39)}。その後 Wurtz らはハロゲン化アルキルと金属ナトリウムの反応を盛んに研究した。彼は異なったハロゲン化アルキル混合物と金属ナトリウムの反応を検討して 3 種類の炭化水素が生成することから、Frankland と Kolbe のラジカルは存在せず、2 個ずつ結合することを実験的に明らかにした(式 13)。さらには Fittig がアリアルハロゲン化物との反応では、アルキルアリアル化合物が選択的に合成できることを見出し Wurtz-Fittig 反応として知られるようになった(式 14)。この方法で合



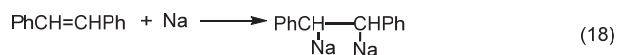
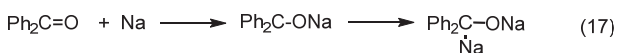
成される 2 種類さらには多置換ベンゼンの異性体の存在は Kekule のベンゼン構造を支持した。Wurtz - Fittig 反応の中間体のアルキルナトリウムはイギリスの Buckton により石油エーテル中アルキル水銀化合物と金属ナトリウムのトランスメタル化反応すると合成できることを見出された(図 1 (2) M =

Na)³⁹⁾。

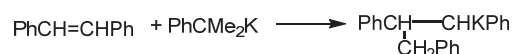
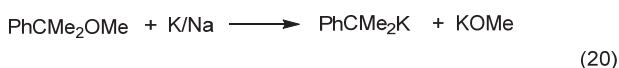
ロシアの Schorigin はエーテルを溶媒としてこの $\text{Et}_2\text{Hg}/\text{Na}$ から EtNa を調整したところ、ジエチルエーテル中では、エーテル結合が切断されることを見出した (Schorigin 反応、式 15)。これは EtNa が求核剤であるばかりでなく、強塩基としてエーテルを脱プロトンして反応が進行するためである。溶媒をトルエンにかえて求電子剤 CO_2 で補足するとフェニル酢酸が生成したのでトルエンのベンジル位がメタレーションされていることがわかった (式 16)。



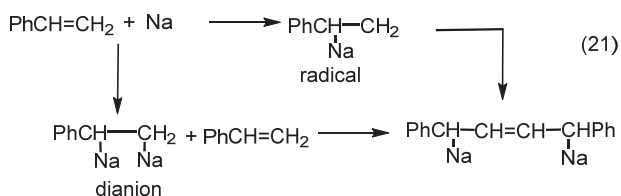
1931 年、ドイツの I G 社の研究者はフェニルナトリウムをベンゼン中でクロロベンゼンと金属ナトリウムから直接法で不溶性の懸濁液として得ることに成功した。これを Ziegler が追試、さらに Gilman らはフェニルカリウムにも適用させた。1917 年アルキル水銀とリチウム金属のトランス金属化によりアルキルリチウム化合物の合成をはじめて Schlenk らが報告した (図 1 (2) $\text{M} = \text{Li}$)。彼の実験操作は枝付のついた特別な反応管を用いて不活性ガス下で行われ、いまでは Schlenk 操作と呼ばれている⁴⁰⁾。Schlenk は今ではラジカルと考えられる三価の炭素に興味があり、ベンゾフェノンに金属ナトリウムが付加して生成するベンゾフェノンナトリウムとジナトリウム化合物を単離した (式 17)。次にオレフィンやジオレフィンについても 1,2 および 1,4-付加反応が進行することを明らかにした (式 18、19)³⁹⁾。



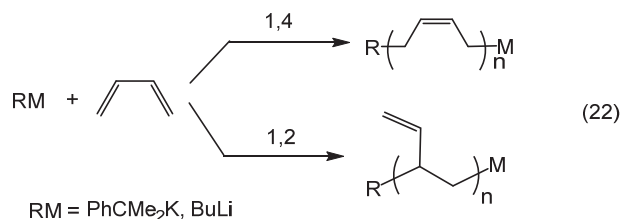
⁴⁰⁾。一方 Ziegler は Schorigin 反応を応用して、フェニルイソプロピルメチルエーテルと K/Na アマルガムからフェニルイソプロピルカリウムを合成することに成功した。そして Schlenk と同様にスチルベンとの反応を試みたところ、アルキルカリウムが二重結合に付加 (カーボメタル化) することをはじめて見出した (式 20)^{41, 42)}。Schlenk は 1, 1-ジフェニルエチレンと金属ナトリウムの反応では途中三価



の炭素 (ラジカル) が生成しその二量化反応で二量体を生成するラジカル機構を考えているのに対し、Ziegler はジナトリウム化合物のカーボメタル化反応 (アニオン機構) を提唱して対立した (式 21)。1920



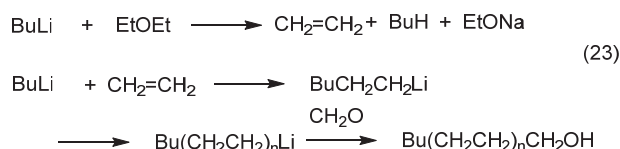
年ごろ大学や BASF の研究者により天然ゴムの単位のイソプレンでは重合しないが、ブタジエンはアルカリ金属で重合することが知られ、人工ゴムのブナの原料に使われた。Ziegler は PhCMe_2K とブタジエンの反応を調べたところ、ブタジエンが速やかに重合することを見出した。これは Schlenk の研究と同じくアルキルカリウムがブタジエンに次々と 1,4-付加して進行すると考えられた (式 22)。



1930 年 Ziegler は反応性が高く、エーテル溶媒とも反応するアルキルナトリウムやカリウムにかわり、より共有結合性で反応性も穏やかなアルキルリチウムの検討を開始した。しかしその合成は Schlenk の有毒な R_2Hg と Li のトランス金属化しかなく、炭化水素中でハロゲン化アルキルと金属リチウムの直接法によるアルキルリチウムの調整法を開発した。こうして生成したアルキルリチウムとブタジエンの反応は温度により、1, 2-付加重合が多くなる結果を与えた (式 22)⁴²⁾。

この時点でも Ziegler はフェニルナトリウムと異なりアルキルナトリウムのアルキルハロゲン化物との金属ナトリウムから合成するのは困難であると見ていた。しかし米国の Morton らは高速攪拌で過剰の金属ナトリウムディスパージョンを調整する方法を開発しアルキルナトリウムの調整を実現させている。この方法はアルキルリチウムの調整にも応用され、米国の Gilman らにより Schlenk 管にかわり三ツロフラスコ、水銀シール攪拌機、滴下ロート、ゴムロート冷却管、不活性ガス導入管など現代の有機金属化合物の合成操作が確立した³⁸⁾。Ziegler は後年、現在の MaxPlanck 研究所に移り、Schlenk の LiEt が蒸留できるとの報告をきっかけにアルキルリチウ

ムの分解を検討した。ブチリチウムを長く、沸騰エーテル中で加熱すると高級炭化水素のアルコールが生成することに気が付いた。このアルコールの生成は **Schorigin** 反応でエーテルから生成するエチレンにアルキルリチウムが次々と付加したと考えれた (式 23)。実際オートクレープ中で BuLi のエーテ

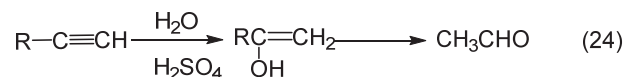


ル溶液にエチレンを圧入し、40℃に加熱すると高級炭化水素（炭素数約 10 ケ）のアルコールが生成した⁴²⁾。この後の **Ziegler** による Al の化学と **Ziegler-Natta** 触媒の発見のエピソードはすでにこのシリーズで紹介したので参照されたい⁴³⁾。

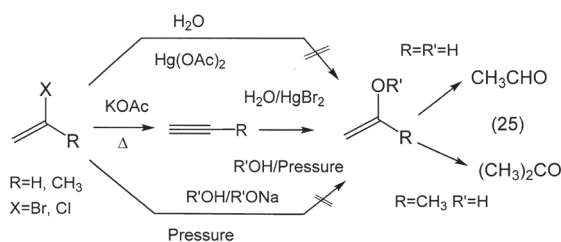
Hg の化学 (2)

次にもう一つの Hg の化学に関するエピソードについて紹介する。19 世紀 **Faraday** により電磁誘導の法則の発見で発電機・モーターが発明されると世の中は電気による第 2 次産業革命の時代に入る。化学分野も食塩電解、アルミニウム電解、銅の電解精錬、さらには **Haber-Bosch** アンモニア合成法につながる石灰窒素、電弧（アーク）法によるノルウェー硝石などの窒素肥料を合成する電気・電熱化学が登場する。これらは技術史の上からイギリスの **Swan** や米国の **Edison** が白熱灯を発明し、それまで工場や大規模施設の照明に使われていたアーク灯を化学工業に転用したことによるとされ、アークの転進と呼ばれている⁴⁴⁾。アーク放電は **Faraday** が電解質溶液の電気分解の法則を発見後、気体放電の研究を放電管を用いてたことにはじまる。19 世紀末には、放電管による陰極線の研究から X 線、放射能、電子が **Röntgen**、**Bequerel**、と **Thomson** によってそれぞれ発見されて 20 世紀以降の物理学がつけられることになる。化学分野でも 1862 年 **Lavoisier** の後継者であるフランスの **Berthollet** が炭素と水素をアーク中で直接化合させアセチレンを合成した。アセチレンと水素を反応させエチレンを合成し、硫酸で水和してアルコールを合成した。またアセチレンの縮合によりベンゼン、CO₂ を還元して CO にしそれから蟻酸を合成した。この後アセチレンは尿素の合成で生氣論を否定したことで知られる **Wholer** によりカーバイド CaC₂ と水から合成できることが見出された。**Berthollet** も有機合成における重要な基本反応を発見することで「有機物を支配する化学力は無機物を支配する化学力と全然同一である」として生氣論を

完全にとどめをさした⁴⁵⁾。**Berthollet** はアセチレンの酸触媒水和反応の生成物に対して、エチレンと同じくビニルアルコールを考えたが、しかしプロピンの水和反応でアセトンが生成することからケトエノール互変異性でアセトアルデヒドが生成すると訂正した (式 24)。その後 **Zeitsev** と **Linnemann** は対

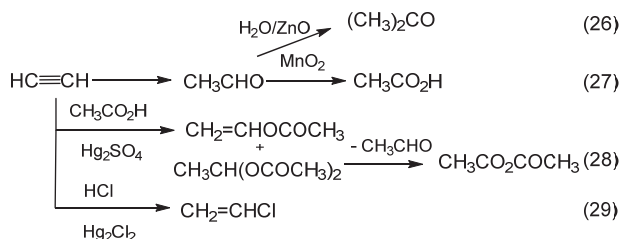


応するビニル臭化物と Hg(OAc)₂ を反応させるとアセトアルデヒドとアセトンが生成することを見出した (式 25)。ロシアの **Kucherov** は、ビニル臭化物の求核置換反応は起きないことから、彼らの報告に疑問をもった。脱臭化水素してアセチレンとプロピレンを生成し、次に水銀触媒でアセチレンとプロピレンが水和されてアセトアルデヒドとアセトンが生成することを見出した (**Kucherov** 反応, 図 1 (3))^{46, 47)}。



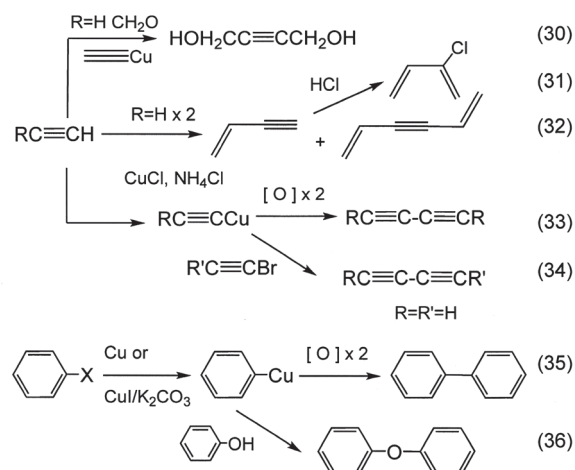
20 世紀に入り、1914 年第 1 次世界大戦前後でコークス製鉄のための石炭乾留で副生するタール工業からだけでは有機薬品をまかなうことができずカーバイドアセチレンを原料とするアセチレン工業がはじまる。すでに 1894 年にはフッ素の発見で知られているフランスの **Moisson** がカーバイド合成の反応式を確立し、カーバイドからの石灰窒素肥料の合成も開始された。しかし **Kucherov** 反応の工業化は生成するアセトアルデヒドの回収法と触媒活性維持という 2 つの問題があり 1910 年前後まで工業化は試みられなかった。アセトアルデヒド合成の工業化が 1916 年ドイツで開始されたのは過剰なアセチレン吹き込みによるアセトアルデヒドの回収法の確立によってである。水銀触媒の活性が損失するのはアセチレン水和反応の副反応のためであり、それは解決されなかった。そのために水銀がスラッジあるいは廃水中に含まれて放出され重大な水銀汚染を引き起こした。1950 年代に入って日本では水俣病が発生して公害問題を引き起こした^{45, 48)}。アセトアルデヒドからはアセトン、酢酸が合成された (式 26、27)。アセチレン系有機合成工業の多くは **Kucherov** 反応と同じく水銀触媒によるアセチレンへの付加反応が利用されている。レーヨン（酢酸セルロース）の原料の無水酢酸、高分子原料の酢酸ビニル、塩化ビニル

などその例である (式 28、29)。アセチレン系有機合成工業は第2次世界大戦下のドイツで最高度まで展開しいわゆるアセチレンの高圧下で反応させる Reppe 合成である⁴⁹⁾。



1928 年ごろ BASF の Reppe はビニルエーテルの合成に着手し、塩化ビニルとアルコールカリ (金属ナトリウムのアルコール溶液) を加圧缶内で反応させ、ビニルエーテルの合成を開発した (式 25)。この反応の副生成物として生じる少量のアセチレンは、反応が高温かつアルカリの存在において長時間たもつと減少することを発見し、アセチレンもアルコールと直接、接触反応する着想に到達した。かくして 1930 年アセチレンとメタノールを 20-22 気圧 160-165℃、加性アルカリを触媒とするビニルエーテルの工業的合成法 (Reppe 反応) が完成された (式 25)⁴⁸⁾。発見の経緯はビニルハロゲン化物の求核置換反応は起きないとして、ハロゲン化水素の脱離で生成するアセチレンとの直接付加反応を考えた Kucherov 反応の発見とまったく同じである⁵⁰⁾。この他、高圧アセチレンとアセトン、アルデヒドを反応させるエチニル化反応、ニッケルカルボニルの金属触媒下 CO の高圧反応からアクリル酸エステルを合成するカルボニル化反応、さらにアセチレンを 3-4 分子重合させるベンゼン、シクロテトラエン (COT) の合成の特許が出願された^{45, 48-50)}。これら Reppe 合成についてはすでにこのシリーズで紹介したので参照されたい⁵¹⁾。Reppe 反応のエチニル化反応は実験室では Grignard 試薬または液体アンモニアでつくった NaNH₂ との反応 (Newland 法) で生成するアセチレン Grignard またはアルカリ金属誘導体とアルデヒド、ケトンを反応させてプロパルギルアルコール誘導体を合成する反応である⁵²⁾。これに対して Reppe はホルムアルデヒドに銅アセチリドを触媒としてアセチレンを反応させてプロパルギルアルコールをさらには人工ゴムのブナの原料である 1,4-ブチンジオール合成に成功した。爆発性のアセチル金属を工業触媒に用いることに驚かされる (式 30)。末端アセチレンの銅アセチリドは酸化するとジアセチレン誘導体を与えることが 1869 年 Glaser により発見されている⁵³⁾。酸化剤として空気、アルカリ性フェリシア化カリウムなどが用いられる。爆

発性なために単離せずに末端アセチレンを塩化銅・塩化アンモニウム存在下酸素または空気直接酸化する改良法が Salkind^{54, 55)} と Reppe や Jones⁵²⁾ により見いだされた (式 33) 銅アセチリド、アリール銅などの有機銅を中間体とする反応は非対称なジアセチレン化合物の合成 (Cadiot Chodkiewicz 反応 式 34)、対称ビアリール誘導体の合成 (Ullman カップリング反応 式 35) や非対称ジフェニルエーテルの合成 (Ullmann 縮合 式 36) へ発展した⁵⁶⁻⁶⁰⁾。Glaser カップリングの塩化銅・塩化アンモニウム試

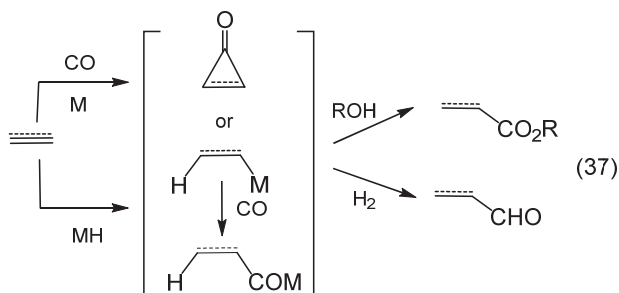


薬はこの後同じアセチレン化学の米国の研究者の名前をとって Newland 試薬と呼ばれることになる (式 32)。それはこの試薬を酸性条件下で用いるとビニルアセチレンが生成し (Straus カップリング) その副生成物のジビニルアセチレンが重合してゴムになることを Newland が見いだしたことに由来する。しかしジビニルアセチレンは空气中に長く接触すると爆発性の過酸化化物となり、合成ゴムの開発に乗り出し DuPont 社でも工場爆発に見舞われた。1928 年 Dupont 社の Carothers はビニルアセチレンに偶然に HCl が付加しクロロプロレンを生成し重合して耐油性のゴムになることを発見した (式 31)^{61, 62)}。

19 世紀はじめ石油がアメリカ、ロシアそしてインドネシアで発見され、おもに灯油として利用されてきた。第1次世界大戦後、敗戦国のトルコのアラビアの石油利権が欧米の戦勝国に譲渡されて中近東の油田開発が開始された。石油 (ガソリン) が工場と内燃機関・エンジン (自動車) の動力として利用されると、白熱灯の普及で需要が落ちた石油はエンジンの燃料として再び需要が増大した。石油の低沸点のガソリン留分を多く得るために石油の分解が起こなわれ、そのとき副生する分解ガス (エチレン、プロピレン) を利用するために石油化学工業がはじまった。石炭アセチレンから石油エチレンへの製造法の

転換である⁴⁵⁾。Kucherov 反応にもとづくアセチレンの水銀法アセトアルデヒドの合成がエチレンからの Wacker 法^{63, 64)} アセトアルデヒド合成に変換された。Wacker 法についてはすでにこのシリーズでも紹介したので参照されたい⁶⁵⁾。その発見のきっかけは 1827 年 Zeise が見出した白金 (IV) のエチレン錯体 (Zeise 塩)^{66, 67)} の加水分解でアルデヒドが生成することにはじまる。また Reppe 反応にもとづくアセチレンのカルボニル化合物の合成が石油の分解ガスのプロピレンの酸化 (アンモ酸化、SOHAI 法) やエチレンのコバルト触媒 Oxo 法に変換された。Oxo 法 (Rohlen 法)⁶⁸⁻⁷⁰⁾ についてもこのシリーズで紹介している⁵¹⁾。

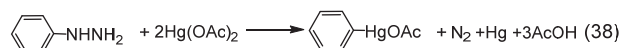
その発見のきっかけは第 2 次大戦中、石油に枯渇したドイツが石炭の液化や CO と H₂ から人工石油を合成する Fischer-Torppsch 法を開発し、その研究の中から見出された。その当時 Reppe はアセチレンのカルボニル化をシクロプロペノン中間体と求核剤との反応を提唱したが、エチレンのカルボニル化についても飽和のシクロプロパノン中間体の反応が考えられていた (式 37)。このカルボニル化の反応



がコバルトヒドリド錯体 (MH) によるヒドロメタリ化と続く挿入反応であるという反応機構を解明したのが Heck 反応で知られる Heck である⁷¹⁾。

以上 Frankland のアルキル水銀化合物の合成と Kucherov 反応の水銀触媒によるアセチレン水和反応に関する水銀の化学について見てきたが、19-20 世紀にかけていろいろな有機水銀化合物の合成法が確立された⁷²⁻⁷⁵⁾。オレフィンと水銀塩の反応 (オキシ水銀化) も最初に研究したのも Kucherov で 1892 年である⁷⁶⁾。20 世紀に入りヒドロホウ素化で知られる Brown はオキシ水銀化で最初に生成する β ヒドロキシ水銀化合物を単離することなく NaBH₄ で還元的に脱水銀化した。生成物はオレフィンからはじめると Markovnikov 付加したアルコールでヒドロホウ素化が AntiMarkovnikov 付加なので相補的なアルコールになる (図 1(4))^{73-75, 77, 78)}。さらに 1959 年亜鉛とジオーメタンでオレフィンがメチレン化される反応が duPont 社の研究員により発見されて

Simon-Smith 反応として知られているが、その発見からわずかに数年遅れて Seyferth らにより水銀の α-ハロアルキル誘導体からオレフィンへのカルベン移動反応が見だされた (図 1(5))^{73-75, 79)}。原料のハロアルキル水銀誘導体はトリハロメタンを塩基存在下、α-アルキル水銀ハロゲン化物と置換反応させることで容易に得られる。Liebig の弟子で渡英し染料の合成で有名な Perkin を育てたのが Hoffman である。1843 年に Hoffman が Frankland よりも早くにアニリンの水銀化を試みているが、残念ながら N-水銀化合物であるのか C-水銀化合物あるのかどうか不明である⁸⁰⁾。一般に芳香族化合物は容易に水銀塩で直接水銀化される (図 1(6))。しかし位置選択性がない。Liebig の弟子で先生のベンゼン構造を実証した Bayer、そしてその弟子でグルコースの立体配置を決定しペプチド合成で生化学分野を開いたのが Fischer である。その Fischer がアリールヒドラジンと酢酸銀と銅触媒存在下反応させるとアリール水銀化合物を位置選択的に合成した (式 38)⁸¹⁾。中間体



にジアゾニウム塩が関与していると考えられる。この反応は後年ロシアの Nesmeyanov によりヒドラジンと酢酸銀の反応さらには芳香族ジアゾニウム塩と水銀塩の反応で高収率で芳香族水銀化合物を合成する方法に発展した (図 1 (7))。このジアゾニウム塩を原料とする反応は水銀以外の種々の典型金属 (元素) にも適用でき、一般に Nesmeyanov 反応と呼ばれている⁸¹⁾。水銀化合物と Pd 金属とのトランスメタル反応は容易に起き、Heck 反応の開発やクロスカップリングにつながった (図 1(8),(10))。さらにホウ素化合物と水銀化合物のトランスメタル化の塩基添加が鈴木-宮浦クロスカップリング反応の開発 (図 1 (9))につながった。これらについては次回紹介する。

おわりに

18-19 世紀の有機金属化学について今は失われてしまった「水銀 (Hg) の化学」を中心に解説した。Frankland のアルキル亜鉛の研究が原子価の概念を導き、と同時に毒性のアルキル水銀化合物も誕生させた。有機水銀化合物はその毒性にもかかわらず空气中で安定で取り扱いが容易でトランスメタル化して RLi などの合成にひろく利用された。一方 Kucherov の見出した水銀触媒によるアセチレンの水和反応が石炭からカーバイドアセチレン工業をつくった。石炭から石油へのエネルギー転換で、有機化学工業もアセチレンからエチレンへの製造法の転換が進められ、遷移金属触媒に関連した 3 つのプロセス (1) オ

キゾ法、(2) Ziegler-Natta 法、(3) Wacker 法も誕生した。

文献

- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (1). 化学 33:531.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (2). 化学 33:617.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (3). 化学 33:709.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (4). 化学 33:789.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (5). 化学 33:875.
- 辻 二郎 (1978) 有機金属化学ノート (完). 化学 33:965.
- 化学史学会編 (2019) 化学史への招待. オーム社. 東京.
- ローレンス M プリチーペ [ヒロ・ヒライ訳] (2010) 錬金術の秘密 再現実験と歴史学から明かされた「高貴なる技」. 勁草書房, 東京.
- 安田徳太郎 (1977) 化学史のすすめ. 化学教育 25: 96-98.
- 島澤なみ子 (2005) 人類は水銀をどのように利用してきたか—科学史における水銀の役割—. 化学と教育 53: 148-150.
- 伊藤俊太郎 (2007) 近代科学の源流, 中公文庫. 中央公論新社, 東京.
- 澤井繁男 (2001) イタリアルネサンス, 講談社現代新書. 講談社, 東京.
- 山本義隆 (2003) 磁力と重力の発見 2 ルネサンス. みずさ書房, 東京.
- 下田 淳 (2014) 「棲み分け」の世界史. NHK ブックス. NHK 出版, 東京.
- 島尾永康 (1976) 物資理論の探求 —ニュートンからドールトンまで—, 岩波新書. 岩波書店, 東京.
- Parsons MB and Percival JB (2005) A brief history of mercury and its environmental impact. In: *Mercury: Sources, Measurements, Cycles and Effects Short Course, Vol. 34*. Parsons MB and Percival JB, eds., Mineralogical Association of Canada, Canada. pp. 1-20.
- 小山慶太 (2020) 高校世界史でわかる科学史の核心, NHK 出版新書. NHK 出版, 東京.
- 中山 茂 (2013) パラダイムと科学革命の歴史, 講談社学術文庫. 講談社, 東京.
- 佐藤満彦 (2020) ガリレオの求職活動, ニュートンの家計簿, 講談社学術文庫. 講談社, 東京.
- 化学の原典 10 (1976) 有機化学構造論. 学会出版センター, 東京.
- 小幡弥太郎 (1969) 化学のあゆみ. 化学教育 17: 398-402.
- 竹林松二 (1982) 私の化学史研究—その目的とおもしろさ—. 化学教育 30: 116-120.
- Seyferth D (2001) Cover essay: Cadet's fuming arsenical liquid and cacogyl compounds of Bunsen. *Organometallics* 20: 1488-1498.
- Thayer JS (1966) Cadet's fuming liquid an historical survey. *J. Chem. Educ.* 43: 594-595.
- Seyferth D (2001) Cover essay: Zinc alkyls, Edward Frankland, and the beginnings of main-group organometallic chemistry. *Organometallics* 20: 2940-2955.
- Thayer JS. (1969) Historical origins of organometallic chemistry part II, Edward Frankland and diethylzinc. *J. Chem. Educ.* 46: 764-765.
- 有本建男 (1997) 科学技術の体制を築いた人々, ドイツカールスルーエで開かれた第 1 回国際化学会議とケクレおよびヴッツの貢献. 情報管理 40: 716-718.
- 入口紀男 (2013) 熊本大学文書館<水俣病>研究プロジェクト. 19 世紀にロンドンで起きた有機水銀中毒症. [www.Asoshiranui.net/minamata/semin05.html].
- Seyferth D (2003) Cover essay: The rise and fall of tetraethyllead. 1. Discovery and slow development in European universities, 1853-1920. *Organometallics* 22: 2346-2357.
- Seyferth D (2003) Cover essay: The rise and fall of tetraethyllead 2. *Organometallics* 22: 5154-5178.
- Grignard V [丸山 和博, 山上佐知子 訳] (1971) 溶液中の有機マグネシウム化合物およびその酸、アルコール、炭化水素合成上の応用. 化学 26: 489-506.
- Reinold H (1950) Fifty years of the Grignard reaction. *J. Chem. Educ.* 26: 476-488.
- Seyferth D (2009) Cover Essay: The Grignard reagents. *Organometallics* 28: 1598-1605.
- Beletsukaya IP and Nenajdenko VG (2019) Towards the 150th anniversary of the Markovnikov rule. *Angew. Chem.* 131: 4828-4839.
- Lewis DE (1994) The university of Kazan-Provincial cradle of Russian Organic Chemistry Part II: Aleksandr Zaitsev and his student. *J. Chem. Educ.* 71: 93-97.
- Meyer K and Brauschweig H (2018) Organometallic chemistry in Europe. *Organometallics* 37: 625-627.
- Carreira EM, Nenajduenko VG, Miller PJ, Chirik PJ and Meyer K (2020) From Russia, with chemistry. *Org. Lett.* 22: 765-767.
- Seyferth D (2006) Cover essay: Alkyl and aryl derivatives of the alkali metals: Useful synthetic reagents as strong bases and potent nucleophiles. 1. Conversion of organic halides to organoalkali-metal compounds. *Organometallics* 25: 2-24.
- Seyferth D. (2009) Cover essay: Alkyl and aryl derivatives of the alkali metals: Strong bases and reactive nucleophiles. 2. Wilhelm Schlenk's organoalkali-metal chemistry. The metal displacement and the transmetalation reactions. Metalation of weakly acidic hydrocarbons. Superbases. *Organometallics* 28: 2-33.
- Tidwell TT (2001) Wilhelm Schlenk: The man behind the flask. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 331-337.
- Ziegler K (1968) A forty year's stroll through the realms of organometallic chemistry. *Adv. Organomet. Chem.* 6: 1-17.
- 大塚齊之助 (1959) オレフィン類の重合—Ziegler の研究. 化学の領域 13: 137-145.
- 加部義夫 (2018) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (5). *Sci. J. Kanagawa Univ.* 29: 113-119.
- 大谷杉郎 (1963) 新工業化学概論. 裳華房, 東京.
- 加藤邦興 (1980) 化学の技術史. オーム社, 東京.
- Rulev AY and Ponomarev DA (2019) Mikhael Kucherov; The experiment confirmed my hypothesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58: 7914-7920.
- 竹林松二 (1988) アセチレンの水和反応—その発見と解明の過程. 化学史研究 1: 8-12.
- 高橋武雄 (1973) 化学工業史. 産業図書, 東京.
- Reppe W. [吉河清、山本一美 訳] (1955) レッペ反応とその工業化. 丸善株式会社, 東京.
- Trotus I-T, Zimmermann T and Schüth F (2014) Catalytic reactions of acetylene: A feedstock for the chemical industry revisited. *Chem. Rev.* 114: 1761-1782.

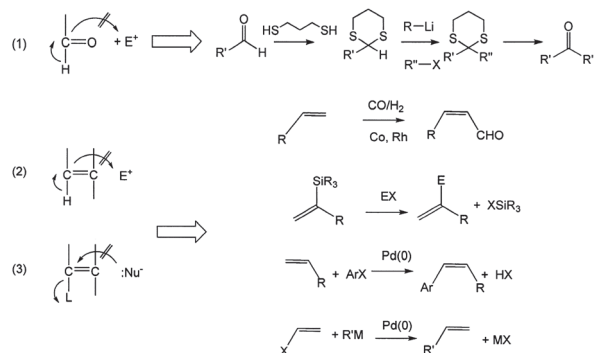
- 51) 加部義夫 (2018) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (4). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 107-111.
- 52) 中川正澄 (1961) アセチレン系化合物の反応. *有機合成化学協会誌* **19**: 2-19.
- 53) Siemesen P, Livingston RC and Diedrich F (2000) Acetylenic coupling: Powerful tool in molecular construction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 2632-2657.
- 54) 国近三吾, 岡伸三郎 (1958) アセチレン化合物の酸化 2 分子縮合. *工業化学雑誌* **61**: 13-16.
- 55) 国近三吾, 鈴木仁美 (1964) 酸化的カップリング. *有機合成化学* **22**: 91-104.
- 56) 伊藤賢一 (2014) 「銅の化学」と有機合成における利用. *化学と教育* **62**: 84-87
- 57) Shidhu KS and Anikumar G (2014) Recent advances and application of Glaser coupling employing greener protocols. *RSC Adv.* **4**: 27867-27887.
- 58) Sindhu KS, Thankachan AP, Sajitha PS and Anikumar G (2015) Recent developments and applications of the Cadiot-Chodkiewicz reaction. *Org. Biomol. Chem.* **13**: 6891-6905.
- 59) Sperotto E, van Klink GPM, von Koten G and de Vries JG (2010) The mechanism of the modified Ullman reaction. *Dalton Trans.* **37**: 66-71.
- 60) Monnier F and Taillefer M (2009) Catalytic C-C, C-N and C-O Ullmann-type coupling reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 6954-6971.
- 61) 高橋武雄 (1952) 化学工業における難問題解決法. *生産研究* **4**: 479-6482.
- 62) 古川淳二 (1989) 合成ゴム・その歴史と将来. *日本ゴム協会誌* **62**: 193-203.
- 63) Reinhard J (2009) A acetaldehyde from ethylene-A retrospective on the discovery of the Wacker process. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 9034-9037.
- 64) 安藤能久 (1962) ヘキストワッカー法について. *有機合成化学* **20**: 1033-1044.
- 65) 加部義夫 (2019) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (6). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **30**: 111-118.
- 66) Thayer JS (1969) Historical origins of organometallic chemistry part I. Zeise's salt. *J. Chem. Educ.* **46**: 442-443.
- 67) Seyferth D (2001) Cover essay: $[(C_2H_4)PtCl_3]^-$, the anion of Zeise's salt, $K[(C_2H_4)PtCl_3] \cdot H_2O$. *Organometallics* **20**: 2-6.
- 68) Cornils B, Herrmann WA and Rasch M (1994) Otto Rolén, Pioneer in industrial homogeneous catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**: 2144-2163.
- 69) 二階堂行徳 (1955) オキシ反応の理論とそその発展経緯に就いて. *有機合成化学協会誌* **13**: 341-351.
- 70) 久野賢治郎 (1977) オキシ反応技術の進歩. *有機合成化学協会誌* **35**: 683-688.
- 71) Heck R (1969) Addition of transition metal compounds. *Acc. Chem. Res.* **2**: 10-16.
- 72) Makorova LG [阪東憲一郎他 訳] (1974) 有機金属化合物の反応 II. 講談社, 東京.
- 73) Larock LG (1978) Organomercury compounds in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **17**: 27-37.
- 74) Larock LG (1982) Organomercury in organic synthesis. *Tetrahedron* **38**: 1713-1754.
- 75) 上村 栄 (1978) 元素の特性と有機合成 水銀、タリウムと有機合成. *化学* **34**: 786-792.
- 76) Larock RC (1986) *Sovomercuration/Demercuration Reaction in Organic Synthesis*. Springer, Berlin.
- 77) 市川克彦 (1963) 水銀塩-オレフィン付加化合物の化学. *工業化学雑誌* **66**: 1037-1041.
- 78) 稲本直樹 (1963) 有機水銀化合物の反応 *有機合成化学*. **26**: 551-562.
- 79) Eisch JJ [桜井英樹 訳] (1969) *有機金属化合物の化学*. 廣川書店, 東京.
- 80) 飛田満彦 (1964) 芳香族の水銀化反応. *有機合成化学* **22**: 339-356.
- 81) 近畿化学工業会 有機金属化学部会編集 (1961) *有機金属の化学と応用*. 朝倉書店, 東京.

加部義夫^{1,2}Yoshio Kabe^{1, 2}

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: kabe@kanagawa-u.ac.jp

Keywords: Heck reaction, Kharasch, cross coupling, nickel, palladium catalyst

すでに解説した3つ目の(3)オキソ法や、今回解説



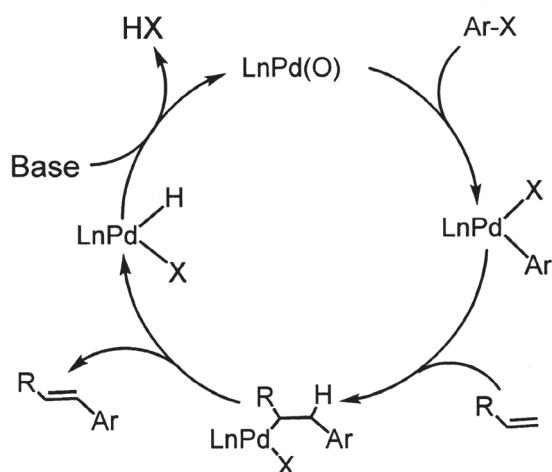
©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

する Heck 反応やクロスカップリング反応は直接的な反応である。今回これら 2 つの反応について解説する。

Heck 反応

1960 年 Heck は米国の Hercules 社で、有機金属化学の基礎的研究を行っていた。Oxo 法の反応機構を解明すると、同僚の Henry がパラジウム触媒 Wacker 法の反応機構の研究をしているのに影響されて、次にパラジウムによる有機水銀化合物のビニル化反応を 1968 年ごろから研究した^{4,5)}。この反応は水銀とパラジウムのトランスメタル化とカーボパラデーション、 β -水素脱離から成っていて、パラジウム触媒種は II 価の反応である (式 1)⁵⁾。そのため同じ頃に開発された藤原反応のように高価なパラジウムを量論で使う欠点があり、酸化剤を用いて Pd(0) を Pd(II) にもどしても毒性のある水銀化合物

(1)



(2)

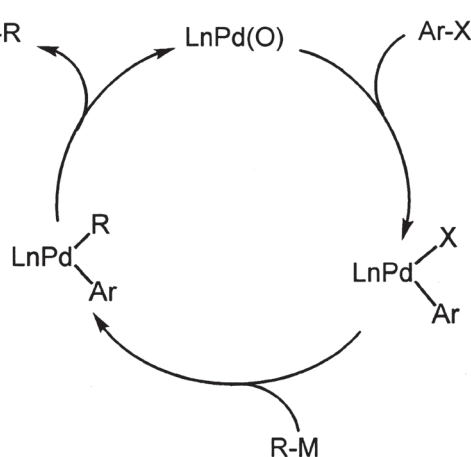
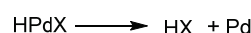
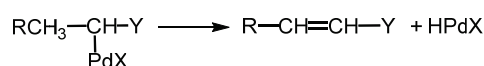
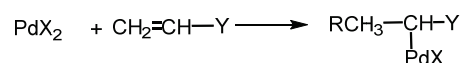
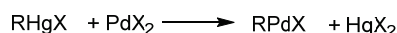
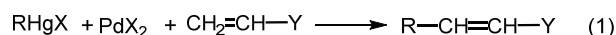
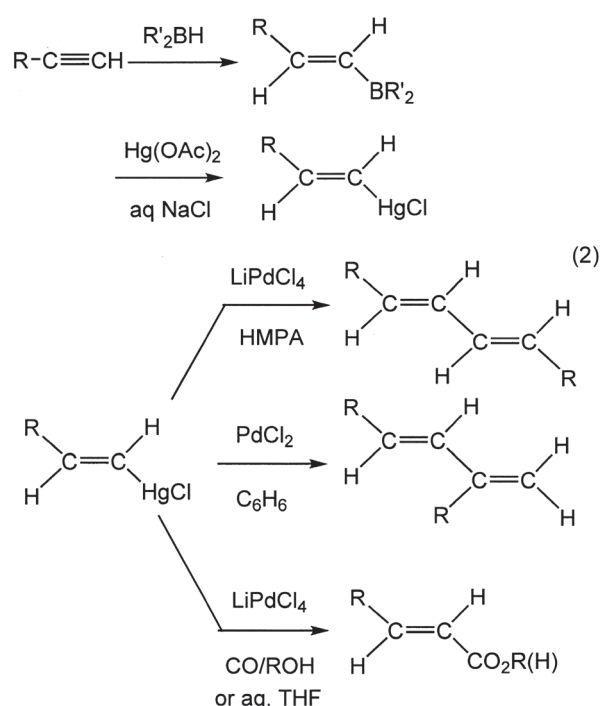
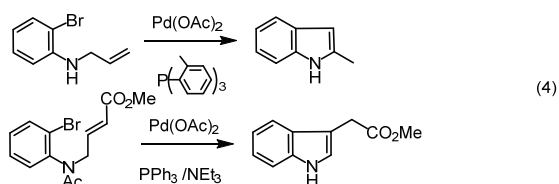
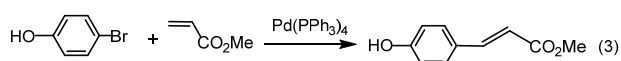


図 2. Pd(0) の触媒反応 (1) Heck 反応. (2) クロスカップリング反応.

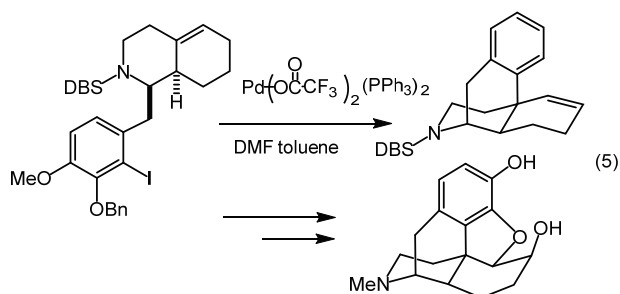


を使う欠点は解決できない。一方、Brown の弟子の Larock もヒドロホウ素化で生成した有機ホウ素化合物と水銀とのトランスメタル化を見出し、この Heck 反応を参考にジエン化合物やカルボニル化したアクリル酸誘導体の合成を報告した (式 2)⁵⁾。水銀の毒性を克服する意味で、同じく 1968 年にヨウ化アリールと Pd(0) に酸化付加できることが報告された⁶⁾。さらに 1971 年には東工大の溝呂木がパラジウムが β 水素脱離して生成するパラジウムヒドリドが塩基でパラジウム (0) に分解されるのでヨウ化アリールと Pd(0) で触媒的に反応が進行することを日本化学会の欧文誌に速報として報告した⁷⁾。いずれも Heck が見つけた量論的ビニル化で考えている中間体である。残念ながらこの後溝呂木は早世してしまう。Heck が水銀化合物をアリールヨウ化物に、パラジウムを 0 価にかえて、いわゆる溝呂木・Heck 反応を完成させる (図 2 (1))^{8,9)}。Heck は会社をリストラされたために 1971 年に退社して Delaware 大学に

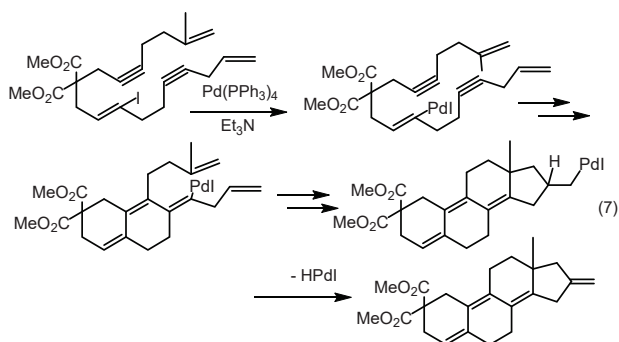
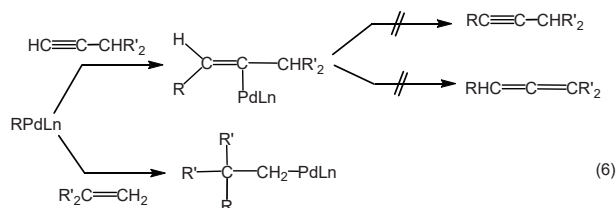




移ってこの触媒反応の論文の第1報を1972年に *J. Org. Chem* 誌に発表する。溝呂木の論文を冒頭に引用し研究者としての誠実さを示した^{10, 11)}。Heck らはヒドリドパラジウムの分解で生成する酸を補足するために Et_3N を用いてケイ皮酸の合成に応用している(式3)¹¹⁾。Heck 反応は有機合成の方法論を大きく変えることになった。たとえば Hegedus, 森・伴らによりインドールなどの複素環合成へ応用された。(式4)^{12, 13)}。Overman らはモルヒネの合成に Heck 反応を利用している(式5)¹⁴⁾。Heck 反応でカーボ



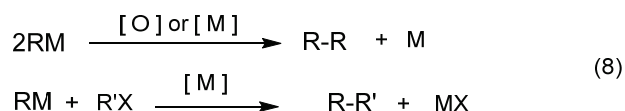
パラデーション後、 β 水素脱離が起き難いまたは β 水素がないときどうなるだろうか。三重結合や多置換二重結合へのカーボパラデーションでは β 水素脱離が起きず、アルキルパラジウム中間体がリビング



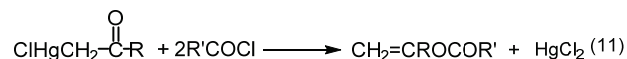
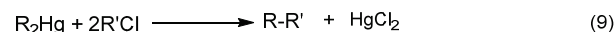
で存在する(式6)。根岸らはリビングのパラジウム中間体の連続的なカーボパラデーションより縮合多環化合物がワンポットで合成できることを見出している(式7)¹⁵⁾。

クロスカップリング反応

有機金属化合物(RM)を炭素-炭素結合生成反応に利用するとき、2通りの反応タイプが考えられる(式8)。1つはホモカップリング二量化反応で、もう1つはクロスカップリング反応である。反応は酸化剤[O]または触媒[M]により進行する。有機水銀化合物とハロゲン化合物のカップリングは古く1872年



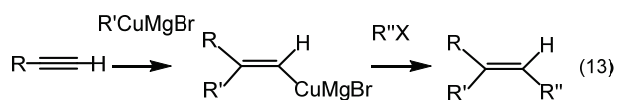
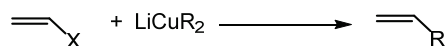
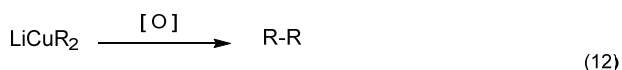
に Kekule により Ph_2Hg と PhCHCl_2 と反応が試みられているが、触媒がない反応なので、 150°C 高温で低収率ながら Ph_3CH が得られている(式9)¹⁶⁾。以来多くの水銀化合物について研究がなされた。酸ハロゲン化物では有機亜鉛化合物やカドミウム化合物と同じようにケトンも生成するも低収率である(式10)。水銀のエノレートと酸ハロゲン化物との反応では O -アシル化されビニルエーテルが生成する(式11)¹⁶⁾。



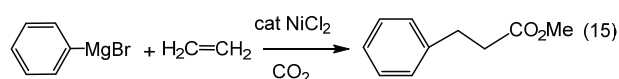
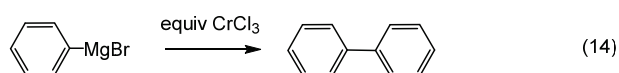
一般に有機水銀化合物 R_2Hg に遷移金属化合物を加えてもトランスメタル化した有機遷移金属化合物は得られず、 R_2Hg が分解してホモカップリング生成物を与える¹⁶⁻¹⁹⁾。前節でみたような Pd を用いると触媒量・室温で Hg から Pd にトランスメタル化することで Heck 反応や Larock の反応のようにカップリングが進行する。そしてビニルハロゲン化物やビニルホウ素化合物からクロスカップリングやホモカップリング生成物を与える。1970年代、Grignard 試薬、有機亜鉛化合物、有機スズ化合物、有機ホウ・ケイ素化合物のハロゲン化物とパラジウム触媒クロスカップリング反応が登場するが、80年に少し遅れて有機水銀化合物もロシアの Beletsukaya らにより検討されたが、その毒性のために実用にはならなかった²⁰⁾。

水銀の次にカップリング反応に使われた金属が銅である。Ziegler らにより直接法によるアルキルリチ

ウムが利用できるようになると、Gilman らによりリチウムアート錯体が導入され、銅アート錯体を用いるホモカップリングやクロスカップリングが Corey らにより報告された (式 12)²¹⁾。さらに Grignard 試薬銅アート錯体がアセチレンに付加する反応が Normant らにより報告されている (式 13)。しかしながらこれらの銅アート錯体を用い反応は量論反応で基質と等量の銅錯体を用いる反応である。銅アート錯体と求核性の強い Grignard 試薬やリチウム化合物以外に近年、広い範囲の有機金属化合物の組み合わせが検討されている²²⁾。

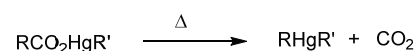
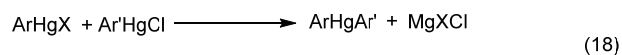
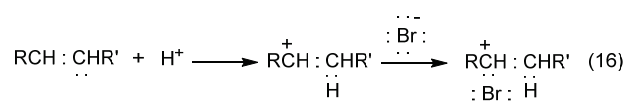


パラジウム触媒クロスカップリングにつながる Grignard 試薬と遷移金属化合物の反応をはじめて研究したのは誰だろうか。Sniekus のクロスカップリングの歴史をまとめた総説²³⁾によるとフランスの Turner が 1914 年 Grignard 試薬と量論量の CrCl_3 と反応させるとホモカップリングしてビフェニルを生成することを見出している (式 14)。 NiCl_2 や CoCl_2 , AgBr などの存在でも同様にビフェニルの生成を Gilman が確認している²⁴⁾。さらに Corriu は両大

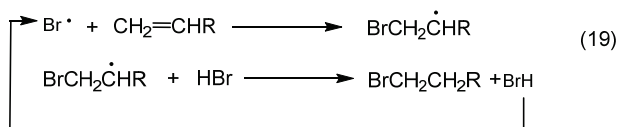


戦中にフランスの Job がフェニル Grignard と触媒量の NiCl_2 を反応するとエチレンを吸収してフェネチルカルボン酸を生成することを指摘し、この報告が遷移金属を触媒的にクロスカップリングした最初であるとしている²³⁾。これら先駆的な研究ではなくその後のクロスカップリング研究にもっとも影響を及ぼしたのは米国の Kharasch である。1940 年代彼は Grignard 試薬に対する触媒量の遷移金属の添加を精力的に研究した。その当時 Kharasch は Chicago 大でラジカルの化学を研究していた²⁵⁾。Robinson、Ingold の有機電子論はまだなかったのでアルケンへの HBr の付加に対する Markovnikov 則 (臭素は置換基の多い側に付加する) を説明するために、Lewis

のオクテット則を適用した (式 16)。すなわち分極した (孤立電子対が片寄った) 結合にプロトンが付加して反応が進行すると考えた。^{26,28)} この分極の方向はアルケンの置換基 (R と R') の電気陰性度によって決まる。実際に非対称ジオルガノ水銀化合物の塩化水素による切断が検討された。水銀との結合を切りプロトンと結合した置換基の R' の方が水銀との結合を保持した置換基 R よりも電気陰性度が高いと解釈された (式 17、Kharasch 系列)。その順番はアリール>アルキル>ベンジルの順で結果をよく説明できた。Kharasch らは非対称型有機水銀化合物を合成するために Grignard 試薬の置換反応やカルボン酸水銀化合物の脱炭酸²⁹⁾などの新しい合成を開発している (式 18)。次に Kharasch はこのオレフィンへの HBr 付加の研究途中で臭化アリルに対する HBr

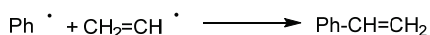
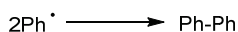
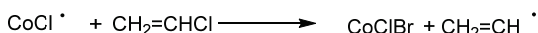
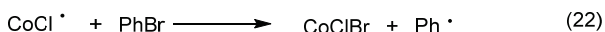
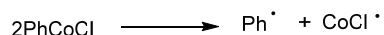
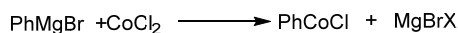
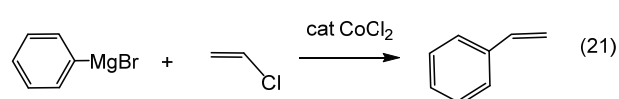
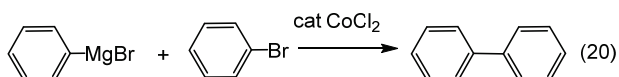


の付加が脱気した反応では 80% 以上 1,2-ジブロモプロパンを、一方脱気しない反応では 85% 以上が 1,3-ジブロモプロパンが生成する事実を見出した (式 19, $\text{R}=\text{CH}_2\text{Br}$)²⁵⁾。後者は AntiMarkovnikov 付加生成物で、それは臭素ラジカルが付加するラジカル連鎖機構で反応が進行している。それはラジカル禁止

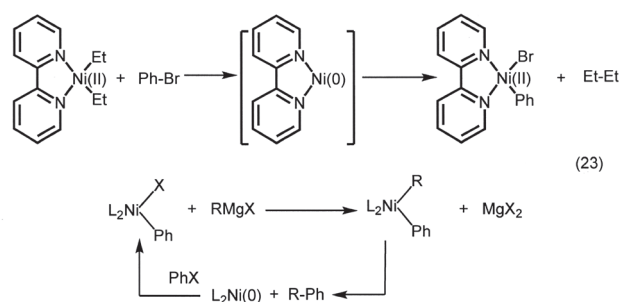


剤で反応が停止し、過酸化物の添加で反応が進行することから明らかにされた^{30,31)}。次に Kharasch は Grignard 試薬とベンゾフェノンの反応に移り、第 3 級アルコールが生成するところ、触媒量の CrCl_3 、 MnCl_2 や FeCl_3 を加えるとベンズピナコールが副生し、これはラジカルが関与する反応と考えた³²⁾。フェニル Grignard 試薬とプロモベンゼンや塩化ビニルのカップリング反応では 3mol% の触媒量でビフェニルやスチレンを好収率で与えるのを見出した (式 20、21)。これもラジカルが関与する反応と考えられた³²⁾。ホモカップリングもクロスカップリング生成物もラジカルカップリング機構を考えている (式 22)。

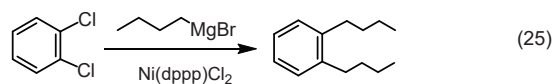
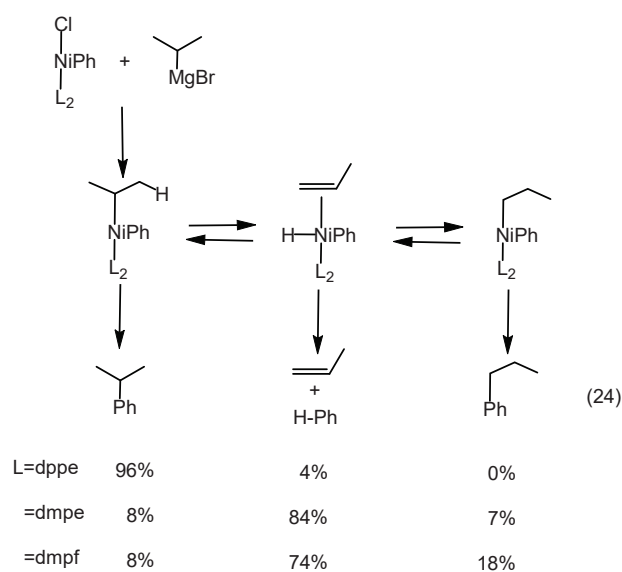
Kharasch 反応の機構を詳細に研究したのが Kochi



で 1970 年代に入ってからである³³⁾。その結果、AgX は Kharasch の考えたようにアルキル Grignard 試薬から生成するアルキル銀の分解とそのラジカルホモカップリングで進行することが示され、ラジカル不均化でオレフィンが副生する。一方 CuBr はアルキル Grignard 試薬からアルキル銅が生成しアルキルハロゲン化物とクロスカップリング反応する。FeCl₃ もアルキル Grignard 試薬と臭化ビニル化合物のクロスカップリング反応し、シス・とトランスプロペニル臭化物と立体が保持されたクロスカップリング生成物を与えるのでラジカル機構は考え難いと示唆された³⁴⁾。Kochi らの報告が 1971 年に発表されると翌 1972 年玉尾・熊田とフランスの Corriu らが独立に Ni 触媒を用いたアルキル Grignard 試薬と塩化ビニルやアリール化合物とのクロスカップリングを報告した (図 2(2)) Pd が Ni、玉尾・熊田・Corriu カップリング)³⁵⁾。玉尾らがこのクロスカップリングを見出す経緯は成書や総説誌³⁶⁻³⁸⁾に興味深くまとめられているが、それによると山本らのジピリジル錯体が還元的に脱離してホモカップリング生成物のブタンを脱離するとともに、臭化アリールが酸化付加する反応にきっかけがある。玉尾らはこの臭化アリール付加体にアルキル Grignard 試薬を反応させればアルキルアリール錯体が生成しその還元脱離でクロスカップリング反応が触媒的に実現すると考えた (式 23)。果たして予想通りであった。一方 Corriu らは前述の Job の研究⁴⁰⁾がきっかけになっている。2001 年に第 11 回 OMCOS (有機合成を志向する有機金属化学) 国際会議が台湾で開かれた。その Post Conference としてクロスカップリング誕生 30 周年を祝う国際会議が京都で熊田らを世話人に開催され、JOMC に掲載されたそのときの論文集に Corriu は発見のきっかけを「フランス料理と日本料理」のタイトルで書いている⁴¹⁻⁴³⁾。Corriu と



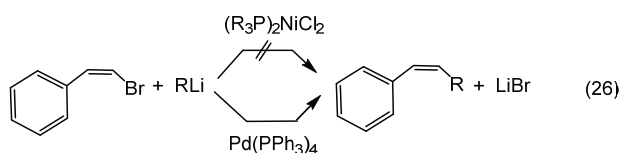
玉尾・熊田の反応の違いは前者が Ni(acac) 錯体触媒であるのに対して、後者は Ni ホスフィン錯体触媒を使っている点である。とくに二座配位ホスフィン(dppe)ではβ水素脱離や異性化も抑えることができ、アルキル Grignard 試薬が使える (式 24, 25)³⁵⁾。何といっても玉尾・熊田らの貢献は、還元的脱離の考え方も確立していないときに、Kharasch や Kochi のラジカル機構と異なり金属はパラジウムではなくニッケルであるが、現在の酸化付加・還元脱離の触



媒サイクルの機構を示した点である (図 2 (2)) Pd が Ni)。これによって他の遷移金属と典型金属の組み合わせの可能性がでてきたことである。当時米国 Syracuse 大学の Brown の弟子の根岸は渡米してポストドクをしていた玉尾にむりやり講演を依頼したというエピソードが残っている⁴¹⁾。クロスカップリング発見の歴史については、先に紹介した成書³⁶⁾と post OMCOS11th の JOMC 誌に掲載された講演集⁴¹⁾に詳しい。さらにパラジウム触媒クロスカップリングで鈴木・根岸・Heck に 2010 年ノーベル化学賞⁴⁴⁻⁴⁶⁾が授与されたときの翌年、化学と工業誌の 1 月

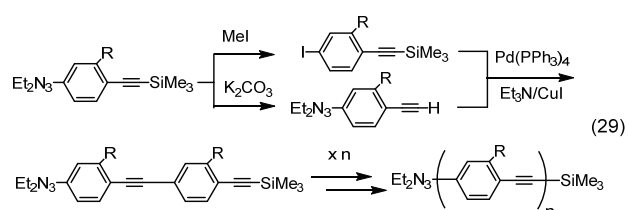
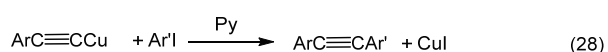
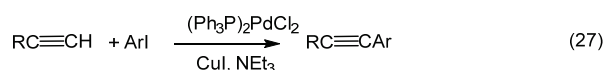
号に特集号として掲載された記事が参考になる⁴⁷⁾。

1975年最初に Ni 触媒を Pd 触媒にかえて検討したのが村橋らである。彼らは玉尾らの系をアルキルリチウムでいかないか検討したがうまくゆかなかった。たまたまパラジウム触媒のベンゼン環の σ -メタレーションを研究していたので Ni から Pd ホスフィン錯体にかえたところうまく反応した (式 26)^{41, 47)}。

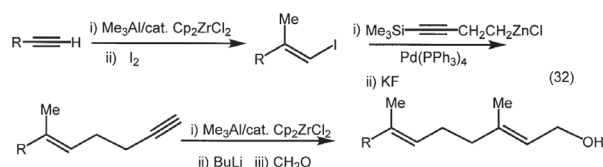
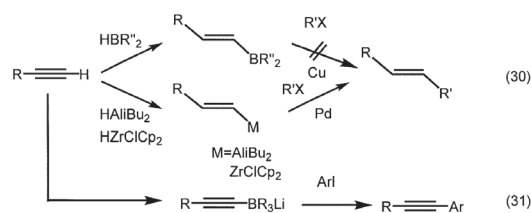


そして同年 Claser、Heck と菌頭らにより三グループほぼ同時に Heck 反応のアセチレン版と言える末端アセチレンとハロゲン化アルキルの Pd 触媒クロスカップリング反応が報告された (式 27)。前 2 者が脱 HX 試薬として MeONa/DMF や Et₃N を利用して加熱を必要とするが、菌頭らの方法は CuI/アミンを用いて系中で銅アセチリドを生成することで、反応が室温で進行する点である (式 27 菌頭カップリング)^{36, 41, 47, 48)}。菌頭らは古くから知られている銅アセチリドと有機ハロゲン化物からアセチレンの合成法、Castro 反応 (式 28) を玉尾の触媒サイクルに応用して見出した反応である。当時石炭から石油化学へ移行して久しく最初は注目されなかったが、有機電子材料や構造制御が必要な超分子化合物の合成に不可欠な反応となっている。例として Tour の鎖長制御したアリレンエチニレンオリゴマーの合成が報告されている (式 29)⁴⁹⁾。

アセチレンに対するヒドロメタル化でビニル金属化合物を合成しクロスカップリングに適用できれば合成的に有用である。根岸らは Brown 研のヒドロホウ素化合物の銅触媒によるカップリングを試みたところ失敗に終わっている。そこで典型金属をホウ素からより極性の高い Al や Zr にかえ、触媒を Cu から Pd にかえたところ、クロスカップリングが実現した (式 30)^{36, 41, 47)}。このとき Pd と比較して Ni も試み

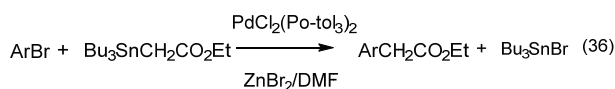
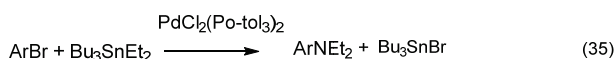
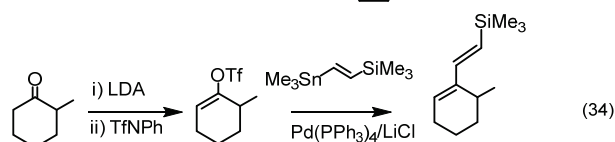
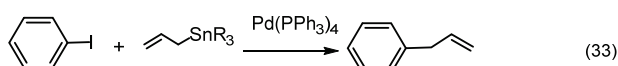


えたところ、収率と立体選択性の点から Pd の方が非常に優れていることも明らかにした。ホウ素を用いたカップリングとしてはエチルホウ素化合物をアート錯体にして求核的にするとアリルヨウ化物と Pd 触媒でカップリングが実現している。しかし根岸の弟子である高橋によるとこのホウ素カップリングで研究費を申請したのが却下されてしまった。審査機関に理由を尋ねると Brown の所で学んだホウ素の研究をする限り研究費はつかないと言われた。これが根岸がホウ素のクロスカップリングを断念した理由とのことだった⁴⁷⁾。その後典型金属を Zn までかえることで、Pd 触媒の TON が高収率のクロスカップリングを見出した (根岸カップリング)。前述のように Cu 触媒によるアセチレンのカーボメタル化が Normant らにより報告されている (式 13)。しかしメチルメタレーションはきわめて困難である。根岸は Zr 触媒を用いたカーボ (メチル) アルミ化反応の開発に成功した。Zn カップリングと組み合わせて多くのテルペン系天然物の有機金属による全合成を成功させた (式 32)⁵⁰⁾。



1977 年まで小杉と右田らはラジカル開始剤によるアリスズを用いたハロゲン化物のラジカルアリル化を研究していた。しかしラジカルアリル化はヨードベンゼンにはまったく反応しなかった。そこで Pd(0) 触媒を用いるとほぼ定量的に進行することが見出された (式 33、右田・小杉・Stille カップリング)。翌年 1978 年には米国の Stille が、さらに 1980 年代に入るとロシアの Beletsukaya らが有機スズ化合物のカップリングを始めて開発競争が激しくなった。Stille らは反応機構として玉尾・熊田の触媒サイクルを適用した。彼らの見出した反応でその毒性は無視するとしてカルボニル化合物をトリフラート化して Pd 触媒でカップリングする方法は有用である (式 34)⁵¹⁾。

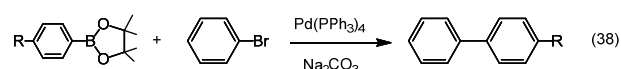
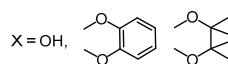
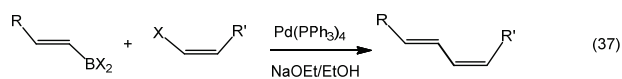
そして小杉・右田らはその後、Pd 触媒クロスカップリングの発展に大きく寄与する 2 つの研究も行った。1 つはスタナアミンとブロモベンゼンと嵩高いホスフィンを配位子とするパラジウム触媒で反応するとアニリン誘導体を生成する反応である (式 35)。これはさらに嵩高いホスフィンを開発した Buchwald と Hartwig によりスズアミンの代わりにアミンとナトリウム *t*-ブトキシドを用いる芳香族アミノ化に発展した (Buchwald-Hartwig 反応)。2 つ目はスズエノラートと臭化アリールを用いた Pd 触媒アリール化する反応で、これもやはり Buchwald と Hartwig により α -アリールケトン・エステル合成法となっている。詳しくは引用文献を参照された (式 36)⁵²⁻⁵⁵⁾。



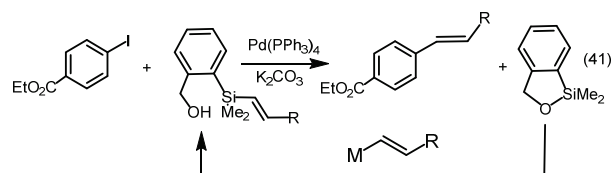
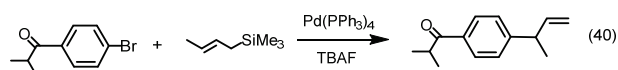
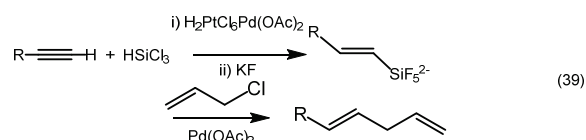
有機スズ化合物は Grignard 試薬、有機銅、リチウム、アルミニウム、Zr 化合物と違いその毒性は別として空气中で安定に扱える化合物である。有機ホウ・ケイ素化合物も安定で容易に取り扱えることから Pd クロスカップリングに利用できるとその応用性は計り知れないが、もっとも開発に時間がかかり 70 年代最後から 80 年代に入って登場した。宮浦と鈴木は安定な有機ホウ素化合物を有機合成に応用しようと研究を進めていた。玉尾・熊田の触媒サイクルにトリアルキルのアート錯体を適用したところヨードベンゼンとのクロスカップリングはホウ素上の置換基が混合したカップリング生成物を生成し、 π -アリールパラジウム錯体とトリアルキルホウ素の反応では β 水素脱離生成物が得られた。そこで β 水素脱離せずにアルキンのヒドロホウ素化で合成できるビニルホウ素誘導体を検討した。アート錯体にして反応を加速させるため塩基として EtOK/EtOH を加えたところ室温で高い収率でカップリング体を与えることを見出した (鈴木-宮浦カップリング、式 37)^{36, 41, 47, 56)}。このような塩基によるトランスメタル化の加速効果は Brown と Larock らのホウ素化合物から Hg へのトランスメタル化でもみられ、宮浦

と鈴木はそれらを参考にした⁵⁶⁾。基質がアリールホウ酸とハロゲン化アリールからのビアリル合成では NaHCO₃ や NaCO₃ などの弱アルカリ水溶液で反応が完結する。その簡便性と取り扱いの容易さから岸のパリトキシンの全合成に応用された (式 38)⁵⁶⁾。

有機ケイ素化合物も空气中で安定であるが、1970 年代に玉尾・熊田・吉田らによりアルキンとトリク



ロロシランのヒドロシリル化生成物を五配位のペンタシリケートに変換しそのパラジウム触媒でハロゲン化物とのクロスカップリングが報告された (式 39)。シリケートにすることでホウ素同様にケイ素置換基の求核性を高くしている。しかし飽和な五配位からフッ素を 1 つはがさなければトランスメタル化が起きず加熱が必須だった。そこで檜山と畠中はフッ素試薬の添加で系中で高配位ケイ素化合物を発生させることでケイ素化合物のパラジウム触媒クロスカップリングを実現した (檜山カップリング、式 40)^{36, 47, 57)}。その後ホウ酸と同様、Denmark らにより対応するケイ酸塩 (シラノレート) を用いる方法が検討され、檜山らによりシラノールの分子内求核攻撃によって五配位化合物を発生できる HOMSi 試薬も開発された。この試薬は回収サイクルが可能である (式 41)⁵⁸⁾。



おわりに

今回、遷移金属触媒の反応として Heck 反応とクロスカップリングを取り上げた。Heck によりアルキル

水銀化合物と Pd とのトランスメル化反応から Heck 反応が見出され、クロスカップリングは Kharasch のラジカル研究から Grignard 反応に対する遷移金属触媒の添加効果から発展した。もっとも実用的なホウ酸化合物のクロスカップリング反応はホウ素化合物と水銀のトランスメル化反応における塩基の加速効果が適用された。

文献

- 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (1). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 261-265.
- 加部義夫 (1999) 反応の分類による現代有機化学入門. *化学と教育* **47**: 766-773.
- 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (3). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 271-275.
- Colacot T (2015) Angewandte obituary Richard Heck (1931-2015) Nobel laureate in chemistry 2010. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**: 1611-1612.
- 辻 二郎, 佐藤史衛 (1981) トランスメル化反応. *化学総説 No.32 有機金属錯体の化学*. 学会出版センター, 東京. pp.203-234.
- Fitton P, Johnson MP and Mckee JE (1968) Oxidative addition of palladium(0). *Chem. Commun.* **1968**: 6-7.
- Mizorogi T, Mori K and Ozaki A (1971) Arylation of olefin with aryl iodide catalyzed by palladium. *Bull. Chem. Soc. Japan.* **44**: 581-581.
- 辻 二郎 (1977) Heck 反応の発見者 Heck 教授 Heck 反応の発見について. *遷移金属が拓く有機合成*. 化学同人, 東京. p.52.
- 山本明夫 (2010) 溝呂木と Heck が生んだ触媒反応. *現代化学* **12**: 26-28.
- Heck RF and Nolley JP Jr (1972) Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl and styryl halides. *J. Org. Chem.* **37**: 2320-2322.
- Heck RF (1979) Palladium-catalyzed reactions of organic halides with olefins. *Acc. Chem. Res.* **12**: 144-151.
- Odle R, Blevins B, Rarcliff M and Hegedus LS (1980) Conversion of 2-halo-N-allylanilines to nindoles via palladium(0) oxidative addition-insertion reactions. *J. Org. Chem.* **45**: 2709-2710.
- Mori M, Chiba K and Ban Y. (1977) The reactions and synthesis with organometallic compounds V. A new synthesis of indole and isoquinolines by intramolecular palladium-catalyzed reaction of arylhalides with olefinic bond. *Tetrahedron Lett.* **18**: 1037-1040.
- Hong CY, Kado N and Overman LE (1993) Asymmetric synthesis of either enantiomer of opium alkaloids and morphinans. Total synthesis of (-)- and (+)-dihydrocodeinone and (-)- and (+)-morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 5974-5976.
- Negishi E, Coperet C, Ma S, Liou SY and Liu F (1996) Cyclic carbopalladation. A versatile synthetic methodology for the construction of cyclic organic compounds. *Chem. Rev.* **96**: 365-393.
- Makorova LG [阪東憲一郎他 訳] (1974) *有機金属化合物の反応 II*. 講談社, 東京.
- Larock LG (1978) Organomercury compounds in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **17**: 27-37.
- Larock LG (1982) Organomercury in organic synthesis. *Tetrahedron* **38**: 1713-1754.
- 上村 栄 (1978) 元素の特性と有機合成 水銀、タリウムと有機合成. *化学* **34**: 786-792.
- Bumagin NA, More PG and Beletsukaya IP (1989) Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organomercurials with organic halides. *J. Organomet. Chem.* **364**: 231-234.
- 野依良治 (1991) 有機銅錯体. *有機合成化学* **34**: 675-678.
- Wipf P (1993) Transmetalation in organocopper chemistry. *Synthesis* **1993**: 537-557.
- Seechurn CCCJ, Kitching MO, Colacot TJ, and Snieckus V (2012) Palladium-catalyzed cross-coupling: A historical contextual perspective to the 2010 Nobel prize. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**: 5062-5085.
- Gilman H (1939) Relative reactivities of organometallic compounds XXV. Coupling reactions with halides of group VIII metals. *J. Am. Chem. Soc.* **61**: 957-959.
- Mayo FR (1986) The evolution of free radical chemistry at Chicago. *J. Chem. Educ.* **63**: 97-99.
- Kharasch MS, Renimuth O and Mayo FR (1928) The electron in organic chemistry I. The electron conception of the nature of the carbon-to-carbon bond from the standpoint of the theory of partial polarity. *J. Chem. Educ.* **5**: 404-418.
- Kharasch MS (1931) The electron in organic chemistry II. Bonds of the ethylene type and factors influencing directed addition. *J. Chem. Educ.* **8**: 1703-1748.
- Kharasch MS, Renimuth O and Mayo FR (1934) The electron in organic chemistry III. The thermal and hydrolytic stability and instability of the carbon-to-carbon bond. *J. Chem. Educ.* **10**: 1581-1590.
- 近畿化学工業有機金属化学部会編集 (1961) *有機金属の化学と応用*. 朝倉書店, 東京.
- 永坂 晃 (1946) 遊離機基ラジカルに関する Karash の研究 (I). *化学* **2**: 115-123.
- 永坂 晃 (1946) 遊離機基ラジカルに関する Karash の研究 (II). *化学* **2**: 193-199.
- 永坂 晃 (1946) 遊離機基ラジカルに関する Karash の研究 (III) —グリニャール反応に及ぼす金属ハロゲン化合物の影響—. *化学* **2**: 460-467.
- Chirik PJ (2020) Pioneers and influencers in organometallic chemistry: A profile of professor Jay Kochi. *Organometallics* **39**: 775-777.
- Tamura M and Kochi JK (1971) Vinylation of Grignard reagents catalyzed by iron. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 1487-1489.
- 玉尾皓平, 熊田 誠 (1972) 遷移金属触媒を用いる炭素-炭素結合生成反応. *化学* **30**: 832-839.
- 有機合成化学協会編 (2006) *化学者たちの感動の瞬間—興奮に満ちた51の発見物語*. 東京化学同人, 東京.
- 山本明夫 (1985) 遷移金属アルキル錯体の化学. 野崎, 山本, 辻, 野依編, *化学増刊 106 オルガノメタリック*. 東京化学同人, 東京. pp. 95-102.
- 山本明夫 (1991) 有機金属化学—三日やったらやめ

- られない。有機合成化学 49: 63-70.
- 39) 山本明夫 (1995) 素反応研究から触媒反応の開発。均一系触媒反応設計のための戦略, 化学増刊 124. 東京化学同人, 東京. pp. 3-8.
 - 40) Felkin H and Swierczewski G (1975) Activation of Grignard reagents by transition metal compounds. *Tetrahedron* 31: 2735-2748.
 - 41) Tamao K, Hiyama T and Negishi E (2002) PostOMCOS-XI international symposium on 30 years of cross coupling reaction. *J. Organomet. Chem.* 653: 1-303
 - 42) 清水正毅, 檜山為次郎 (2001) いまクロスカップリングが熱い! 日本で生まれ育った革新的化学技術. 化学 56: 45-47.
 - 43) 山口 茂, 玉尾皓平 (2002) 発見 30 年を迎えたクロスカップリング反応. 化学と工業 55: 550-554.
 - 44) 宮浦憲夫 (2010) パラジウム触媒クロスカップリング反応ー R.F.Heck 博士, 根岸博士, 鈴木章博士の業績ー. 現代化学 2: 18-24.
 - 45) Suzukii A (2011) Cross-coupling reactions of organoboranes: An easy way to construct C-C bonds (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 50: 6723-6737.
 - 46) Negishi E (2011) Magical power of transition metals: past and future (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 50: 6738-6764.
 - 47) 2010 年ノーベル化学賞受賞記念特集: クロスカップリング反応の軌跡 1-9 (2011). 化学と工業 64: 12-29.
 - 48) 菌頭健吉, 高橋成年 (1980) 金属錯体を用いるアセチレン誘導体の合成. 有機合成化学 38: 648-660.
 - 49) Tour JM (1996) Conjugated macromolecules of precise length and constitution. organic synthesis for the construction of nanoarchitecture. *Chem. Rev.* 96: 537-553.
 - 50) Negishi E (1981) Bimetallic catalytic systems containing T, Zr, Ni and Pd. Their applications of selective organic syntheses. *Pure & Appl. Chem.* 53: 2332-2356.
 - 51) Stille JK (1986) The palladium-catalyzed cross-coupling reaction of organotin reagents with organic electrophiles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 25: 508-524.
 - 52) 辻 二郎 (2001) 日進月歩のパラジウム, ニッケル触媒の化学 増大する有機合成化学へのインパクト. 有機合成化学協会誌 59: 607-616.
 - 53) 辻 二郎 (2001) 日進月歩のパラジウム, ニッケル触媒の化学と有機合成化学へのインパクト: 容易に進行するようになったカルボニル化合物の α -アリール化反応. 有機合成化学協会誌 60: 989-994.
 - 54) 辻 二郎 (2001) 日進月歩のパラジウム触媒の化学: こんな反応がパラジウム触媒で. 有機合成化学協会誌 63: 539-550.
 - 55) Dorel R, Grugel CP and Haydl AM (2019) The Buchwald-Hartwig amination after 25 years. *Angew. Chem. Int. Ed.* 58: 17118-17129.
 - 56) 宮浦憲夫, 鈴木 章 (1990) パラジウム触媒を用いるアリールおよびビニル型ホウ素化合物と有機ハロゲン化合物のクロスカップリング反応. 有機合成化学 46: 848-860.
 - 57) 畠中康夫, 檜山為次郎 (1990) 有機ケイ素化合物 / F/Pd 触媒による高選択的交差カップリング反応. 有機合成化学 48: 834-843.
 - 58) Nakano Y and Hiyama T (2011) Silicon based cross-coupling reaction: an environmentally benign version. *Chem. Soc. Rev.* 40: 4893-4901.

2020 年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

所 長：	化学科	教授	川本達也
運営委員：	数理・物理学科	教授	酒井政美
	数理・物理学科	教授	水野智久
	情報科学科	教授	木下佳樹
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	辻 勇人
	化学科	教授	西本右子
	生物科学科	教授	泉 進
	生物科学科	教授	小谷 享

(2) 編集委員

委 員 長：	化学科	教授	川本達也
編集委員：	数理・物理学科	教授	阿部吉弘
	数理・物理学科	准教授	川東 健
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	加部義夫
	化学科	教授	堀 久男
	生物科学科	准教授	安積良隆
	生物科学科	教授	井上和仁

(3) 産官学委員

委 員 長：	数理・物理学科	教授	水野智久
運営委員：	数理・物理学科	准教授	松澤 寛
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	辻 勇人
	化学科	教授	堀 久男
	生物科学科	教授	井上和仁
	生物科学科	教授	大平 剛

(4) 顧問・特別所員・客員教授・客員研究員

顧 問：	門屋 卓
特 別 所 員：	上村大輔、 紀 一誠
	鈴木季直、 野宮健司
	羽鳥尹承、 丸田恵美子
客員教授	菅原 正
客員研究員：	安部 淳、 阿部孝宏

井上 哲、 内田英伸
 大石不二夫、 河合 忍
 川上義輝、 岸 康人
 菊地原愛、 木下修司
 忽那周三、 河野 優
 齋藤礼弥、 櫻井英博
 佐藤 剛、 篠原直貴
 関 裕平、 高橋一男
 高橋広奈、 田中輝彦
 田仲二郎、 辻本和雄
 堤 一統、 豊泉和枝
 豊田賢治、 永島賢治
 永島咲子、 西井かなえ
 橋友理香、 付 哲斌
 藤原葉子、 馬 瑞強
 村下 達、 谷地田剛介
 山崎淳也、 八柳祐一
 横山隆亮、 吉田 剛

2 産官学 活動実績

(1) 特 許

[日本出願]

1) 「化合物、並びにそれを用いた発光材料、光学材料及び光電変換材料」

辻 勇人

2) 「化合物、高分子架橋剤、架橋高分子化合物、樹脂材料及び硬度調整樹脂材料の製造方法」

山口和夫

3) 「化合物、及び抗腫瘍剤」

上村大輔

Science Journal of Kanagawa University

投稿規定

1 編集方針

Science Journal of Kanagawa University は、神奈川大学総合理学研究所の事業および研究の成果を公表する科学誌であり、事業報告、公募研究の成果報告論文、数学、物理学、情報科学、化学、生物学その他理学全般にわたる所員による一般研究論文、所員が所外の研究者と行なった共同研究に関する論文等を掲載する。投稿者は原則として神奈川大学総合理学研究所所員であるが、編集委員会の承認により所員以外の投稿論文も掲載する。論文の共著者については特に規定しない。本誌名称の略記は *Sci. J. Kanagawa Univ.* とし、和名は神奈川大学理学誌である。

2 掲載論文の種類

研究論文は、総説 (Review) と原著 (Full-Length Paper/ Note)、および報告書 (Report) とする。原著には短報 (Note) を含み、報告書 (Report) は原著に準ずる。

上記論文の他に、テクニカルノート (Technical Note)、教育論文 (Educational Paper) および研究交流報告 (Report of Research Communication) を掲載する。

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

総説および原著論文 (短報を含む) の原稿は、下記要領に従って、そのまま印刷できるように仕上げる。なお、テクニカルノート、報告書、教育論文および研究交流報告についてはそれぞれ以下の 4、5、6、7 に示す。

(1) 頁数

短報は、刷り上がり 4 頁以内とするが、それ以外の論文には特に頁制限はない。但し、編集委員会により論文が冗長と判断された場合には頁数は限定される。また、12 頁を超える場合には、超過分に係わる経費は著者の負担とする。

(2) 原稿用紙サイズ

A 4 版の用紙を用いる。本文および図表の占める範囲 (紙面) は縦横 245 × 170 mm とす

る。この場合、余白は、上辺 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

(3) 段組み

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語)、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語) は 1 段組みとする。但し、所属、Abstract、Keywords は紙面内で更に左右およそ 10 mm ずつの余白を置く。

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語) は中央揃え、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語) は左右両端揃えとする。

序論、材料と方法 (または方法)、結果、討論 (または結果と討論)、謝辞、文献は 2 段組み、左右両端揃えとする。

(4) 使用文字 (フォントの種類)

基本的に、和文は MS 明朝、英文は Century とする。但し、 μ などのギリシャ文字や数学記号などを部分的に異なる字体にすることは差し支えない。

図の説明文および表もこれに準ずるが、図中の文字や記号については特に限定しない。文字サイズは下記の各項目で指示する。

(5) 論文構成

研究課題名、著者名、研究課題名 (英語)、著者名 (英語)、所属 (英語)、Abstract (英文)、Keywords (英語)、序論、材料と方法 (または方法)、結果、討論 (または結果と討論)、謝辞、文献 (英語または日本語) の順とする。図と表は本文中の適切な位置に挿入する。

(6) 論文種の表示

第 1 頁、第 1 行目に左揃えで、前後に ■ 記号を付して論文種を記入する。

例えば、■総説■、■原著■、■原著 (短報) ■、■報告書■ など、
英文では、■ Review ■、■ Full-Length Paper ■、■ Note ■、■ Report ■ など。

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、MS ゴシックで 11P (ポイント) とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

本文が和文の場合、研究課題名（日本語）は太字（Bold）で14P（ポイント）、著者名（日本語）は太字で12Pとする。著者と著者の間は1文字分のスペースをあける。

続く、研究課題名（英語）は13P、著者名（英語）は12P、所属（英語）は9Pとし、これらは太字にしない。

本文が英文の場合、研究課題名は太字で14P、著者名は太字で12P、所属（英語）は太字にせず9Pとする。

それぞれの間は1行あけを原則とするが、著者名（英語）と所属（英語）の間は行間をあけない。

著者の所属が複数の場合には、各著者名末尾および対応する所属の先頭に上つき数字（1、2、3、など）を付し区別する。

本文が英文の場合、研究課題および所属は前置詞、冠詞、接続詞を除き各語の最初の文字を大文字で記述し、著者名はフルネームで名姓の順に記述する。最終著者の前は“and”を置く。

次のAbstractまでは1行あける。

(8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切である。

見出し（Abstract:）からは1文字あけて要旨本文を書く。

文字サイズは、見出し（Abstract:）は太字で11P、要旨本文は10Pとする。

(9) Keywords

要旨に続けて、行間をあけず、Keywords: の見出しを置き、1字あけて、5語程度（英語）のKeywordsを付す。

文字は10Pを用い、見出し（Keywords:）はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

序論、材料と方法（または方法）、結果、討論（または結果と討論）、謝辞、文献の各項目の見出しは左揃えとする。

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で12P、本文は10Pとする。

各項目の第1段落の出だしは左寄せではじ

め、第2段落から出だしを1文字（英文では2文字）あける。

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で10.5Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

番号は片括弧（閉じ括弧のみ）表示とする。本文中では、片括弧つき番号を“上つき文字”とし、該当する部分に必ず記入する。

文字サイズは、項目の見出しは太字で12P、各文献は9Pとする。

文献が日英混合の場合、和文の文献のアルファベットと数字には、Centuryのフォントを用いる。

以下は記入例である。著書、分担著書、原著、学位論文、学会発表などにより表記法が異なるので、それぞれの記入例を参照して正確に記載する。

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 3) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 4) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 5) Owada M (2011) Phylogeny and adaptation of endolithic bivalves in the Mytilidae. *D.Sc. thesis, Kanagawa University, Japan*.
- 6) Taiz L and Zeigen E [西谷和彦, 島崎研一郎 監訳] (2003) *テイツダイガー植物生理学 第3版*. 培風館, 東京.
- 7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料

の元素分析法. *微生物* 5: 34-44.

- 8) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版, 東京.
- 9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. *よくわかる電子顕微鏡技術*. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
- 10) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川大学総合理学研究所年報* 2003. pp.41-80.

※ インターネット情報を文献として引用する場合は、著者 (年) 論文タイトルなどの末尾に [] 付きで、[doi. -----]、[www. -----]、[http://www. -----] のように記述する。なお、閉じ括弧のあとには必ずピリオドをつける。

- (12) 表
本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

表の上部には必ず番号 (表 1.、Table 1. など) とタイトルを付し、本文との整合を期す。

表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。タイトルの末尾にピリオドはつけない。

表のスタイルについては特に定めないが、用いる文字や数字のサイズは本文のそれを超えないように配慮する。

なお、本文への挿入の他に各表の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。

- (13) 図
本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

図には必ず番号 (図 1.、Fig.1. など) を付し、本文との整合を期し、図の下部に番号と説明文を加える。図が細分化されている場合には、A、B、C … (図 1A.、Fig.1A. など) をつけて区別する。

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。
図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図のタイトルと説明文に限り、和文でもピリオド (.) とカンマ (,) を用いる (和文の句読点は用いない)。

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

図はできるだけ分かりやすいものとし、図中の文字や記号は高さ 3 ～ 5 mm 程度にする。

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

なお、本文への挿入の他に各図の抜粋も作成

し、電子媒体として原稿に添付する。これらの図は、あまり圧縮せず、電子密度 300dpi 程度 of 原図とする。

- (14) 単位

SI unit を用いる。和文であっても、原則的に、数値および単位には半角文字を用い、%および℃を除き、数値と単位の間は必ず半角分スペースをあける。

- (15) 作製見本

希望者には作製見本 (デジタルファイル) を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁 (報告書)

これに該当するものは、神奈川大学および総合理学研究所より研究費助成を受けた研究の報告書である。

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

個別の助成研究の報告書は原著と同等に扱うので3の規定に準じて原稿を作製する。

多人数による共同研究のうち、

- (1) 各研究者が全員原著と同等の論文 (短報の場合も含めて) を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は3の規定に準じて作製する。
- (2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は3の規定と同じである。

報告書のうち、著者が希望し編集委員会が採択したもの、あるいは編集委員会が選択し著者の同意が得られたものは原著または短報として掲載する。

5 原稿の体裁 (テクニカルノート)

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文 (原著および報告書) の規定に準じて原稿を作製する。

6 原稿の体裁（教育論文）

これに該当するものは、自然科学分野の教育研究や教育技法に関する論文、および完成度が高く簡潔に纏められた実習テキストなどである。

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

7 原稿の体裁（研究交流報告）

これに該当するものは、研究交流を目的とした他大学・研究所訪問記、海外研究留学報告、国内外開催の国際学会参加報告などである。

本誌、18巻掲載の該当論文を参照し、英文要旨を省略できることを除いて、研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

8 投稿と略題名（Running Title）提出

明瞭に印刷された図を含むオリジナルの印刷された原稿1部とそれがファイルされているデジタル記録媒体（FD、MO、CDなど）を編集委員会（神奈川大学総合理学研究所）に提出する。

論文の課題名が長い場合には、和文で25字、英文で50字以内の略題名（Running Title）が必要である。略題名は原稿に加えず、別紙に記入して提出する。

9 投稿論文の審査

適時、レフリーによる校閲を行ない、採否や再投稿請求は編集委員会で決定する。

総説、および編集委員会が認める特殊な報告書の場合を除き、既に発表されている論文の著作権を侵害するような原稿は採用されない。

10 原稿の校正

掲載決定原稿は、ゲラ刷りの段階で著者の校正を依頼する。校正は最低限の修正に留める。

11 投稿料

原則として投稿は無料であるが、カラー印刷を含むものについての著者経費負担の有無および負担額は編集委員会で決定する。投稿原稿の体裁が規定にあわず、編集段階で修正に経費が生じた場合は著者が実費を負担するものとする。

また、いずれの範疇であっても、論文が12頁を超える場合には、超過分に係る経費は著者がその実費を負担するものとする。

12 別刷

掲載された総説および原著（短報を含む）は別刷り50部が著者に無料贈呈される。50部を超えて希望された別刷部数については実費を徴する。

13 著作権等

掲載論文の内容についての責任は著者が負うものとする。その著作権は著者に属するが、著作権のうち、複製権および公衆送信権については神奈川大学図書館に許諾を与えるものとする。論文内に使用した他者の著作物（図版や写真など）の転載許可は著者の責任において投稿前に行う。

出版権は神奈川大学総合理学研究所に属するが、総合理学研究所は頒布の便を図るために、神奈川大学学術機関リポジトリを通じて「Science Journal of Kanagawa University」を公開するものとする。

Author Index

A

Akimoto, Mayu	1
Ando, Haruko	59
Aoki, Takashi	27
Aoyanagi, Yuki	69
Asaoka, Mariko	55
Azumi, Yoshitaka	47

H

Hatakeyama, Risa	1
Hayatsu, Manabu	47
Hirano, Hiroki	35
Hoshino, Yasushi	11

I

Iguchi, Shu	1
Ishiwata, Daisaku	69
Ito, Takashi	41
Iwamoto, Akitoshi	81
Iwasaki, Takaya	59
Izumi, Susumu	59

K

Kabe, Yoshio	87, 97
Kaga, Yuki	21
Kanazawa, Ken'ichi	69, 73
Kaneko, Takayuki	1
Kato, Masayo	1
Kawai, Akio	35
Kawanobe, Kyoko	73
Kikuchi, Suzuka	81
Kotani, Susumu	41
Kuroda, Kouhei	1

M

Matsuo, Ayumi	59
Mizumoto, Yu	55
Murayama, Takashi	1

N

Nakahama, Naoyuki	59
Nakata, Jyoji	11
Nin, Chin	1
Nishimoto, Yuko	69, 73
Nishitani, Kazuhiko	21, 55

O

Okuda, Mami	59
Oono, Yutaka	21
Oti, Takumi	41

S

Sakai, Shunsuke	73
Sakamoto, Hirotaka	41
Sakamoto, Tatsuya	41
Shimizu, Yoshioki	1
Soutome, Masako	1
Suyama, Yoshihisa	59
Suzuki, Suechika	1
Suzuki, Yoshihiro	17, 69, 73

T

Takahashi, Hirona	35
Tanaka, Juri	1
Tuji, Minoru	1

U

Ushizawa, Ryouji	1
------------------	---

Y

Yokoyama, Ryusuke	21
Yokoyama, Toshiya	21, 55
Yu, Yongjie	17

Z

Zhang, Shanjun	17
Zun, Miho	41

編集後記

第32巻は原著論文12件、テクカルノート1件、教育論文2件が掲載されています。コロナ禍2年目に入り、経営学部がこの3月にみなとみらいキャンパスに移転、再来年2023年には理学部も横浜（六角橋）キャンパスに移転が予定されています。このたいへんな状況の中で、例年と変らぬ数の研究論文を投稿していただいた著者の先生方に感謝申し上げます。さらには、川本総理研所長、編集委員の先生、鈴木編集顧問、事務局竹内さんにも感謝申し上げます。

Science Journal of Kanagawa University はかつて平塚キャンパス解説20周年記念号（2009年、第20巻、No2）につづいて理学部創設30周年記念号（2017年、第28巻、No2）を発刊し、ほぼ理学部全部の先生方から原稿をおよせいただくことができています。その結果、研究成果を埋もれさすことなく、著者の意思で自由に公表できる身近な総合科学学術誌に成長してきています。

その間、学外者による審査員制度をもうけ、大学紀要から脱皮することが一時検討されたことがありましたが、このように現状維持で今にいたっています（第26巻、編集後記、鈴木季直先生）。私事です

が、長年授業で蓄えた資料をまとめて出版したいと某出版社に相談したところ、ある程度の売り上げが見込めないとのことで断られました。その内容をいま教育論文としてシリーズで掲載していただいております、たいへんに助かっています。本誌は国立情報研究所、神奈川大学図書館及び総合理学研究所のホームページをつうじて公開されているので、WEBで検索をしますと過去のシリーズがしっかり拾え、目的は達成されていると思います。さらに専門の研究論文についても、以前は1つの研究成果をまず速報として発表し、その後データを追加してフルペーパーとしてきました。しかし学術誌のWEBサイトに膨大な研究論文のサポータイング・インフォメーションが掲載されるようになると、それがフルペーパーの役目を果たすようになり、速報に値しない研究成果を発表する機会がなくなりつつあります。その点でも大学紀要のメリットが再認識されていると思います。

最後に理学部の横浜（六角橋）キャンパス移転にともない、理工再編が検討されています。今後、新制理学部においても、本誌が理学部の研究推進の基軸として、さらに発展することを願ってやみません。

〔 神奈川大学総合理学研究所
理学部・化学科 加部義夫 〕

神奈川大学理学誌編集委員会		Science Journal of Kanagawa University	
委員長		Editor-in-Chief	
川本達也	化学科	Tatsuya Kawamoto	Department of Chemistry
委員		Editors	
安積良隆	生物科学科	Yoshitaka Azumi	Department of Biological Sciences
阿部吉弘	数理・物理学科	Yoshihiro Abe	Department of Mathematics and Physics
井上和仁	生物科学科	Kazuhiro Inoue	Department of Biological Sciences
加部義夫	化学科	Yoshio Kabe	Department of Chemistry
川東 健	数理・物理学科	Ken Kawahigashi	Department of Mathematics and Physics
桑原恒夫	情報科学科	Tsuneo Kuwabara	Department of Information Sciences
張 善俊	情報科学科	Shanjun Zhang	Department of Information Sciences
堀 久男	化学科	Hisao Hori	Department of Chemistry
顧問		Adviser	
鈴木季直	神奈川大学名誉教授	Suechika Suzuki	Emeritus Professor of Kanagawa University

Science Journal of Kanagawa University Vol. 32
(Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2021年6月30日
編集者	Science Journal of Kanagawa University 編集委員会
発行者	神奈川大学総合理学研究所
発行所	〒259-1293 平塚市土屋 2946 Tel. 0463-59-4111 (内 2500) Fax. 0463-58-9684
印刷所	光和アドバンス株式会社

神奈川大学総合理学研究所
Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University