

# SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

# KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

# Vol.16 2005

神奈川大学総合理学研究所

*Research Institute for Integrated Science of Kanagawa University*

# Science Journal of Kanagawa University

Vol. 16

---

## 目 次

### 巻頭言

はじめに 齊藤光實 .....	1
-----------------	---

### 原 著

Analysis of Electrode Materials for Diamond Semiconductors using RBS and PIXE Methods Shinich Ohno, Saitou Yasunao, Jyoji Nakata, Katsunori Kawasaki and Toshiyuki Hattori .....	3
X-線マイクロアナリシスによるムラサキイガイ前足糸索引筋の形質膜内表面 Ca 局在に関する研究 鈴木季直、濱元千絵子、柴山理恵 .....	9
匂い受容体の機能解析を目指したバイオインフォマティクス 大瀧丈二、中山 堯、後藤智範、山本晴彦 .....	19
Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH) 法によるシロイヌナズナの花粉母細胞での減数第一分裂 期染色体の動態解析 安積良隆、外山俊士、中村美奈子、豊泉龍児、風間 真、朝倉史明、日野昌也、鈴木秀穂 .....	25
アフリカツメガエル胚右側板中胚葉における Nodel シグナリングの活性化は内臓左右軸を逆転する 豊泉龍児、茂木和枝、日野昌也、小笠原 強、竹内重夫 .....	35
遺伝子組換えタマネギに生分解性プラスチック原料を生合成させる試み II 安積良隆、上西愛子、野村 研、北宣 裕、齊藤光實 .....	45
<b>短 報</b>	
アールヌーボー調画像生成のための一手法 木元宏次 .....	51
ナノ細孔をもつ光・酸化および水素化触媒の構築と地球環境改善への展開 森 和亮、加藤知香 .....	55
環境と健康を守るための水に関する科学的研究 西本右子、天野 力、井上和仁、大石不二夫、河村正一、関 邦博、寺本俊彦、峯岸安津子、 渡部徳子 .....	57
光ファイバー分光器を用いた海中光環境の測定 柴田達矢、北島正治、鈴木祥弘 .....	59
ファイトレメディエーションへの利用を目指したケナフ ( <i>Hibiscus cannabinus</i> L.) の鉛汚染土壌へ の順化の解析 澤上航一郎、大石不二夫、黒澤祥子、鈴木祥弘 .....	63
<i>Ralstonia eutropha</i> H16 の新規細胞内 3-ヒドロキシ酪酸オリゴマー分解酵素 小林照幸、内野圭一、安部智子、齊藤光實 .....	67

## 報告書

意味関係を有する大規模知識ベースに対する仮想 3 次元表示方法の研究 水越大介、森本貴之、藤原 譲、後藤智範 .....	73
ウェブサービスのセキュリティの研究 野口健一郎、門脇吉彦 .....	81
Mechanistic Aspects of Bioluminescence and Chemiluminescence Masakatsu Matsumoto, Mamoru Ohashi, Nobuko Watanabe and Ken Fujimori .....	83
NMR 量子コンピュータ 小澤 宏、天野 力、岡部建次、坂口 潮、福見俊夫、峯岸安津子 .....	87
速度定数と抗酸化性 ; UV 照射による OH 生成 天野 力、長崎 淳、中嶋康乃、大石不二夫、西本右子、峯岸安津子、渡部徳子 .....	89
Ge-73 NMR 分光法による有機ゲルマニウム化合物の構造の研究 竹内敬人、高山俊夫 .....	91
メタクリル樹脂用ジクロロメタン代替無害接着剤の探索 大石不二夫、笠井美由紀 .....	93
DNA チップのための新規 DNA 固定化法の開発 山口和夫、塩野博文 .....	99
ヒノキチオール金属錯体の合成、X 線構造解析および抗菌活性 野宮健司、清水克也、木村卓央 .....	101
ケナフ植生による重金属抽出 黒澤祥子、大石不二夫、鈴木祥弘、澤上航一郎 .....	103
機能水の微生物の増殖効果 井上和仁 .....	109
光合成細菌を利用した環境保全のための基盤技術開発 井上和仁、桜井英博、増川 一、中原昌明 .....	111
<b>2004 年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告</b> .....	<b>113</b>
<b>Science Journal of Kanagawa University 投稿規定</b> .....	<b>116</b>
<b>編集後記</b> .....	<b>119</b>

■ 巻頭言 ■

はじめに

齊藤光實  
神奈川大学総合理学研究所 所長

Preface

Terumi Saito

Director of the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

大学は今大きな変化にさらされている。少子化による受験生の減少である。大学院を含めて大学は多かれ少なかれ学生の取り合いをせざるを得ない状況に追い込まれている。わが理学部も当面のこの問題を乗り越えなければならないのは当然のことではあるが、しかし大学の危機は単に少子化という外部要因だけではない。

明治時代の鋭い評論で鳴らした斎藤緑雨(1867-1904)は「教育の普及は浮薄の普及」と書いたそうである。教育が普及した結果、浮薄人間がたくさん生ずるということでもあるし、大学が多くできれば当然教師の質も下がり、大学教育も浮薄となり、ひいては学問の浮薄を引き起こすともいえる。さらに科学技術の進歩が世界的な浮薄を引き起こしているという面もある。

科学技術は、哲学、文学、芸術とは根本的に違い、現在の成果を簡単に利用できるという性格を持つ。2000年以上昔のミロのビーナスがなにゆえ現代でも珍重されるのか。現代人がミロのビーナスの作り出す美を簡単に再現できないところにあるからである。あの美を作るにはあの美を作った人の内面に迫り、それを経験し、それを再現できるまでに成長する必要があるのではないか。だからして簡単にホ

イホイと誰もが過去の傑作を再現できる訳ではないのである。しかし科学は芸術の姉妹であるが、科学が生み出す技術には少し違う面がある。4年生でも勉強すれば科学の最前線にある程度理解することが出来るし、また最前線の研究を行うことも不可能とはいえない。遺伝子のクローニングは20年前にはかなり大変なことであったが、いまではPCR (polymerase chain reaction) という技術が普及したため、何も知らない初心者でも、DNAと試薬を混ぜるだけで出来てしまう。これを浮薄といわずして何が浮薄であろうか。このような性質を科学技術の「可積性」と仮に呼ぶとすれば、科学技術は「可積性」に富み、哲学、文学、芸術等は「可積性」に乏しいといってよい。この「可積性」によって科学技術には新しい発見と真理に常に浮薄を呼び込む側面があるのではないのか。理学部の重要な役割一つは科学技術の持つこの危険な性質に警告を発し、中身のある人間を生み出すことにある。

研究所の年報は本巻から新しい装いで出発する。年報としての役割の他に学術雑誌としての側面も加えることになった。所員の皆様、ご関係の皆様のご理解とご支援を賜りたい。

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

## Analysis of Electrode Materials for Diamond Semiconductors using RBS and PIXE Methods

Shinich Ohno<sup>1</sup>, Saitou Yasunao<sup>1</sup>, Jyoji Nakata<sup>1,4</sup>,  
Katsunori Kawasaki<sup>2</sup> and Toshiyuki Hattori<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa, 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Science and Engineering TIT, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

<sup>3</sup> RLNR TIT, Meguro-ku, Tokyo, 152-8550, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: jyojin@info.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** We analyzed various sputtering target materials, using Rutherford Backscattering (RBS) method and Proton-Induced X-ray Emission (PIXE) method, and identified the metals required for the electrodes of diamond semiconductors. Before various metals were examined on the diamond substrate, we analyzed these by evaporating them on the Si substrate by using a magnetron CVD sputtering apparatus. Ti was used as an electrode material to make ohmic contact with the diamond semiconductor substrate. Oxygen atoms were detected thickly near the surface by the RBS method, although the purity of Ti sputtering target metal was 99.95%. This oxide film was formed when the Ti film was exposed to air. To prevent Ti film from oxidation, Pt metal is usually deposited on Ti film as a cap layer. Thus, the double-layer Ti-Pt thin film was formed to confirm whether oxidation of Ti film was completely prevented or not, using the RBS measurement method. We have succeeded in obtaining an antioxidant effect of Pt cap film on Ti film, by developing the magnetron CVD processes appropriately.

**Keywords:** metal assay, RBS, PIXE, sputtering target, ohmic contact, diamond semiconductors

### Introduction

The N-type electrical activation of diamond semiconductors using ion implantation process has not yet been achieved. We proposed non-equilibrium annealing process called IBIEC (Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization) of ion-implanted diamond semiconductors by means of MeV ion beam irradiation. The Hall-Effect measurement is usually used to estimate the electrical characteristics of the diamond substrates and epitaxial layers on them. To obtain ohmic contact with the diamond substrate or epitaxial diamond layer, Ti metal is usually used as an electrode, along with the Pt metal that is deposited on Ti to prevent it from oxidation. We searched for these metals among unknown various sputtering target materials by means of Rutherford Backscattering (RBS) measurement method along with the Proton-Induced X-ray Emission (PIXE) method.

The magnetron sputtering apparatus is used for forming metal electrodes on a diamond substrate. The electrodes are usually formed in four corners of the diamond substrate as shown in Fig. 1. The vertical structure of the electrode is shown in Fig. 2. Three layers of Ti-Pt-Au are successively formed by using magnetron sputtering apparatus. The reason for using these metals as an electrode is as follows.

- Ti : Titanium is a good ohmic contact with the diamond substrate.
- Pt : The oxidation of the surface of Ti film can be suppressed by covering the surface of Ti film with Pt metal.
- Au : Gold electrode is connected with the thin gold wire to the Hall-Effect apparatus.

Before these electrodes were formed on the diamond substrate, we had to search for sputtering

target materials of these kinds, because the metal species were not recorded. We first show various RBS spectra for metals deposited on the Si substrate to identify metal species among various target materials. Several sputtering target materials were examined by the RBS and the PIXE method and the elements of each metal are specified. Furthermore, the Ti-Pt thin film was fabricated and analyzed by the RBS measurement method, to confirm whether oxidation of Ti film was completely prevented or not.

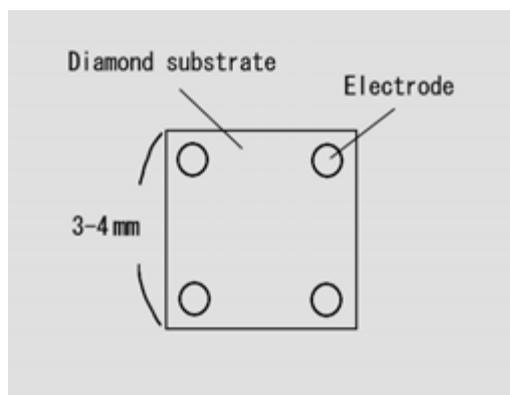


Fig. 1. Top view of the electrode.

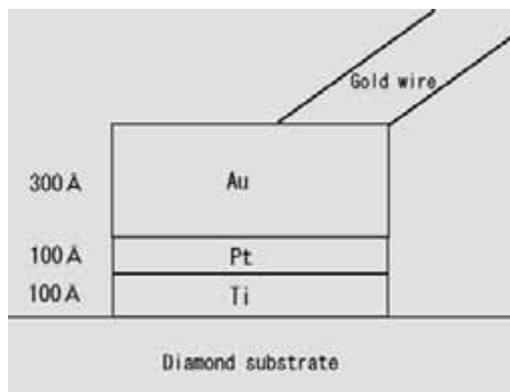


Fig. 2. Side view of the electrode.

## Results and Discussion

### Identification of sputtering target metals

The experimental conditions of the RBS and PIXE measurements were as follows. Well-collimated ( $<0.03^\circ$ ) 1.5-MeV  $\text{He}^+$  ions from the Van-de-Graaff accelerator of Tokyo Institute of Technology were used for the RBS measurement. Silicon Surface Barrier detector was settled to an  $170^\circ$  angle to the He beam direction. 2.5-MeV proton beam is used for the PIXE measurement, and two X-ray detectors with different detection energy range are used. Ti, Au, and Pt metals are

identified among many kinds of metals by these two analysis methods.

### 1. Analysis by the RBS method

Many kinds of metals are deposited on silicon wafers using magnetron sputtering apparatus. The pressure of the Ar gas atmosphere was 30 mTorr during deposition. The silicon wafer temperature was  $600^\circ\text{C}$ .

The Ti target metal was discovered, analyzing the RBS spectrum shown in Fig. 3. A 20-nm thick Ti film is clearly seen in the RBS spectrum. Oxygen atoms were also detected, demonstrating that the entire Ti film had been oxidized.

The spectrum shown in Fig. 4 is an alloy of Ag and metal with the mass number being near the mass of Au. However, the element of this metal can not be specified. The reason for this is that there are two or more candidates in the range of error. Also, the RBS spectrum shown in Fig. 5 cannot distinguish Au or Pt elements because of poor mass resolution of heavy elements.

As a result of this study, Au and Pt metals cannot be identified by the RBS measurement only. Thus, we have conducted the PIXE measurement of these samples.

### 2. Analysis by the PIXE method

The PIXE spectra of the same sample as in Fig. 4 are shown in Fig. 6, and also those of the sample in Fig. 5 are shown in Fig. 7. The spectra in left-side are for the low X-ray energy region and those in right-side are for the high-energy region of the same sample. We can identify Au and Ag elements from Fig. 6, and the Pt element is ascertained from Fig. 7. The signal of Ar element was also detected in Fig. 6. It is probable that Ar atoms adhered to the surface of the sample during deposition. Thus, we can with combination of PIXE method.

### Verification of antioxidant effect of Ti film using Pt film cap

#### 1. Formation of electrode

The electrode was formed according to the following procedures. First, the oxide film on the surface of Ti sputtering target is removed before depo-

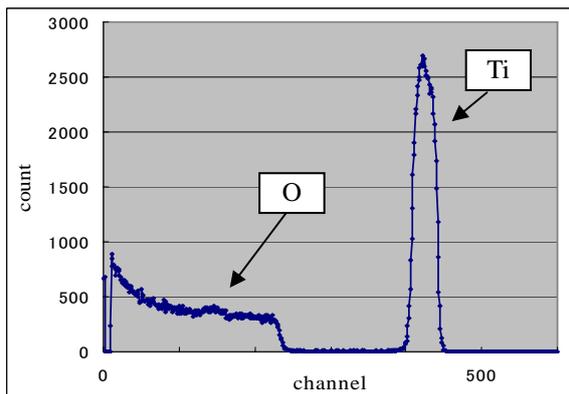


Fig. 3. RBS spectrum of titanium

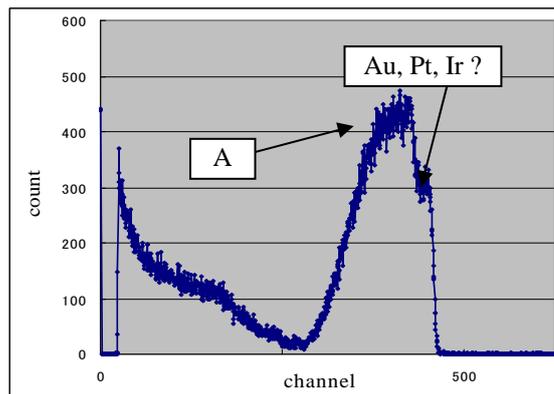


Fig. 4. RBS spectrum of Ag and uncertain metal.

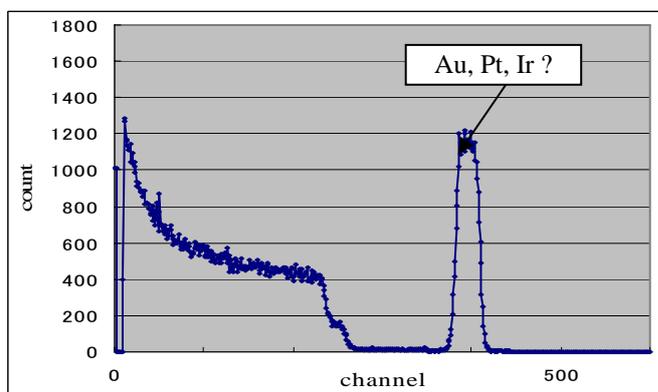


Fig. 5. RBS spectrum of uncertain metal.

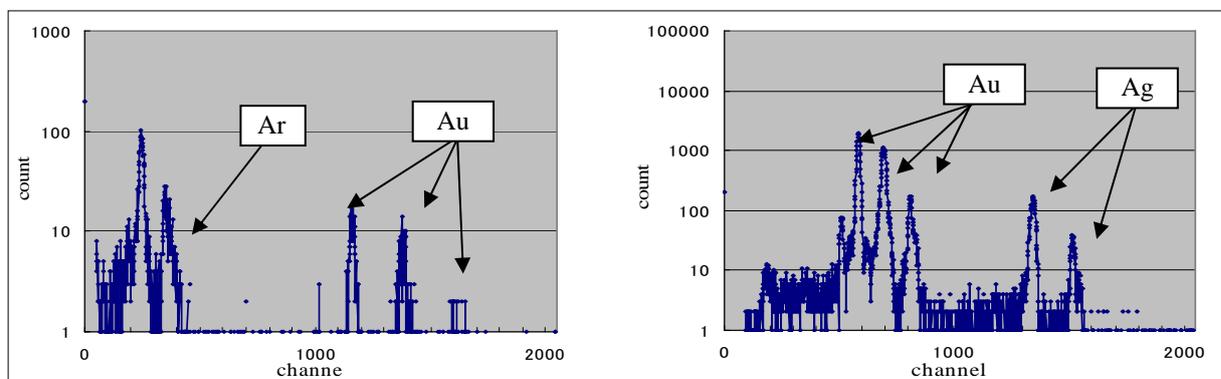


Fig. 6. PIXE spectra of AuAg.

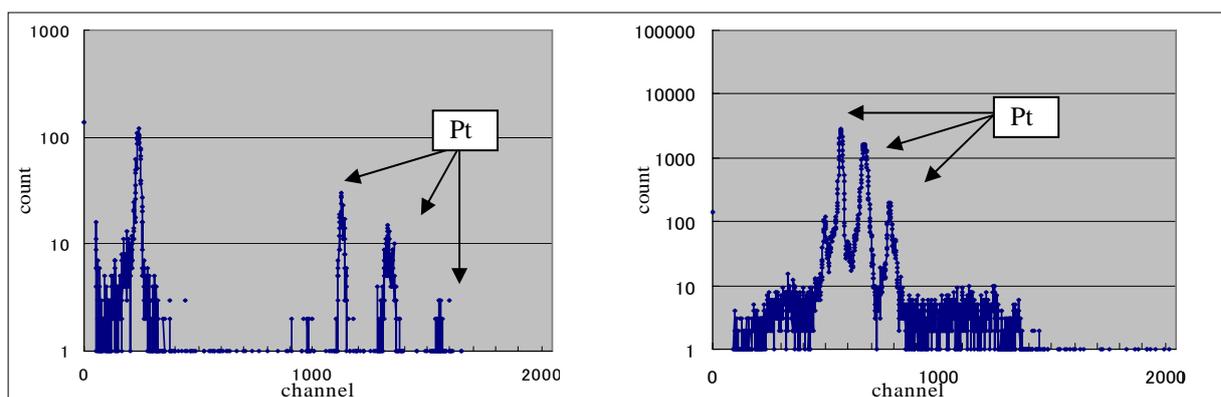


Fig. 7. PIXE spectrum of Pt.

sition of Ti films on the Si wafer, by using the magnetron sputtering apparatus. Then, Ti atoms were successively deposited on the Si wafer at 600°C. Lastly, Pt film was deposited on Ti film on the Si wafer. Two-layers Ti-Pt thin film was analyzed by the RBS method.

## 2. Analysis by the RBS method

Thus, we tried to change sputtering processes in order to confirm antioxidation effect of Ti film using Pt cap.

First, we conducted presputtering of Ti target material for about 30 minutes to remove completely Ti oxide film formed on the Ti target material. Sputtered Ti oxide film thickness is estimated to be about 0.5 nm. Then, we spent one hour during pumping up the vacuum chamber in order to cool down the sputtering system. This is done to adhere almost all sputtered atoms (Oxygen, Titanium) to the wall of vacuum chamber.

Secondly, we sputtered genuine (not oxidized) Ti target material and form Ti film on the Si substrate. Then again, we spent one hour during pumping up the vacuum chamber in order to cool down the sputtering system.

The existence of Ti and Pt atoms were confirmed by the RBS spectrum shown in Fig. 8. But also a great amount of oxygen atoms could be detected on the surface of the Ti film under the Pt film. Thus, oxidation of Ti film cannot be prevented at all. Furthermore, as clearly seen in Fig. 9, it is striking that Pt atoms were also detected in the only Ti-deposited sample, formed successively after Ti-Pt sample formation. It is probable that this is because the Pt atoms that had adhered to the vacuum chamber were deposited at the same time during Ti deposition.

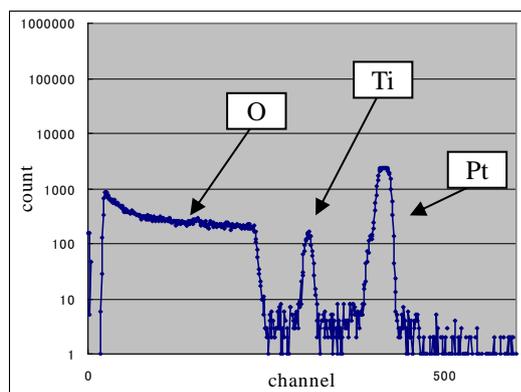


Fig. 8. RBS spectra of Ti-Pt.

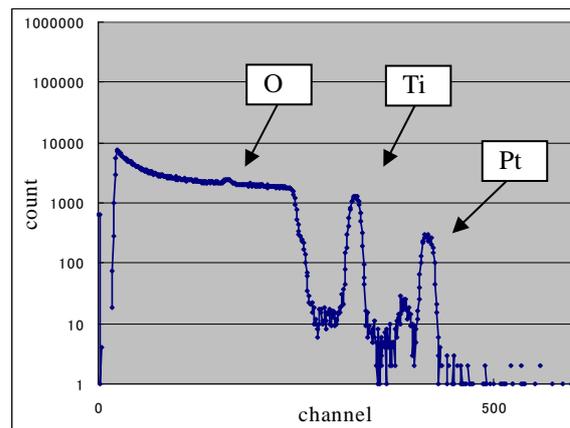


Fig. 9. RBS spectrum of Ti.

It is thought that one of the reasons that the oxidation is not prevented in spite of Pt film formation on Ti film was insufficient preliminary sputtering of Ti target. This preliminary sputtering was done to remove the Ti oxide film on the sputtering Ti target.

Lastly, we sputtered Pt target material (not presputtered because oxidation effect is very low) and form Pt film on the Ti film.

Figure 10 shows the RBS spectrum of Ti-Pt film on the Si substrate sample, formed under the above processes. Signals hatched in the 210 ch – 250 ch are attributed to oxygen atoms in the Ti film. However, we can show that two peaks are clearly seen in this region. After estimating energies of these peaks, lower energy peak denotes oxygen at the interface between the Si substrate and the Ti film and we can identify higher energy peak signifies oxygen at the interface between Ti film and Pt film. In conclusion, we can diminish oxygen atoms inside the Ti film. If we conducted pre-sputtering of Pt target materials, as done in the Ti target, we can further diminish oxygen atoms at the interface between Ti film and Pt film.

## Summary

We analyzed various sputtering target materials, using RBS measurement method and PIXE method, and identify needed metals used for the electrode of the diamond semiconductors. This is successfully achieved by combining merits of each measurement methods.

Ti is used as an electrode material to make ohmic contact with the diamond semiconductor

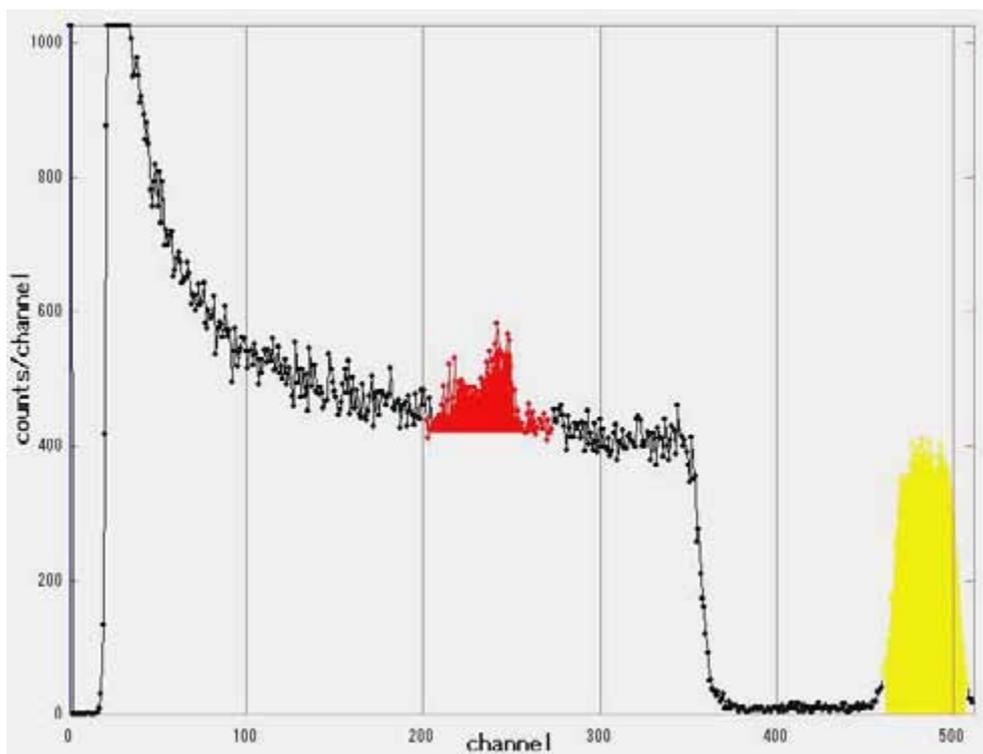


Fig. 10. RBS spectrum of Ti-Pt film only oxidized at the Si-Ti interface and at the Ti-Pt Interface.

substrate. However, Ti film is liable to be oxidized by the mere exposure to the air environment.

To prevent Ti film from oxidation, Pt metal is usually deposited on Ti film. The Ti-Pt thin film is formed to confirm whether oxidation of Ti film is completely prevented or not. This was analyzed using the RBS measurement method, however in the first, Ti film was fully oxidized. It is thought that one of the reasons that the oxidation is not prevented in spite of Pt film formation on Ti film was insufficient preliminary sputtering of Ti

target metal. Finally, we have succeeded in diminishing oxygen contents in the Ti film, by changing sputtering process fundamentally.

## References

- 1) Chu W-K, Mayer JW and Marc-A. Nicolet M-A (1978), *Backscattering Spectrometry* Academic Press, New York.
- 2) Ziegler JF (1977), *HELIUM Stopping Powers and Ranges in ALL Elements*, Pergamon Press, New York.

■原 著■

## X-線マイクロアナリシスによるムラサキイガイ前足糸牽引筋の 形質膜内表面 Ca 局在に関する研究

鈴木季直<sup>1,2,3</sup> 濱元千絵子<sup>1</sup> 柴山理恵<sup>2</sup>

### X-ray Microanalysis Studies on the Calcium Localization along the Inner Surface of Plasma Membranes in the Anterior Byssus Retractor Muscle of *Mytilus edulis*

Suechika Suzuki<sup>1,2,3</sup>, Chieko Hamamoto<sup>1</sup> and Rie Shibayama<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Physiology, School of Medicine, Teikyo University, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika@info.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** To investigate the role of plasma membranes in the regulation of intracellular Ca translocation in smooth muscles, the intracellular Ca localization in the anterior byssus retractor muscle (ABRM) of *Mytilus edulis* was examined by the quantitative X-ray microanalysis of cryosections. When the spot analysis was carried out successively along the plasma membrane in the cryosections of resting ABRM fibers, significant amounts of Ca (~8 mmol/kg dry wt) were frequently detected, although in some cases the Ca concentration was negative. Averaged Ca concentration detected was approximately 3.0 mmol/kg dry wt (n=25), while the Ca concentration was negligible at the myoplasm. By the pyroantimonate method including the semi-quantitative X-ray microanalysis, the intracellular Ca localization and its translocation during the contraction were also observed. These results indicate that, in the ABRM fibers, the plasma membranes accumulate Ca on their inner surface, and release Ca to cause contraction.

**Keywords:** ABRM of *Mytilus edulis*, intracellular Ca localization, plasma membrane, X-ray microanalysis of cryosection, pyroantimonate method

## 序論

筋肉の収縮と弛緩は細胞内 Ca 濃度の増減によって調節されており、平滑筋では、細胞内 Ca 濃度の増加は、細胞内 Ca 貯蔵構造からの Ca 遊離や細胞外からの Ca 流入によって引き起こされる。収縮をひきおこす Ca (活性化 Ca) の細胞内貯蔵構造として一般に考えられるのは筋小胞体であるが、その一方で、多くの平滑筋の形質膜内表面は Ca 貯蔵構造として機能していることが知られている<sup>1-3)</sup>。例えば、ムラサキイガイの前足糸牽引筋(anterior byssus retractor muscle; ABRM)では、ピロアンチモン酸を用いた細胞化学法により、Sb-Ca の沈殿が静止時には形質膜内表面に局在し、収縮時には Ca 遊離と移動を反映して細胞内に一様に分散分布することが報告されており<sup>4)</sup>、最近ではその筋形質膜より分子量

450 kD の Ca 結合蛋白質(MCBP-450)が単離され<sup>5)</sup>、細胞化学法で示されてきた結果の妥当性が裏付けられている。さらに、外液に高濃度の Ca を加え、細胞内に過剰な Ca を蓄積させ、アクロレインでガス固定し急速凍結した ABRM の凍結切片の X-線マイクロアナリシスにより形質膜内表面から高濃度の Ca が検出されている<sup>6)</sup>。しかし、これまで、細胞の生きた状態をもっとも適切に反映すると考えられる無固定・急速凍結試料での凍結切片・元素分析法による研究はなされていない。本研究では、平滑筋の形質膜内表面結合 Ca による収縮-弛緩の調節メカニズムを明らかにするために、カサゴウキブクロ筋の収縮-弛緩にともなう Ca 動態研究において、筆者らによって確立された凍結切片・元素分析法<sup>7)</sup>により

ABRMの形質膜内表面結合Ca局在の事実を明確にし、収縮-弛緩サイクルにともなう細胞内Ca動態について検討した。

## 材料と方法

### 筋線維標本と実験液

ムラサキイガイ *Mytilus edulis* より ABRM を摘出し、 $10^{-6}$  M の 5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) を含む液温  $4^{\circ}\text{C}$  の人工海水 (ASW) を満たしたシャーレ (底部にシリコンラバー) 内に入れ、両端をピンで固定することにより筋長を生体長に維持しながら、さらに直径約 0.5 mm、長さ 20 mm の筋線維束を単離した。筋線維束の両端に外科用絹糸 (No.8) でステンレスチールのフックをとりつけた。

ASW の組成は、NaCl, 513 mM; KCl, 10 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM;  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM; pH 7.2 ( $\text{NaHCO}_3$  で調整) とし、カリウム (K-) 拘縮にはこの組成の KCl 濃度を 400 mM に増加し、代わりに NaCl 濃度を 123 mM に減じた K-拘縮液を用いた。元素分析法で細胞内 Ca 濃度を測定するには細胞外 Ca が無いほうが望ましいので、急速凍結や化学固定など、適時必要に応じてその直前に外液を Ca-free 溶液 (ASW および K-拘縮液から  $\text{CaCl}_2$  を除去し、等価イオン量の NaCl を増加し、さらに 2 mM の EGTA を加えた液) に置換した。筋収縮を引き起こすためには前述の Ca-free K-拘縮液と Ca-free ASW に  $10^{-4}$  M の acetylcholine (ACh) を加えた ACh-拘縮液を用いた。なお、弛緩液として ASW、あるいは  $10^{-6}$  M 5-HT を含む ASW を用いた。

### 通常の化学固定とピロアンチモン酸法による細胞化学固定

微細構造観察のために、ASW を満たした実験槽内で、ABRM の筋線維束を、両端にとりつけたフックを用いて張力トランスデューサー (UT-100、Shinnko-Tushinn) と固定レバーに接続した。増幅器 (RP-3、NihonKohden) を介してペンレコーダー (Mark VII WR3101、Graphtec) で等尺性張力を測定しつつ、静止時に 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した 6% の glutaraldehyde 液で化学固定し、さらに、蒸留水で希釈した 2% の osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) で後固定した。細胞内 Ca 検出のために、同様に実験槽内に置かれた筋線維束を、静止時と ACh-拘縮の最大張力発生時に 2% の potassium pyroantimonate (K-PA;  $\text{K}[\text{Sb}(\text{OH})_6]$ ) を含む 1% の  $\text{OsO}_4$  液 (PAOs 液; pH 7.2) で固定した<sup>9)</sup>。固定試料は、ethanol 系列で脱水し、Epoxy 樹脂に包埋して熱重合後にウルトラマイクロトームで超薄切片を作

製し、uranyl acetate や lead citrate で電子染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX, JEM2000FXS) で観察した。細胞化学用に固定した試料の超薄切片の一部は電子染色せず、エネルギー分散型 X-線検出器 (TX3/58-8341M、NORAN Instruments) を装着した電子顕微鏡 (JEOL JEM 2000FXS) で観察し、切片像で見られる PA の沈澱を元素分析した。

### 急速凍結

凍結切片-元素分析のための試料の急速凍結は主にプロパンジェット法<sup>8-10)</sup>で行なった。ASW を満たした急速凍結装置装着の実験槽内に ABRM の筋線維束を等尺性にセットし、ASW を K-拘縮液に置換することによりテスト収縮を誘導し、その張力変化をトランスデューサー (UL-2GR、Shinnko-Tushinn) および増幅器 (RP-3、NihonKohden) を介してペンレコーダー (Mark VII WR3101、Graphtec) で記録した。次に、液交換により筋を弛緩させ、その後の静止時に液体プロパン ( $-190^{\circ}\text{C}$ ) を噴出させ筋を急速凍結した。凍結直前には筋線維束の中央部を 2 枚の Gold-plate<sup>10)</sup> ではさみこみ、マイクロピペット吸引で実験液を急速に除去した。凍結試料は凍結切片作製まで液体窒素中 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) に保存した。急速凍結の評価のため、凍結試料の一部は 2%  $\text{OsO}_4$  を含む  $-80^{\circ}\text{C}$  のアセトン中で凍結置換を施し、樹脂包埋後、超薄切片を作製し、ウランと鉛の電子染色を加えた後、通常の電子顕微鏡観察を行なった。

### 凍結切片の作製

急速凍結された ABRM から、クライオマイクロトーム (LKB Cryo NOVA、試料温度  $-130^{\circ}\text{C}$ ) で厚さ約 100 nm の凍結切片を作製し、クライオチャンバー内で、支持膜としてカーボン薄膜をはった Ni-200 のグリッド上に載物し、もう一枚のグリッドをカーボン薄膜どうしが向かい合うように重ねて軽く圧を加えた後、これを凍結切片、凍結乾燥用の自家製コンテナ<sup>11)</sup> に収納した。さらに凍結乾燥装置 (VFD300、真空デバイス社) に収納し、 $-80^{\circ}\text{C}$  以下でおおよそ 12 時間乾燥した。乾燥終了後は直ちに切片表面にカーボンを薄く真空蒸着し、次の元素分析までデンケーター内に保存した。

### 凍結切片の定量元素分析

凍結乾燥後の切片を Be 製のクライオトランスファーホルダー (EM - CTH10 CRYO Transfer-holder、JEOL) に装填し、コールドトラップに液体窒素を注入し、予めホールピースまわりを冷却し

ておいた透過型分析電子顕微鏡(JEM2000FXS、JEOL)内に挿入し、続いてホルダー自体も液体窒素で $-130^{\circ}\text{C}$ に冷却した。この冷却温度は分析時のコンタミとビーム照射による質量損失(mass-loss)が最も少ない温度を予備実験で確認して設定した。観察倍率 25,000 倍、加速電圧 80 kV で、径  $0.16\ \mu\text{m}$  の電子ビームを凍結切片の分析対象領域に 100~200 秒間照射(試料電流、1.35 nA)し、発生した X-線をエネルギー分散型 X-線検出器(TX3/58-8341M 型、NORAN Instruments)で検出し、X-線スペクトルをコンピューター解析(TN-5450 EDX Analyzer、NORAN Instruments)し、各分析領域の元素濃度を乾燥重量(mmol/mg dry wt)で求めた<sup>7)</sup>。

一般に、定量は Hall (1971)<sup>12)</sup> によって提案された理論式にもとづいて X-線スペクトルから計算されるが、個々の分析システムごとに異なるウェイトファクター( $W_x$ )を予め求めなければならない<sup>13)</sup>。本研究では、Shuman *et al.* (1976)<sup>14)</sup> の方法により、子牛の血清アルブミン(BSA)を溶媒にした種々の Ca 濃度標準試料を作成し、これらを前述の分析条件下で分析し、得られた X-線スペクトルの Ca スペクトルピークの強度(P; Peak)とバックグラウンド(B; Continuum, 4.5-5.5 KeV region)の強度比(P/B ratio; Peak /Continuum ratio)から Ca のウェイトファクター( $W_{Ca}$ )として 148.81 の値を得た(図 1)。なお、Ca 濃度標準試料の正確な濃度は、同一試料を高周波プラズマアナライザー(Spectrometer ARL 4310 型、Applied Research Laboratory)で分析して決定した。

## 結果

### 微細構造と細胞化学法による細胞内 Ca の局在と収縮時の移動

図 2 は、glutaraldehyde-OsO<sub>4</sub> で固定された ABRM の筋線維束の横断切片像である。筋線維の直径は 5~10 $\mu\text{m}$  程度で、筋線維中央部は収縮要素である太いフィラメントと細いフィラメントで占められており、周辺部には筋小胞体やミトコンドリアが局在していた。筋小胞体は、長径  $0.1\sim 0.5\ \mu\text{m}$  の楕円体であり、形質膜と diad を構成していた。また、ミトコンドリアの多くは球状で、直径は大きなものではおよそ  $0.5\ \mu\text{m}$  程度であった。

静止時に PAOs 液で固定された筋線維では、既に報告されているように<sup>9)</sup>、形質膜内表面と筋小胞体膜に顕著な PA の沈澱が観察された(図 3a)。また、PA の沈澱はミトコンドリアや核にも見られた。一方、ACh-拘縮時に PAOs 液で固定された筋線維では、PA の沈澱は形質膜内表面や筋小胞体膜で著しく減

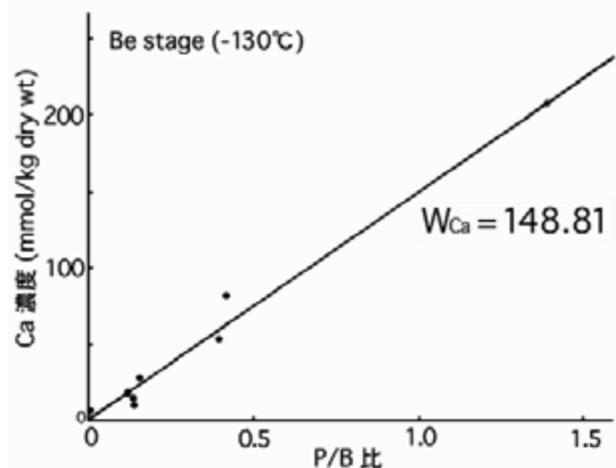


図 1. 元素分析システムにおける Ca のウェイトファクター( $W_{Ca}$ ).

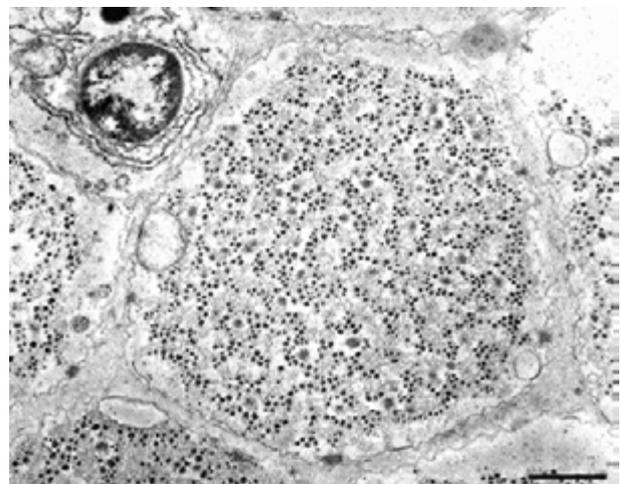


図 2. 化学固定された ABRM の横断切片像。筋線維中央に筋フィラメント、周辺部に筋小胞体とミトコンドリアがみられる。スケール:  $1\ \mu\text{m}$ 。

少しており、筋フィラメントで占められる筋線維中央の筋形質内に一様に分散分布していた(図 3b)。形質膜や筋小胞体での PA 沈澱の減少とは対照的にミトコンドリアや核では PA 沈澱の有意な減少は認められなかった。

PA は、生体内で種々の陽イオンと反応して沈澱を生ずることが知られており<sup>15)</sup>、電子顕微鏡下で観察された沈澱に Ca が含まれていることを明らかにするために X-線マイクロアナリシスを行った。図 4 は、その結果得られた典型的な X-線スペクトルを示している。静止時に固定された筋線維の筋形質膜上に見られた PA 沈澱の X-線スペクトル(図 4a)では、 $500\sim 4,500\ \text{eV}$  のエネルギー範囲で、Os-M 線( $1,914\ \text{eV}$ )と Cl-K $\alpha$ 線( $2,621\ \text{eV}$ )のピークとともに、Sb-La 線のピーク値である  $3,600\ \text{eV}$  付近に顕著なピークが見られた。Na-K $\alpha$ 線( $1,041\ \text{eV}$ )のピークは見られず、Mg-K $\alpha$ 線( $1,253\ \text{eV}$ )および K-K $\alpha$ 線( $3,312\ \text{eV}$ )付近にはある程度の X-線強度は認められたが、顕著

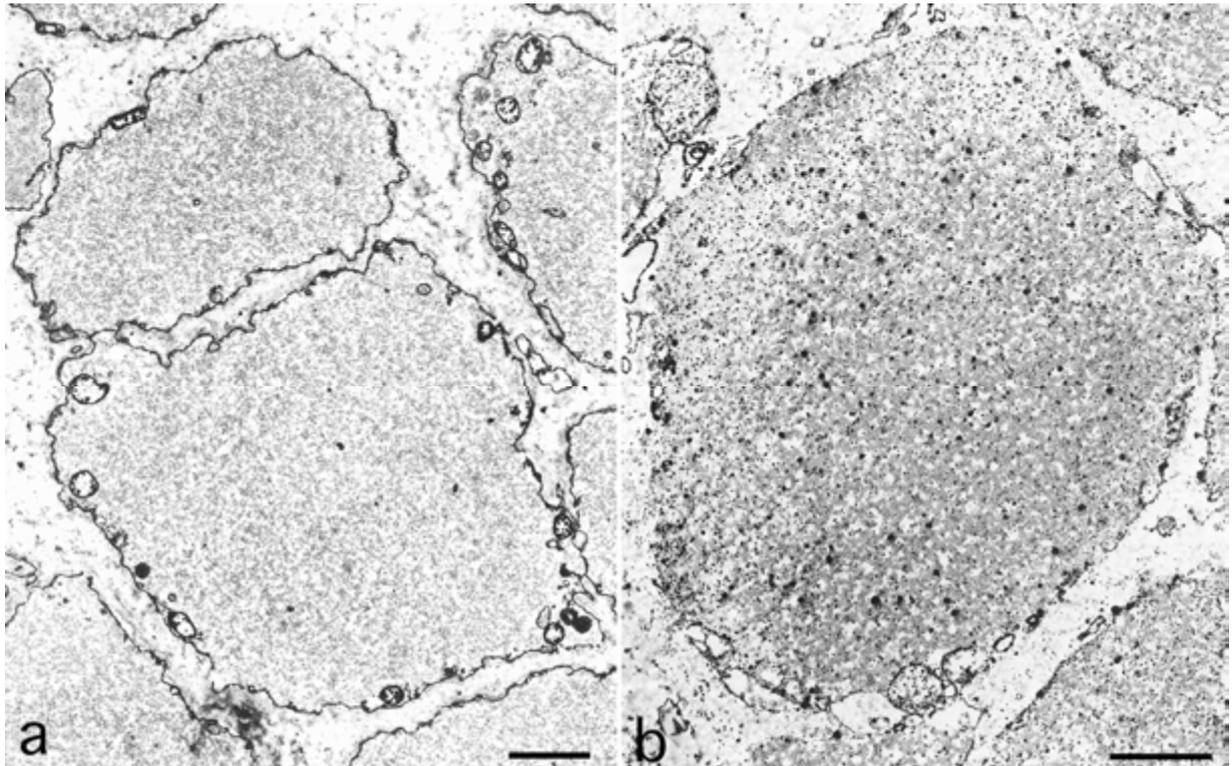


図3. ピロアンチモン酸(PA)法による細胞内局在と収縮時の移動. 静止時に PAOs で固定された筋線維(a)では, 形質膜内表面, 筋小胞体, ミトコンドリアに PA の沈澱が見られる. ACh-拘縮時に PAOs 液で固定された筋線維(b)では, PA 沈澱は主に筋形質中央部に分散分布しており, 形質膜内表面や筋小胞体では著しく少ない. ミトコンドリアでは沈澱の減少は見られない. スケール: 1  $\mu$ m.

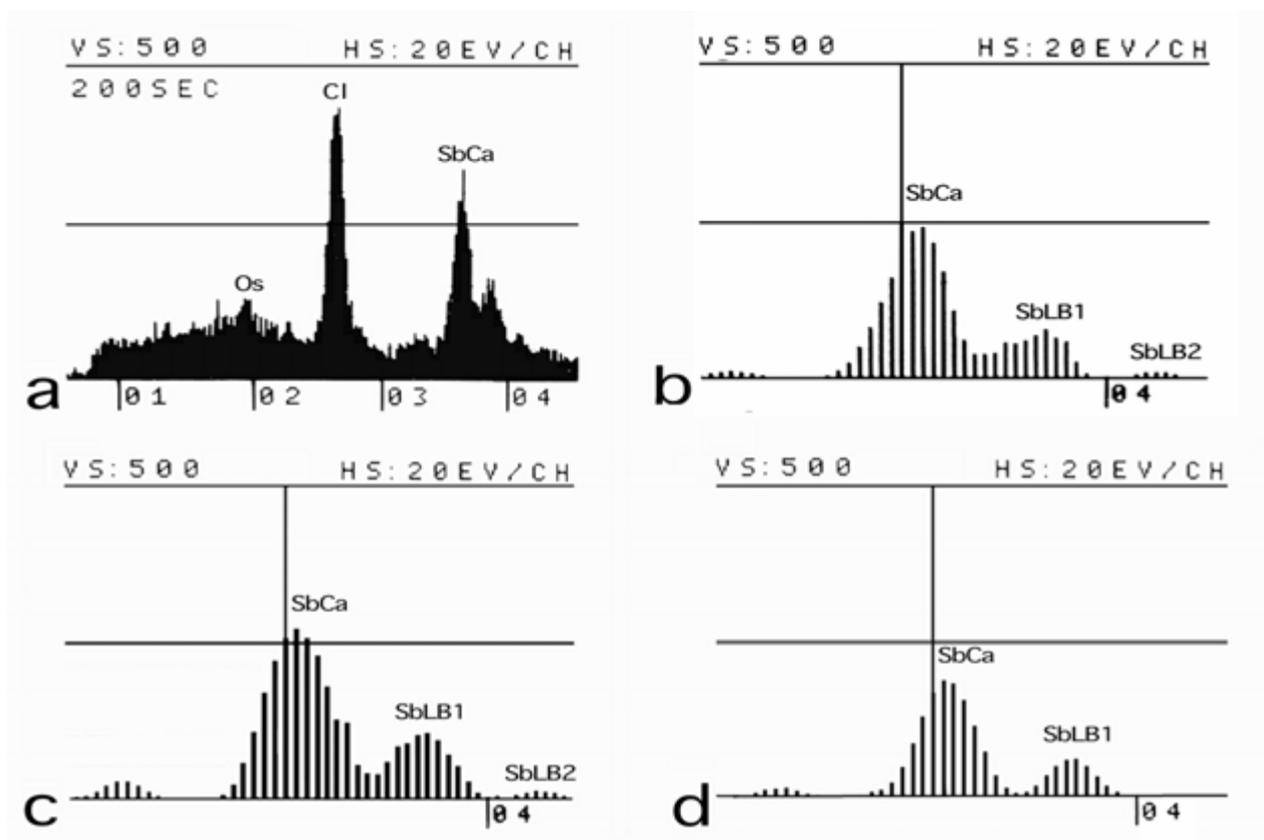


図4. 静止筋線維の形質膜(a, b)と筋小胞体(c)および収縮筋線維の筋形質(d)に見られる PA 沈澱から得られた X-線スペクトル. b 図は a 図の一部を拡大. 中央の垂直線は 3,600 eV を示す(b-d). Os: Os-M 線, Cl: Cl-K $\alpha$ 線, SbCa: Sb-L $\alpha$ 線と Ca-K $\alpha$ 線, SbLB1: Sb-L $\beta$ 1 線, SbLB2: Sb-L $\beta$ 2 線, VS: 縦軸(X-線カウント), 横軸: エネルギー値 (KeV; 20 eV/CH).

表 1. ムラサキイガイ ABRM の筋線維内 PA 沈澱に含まれる各元素の X-線強度比(相対濃度)

元素-線	強度比		
	静止筋線維		収縮筋線維
	形質膜	筋小胞体	筋形質
Sb-L $\alpha$	1.00	1.00	1.00
Ca-K $\alpha$	0.43 $\pm$ 0.12	0.33 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.08
K-K $\alpha$	0.12 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.04
Mg-K $\alpha$	0.11 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.06
Na-K $\alpha$	0.15 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.05

値は平均値 $\pm$ 標準偏差(n=12)

なピークは見られなかった。図 4b は a 図のスペクトルから連続 X-線からなるバックグラウンド(B)を除去し、3,600 eV 付近のピークを中心にして横に拡大した図である。このピークのエネルギー値は 3,620~3,630 eV であり、これは Sb-L $\alpha$ 線と Ca-K $\alpha$ 線(3,690 eV)の合成ピークであった<sup>3,6,13,16)</sup>。また、3,840 eV と 4,100 eV のピークは、それぞれ Sb-L $\beta$ 1線と Sb-L $\beta$ 2 線のピークであった。同様の X-線スペクトルが、静止筋線維の筋小胞体(図 4c)と収縮筋線維の筋形質中央(図 4d)に見られた PA 沈澱の点分析で得られた。表 1 は、これらのスペクトルを Russ の計算式<sup>17)</sup>を組み込んだプログラムでコンピューター処理し、Sb-L $\alpha$ 線の X-線強度を 1 とした時の他の元素の比較定量値を示したものである。観察された PA 沈澱は、いずれも有意に Ca を含むことを示した。

#### 凍結切片-元素分析法による細胞内 Ca 局在

静止時の ABRM 筋線維束を、等尺性張力を測定しながら-190°Cの液体プロパンで急速凍結した。図 5 は、凍結記録の一例である。プロパンジェット凍結装置の実験槽内に満たされている ASW を K-拘縮液に交換し、テスト収縮を誘導して筋線維束の活性度を確認した後、外液を ASW に戻して弛緩させ、10 min 以上の十分な回復期<sup>18)</sup>を経た静止時に外液の ASW を除去して急速凍結した。

急速凍結によってどの程度細胞が生きた状態に近く保存されたかについての評価は凍結置換切片像の観察から得られた。図 6 は静止時の ABRM 筋線維束をプロパンジェット法で急速凍結し、-80°Cの 2% OsO<sub>4</sub> を含むアセトン中で凍結置換し、Quetol 812 樹脂に包埋した後作製した超薄切片の電顕像である。各細胞内の筋フィラメントや基質の状態から、筋線維束の表層(写真上部)から筋線維束中心部に向かって、およそ 5  $\mu$ m までは極めて良好な凍結が得られていることが示された。これよりさらに深部では筋フィラメントの配列は徐々に乱れはじめ、基質も密

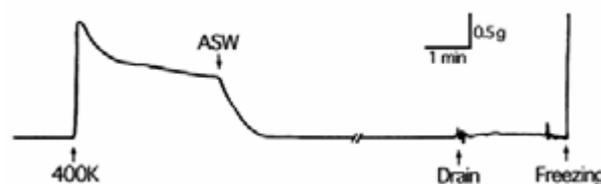


図 5. 静止時に ABRM の筋線維束がプロパンジェット法で急速凍結されるまでの等尺性張力記録。テスト収縮(400K)後の十分な回復期を経て、ASW を除去(Drain)し、急速凍結(Freezing)。凍結時の瞬間的な張力増加は液体プロパン噴出の衝撃を示す。

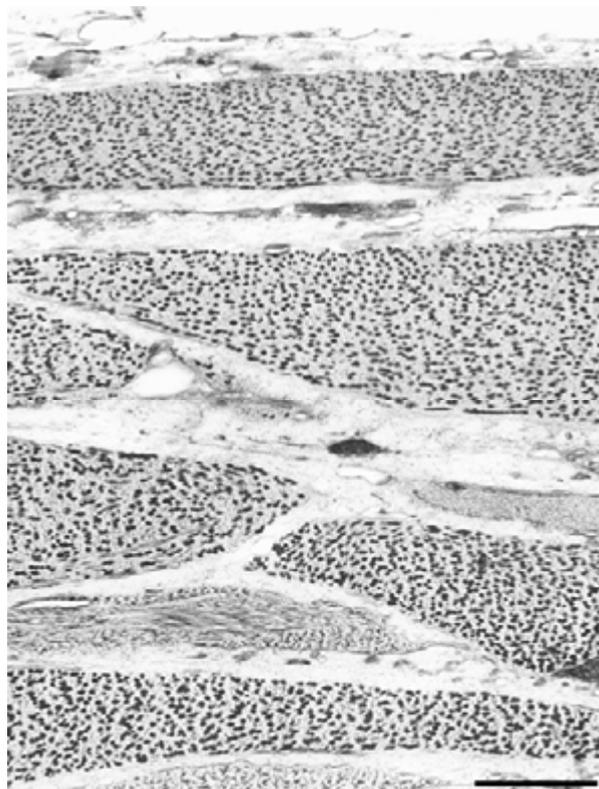


図 6. ABRM 筋線維束の凍結置換切片像。筋線維束表面(写真上部)から深さおよそ 5  $\mu$ m までは凍結良好である。スケール: 1  $\mu$ m。

から疎になり、凍結が次第に劣悪になることが示された。以上のような凍結置換の結果にもとづき、元素分析用の凍結切片は、筋線維束表面から 5  $\mu$ m 以

内の部分から作製した。

図7は凍結切片像の一例を示している。細胞内では多数の筋フィラメントが筋線維長軸に沿って平行に走行しており、形質膜付近にはしばしば筋小胞体と思われる小胞が観察された。凍結切片のグリッドへの載物は乾式で行なうので、グリッド上で切片が浮き上がらないよう凍結乾燥前に2枚のグリッドで挟み込み、圧を加えているが、グリッド表面のカーボン支持膜に密着させることは難しく、切片はかなり波うった状態であった。しかし、随所にカーボン支持膜に密着した部分も観察され、こうした部分を対象に元素分析を行なった。形質膜内表面に結合しているCaを検出するために、収束ビームを形質膜内側に照射し(図7、○印)、さらに、ビームを形質膜内表面に沿って連続的に移動させて点分析した。また、筋形質部分の分析では、細胞中央部で収束ビームをランダムに移動させて点分析した。X線スペクトルをもとに各元素の定量値を求めるにはグリッド、支持膜、外液等に由来するバックグラウンド(B)のX線強度の測定も必要であるため、細胞内点分析を行なった領域に最も近い細胞間隙または支持膜部分も同時に点分析した。

図8は静止時のABRM筋線維束の凍結切片を元素分析した結果得られたX線スペクトルの典型例を示している。形質膜内表面の点分析(図8a)では低

エネルギー領域から順次、Ni-L $\alpha$ 線(851 eV: Ni)、Na-K $\alpha$ 線(1,041 eV: Na)、Mg-K $\alpha$ 線(1,253 eV: Mg)、Si-K $\alpha$ 線(1,739 eV: Si)、P-K $\alpha$ 線(2,013 eV: P)、S-K $\alpha$ 線(2,307 eV: S)、Cl-K $\alpha$ 線(2,621 eV: Cl)、K-K $\alpha$ 線(3,312 eV: K)、Ca-K $\alpha$ 線(3,690 eV: Ca)のスペクトルピークが検出された。Ca-K $\alpha$ 線のスペクトルピークは実際には単独のピークではなく、K-K $\beta$ 線(3,589 eV)のスペクトルピークとの合成ピークであった。Ca-K $\alpha$ 線のX線強度は、純粋なCaCl $_2$ およびKCl試料を分析して得られる標準スペクトルの一次および二次微分波形で比較検討し、合成ピークをK-K $\beta$ 線とCa-K $\alpha$ 線の二つのピークに分離させることによって求めた。筋形質内分析(図8b)でもほぼ同様のスペクトルピークが検出された。しかし、K-K $\beta$ 線とCa-K $\alpha$ 線による合成ピークではCa-K $\alpha$ 線領域の強度が形質膜内面分析のスペクトル(図8a)より低い事が認められた。一方、バックグラウンドの分析スペクトル(図8c)ではノイズレベルのS、Cl、Kのピークの他は顕著なスペクトルピークは検出されなかった。ノイズレベルで検出されるS、Cl、Kはおそらく外液由来のものと思われる。定量計算ではこのスペクトルをバックグラウンドとして形質膜内表面の分析スペクトル(図8a)や筋形質内の分析スペクトル(図8b)から減算した。表1は静止時のABRM筋線維の筋形質内表面および筋形質の点分析によって得

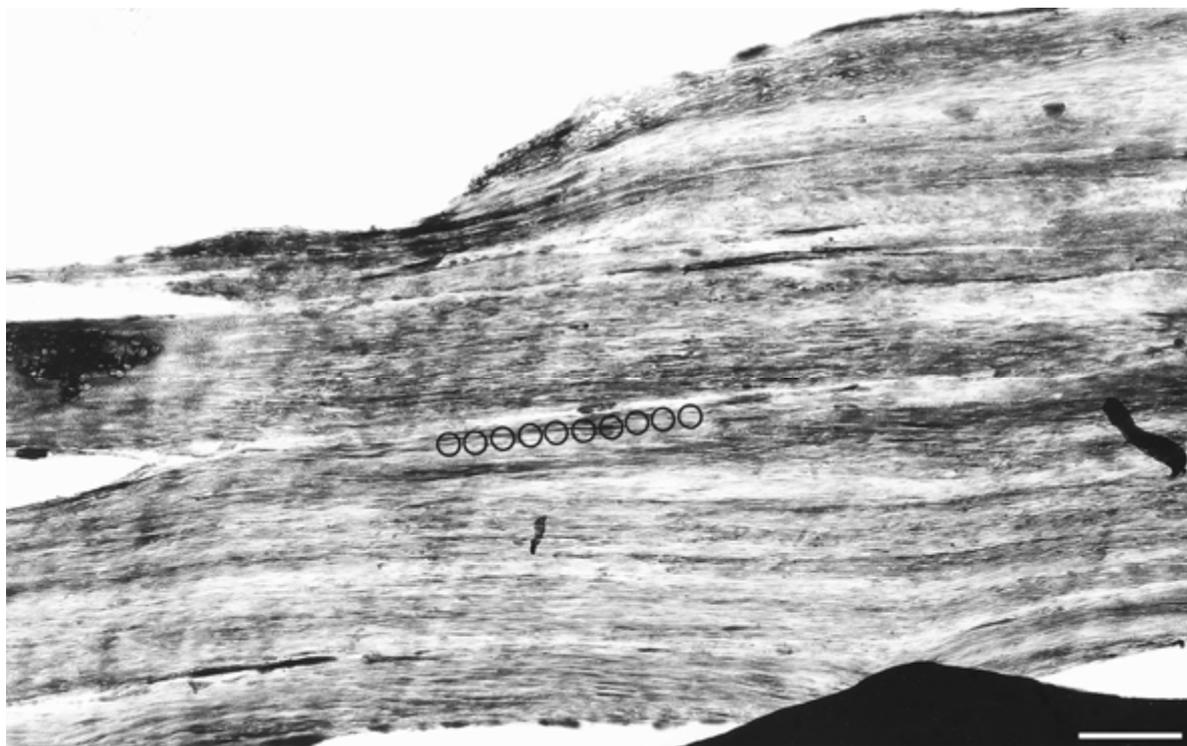


図7. ABRM筋線維束の縦断凍結切片像。○印は形質膜内表面に結合しているCaを検出するための点分析におけるビーム照射位置を示している。筋形質部分は細胞中央部で点分析、またバックグラウンド(B)として切片のない支持膜部分を分析。スケール: 1  $\mu$ m.

られた主要元素の濃度を示したものである。筋形質内表面に沿った連続点分析で得られた Ca 濃度は 3.03 mmol/kg dry wt であり、一方、筋形質部分の Ca 濃度は 1.56 mmol/kg dry wt であった。分析では高濃度の K および Cl も検出されたが、その濃度は形質膜内表面と筋形質とで有意の差はなかった。K と Cl に関するこの結果は、凍結切片-元素分析を行なったカサゴウキブクロ筋の結果<sup>7)</sup>と良く一致しており、これらの元素濃度が細胞内で高いことは試料の凍結処理によって筋線維が損傷を受けず、生き

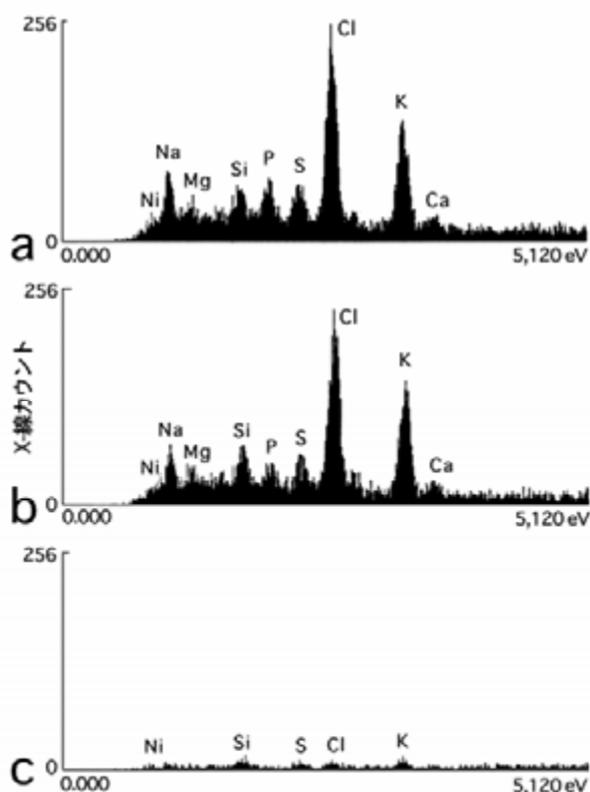


図 8. ABRM 筋線維束の凍結切片各分析領域の点分析で得られた X-線スペクトル. (a) 筋形質膜内表面(図 7, ○印)の分析 X-線スペクトル. (b) 筋形質の分析 X-線スペクトル. (c) 切片外領域の分析 X-線スペクトル(バックグラウンド). 縦軸は X-線カウント(0~256 counts), 横軸は eV (0.000~5,120 eV). スペクトル中のラベルは各元素による特性 X-線のピークを示す(詳細は本文参照).

表 2. ABRM 筋形質膜内表面と筋形質の元素濃度

元素	元素濃度 (mmol/kg dry wt.)	
	形質膜内表面 n=25	筋形質 n=8
Ca	3.03 ± 5.88	1.56 ± 2.43
K	315.55 ± 80.78	293.97 ± 64.33
Cl	335.52 ± 129.63	477.96 ± 72.20

値は平均値 ± 標準偏差. Ca 濃度 0 の分析例も含む.

ている状態と同じような状態で良好に凍結された事を示している。

## 討論

### 細胞化学法による Ca 動態と PA 沈澱分析

静止時に PAOs 液で固定された ABRM の筋線維では、筋形質膜内表面や筋小胞体膜に顕著な PA 沈澱が見られ(図 3a)、一方、収縮時に固定された筋線維では、これらの構造では PA の沈澱は減少し、代わりに筋フィラメントが存在する細胞中心部に多数の分散分布した PA 沈澱が見られた(図 3b)。この結果は、Atsumi and Sugi (1976)の報告<sup>4)</sup>を再確認するもので、静止時に細胞内貯蔵構造に局在している Ca が収縮時に活性化 Ca として筋形質内に遊離される現象を反映していると考えられる。静止時と収縮時の PA 沈澱の変動が認められないミトコンドリアや核は Ca を貯蔵しても、筋の収縮-弛緩サイクルには関与していないと考えられる。同様の結果は、ムラサキイガイの他にも多くの無脊椎動物や脊椎動物の平滑筋で報告されており<sup>1-3)</sup>、この考えの妥当性が支持されている。

細胞化学法としての PA 法は、1960 年代頃までは Na の検出にも使われていたように、PA は生体内で Ca 以外の陽イオンとも反応して沈澱することが知られており<sup>15)</sup>、PA 法による平滑筋の Ca 動態研究では、観察される PA 沈澱が実際に Ca を含んでいることを明確にする必要がある。この目的のためには、PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスが有効である<sup>6,16,19)</sup>。ムラサキイガイの ABRM における Ca 動態を始めて明らかにした研究<sup>4)</sup>でも PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスが試みられているが、定量的解析は行なわれていない。PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスでは、沈澱に Ca が有意の量で含まれていると、ピークエネルギー値が 3,610~3,640 eV となる Sb-Ca の合成スペクトルが検出されることが明らかにされている<sup>6,16,19)</sup>。今回の分析結果は、いずれも、およそ 3,620 eV にピークをもつ合成スペクトルを示し(図 8)、それらのスペクトルにおいても、Ca-K $\alpha$ 線の X-線強度は Sb-L $\alpha$ 線のそれに対して大きな相対値を示した(表 1)ので、電子顕微鏡下で観察された PA 沈澱は確実に Sb-Ca の沈澱であり、細胞内の Ca 局在と収縮時の移動を示したものと考えられる。

PA 沈澱の X-線スペクトル(図 4a)では、500~4,500 eV のエネルギー範囲で、Os-M 線(1,914 eV)と Cl-K $\alpha$ 線(2,621 eV)のピークが見られた。Os-M 線は、固定液の OsO<sub>4</sub> に由来し、Cl-K $\alpha$ 線は試料を包埋している樹脂に由来する<sup>16)</sup>。X-線スペクトルにおいて、Na-K $\alpha$ 線、Mg-K $\alpha$ 線および K-K $\alpha$ 線の顕著な

ピークは見られなかったが、定量解析では有意な相対強度が示された。しかし、これらの元素は、試料の固定、脱水および樹脂包埋の過程で二次的に PA と反応し、生理的な動態を反映したものではないことが明らかにされている<sup>6)</sup>。

### 形質膜局在の Ca とその収縮調節機構

静止時に急速凍結された ABRM 筋線維束の縦断凍結切片の筋形質膜内表面と細胞中央の筋形質部とを点分析した結果、検出された Ca 量の平均濃度は、筋形質膜内表面では 3.03 mmol/kg dry wt であり、一方、筋形質部では 1.56 mmol/kg dry wt であった(表 2)。外液の Ca は凍結時除去されているので形質膜内表面の点分析によって検出された Ca は内表面に結合した Ca によるものと考えられ、この結果は、より生体に近い状態での形質膜内表面の Ca 局在を明示するものと考えられる。しかし、筋形質内の平均濃度に比し、形質膜内表面局在の Ca 濃度はあまり高くなく、濃度差は顕著ではなかった。これは、形質膜を連続的に点分析した時に、各分析点間でかなり Ca 濃度に差があり、その計算濃度がゼロであったりマイナスを示すものも含まれているためである。既に述べたように、Ca は形質膜に局在する Ca 結合蛋白質<sup>6)</sup>に結合していると思われ、かつ、フリーズフラクチャーレプリカの観察では、結合蛋白質と思われる粒状構造が膜表面には高密度で見られない(未発表データ)ことから、定量値がゼロやマイナスを示す分析点があることは当然のことと思われる。すなわち、形質膜内表面の分析点の中には Ca 結合蛋白質が含まれず、Ca が存在しない部分も含まれていた可能性がある。そこで、考察のため、ゼロやマイナスの定量値を示した分析点の結果を除外し、有意な量の Ca が検出された分析例のみを抽出し、平均 Ca 濃度を求めた。表 3 はその結果を示したものであり、この場合、形質膜内表面の Ca 濃度は 7.58 mmol/kg dry wt となり、一方、筋形質での濃度は 2.50 mmol/kg dry wt で、両者に顕著な差が見られた。

表 3. ABRM 筋形質膜内表面と筋形質の元素濃度

元素	元素濃度 (mmol/kg dry wt.)	
	形質膜内表面 n=10	筋形質 n=5
Ca	7.58 ± 7.20	2.50 ± 2.66
K	292.25 ± 95.69	302.32 ± 67.80
Cl	379.79 ± 147.72	488.41 ± 81.41

値は平均値 ± 標準偏差. Ca が検出された分析例のみ抽出.

凍結切片・元素分析法で Somlyo *et al.* (1981)<sup>19)</sup>により報告されたカエル横紋筋(骨格筋)静止時の筋小胞体終末槽に含まれる Ca 濃度は ~129 mmol/kg dry wt であり、また、著者ら<sup>7)</sup>が同手法で硬骨魚カサゴのウキブクロ筋で得た濃度はおよそ 43 mmol/kg dry wt であった。この濃度差は細胞内に占める筋小胞体の容積と含水量によって補正し、湿重量あたりの濃度にするとはほぼ近い値になる。ABRM についてまだ利用できる含水量の値がないので湿重量あたりの濃度での比較はできないが、乾重量あたりの濃度で比較すると、形質膜内表面に結合している Ca 濃度は横紋筋の筋小胞体内 Ca 濃度よりはるかに低い。しかし、横紋筋の筋小胞体が閉鎖内膜系であり、終末槽に局在する Ca 結合蛋白質の calsequestrin により高濃度に蓄積されやすいのにくらべ、形質膜内表面での Ca 結合蛋白質への Ca 結合は開放系であるため横紋筋の筋小胞体のように高濃度に蓄積することは困難と考えられる。また、ABRM の活性化 Ca の貯蔵には形質膜内表面のみではなく筋小胞体も関わっている。このように、横紋筋との Ca 貯蔵様式の違いを考慮すれば、形質膜内表面のおよそ 8 mmol/kg dry wt の Ca は収縮を引き起こすためにかなり有効な量であると思われる。フリーズフラクチャーおよびエッチングレプリカの電子顕微鏡観察では、形質膜内表面上に、低角度回転蒸着法で観察された Ca 結合蛋白質(MCBP-450)と類似した粒状構造が確認されており(未発表)、Ca は、おそらく、静止時には膜表面から突出した Ca 結合蛋白質の一部に結合しており、収縮時には膜電位変化に影響された Ca 結合蛋白質の結合部位から筋形質内に遊離されると考えられる。

### 謝辞

本研究は、一部、文部科学省の科学研究費補助金(07670063)の援助を受けて行なわれた。

### 文献

- 1) 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.
- 2) Sugi H and Suzuki S (1982) Physiological and ultrastructural studies on the intracellular calcium translocation during contraction in invertebrate smooth muscles. In: *Basic Biology of Muscles. A Comparative Approach.* Twarog BM, Levine RJC and Dewey MM, eds., Raven Press, New York. pp. 359-370.
- 3) 鈴木季直, 杉 晴夫 (1986) 興奮収縮連関-細胞化学的アプローチ. *新生理科学大系 第4巻 筋肉の生理*

- 学. 富田忠雄, 杉 晴夫 編, 医学書院, 東京. pp. 178-189.
- 4) Atsumi S and Sugi H (1976) Localization of calcium-accumulating structures in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis* and their role in the regulation of active and catch contraction. *J. Physiol.* **257**:549-560.
  - 5) Yamanobe T and Sugi H (1993) Purification and characterization of a Ca<sup>2+</sup>-binding 450-kDa protein (MCBP-450) in the plasma membrane enriched fraction from a molluscan smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* **1149**: 166-174.
  - 6) Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryo sections. *Histochemistry* **92**: 95-101.
  - 7) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocation during the contraction relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**:1093-1099.
  - 8) Muller M, Meisner N and Moor H (1980) Freezing in a propane jet and its application in freeze-fracturing. *Mikroskopie* **36**: 129-140.
  - 9) Suzuki S and Pollack GH (1986) Bridgelike interconnections between thick filaments in skeletal muscle fibers observed by the freeze fracture method. *J. Cell Biol.* **102**: 1093-1098.
  - 10) Suzuki S, Oshimi Y and Sugi H (1993) Freeze-fracture studies on the cross-bridge angle distribution at various physiological states and the thin filament stiffness in single skinned frog muscle fibers. *J. Electron Microsc.* **42**: 107-116.
  - 11) 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.
  - 12) Hall TA (1971) The microprobe assay of chemical elements. In: *Physical Techniques in Biological Research*. Oster G, ed., Academic Press, New York, pp.157-275.
  - 13) 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**: 32-42.
  - 14) Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity. *Ultra-microscopy* **1**: 317-339.
  - 15) Komnick H and Komnick U (1963) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur funktionellen Morphologie des Ionentransport in der Sarzdruse von *Larus argentatus*. *Z. Zellforsch. Anat.* **60**:163-203.
  - 16) Suzuki S (1978) Quantitative and Semiquantitative X-ray microanalyses of pyroantimonate precipitate in molluscan smooth muscle, with special reference to the presence of calcium. *Teikyo Med. J.* **1**: 259-268.
  - 17) Russ JC (1974) The direct element ratio model for quantitative analysis of thin sections. In : *Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissues*. Hall T *et al.*, eds., Academic Press, New York. pp.269-276.
  - 18) Sugi H and Suzuki S (1978) The nature of potassium and acetylcholine-induced contracture in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **61C**:275-279.
  - 19) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. II. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-468.
  - 20) Somlyo AV, Gonzalez-Serratos H, Shuman H, McClellan G and Somlyo AP (1981) Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron probe study. *J Cell Biol.* **90**:577-594

■原 著■ 2003-2004 年度神奈川大学共同研究奨励助成論文

## 匂い受容体の機能解析を目指したバイオインフォマティクス

大瀧丈二<sup>1,3</sup> 中山 堯<sup>2</sup> 後藤智範<sup>2</sup> 山本晴彦<sup>1</sup>

### Bioinformatics for Functional Analyses of Odorant Receptors

Joji M. Otaki<sup>1,3</sup>, Takashi Nakayama<sup>2</sup>, Tomonori Gotoh<sup>2</sup> and Haruhiko Yamamoto<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Information Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: otaki-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** In order to delineate the functional aspects of odorant receptors as protein molecules, we here employed computational and biological approaches, each of which could eventually highlight different aspects of odorant receptors. We first characterized the non-redundant protein database to depict the general nature of proteins with a comprehensive database search strategy. We also employed a computational method called self-organizing map to understand possible relations of odorant receptors to other G-protein-coupled receptors. Furthermore, we have studied how to deliver foreign genes or proteins to olfactory sensory neurons in mice *in vivo*. Systematic synthesis of these computational and biological results could pave the way to our understanding of the whole nature of odorant receptors as protein molecules.

**Keywords:** odorant receptor, G-protein-coupled receptor, bioinformatics, database search, self-organizing map, gene/protein delivery

## 序論

鼻腔内に存在する嗅神経細胞が持つ匂い受容体は、外部からの匂い物質を捕える蛋白質分子である。哺乳類のゲノムには約 1000 種類ほどの匂い受容体遺伝子が保持されており、これは哺乳類の全遺伝子の約 4%にも相当する生物界で最も大きな遺伝子ファミリーである<sup>1)</sup>。その発見および分子レベルでの嗅覚系の解明という功績に対して、コロンビア大学のアクセル教授とハッチンソン・ガン研究センターのバック博士にノーベル生理学・医学賞が与えられたことは記憶に新しい<sup>2,3)</sup>。

匂い受容体蛋白質はホルモンをはじめとした生物学的に重要な化学物質一般の受容体、G蛋白質共役受容体 (GPCR) の一群を構成している。事実、多細胞動物において、匂い受容体を除いて考えても、GPCR は最も汎用されている受容体である<sup>4)</sup>。

本研究は、匂い受容体を GPCR のモデル系として捉え、情報科学および分子生物学の手法を用いて哺乳類の匂い受容体の機能解析のための基盤をつくるのが目的である。すべての GPCR は非常に類似し

た三次元構造を持つと考えられているが、個々の受容体の一次配列を用いた類似性検索では的確なアライメントを得ることが難しく、GPCR スーパーファミリーの全体像を描くことは容易ではない<sup>4)</sup>。そのため、筆者らは、これまでもその代替あるいは補完となる方法論を模索してきたが<sup>5,6)</sup>、今までの方法とはまったく異なったアプローチが優れた結果を生み出す可能性もある。

そのような考えのもとに、本研究では、既存の類似性検索以外の方法で、計算機の使用によって GPCR および匂い受容体の機能を推測することに努力する。具体的には、①アミノ酸配列の組み合わせを網羅的に検索することで、蛋白質データベースの性質を明らかにする。②自己組織化マップ (SOM) を用いて GPCR および匂い受容体の性質を検討する。さらに、③マウスの嗅神経細胞に外部から任意の遺伝子および蛋白質を導入する実験系を確立することを目指す。これは、情報科学的研究から得られた結果に基づき、嗅神経細胞に発現している匂い受

容体の性質を任意に操作することを目的とした実験方法の開発研究である。これら①から③にみられるように、情報科学と生物科学の手法を駆使し、総合的な蛋白質科学として GPCR および匂い受容体にアプローチする。

尚、今回の助成研究結果のうち、①に関する研究については専門誌に発表した<sup>7,8)</sup>。また、②および③に関する研究についても、近々発表予定である。この報告書では要点を述べるにとどめるが、詳細についてはそちらを参照されるとよい。

## 材料と方法

### データベース検索と蛋白質発現

米国 NCBI (National Center for Biotechnology Information) が管理している nr (non-redundant) 蛋白質データベース(2003 年 9 月のエントリーレコード数 = 154 万件)をダウンロードした。アミノ酸は約 5 億個含まれる。検索過程を容易にするために、すべてのデータを XML 化し、mutant、mutation、engineered、engineering などの表示を持つ人工的な配列を含むサンプルは除外した結果、対象となるサンプル数は 1,539,248 となった。

全アミノ酸配列について 1 アミノ酸残基および 3~5 アミノ酸組の出現頻度を調べる JAVA プログラムを作成し、それぞれのアミノ酸組の出現頻度を検索した。検索結果は ystat などの統計ソフトを用いて検討した。

5 アミノ酸組については、データベース中に存在しないものについて 6 種類を選び、ペプチドの化学合成および大腸菌 BL21Star(DE3)による融合蛋白質の産生を行った。

### 自己組織化マップ (SOM)

G 蛋白質共役受容体 (GPCR) のアミノ酸配列データを機能グループ (ファミリー) ごとに分類するシステムを開発する目的で自己組織化マップ (SOM)<sup>9)</sup>を用いた。

SOM の入力是对象とするデータの特徴ベクトルである。SOM の出力結果はこの特徴ベクトルに大きく依存するため、その検討が重要となる。そこで、入力ベクトルには記号表現および z 値を用いた。記号表現とは、アミノ酸配列データを直接入力ベクトルとする方法である。z 値とは、個々のアミノ酸の物理化学的性質を表わす数値である<sup>10)</sup>。GPCR サンプルを入力ベクトルに変換するために、配列データを 1 個、3 個あるいは 5 個の z 値に変換した。つまり、1 アミノ酸が z 値の組で表現される。得られた各 z 値表現のデータ列の自己共分散・相互共分散を

計算し、それを並べて SOM の特徴ベクトルとした。

データは GPCRDB で公開配布されている Class A GPCR を用いた。このデータはすでに 15 種類のファミリーに分類されている。GPCR の蛋白質配列データをダウンロードし、ファミリーごとに無作為に選んだデータの半数を訓練データとし( $n = 2063$ )、残りの半数をテストデータ( $n = 2053$ )とした。

SOM はニューロン数を 50 X 50 とし、バッチ方式で学習させた。バッチ SOM は、最初に全データを入力し、各データに最良一致するニューロンを見つけてそのデータをニューロンに一時的に記憶させ、着目ニューロンの重みベクトルを近傍内ニューロンの重みベクトルとする方法である。この処理を近傍を縮小しながら、収束するまで繰り返した。

### 遺伝子導入および蛋白質導入

緑色蛍光蛋白質 (GFP) 遺伝子を持つアデノウイルス・ベクターをマウスの鼻腔内に注入した。24 時間後、嗅上皮を露出させ、蛍光実体顕微鏡において観察した。

同様に、リポフェクション法に基づいた遺伝子導入試薬 NeuroPORTER (Gene Therapy System 社) を用いて、変異型 GFP 遺伝子を維持しているプラスミド pIRES2-EGFP (Clontech 社) の直接的な導入を試みた。

また、精製した蛋白質を直接マウスの嗅神経細胞へ導入するために、細胞膜透過性蛋白質である VP22 と緑色蛍光蛋白質との融合蛋白質を pCRT7/VP22-1-TOPO プラスミド (Invitrogen 社) から大腸菌 BL21Star(DE3)において発現させた。この融合蛋白質のヒスチジン・タグをもとに精製後、精製蛋白質溶液をマウスの鼻腔へと吸入させ、蛍光実体顕微鏡で嗅上皮を観察した。

## 結果と討論

### ①データベース検索と蛋白質発現

#### 蛋白質のアミノ酸組成

蛋白質データベースの性質を調べる第一段階として、データベース全体のアミノ酸組成を調べた。それぞれのアミノ酸組成はロイシンの 9.68% からトリプトファンの 1.35% まで様々であった。これらのアミノ酸組成の昇順とアミノ酸の化学的性質との関連は認められなかったが、遺伝子のコドン表におけるアミノ酸の使用頻度との相関が認められた (Spearman 相関係数 0.81)。このことは、われわれが対象としている蛋白質データベースが地球上に存在する蛋白質の母集団全体を適切に反映していることを示唆している。

### 3 アミノ酸組における分布

8000 種類存在する 3 アミノ酸組の出現頻度分布を調べた。データベース中の 1 アミノ酸残基の存在比の違いを補正するために、検索した 1 アミノ酸残基の出現頻度から予想される各 3 アミノ酸組の出現頻度の期待数を算出し、3 アミノ酸組を検索した実際の出現頻度と算出した期待数との比を求め、さらに 1 を引いた値を相対出現頻度 (RF) とし、その分布を図 1 に  $D_{\text{Triplet}}$  として表示した。また、対照として、JAVA プログラムでデータベース中の 1 アミノ酸残基と同じ存在比のアミノ酸群から無作為に 3 アミノ酸を発生させ、同様に理論的相対出現頻度を求め、その分布を図 1 に  $D_{\text{Random}}$  として表示した。図から明らかなように、理論的相対出現頻度分布  $D_{\text{Random}}$  と比較して、検索結果の分布  $D_{\text{Triplet}}$  は幅が広いことがわかった。つまり、ある 3 アミノ酸組は期待されるよりも頻繁に蛋白質中出现し、また別の 3 アミノ酸組は理論的に予測されるよりも稀にしか使用されていないこととなる。

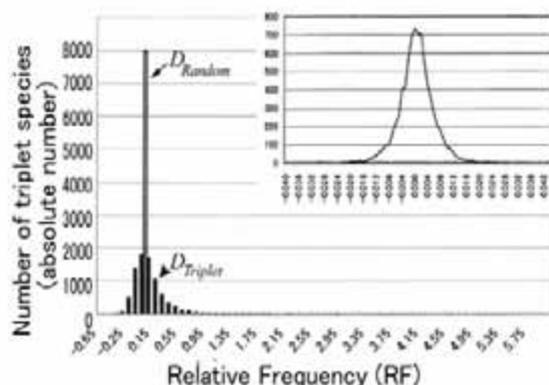


図 1. 3 アミノ酸組の相対出現頻度分布. 挿入図は  $D_{\text{Random}}$  を拡大したもので、分布の正規性を示している。

ゲノム・プロジェクトが完了している生物学的なモデル生物、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、大腸菌のデータを抽出したのものについても同様の計算を行ったが、その結果はデータベース全体を対象にした結果と基本的に同一の傾向を示した(図 2)。このことから、図 1 および図 2 で示された理論値からのずれは、データベースの人為的偏りによるのではない可能性が高い。つまり、この理論値からのずれは生物の蛋白質構成における本質的な性質であると考えられる。

さらに、このような理論値からのずれは、4 アミノ酸組および 5 アミノ酸組においても見られた。特に 5 アミノ酸組においては、以下に論じるように、このずれがさらに顕著となり、理論的には出現することが期待されているが実際にはデータベース中に

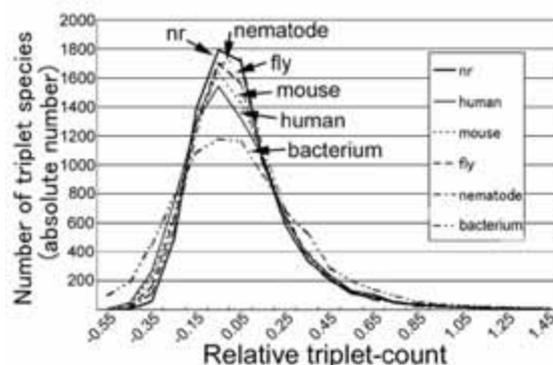


図 2. 生物種別の 3 アミノ酸組の相対出現頻度の分布。

出現しないものがみられた。今後、どのようなアミノ酸組が GPCR あるいは匂い受容体のどの部分に出現するのかを検討することによって、蛋白質分子としての匂い受容体の性質に迫ることができるだろう。

### 出現しない 5 アミノ酸組

約 5 億個のアミノ酸を持つ全データベース中の 5 アミノ酸組 320 万種について考えると、それぞれの 5 アミノ酸組について平均 150 回程度の出現が期待される。データベース中のアミノ酸出現率を基にして理論的に出現回数を計算すると、データベース中に存在しない(出現回数 1 回未満)と期待される 5 アミノ酸組は 832 種類であった。

実際にデータベース中に存在する全 5 アミノ酸組について検索したところ、データベース中にまったく存在しない 5 アミノ酸組が 12080 組存在した。これは、アミノ酸組の分布の偏りが極端なまでに表出した現象であると捉えることができる。

これらの特定の 5 アミノ酸組がデータベース中にまったく出現しない理由については正確なことは言えないが、化学的あるいは生物学的に合成が困難であることも可能性として考えられないわけではない。そこで、6 種類の 5 アミノ酸組を選び、それらを化学合成した。一般的な Fmoc 法により、高収率でペプチドを得ることができた。また、これら 6 種類のアミノ酸配列に対応する DNA 配列をプラスミドに組み込み、融合蛋白質として大腸菌 BL21Star(DE3) において発現を誘導した結果、高レベルの発現が観察された。

これらの結果から、データベース中出现しない 5 アミノ酸組は、その産生が化学的・生物学的に不可能ではないと言える。特定の 5 アミノ酸がデータベース中に存在しないのは、蛋白質分子の機能的な進化の結果であると考えられる。

## ②自己組織化マップによる GPCR の分類

### アラインメントされている蛋白質配列

SOM の分類能力を検討するための第一段階として、すでにアラインされている 1397 種類の GPCR を対象とした。これらの GPCR サンプルは長さが 248 アミノ酸残基に揃えられたものである。また、これらの GPCR サンプルはすでに 15 の既成のファミリーに分類されてある。15 のファミリー (amine, peptide, hormone protein, rhodopsin, olfactory, prostanoid, nucleotide-like, cannabinoid, platelet-activating factor, gonadotropin-releasing hormone, tyrotropin-releasing hormone & secretagogue, melatonin, viral, lysosphingolipid & LPA (EDG), and leukotriene B4) はリガンドの化学的性質、配列の類似性、薬理的データなどによって分けられたものであるが、絶対的・統一的な基準は存在しない。ここでは、それぞれの GPCR サンプルの特徴ベクトルを構成するために、記号表現、3 個の  $z$  値による表示、5 個の  $z$  値による表示という 3 種類の方法を用いた。それぞれのファミリーに任意の色を割り当て、色マップを作成し、ファミリーのクラスタリングの程度と分類精度を検討したところ、3 種類の方法それぞれの出力マップは異なったクラスタリングの程度を示した。しかし、どの方法でも 99% 以上の分類精度を得ることができた。

匂い受容体に注目すると、記号表現の場合は、1 個の受容体サンプルが rhodopsin ファミリーとして誤分類されたが、3 個あるいは 5 個の  $z$  値を使用した場合、誤分類はまったくみられなかった。これは、われわれの使用したプログラムが匂い受容体を含めた GPCR の配列を的確に読み取ることができ、その結果として GPCR サンプルの分類を的確に行うことができる可能性を示している。

### アラインメントされていないサンプル

次に、われわれはアラインされていない GPCR のサンプルを対象とした。記号表現は定義上難しいため、1 個、3 個、5 個の  $z$  値をそれぞれ用いた。

試行によって多少の違いはあるものの、5 個の  $z$  値を用いた場合、総合で 98.5% の分類精度を得ることができた。このことは、われわれの SOM プログラムが GPCR サンプルの分類法として適切であることを意味している。

5 個の  $z$  値を使用した場合の出力について検討してみると、匂い受容体が最も広範囲 (全体の約 1/3 程度) を占めることがわかった (図 3)。しかも、匂い受容体は、例えばアミン受容体やペプチド受容体のように散在的ではなく、連続的な分布を示してい

た。これは匂い受容体に特徴的な配列の存在を示しており、他の配列解析結果<sup>13)</sup>と矛盾しない。また、匂い受容体だけに着目した場合の分類精度は 99.8% に達した。

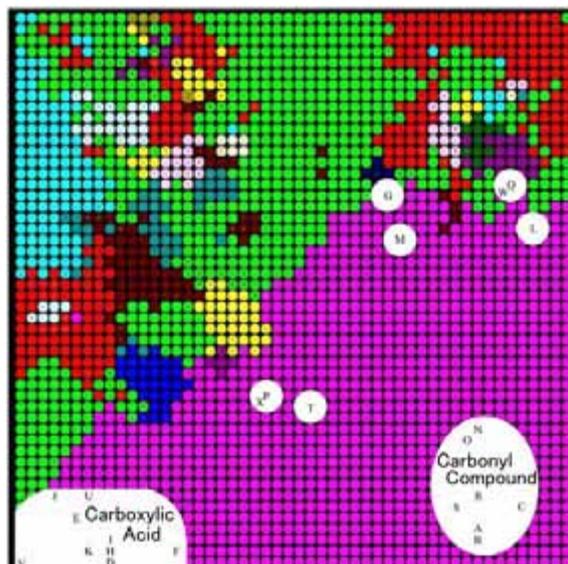


図 3. 5 個の  $z$  値を用いた場合の SOM の出力地図. 最も広い赤紫の領域が匂い受容体に対応する。また、リガンドが判明している A~X までの匂い受容体について地図上の位置を示した。

### 匂い受容体の分布

われわれの SOM プログラムは蛋白質の一次配列だけによって GPCR を分類し、2 次元平面上の位置関係を示すことができる。このようにして出来上がった受容体地図の性質をさらに調べるために、ここでも匂い受容体に着目した。

匂い受容体は SOM の出力地図において最も広い範囲を占めるにもかかわらず、匂い受容体というファミリー・カテゴリーはリガンドの性質を直接的に反映するものではない。リガンドとしての匂い物質には、化学的に様々な化合物が含まれているからである。いくつかの匂い受容体については対応するリガンド (匂い物質) が知られているので、これらのリガンドの特異性が SOM の出力地図においてどのように反映されているのかについて調べるため、すでにリガンドが決定されている匂い受容体 24 サンプルに着目した。

これらの受容体は、地図上では、主に二つのクラスターを形成した (図 3)。そのうちの一つのクラスターには 9 サンプルが含まれ、これらの匂い受容体はカルボン酸のリガンドを持つ傾向にあった。もう一つのクラスターには 7 サンプルが含まれ、これらの匂い受容体はカルボニル化合物をリガンドに持つ傾向が見られた。他の受容体 8 サンプルは、たとえ

カルボン酸やカルボニル化合物をリガンドとして持ってもクラスターを形成しなかった。

総合的に考えると、リガンド特異性はある程度地図上に反映されていると思われるが、例えば G 蛋白質結合領域や構造変化に関わる領域など、他の要素も地図上に反映されていると思われる。

### ③嗅神経細胞への遺伝子導入および蛋白質導入

#### GFP アデノウイルスによる予備的検討

情報科学的方法で得られた結果を生物学的に確認するためには、匂い受容体を発現している嗅神経細胞に任意の生体分子を導入する実験が必要となる。嗅神経細胞に遺伝子や蛋白質を外部から効率よく送り届けるには、第一に試薬そのものを効率よく嗅神経細胞の表面まで届けなければならない。つまり、試薬をマウスにいかにもく吸入させるかが第一のポイントになる。

嗅神経細胞への遺伝子導入には、筆者らはアデノウイルス・ベクターを用いた実験系を開発してきた<sup>12,13)</sup>。しかし、アデノウイルス・ベクターの作製は煩雑であるという点で汎用性に乏しく、より優れた遺伝子・蛋白質導入系の開発が望まれる。

本研究では、吸入法を再検討する目的で、GFP (緑色蛍光蛋白質) 遺伝子を持つアデノウイルス・ベクターを用いた。このアデノウイルスが持つ GFP 遺伝子は強力な CMV プロモーターによって哺乳類細胞内で発現される。GFP は励起光を当てると緑色の蛍光を発するため、その遺伝子が細胞に導入され、発現したことがわかるのである。つまり、非常に効率のよい遺伝子導入・発現マーカーとして GFP を使用することができる。

吸入方法は、マイクロシリンジを使用する方法や噴霧する方法などが考えられるが、この研究では、自然吸入法を行うことにした。具体的には、全身麻酔下でマウスを横たわせ、微量ピペットで数マイクロリットルずつ鼻孔に滴下するという方法である。

図 4 に示すように、ウイルス処理を施した嗅上皮では、特定の部分に緑色の蛍光が見られた。その部分に GFP 発現細胞が存在することを示している。

遺伝子導入効率については、表 1 に示した通りである。表 1 の作成にあたっては、蛍光顕微鏡による観察後、写真撮影し、画像上でとらえた嗅上皮全体の面積に対する緑色蛍光領域を蛍光面積率とした。計測は 3 回行い、平均±SD を示した。

アデノウイルスで処理した個体 8 頭のうち 7 頭において図 4 のような緑色蛍光が見られたことから (GFP 発現個体率 87.5%)、吸入についてはかなり信用できる方法を確立したと言ってよいであろう。

つまり、自然吸入法を用いて、嗅神経細胞に効率よく遺伝子を導入できることが示された。

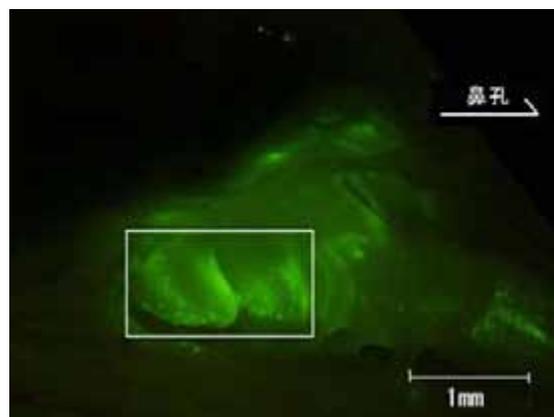


図 4. アデノウイルス・ベクターによるマウス嗅上皮への GFP 遺伝子の導入および発現。緑色蛍光が GFP の発現を示す。四角内の領域に顕著な蛍光が見られる。

表 1. アデノウイルス・ベクターによる GFP 導入

日齢	頭数	吸入量(μL)	蛍光面積率
P2	1	2.0	7.15±2.06%
	1	2.0	1.60±0.36%
P3	2	2.0	0%
		2.5	計測不可
P7	1	5.0	8.70±2.9%
	1	4.5	0.45±0.12%
	1	4.0	0.78±0.06%
	1	5.0	1.47±0.48%
合計	8		平均 3.36%

#### リポフェクション法における遺伝子導入の検討

以上のような自然吸入法を用いて市販のリポフェクション試薬 (NeuroPORTER, Gene Therapy System 社) による遺伝子導入を試みた。用いたプラスミドは pIRES2-EGFP プラスミド (Clontech 社) である。このプラスミドは EGFP (緑色蛍光蛋白質の変異体) の遺伝子を保持しているため、上述のアデノウイルスと同じように緑色蛍光を観察することで遺伝子導入効率を定量化することができる。

表 2 に示すように、1 頭ではあるが、比較的明確な GFP 発現が得られた。このような蛍光は無処理のものでは決して見られなかった。しかし、GFP 発現個体率は 6.3% に過ぎず、この遺伝子導入法は再現性に乏しいことは否めない。

条件を最適化すればリポフェクション法の効率を上げることは可能だと思われるが、条件検討のための時間的余裕がないため、今回はリポフェクション法をこれ以上追求することは止め、蛋白質導入へ向けて実験を開始した。

表 2. リポフェクション試薬による GFP 導入

日齢	頭数	吸入量( $\mu$ L)	蛍光面積率
P2	5	3.2	0%
	3	3.2	4.87%
P3	3	3.7	0%
P7	2	3.5	0%
	2	3.5	0%
	1	3.5	0%

### 蛋白質導入に関する予備的検討

そのような理由から、大腸菌内で緑色蛍光蛋白質を生産し、その蛋白質を精製し、嗅神経細胞へ導入する方法を検討することにした。その一つの方法が VP22 を用いる方法である。VP22 は細胞膜透過性蛋白質であり、VP22 との融合蛋白質を作製することにより、任意の蛋白質を外部から細胞内へ導入することができる<sup>14-16)</sup>。

この方法によって嗅神経細胞に緑色蛋白質を導入することができるか否かを検討するために、VP22 と EGFP との融合遺伝子を作製し、大腸菌 BL21Star (DE3) において発現させた。IPTG による発現誘導後、約 50 kDa の融合蛋白質の発現がポリアクリルアミドゲル上で検出された。

現在、精製した蛋白質をマウスに吸入させる実験を続けており、良好な結果を得ている。

### 結論

上述のように、主として 3 種類の実験法を用いて研究を進めているが、現在のところ、それぞれの研究において初期的な展開がみられたところである。情報科学と生物科学のさらなる有機的な連携により、今後、より深く蛋白質としての匂い受容体の機能に迫りたい。

### 謝辞

本研究は、2003-2004 年度神奈川大学共同研究奨励助成のもとに行われた。

### 文献

- 1) Buck L and Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175-187.
- 2) 大瀧丈二(2005) におい受容体の発見にノーベル賞! *Aroma Research* **6**: 308-311.
- 3) 大瀧丈二(2005) におい受容の生物学的意義—ノーベル賞受賞研究から観る—。アロマセラピー学雑誌 **5**: 1-8
- 4) Bockaert J, and Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**: 1723-1729.
- 5) Otaki JM and Firestein S (2001) Length analyses of mammalian G-protein-coupled receptors. *J. Theor. Biol.* **211**: 77-100.
- 6) Otaki JM and Yamamoto H (2003) Length analyses of *Drosophila* odorant receptors. *J. Theor. Biol.* **233**: 27-37.
- 7) Otaki JM, Gotoh T, and Yamamoto H (2003) Frequency distribution of the number of amino acid triplets in the non-redundant protein database. *J. Jpn. Soc. Information Knowledge* **13**: 25-38.
- 8) Otaki JM, Ienaka S, Gotoh T, and Yamamoto H (2005) Availability of short amino acid sequences in proteins. *Protein Science* **14**: 617-625
- 9) Kohonen T (2001) *Self-Organizing Maps*. Third Edition, Springer-Verlag, Berlin
- 10) Sandberg M, Eriksson L, Jonsson J, Sjöström M and Wold S (1998) New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. A multivariate characterization of 87 amino acids. *J. Med. Chem.* **41**: 2481-2491.
- 11) Liu AH, Zhang X, Stolovitzky GA, Califano A, and Firestein SJ (2003) Motif-based construction of a functional map for mammalian olfactory receptors. *Genomics* **81**: 443-456.
- 12) Zhao H, Otaki JM, and Firestein S (1996) Adenovirus-mediated gene transfer in olfactory neurons *in vivo*. *J. Neurobiol.* **30**: 521-530.
- 13) Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Miko-shiba K, Firestein S (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **279**: 237-242.
- 14) Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**: 223-233.
- 15) Phelan A, Elliott G and O'Hare P (1998) Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat. Biotechnol.* **16**: 440-443.
- 16) Brewis N, Phelan A, Webb J, Drew J, Elliott G, and O'Hare P (2000) Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J. Virol.* **74**: 105-1056.

■原 著■ 2003-2004 年度神奈川大学共同研究奨励助成論文

## Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 法によるシロイヌナズナの花 花粉母細胞での減数第一分裂期染色体の動態解析

安積良隆<sup>1,3</sup> 外山俊士<sup>1</sup> 中村美奈子<sup>1</sup> 豊泉龍児<sup>1</sup> 風間真<sup>1</sup>  
朝倉史明<sup>2</sup> 日野晶也<sup>1</sup> 鈴木秀穂<sup>1</sup>

### Analysis of Chromosome Dynamics during Meiosis I of *Arabidopsis thaliana* Pollen Mother Cells by Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)

Yoshitaka Azumi<sup>1,3</sup>, Takashi Toyama<sup>1</sup>, Minako Nakamura<sup>1</sup>, Ryuji Toyoizumi<sup>1</sup>,  
Makoto Kazama<sup>1</sup>, Nobuaki Asakura<sup>2</sup>, Akiya Hino<sup>1</sup> and Hideho Suzuki<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Laboratory of Biology, Faculty of Engineering, Kanagawa University, Yokohama-City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yoshitk@info.kanagawa-u.ac.jp

**Summary:** Since insertion mutagenesis methods, which enabled us to identify the mutagenized genes routinely, were developed for plants, *Arabidopsis thaliana* has been playing a central role in plant meiosis research. Though several techniques to analyze meiotic chromosome behavior have been introduced into *Arabidopsis* research since Ross *et al.* reported the method to observe male meiotic chromosomes of this plant through light microscope in 1996 (*Chromosome Res.* 4:507-516), intimate analysis of the chromosome behavior has not been accomplished. Taking advantage of the recent development of new nucleotides labeled with fluorescent dyes, we investigated chromosome behavior during male meiosis by multicolor FISH. Telomeres found around nucleoli in premeiotic interphase cells dispersed after entering meiosis, then clustered in a bouquet-like configuration. Statistically, telomeres of homologous chromosomes paired earlier than centromeres, but when respective chromosomes were examined, the telomeres were not always quick to pair. At early prophase I, possibly at around the zygotene stage, the signals from telomeres reduced to less than ten. This reduction suggests that the paired telomeres of homologous chromosomes temporally associate with other telomeres to look for their real partners. When homologous chromosomes separated at anaphase I, telomeres were always last to segregate. This suggested that there was unknown interaction between the telomeres of homologs, connecting them until anaphase I started.

**Keywords:** meiosis, *Arabidopsis thaliana*, homologous chromosome, FISH (fluorescent *in situ* hybridization)

### 序論

減数分裂は特殊な細胞分裂で、一度の染色体複製の後、それぞれ前期、中期、後期、終期からなる第一分裂、第二分裂が連続して二回起こる。その結果として、一つの母細胞から染色体数が半減した細胞が四つ形成される。この減数分裂に特徴的なのは第一分裂の前期で、レプトテン期(細糸期)、ザイゴテン期(合糸期)、パキテン期(太糸期)、ディプロテン

期(複糸期)、ダイアキネシス期(移動期)からなる。レプトテン期には染色体が細い糸状に観察されるようになり、ザイゴテン期に入ると相同染色体の相同部分が部分的に対合(ペアリング)し始める。パキテン期には相同染色体同士が全長にわたって対合し、相同染色体間にシナプトネマ構造(synaptonemal complex)が形成される(シナプシス; synapsis)。

この時、相同染色体間でキアズマが観察されるようになる。ディプロテン期にはシナプトネマ構造は崩壊し、キアズマ以外の部分では相同染色体同士は離れ、凝縮を開始する。ダイアキネシス期には染色体の凝縮が完成する。第一分裂中期には、キアズマによって連結された相同染色体対（二価染色体）が紡錘系に引かれ、赤道面に整列する。後期に入ると相同染色体同士は互いに別々の極に分配される。第二分裂では体細胞分裂と同様にして、それぞれの複製されている染色体が姉妹染色分体に分かれる（減数分裂の概要に関しては総説を参照）<sup>1-3)</sup>。

相同染色体の対合（ペアリング）とは父方由来と母方由来の相同の染色体同士が何らかの物理的接触を持っている状態を示す。この過程はいくつかの段階に分けることができる。1) テロメアのクラスタリング（予備段階）、2) 相同染色体の並列、3) シナプトネマ構造の構築、4) キアズマによる連結である。減数分裂開始前後の時期にテロメアが核膜の一部に集合した染色体の状態はテロメア集合（telomere clustering）あるいはブーケ配向（bouquet configuration）と呼ばれ、相同染色体の対合を起り易くする働きがあるものと考えられているが、この段階ではペアリングは起こっていない。レプトテン期からサイゴテン期にかけて、相同染色体はある程度の距離を置き、互いに並列する（alignment, juxtaposition）<sup>4)</sup>。減数分裂期組換え反応は SPO11 タンパク質による二本鎖切断によって開始される<sup>5)</sup>。DCM1 と RAD51 の作用の結果できた一本鎖が相同部分の探索に働いていると考えられている<sup>6)</sup>。この並列は離れ過ぎているため、塩基配列性の相同検索は可能と考えられず、相同染色体が何を基準に相手を見つけ出すのかはよく分かっていない。サイゴテン期に、染色体に軸因子（axial element）が形成され始め、それがパキテン期には連続して側方因子（lateral element）へと発達し、側方因子間に中心因子（central element）が形成されて、シナプトネマ構造となる。組換えが起こった部位ではキアズマが形成される。ディプロテン期にはシナプトネマ構造は崩壊するが、キアズマによって第一減数分裂中期まで相同染色体は相同染色体が連結されている。そのため、広義のペアリングでは並列した状態から第一減数分裂中期の二価染色体の状態を意味するが、通常、並列状態からシナプス状態までを示す。本稿ではペアリングをこの意味で用いている。狭義に用いる場合にはシナプシスする前の並列状態のみを示す。

ペアリングとキアズマ形成は減数第一分裂時に、対を成す相同染色を別々の娘核に均等に分配するの

に必須の過程である。不均等に分配されると正規の染色体数を持たない配偶体（植物の場合は胚のう細胞と花粉細胞）ができることになり、不稔となる。酵母や動物では対合が起こらないとパキテンチェックポイントが働き、そこで細胞分裂が停止するが<sup>7)</sup>、植物の場合は対合が起こらなくても細胞分裂は進行する。キアズマができない場合も染色体が無秩序に分配され、不稔の配偶体を形成する<sup>8-9)</sup>。相同染色体がペアリングするまでの過程は種によって多少特異性がある。分裂酵母では第一分裂前期の始めに、テロメアが集合して引率するホーステイル運動が見られる<sup>10)</sup>。ホーステイル運動は分裂酵母に特有のもので、他の種では報告されていないが、テロメアの集合は減数分裂前間期あるいは第一減数分裂前期に普遍的に観察される<sup>11)</sup>。

減数分裂の研究は酵母やマウス等の様々な生物を材料にして行われている。植物でも古くから花粉母細胞の減数分裂の様子が観察されている。しかし減数分裂中の細胞を多量に集めるのが困難などの理由で、植物を材料とする減数分裂の研究は他の生物のそれに比べると大きく遅れをとってきた。ゲノムサイズが小さい、世代時間が短い、小型で実験室内での栽培が容易等の実験材料として有利な特徴を持つシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がモデル植物に採用され、形態観察も詳しく行われた<sup>12)</sup>。様々な研究方法がこの植物を材料として進められるようになり、いわゆる、タギング法と呼ばれる挿入変異体作製法が開発された<sup>13-14)</sup>。

シロイヌナズナのゲノムの全塩基配列が決定されたこともあって、この方法は変異した遺伝子の同定を著しく簡略化し、これによってそれまで困難であった、変異体の変異遺伝子の同定が実験室レベルで可能となった。近年にはシロイヌナズナから、この方法によって多くの減数分裂変異体が作製され、それらの遺伝子が同定されている<sup>15)</sup>。つまりそれぞれの挿入変異体の表現型の原因を遺伝子にもとめることが可能となったわけである。イネでもレトロトランスポゾンを利用したタギング法が開発されており<sup>16-17)</sup>、減数分裂変異体が報告されている<sup>18-19)</sup>。これ以外の植物では、まだタギング法による変異体作製例は報告されていない。

減数分裂の目的は相同染色体を別々の娘細胞に分配することであるが、この過程を解析するには染色体を個別に観察することが必須である。シロイヌナズナのゲノムサイズは半数体当たり約1億3千万塩基対で<sup>20)</sup>、染色体は他の生物に比べ非常に小さい。染色体が最も凝縮した分裂中期の染色体では縦横の区別もつかなくなる。花粉母細胞の減数分裂の染色

体の様子を観察するために、細胞壁を消化した後、染色体をスライドガラス上に展開して、DAPI で染色し観察するという方法が開発された（消化展開法）<sup>20</sup>。この方法では、従来の押しつぶし法より遥かに解像度の高い染色体像が得られ、減数第一分裂の前期の各ステージも見分けることができる。その後、展開された染色体に対し、染色体の各領域に特異的なプローブをハイブリダイズさせ、そのプローブを蛍光によって検出する方法（FISH; fluorescent *in situ* hybridization）がこの植物の減数分裂期染色体の観察に導入された<sup>22-23</sup>。この方法により染色体を個別に追跡することができるようになり解析精度が一段と向上した。さらに最近ではプローブ分子を直接、蛍光標識できるようになり、以前よりも鮮明なシグナルが得られ、操作も単純化されたため、今後、減数分裂期の染色体解析もより詳細に行われるようになるものと考えられる。

シロイヌナズナから減数分裂に関する挿入変異体が単離されるようになったが、減数分裂期の染色体の挙動に関して基準となるものがまだ確立されていない。我々は野生型のシロイヌナズナを実験材料とし、テロメアとセントロメアに焦点を絞って、これらの動態を明らかにすべく FISH 法を用いて実験を行った。

## 材料と方法

### シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Landsberg) は、神奈川大学平塚キャンパス植物育成棟内で、気温 24°C、湿度 60%、光強度約 60  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明暗 14 時間 10 時間周期の条件下で、栄養源としてハイポネックスとムラシゲ・スクーク培地を週に一度、交互に与えながらロックウール上で栽培した。

### 消化展開法

播種後 6 週間程度のシロイヌナズナより、つぼみを次々と生産している健康な花序を採取し、Ross らの方法に従って染色体試料を準備した<sup>21</sup>。まず、採取した花序を酢酸エタノール（1 : 3）溶液に室温で 16 時間程度置くことによって、細胞を固定した。水で 10 分間 2 回洗浄した後、10 mM クエン酸緩衝液（pH 4.5）で同様に洗浄した。サイトヘリカーゼ（Sigma）、ペクトリアーゼ（Kikkoman）、セルラーゼ（Yakult）を 0.4%（w/v）含むクエン酸緩衝液中で、最初に減圧して酵素を組織内に浸潤させてから、37°C で 3 時間保温した。クエン酸緩衝液で先と同様に洗浄後、花序をシャーレ上に滴下された 60% 酢酸中に移した。つぼみを単離し、減数分裂中の花粉母

細胞を含むと考えられるつぼみ（長さが 0.3~0.5 mm 程度のもの）を選んだ。スライドガラス（Matsunami S2441）上に 5  $\mu\text{L}$  の 60% 酢酸を滴下し、そこにつぼみを移した。つぼみを先端の鋭利な針（自作のタングステンニードル）で解剖し、雄しべ以外をキムワイプで酢酸とともに吸い取った。葯を潰して花粉を展開した後、再び酢酸を 5  $\mu\text{L}$  滴下し、45°C のホットプレート上で 1 分間加温した。氷冷した酢酸エタノールを周りに滴下し、ゆっくりと混和した後、液を捨て、スライドガラスを風乾した。

### プローブの調製

染色体の特定領域に対するプローブは、その領域を含む BAC クローンを ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) より入手し、DNA は FlexiPrep DNA Purification Kit (Amersham) を用いて精製して、鋳型として用いた。8 種類の制限酵素 *EcoRI*, *EcoRV*, *EcoT22I*, *PstI*, *SalI*, *DraI*, *ClaI*, *HaeIII*, *ScaI* (タカラバイオ) で断片化した後、30 枚のスライドガラスに対し、2  $\mu\text{g}$  の DNA を使用し、Arexa Fluor DNA Labeling Kit (Invitrogen) を用いてプローブを作製した。テロメアに対するプローブは TTTAGGGx 6 と CCCTAAA x 6 のプライマーのみで PCR を行い、その産物を鋳型とし、Cy3 (Amersham) あるいは Cy5 (Amersham) を含み、先ほどと同じプライマーを用いる PCR 反応によって、プローブを作製した。それぞれのプローブはエタノール沈澱後、ホルムアミドに溶解し、等量の 20% デキストラン / 4x SSC 溶液を加えて用いた。

### FISH

風乾したスライドガラスをもう一度、酢酸エタノール溶液に 30 分間浸し固定後、風乾した。0.1 mg/ml RNase A で 37°C 30 分間処理し、2xSSC 溶液で 2 回洗浄後、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の Pepsin (和光) で 37°C 2 分間処理した。2xSSC 溶液で 2 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間処理した。2xSSC 溶液で 3 回洗浄し、70%、90%、99.5% エタノールに順次 3 分間ずつ浸した後、乾燥させた。風乾した 1 枚にスライドガラスに、20  $\mu\text{L}$  の割合でプローブ溶液を滴下した。パラフィルムで被った後、72°C で 2 分間加温し、プローブと染色体 DNA を熱変性させ、37°C で 16 時間保温した。50% ホルムアミド / 2xSSC 溶液、2xSSC、1xSSC で 37°C 20 分間、洗浄した。5  $\mu\text{L}$  の 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DAPI 溶液 (Vector) を滴下し、カバーガラスで被った。オリンパス蛍光顕微鏡 BX61 を用いて観察した。PROVIA F100 (FUJI Film) に撮影し、プリントしたものをスキャナーで

取り込み、Photoshop (Adobe) で加工した。

## 結果

### 減数分裂前間期～レプトテン期

減数分裂が始まる時期にテロメアが核膜のある領域に集まる現象が様々な生物で知られている (ブーケ配向)。様々な生物でこの時点で相同染色体間のテロメアのペアリングが始まると報告されている。シロイヌナズナでは減数分裂前の花粉母細胞やその他の体細胞で、テロメアは核小体の周辺部分に分布することが報告されている<sup>20)</sup>。まず、シロイヌナズナにおけるテロメアの減数分裂開始後の挙動を調べることを目的に実験を始めた。TTTAGGG の繰り返し配列からテロメアに対するプローブを作製し、FISH を行った。第一減数分裂が始まる前の間期の細胞で、20 近くのシグナルが核小体領域に観察され、報告されているようにテロメアの核小体周辺部への分布を確認することができた (図 1A の緑色シグナル)。テロメアの配列は第一染色体のセントロメア近傍にも存在することが知られている<sup>25-26)</sup>。その配列はテロメアプローブに対し強く反応し、核小体以外ところで観られる強いシグナルはその配列からのものと考えられる。レプトテン期に入るとテロメアは核小体から離れ、一度分散した (図 1B, C, D)。その後、レプトテン期からザイゴテン期にかけて、テロメアは比較的狭い領域に集合した (図 2E, F)。これがシロイヌナズナにおけるブーケ配向と考えられる。

次にテロメアのペアリングについて調べるため、テロメア付近の各染色体に特異的な領域を有する BAC クローンよりプローブを調製し FISH を行った。減数分裂前間期では相同染色体のテロメアからのシグナルは多くの場合、離れており、ペアリングは起こっていないものと考えられる。レプトテン期の細胞ではシグナルが隣接している場合 (シグナルが並んで、あるいは一つに融合してみえるもの) もあったが、シグナルが別々の場所で観察される場合の方が多かった (図 2A, B 赤色シグナル)。ザイゴテン期では多くの細胞でシグナルが隣接して観察されたことからペアリングが進行しているものと考えられる (図 2C, D)。パキテン期ではいつもシグナルが隣接して観察されており、これはこの時期ですでに全相同染色体間でシナプシスが完成していることを示している。ディプロテン期の細胞では、シグナルは多くの場合は並んで観察されたが、少し離れたところに観察される場合もあった。これは DAPI 染色した染色体像からも分かるが、この時期では相同染色体同士でもキアズマ以外の部分では連結されていないのを示している。

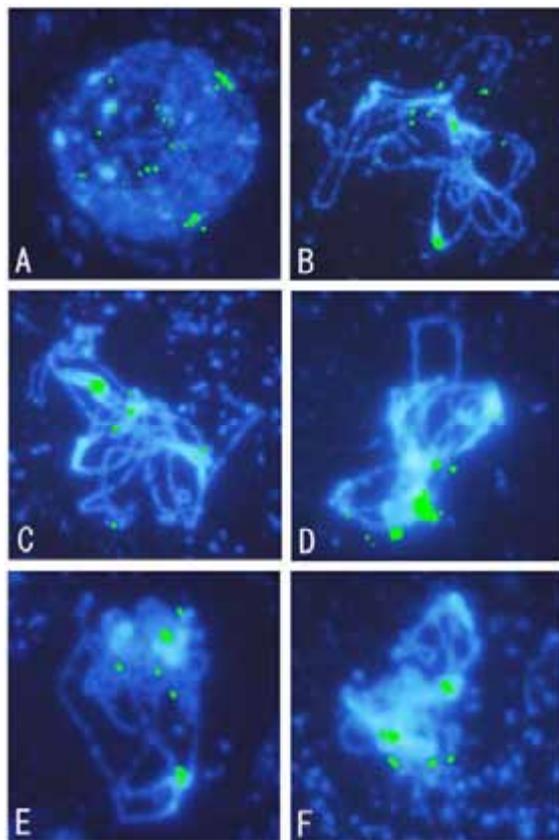


図 1. テロメア配列に対するプローブを用いた FISH. 各染色体の末端にあるテロメアの繰り返し配列に対するプローブを材料と方法に記述したように蛍光標識して準備した。これを、スライドガラス上に展開したシロイヌナズナの花粉母細胞の染色体に対して、ハイブリダイズさせた。A は減数分裂前間期の細胞。B~F は第一減数分裂前期の初期 (レプトテン期からザイゴテン期) の細胞。青白く光っているものが DAPI で染色した核 (A) あるいは染色体 (B~F)。緑の点がテロメア繰り返し配列からのシグナルを表すが、第一染色体のセントロメア付近にもテロメア繰り返し配列が存在し、強いシグナルとして現れる。

シロイヌナズナのセントロメアの構造は完全に解明されているわけではないが、10 本の染色体のセントロメアには共通の繰り返し配列が含まれている。セントロメアから少し離れた領域に対するプローブを用いれば、各染色体のセントロメアを識別し、個別に追跡することができる。そのような領域を含む BAC クローンよりプローブを準備してセントロメアの挙動について調べた。減数分裂前間期の細胞ではほとんどの場合、セントロメアは大きく離れて存在していた。レプトテン期の細胞では割合は少ないが、シグナルが隣接して観察されるものが現れ始め、ペアリングが始まっているのを示している (図 3A, B)。ザイゴテン期には多くのシグナルが隣接して観察されることから、すでに染色体の多くの部分でペアリングが起こっているのがわかる (図 3C, D)。パ

キテン期には全てのシグナルが同じ部位で並んで観察された。ディプロテン期の細胞ではシグナルが少し離れて観察されるものがあるため、セントロメア付近の領域でもディプロテン期には互いに解離しているものと考えられる。その後、相同染色体のセントロメア同士は互いに異なる極に面することになるが、この時にセントロメア同士が物理的に接着しているのかどうかは分かっていない。

染色体の広がりに対するテロメアあるいはセントロメアのシグナル間の距離の割合を 10 段階に分類し、グラフにしたものが図 4 である。テロメアに関してはレプトテン期に入ると約 40%のものがペアリングしているのが解る。しかしこの時期、セントロメア領域ではまだ 20%程度しかペアリングしていない。この結果から統計的にテロメアのペアリングはセントロメアのペアリングに先行していると予想される。

染色体の末端部分からファスナーを閉めるようにペアリングが進むように考えられているが、実際にそのようにペアリングが進行するのかどうかを、て見られた (図 5)。テロメアのみあるいはセントロメア付近の領域に対するプローブとセントロメア付近の領域に対するプローブを同時に用いて調べてみた。ザイゴテン期のものでは多くの場合、テロメア部分でもセントロメア部分でもペアリングしていた。レプトテン期のものでは様々な組み合わせがのみがペアリングしている場合や、両方がペアリングしている、あるいは両方もペアリングしていない場合が見られた。この結果は個々の染色体を観察

した場合、ペアリングは必ずしも染色体の末端から始まるのではなく、内部領域から始まる場合もあることを意味している。

### 五星分布状態 (Five Star Configuration)

テロメアに対するプローブを用いて FISH を行った時に、ザイゴテン期と考えられる時期にシグナルの数が予想外に減少するのが観察された。シロイヌナズナのゲノムは 10 本の染色体の染色体から構成されており、それらの両末端にテロメアが存在するので、20 のシグナルが観察されるはずである。減数分裂が開始される前には約 20 のシグナルが観察される (図 1A)。減数分裂が始まると相同染色体がペアリングを始めるため、シグナルの数が減少する。完全にペアリングした状態では染色体は 5 本のように見え、10 のシグナルが観察されるようになる。ところがザイゴテン期と考えられる細胞で、シグナルが 10 以下に、ある時期では 5 ないし 6 に減少するのが見つかった (図 1 E, F)。この五つの明るい星の様に輝くシグナルが非常に印象的であるので我々はこの染色体の状態を五星分布状態と呼んでいる。一つのシグナルは第一染色体のセントロメア付近のテロメア様の配列から発せられたものと考えられる。シグナルの強度から二つ以上のテロメアがそれぞれの部位に集まって、一時的に結合しているものと考えられる。この現象はペアリングした各染色体対のテロメアが染色体内で、あるいは他の染色体と結合している可能性を示唆している。パキテン期に入るとテロメアのシグナルの数は再び約 10 に復帰した。

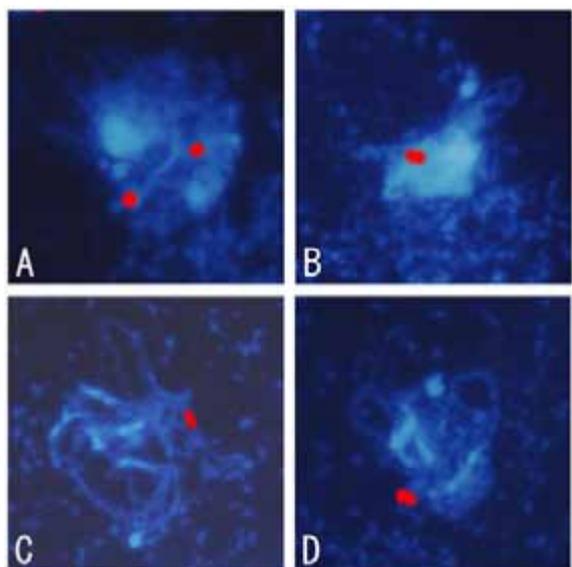


図 2. テロメア付近の配列に対する FISH. 第 4 染色体のテロメア付近の領域 (F22I13) に対するプローブを用いて図 1 と同様に FISH を行った. A, B はレプトテン期, C, D はザイゴテン期と思われる細胞. 赤い点がシグナルを表す.

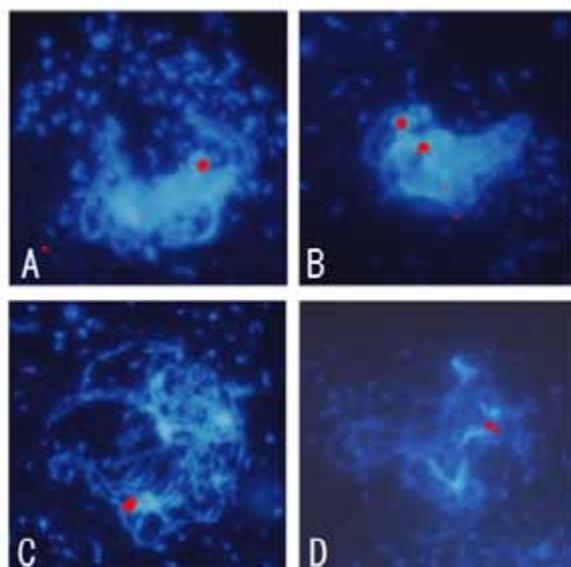


図 3. セントロメア付近の配列に対する FISH. 第一染色体のセントロメア付近の領域 (F12A4) に対するプローブを用いて図 1 と同様に FISH を行った. A, B はレプトテン期, C, D はザイゴテン期と思われる細胞. 赤い点がシグナルを表す.

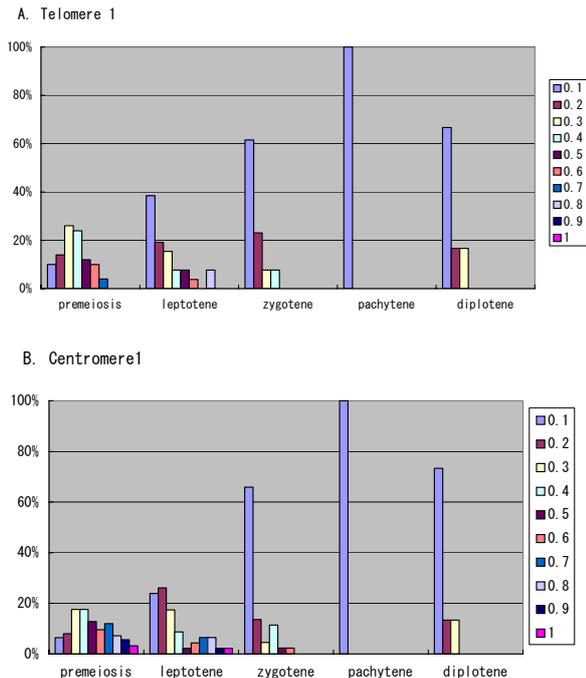


図 4. セントロメアとテロメアのペアリングの比較. 第一染色体のセントロメア付近の領域 (F12A4) とテロメア付近の領域 (F22A17) に対するプローブを用いて FISH を行った. 得られたシグナル間の距離の細胞の大きさに対する割合をグラフに表した.

第一分裂中期～後期

第一減数分裂中期には相同染色体が連結したまま赤道面に整列する。セントロメアに紡垂糸が結合し、対をなす相同染色体を別々の極に分配する準備が行われる。この時キアズマによる相同染色体をつなぎ止めようとする力と染色体を両極に引き離そうとする紡錘体からの力が拮抗する。この時の染色体の様子を示すのが図 6 である。染色体は中央に結び目を持ち、両方から引っ張られているロープのような外見をしていることが多い。テロメアに対するプローブをハイブリダイズさせた場合に第一染色体のセントロメアからのシグナルと考えられるもの以外は赤道面付近に観察された。キアズマのみで連結されている場合にはキアズマから遠い方のテロメアは近い方のテロメアよりかなり離れて存在してもよさそうである。しかしこれまで観察した限りでは常にテロメアのシグナルは赤道面付近に残っているように見られた。テロメアに対するプローブを用いた場合は染色体を区別することができず、判然としないため、テロメア付近の領域を標識して、特定の染色体のテロメアの存在部位について調べた。すると両極に引っ張られている相同染色体間で、シグナルはいつも中央付近に観察された (図 6A, B)。これは相同染色体同士がテロメア部分でなんらかの結合をしていることを示している。この結合が第一減数分裂中期

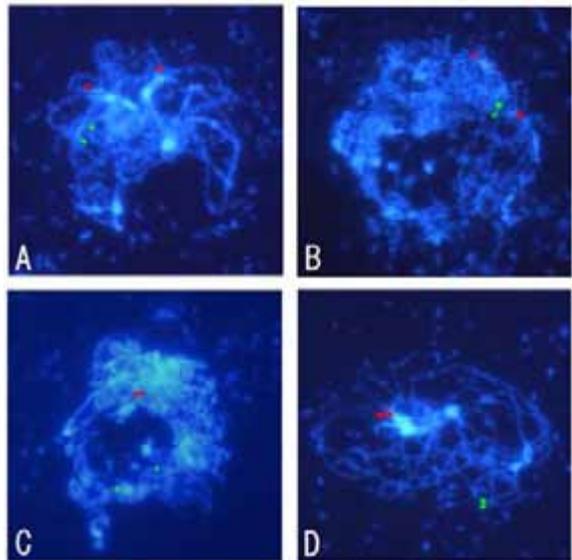


図 5. セントロメア付近の配列とテロメア付近の配列に対するプローブを同時に用いた FISH. 第一染色体のセントロメア付近の領域 (F12A4) とテロメア付近の領域 (F22A17) に対するプローブを用いて、レプトテン期からサイゴテン期の細胞に対して、マルチカラー FISH を行った. 緑の点が テロメア近辺領域に対するシグナルを、赤い点が セントロメア近辺領域に対するシグナルを表す.

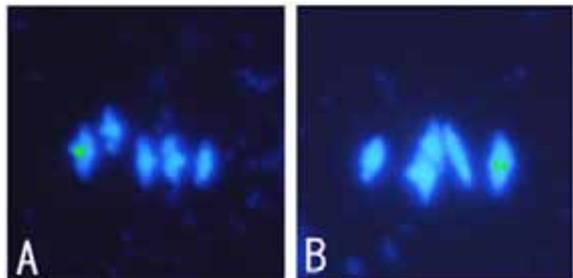


図 6. 第一減数分裂中期の細胞に対する FISH. 花粉母細胞の減数第一分裂中期の赤道面に整列している染色体に対して、第五染色体のテロメア付近の領域 (K21L13) に対するプローブを用いて FISH を行った. 緑の点がシグナルを表す.

において相同染色体同士を最後までつなぎ止める役割を果たしているものと推論することができる。

討論

蛍光標識された高感度のプローブ分子を容易に作成することができるようになって、FISH の作業工程が簡略化され、多くの試料を観察し、染色体の動態を詳しく調べることができるようになった。このような技術の進歩を利用して、モデル植物であるが、染色体が小さく細胞生物学的な解析が難しいシロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期の染色体の動態を調べることにした。

シロイヌナズナですでに報告されている減数分裂前のテロメアの核小体周辺への分布が確認された。

染色体に特異的なテロメア近辺領域に対するプローブを用いた実験は、この時期ではシグナルが並んで観察される細胞はごく一部であることを示していた。レプトテン期と考えられる細胞でも、約 60% の細胞ではテロメア付近の領域は離れて存在している (図 4)。ザイゴテン期に入るとペアリングするテロメア近辺領域の割合はずっと増加する。この時期に様々な生物でブーケ配向が観察されている。植物でもトウモロコシ、オートムギ、ライムギ、コムギなどでもペアリングの起こる時期にブーケ配向が観察されている<sup>27-30)</sup>。しかしシロイヌナズナでは明確なブーケ配向が見られない。ゲノムがシロイヌナズナと比べると巨大で染色体が長く、反復配列の多いトウモロコシ等の植物ではミスマッチを防ぐために染色体の両末端をそろえて並べるといった、ペアリングの準備を整えておくことが重要なのかも知れない。そして端からペアリングを進めるという方法は合理的と考えられる。それに比べゲノムが小さく染色体も短いシロイヌナズナでは、相同染色体同士が互いに相手を見つけるのが比較的容易なため、染色体の端からとは限らず、様々な部分からペアリングが起こるのかも知れない。実際に実験結果として、テロメア付近の領域がペアリングしていない染色体でセントロメア付近の領域がペアリングしているのが観察されている。シロイヌナズナではザイゴテン期にブーケ配向様のテロメアの分布も観察されるが、染色体のペアリングにおける重要性が低いのかも知れない。シロイヌナズナで見られるものや他の生物で見られるブーケ配向がどのような分子基盤に立って構築されているのかが明らかにされれば、シロイヌナズナの場合と比較が可能となり、その関連性には興味を持たれる。

パキテン期には相同染色体同士は並列状態よりもさらに接近し、お互いをシナプトネマ構造と呼ばれるタンパク質等からなる構造によって結び付け、シナプシスと呼ばれる状態となる。端から端まで全ての相同染色体対で対合が完成すると、ディプロテン期にはシナプトネマ構造は崩壊し、組換えを起こしたキアズマ部分を残して、相同染色体同士は少し離れるようになる。ステージが進行するに連れ、染色体は凝縮を進め、シロイヌナズナではダイアキネシス期の二価染色体は完全に一体化して二本の染色体からできているようには思えない。この時、相同染色体同士はキアズマ部分では連結しているが、それ以外の部分ではどのようなになっているのかよく解っていない。ダイアキネシス期の染色体ではテロメア付近の領域に対するプローブはほとんどの場合、並んで観察される。さらに第一分裂中期の染色体では

染色体がセントロメアに付着した紡錘糸によって引っ張られているのがわかるが、相同染色体を最後まで結び付けているのはテロメアであるように思われる (図 6)。体細胞分裂では TRF1 をリボシル化する酵素が関連する、姉妹染色分体のテロメアを互いに結び付けている構造を切断するしくみがあることが報告されている<sup>31)</sup>。減数分裂期の相同染色体のテロメア間にも何らかの物理的な結びつきがあることをこの実験結果は示している。ディプロテン期には相同染色体のセントロメア領域は互いに物理的に接着している様には見えないが、第一分裂中期に両極からの紡錘糸が別々のセントロメア上に構築されたキネトコアに結びつくには、相同染色体のセントロメアは背中合わせに接着している必要があると考えられる。ダイアキネシス期の間にセントロメア間で何らかの結合が構築された可能性がある。ダイアキネシス期にはテロメア領域やセントロメア領域を含む、染色体の様々な部分でシナプトネマ構造が崩壊した後に、相同染色体間で再結合が起きているのかもしれない。第一分裂中期の終わりになると紡錘糸に引っ張られ、セントロメアは既に離れてしまっている。これらのことから、第一分裂中期から後期にかけての相同染色体の分離は、まずセントロメア領域で起こり、次にキアズマが解消されて、最後にテロメア部分が解離するのではないかと考えられる。しかしシロイヌナズナでのキアズマの解消がいつ起こるのかは詳しく調べられておらず、相同染色体間の様々な部位で再結合が起きているとも考えられる。ダイアキネシス期に既に解消されている可能性も考えられる。

テロメアの五星分布状態は何のためにあるのかを想像することすら難しい。テロメアのクラスタリング (ブーケ配向) がさらに進行して、テロメア同士が結合した状態とも考えられるが、これまでのところ、このテロメア同士の結合が染色体内の結合 (染色体の両末端の結合) なのか、染色体間の結合なのか明らかではない。それぞれの染色体のテロメアを異なる色の蛍光で標識して調べる必要がある。テロメアには様々な働きがあると考えられている。テロメアが染色体末端部分での染色体複製とか、染色体末端の保護を可能にしている。減数分裂時に関してはよく調べられていないが、体細胞分裂期のテロメアは T-loop configuration と呼ばれる特殊な構造をしている<sup>32)</sup>。テロメラーゼや TRF1 などの様々なタンパク質等が複合体を形成し、テロメアに結合している<sup>33-34)</sup>。減数分裂に入った細胞では既に染色体の複製は終了しているため、五星分布状態が複製に関与しているとは考えにくい。テロメアのクラスタリン

グは相同染色体のペアリングに寄与しているかも知れないが、それ以上テロメアを結合させる意味を推測するのは難しい。染色体内でテロメア結合した場合、染色体はリング状になるが、これが真の姿であったとしても、その意味は何であろうか。特殊な機構により、相同染色体のペアリングに貢献している可能性が考えられる。テロメアがその相同である本来のパートナーを探索する過程で、他のテロメアと一次的に結合しているのかも知れない。セントロメアに関してもセントロメア同士が互いに引き合い、ペアリングの手助けをしているという報告がある<sup>39)</sup>。著者らもキアズマのできないシロイヌナズナの変異体で相同染色体同士が並んでいるのを観察している。様々な方法でペアリングをより確実なものにする仕組みになっているのかも知れない。パキテン期にはテロメアは五星分布状態から解放されて、10 近くのシグナルが観察される。ディプロテン期には相同染色体のテロメア同士も離れるが、ダイアキネシス期、第一分裂中期には前述のしくみによって相同染色体同士のテロメアはまた結合しているように観察される。テロメアは減数分裂期の各ステージに合わせて異なる成分からなる構造によって結合したり解離したりしていると推測できる。減数分裂期の染色体の挙動にはまだ意義の不明なものが多く、それらがそれぞれの役割を果たしながら、減数分裂という複雑な過程を遂行していると考えられる。

植物では、トウモロコシやムギ類で FISH 法や間接免疫蛍光法などによる減数分裂期の染色体の動態研究が盛んに行われている。同じ植物でも単子葉植物であるトウモロコシと双子葉植物であるシロイヌナズナでは、様々な点で異なることが明らかとなった。しかしこの違いは、多くの単子葉植物や双子葉植物で減数分裂期染色体の研究が行われているわけではないので、シロイヌナズナあるいはトウモロコシの特殊な事情によるものであるのかも知れない。というのも、トウモロコシのゲノムは非常に巨大で、シロイヌナズナのゲノムは非常にコンパクトである。この違いが大きく影響しているのかも知れない。比較的ゲノムサイズの小さいイネなどでも減数分裂期染色体の解析が進むことが望まれる。

本研究は固定された細胞の染色体の分布状態を調べたもので、生きた細胞の動きのある染色体を観察したものではない。それゆえ本研究によって提案された染色体の挙動というものは必ずしも正しいとは言いきれない。シロイヌナズナの減数分裂期の染色体はもっと複雑怪奇な運動をしているのかも知れない。それを明らかにするには生きた細胞を経時的に追跡することが必要であるが、残念ながら花粉の減

数分裂の様子を観察した例は報告されていない。今後は、生きた花粉母細胞の細胞内の様子を観察するシステムの開発が望まれる。

## 謝辞

本研究は神奈川大学共同研究奨励助成を受けて、行われました。お礼申し上げます。また顕微鏡写真のプリントに関して、カメラのキタムラ平塚店の方々に多大な御協力を頂きました。ありがとうございます。

## 文献

- 1) Roeder GS (1997) Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **11**: 2600-2621.
- 2) Zickler D and Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 603-754.
- 3) Bhatt AM, Canales C and Dickinson HG (2001) Plant meiosis: the means to 1N. *Trends Plant Sci.* **6**: 114-121.
- 4) Page SL and Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* **301**: 785-789.
- 5) Keeney S, Giroux CN and Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375-384.
- 6) Bishop DK (1994) RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* **79**: 1081-1092.
- 7) Roeder GS and Bailis JM (2000) The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* **16**: 395-403.
- 8) Armstrong SJ, Caryl AP, Jones GH and Franklin FC (2002) Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in Arabidopsis and Brassica. *J. Cell. Sci.* **115**: 3645-3655.
- 9) Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *Embo J.* **21**: 3081-3095.
- 10) Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M and Hiraoka Y (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science* **264**: 270-273.
- 11) Harper L, Golubovskaya I and Cande WZ (2004) A bouquet of chromosomes. *J. Cell Sci.* **117**: 4025-4032.
- 12) Bowman J (1994) Arabidopsis. An Atlas of Morphology and Development, Springer-Verlag, New York.
- 13) Aarts MG, Dirkse WG, Stiekema WJ and Pereira A (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in Arabidopsis. *Nature* **363**: 715-717.
- 14) Sundaresan V, Springer P Volpe T, Howard S, Jones JD, Dean C, Ma H and Martienssen R (1995) Patterns of gene action in plant develop-

- ment revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* **9**: 1797-1810.
- 15) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物雄性生殖研究における最近の展開 2003. 神奈川県大学総合理学研究所年報 2003. pp.41-80.
  - 16) Agrawal GK, Yamazaki M, Kobayashi M, Hirochika R, Miyao A, and Hirochika H (2001) Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel ostatic gene. *Plant Physiol.* **125**: 1248-1257.
  - 17) Izawa T, Ohnishi T, Nakano T, Ishida N, Enoki H, Hashimoto H, Itoh K, Terada R, Wu C, Miyazaki C, Endo T, Iida S and Shimamoto K (1997) Transposon tagging in rice. *Plant Mol. Biol.* **35**: 219-229.
  - 18) Nonomura K, Nakano M, Fukuda T, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H and Kurata N (2004) The novel gene HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1 of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *Plant Cell* **16**: 1008-1020.
  - 19) Nonomura KI, Nakano M, Murata K, Miyoshi K, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H and Kurata N (2004) An insertional mutation in the rice PAIR2 gene, the ortholog of Arabidopsis ASY1, results in a defect in homologous chromosome pairing during meiosis. *Mol Genet. Genomics* **271**: 121-129.
  - 20) Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
  - 21) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
  - 22) Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC, Torres-Ruiz RA and Jones G (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**: 867-876.
  - 23) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence in situ hybridization procedure applicable to whole stages of male meiosis of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Science* **5**: 1-6.
  - 24) Armstrong SJ, Franklin FC and Jones GH (2001) Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Sci.* **114**: 4207-4217.
  - 25) Richards EJ, Goodman HM and Ausubel FM (1991) The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3351-3357.
  - 26) Haupt W, Fischer TC, Winderl S, Fransz P and Torres-Ruiz RA (2001) The centromere1 (CEN1) region of *Arabidopsis thaliana*: architecture and functional impact of chromatin. *Plant J.* **27**: 285-296.
  - 27) Carlton PM and Cande WZ (2002) Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation. *J. Cell Biol.* **157**: 231-242.
  - 28) Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA and Cande WZ (2000) Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J. Cell Sci.* **113**: 1033-1042.
  - 29) Martinez-Perez E, Shaw P, Reader S, Aragon-Alcaide L, Miller T and Moore G (1999) Homologous chromosome pairing in wheat. *J. Cell Sci.* **112**: 1761-1769.
  - 30) Mikhailova EI, Sosnikhina SP, Kirillova GA, Tikhonov OA, Smirnov VG, Jones RN and Jenkins G (2001) Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.). *J. Cell Sci.* **114**: 1875-1882.
  - 31) Dynek JN and Smith S (2004) Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* **304**: 97-100.
  - 32) Riha K and Shippen DE (2003) Telomere structure, function and maintenance in *Arabidopsis*. *Chromosome Res.* **11**: 263-275.
  - 33) Evans SK, Bertuch AA and Lundblad V (1999) Telomeres and telomerase: at the end, it all comes together. *Trends Cell Biol.* **9**: 329-331.
  - 34) Chang W, Dynek JN and Smith S (2003) TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes Dev.* **17**: 1328-1333.
  - 35) Kemp B, Boumil RM, Stewart MN and Dawson DS (2004) A role for centromere pairing in meiotic chromosome segregation. *Genes Dev.* **18**: 1946-1951.

■原 著■ 2004 年度神奈川県大学総合理学研究所共同研究助成論文

## アフリカツメガエル胚右側板中胚葉における Nodal シグナリングの活性化は内臓左右軸を逆転する

豊泉龍児<sup>1</sup> 茂木和枝<sup>2,4</sup> 日野晶也<sup>1</sup> 小笠原 強<sup>1,3</sup> 竹内重夫<sup>1</sup>

The potentiation of Nodal signaling in the right lateral plate mesoderm  
inverts the left-right specification of the internal organs.

Ryuji Toyozumi<sup>1</sup>, Kazue Mogi<sup>2,4</sup>, Akiya Hino<sup>1</sup>,  
Tsuyoshi Ogasawara<sup>1,3</sup> and Shigeo Takeuchi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Sciences, and

<sup>3</sup> High-tech Research Center, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City Kanagawa,  
259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyo-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** In *Xenopus*, multiple *nodal*-related genes are expressed during early embryogenesis. Among them, only *Xenopus nodal related-1* (*Xnr-1*) is expressed unilaterally in the left lateral plate mesoderm (LPM) at the late neurula-early tailbud stage. Early studies report that ectopic administration of *Xnr-1* in the right hemisphere at the cleavage stage alters the left-right specification of the heart and visceral organs, or else makes a secondary axis. However, because *Xnr-1* and other *Xnrs* function already at the blastula-gastrula stage, it is very difficult to evaluate the correct timing of the effects of excessively administered *Xnr-1* from such a method. To elucidate the essential role of *Xnr-1* within the left LPM, ectopic potentiation of Nodal signaling in the right lateral plate mesoderm was performed. Right-side injection of Nodal protein changed the laterality of *Xnr-1* and *Xenopus pitx2*, but *lefty*, and fully (more than 90%) reversed the situs of the internal organs. Polyethyleneimine-based gene transfer of *Xnr-1* mRNA in the right LPM also changed the laterality of *pitx2* and fully (more than 90%) reversed the situs of the internal organs. Taken together, the potentiation of *Xnr-1* signaling in the right LPM induces *pitx2* in the right side and fully inverts the left-right axis of the heart and visceral organs, suggesting that the right LPM can transduce Nodal signaling, and only the absence of the *Xnr-1* ligand silences the Nodal signaling in the right LPM. Normal left-right balance of *Xnr-1* signaling is needed for the normal left-right specification of the internal organs.

**Keywords:** *Xenopus laevis*, left-right asymmetry, neurula, *Xnr-1*, *pitx2*, microinjection

### 序論

TGF- $\beta$  superfamily に属する分泌因子 Nodal は、脊椎動物の中内胚葉形成、頭尾軸形成、神経形成などの局面で重要な役割を果たす<sup>1,2)</sup>。マウス胚やニトリ胚では、*nodal* は原条胚の node/organizer 領域において左側に偏って発現し、体節期胚の側板中胚葉においては左側のみで発現する<sup>3-5)</sup>。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 胚の *nodal* 相同遺伝子は、現在までに 6 種類が同定されているが、左右非対称な遺伝子発現を示すことが報告されているのは *Xnr-1*

のみである<sup>6,7)</sup>。*Xnr-1* は、胞胚の植物極側やオルガナイザー領域の原口背唇部で発現した後、後期神経胚期から左側板中胚葉に発現し、右側板中胚葉には発現しない<sup>6,8)</sup>。

上記の発現パターンと他の脊椎動物胚の *nodal* 相同遺伝子に関する知見から、*Xnr-1* はツメガエル胚の左右軸形成のプロセスで重要な役割を果たすと期待される。卵割期ツメガエル胚の右側割球に *Xnr-1* を発現するベクターを導入すると内臓逆位が生じる

ことが<sup>9)</sup>、*Xnr-1*が左右軸形成において機能していることの主要な根拠となっているが、この実験にはいくつかの問題点がある。

(i) *Xnr-1*の属するTGF- $\beta$  superfamilyのリガンド-受容体間は広範な親和性を有し、その相互作用は複雑多岐にわたるため<sup>10)</sup>、過剰発現実験のみから*Xnr-1*の機能を調べることは出来ない。過剰発現した*Xnr-1*リガンドが、(左右性決定に関する)真の内在性リガンドである他のTGF- $\beta$  superfamilyのリガンド(例えばActivin)の機能をmimicしている可能性が考えられる。一方、Vg1, Activinリガンドの右割球注射による過剰発現実験においても、*Xnr-1*同様に高頻度の内臓逆位を誘起するため<sup>11)</sup>、これらのリガンドが、真の内在性左右軸決定因子*Xnr-1*の活性をmimicした可能性も考えられるためである。即ち、いずれのリガンドが本物であるかについて、過剰発現実験からは判断出来ないのである。

(ii) *Xnr* familyのリガンドはオルガナイザー形成や中胚葉分化に重要な役割を果たすため、過剰発現させた*Xnr-1*がオルガナイザー形成期の左右性決定機構に影響したのか、それ以降の発生段階の左右性決定機構に影響したのかについて、卵割期実験からは明らかにできない。

(iii) *Xnr-1*の過剰発現実験では高頻度で奇形や二次軸が生じることが報告されており<sup>8, 9, 12, 13)</sup>、Sampathらの実験では奇形を逃れた胚の左右性について集計している<sup>9)</sup>。そのため、Sampathらの実験からは奇形を原因として派生的に内臓逆位が生じている懸念を払拭出来ない。

我々は、ツメガエル胚の左右軸形成機構を明らかにするためには、*Xnr-1*の果たす役割を、特に原腸形成後の神経胚を対象とした実験操作をもとに、多角的に検討する必要があると考えた。本研究は、右側板中胚葉に、Nodalタンパク質を過剰投与したり*Xnr-1* mRNAを遺伝子導入して異所的に発現させることで、左右側板間でのNodalシグナリングのバランスを無処理胚のそれと逆転させることを行った。これらの実験を通じて、*Xnr-1*の左側特異的な発現が、*Xnr-1*よりも後期に左側板特異的に発現する*lefty (antivin)*, *pitx2*<sup>14-17)</sup>の発現の側性に及ぼす影響や内臓の左右性に及ぼす影響について調べた。本研究においては、上記の問題点のうち、(ii)と(iii)に対する考察を得ることを目的として、*Xnr-1*の原腸形成期までの発現に影響しない、神経胚期以降の胚の側板中胚葉の左右性分化に着目して実験を行った。尚、上記の問題点のうち、(i)については、*Xnr-1* mRNAに相補的なantisense oligonucleotideを用いて研究を行い、その予備的な結果について、文

献<sup>18)</sup>に報告している。

## 材料と方法

gonadotrophinを注射したアフリカツメガエル雌雄成体のペアから有精卵を得て、2細胞期から初期胚期までの間に2.5%チオグリコール酸溶液(pH8.4-8.6)で脱ゼリーし、15-26°Cで飼育して、初期神経胚期～後期神経胚期(stage 13/14~17/18)、神経管期(stage 19/20)、または初期尾芽胚期(stage 21-26)に達した段階で注射実験に用いた。発生段階の同定は、NieuwkoopとFaberの1967年の発生段階表に従った。

注射に用いた胚は、2本のピンセットで透明なchorionを除去し、10% Steinberg氏液を満たしたテラサキプレート(住友ベークライト製)のwellの中に並べた。Drummond社製の微量注射器『Nanoject』を用いて、胚を側面から見た時の中心にあたるポイントの皮下に、タンパク質溶液を微量注射した。テラサキプレートのwell内で、hair loopを用いて胚の側面中央を注射針に対して浅い角度を保つように押さえ、表皮に対して非常に浅い角度で注射針を刺すことで、溶液を主に表皮と側板中胚葉との間に注入することが出来た<sup>19)</sup>。

タンパク質溶液は、注射後に注射した側の左右にミスがないかをチェックする目的で、10:1の比率で生体染料である10% Nile Blue溶液(和光純薬製)と混合してから注射に用いた。組換え型マウスNodalタンパク質(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)は、0.2-200  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で5または25 nlを左もしくは右側板中央に注射した(胚が伸長して尾芽胚になるとやや前方に色素が位置する)。Nodalタンパク質の投与量は、0.001-10 ngとした。注射位置は、神経胚を横から見て側板中央とした。注射胚が尾芽胚期に達してから、注射した側の左右を間違えていないかについてNile Blue色素のスポットをもとに判定した。対照実験として、分子量分画した1%ウシ血清アルブミン(BSA fraction V; Sigma社)を5 nlまたは25 nl注射した。

微量注射後、胚を0.1% BSAを満たした24穴のポリスチレン製浮遊培養用テストプレート(岩城硝子製)に1穴につき1匹ずつ静置し、発生段階41-42に達するまで18-26°Cで飼育した。内臓の左右性の判定は、主にstage 41-42で行い、内臓逆位率の算出方法は、文献<sup>20)</sup>の方法に従った。腸管の左右性の判定の際には、臍臓の位置も参考にした。胚の前後軸、背腹軸に沿った形態形成に対する、注射したタンパク質の影響を調査するために、すべての胚について、dorso-anterior index (DAI; Kao and Elinson,

1988) を記録した。

比較のために、Activin B (ウシ組換えタンパク質、和光純薬), fibroblast growth factor (FGF)-8 (マウス組換えタンパク質, R&D 社/ ヒト組換えタンパク質, Pepro Tech 社), FGF-10 (マウス組換えタンパク質, R&D 社/ ヒト組換えタンパク質, Pepro Tech 社), insulin-like growth factor (IGF)-I (ヒト組換えタンパク質, Pepro Tech 社), IGF-II (ヒト組換えタンパク質, Pepro Tech 社), platelet derived growth factor (PDGF) (ヒト組換え PDGF-AA, R&D 社), vascular endothelial growth factor (VEGF) (ラット組換えタンパク質, R&D 社), growth/differentiation factor (GDF)-6 (マウス組換えタンパク質, R&D 社), GDF-8 (マウス組換えタンパク質, R&D 社), BMP-3 (ヒト組換えタンパク質, R&D 社) の各タンパク質溶液も注入した。これらのタンパク質のうち、FGF-8 は 1 胚あたり 250 pico-gram (pg) あるいは 500pg で、他のタンパク質は 500pg 以上の投与量を注射した。

#### ***Xnr-1* mRNA の神経胚側板細胞への導入**

*Xnr-1* 全長が挿入された pBluescript SK (恵与された cDNA) を、制限酵素 XhoI を用いて、37°C で 60 分間 incubate し 直鎖 DNA にした。これを template DNA として用いるため、1 $\mu$ g/ $\mu$ l に濃度を調整した。Capping された *Xnr-1* mRNA は、mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion Co.) と T<sub>3</sub> polymelase を用いて、37°C で 60 分間、*in vitro* で合成した。合成された mRNA をエタノール沈澱として回収後、RNase-free 水 15  $\mu$ l に溶解した (ストック溶液の濃度は 0.85  $\mu$ g/ $\mu$ l となった)。

RNase-free の 1.5ml エッペンチューブを用意し、*Xnr-1* mRNA のストック溶液から 1.2 $\mu$ l を取り、5% glucose を含む Marc's Modified Ringer's solution (MMR; 0.1M NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES, 0.1mM EDTA, pH7.4) 8.8 $\mu$ l に溶解した。*Xnr-1* の mRNA の濃度は 1 $\mu$ g/10 $\mu$ l となった。

polyethyleneimine などのカチオン性物質を用いた遺伝子導入の場合、カチオン性物質に DNA/RNA を吸着させるため、両者の混合比が重要であるとされる。polyethyleneimine として、*in vivo*-jet PEI (Polytransfection 社) を用いた。*in vivo*-jetPEI 溶液の量と DNA/RNA の量のイオンバランスの値 (N/P 値) は、N/P=5-10 が最適とされ、Polytransfection 社プロトコルに記された DNA/RNA の量 ( $\mu$ g)  $\times$  3  $\times$  (N/P 値)  $\mu$   $\div$  150 の計算式より、N/P 値を 10 として添加する *in vivo*-jetPEI 溶液の最適量を割

り出した。1( $\mu$ g)  $\times$  3  $\times$  (10)  $\div$  150 = 0.2 $\mu$ l。すなわち、1 $\mu$ g の RNA 量に対して *in vitro*-jetPEI 溶液を 0.2  $\mu$ l 添加すれば良いことが分かった (*in vivo*-jetPEI 溶液の原液は 150mM であった)。

*in vivo*-jetPEI 溶液 1 $\mu$ l を 49 $\mu$ l の MMR 溶液に溶解した。ピペッティングしてよく混合させた後に 10 $\mu$ l を取り、これを 1 $\mu$ g/10 $\mu$ l の *Xnr-1* mRNA 溶液中に添加して、ピペッティングしてよく混合した。*Xnr-1* mRNA 量と *in vivo*-jetPEI 溶液の量は N/P=10(最適値)となる 1 $\mu$ g と 0.2 $\mu$ l になった。*Xnr-1* mRNA 溶液の最終濃度は 1 $\mu$ g/20 $\mu$ l、すなわち 50mg/ml となり、沈澱を生じる濃度となる 500  $\mu$ g/ml よりも低濃度であった。この *Xnr-1* mRNA + *in vivo*-jet PEI 溶液を、室温で 15 分間 incubate した。再度よく混合してからテラサキプレートに *Xnr-1* mRNA - jetPEI 混合溶液を移した。

初期-後期神経胚の右側面あるいは左側面に、10-50nl ずつ混合溶液を注射して、14-15°C で overnight 培養した。翌日には注射胚は stage 24-28 になっていたため、その後は 24°C に温度を変更して培養した。stage 42 に到達したところで内臓の左右性を判定した。*in vivo*-jet PEI 溶液を用いた場合、DNA/RNA が細胞内に浸透するためには 12-48 時間が必要なので、注射直後の胚の培養温度は 翌日までは 14-15°C と低く設定した。

#### **Wholemount *in situ* hybridization**

*Xnr-1* の全長配列を含む cDNA は、Washington 大学の Randall T. Moon 博士から恵与された。*Xenopus lefty-related factor antivin (Xatv)* の cDNA は、Christopher V. E. Wright 博士から恵与された。*Xenopus pitx2c (pitx2)* の cDNA は、Salk 研究所の Juan Carlos Izpisua Belmonte 博士から恵与された。

Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA を微量注射したことが、左側板における *Xnr-1* の発現にどのような影響を及ぼしたのかを知るために、微量注射実験に用いた胚を初期尾芽胚期まで培養し、digoxigenin で標識した *Xnr-1* に相補的な cRNA プローブを作成し、wholemount *in situ* hybridization を行った。プローブ作成には、*in vitro* transcription のためのキット (Riboprobe *in vitro* Transcription System; Promega Co.) と digoxigenin 標識 dUTP を含んだ dNTP 溶液 (DIG RNA Labelling Mix; Roche Co.) を用いた。また、*Xnr-1* の発現開始よりも後の発生段階において左側板中胚葉に発現する 分泌因子 *lefty*, 転写因子 *pitx2* の mRNA 発現を、digoxigenin で標識した *lefty*, *pitx2* に相補的な cRNA を

プローブとして、同じく wholemount *in situ* hybridization 法で調べた。コントロール染色には、sense RNA probe を digoxigenin 標識して用いた。*Xnr-1*, *lefty* については、左右非対称に側板に発現する stage 24-26 の初期尾芽胚期で、*pitx2* については stage 28-30 の尾芽胚期で固定して染色した。

胚の固定は MEMFA (2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub> and 4% formaldehyde を含む 0.1M MOPS (pH 7.4 with NaOH)) を用いて 室温で 1 時間行い、TBST で洗浄後、メタノールで脱水し、-20℃のメタノール中で 染色に用いるまでストックした。wholemount *in situ* hybridization は、Harland (1991) の方法を微修正して用いた<sup>21)</sup>。cRNA プローブのハイブリダイズ後の洗浄は、胚の発生段階や用いるプローブによって SSC 溶液の stringency を変えて行った。BM purple 発色後は、0.1% Tween 20 を含むリン酸緩衝 saline (PBS-) で洗浄し、50% glycerol で透徹後、あるいは透徹せずに写真撮影した。染色後の胚は、4% ホルマリン/PBS-溶液で保存した。

## 結果

神経胚の右側面への Nodal タンパク質の注射は、内臓の左右性を高頻度で反転させ、左側板特異的な遺伝子発現を変化させる

Nodal タンパク質を 神経胚の片側の側板中央に注射することで、原腸形成や中胚葉誘導が行われた後の発生段階である 神経胚における左右性決定に Nodal シグナルの左右のバランスが関与するか否かについて調べた。2.5-5ng の Nodal タンパク質を stage 13-18 の神経胚の側面中央に皮下注射したところ、100%近い頻度で内臓逆位が誘起された (図 1, 表 1a)。

Nodal タンパク質を野生型の胚に注射することで 100%近い頻度で内臓逆位を誘起したという報告は、全脊椎動物を通じて 本研究が初めてのものである。一方で、神経胚の左側面に Nodal タンパク質を注射しても、内臓逆位は殆ど生じなかった (図 1, 表 1b)。左側に発現する遺伝子の側性は、投与された Nodal タンパク質の効果で変更された。図 2b, d は、100% 近い内臓逆位が生じる条件で Nodal タンパク質を右側面に投与した際の、遺伝子発現の左右性の変化を示したものである。*Xnr-1* と *pitx2* の側性は、Nodal タンパク質の右側への投与の結果、著しく変更され、右側に発現する胚が多くなったが、多くの胚では 左側での本来の発現も保持されていた。

*Xnr-1* よりも *pitx2* の発現の方が、右側板の方に発現の強い側がシフトするケースが多かった (図 2d)。一方、左側板における *lefty* の発現は 右側に Nodal

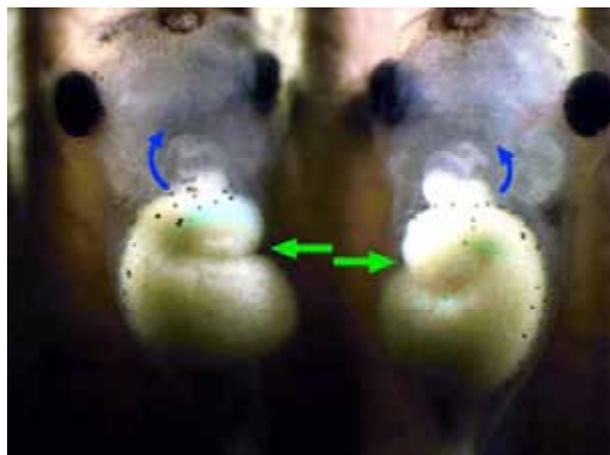


図 1. Nodal タンパク質の中期神経胚側板への皮下注射が内臓左右性に及ぼす効果。左胚は、左側板に 5ng の Nodal タンパク質を注射した後の stage 42 の胚内臓の左右性や形態は正常である。右胚は、右側板に Nodal タンパク質を同じ条件で注射した stage 42+ の胚で、左胚とは異なり、心臓と腸管の両方で逆位が観察される。

表 1. Nodal タンパク質を中期神経胚の左または右側面に注射した際の生存率と濃度依存的に生じた内臓逆位の発生率。

### a. Nodal protein injection (5ng, right-sided injection)

stage	Survival of the injected embryos	Total incidence of L-R reversal	L-R reversal of both heart and gut	L-R reversal of heart-alone	L-R reversal of gut-alone
13-14	100 65/65	91 59/65	38 25/65	45 29/45	8 5/65
15-16	97 116/120	92 107/116	53 61/116	28 33/116	11 13/116
17-18	100 77/77	91 70/77	30 23/77	52 40/77	9 7/77
19-20	100 61/61	87 53/61	26 16/61	54 33/61	7 4/61
21-22	83 50/60	22 11/50	6 3/50	16 8/50	0 0/50
23-24	100 37/37	3 1/37	3 1/37	0 0/37	0 0/37
25-26	98 47/48	2 1/47	0 0/47	2 1/47	0 0/47

Upper, %; Lower, inverted/survived.

### b. Nodal protein injection (stage 15-16)

Dose (ng)	Upper, %; Lower, inverted/survived.			
	5ng	2.5ng	1ng	0ng
Right	92 107/116	100 24/24	57 20/35	0 0/63
Left	2 2/96	0 0/24	0 0/24	-

90%以上の胚が、1-5ng の Nodal タンパク質注射を経ても、左右性判定時の 4 日胚まで生存していた。右側注射の場合には、心臓と腸管は、ともに高頻度で内臓逆位を示しており、Nodal のシグナル伝達経路が内臓器官の左右性を決めるメカニズムに関与していると考えられる。

タンパク質を注射しても変化しなかった (図 2d)。これらの観察結果にもとづき、右側面に皮下注射した Nodal タンパク質は 右側板において *Xnr-1* 発現を誘導し、誘導された *Xnr-1* が *pitx2* を更に誘導するとともに、Nodal タンパク質自体も直接 *pitx2* を右側板に誘導することで、内臓の左右性決定を再指定(respecify)したのであると考えられる。また、

Nodal の右側面への注射の結果、*Xenopus lefty* が右側に誘導されることは殆ど無かったにもかかわらず 100%の頻度で内臓逆位が誘導されたことから、意外にも、*lefty* は左右の向きの決定に必要な不可欠ではないことが明らかとなった。左側板に Nodal タンパク質を投与しても、上記の 3 遺伝子発現の側性には何も変化をもたらさなかった (図 2a, c)。

***Xnr-1* mRNA の神経胚側板細胞への遺伝子導入**

次に、5'キャッピングした *Xnr-1* mRNA とカチオン性脂質である polyethylene-imine (PEI) とを混和し複合体を形成させて、左または右側面皮下に微量注射し、胚細胞の活発な貪食能と PEI の proton sponge 効果を利用して、側板中胚葉細胞に遺伝子導入を行った。この場合にも、Nodal タンパク質の注射実験同様、右側に注射した場合に限り 内臓左右軸は最高 92%の胚で逆位となった (表 2a)。左側に *Xnr-1* mRNA を導入しても、殆ど逆位は生じなかった (表 2b)。PEI 単独投与の場合 (mRNA 0ng) にも *Xnr-1* mRNA と混合投与した場合にも、胚の外部形態は正常胚と見分けがつかない程度に正常であった。Nodal タンパク質を右側板に与えた場合よりも内臓逆位率が やや低いのは、mRNA の導入効率の問題や、側板細胞のタンパク質合成能力の限界が原因かもしれない (精製したタンパク質を投与する方が高濃度で作用させることができる)。それでも最高で 92%の胚に内臓逆位が誘起された。Nodal タンパク質の右側板注射実験において 発現の側性が最も変化した *pitx2* について、*Xnr-1* mRNA の遺伝子導入後に発現パターンを調査した。左側板に *Xnr-1* mRNA を導入した場合の *pitx2* 発現の側性は、正常胚と同じで殆ど左側のみに発現していた (表 2c)。ところが、右側板に *Xnr-1* mRNA を導入したところ、61%の胚で *pitx2* の発現が両側性のものとなり、17%の胚では右側のみの発現に切り替わっていた (表 2c)。

Nodal タンパク質の注射実験においては、Nodal タンパク質としてマウス胚のそれを用いたが、*Xnr-1* mRNA の右側板への導入によって同様の結果が得られたことから、ツメガエル胚に内在する *Xnr-1* タンパク質をリガンドとして受け入れ可能な Nodal シグナルの受容システムが右側板に備わっていることが強く示唆された。

**Nodal 以外の様々な成長因子の注射実験**

序論の項で述べたように、TGF-β superfamily に属するリガンドの間は、その数多くの type I (ALK), type II 受容体群と「多対多」の関係で結合する<sup>10)</sup>。

表 2. *Xnr-1* mRNA を神経胚期の左または右側板中胚葉に遺伝子導入した胚における、内臓逆位の発生率と *Xenopus pitx2* 遺伝子の発現パターンの変化。

***Xnr-1* mRNA injection**

**a. Right**

stage	neurula stage		
	13-14	15-16	17-18
dose (ng)	Upper, %	Lower, inverted/survived	
2-2.5	74 34/46	58 41/71	- -
1.25	92 22/24	88 14/16	19 4/21
0.5	- -	71 17/24	- -
0	0 0/40		

**b. Left**

stage	neurula stage	
	13-14	15-16
dose (ng)	Upper, %	Lower, inverted/survived
2	0 0/24	- -
1.25	4 1/23	
0	0 0/35	

**c. Expression pattern of *Pitx2***

	Left	Bilateral	Right	Absence
Right injection	11% n=4/36	61% n=22/36	17% n=6/36	11% n=4/36
Left injection	91% n=21/23	0% n=0/23	0% n=0/23	9% n=2/23

神経胚期に、polyethyleneimine をキャリアとして、5'キャッピングした *Xnr-1* mRNA を側板中胚葉細胞に導入した。 a. 右側板に導入した場合、最高で 92%の胚に内臓逆位が生じた。表中の分母は生存胚数で、分子は逆位胚数。 b. 左側板に導入した場合、内臓逆位は殆ど生じなかった。 c. 板における *pitx2* の発現は、右側に *Xnr-1* mRNA を遺伝子導入した場合には高頻度で両側性の発現を示したが(上段)、左側に与えた場合には、殆ど左側のみに発現していた(下段)。

Nodal タンパク質の神経胚注射実験に関して、本章で得られた結果のリガンド特異性を知るために、TGF-β superfamily に属しながらも Nodal や Lefty とは異なるシグナル伝達経路を持つ GDF-6, BMP-3をはじめ、TGF-β superfamily に属さない他の family の成長因子について、神経胚側板に微量注射を行った。しかしながら、以下の 2 つを除いては、材料と方法の項に記した全ての成長因子タンパク質について、内臓逆位誘発活性は見いだせなかった。

そこで、反対に Nodal や Lefty に類似したシグナル伝達経路を持つとされる成長因子を、左または右側板に注射することにした。TGF-β superfamily の受容体は、type I 受容体と type II 受容体の heterotetramer としてリガンドと結合し、細胞内に

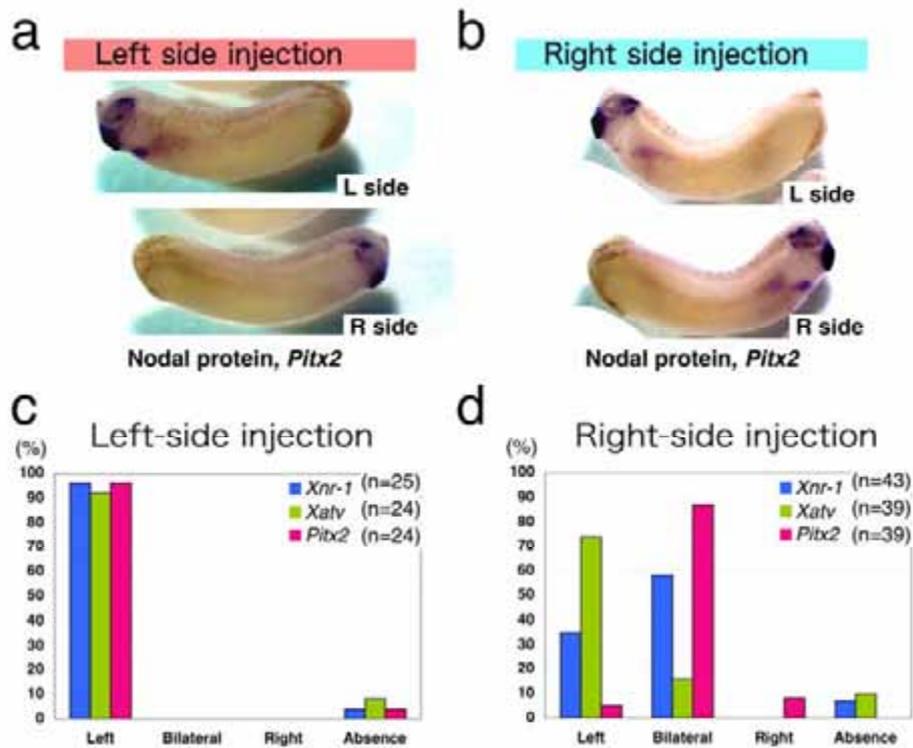


図2. Nodal protein の側板への注射が遺伝子発現の側性に及ぼす影響. a, c. 中期神経胚の左側板に Nodal protein を注射. *Xnr-1, lefty* (*Xatv*), *pitx2* (a) の発現の側性に変化はない. b, d. 中期神経胚の右側板に Nodal protein を注射. *Xnr-1* と *pitx2* (b) は右側に誘導されているが, *lefty* の発現は大半の胚で左側のみにあり変化しなかった.

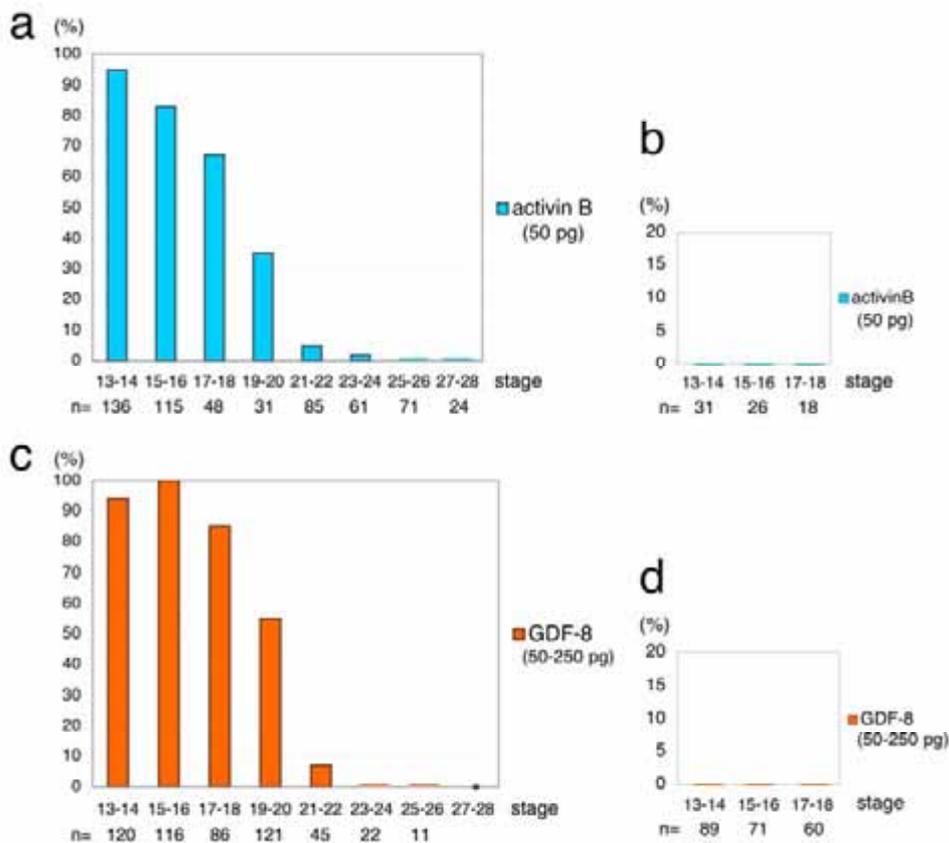


図3. ツメガエル神経胚/尾芽胚の右(a, c)または左側板(b, d)への Activin B タンパク質(a, b) ならびに GDF-8 タンパク質(c, d) の微量注射. Nodal に近いシグナル伝達経路を持つこれらのリガンドにおいては, Nodal タンパク質の微量注射の場合(表 1) と同じく 右側板に注射した場合には高い内臓逆位を示し, 左側板への注射では殆ど内臓逆位を誘起しなかった. また, *Xnr-1* 発現後の発生段階である尾芽胚に内臓逆位を誘起することはなかった.

シグナルを伝えることが知られている<sup>10, 22)</sup>。Nodal リガンドと Activin リガンドは Activin type II A, Activin type II B 受容体の双方に結合し、ALK-4 (type I 受容体のひとつ) 受容体も共有する<sup>23, 24)</sup>。またマウスや zebrafish の Lefty は、Activin type IIB 受容体に結合することが明らかにされており<sup>24, 25)</sup>、Activin type II A 受容体に結合することも示唆されている<sup>24)</sup>。ツメガエル神経胚において、*activin subunit* (=inhibin- $\beta$  chain) が左右非対称に発現するという報告はないが、ニワトリ原条胚では *activin  $\beta$ B chain* ならびに *activin type IIA receptor* が原条の右側に発現する<sup>3, 26)</sup>。

これらの背景から、ツメガエル神経胚側板に Activin B タンパク質を注射したところ、右側に注射した場合にのみ、神経胚期を通じて高い内臓逆位誘発活性が観察された (図 3a)。左側に注射した場合には内臓逆位は生じなかった (図 3b)。次に、TGF- $\beta$  superfamily の中で、Nodal や Activin とは異なる GDF family に属するが、Activin や Nodal と共通の Activin type II A ならびに Activin type II B 受容体を使ってシグナル伝達を行うとされる GDF-8<sup>27)</sup> を神経胚側板に注射した。Activin B タンパク質注射の場合と同様に、右側板に注射した場合には 高い内臓逆位誘発活性が観察されたが (図 3c)、左側板に同量を注射しても内臓逆位は観察されなかった (図 3d)。

これらの結果は、表 1 で示した、Nodal タンパク質の注射の結果に類似している。ツメガエル胚においては、上記のニワトリ胚の場合とは異なり、左右非対称に発現する TGF- $\beta$  superfamily の受容体は知られていないが、右側に注射した Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA は、Activin-B や GDF-8 と共有される受容体 (特に Activin type II 受容体) やその下流のシグナル伝達経路を通じて、左右非対称性に関与するカスケードを動かしていると推察される。

## 討論

ツメガエル胚の 6 つの *nodal* 相同遺伝子の中で、*Xnr-1* のみが左側板で発現する。文献 18) に記した、*Xnr-1* に相補的な Morpholino oligonucleotide の注射実験の結果、*Xnr-1* の左側板特異的な発現は、内臓器官の左右非対称な形態形成において、左右の向きを決めるのに際して必須の役割を担うことが強く示唆された。今回は、2 つの異なったアプローチを用いて、*Xnr-1* の左側特異的な発現の機能について調べた。Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA の右側板注射胚における遺伝子発現の側性や、心臓や腸管の左右性の調査から、*Xnr-1* は、左右非対称性に関

連する *pitx2* 発現の側性を指示することを介して、内臓器官の左右非対称な向きや配置を決めるのに重要な役割を果たすことが強く示唆された。この実験結果は、文献<sup>18)</sup>の *Xnr-1* MO の結果を補完する。恐らく、Nodal シグナルの強い方が左側になり、反対側が右側になる形で、Nodal シグナルの左右のバランス (強弱の差) が左右の向きを決めると考えられる。先に *Xnr-1* シグナルを受け取った側が 反対側で *pitx2* 発現が開始されるのをブロックする、抑制的な分子メカニズムが 両側板間に存在している可能性がある。

側板中胚葉は、発生にともない前後軸に沿って拡張し、胚の側面の広い領域を占める。この「フィールド」の中で、*Xnr-1* の発現は、胚の後端から前方に向けて伝播し、側板の前方で *lefty* と *pitx2* の発現を誘導すると考えられる<sup>6, 14, 16)</sup> (図 2b,d)。従って、原腸形成後の胚の後方から始まり、尾芽胚の側板前方における *pitx2* や *Nkx3* (*Xenopus bagpipe*<sup>28)</sup>) の発現に先行する *Xnr-1* 発現の伝播は、初期の左右性の特異化 (specification) の情報を *pitx2* 発現の側性などの後期の情報に変換するのに必要な現象であると思われる。Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA の右側面への皮下注射が、*Xnr-1* や *pitx2* の発現を右側板に誘導し、内臓器官の側性を完全に逆転させることを示した。この結果は、右側板が Nodal シグナル、なかでも *Xnr-1* シグナルを受容出来ることを証明している。この結果と符号する知見として、マウスやニワトリやゼブラフィッシュの体節期胚は *FAST* (*Forkhead Activin Signal Transducer; FoxH1*) を左右両側板で発現している<sup>29)</sup>。FAST (*FoxH1*) は Nodal のシグナル伝達経路の必須の構成因子であり、左側板における *pitx2* の活性化に必須の転写因子であると考えられている<sup>30-32)</sup>。Nodal のシグナル伝達には、細胞膜上にアンカーされリガンド-受容体複合体に結合する EGF-CFC タンパク質が必要である<sup>1, 2, 33)</sup>。EGF-CFC も、FAST 同様、両側板に発現し、左右非対称性決定のカスケードに関与する<sup>34-36)</sup>。

これらの知見と本研究の結果から、右側板では、*Xnr-1* というリガンドは発現していないが、シグナルを受け取る方のシステムは、右側板にも潜在的に備わっていることが強く示唆された。*Xnr-1* リガンドの不在が、右側板が解剖学的な左側組織に分化する specification を受けないことの原因となっていると考えられる。

左右軸研究の進展に伴い、左右性決定のメカニズムは様々な因子を含むことが解明されつつある。同じ脊椎動物の中でも、種が違えば 初期の左右性決定

のプロセスは異なり、初期発生の多様性を反映している<sup>37,38)</sup>。例えば、相同遺伝子が、動物の違いで左右反対の側性を持っていたり、ある動物で左右非対称に発現する遺伝子が別の動物では左右対称に発現したりする例が次々と発見されており、左右性決定の分子メカニズムには脊椎動物内部にも多様性があり種固有の側面があると考えられている(*nkx3.2*, *sonic hedgehog*, *snail*, *FGF-8* など<sup>4,5,37)</sup>。

一方、初期の左右性決定のメカニズムのバリエーションとは対照的に、*nodal-pitx2* 経路は、脊椎動物の全ての綱(class)で高度に保存されていると考えられている<sup>4,5,37,38)</sup>。ツメガエル胚は多数の *nodal* 相同遺伝子を持っているが、今回の結果は、*Xnr-1*→*pitx2* 経路が ツメガエル胚の左右性決定において必要不可欠なものであり、左側板に発現する *nodal* が同じ左側に *pitx2* を誘導するという点において、他の脊椎動物と共通のルールを持っているとの見解を支持する。本研究で我々は、Nodal タンパク質や *Xnr-1* mRNA を原腸形成後の神経胚/尾芽胚に注射して、胚の左右性を解析した。そのようにして、原腸胚期までの初期発生における Nodal シグナリングとは区別して、左側板における Nodal シグナリングについて解析することが出来た。このアプローチは、オルガナイザー領域特異的な *nodal* の *hypomorph* やゼブラフィッシュ胚における *cyclops mutant* の解析などの方法に比べ、胚形成の特定の局面における *nodal* の機能を調べるのに優れている。何故なら、後者の方法では、左右性の異常の他にも様々な奇形が出るので、その左右性の異常に関する解釈が難しくなるからである<sup>39-41)</sup>。

右側板中胚葉にのみ発現する遺伝子として、ニワトリ胚の右側板における *snail* の発現<sup>42)</sup>や、マウス胚における *nkx3.2* の発現<sup>43)</sup>が知られているが、これらの遺伝子はアフリカツメガエル胚では右側特異的に発現することはない。アフリカツメガエル胚においては、右側板特異的に発現する遺伝子は一つも知られていない。右側板での Nodal(*Xnr-1*) シグナルの活性化実験は、胚の物理的な右側を解剖学的な左側になるように分化させた時に、物理的な左側は反対側に分化、すなわち解剖学的な右側に分化することを余儀なくされるメカニズムがあることを示唆している。このアイデアを実証するには、両生類胚ではひとつも知られていない右側板特異的に発現する遺伝子を発見し、マーカーとして用いる必要がある。

*Xnr-1* が左側板中胚葉において発現する直前に、背側後方、原腸蓋の内表面近くに小さな両側性の *Xnr-1* 発現が出現し、少なくとも stage 30 の尾芽胚期まで(左側板における *Xnr-1* 発現が終息するまで)、

この背側後方の発現が持続する<sup>6,8, 未発表データ</sup>。この発現領域と重なるように、ツメガエル神経胚の原腸蓋の背側天井には繊毛が生えており、左右性決定に関与するモータータンパク質の *left-right dynein* が発現している<sup>44)</sup>。マウス胚では後期原腸胚期のオルガナイザー領域(node)の腹側に生えた繊毛の回転運動が右から左への左右非対称な液流(nodal flow)を生じ、これが左側板中胚葉における *nodal* の非対称発現の原因となっていることが報告されている<sup>45,46)</sup>。*Xnr-1* の背側後方の両側性の発現が産生する *Xnr-1* リガンドが、神経胚原腸後端における右から左への液流に運ばれ、これが左側板における *Xnr-1* 発現を autonomous に誘起する可能性が考えられる。我々は、微量注射法により、ツメガエル胚原腸内部に *dynein-ATP* 阻害剤であり繊毛運動を抑制するバナジン酸( $\text{NaVO}_3$ )を注射したところ、27%の胚に内臓逆位が生じることを観察している(未発表データ)。今後は、液流 (nodal flow) をキーワードに *Xnr-1* の左右非対称な発現の誘導機構を追究する必要があると思われる。

## 謝辞

本研究は、本論文の著者全員による共同研究「脊椎動物胚の左右性決定機構における *nodal* 遺伝子の役割の研究」として神奈川大学総合理学研究所の助成のもとで行いました。所長ならびに所員各位に感謝いたします。

## 文献

- 1) Schier AF and Shen MM (2000) Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* **403**: 385-389.
- 2) Schier AF (2003) Nodal signaling in vertebrate development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 589-621.
- 3) Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M and Tabin C (1995) A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**: 803-814.
- 4) Hamada H, Meno C, Watanabe D and Saijoh Y (2002) Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 103-113.
- 5) Levin M (2005) Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech. Dev.* **122**: 3-25.
- 6) Lowe LA, Supp DM, Sampath K, Yokoyama T, Wright CVE, Potter SS, Overbeek P and Kuehn M R (1996) Conserved left-right asymmetry of *nodal* expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* **381**: 158-161.
- 7) Takahashi S, Yokota C, Takano K, Tanegashima K, Onuma Y, Goto J and Asashima M (2000) Two novel *nodal-related* genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development* **127**: 5319-5329.

- 8) Lustig KD, Kroll K, Sun E, Ramos R, Elmendorf H and Kirschner MW (1996) A *Xenopus nodal related* gene that acts in synergy with *noggin* to induce complete secondary axis and notochord formation. *Development* **122**: 3275-3282.
- 9) Sampath K, Rubinstein AL, Cheng AM, Liang JO, Fekany K, Solnica-Krezel L, Korzh V, Halpern ME and Wright CV (1998) Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* **395**: 185-189.
- 10) Massagué J, Blain SW and Lo RS (2000) TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**: 295-309.
- 11) Hyatt BA and Yost HJ (1998) The left-right coordinator: the role of *Vg1* in organizing left-right axis formation. *Cell* **93**: 37-46.
- 12) Jones CM, Kuehn MR, Hogan BL, Smith JC and Wright CV (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**: 3651-3662.
- 13) Yamamoto TS, Takagi C, Hyodo AC and Ueno N (2001) Suppression of head formation by *Xmsx-1* through the inhibition of intracellular nodal signaling. *Development* **128**: 2769-2779.
- 14) Cheng AM, Thisse B, Thisse C and Wright CV (2000) The lefty-related factor *Xatv* acts as a feedback inhibitor of nodal signaling in mesoderm induction and L-R axis development in *Xenopus*. *Development* **127**: 1049-1061.
- 15) Branford WW, Essner JJ and Yost HJ (2000) Regulation of gut and heart left-right asymmetry by context-dependent interactions between *Xenopus* Lefty and BMP4 signaling. *Dev. Biol.* **223**: 291-306.
- 16) Ryan AK, Blumberg B, Rodriguezesteban C, Yoneitamura S, Tamura K, Tsukui T, Delapena J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris DP, Robertson EJ, Evans RM, Rosenfeld MG and Belmonte JCI (1998) *Pitx2* determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**: 545-551.
- 17) Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H and Blum M (2000) *Pitx2* isoforms: involvement of *Pitx2c* but not *Pitx2a* or *Pitx2b* in vertebrate left-right asymmetry. *Mech. Dev.* **90**: 41-51.
- 18) 茂木和枝, 安積良隆, 竹内重夫, 豊泉龍児 (2003). 無尾両生類 *nodal* 遺伝子の左右非対称な発現の調節機構の解析ならびに有尾両生類 *nodal* 遺伝子のクローニング. 神奈川大学総合理学研究所年報 2002. pp. 11-36.
- 19) Toyozumi R, Mogi K and Takeuchi S (2000) More than 95% reversal of left-right axis induced by right-sided hypodermic microinjection of activin into *Xenopus* neurula embryos. *Dev. Biol.* **221**: 321-336.
- 20) Toyozumi R, Kobayashi T, Kikukawa A, Oba J and Takeuchi S (1997) Adrenergic neurotransmitters and calcium ionophore-induced *situs inversus viscerum* in *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Growth Differ.* **39**: 505-514.
- 21) Harland RM (1991) In *situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* **36**: 685-695.
- 22) Massagué J (1998) TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 753-791.
- 23) Reissmann E, Jornvall H, Blokzijl A, Andersson O, Chang C, Minchiotti G, Persico MG, Ibanez CF and Brivanlou AH (2001) The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev.* **15**: 2010-2022.
- 24) Sakuma R, Ohnishi Yi-Y, Meno C, Fujii H, Juan H, Takeuchi J, Ogura T, Li E, Miyazono K and Hamada H (2002) Inhibition of Nodal signalling by Lefty mediated through interaction with common receptors and efficient diffusion. *Genes Cells* **7**: 401-412.
- 25) Meno C, Takeuchi J, Sakuma R, Koshiba-Takeuchi K, Ohishi S, Saijoh Y, Miyazaki J, ten Dijke P, Ogura T and Hamada H (2001) Diffusion of nodal signaling activity in the absence of the feedback inhibitor Lefty2. *Develop. Cell* **1**: 127-138.
- 26) Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn MR and Tabin CJ (1997) Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev. Biol.* **189**: 57-67.
- 27) Lee SJ and McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 9306-9311.
- 28) Newman CS, Grow MW, Cleaver O, Chia F and Krieg P (1997) *Xbap* a vertebrate gene related to *bagpipe*, is expressed in developing craniofacial structures and in anterior gut muscle. *Dev. Biol.* **181**: 223-233.
- 29) Hoodless PA, Pye M, Chazaud C, Labbe E, Attisano L, Rossant J and Wrana JL (2001) FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev.* **15**: 1257-1271.
- 30) Weisberg E, Winnier GE, Chen X, Farnsworth CL, Hogan BL and Whitman M (1998) A mouse homologue of FAST-1 transduces TGF $\beta$  superfamily signals and is expressed during early embryogenesis. *Mech. Dev.* **79**: 17-27.
- 31) Norris DP and Robertson EJ (1999) Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev.* **13**: 1575-1588.
- 32) Norris DP, Brennan J, Bikoff EK and Robertson EJ (2002) The Foxh1-dependent autoregulatory enhancer controls the level of Nodal signals in the mouse embryo. *Development* **129**: 3455-3468.
- 33) Minchiotti G, Parisi S, Liguori GL, D'Andrea D and Persico MG (2002) Role of the EGF-CFC gene *cripto* in cell differentiation and embryo development. *Gene* **287**: 33-37.
- 34) Yan YT, Gritsman K, Ding J, Burdine RD, Corrales JD, Price SM, Talbot WS, Schier AF and Shen MM (1999) Conserved requirement for EGF-CFC genes in vertebrate left-right axis formation. *Genes Dev.* **13**: 2527-2537.
- 35) Gaio U, Schweickert A, Fischer A, Garratt AN, Muller T, Ozcelik C, Lankes W, Strehle M, Britsch S, Blum M (1999) A role of the *cryptic* gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr. Biol.* **9**: 1339-1342.

- 36) Schlange T, Schnipkowitz I, Andree B, Ebert A, Zile MH, Arnold HH and Brand T (2001) Chick CFC controls Lefty1 expression in the embryonic midline and nodal expression in the lateral plate. *Dev. Biol.* **234**: 376-389.
- 37) Burdine RD and Schier AF (2000) Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev* **14**: 763-76.
- 38) Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ and Izpisua Belmonte JC (2000) Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* **101**: 9-21.
- 39) Feldman B, Gates MA, Egan ES, Dougan ST, Rennebeck G, Sirotkin HI, Schier AF and Talbot WS (1998) Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* **395**: 181-185.
- 40) Feldman B, Dougan ST, Schier AF and Talbot WS (2000) Nodal-related signals establish mesodermal fate and trunk neural identity in zebrafish. *Curr. Biol.* **10**: 531-534.
- 41) Saijoh Y, Oki S, Ohishi S and Hamada H (2003) Left-right patterning of the mouse lateral plate requires nodal produced in the node. *Dev. Biol.* **256**: 160-172.
- 42) Isaac A, Sargent MG and Cooke J (1997) Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**: 1301-1304.
- 43) Schneider A, Mijalski T, Schlange T, Dai W, Overbeek P, Arnold HH and Brand T (1999) The homeobox gene *NKX3.2* is a target of left-right signaling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr. Biol.* **9**: 911-914.
- 44) Essner JJ, Vogan KJ, Wagner MK, Tabin CJ, Yost HJ and Brueckner M (2002) Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* **418**: 37-38.
- 45) Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M and Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**: 829-837.
- 46) Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y and Hamada H (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**: 96-99.

■原 著■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## 遺伝子組換えタマネギに生分解性プラスチック原料を 生合成させる試み II

安積良隆<sup>1,3</sup> 上西愛子<sup>2</sup> 野村 研<sup>2</sup> 北 宜裕<sup>2</sup> 齋藤光實<sup>1</sup>

### Trial to Establish to New Technique to Produce Raw Materials for Bio-Degradable Plastic in Genetically Modified Onion (*Allium cepa* L.) II

Yoshitaka Azumi<sup>1,3</sup>, Aiko Kaminishi<sup>2</sup>, Ken Nomura<sup>2</sup>,  
Nobuhiro Kita<sup>2</sup> and Terumi Saito<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Biotechnology and Bio-Resource Division, Kanagawa Prefectural Agricultural Research Institute, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1204, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yoshitk@info.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** We have been conducting experiments for the purpose of exploiting new techniques to produce beneficial materials, such as bio-degradable plastic, within genetically modified (GM) onion cells. A transforming procedure to produce GM onions was established, in which *Agrobacterium tumefaciens* was used to introduce foreign genes into the onion genome. As a result, we obtained GM onion seedlings, expressing introduced Green Fluorescent Protein (GFP) gene, by selecting on hygromycin-containing medium. An *Arabidopsis* gene, *AtMTP1* encoding vacuole membrane protein, was examined for its capability as a guide to transfer foreign gene products into vacuoles. *AtMTP1-GFP* fusion genes were delivered into the epidermis cells of an onion bulb by a particle gun. Under a fluorescence microscope, the gene product was detected on vacuole membranes. Our present results, together with the former results, indicated that it is possible to express foreign genes under control of an alliinase gene promoter, and accumulate the gene product in the vacuole at a high level.

**Keywords:** *Allium cepa* L., genetically modified (GM) plant, GFP (Green Fluorescent Protein), *AtMTP1*

### 序論

日本ではタマネギは明治時代に伝染病予防に効果があるということで一般に食されるようになったが、エジプトでは古代からスタミナ食品として栽培されてきた。現在では栄養価が高く、健康促進効果があるタマネギは、毎日の食卓に欠かせない野菜である。タマネギは血液をさらさらにする効果があると言われているが、これはアリシンなどの含硫化合物である硫化アリルが血糖値を低下させる効果があるためである。タマネギの辛み成分のもとであるアリシンは傷害によって液胞から放出されたアリインから細胞質に存在するアリイナーゼの働きによって細胞内で生合成される<sup>1,2)</sup>。また、タマネギにはケルセチン

と呼ばれる抗酸化フラボノイドの一種が多量に含まれており、血栓予防に働いている。さらにタマネギに多く含まれるグルタチオンは酸化還元状態を正常に維持する作用があり、肝臓機能強化に効果がある。タマネギは寒冷地で良く育ち、土地の肥えていないところや狭隘な耕地でも容易に栽培することができる。また収穫した、いわゆるタマネギ（鱗茎部分）は室温で傷みにくく、保存性に優れている。輸送に便利であるため世界中で生産され、その収穫量はトマトについて野菜の中では第二位である。

石油から工業的に作られるプラスチック製品は自然界では分解されにくく、不要になったものはゴミ

として貯まってしまい、環境に悪影響を及ぼす。ある種の細菌はプラスチック原料となる poly(D-3-hydroxybutylate) (PHB) を合成する。これを原料に製造されたプラスチック、生分解性プラスチック (bio-degradable plastic; BDP) は生物の働きによって容易に分解される。神奈川県理学部生物科学科の齋藤光実研究室では PHB を合成あるいは分解する細菌の研究を行ってきた<sup>3,4)</sup>。これまでに PHB の合成に必要な酵素の遺伝子 *phbA*, *phbB*, *phbC* などをクローニングしている。これらの遺伝子を導入すれば、その細胞内で PHB を合成できる可能性がある。

これまでに神奈川県農業総合研究所・生物資源部では神奈川県特産のタマネギ、湘南レッドを材料にアリイナーゼ遺伝子の解析を行ってきた。これまでにアリイナーゼ遺伝子の cDNA クローンを単離するのに成功しており、アリイナーゼ遺伝子のプロモーターの解析も行っている。また、タマネギ植物への遺伝子導入、つまりタマネギ形質転換体の作製の成功例は世界的に見ても数少ないが、これについても研究を行っており、形質転換系の確立に取り組んでいる<sup>5)</sup>。形質転換植物を作製するには遺伝子が導入された細胞より植物体を再生する必要があるが、この時重要なのはサイトカイニンとオーキシンの濃度とその比である。平成 14 年度までに、我々はタマネギのカルス細胞から植物体を再生するのに成功した。また選択形質として、カナマイシン耐性よりもハイグロマイシン耐性の方が選択効率が高いことがわかってきた<sup>6)</sup>。そこで昨年度は、35S プロモーターと呼ばれる植物細胞で高発現を誘導するプロモーターに Green Fluorescent Protein の遺伝子と  $\beta$ -Glucuronidase 遺伝子を融合させた 35S::GFP::GUS 融合遺伝子をハイグロマイシン耐性の遺伝子と連結させて、タマネギに形質転換する実験を行った<sup>7)</sup>。本年度は、得られた植物体を培養してレポーター遺伝子の発現を調べた。

タマネギの鱗莖葉細胞の大部分は液胞が占める。一般に液胞は老廃物の集積場のように考えられがちであるが、タマネギの鱗莖細胞の場合、アリンがここに蓄えられているなど、貯蔵庫としての機能があると考えられる。発芽時に必要なエネルギー源やその他の代謝産物もここに貯蔵されているものと考えられる。液胞に細胞内で合成されたタンパク質を局在化させるシグナルが存在すると考えられているが、これまでのところその配列は明らかにされていない。シロイヌナズナで液胞膜に局在するタンパク質の遺伝子 *AtMTP1* が報告されている<sup>8)</sup>。この遺伝子の産物は液胞膜を 6 回貫通するため、融合させた

い遺伝子の挿入部位を操作することによって液胞膜の内側にも細胞質側にも配置することができると考えられる。シロイヌナズナの *AtMTP1* の遺伝子産物がタマネギの細胞に於いても液胞膜上に局在するかどうかについても調べた。

## 材料と方法

### 形質転換タマネギの栽培

形質転換を行ったタマネギカルスを昨年度の方法を引き継ぎ、培養した<sup>9)</sup>。以下に形質転換体作製と培養の方法を簡単に説明する。基本的に操作は無菌的に行い、培養は 24°C、蛍光灯連続照射下で行った。エタノールで滅菌したタマネギの種子を、2 mg/L の 2,4-D を含む MS 培地 (カルス誘導培地) 上で培養し、カルスを形成させた。カルス部分を切り取り、35S::GFP::GUS 融合遺伝子を植物形質転換用デスチネーションベクター上に持つアグロバクテリウム培養液中に浸した。このベクターは島根大学農学部中川強助教授から供与されたもので、融合遺伝子は pGWB6 というハイグロマイシン耐性を賦与するベクターに組み込まれている。これを Gene Pulser (Bio-Rad) を用いてアグロバクテリウム C58 株に導入した。2 mg/L 2,4-D と 10 mg/L アセトシリシリンゴンを含む MS 培地 (共存培地) 上で 3 日間暗所で培養し、形質転換を誘発した。カルスを 200 mg/L クラフォランで洗浄後、10 mg/L 2-ip、200 mg/L クラフォランを含む MS 培地 (除菌培地) 上で 1 週間培養した。その後、10 mg/L 2-ip、200 mg/L クラフォラン、25 mg/L ハイグロマイシン含む MS 培地 (再分化培地) 上で培養した。シュートが成長した時点で、200 mg/L クラフォラン、25 mg/L ハイグロマイシン含む MS 培地 (発根培地) に移し、発根を促した。十分に発根した再生植物体は、非滅菌の通常の土壌で生育させることができる。

形質転換の確認のため、融合遺伝子の発現の有無を調べた。発根し成長しているタマネギに培養瓶の外から、青色 LED (発光ダイオード) ランプ ((株) 美館, MC-L12B) からの励起光を照射して、550 nm 以下の波長の光を遮断するフィルター (ケンコー, YA3) を装着したデジタルカメラで撮影した。

### 遺伝子導入実験

*AtMTP1* クローンは名古屋大学生命農学研究科前島正義教授に分与して頂いた。大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換後、Flexi Prep DNA purification kit (Amersham) を用いてクローン DNA を精製した。10  $\mu$ g のクローンの DNA と 2 mg の金粒子を 50  $\mu$ L の TE 緩衝液中で混合し、エタノール沈澱する

ことによって、金粒子に DNA を吸着させた。遠心後、100  $\mu$ L のエタノールに懸濁した。遺伝子銃 IDERA ((株) タナカ、札幌) を用いて、一度に 5  $\mu$ L の金粒子懸濁液をタマネギ鱗茎葉の芯側の表皮細胞に打ち込んだ。24  $^{\circ}$ C で 20 時間培養後、表皮を剥がし、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX60) で観察した。

## 結果

### タマネギ形質転換実験

我々はこれまでタマネギ形質転換体を作製するための条件検討を行って来た。昨年度、これまでに行っ

たタマネギ形質転換の条件検討の結果に従って、タマネギに *35S::GFP::GUS* 融合遺伝子を導入する実験を行った。本年度は、タマネギ形質転換体作製実験を引き続き行った。用いた遺伝子は *35S* プロモーターと *GFP* 遺伝子と *GUS* 遺伝子を融合させた人工遺伝子である。*35S* プロモーターはカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターで、植物細胞内で高い発現を誘導する。*GFP* 遺伝子は Green Fluorescent Protein をコードする遺伝子で、この遺伝子産物は生きた細胞内でも励起光を照射すると緑の蛍光を発し、容易に検出することができること

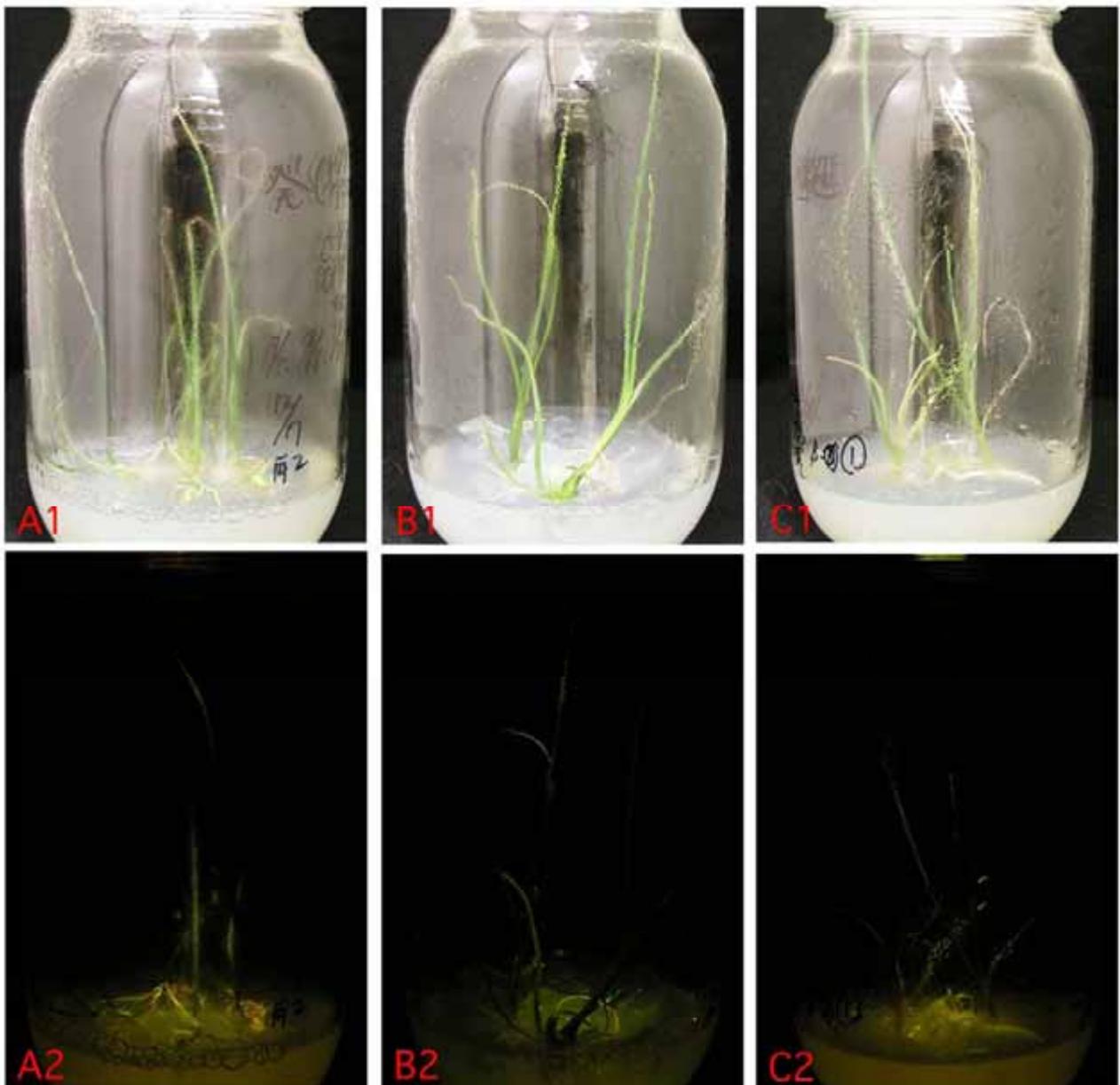


図 1. 形質転換タマネギの作製. 形質転換は材料と方法に記載したとおり行った. 胚軸に形成したカルスに *35S::GFP::GUS* 融合遺伝子を Ti プラスミド上に持つアグロバクテリウムを感染させ、形質転換を誘導した. 図に示したものは、ハイグロマイシンを含む培地上で地上部が分化し、すでに発根も進んでいるものである. A1 と A2, B1 と B2, C1 と C2 は同じ形質転換体で、A1, B1, C1 は白色光下で、A2, B2, C2 は青色 LED ランプの照明下で撮影したものである.

からレポーター遺伝子として用いられる。*GUS* 遺伝子は  $\beta$ -Glucuronidase をコードする遺伝子で、この遺伝子産物も酵素活性によって高感度に検出できるためレポーター遺伝子として用いられる。

昨年度は、オーキシシン (2,4-D) を含むカルス誘導培地上で形成したカルスの細胞に遺伝子導入を行って、除菌後、シュート (苗条; 茎や葉といった植物の地上部。) を誘導するためのサイトカイニン (2-ip) を含む再分化培地で培養した。本年度はその中で生長が見られるものを選抜し、引き続き培養した。2~3ヶ月間培養して、ある程度大きくなったものを根の形成を誘導するために、植物ホルモンを含まない発根培地に移した。発根を誘導して3~6ヶ月して、いくつかの植物体で発根が確認できた (図 1 A1, B1, C1)。選択効率の良いハイグロマイシンを含む培地で発根し生育しているため、この時点でおそらく形質転換であろうと考えられた。

次に融合遺伝子が確実に導入されているかどうかの確認であるが、植物の一部を切り取り、DNA を抽出して PCR を行う方法が考えられたが、まだ無菌培養中であるので植物の一部を切り取るのは断念した。その代わりに、GFP からの蛍光の有無で形質転換が起こっているかどうかを調べることにした。融合遺伝子が導入されて発現していれば、GFP::GUS 融合タンパク質が細胞内に蓄積し、これに励起光である青色光を照射すれば緑色の蛍光を発するはずである。培養瓶を暗所に置き、青色光を照射して、青色光を遮断するフィルターを取り付けたデジタルカメラで撮影した (図 1 A2, B2, C2)。35S プロモーターは鱗茎部分では強い発現を誘導しないことが知られているが、それでも緑の蛍光が認められた。青色光を照射しているので、植物の緑色部分からの反射光では無いと考えられる。特に白色の根の部分でも、緑色の光を発しているのも、これは GFP からの蛍光であると考えられる。この結果は融合遺伝子がタマネギ細胞内に導入され発現していることを示している。

**導入遺伝子発現実験**

シロイヌナズナの液胞膜に局在する *AtMTP1* 遺伝子産物がタマネギ細胞でも液胞膜に蓄積するかどうかを調べた。*AtMTP1* と *GFP* を融合させた遺伝子の DNA 分子を金粒子に吸着させた後、遺伝子銃 (パーティクルガン) を用いて、タマネギの鱗茎葉の表皮細胞に打ち込んだ。20 時間後に GFP からの蛍光で *AtMTP1* を検出した。図 3 から解るように、蛍光は細胞膜の内側で検出された。タマネギでは液胞が細胞質の大部分を占め、液胞以外の部分は

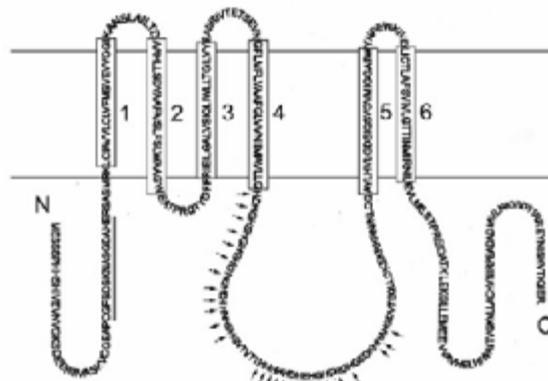


図 2. *AtMTP1* の予想される構造. *AtMTP1* は液胞膜を貫通する部位を 6 か所 (1~6 の□で囲まれた部分), 持つことからこのようなモデルが考えられる. N はタンパク質の N 末端を, C は C 末端を表す. 参考文献 7) より複写.

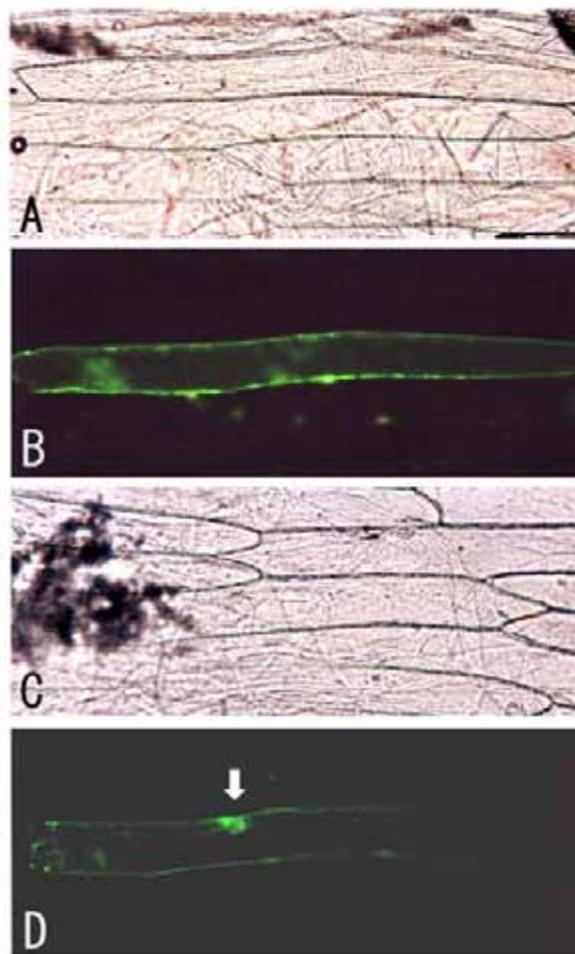


図 3. *AtMTP1* の遺伝子銃による導入実験. タマネギの鱗茎葉の表皮細胞に遺伝子銃を用いて *AtMTP1::GFP* 融合遺伝子の DNA を打ち込み、遺伝子産物が細胞内のどこに局在するかを調べた. A と B, C と D は同じ視野の細胞を観察したもので、A と C は明視野観察, B と D は蛍光観察. □は核領域を表す.

細胞膜のすぐ内側に薄層状態になっているのが観察されている。細胞核は細胞膜付近に存在するが、核を中心に物質輸送の経路が張り巡らされている。こ

のため、核も液胞膜によって被われているが、液胞膜が複雑に入り組んだ状態となる。その結果核膜付近では GFP からの強い蛍光が見られた (図 3、 $\square$  に示された部分)。GFP の観察結果は液胞膜の分布状態と良く一致し、タマネギ細胞でも AtMTP1 は液胞膜上に局在することを示している。

## 考察

我々はタマネギに有用物質を生合成させる系を開発するために研究を進めてきた。これまでの成果として、タマネギカルスから植物体を再生するホルモン条件を確立し、ハイグロマイシンのタマネギにおける有効性を確認することができた。この結果を踏まえて、*GFP::GUS* レポーター融合遺伝子を材料にしてタマネギ形質転換実験を行った。昨年度に得たシュートが出かけていたカルスを、本年度はハイグロマイシンを含む再分化培地でさらに培養し、そこで生長したものを発根培地に移すことによって発根を誘導することができた。現在、ほぼ完全な植物体に再生しているが、脆弱であるため非滅菌状態に置くにはまだ早いと判断される。これまでほぼ密封状態で培養されてきた植物であるので、非密封の状態に置くには十分に生長させる必要がある。今後、1-2ヶ月のあいだには通常の土壌に移し換えることができるのではないかと考えている。

形質転換体であることをもっとも簡単に調べる方法は、この場合、GFP からの蛍光を調べることである。今回はデジタルカメラで撮影してみたが、GFP の発光を精確に観察するには蛍光顕微鏡を用いる必要がある。今後、十分成長したら一部を切り取り、切片を作製するなどして GFP からの蛍光を確認する予定である。GUS 活性を調べるのも一つの手段であるが、この場合も植物体の一部を切り出す必要がある。最終的には PCR 法により、遺伝子の存在を確認しなければならない。

すでに形質転換を始めてから1年半が経過しているが、順調に行けば今年の秋には形質転換タマネギ (T1 世代) から、その次世代である種子 (T2 世代) が得られるものと予想される。形質転換体を作製するのに時間を費やしたが、一度できてしまえば、増やすのは容易いと考えられる。しかし、その前に T2 同士の交配によって純系を得る必要がある。

シロイヌナズナの液胞膜に局在する AtMTP1 がタマネギでも液胞膜に局在することが確認できた。このタンパク質は6回膜を貫通し、細胞質側に露出する部分と液胞側に露出する部分がある。これまでのところ、どの部分が液胞側でどの部分が細胞質側であるか分かっていないが、それが確認されれば、

液胞側に露出する部分に例えば、PHB を合成する酵素の遺伝子、*phbA*、*phbB*、*phbC* を組み込めば、一度の形質転換で3つの遺伝子を導入し、その産物を液胞内で働かせることができる可能性もある。アリナーゼ遺伝子は鱗茎細胞で強く発現していることが知られている。昨年度の研究でアリナーゼのプロモーターにより *GFP* 遺伝子をタマネギ細胞で発現させることに成功した。アリナーゼプロモーターの下流に先のような構成を持つ遺伝子を配置すれば液胞内で PHB を蓄積させることができると考えられる。残念ながら、そのような人工遺伝子を作製するに至らなかったが、本研究によってタマネギ形質転換系の確立、高発現を誘導するプロモーターの確認、有用物質を合成する材料が蓄積していると考えられるタマネギの液胞への輸送のガイドとなる遺伝子の検証が行われ、将来における研究の発展の基盤を整備することができたと言える。そのような意味で非常に意義があったと評価できる。今後は、これまでに得られた個々の方法と材料を組み合わせ、発展していくことを期待する。

## 謝辞

本研究は神奈川大学総合理学研究所産学共同研究助成を受けて行われました。お礼申し上げます。

## 文献

- 1) Van Damme EJ, Smeets K, Torrekens S, Van Leuven F and Peumans WJ (1992) Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *Eur. J. Biochem.* **209**: 751-757.
- 2) Do GS, Suzuki G and Mukai Y (2004) Genomic organization of a novel root alliinase gene, ALL1, in onion. *Gene* **325**: 17-24.
- 3) Saegusa H, Shiraki M, Kanai C and Saito, T (2001) Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol* **183**: 94-100.
- 4) Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, Sugiyama A and Saito T (2003) Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol* **185**: 3485-3490.
- 5) 上西愛子, 野村研, 大矢武志, 北 宜裕 (2002) 赤タマネギ '早生湘南レッド' における初生根端カルスからの再生体誘導. *神奈川農総研研究報告 第142号*. pp.57-61.
- 6) 安積良隆, 田島邦弘, 森川真吾, 宮沢 哲, 湯村貴文, 竹田光宏, 鈴木秀穂, 上西愛子, 北 宜裕 (2002) 植物工場を目指したタマネギ形質転換系の確立. *神奈川大学総合理学研究所年報 2002*. pp.99-102.
- 7) 安積良隆, 齋藤光実, 松本佳代, 北 宜裕, 上西愛子,

野村研 (2003) 遺伝子組換えタマネギに生分解性プラスチックを生合成させる試み. *神奈川大学総合理学研究所年報 2003*. pp.133-140.

8) Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura

T, Nakagawa T and Maeshima M (2004) Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1749-58.

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## アールヌーボー調画像生成のための一手法

木元 宏次

### A Technique for Generating Art Nouveau Style Images

Hirotsugu Kimoto

Department of Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan  
E-mail : stella@info.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** We describe a technique for generating Art Nouveau style images using a non photorealistic rendering method. Assuming a two-dimensional image to be an input, we aimed to synthesize it into an Art Nouveau style image referring to an actual Art Nouveau work image. First, an outline image of an input two-dimensional image and the histogram were created. In the same way, those of an actual Art Nouveau work image were also created. Next, applying a technique to level a histogram, the outline image's histogram of the input two-dimensional image was matched to that of the Art Nouveau work image. The modified outline image was regarded as a transparency filter, and synthesized with the original input two-dimensional image. Although some problems remained, we were able to create some good Art Nouveau style images.

**Keywords:** non photorealistic rendering, Art Nouveau, image processing, outline image, histogram matching

#### 序論

コンピュータグラフィックス(CG)の研究分野では、写真のようなリアルな画像生成を目標とするフォトリアリスティックレンダリング(PR)の技術研究が盛んに行われてきた。しかし、近年、リアルでない画像生成を目標とするノンフォトリアリスティックレンダリング(NPR)と呼ばれる技術研究も数多くなされてきている<sup>1)</sup>。

絵画やイラストなど、リアルでない画像は、一般的に、シーンを強調あるいは省略して表現されている。そのような画像は、用途や目的によっては、リアルな画像よりも有効な場合がある。また、芸術性の面から考えても、リアルさを追求するだけでは表現力を狭くするばかりである。NPRの研究が盛んになってきたのは、その重要性が強く認知されるようになったからといってよい。

これまでに、油彩画調、水彩画調、ペン画調などのさまざまな表現を実現する技法、あるいは、ある特定の画家や流派を表現する技法が考案されてきている。しかしながら、まだ十分研究がなされていない表現分野もあり、アールヌーボー調の絵画(イラ

スト)もその1つである。

本研究は、アールヌーボー調の画像を生成する一手法を提案するものである。2次元画像を入力画像とし、実際のアールヌーボー作品画像を参照して、アールヌーボー調画像に変換することを目標とする。

#### 方法

##### アールヌーボー調画像の生成

アールヌーボー作品画像を図1に示す。アールヌーボー作品の特徴の一つとして、輪郭線が強調されていることがあげられる。

まず、入力2次元画像(図2)から、特徴抽出フィルタを用いて輪郭線画像(図3)とそのヒストグラム(図4)を求める<sup>4,5)</sup>。同様にして、アールヌーボー作品画像(参照画像と呼ぶことにする)から、輪郭線画像とそのヒストグラム(図5)を求める。

次に、ヒストグラム平坦化の手法を応用し、図4のヒストグラムを図5のヒストグラムにマッチングさせる。この操作により変換された入力2次元画像の輪郭線画像を図6に示す。図6の輪郭線画像を透



図 1. アールヌーボー作品画像<sup>3)</sup>.

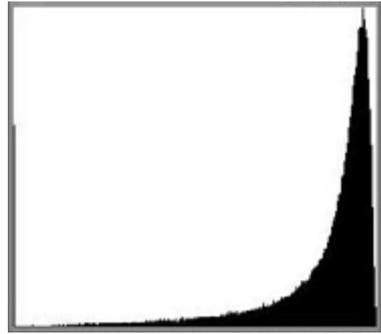


図 4. ヒストグラム (入力 2 次元画像).



図 5. ヒストグラム  
(アールヌーボー作品画像).



図 2. 入力 2 次元画像<sup>3)</sup>.



図 6. ヒストグラム変換後の輪郭線画像  
(入力 2 次元画像).



図 3. 輪郭線画像 (入力 2 次元画像).



図 7. アールヌーボー調画像.

明度フィルタとみなし, 入力2次元画像と合成してアールヌーボー調画像を生成する(図7)。

### 結果と討論

本手法を用いて生成した画像を以下に示す。

図8と図10が入力2次元画像, 図9と図11がそ

れぞれ本手法で生成した画像である。どちらの場合も, 参照画像には図1の画像を用いている。

アールヌーボー調の画像生成のための一手法を考案した。図7, 図9, 図11の結果から, 現段階で, ある一定の成果を得ることができたと考えている。しかしながら, 本手法ではまだ十分満足の行かない



図8. 入力2次元画像(その1)<sup>2)</sup>.



図9. アールヌーボー調画像(その1).



図10. 入力2次元画像(その2)<sup>2)</sup>.



図11. アールヌーボー調画像(その2).



図12. 入力2次元画像(その3)<sup>2)</sup>.



図13. アールヌーボー調画像(その3).



図14. アールヌーボー調画像(その3).  
(ヒストグラム変換未処理).

結果が出てしまう場合もある。以下にその例を示す。図 12 が入力 2 次元画像，図 13 が本手法を用いて生成したアールヌーボー調画像である。図 13 をみると，輪郭線の強調についてはよい結果が出ているが，一方，画像全体にわたって多量のノイズが発生してしまっている。特徴抽出フィルタを用いて輪郭線画像を生成するときに，まず，ノイズが入り，ヒストグラム変換の処理でさらにそのノイズが強調されてしまうことが考えられる。画像のノイズ除去によく利用されるメディアンフィルタを適用することも試みたが，現段階では良好な結果を得ることができなかった。

図 14 は，本手法のヒストグラム変換処理のみを行わずに画像生成を行ったものである。図 13 と比較すると，輪郭線の強調は不十分ではあるが，ノイズの発生については許容範囲に収まっていると考えられる。

まずは，輪郭線画像のヒストグラムを変換する際

に，輪郭線の強調はそのまま極力ノイズの発生を抑える手法を開発することが重要課題である。また，将来的には，本手法を発展させることで，アールヌーボー調の画像生成だけでなく，さまざまな絵画調，イラスト調画像の生成が統一的に可能になることを目指している。

## 文献

- 1) 日塔雄一，上埜友子，中丸幸治，大野義夫 (2003) 体系化を目指した絵画風の画像生成. *映像情報メディア学会冬季大会予稿 CD-ROM*.
- 2) 情報処理推進機構：教育用画像素材集. <http://www2.edu.ipa.go.jp/gz/>
- 3) The USC-SIPI Image Database. <http://sipi.usc.edu/database/>
- 4) 酒井幸市 (2002) *デジタル画像処理入門*. CQ 出版社，東京.
- 5) 末松良一，山田宏尚 (2002) *画像処理工学*. コロナ社，東京.

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## ナノ細孔をもつ光・酸化および水素化触媒の構築と地球環境改善への展開

森 和亮<sup>1,2</sup> 加藤知香<sup>1</sup>

### Novel Microporous Metal Carboxylate Complexes: Synthesis and Heterogeneous Catalysis

Wasuke Mori<sup>1,2</sup> and Chika Kato<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: wmori@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Novel microporous rhodium(II) carboxylate polymer complexes having metalloporphyrin, Rh<sub>2</sub>[MTCPP] (M = H<sub>2</sub> 1, Cu<sup>2+</sup> 2, Ni<sup>2+</sup> 3, Pd<sup>2+</sup> 4) (H<sub>2</sub>TCP = 4,4',4''-(21*H*,23*H*-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis benzoic acid), were synthesized and completely characterized by elemental analysis, TG/DTA, magnetic susceptibilities, FT-IR, DR-UV-vis, XRPD, BET analysis, and nitrogen adsorption measurements. These complexes possess carboxylate bridged dinuclear rhodium(II) sites and mononuclear copper(II), nickel(II), and palladium(II) centers in the porphyrin ring to form uniform micropores of ca. 5.0 Å. Furthermore, they show high surface areas and high nitrogen adsorption capacities, and act as efficient heterogeneous catalysts for hydrogenation of olefins at approximately 200 K. The unique bimetallic effects shown by metalloporphyrin and dinuclear rhodium sites in micropores were investigated by kinetic studies and hydrogen and propene adsorption-desorption measurements; the priority coordination of olefins onto metalloporphyrins and the intramolecular transfer of hydrogen from rhodium center to the olefin molecule coordinated onto metalloporphyrin remarkably reflects the catalytic activities in hydrogenation.

**Keywords:** rhodium carboxylate polymer complex, metalloporphyrin, microporous materials, olefin hydrogenation, adsorption property

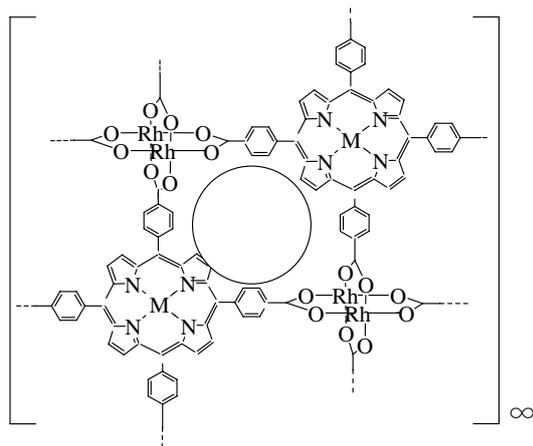
### 序論

不飽和炭化水素の水素化は重要な工業的プロセスの一つである。これまで様々な水素化固体触媒が報告されているが、分子レベルでの活性点構造の制御、不均一系水素化触媒反応での構造と反応性との相関については未だ不明瞭な点が多い。一方、我々はこれまで、フマル酸などのジカルボン酸を配位子としたロジウム(II)錯体が酢酸銅(II)一水和物型二核構造をとり、これが積層することにより均一な一次元細孔を形成することを見出してきた<sup>1)</sup>。また、最近ではポルフィリンを含むテトラカルボン酸ロジウム(II)錯体がオレフィンの水素化に対し高い触媒活性を示すことを見いだした<sup>2)</sup>。本研究では、Cu、Ni、Pd等の種々の金属を配位した金属ポルフィリンを含むテトラカルボン酸ロジウム(II)二核錯体 Rh<sub>2</sub>[MTCPP] (M = H<sub>2</sub> 1, Cu<sup>II</sup> 2, Ni<sup>II</sup> 3, Pd<sup>II</sup> 4)

(Fig.1)に注目し、それらの錯体の物性、水素化触媒活性について調べた。またポルフィリン中心金属と二核ロジウムサイトとのバイメタリック効果について検討したので報告する。

### 材料と方法

酢酸ロジウム(II)二量体二水和物と H<sub>2</sub>TCP (4,4',4''-(21*H*,23*H*-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis benzoic acid)、Cu<sup>II</sup>TCP<sup>3)</sup>、Pd<sup>II</sup>TCP<sup>3)</sup>、Ni<sup>II</sup>TCP<sup>3)</sup>のメタノール溶液を窒素気流下、オートクレーブ中で、180°Cに加熱することで紫色の粉末微結晶を得た<sup>3)</sup>。同定は元素分析、TG/DTA、DRUV、磁化率測定、表面積・細孔分布測定を用いて行った。窒素ガスによる吸蔵量測定は Faraday 型磁気天秤を用い、圧力(20 torr)、温度範囲(77-250 K)で行った。水素化

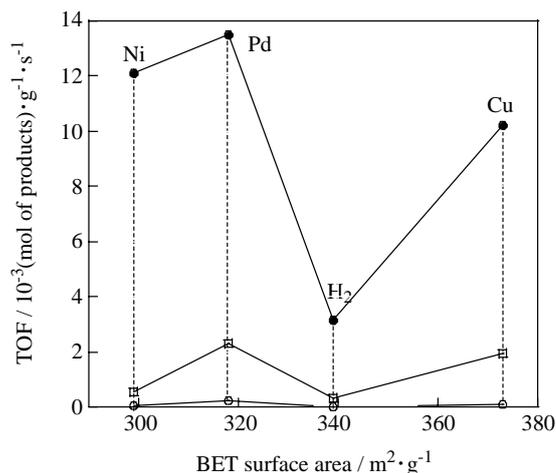


**Fig.1** Schematic drawing of an infinite two-dimensional lattice with uniform micropores.

触媒反応は閉鎖循環装置を用いて行った。分析はGC (Porapak Q)で行った。

## 結果と討論

Ar の等温吸着測定から得られた表面積と細孔径、液体窒素温度での  $N_2$  の等圧吸着測定から得られた最大吸蔵量を Table 1 に示す。また、プロペンの水素化触媒活性に対する表面積依存性を Fig. 2 に示す。前処理は室温で真空排気を行った。生成物はプロパンで選択率は 100%を示した。金属ポルフィリンで架橋したロジウム錯体は以前に報告した  $Rh^{II}_2[H_2T CPP]^a$  よりプロペンの水素化に対し高い触媒活性を示した。ポルフィリン中心金属による活性序列は  $Pd^{II} > Cu^{II} > Ni^{II}$  となり、触媒の活性は表面積に依存せず、ポルフィリン環中心の金属に依存することが分かった。また、 $Rh^{II}_2[H_2T CPP]$  と金属塩化物、あるいは金属ポルフィリンと酢酸ロジウムの物理混合物は低活性を示したことから、 $Rh^{II}_2[MTCPP]$  中の水素化反応に対するポルフィリン環中心と架橋二核ロジウムサイトとのバイメタリック効果は著しかった。本反応は、ポルフィリン環中心金属に優先的に配位したオレフィン分子へ Rh 2 核サイト上に生成した Rh-H 種が分子内水素移行することにより進行した。



**Fig.2** Surface area dependence of TOF for propene hydrogenation catalyzed by  $Rh^{II}_2$  [MTCPP]. (at 194 K ○; at 220 K; at 255 K ●).

**Table.1** Microporosity of complex 1-4 obtained by Aradsorption<sub>m</sub> and maximum amount of adsorbed  $N_2$ .

Complexes	Surface Area		Micropore Volume ( $cm^3/g$ )	Pore size (Å)	Amount of adsorbed $N_2$
	BET	Langmuir			
1	339(168)	416(206)	0.14	6.0	2.9 <sup>a</sup> (5.7) <sup>b</sup>
2	373(197)	456(241)	0.16	6.1	3.2 <sup>a</sup> (6.4) <sup>b</sup>
3	299(157)	361(190)	0.12	6.2	2.4 <sup>a</sup> (4.7) <sup>b</sup>
4	318(174)	387(212)	0.13	6.1	2.5 <sup>a</sup> (5.0) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>[ $m^2/g$ , ( $\times 10^3$  mol of Rh)], <sup>b</sup>mol/mol of Rh, <sup>c</sup>mol/mol of porphyrin.

## 文献

- 1) Mori W, Takamizawa S, Kato CN, Ohmura T and Sato T (2004) Molecular-level design of efficient microporous materials containing metal carboxylates: inclusion complex formation with organic polymer, gas-occlusion properties, and catalytic activities for hydrogenation of olefins. *Micropor. Mesopor. Mater.* 73: 31-46.
- 2) Sato T, Mori W, Kato CN, Ohmura T, Sato T, Yokoyama K, Takamizawa S and Naito S (2003) Microporous rhodium(II) 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl) tetrakisbenzoate. synthesis, nitrogen adsorption properties, and catalytic performance for hydrogenation of olefin *Chem. Lett.* 32: 854-855.
- 3) Sato T, Mori W, Kato CN, Yanaoka E, Kuribayashi T, Ohtera R and Shiraishi Y (2005) Novel microporous rhodium(II) carboxylate polymer complexes containing metalloporphyrin: synthesis and catalytic performance in hydrogenation of olefin *J. Catal.* (in press)

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 環境と健康を守るための水に関する科学的研究

西本右子<sup>1,5</sup> 天野 力<sup>1</sup> 井上和仁<sup>1</sup> 大石不二夫<sup>1</sup> 河村正一<sup>2</sup>  
関 邦博<sup>1</sup> 寺本俊彦<sup>3</sup> 峯岸安津子<sup>1</sup> 渡部徳子<sup>4</sup>

### Study on Water Science

Yuko Nishimoto<sup>1,5</sup>, Chikara Amano<sup>1</sup>, Kazuhito Inoue<sup>1</sup>, Fujio Oh-ishi<sup>1</sup>,  
Shoichi Kawamura<sup>2</sup>, Kunihiro Seki<sup>1</sup>, Toshihiko Teramoto<sup>3</sup>,  
Atsuko Minegishi<sup>1</sup> and Tokuko Watanabe<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> National Institute of Radiological Sciences, Chiba-City, Chiba 263-8555, Japan

<sup>3</sup> Natural Environment Research Inc. Ltd. jp. Shinjuku-ku, Tokyo 162-0801, Japan

<sup>4</sup> Aoyama Women College

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: y24moto@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** In this study, we intended to clarify the effect of various treatments such as magnetism, ultraviolet light irradiation and ultrasonic wave treatment on the acidic electrolyzed aqueous solutions and alkali halide aqueous solutions. The results have indicated that the available chloride concentration of acidic electrolyzed aqueous solution was decreased by these treatments. It was proved that these treatments increased hydroxyl radicals and bound water in the alkali halide aqueous solution.

**Keywords:** functional water, magnetic treatment, ultraviolet light irradiation, ultrasonic wave treatment, bound water

### 序論

21 世紀は水の時代ともいわれている。本研究は過去 2 年間に渡って実施してきた共同研究「健康に関する研究」の発展として、環境と健康を守るためのキーワードである水に焦点をおいている。本報告では環境及び生体に適合した機能水として医療・農業分野で一部実用化も進んでいる電解水及び超音波処理水、紫外線照射水、磁気処理水に関する分析化学的評価を中心に述べる。

### 材料と方法

試料は電解水のモデル溶液<sup>1)</sup>として、有効塩素量 0.3, 1.0 mmol/L、共存塩 (NaCl または KCl) 濃度 200mmol/L 以下、pH2.5, 10.5 の非電解調製水を使用し、飲用を考慮し NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> 水溶液(1~100mM)を用いた。磁気処理には、永久磁石 (NIKKENSURU-WATER magnet : Nd 磁石 : 430mT×12)、紫外線照射には、UV ランプ (SLUV-8 アズワン製, 254nm : 光源から 50mm で 2020 μW/cm<sup>2</sup>)、超音波処理には、超音波洗浄器 : US-1(井内盛栄堂 80W/38kHz) (A), USM(井内盛栄堂

100W/42kHz)(B), パリソナ超音波洗浄器 (井内盛栄堂 40W/48kHz)(C)を使用した。測定装置は、NIR(近赤外分光光度計) : Jasco V-570, ESR(電子スピン共鳴):X-BAND (JEOL RE2X), UV-VIS (Shimadzu Multispec1500), pH, ORP (酸化還元電位) : (CUSTOM 製 TES 1380), DO (溶存酸素) : (TOA DKK DOL-40), オゾン電極 (TOA DKK OZ-20), <sup>17</sup>O NMR (JEOL JNM EX 400)を使用した。各処理前後の測定値を比較し、<sup>17</sup>O NMR 測定では緩和時間(T<sub>2</sub>)を求めた。

### 結果と討論

電解水の有効塩素濃度は UV 法により検討した。その結果、電解助剤が NaCl, KCl のいずれの場合も処理による有効塩素濃度の低下がみられた。超音波処理では周波数、UV 照射では照射時間、磁気処理では濃度低下は磁場が減少率に関係していたが、共存塩(電解助剤)KCl の方が処理による変化が大きくみられた。また共存塩により有効塩素濃度の減少が抑えられることがわかった。

塩の水溶液では、処理により、水の束縛状態が弱くなり自由水が増加し、その程度は、処理の強度や時間に依存することがわかった。またヒドロキシラジカルが、各処理により増加するが、増加の程度は塩濃度に伴い減少することがわかった。

## 文献

- 1) 岩沢篤郎, 中村良子, 井上 啓, 丹羽友和, 西本右子(2004)強酸性電解水の殺菌効果に対する pH 及び共存塩濃度の影響. *防菌防黴誌*. **32**: 301-306.
- 2) 西本右子, 井上 啓(2004)電解水の安定性に対する pH および温度の影響. *機能水研究*. **2**: 71-74.
- 3) 岩沢篤郎, 中村良子, 重山かの, 丹羽友和, 西本右子(2002) 強酸性電解水の有効塩素測定法. *防菌防黴誌*. **30**: 627-633.
- 4) 岩沢篤郎, 中村良子, 丹羽友和, 西本右子 (2002) 強酸性電解水の殺菌効果に対する pH の影響. *防菌防黴誌*. **30**: 635-643.

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 光ファイバー分光器を用いた海中光環境の測定

柴田達矢<sup>1,2</sup> 北島正治<sup>1</sup> 鈴木祥弘<sup>1</sup>

### Determinations of light spectrums under sea ice with fiber optics spectrometer

Tatsuya Shibata<sup>1,2</sup>, Masaharu Kitashima<sup>1</sup> and Yoshihiro Suzuki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: roundrobin200@yahoo.co.jp

**Abstract:** A fiber optics spectrophotometer (USB2000, OceanOptics, USA) was applied to measure light conditions under sea ice at Saroma-ko Lagoon, Hokkaido Japan, in February and March 2005. One end of a 10 m quartz fiber optics (QP200-2-UV-VIS, OceanOptics, USA) fixed under sea ice led light to the other end, and the spectrophotometer determined the spectrum of the light at the other end on the sea ice. Signals from the spectrophotometer were normalized with the calibration light source (DH2000CAL, OceanOptics, USA) and a program (OOIBase, OOIIrad, OceanOptics, USA) and were determined as irradiance ( $\text{W m}^{-2} \text{nm}^{-1}$ ). Without the cosine-collector for collecting the light from 180 degrees in front, the fiber optics collected light from a narrow range and showed quite different spectrums from those determined with the cosine-collector. Spectrums with a peak at 570 nm were determined with the cosine-collector and corresponded well with the spectrums often determined at near coastal areas. Photon flux densities ( $\mu \text{mol photons s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{nm}^{-1}$ ) were estimated from spectrums determined with the cosine-collector and correlated well ( $R^2=0.98$ ) with those determined with the quantum sensor (LI-193, LI-COR, USA). These results showed that fiber optics spectrophotometer could determine the light conditions under sea ice both qualitatively and quantitatively.

**Keywords:** fiber optics spectrophotometer, light condition, spectrum, sea ice, photon flux density

## 序論

水界では基質である水や溶存物質、懸濁粒子の吸収により、光強度や光質が大きく変化する<sup>1)</sup>。また、海域や季節により異なる溶存物質や懸濁粒子が作り出すさまざまな光環境に対応して、植物プランクトンは光合成を行っている<sup>2)</sup>。このため、水界の主要な一次生産者である植物プランクトンの光合成・一次生産を考える上で、光強度と光質に着目して水界の光環境を測定することが不可欠である。

水界の光強度の測定には 400 nm から 700 nm の波長範囲の光合成有効照射(PAR)に対して波長に応じた感度を持つ光量子センサーがしばしば用いられる。単純な構造を持つ光量子センサーの気密を保つことは容易であり、市販のセンサーでも水深 350 mまで測定が可能である。このセンサーを用いるこ

とで多くの測定がなされてきた<sup>3)</sup>。一方、光質の測定に用いられる分光器は複雑な構造を持ち、気密を保ったまま水中で測定を行うことは難しい。このため、一定の波長範囲の光を透過する干渉フィルターをつけた光量子センサーによる測定や採水された海水の光吸収特性から、間接的に海中の光質が推定されてきた<sup>4)</sup>。しかし、高い精度で光質を測定するためには、分光器を直接用いることが不可欠である。

分光器を気密し海中に投入するかわりに光ファイバーの先端を投入しそこから導かれた光を分光器で測定することができれば、より簡便に海中の光質測定に分光器を用いることができる。本研究では光ファイバー分光器を用いた新しい方法について、正確な測定が可能かどうか詳細に検討した。

## 方法

2005年2月16日から3月5日まで北海道サロマ湖の観測地点(44°07'41"N, 143°57'423"E)において実験を行った。海水を50 cm × 70 cm の方形に切除し(測定穴)、ここから光ファイバーと光量子センサーを海中に投入した。測定穴の周囲5 m × 5 m の氷上面は測定に影響が出ないよう厳密に保全した。孔径200 μm、全長10 m の石英ファイバー(QP200-2-UV-VIS, OceanOptics, USA)を接続した光ファイバー分光器(USB2000, OceanOptics, USA)を用いて、空気中および海水中の光強度と光質の測定を行った。分光器からの300 nm から800 nm の範囲で0.3 nm 毎に得られる出力を校正用重水素タングステンハロゲンランプ(DH2000CAL, OceanOptics, USA)とソフトウェア(OOIrad, OceanOptics, USA)を用いて、放射照度( $W m^{-2} nm^{-1}$ )に変換した。さらに、各波長の光量子のエネルギーから、放射照度を波長毎の光量子流量密度( $\mu mol photons s^{-1} m^{-2} nm^{-1}$ )に変換した。開口部前面180°の光を集めるコサインコレクター(CC-3, OceanOptics, USA)の効果を調べるため、コサインコレクターを装着した光ファイバー開口部を固定台に固定し、太陽方向とそこから一定の角度に向けて測定した。その結果を、コサインコレクターを装着しない場合と比較した。コサインコレクターを装着した開口部を鉛直上向きに海水下面に固定して、光強度と光質の測定を行った。同時に、光量子センサー(LI-193, LI-COR, USA)を鉛直上向きに海水下面に固定し、データロガー(LI-1400, LI-COR, USA)に記録したPARの光強度と比較した。

## 結果と討論

光ファイバー開口部の方向を太陽の方向から変化させて測定した(図1)。コサインコレクターを装着せずに開口部を太陽方向に向けると、光が強すぎて測定できなかった。鉛直方向に対して同じ角度を保ったまま、東西に45°角度を変化させると、500 nm の光強度( $\mu mol photons s^{-1} m^{-2} nm^{-1}$ )は0.034と0.026となった。さらに角度を変化させ太陽方向から90°にすると、0.022と0.019となり、180°にすると、0.020となった。コサインコレクターを装着して測定を行うと、開口部を太陽方向に向けても測定が可能であり、500 nm の光強度は6.1となった。東西に45°角度を変化させると、4.9と3.7となった。90°にすると、1.22と0.89となり、180°にすると、0.87となった。コサインコレクターを装着せずに測定すると、狭い範囲からの光しか受光できない。このため太陽方向では測定できないほどの強い光強度

を示すがそこから離れると非常に弱い光強度を示し、45°角度を変えると装着した場合のわずか0.7%となった。一方、装着して測定すると前面180°の平均した光を受光することとなる。このため、太陽方向では比較的弱い光強度を示すが、そこから離れても著しく弱まることはなかった。光合成生物の光合成には光は太陽からの直達光とともに散乱光も利用される。このため、光強度の測定には前面180°の散乱光を集めるコサインコレクターや全後面360°の散乱光を集めるコレクターが利用される<sup>9)</sup>。コサインコレクターの装着の有無により測定結果が全く異なることから、コサインコレクター無しでは、光ファイバーを利用した光強度の測定はできないことがわかった。

光ファイバー開口部を海中に沈め、1 m から湖底までの各深度の波長毎の光強度( $\mu mol photons s^{-1} m^{-2} nm^{-1}$ )を測定し、コサインコレクターが光質の測定に及ぼす影響を検討した(図2)。コサインコレクターを装着せずに測定すると、水深1 m で得られた570 nm のピークの強度は0.03であり、装着して測定した570 nm 強度の20%にすぎなかった。また、コサインコレクターを装着せずに測定すると、570 nm 付近のピークに加え、480 nm 付近にほぼ同じ高さのピークが認められ全く異なるスペクトルを示した。天頂方向からの光は海水、海水を透過する光路長が短く太陽光の青色成分が残りやすい。コサインコレクターを装着せずに測定すると、この透過光を反映したスペクトルを示すようである。長い光路を抜けて海水、海水中の溶存物質、懸濁粒子に青色成分を強く吸収されている上面180°からの光とは全く異なっていた。コサインコレクターを装着せずには、光質の測定も難しいことがわかった。

3月1日にコサインコレクターを装着した開口部を海水下面に鉛直上向きに固定し測定した。波長毎の光強度からPAR光強度の時間変化を算出した(図3)。光量子センサーを用いて、同時に測定した光強度と比較した。分光器の結果が瞬間値で、光量子計の結果が1分間の平均値であることから、分光器に大きな変動が認められるものの日変化はほぼ一致した。同時刻に測定した分光器と光量子計の結果を比較すると、高い相関関係( $R^2=0.98$ )が認められた。分光器の値が光量子計の値の6.7倍となるのは、氷上の雪の深さが異なるためである。空気中の測定結果では分光器で測定されたPARの光量子流量密度は、光量背センサーの1.3倍の値であった。光量子センサーの再校正により、この値は完全に一致すると思われる。

これらの結果は、光ファイバーの先端を海中に投

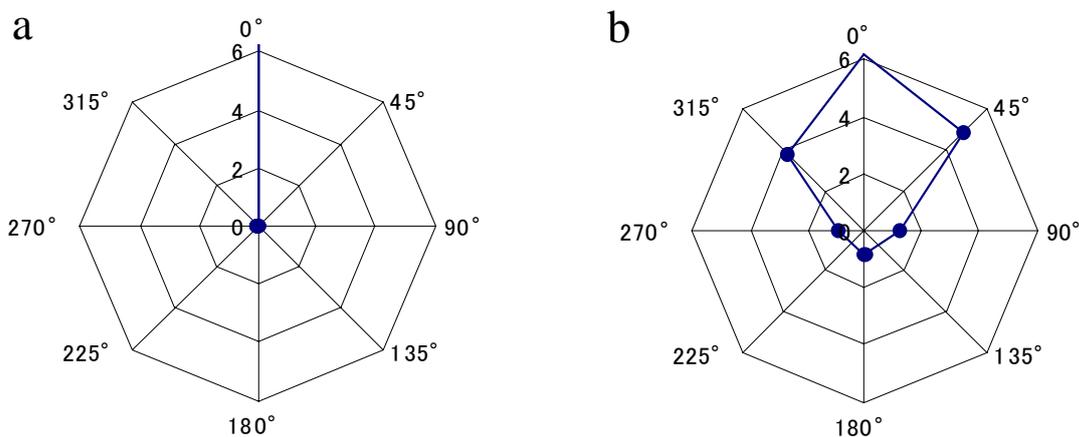


図1. 太陽方向から一定の角度に光ファイバー開口部を向けて測定した 500 nm の光強度( $\mu \text{ mol photons s}^{-1}\text{m}^{-2}\text{nm}^{-1}$ ).

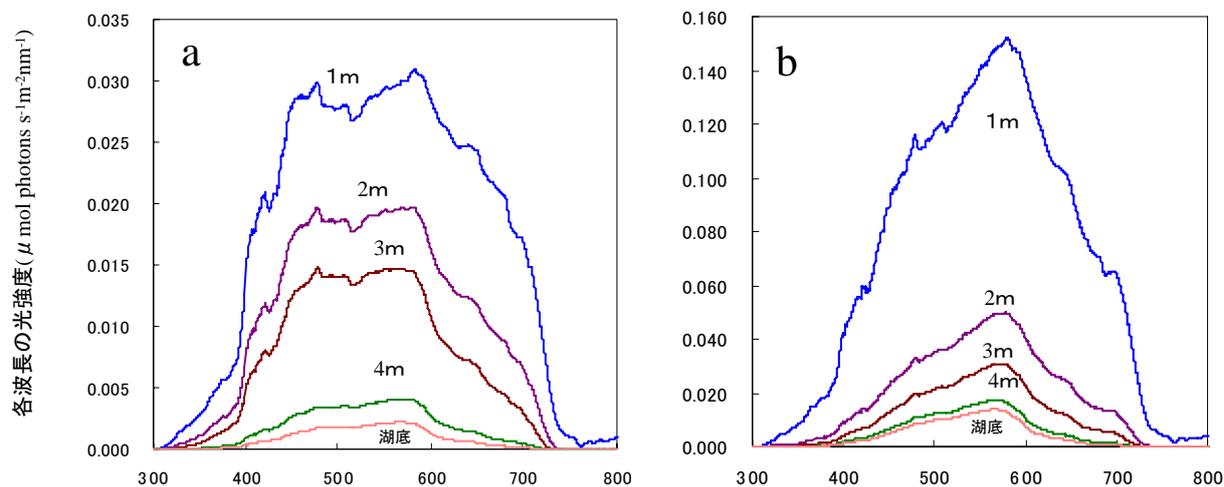


図2. 海水下で測定された鉛直上面方向からの光スペクトル. a. コサインコレクターを装着せずに校正を行い測定. b. コサインコレクターを装着して校正を行った後測定.

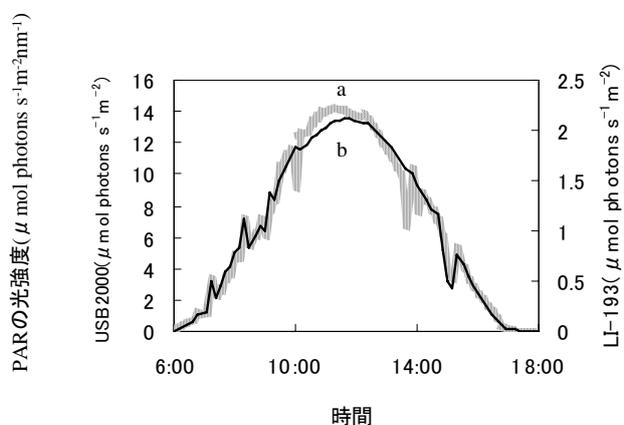


図3. 3月1日の海水下面の光合成有効照射 (PAR) の光強度の日変化. a. コサインコネクタを装着した光ファイバー分光器(USB2000,OceanOptics,USA)で測定. b. 量子センサー(LI-193, LI-COR,USA) で測定.

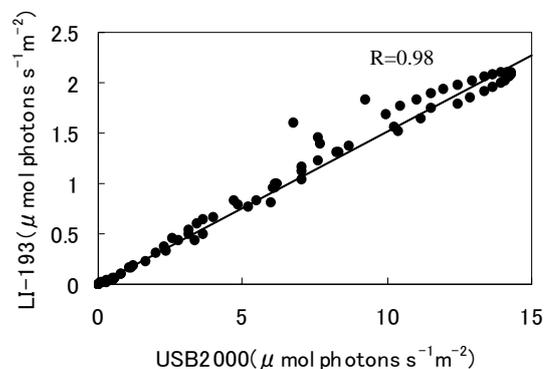


図4. 3月1日の同時刻にUSB2000とLI-193で測定された光量子流量密度の比較. 1分毎のデータをプロットした.

入することで、海中の光質を高い波長分解能で直接測定できることを明らかにしている。また、光合成生物に重要な光環境を測定するためには、コサインコレクターの装着が不可欠であることが明らかになった。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力をいただいたサロマ湖養殖漁業協同組合の前川公彦氏、阪口耕一氏に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) Kirk JTO (1980) Spectral absorption properties of natural waters: Contribution of the soluble and particulate fractions to light absorption in some inland waters of south-eastern Australia. *Australian J. Marine Freshwater Res.* **3**: 287-296.
- 2) Kirk JTO (1994) *Light & Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge
- 3) Kirk JTO (1977) Use of a quanta meter to measure attenuation and underwater reflectance of photosynthetically active radiation in some inland and coastal southeastern Australian waters. *Australian J. Marine Freshwater Res.* **28**: 9-21.
- 4) Hojerslev NK (1975) A spectral light absorption meter for measurements in the sea. *Limnol. Oceanography.* **20**: 1024-1034.
- 5) Booth CR (1976) The design and evaluation of a measurement system for photosynthetically active scalar irradiance. *Limnol. Oceanography.* **21**: 326-336.

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## ファイトレメディエーションへの利用を目指した ケナフ (*Hibiscus cannabinus* L.) の鉛汚染土壌への順化の解析

澤上航一郎<sup>1,3</sup> 大石不二夫<sup>2</sup> 黒澤祥子<sup>2</sup> 鈴木祥弘<sup>1</sup>

### Acclimations of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) to Pb in a Polluted Soil

Koichiro Sawakami<sup>1,3</sup>, Fujio Ohishi<sup>2</sup>, Shoko Kurosawa<sup>2</sup> and Yoshihiro Suzuki<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: r200470220@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Seeds of kenaf (*H.cannabinus*) could germinate and grow in the soil polluted with 5310 ppm Pb, although their growth was strongly inhibited at first. After the expansion of the third and fourth leaves, older leaves died and fell, followed by the expanding new leaves. During the first 30 days, the numbers of leaves did not increase at a same rate as the control plants growing in soil without pollution. The numbers of leaves were only 9.0 after 30 days and the dry weight of the leaves and stems (upper ground biomass hereafter) was 0.26 g, which was 3.3% of the biomass of the control plants. After the first 30 days, the plants on the polluted soil did not lose their older leaves and began to increase the numbers of leaves. The plants then increased their upper ground biomass rapidly. The upper ground biomass was 59 g after 69 days, which was 32% of the control biomass. These results strongly suggest that seedlings of kenaf can tolerate and acclimate to soils highly polluted with Pb. Although their acclimations took a long period of time, 30 days, kenaf plants could grow normally after the acclimations. The concentrations of Pb in leaves, barks of stems and cores of stems measured by atomic absorption spectrometry were 0.204, 0.211 and 0.407 ppm, respectively. After the acclimations, kenaf accumulated Pb at concentrations lower than 1.0 ppm. Phytoremediation with kenaf is necessary to research acclimations.

**Keywords:** acclimation, kenaf, Pb, phytoremediation, polluted soil

### 序論

工場跡地の再利用などで、基準値を超える重金属や揮発性有機化合物による汚染が見つかることは少なくない。国内で汚染が明らかとなった土地だけでも32万箇所におよび、その浄化対策費用は13兆円に達すると試算されている<sup>1)</sup>。土壌汚染対策法の成立や、土壌環境調査機関の増加とともに、土壌汚染に対する関心が高まっている。

トリクロロエチレンをはじめとする揮発性有機化合物の除染には、旧来の物理的・化学的方法に加え、生物を用いる新しい方法(バイオレメディエーション)が、日本でも適用されつつある。環境中で微生物を用いて有機化合物を分解するバイオレメディエーション法は、土壌から低濃度の有機化合物を除

去するのに莫大なエネルギーと費用を必要とする物理的・化学的方法よりも、低いエネルギーと費用で除染が行えるものとして期待されている<sup>2)</sup>。

しかし、重金属の除染には微生物による分解法は利用できない。微生物を使って重金属化合物を可溶化または無毒化することは可能であるが、毒性がある元素自体を除去できないためである<sup>3)</sup>。元素自身を除去し、汚染土壌の除染を行うバイオレメディエーション法に、維管束植物を用いるファイトレメディエーションがある。ファイトレメディエーションでは、維管束植物の蒸散に伴う水の流れを利用して、汚染物質を植物体内に回収することで除染を行う。

これまで、ファイトレメディエーションでは、鉍

山に自生する重金属耐性植物が用いられてきた。しかし、概してバイオマスが小さい耐性植物では、大量の汚染物質を回収することは難しかった。その後さまざまな植物で汚染土壌に対する耐性が試験され、鉱山に自生する植物以外でも、重金属を有効に回収する例が見つかってきた<sup>9)</sup>。本研究では、一次生産速度および蒸散速度が高く、蒸散に伴う水や土壌からの物質移動量が大きいことが知られているケナフ (*H. cannabinus*) に着目し、ファイトレメディエーションへの利用を検討した。特に、汚染例の多い鉛汚染土壌でケナフを栽培し、鉛がケナフの一次生産速度および生産構造へ与える影響と、植物体内への蓄積を調べた。

## 材料と方法

神奈川大学平塚キャンパス敷地内圃場から採取した土壌と高濃度鉛汚染土壌 (スミコンセルテック株式会社より供与) の鉛濃度を測定し、植物の栽培に用いた。45 リットルのプラスチック容器に土壌を充たし、ケナフ (*H. cannabinus* L. cv. Evergrades41、釜野徳明 神奈川大学名誉教授より供与) の種子を各容器の 3 箇所 に 5 粒ずつ分散し、計 15 粒を播種した。気温 30℃、湿度 65%、陽光ランプとマイクロ波ランプによる 12 時間明期/12 時間暗期 (2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) の光条件に制御した人工気象室 (小糸工業株式会社) 内で栽培を行った。栄養塩類の不足により生長が低下しないよう各容器に化成肥料 (飼料作物配合 246 号、N:P:K=12:14:6、全国農業協同組合連合会) 15 g を与え、十分な灌水を行い土壌の乾燥を避けた。

播種 7 日後、各 5 粒から発芽した個体のうち、生長の良い 2 個体を残して間引きした。播種 30 日後と 69 日後に、各容器の 3 カ所から 1 個体、計 3 個体の地上部を層別に刈り取り、各層の葉 (光合成器官)、茎 (支持器官)、腋芽 (分裂器官) および蕾 (生殖器官) の生重量を測定した。さらに、60℃で 14 日間乾燥後 (DRYING OVEN、SANYO)、乾燥重量を測定した。

ケナフの葉、茎 (靱皮・芯) は灰化後、原子吸光分析法により鉛濃度を測定し、生長に伴う土壌鉛成分の植物体への吸収を求めた。

## 結果と討論

キャンパス敷地内圃場の土壌 (非汚染土壌) からは鉛は検出されなかったが、汚染土壌からは 5310 ppm の非常に高濃度の鉛が検出された。

ケナフ種子は播種後 2~3 日で発芽した。発芽後、子葉に続き本葉が数枚展開するまでは非汚染土壌と

汚染土壌の個体の生長に違いは認められなかった。種子に蓄えられた栄養に依存した生長には土壌の鉛の影響は小さいためと考えられる。

播種から 10 日目以降、第三・第四葉が展開した。この後、汚染土壌の個体では新しい葉の展開が始まると古い葉が黄色く変色し、さらに、新しい葉が完全に展開すると古い葉が落葉した。また非汚染土壌個体が次第に大きな葉をつけるようになったのに対し、汚染土壌個体の葉は小さなままであった。このため、汚染土壌個体の葉の枚数、総葉面積は増加せず、茎の伸長も非汚染土壌の個体に比べ著しく遅延した。第三・第四葉以降の葉は土壌中の栄養塩類に依存して光合成一次生産を始めたため、汚染土壌の鉛の影響が表れたと考えられる。葉の展開とともに同数の古い葉が枯死する生長の遅延は、栄養塩類が極端に不足した場合にも認められる<sup>9)</sup>。化成肥料を十分に与えているにも関わらず生じた生長の遅延は、汚染土壌からの栄養塩類の取り込みにも何らかの障害が生じていることを強く示唆している。また、植物体の根系が枯死することなく、地上部にしおれが生ずることもなかった。このため、土壌からの水の取り込みへの鉛の影響は小さいと考えられる。

播種から 30 日目のケナフ地上高は、非汚染土壌で 100 cm に達したのに対し、汚染土壌では 50 cm に過ぎず 50% であり (図 1)、葉の枚数も平均 15 枚に対して、平均 9.0 枚であった。支持器官 (茎) の生重量に対する光合成器官 (葉) の生重量の比は、非汚染土壌個体の 110% に対して、汚染土壌個体は 42% であった。汚染土壌個体の光合成器官が極めて小さいことがわかる。非汚染土壌個体の地上部の乾燥重量が、平均 7.7 g であったのに対し、汚染土壌個体の乾燥重量は平均 0.26 g で、非汚染土壌個体の 3.3% に過ぎなかった (表 1)。

播種 30 日以降、汚染土壌個体の古い葉の落葉が遅くなり、葉の枚数が増加した。この光合成組織の生長の再開は、ケナフの鉛汚染土壌に対する強い馴化能力を示唆していた。生長再開後、汚染土壌個体は急速に生長し、播種から 69 日目のケナフ地上部は、非汚染土壌個体では 180cm に対し、汚染土壌個体

表 1. ケナフの乾燥重量(g)

	葉	茎	腋芽	生殖	合計
30日後					
非汚染土壌栽培ケナフ	4.02	3.69	0.00	0.00	7.71
鉛汚染土壌栽培ケナフ	—	—	0.00	0.00	0.26
69日後					
非汚染土壌栽培ケナフ	13.79	40.00	3.26	2.11	59.16
鉛汚染土壌栽培ケナフ	5.31	13.01	0.73	0.01	19.05

は約 160 cm と非汚染土壌個体の 89%まで回復した(図 2)。支持器官(茎)の生重量に対する、光合成器官(葉)の生重量の比は、非汚染土壌個体の 48%に対し、汚染土壌個体でも 44%となり、地上高、葉/茎比ともに汚染土壌個体の光合成器官が非汚染土壌個体に近い生産構造を取りつつあることがわかる。さらに、非汚染土壌個体の地上部の乾燥重量が、平均 59 g であったのに対し、汚染土壌個体は平均 19 g で、非汚染土壌個体の 32%にまで回復した(表 1)。馴化後には、汚染土壌でもケナフは高い光合成・一次生産が維持されていることを示していた。

播種から 69 日目の汚染土壌個体の葉、茎の靱皮、茎の芯の鉛濃度は、それぞれ 0.204、0.211、0.407 ppm であり、植物 1 個体あたりの地上部全体で 5.7  $\mu\text{g}$  の鉛の吸収が認められた。毒性を持つ金属イオンには、銅、亜鉛、カドミウム、アルミニウムなど根に集積する金属イオンが多い。中でも鉛は茎や葉から非常に強く排除されることが知られている<sup>9)</sup>。本研究でもケナフ地上部の鉛濃度は低く、茎や葉から鉛が排除されていることが示された。今回は測定を行わなかったが、地下部根系へは高濃度で鉛が蓄積されている可能性もある。また、茎や葉からの鉛の排除を示すこれらの結果は、ケナフの鉛土壌への馴化機構が、発芽当初の栄養塩類を含む全ての金属イオンの排除から、鉛イオンの選択的排除への変化によることを示唆している。

茎・葉からの排除が鉛に比べ緩やかなカドミウムでは、汚染土壌から植物体への集積が知られており<sup>9)</sup>、ケナフも高い一次生産速度とともに汚染土壌からカドミウムを有効に回収する植物であることがわかっている。しかし本研究は、鉛汚染土壌からケナフの葉・茎への集積が一定量を超えないことを明らかにした。また、植物を使った汚染土壌からの鉛の回収を目指すファイトレメディエーションでは、地下部根系の解析が重要であることも本研究により強く示唆された。ファイトレメディエーションが活用される実際の汚染土壌の鉛濃度が、基準値前後のより低濃度であることを考えると、ケナフが鉛に対する高い順化能力を持ち、一定の鉛を集積することは、ファイトレメディエーションに有効な植物であることを示している。蒸散に伴う水の流れにより、根や根圏土壌への鉛の集積は今後の解析が必要である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力を賜ったスミコンセルテック株式会社の森田正氏、二見達也氏、西本研究室の西本右子助教授に深く感謝申し上げます。

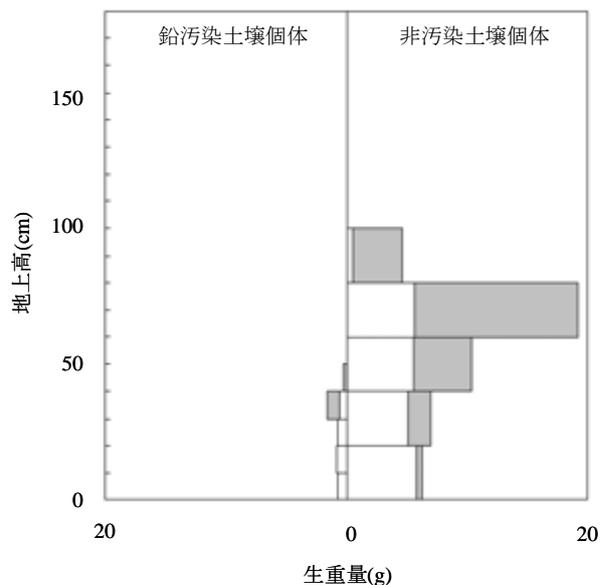


図 1. 播種 30 日後の生産構造. 地表からの高さごとの生重量を支持器官(白), 光合成器官(灰), 分裂・生殖器官(黒)に分けて測定した。

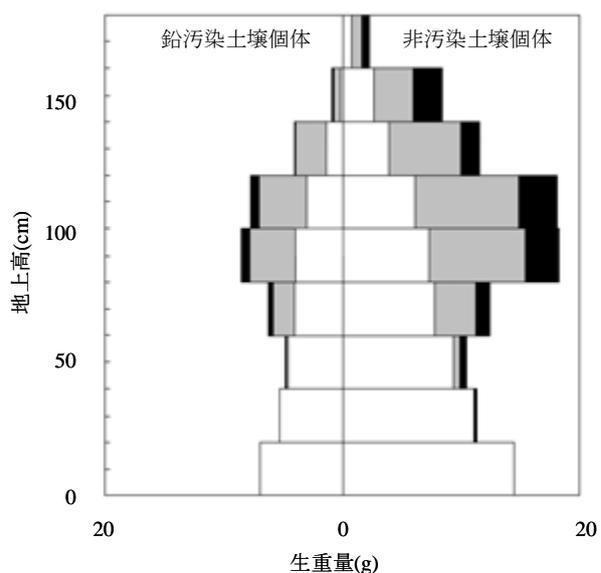


図 2. 播種 69 日後の生産構造. 地表からの高さごとの生重量を支持器官(白), 光合成器官(灰), 分裂・生殖器官(黒)に分けて測定した。

## 文献

- 1) 土壤環境センター編 (2000) 我が国における土壤汚染対策費用の推定—土壤汚染調査費用の推定—土壤汚染浄化費用の推定—. (社) 土壤環境センター.
- 2) Anderson WC (1997) バイオレメディエーションプロセスの種類と特徴, 第 3 章. バイオレメディエーション微生物による環境修復技術の実際. 軽部征夫監修 池上雄二, 角田英男訳 シュプリンガー・フェアラーク東京, pp. 22-171.
- 3) 大森俊雄 (2000) 重金属汚染の微生物除去, 第 8 章. 環境微生物学 環境バイオテクノロジー. (株) 昭晃堂. pp. 106-116
- 4) Schepers T (2003) Phytoremediation of heavy metals from soils. In: *Phytoremediation, Advance S in*

*Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 98-123.

- 5) Larcher W (1995) The utilization of mineral elements. In: *Physiological Plant Ecology*. Springer-

Verlag, Berlin. pp. 167-211.

- 6) Fitter AH and Hay RKM (1987) Ionic toxicity. In: *Environmental Physiology of Plants, 2nd ed.* Academic Press Inc, San Diego. pp.225-259.

■短 報■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## *Ralstonia eutropha* H16 の新規細胞内 3-ヒドロキシ酪酸オリゴマー分解酵素

小林照幸<sup>1,3</sup> 内野圭一<sup>1</sup> 安部智子<sup>1</sup> 齊藤光實<sup>1,2</sup>

### Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Ralstonia eutropha* H16

Teruyuki Kobayashi<sup>1</sup>, Keiichi Uchino<sup>1</sup>, Tomoko Abe<sup>1</sup> and Terumi Saito<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E. mail: kobayt43@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** *Ralstonia eutropha* H16 mobilizes intracellularly accumulated poly(3-hydroxybutyrate) with intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases. Different types of depolymerase, PhaZ1 and its homologs, account for the mobilization significantly but incompletely, and it is proposed that further unknown depolymerases or related enzymes complement the mobilization. A novel hydrolase was therefore investigated. The amino acid sequence of the intracellular 3HB-oligomer hydrolase of *Acidovorax* sp. SA1 and the genome sequence of *Ralstonia solanacearum*, a close relative of *R. eutropha*, revealed a candidate for the hydrolase gene. The DNA sequence of its hydrolase was used for the design of a pair of primers. With chromosomal DNA of *R. eutropha* as a template, these primers were used to amplify about a 1.3-kbp fragment including the equivalent gene, *phaZc*. Then the *phaZc* gene was cloned by Southern hybridization using the amplified DNA fragment as a probe. The hydrolase (PhaZc) was purified from *Escherichia coli* overexpressing *phaZc* and characterized. Immunoblot analysis revealed that PhaZc exists mainly in the cytosolic fraction of *R. eutropha*. PhaZc degraded various 3-hydroxybutyrate-oligomers at a high rate and artificial amorphous poly(3-hydroxybutyrate) at a lower rate. A *phaZ*-null mutation enhanced the deposition of PHB in the logarithmic phase in a nutrient-rich medium. PhaZc differs from the previously reported hydrolases in *R. eutropha* and is a novel type of intracellular 3HB-oligomer hydrolase, which participates in the mobilization of PHB along with other hydrolases.

**Keywords:** *Ralstonia eutropha* H16, poly(3-hydroxybutyrate), PHB, intracellular 3HB-oligomer hydrolase

## 序論

ポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は多くの細菌が細胞内に炭素/エネルギー源として蓄積するポリエステルであり、生分解性プラスチックとして知られている<sup>1)</sup>。PHB 蓄積菌は細胞内に PHB 分解酵素を持つ事が知られており、これまでにいくつかの細菌において PHB 分解酵素の精製、遺伝子のクローニングなどの報告がなされている。PHB 蓄積菌として最も研究されている。

*Ralstonia eutropha* H16 においては、PHB 分解

酵素である PhaZa1<sup>2)</sup> と、そのホモログである PhaZa2, 3, 4, 5<sup>3,4)</sup>、3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) オリゴマー分解酵素である PhaZb<sup>5,6)</sup> が見つかっている。PhaZa1 及び PhaZb については蛋白質の精製がなされており、どちらの酵素も PHB を分解するが PhaZb は効率よく 3HB オリゴマー を分解し、モノマーを生じる。これらの遺伝子の欠損株では PHB 蓄積量が上昇するが両方の遺伝子の欠損株においても PHB の分解が見られる。一方、*R. eutropha*

の細胞質中には PhaZa1、PhaZb とは異なる性質の PHB 分解酵素が存在する事が分かっている。これらの結果から、さらに別の PHB 分解酵素の存在が示唆されている<sup>9)</sup>。

*Acidovorax* sp. SA1 は PhaZb と異なるタイプの 3HB オリゴマー分解酵素を持つ事が報告されている<sup>9)</sup>。今回、このアミノ酸配列を基に BLAST search を行った結果、ゲノムプロジェクトが進行中である *Ralstonia* 属の細菌において類似したアミノ酸配列を持つ蛋白質が見つかった。この蛋白質は新規の 3HB オリゴマー分解酵素である可能性が考えられた。また、*R. eutropha* も同様の蛋白質を持っていると考えた。

PHB 蓄積菌として最もよく研究されている *R. eutropha* においても未だ PHB 分解系の全容は明らかになっていない。我々は PHB 分解系の解明を目的として *Acidovorax* sp. SA1 の 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列を基に、新規 3HB オリゴマー分解酵素の探索と得られた分解酵素の性質の検討を行った。

## 材料と方法

### 3HB オリゴマー分解酵素遺伝子 (*phaZc*) のクローニングと大腸菌での発現、遺伝子産物の精製

*Acidovorax* sp. SA1 の 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列をプローブとし、BLAST search を行った。その結果 *Ralstonia* 属で見つかった蛋白質の塩基配列を基にプライマーを作製した。このプライマーを使用し、*R. eutropha* の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。得られた DNA 断片をプローブにして RI でラベルし、サザンハイブリダイゼーションを行った。シグナルの見られた部分の DNA 断片をベクターに繋ぎ、コロニーハイブリダイゼーションによって 3HB オリゴマー分解酵素の遺伝子が含まれている DNA をクローニングした。この DNA 断片の塩基配列を決定した後に、新たに ORF 部分のみを PCR により増幅し、発現ベクターに繋いだ。このベクターで大腸菌を形質転換した。大腸菌を培養後、発現誘導を行った。この大腸菌を集菌した後に超音波処理によって菌を破碎した。PhaZc は遠心分離後の上清から Toyopearl Ether-650M、Toyopearl DEAE-650M を用いて精製した。

### PhaZc の細胞内局在

PHB を蓄積する条件で *R. eutropha* を培養した後に菌を破碎した。破碎液を蔗糖密度勾配遠心分離により各画分に分けた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 後、免疫染色によって PhaZc

を染色した。可溶性画分、PHB 画分のマーカーとして、それぞれ 3HB デヒドロゲナーゼ、PhaZa1 を使用した。

### *phaZc* 欠損株の作製

*phaZc* の N 末端 300 bp と C 末端 300 bp を PCR により増幅した後に連結し suicide ベクターに繋いだ。このベクターで大腸菌を形質転換した後に接合により *R. eutropha* の染色体上にベクターを組み込んだ。蔗糖を含む培地で *R. eutropha* を培養する事によりベクター部分を含まず欠損のみを生じた *phaZc* 欠損株を得た<sup>8)</sup>。欠損株と野生株の PHB 蓄積量の違いは HPLC を用いて調べた。

## 結果

### *phaZc* のクローニング

*Acidovorax* sp. SA1 の 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列をプローブとし、BLAST search を行った結果 *Ralstonia* 属で類似したアミノ酸配列を持つ蛋白質が見つかった。これらの蛋白質の塩基配列を基にプライマーを作製し、*R. eutropha* の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った結果、予測される大きさ (1.3 kbp) の断片が増幅した。この断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った後に得られた DNA 断片の塩基配列を決定した結果、3HB デヒドロゲナーゼの遺伝子と *phaZc* を含んでいる事が分かった。*phaZc* 遺伝子の ORF は 898 bp からなり、これから予測される蛋白質の分子質量は 31542 Da. であった。PhaZc の一次構造中にはセリンエステラーゼに見られるリパーゼボックス (Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly) と呼ばれる配列が存在していた。

### PhaZc の性質

大腸菌での発現誘導後、細胞質画分の SDS-PAGE を行った結果、約 32 kDa の蛋白質が生産されている事が分かった。2種類のカラムクロマトグラフィーを行う事によって SDS-PAGE 上で均一なバンドを示す蛋白質を得る事が出来た (図 1)。精製酵素の N 末端は最初のメチオニンが欠如していたが、それ以降の配列は塩基配列から予測される PhaZc のアミノ酸配列と同じであった。また、免疫染色の結果 *R. eutropha* においても同一の分子質量を示す事が分かった。

PhaZc の基質特異性を表 1 に示した。3HB オリゴマーを効率よく分解し、その量体数が高くなるに従い分解活性も高くなった。また、人工アモルファス PHB をわずかに分解し 3HB モノマーを生じ

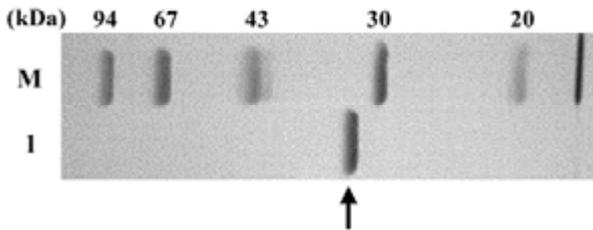


図 1. 精製 PhaZc の SDS-PAGE 分析. レーン 1; 精製 PhaZc(1µg), レーン M; 分子質量マーカー. 矢印は PhaZc を示す.

た。p-ニトロフェルエステル化合物はわずかに分解した。結晶 PHB、native PHB、olive oil は分解しなかった。セリンエステラーゼの阻害剤である DFP によって阻害された。PHB の分解において PhaZb と PhaZa1 は相乗効果を示したが<sup>9)</sup>、PhaZc では PhaZb 及び PhaZa1 との相乗効果はみられなかった。

表 1. PhaZc の基質特異性

基質	比活性 (µmol/min/mg)
3HB-oligomer	
Dimer	31
Trimer	200
Tetramer	240
Pentamer	310
PHB	
Artificial amorphous PHB	3.0
Native PHB granules	< 0.1
Semicrystalline PHB	< 0.1
p-nitrophenyl ester	
Acetate	1.0
Butyrate	6.0
Palmitate	< 0.01
Olive oil	< 0.5

### 細胞内局在

PHB 蓄積時の局在性を調べる為に PHB 蓄積条件で 2 日間培養した後、細胞破砕液を蔗糖密度勾配遠心分離法により分画した。その結果、PhaZc は大部分が細胞質中に存在し、わずかに PHB 上にも存在する事が分かった (図 2)。PhaZc の局在性は PhaZa1、PhaZb どちらとも異なっていた<sup>9)</sup>。

### phaZc 欠損株の PHB 代謝

PhaZc が実際に PHB の代謝に関わっているかを調べる為に phaZc 欠損株の PHB 蓄積量を野生株と比較した。*R. eutropha* は富栄養培地で培養した場合、対数増殖期に一時的に PHB を蓄積する事が知られており<sup>7)</sup>、phaZc 欠損株においても同様の結果が得られた。しかし、野生株と比較して欠損株では対数増殖期の PHB 蓄積量が増加していた。定常期において phaZc、phaZb 欠損株では PHB 含量

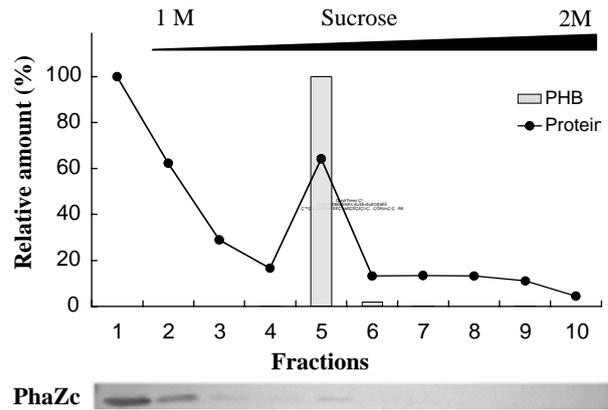


図 2. PhaZc の局在性. PHB を蓄積した菌を破砕し、蔗糖密度勾配遠心法により分画した。SDS-PAGE の後に免疫染色を行なった。

が野生株よりも多かったが phaZbc double 欠損株では野生株と同程度まで減少した。PHB 蓄積条件で培養した場合には富栄養培地で培養した時の対数増殖期と同じ現象が見られた。全ての条件において phaZb 欠損株の PHB 蓄積量が最も増加していた (図 3)。

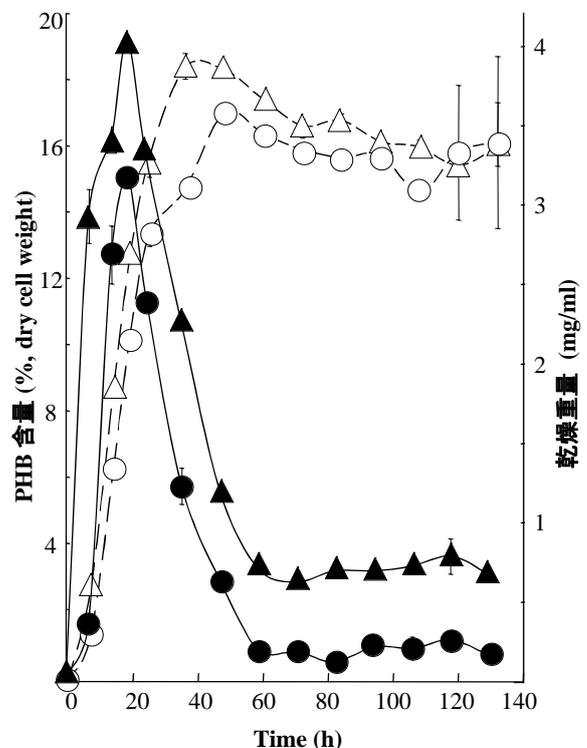


図 3. 富栄養培地における phaZc 欠損株の生育と PHB の蓄積. 点線: 乾燥重量, 実線: 乾燥重量あたりの PHB 含量(%). Wild-type(○, ●); phaZc 欠損株(△, ▲). 結果は 3 点の平均であり, 誤差棒は標準偏差を示している.

## 討論

*R. eutropha* は PhaZa、PhaZb の異なるタイプの細胞内 PHB 分解酵素を持っている事が知られており、今回、新たに PhaZc の存在を示した。PhaZa1 とそのホモログ、PhaZb、PhaZc は、それぞれ分子質量、アミノ酸配列が異なっている。PhaZa1 とそのホモログは分子質量が約 45 kDa の蛋白質であり、全ての細胞外 PHB 分解酵素に見られるようなリパーゼボックスが存在しない。その活性中心にはセリンの代わりにシステインが存在している。一方、PhaZb と PhaZc の活性中心はリパーゼボックス中のセリンである。PhaZb は分子質量が約 78 kDa の蛋白質であり、*Ralstonia pickettii* A1 の細胞外 3HB オリゴマー分解酵素<sup>9)</sup>とアミノ酸配列が似ている。PhaZc の分子質量は PhaZb の半分程度である 32 kDa であり、*Acidovorax* sp. SA1 の細胞内 3HB オリゴマー分解酵素のアミノ酸配列と似ている。これらの事から PhaZa, b, c はそれぞれ異なるグループに属すると考えられる。

最近、光合成細菌である *Rhodospirillum rubrum* のペリプラズム画分から PHB 分解酵素が精製され、その遺伝子もクローニングされた<sup>10)</sup>。そのアミノ酸配列は細胞外 PHB 分解酵素の触媒領域と類似している。*R. eutropha* にも、この酵素と似た性質を示す PHB 分解酵素が存在している可能性がある。

PhaZc は基質特異性から特異性の広いエステラーゼもしくはリパーゼの一種ではなく 3HB オリゴマーに作用する特異的な分解酵素であると考えられる。PHB の分解を *in vitro* で調べた結果では PhaZc と PhaZa1、PhaZb の間に相乗効果は見られなかったが、PhaZa1 と PhaZb は相乗的に PHB を分解していると言う事が分かっている。人工アモルファス PHB を分解する事から細胞内においては、PHB を分解しているかもしれない。これらの結果から、細胞内において PhaZa1、PhaZb、PhaZc は効率よく働き PHB、3HB オリゴマーを分解していると思われる。

*R. eutropha* の野生株と *phaZc* 欠損株の PHB 蓄積量には十分な違いが見られた。この結果は PhaZc が PHB 代謝に貢献している事を示している。PHB の合成と蓄積は同時に起こっている事が知られており、欠損株においては、そのバランスが崩れ、その結果、PHB 蓄積量の増加が見られると考えられる。*PhaZb*<sup>9)</sup> と *phaZc* 欠損株の間に見られる蓄積量の違いは細胞内局在性によるものと思われる。*PhaZb* は約半分が PHB 上に存在している為、細胞内において PhaZc よりも PHB の分解に

働いているかもしれない。

PhaZb、PhaZc は共に 3HB オリゴマーを効率よく分解する事から細胞内の 3HB 濃度が変化している事は明らかであり、この事から PHB の代謝は 3HB 濃度によって調節されている可能性が考えられる。以上の理由から PHB の代謝は環境変化による窒素源、炭素源の濃度変化による調節だけではなく、3HB もしくは 3HB オリゴマーの濃度によっても調節されていると考えられる。

*R. eutropha* の PHB 代謝系は非常に複雑であり、未だ不明な点が多く、更なる研究が必要である。

## 文献

- 1) Anderson AJ and Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic roles, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbial. Rev.* **54**: 450-472.
- 2) Saegusa H, Shiraki M, Kanai C and Saito T (2001) Cloning of an intracellular poly [D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.* **183**: 94-100.
- 3) York GM, Lupberger J, Tian J, Lawrence AG, Stubbe JA and Sinskey AJ (2003) *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly [D- (-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J. Bacteriol.* **185**: 3788-3794.
- 4) Pötter M, Müller H, Reinecke F, Wiczorek R, Fricke F, Bowien B, Friedrich B and Steinbüchel A (2004) The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology* **150**: 2301-2311.
- 5) Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, Sugiyama A and Saito T (2003) Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol.* **185**: 3485-3490.
- 6) Saegusa H, Shiraki M and Saito T (2002) Cloning of an intracellular D (-) -3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and identification of the activity site serine residue by site-directed mutagenesis. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 106-112.
- 7) Sugiyama A, Shiraki M, Kobayashi T, Morikawa G, Yamamoto M, Yamaoka M and Saito T (2002) Cloning and Sequencing of an intracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Acidovorax* sp. strain SA1 and purification of the enzyme. *Curr. Microbiol.* **45**: 123-127.
- 8) Lenz O and Friedrich B (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12474-12479.
- 9) Zhang K, Shiraki M and Saito T (1997) Purification of an extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain

A1 and cloning and sequencing of its gene. *J. Bacteriol.* **179**: 72-77.

- 10) Handrick R, Reinhardt S, Kimmig S and Jendrossek D (2004) The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)depolymerase of *Rhodospiril-*

*lum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* **186**: 7243-7253.

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## 意味関係を有する大規模知識ベースに対する仮想3次元表示方法の研究

水越大介<sup>1</sup> 森本貴之<sup>1</sup> 藤原 譲<sup>2</sup> 後藤智範<sup>1,3</sup>

### Research for the 3-Dimensional Visualization Methods to a Large-scale Knowledge Base with Semantic Relations

Daisuke Mizukoshi<sup>1</sup>, Takayuki Morimoto<sup>1</sup>, Yuzuru Fujiwara<sup>2</sup> and Tomonori Gotoh<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Research Laboratory of Fundamental Infology, Tsukuba-City, Ibaragi 305-0025, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: gotoh@info.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Some research on information visualization for knowledge bases has been done in recent years. Lots of visualization methods for hierarchical structure have been developed in this research. We developed several visualization methods for large scale knowledge bases in which a lot of nodes form hierarchical structures, and also link in complicated semantic relations. The prototype program based on the methods has been implemented and coded in Java and Java 3D APIs. This paper outlines the methods and the program with some display samples.

**Keywords:** information visualization, 3-dimensional visualization, lexical knowledge base, hierarchical structure, Java 3D

#### 序論

昨今、電子化された情報は日を追って膨大になってきている。一方、これらの資料をどのように見やすく利用者に提示するか、またどれだけ検索しやすくするかという問題も生じる。

10年ほど前までは、コンピュータを使った情報検索は「文字」を用いておこない、その検索結果も「文字」で表示、印刷されるものがほとんどであった。それが現在では、コンピュータ・グラフィックス技術、ユーザ・インターフェイス技術、データ処理技術などを組み合わせ、情報の性質（情報の時間的変化、情報間の相互関係、膨大な情報量など）を考慮した「視覚化」が数多く提案されている<sup>1)</sup>。

階層構造をもつデータの中には、それとは別に意味関係を有するものも存在する。このような情報はそれぞれを2次元座標上に表示することは可能だが、その場合各々のデータの階層構造を意識しながら意味関係を視覚的に把握することは困難である。

本研究は、上述の問題を解決するために、意味関係を有する階層構造を仮想3次元空間に表示するための表示モデルの提案・実装・問題点について考える。なお、データとしてEDR電子化辞書中のEDR

概念辞書を使用する<sup>2)</sup>。

近年のCG技術の発達には目を見張るものがあり、映画やテレビでも見るができるように、実在のものと同見分けのつかない程、現実的な図が作りだせる。さらにCGの重要な点は、実在しないものも作り出すことができる点である。情報視覚化とはこうしたCG技術を駆使し、本来形も色もない情報に形や色を与え、人間の情報に対する理解を促進する研究である。研究そのものの歴史は20年ほどとそれほど長くはないが、現在では数値データやテキストなどの情報を視覚化する研究が各種機関において行われている。従来は計算機のように膨大な情報を無味乾燥な文字の羅列として表示するのではなく、これを図として適度に抽象化しつつ分かりやすく表示することができれば、計算機専門家はもちろん、一般の利用者にとっても情報システムはさらに使いやすくなるであろう。

階層構造を表現する主なモデルとしては以下のものが挙げられる。

1. 入れ子図形モデル
2. 円形配置モデル

### 3. 円錐形モデル

入れ子モデルは、データ全体が一定の範囲内に収まるという利点を持つ<sup>3,4)</sup>。しかし、単純な上位-下位関係しか表現できないため、この手法を本研究のテーマに採用するのは非常に困難である。円形配置モデルは、Web サイトのリンクなどネットワークの構造を表現するのに適したモデルである<sup>5-13)</sup>。しかし、構造全体をグラフとして捉えているために階層関係の認識に支障をきたす恐れがある。円錐形モデルは、高さ方向の配置位置で階層構造が表現されているので、他のモデルと比べ階層構造の把握が容易である<sup>14-19)</sup>。また、関連をノードとリンクで表現しているため、単純な上位-下位関係以外の関係も表現可能である。そのため、本研究においてはこのモデルを発展させたものがふさわしいと判断した。

## 結果

### 意味関係の仮想 3 次元表示手法

#### 1. 実験用データ

本題に入る前に、本研究で使用している EDR 電子化辞書についての説明を簡単に述べる。EDR 電子化辞書は、コンピュータによる先進的な言語処理のために開発され、単語辞書などのいくつかの大規模な個別辞書から構成されている。

本実験では、概念体系を表示するために、EDR 概念辞書を用いて実験を行う。EDR 概念辞書は、各概念を言葉で説明する概念見出し辞書と、概念間の関係を与える概念体系辞書、概念記述辞書の 3 辞書から成る。概念体系辞書は概念間の上位-下位関係を規定し、概念記述辞書はそれ以外の関係（意味関係）を規定するものである。

EDR 電子化辞書の上位-下位関係は、3aa966 という概念識別子を持つ概念をルートとし全部で 40 万以上の概念を持つ巨大な用語木である。また、多重継承を許しているため下位概念が複数の親を持つ場合もある。EDR 概念体系辞書では直接の上位-下位関係にある 2 概念のペアを一つのレコードとし、すべてのペアを列挙することにより概念体系を表現する。

意味関係とは、二つの概念の間に上位-下位以外の関係があることをいう。EDR 電子化辞書では、概念辞書の中の概念記述辞書にそのデータが存在する。一般にそのような関係には無数のものが考えられるが、EDR 概念記述辞書では動詞的概念が名詞的概念を支配する場合の格関係を中心に以下の 8 個の関係をを選び、この関係子によって関係づけられる概念のペアを列挙する。

agent	有意志動作を引き起こす主体
object	動作・変化の影響を受ける対象
a-object	属性をもつ対象
implement	有意志動作における道具・手段
cause	事象の原因、理由
goal	事象の主体または対象の最後の位置
place	事象の成立する場所
scene	事象の成立する場面

例えば、「りんごを食べる」という文に相当する意味関係表現として、

《食べる》 --object→ 《りんご》

という表現が得られるが、概念記述辞書では、ここに現れるそれぞれの関係を 2 つの概念間に成り立つ関係として取り上げ、記述する。

本研究では EDR 概念辞書に含まれる 3 辞書を、データの操作を容易に行うために 1 ファイルに統合した。概念体系辞書、概念記述辞書においてデータは関係のペアごとに保存されているが、本実験ではデータをより扱いやすくするために、概念単位でデータを扱えるようにした。また、40 万もの概念をすべて表示することは、視覚面においてもデータ読み込みにおいても得策ではない。そのため、表示する概念数の上限をあらかじめ定めることにした。

#### 2. 表示モデル

意味関係を仮想 3 次元空間上に表現する方法は色々考えられるが、本研究では「意味関係を持つ用語同士を、関係を示す色つきの線で結ぶ」という手法を用いた。しかしながら線のみでは関係子の区別ができないため、関係子は用語木とは別に、線の色と同じ 3D テキストを用いることで表現した。

しかし、表示される用語数を制限しているため、表示されていない用語と関係を持つケースも存在する（厳密には正しい定義とはいえないが、以後、表示されている用語間の関係を同一用語木内の意味関係、表示されている用語と表示されていない用語との関係を異用語木間の意味関係とする）。したがって、本研究で検討すべき表示モデルは以下の 2 種類である。

同一用語木内の意味関係の表示モデル  
異用語木間の意味関係の表示を行うモデル

下記では、これらの表示モデルについて述べる。

## 2.1 マルチコーンの表示

意味関係の表示モデルの説明に先立ち、用語木そのものの表示モデルについて簡単に説明する。

用語木は親の数だけコーンを表示するマルチコーン形式 (Cone Trees とほぼ同じ形式) で表示することとした。その表示モデルを以下に示す(図 1)。図の○や△などは用語木中の用語 (概念) である。これを元にして、意味関係の表示モデルを考える。なお、座標軸は特に断りがない限り、x 軸は左から右方向、y 軸は下から上方向、z 軸は奥から手前方向である。

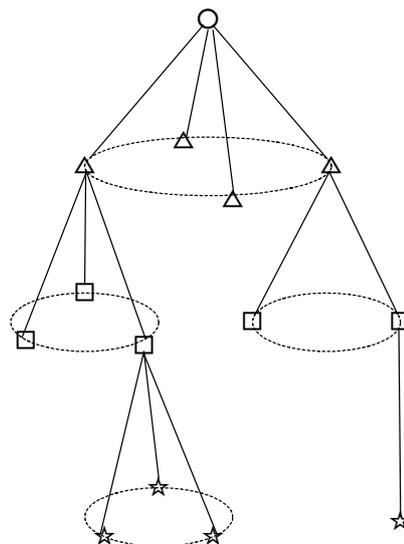


図 1. 用語木の表示モデル.

## 2.2 同一用語木内の意味関係表示モデル

まず、同一用語木内の意味関係の表示モデルは次のもの考えた(図 2)。以降、関係のある用語にあたる場所は黒塗り表示にしてある。図中の太いリンク線が用語間の関係を表す。リンク線は階層構造の線と同一である必要はなく、複数の階層をまたがる場合や、関係のある用語が別々のコーンにある場合や、同一階層上に関係が存在するケースも存在する。

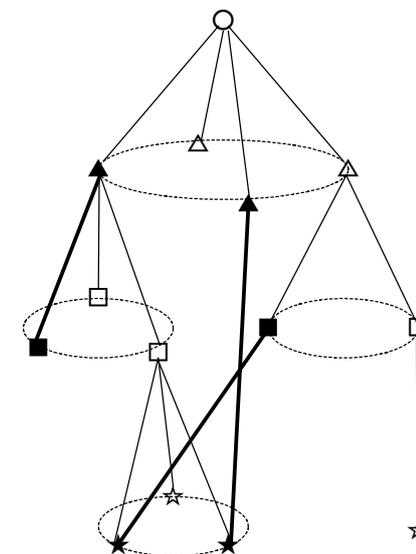


図 2. 同一用語木内の意味関係表示モデル.

## 2.3 異用語木間の意味関係表示モデル

次に、異用語木間の意味関係の表示を行うモデルを示す(図 3)。

この例では、3 階層目の用語の 1 つを指定している。そして指定された用語と関係を持つが元の用語木に存在しない用語を、この場合は用語木の右側に描画し (指定用語が用語木の左方にある場合は左側に描画する)、それらを色つきの線で結ぶ。描画された用語および線は横向きのコーンのような形状をなしている。

## 3. 表示モデルの実装

前節で構想した表示モデルを Java3D API を用いて実装を行った。

### 3.1 マルチコーン表示の実装

意味関係表示モデルの実装を説明する前に、マルチコーン表示の実装について簡単に説明する。まず、大まかな手順を以下に示す。

1. 用語木のデータをファイルから読み込む。
2. それぞれの用語について座標計算を行う。
3. 用語およびリンクのオブジェクトを該当する座標に配置する。

こうして表示されたものを図 4 に示す。この用語木は、概念識別子 359313 を根とした木を 2000 語表示した図である。概念識別子 359313 は、「情報を担う音や記号や文字」という概念説明である。EDR

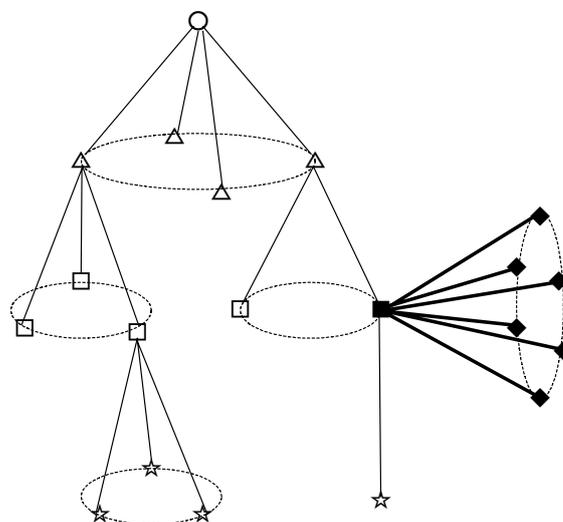


図 3. 意味関係表示モデル(2).

概念辞書ではあらゆる物事を記述しているため、このような見出し語として表現できない概念が多数存在する。本研究ではこのような概念を「--No name--」として表示する。

親ノードごとにコーンを作るマルチコーン形式を採用したことで、「どのコーンがどの親を持っているか」の判断が容易である。また、葉と内部節を区別しわかりやすくするため、葉を黄色に、内部節を赤に色づけを行った。

用語木の操作は、マウスのドラッグによる回転、移動、ズームが可能である。しかし、このうちの回転操作は  $xy$  両方の軸を中心に回転するため、やや癖があり全ての利用者にとって使いやすいものとはとてもいえない。そのため少しでも使いやすいするために、回転操作に関しては回転軸を固定して操作する機能を付加した。図 4 下部の「orbit …」というボタンをクリックするたびに、 $xy$  軸回転 →  $x$  軸回転 →  $y$  軸回転 → 回転操作禁止 →  $xy$  軸回転 → … というように回転軸を変化させることができる。

### 3.2 同一用語木内の意味関係表示の実装

まず、同一用語木内の意味関係の表示手順を以下に示す。

1. 仮想 3 次元空間上に用語木を表示する。
2. 用語木を巡回して関係のある用語の組を探し、関係を示す色つきのリンク線を描画する。
3. 色に対応する関係子名を表示する。

リンク線の描画には、関係を持つ用語の位置する座標を知る必要があるが、これらは用語木表示に使用されているものをそのまま使用できるので、改めて計算する必要はない。こうして意味関係を表示したものが図 5 である。図中の細い線は階層構造を示し、やや太目の色つきの線は意味関係を示す。また、関係子は右上に関係ノードと同じ色で示されている。

### 3.3 異用語木間の意味関係表示の実装

次に、異用語木間の意味関係表示の手順を以下に示す。なお、同一用語木内の意味関係は既に表示されているものとする。

1. 意味関係を表示したい用語を、用語木内の用語を直接クリックして選択する。
2. 指定された用語が異用語木の用語と関係を持つかを調べ、あれば関係を持つ用語の座標を計算し、描画する。

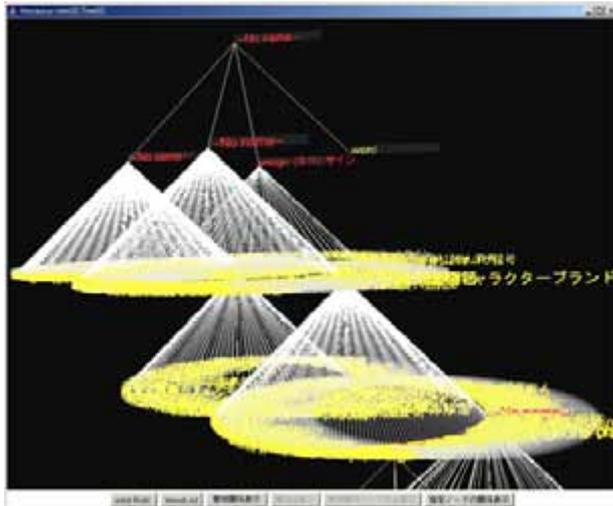


図 4. 用語木表示.

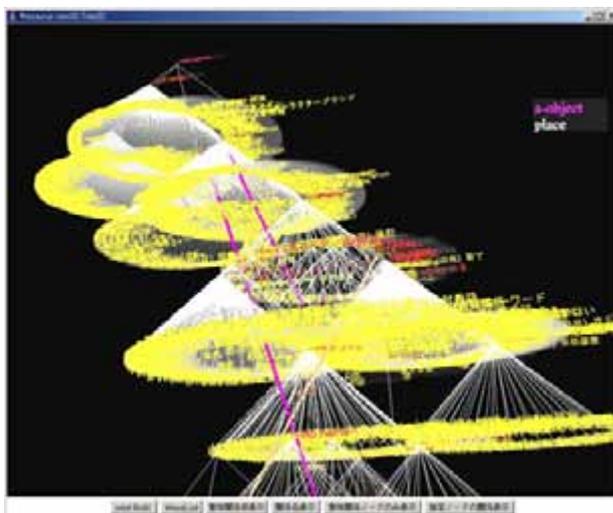


図 5. 同一用語木内の意味関係表示.

3. 指定された用語との関係を示す色つきの線を描画する。

まず、意味関係を表示したい用語の指定方法について説明する。本研究では用語木中の用語を直接クリックして指定する方法を選択した。

Java3D API には、ピッキングというマウス操作によって画面上のオブジェクトを操作・指定する機能がある。この機能を用いることで用語の指定が可能となるのだが、元々本研究で用語オブジェクトとして使われている Text3D クラスのオブジェクトは、ピッキング機能とあまり相性がよくない。同じ Text3D オブジェクトでもピッキングが可能なものとは不可能なものがあり、このままでは実用的とはいえない。そのため、Text3D オブジェクトの背景として四角形のポリゴンを追加した (図 6)。四角形ポリゴンは Text3D オブジェクトとくらべてピッキングが容易であり、動作も安定している。また、ポリゴ



図 6. 四角形ポリゴンの追加.

ンの透明度を高く設定すれば、用語オブジェクトの邪魔になることもない。ただし、Java3D API のポリゴンには片側の視点からは見えても、もう片方の視点からは見えないという性質がある。そのため、本研究ではポリゴンを両面に配置し、反対側から見てもポリゴンが消えないようにした。こうすることで視覚面での利便性も確保することができる。

用語を具体的に指定すると、その用語と関係する異用語木の用語と関係を描画する。描画を行うには、図 5 下部の「指定ノードの関係表示」ボタンをクリックすればよい（指定された用語が関係を持たないときは何も起こらない）。以降、指定された用語が異用語木の用語と何らかの関係を持つとして話を進める。

まず、異用語木の用語の座標計算を行う。ここでは 2 段階にわけて座標の計算を行う。

最初に、基準となる座標を定める。これは、y および z 座標は指定された用語と同じで、x 座標は同じレベルで最も x 成分の値が大きい（指定された用語が左寄りなら最も x 成分の値が小さい）座標とする(図 7)。

次に、それぞれの用語の座標を、先ほど求めた基準座標をもとに計算する。

$$\text{基準座標} : (\alpha, \beta, \gamma) \dots \dots \dots \text{(式 1)}$$

n 番目の関係する用語の座標 :

$$(x, y, z) \dots \dots \dots \text{(式 2)}$$

$$\text{基本ベクトル } \vec{v} = (x', y', z') \dots \dots \dots \text{(式 3)}$$

$$\text{回転角 } \theta = \frac{2\pi n}{N_i} \dots \dots \dots \text{(式 4)}$$

( $N_i$  : 指定用語と関係する用語の数)

$$(x, y, z, 1) = (x', y', z', 1) \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & \alpha \\ 0 & \cos \theta & -\sin \theta & \beta \\ 0 & \sin \theta & \cos \theta & \gamma \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \dots \dots \dots \text{(式 5)}$$

指定された用語の n 番目の関係する用語の座標を式 2 とする。まず、円錐の母線にあたるリンク線についての基本ベクトル  $\vec{v}$  (式 3) を定める (図 8)。次にあらかじめ調べた関係を持つ用語数から基本ベクトルの回転角を求め (式 4)、基準座標だけ平行移動した上で x 軸に対しての回転を行う (式 5)。なお、

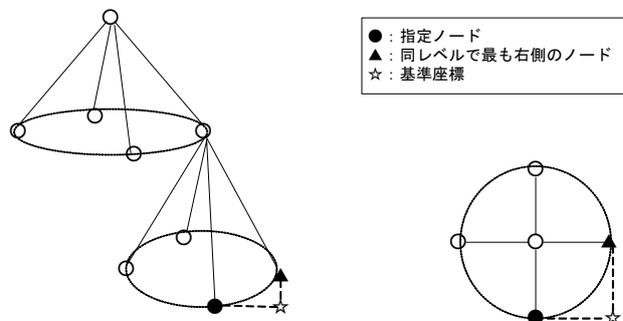


図 7. 基準座標の位置.

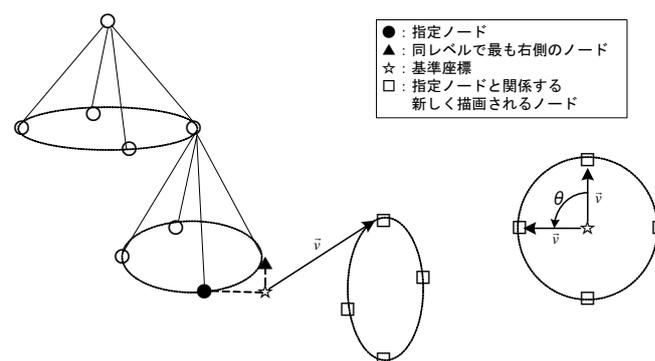


図 8. 座標計算の図.

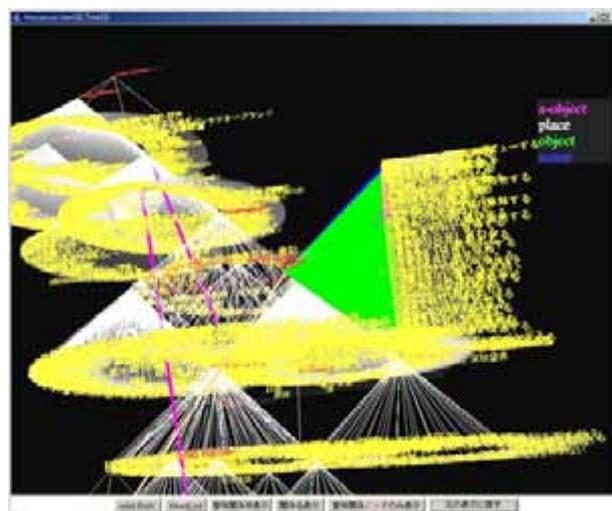


図 9. 異用語木間の意味関係表示.

図の基準座標から伸びている線はあくまでもベクトルであり、実際に描画される線とは違うことを明記しておく。

座標の計算が終了したら、それをもとに用語および関係リンク線の描画を行う。関係リンク線の描画方法については同一用語木内の関係表示のときと同じである。

すべての計算・描画が終了すると、図9のように関係が表示される。この図では、概念識別子318038の「ない」という用語を指定し、それと関係する用語をすべて表示し、色つきの線で関係を示したものである。

## 討論

### 表示形式の改良

前章において表示したモデルは、意味関係と関係のない数多くのノードが利用者の邪魔になり、意味関係および階層関係の把握に支障をきたす問題がある。また、異用語木間の意味関係表示においては、用語そのものの選択が困難なことや、大量のオブジェクトが描画されると用語指定のピックアップの処理にかかる時間が長くなる問題点がある。本節ではこのことに関する改善策を述べる。

### 不要ノードの削除

まず、意味関係の把握を容易にする手法として、意味関係を持たないノードをすべて取り除いて表示する手法を挙げる。具体的には、以下の条件を満たさないノードをすべて取り除いて意味関係を表示する。こうすることにより、階層関係を崩すことなく意味関係をよりわかりやすく表示することができる。

「用語木中または外に関係を持つ用語があるか、それらの用語の親となる概念」

図10は、前章の例と同じ概念識別子359313を根とし用語総数を6000に増やした木を、意味関係表示後に不要なノードを除去し、用語数を100強まで減らして表示したものである。

前章の図5、図9と比べると、ノード数が減った分関係を持つ用語がより目立つようになり、意味関係がより理解しやすくなったといえる。また、オブジェクト数の減少によりピックアップの処理に要する時間も減少した。

このため、用語の指定も全体表示時よりも格段に行いやすくなった。図11は、概念識別子104126の「English」という用語を選択し、その用語と関係する用語木外の用語および関係を表示したものである。

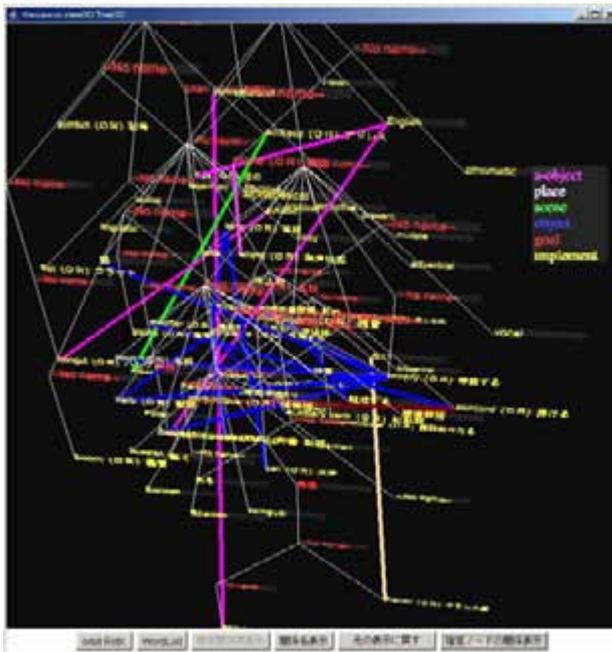


図10. 同一用語木の意味関係表示(不要ノード除去)。

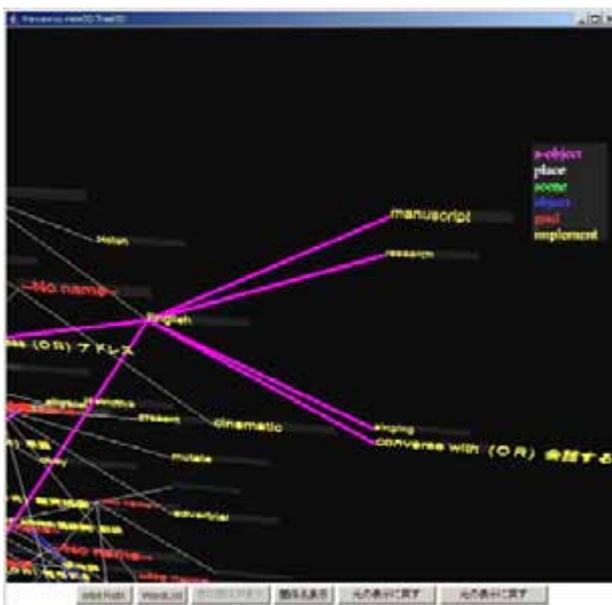


図11. 異用語木間の意味関係表示(不要ノード除去)。

### コーンの重なるの対処

前節の手法により、用語木を全体表示させていたときと比べるとだいぶ見やすくなったが、それでもなお用語が見づらい箇所がかなり見受けられる。その理由は、コーン同士が複雑に重なり合い、階層構造の視覚的な理解を妨げているからである。

これを解決する手法の1つは、コーンの半径を階層ごとに変化させる(普通は、下位にいくにしたがって半径を小さくすることである。しかし、この手法は本研究ではまだ採用していない。というのも、これを用いて下位階層より座標を計算して重なりを完全になくすことは可能であるが、こうした場合用語

木の大きさが過度に巨大化し、そのために画面上の情報量が極端に減り、仮想 3 次元空間上にデータを描画する意味がほとんどなくなってしまう可能性が高いからである。しかしながら、過度に使用しなければ有用な手法であることは事実である。この手法を本研究に利用する方法は将来の課題とする。ここではそれと全く別の観点で、コーンの重なりを減少させる手法を提案する。

ありがちなケースとして、同じコーンの中に内部節が複数あり、それらが隣接しているためにコーンが重なってしまうことがある。それを改善する方法として、図 12-14 の表示モデルを挙げる。

図 12 は、葉を内側のコーンに、内部節を外側のコーンに配置する、いわば「二重コーン」の形にノードを配置したものである。図 13 は、1 つのコーンの中で内部節が最も離れるようにノードを配置したモデルである。図 14 は図 12 のような「二重コーン」であるが、葉のコーンと内部節のコーンの高さを変えたモデルである。以下、それぞれのモデルを(1)、(2)、(3)とする。

これらのモデルの基本的な考え方は次の通りである。もし内部節が同一コーン上において隣同士に配置されていたとすれば、それらを親を持つコーン同士の重なりは避けられない。そのため、内部節同士を遠ざけるように配置すれば、コーンの重なりを減少させることができるのではないかと考えた。

そうして最初に考えたのが(1)のモデルである。しかし、この手法では新たな問題が生じる。図 12 を見てわかるように、内側の葉と外側の内部節がほぼ重なってしまうことがある。ノード数が少なければ位置をずらすことで対応することは可能である。ところが、数が多くなるとそうはいかない。そこで、図 12 を改良した(2)、(3)といったモデルを考えた。

(2)のモデルは、本来の目的を考えれば何も「二重コーン」にする必要はない、内部節さえ離ればコーンの重なりは減少できるという考え方である。表示そのものは従来のモデルと変わらないため、現在のシステムからの変更が容易であるという利点もある。

(3)のモデルは、高さをずらすことで(1)の問題点を解消しようと考えたモデルである。葉と内部節の位置関係を逆にすることも考えたが、内部節側のコーンの半径を大きくしたほうが下のレベルにおけるコーンの重なりを少なくすることができると考えた。

しかしながら、この節で挙げてきたモデルにはいくつかの問題点がある。それを以下に挙げる。まず、共通する問題として挙げられるのは、コーン中に順序関係がある場合、それが崩れてしまうことである。特に(2)のモデルについては、内部節が葉の

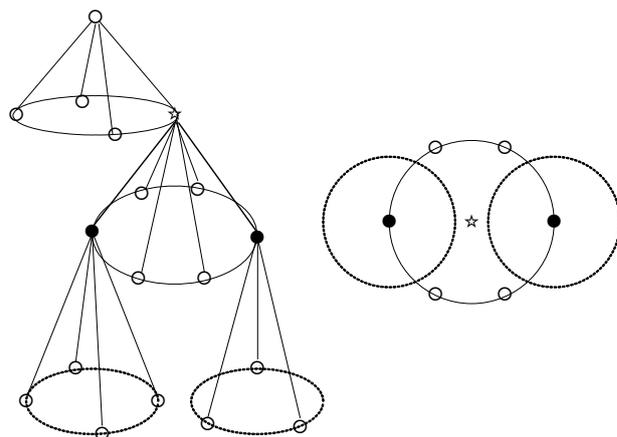


図 12. コーンの内側と外側の重なりを減少させるモデル(1).

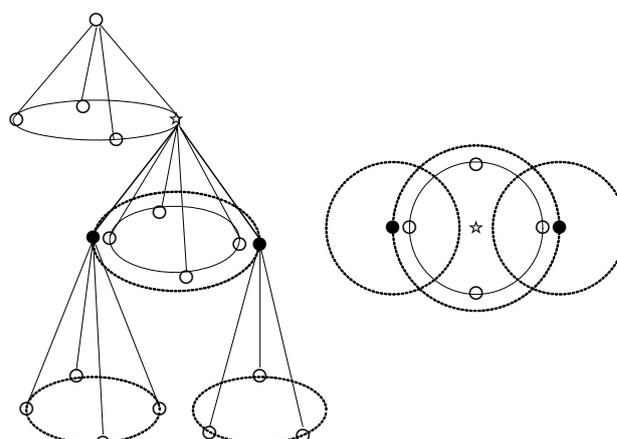


図 13. コーンの内側と外側の重なりを減少させる表示モデル(2).

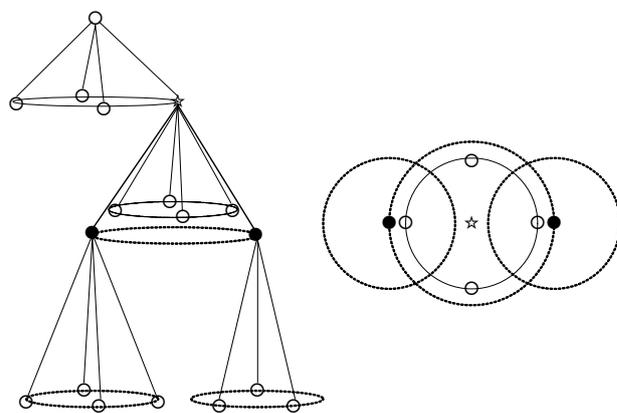


図 14. コーンの内側と外側の重なりを減少させる表示モデル(3).

間に割り込む形になるため、より深刻である。順序を意識せずに関係を把握したい場合は特に問題はないが、順序関係が重要視される場合は問題である。また、内部節の数そのものが多い場合はあまり効果が期待できない。その場合はノード数、あるいは内部節数そのものを制限しないと利用者にとって見やすい表示形式にはならない。

また、(1)や(3)の「二重コーン」を採用しているモデルでは、実際は同じコーンなのに葉と内部節が別々のコーンに属していると捉えられてしまう恐れがある。特に(3)はコーンの高さが違うために、別々の階層であると見られてしまう可能性すらある。それに加え、高さがずらしてあるとはいえ、葉が多ければ内部節の上方の視界をさえぎり、確認をしづらくなる原因にもなる。

以上の点を考えると、コーンの重なりを避けるモデルとしては、順序を意識することがなければ(2)が最適といえる。しかしながら、これらのモデルは実際に表示して検証したわけではなく、「二重コーン」のモデルにもコーンの重なり減少以外の利点が存在する可能性もある。このあたりについては今後の研究課題としたい。

## 終わりに

本研究では、Java3D を用いて EDR 概念辞書のデータをもとに概念の意味関係を階層関係と共に 3次元情報視覚化するという試みを行った。その結果、階層関係上に意味関係を表示させることに成功したものの、それと関係する様々な問題点も浮かび上がってきた。それらの多くは意味関係表示というよりは階層関係表示に関するものであった。将来的により利用しやすいモデルを目指すためには、ノード配置方法の改良など階層関係表示に関するさらなる修正を行っていかねばならないと考えている。

## 文献

- 1) 増井俊之 (1999) 情報視覚化の研究動向. ヒューマンインターフェース学会誌 2(3):189-192.
- 2) EDR Home Page : [http://www2.nict.go.jp/kk/e416/EDR/J\\_index.html?](http://www2.nict.go.jp/kk/e416/EDR/J_index.html?)
- 3) 暦本純一 (1994) InformationCube: 半透明表示を用いた 3次元情報視覚化技法. インタラクティブシステムとソフトウェア I. 日本ソフトウェア科学会 WISS'93. pp.1-8.
- 4) 伊藤貴之, 山口裕美 (2002). 「データ宝石箱」による情報視覚化. 第4回創造的研究のための大規模データマネジメントシンポジウム 2002. pp.1-8.
- 5) Lamping J and Rao R (1994) Laying out and visualizing large trees using a hyperbolic space. In: *Proceedings of the ACM Symposium on User Interface Software and Technology* 1994. pp.13-14.
- 6) Lamping J, Rao R and Pirolli P (1995). A focus context technique based on hyperbolic geometry for visualizing large hierarchies. In: *Proceedings of the ACM Conference on Human Factors in Computing Systems (CHI'95)*.
- 7) 稲田徹悟, 大野義夫 (1999) グラフモデルによる大規模データの表現法. 情報処理学会研究報告「グラフィックスとCAD」, No.096-011. pp.61-66.
- 8) Munzner T and Burchard P (1995) Visualizing the structure of the world wide web in 3D hyperbolic space. In: *Proceedings of VRML '95, Special Issue of Computer Graphics*. pp.33-38.
- 9) Munzner T (1997) H3: Laying out large directed graphs in 3d hyperbolic space. In: *1997 IEEE Symposium on Information Visualization*. pp. 2-10.
- 10) Munzner T (1998) Exploring large graphs in 3D hyperbolic space. *IEEE Computer Graphics and Applications* 18(4):. pp.18-23.
- 11) Munzner T (1998) Drawing large graphs with H3viewer and site manager (system demonstration). In: *Proceedings of Graph Drawing '98, Lecture Notes in Computer Science 1547*. pp. 384-393.
- 12) skitter : <http://www.caida.org/tools/measurement/skitter/>
- 13) URLGRAPH : <http://www.comp.lancs.ac.uk/>
- 14) Robertson G, Mackinlay J D and Card S K (1991) Cone Trees: Animated 3D visualizations of hierarchical information. In: *Proceedings of the ACM Conference on Human Factors in Computing Systems (CHI'91)*. pp.189-194.
- 15) 小池英樹, 吉原大敬 (1994) 対話型システムにおける大規模階層構造視覚化へのフラクタルの応用. 情報処理学会論文誌 35(12): 2703-2711.
- 16) 山口裕美, 藤代一成, 高橋成雄, 堀井秀之 (2002) 拡張 ConeTrees 技法による DAG 情報の可視化. In: *Visual Computing グラフィックスとCAD合同シンポジウム 2002*. pp.1-6.
- 17) 山口健太郎, 船戸康徳, 藤代一成, 堀井秀之 (2003) 社会問題の解決に資する事実の明示化手法の構築. *社会技術研究論文集*, Vol.1. pp.9-15.
- 18) Hearst M and Karadi C (1997) Cat-a-Cone: An interactive interface for specifying searches and viewing retrieval results using a large category hierarchy. In: *Proceedings of the 20th Annual International ACM/SIGIR Conference*.
- 19) 大隈隆史, 竹村治雄, 片山喜章, 岩佐英彦, 横矢直和 (1995) 順序付き階層構造情報の三次元視覚化の一手法. 情報処理学会研究報告「ヒューマンインターフェース」, No.063-003. pp.13-18.

■報告書■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

ウェブサービスのセキュリティの研究

野口健一郎<sup>1,3</sup> 門脇吉彦<sup>2</sup>

Study on Web Service Security

Kenichiro Noguchi<sup>1</sup> and Yoshihiko Kadowaki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Computer and Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> eSEC, Yamato-City, Kanagawa 242-0002, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. Email: noguchi@info.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** We studied the newly standardized security technologies for Web Services, SAML (Security Assertion Markup Language), which is for authentication, and XACML (XML Access Control Markup Language), which is for access control. We applied these technologies in an experimental system and confirmed that these technologies, combined together, can realize secure Web Services.

**Keywords:** security, web services, SAML, XACML

序論

SAML とは、XML で記述された認証情報をやり取りするための仕様である。Web サービスにおいては SOAP メッセージ等に、SAML で記述された認証情報が挿入され、利用される。また XACML とは、XML 文書に対してアクセス権を設定するための仕様である。

まず、情報家電を Web サービス技術を用いて遠隔操作する実験システムに、SAML による認証機能を追加する実験を行った<sup>1)</sup>。図 1 に示す構成を取ること、SAML によるユーザ認証がうまく行くことを確かめた。

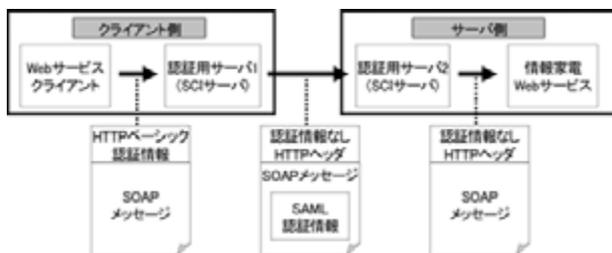


図 1. SAML を利用した認証の概要。

実際の運用では、認証対象のユーザの管理が必要になる。そこで、Web サービス技術と SAML を利用して、認証対象のユーザの管理を遠隔地から行う方式を開発した。その概要を図 2 に示す。

次に、認証後のユーザに対して、アクセス制御を

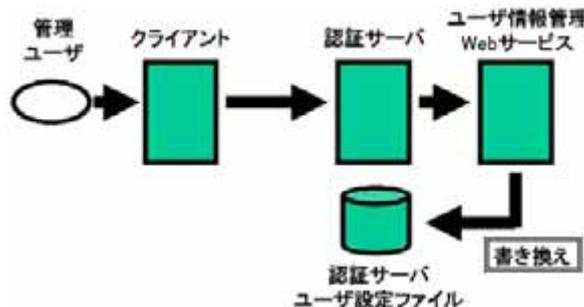


図 2. 認証対象ユーザの管理方式の概要。

行う実験を行った。図 3 にシステムの概要を示す。クライアントから①,②,③の順で、Web サービスサーバにアクセスする。

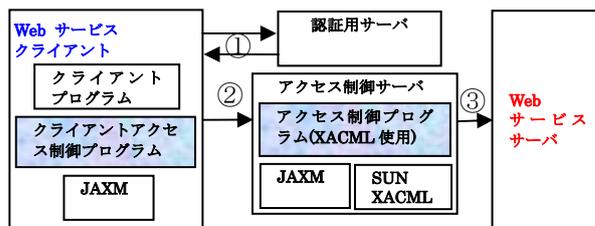


図 3. XACML を用いたアクセス制御の概要。

サーバのアクセス制御プログラムの構成を図 4 に示す。XACML を用いてアクセス制御を実現し、実

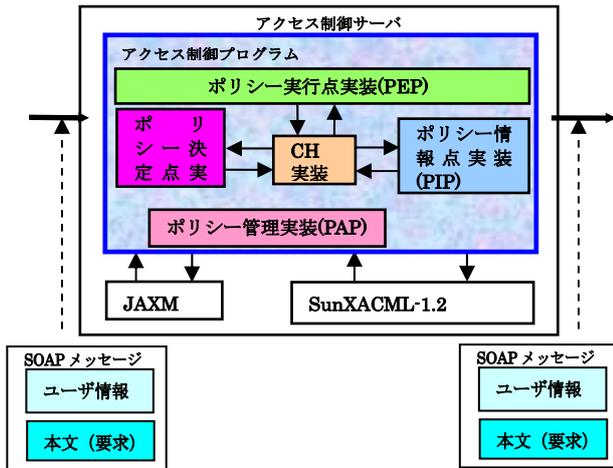


図 4. アクセス制御プログラムの構成.

際にアクセス制御が行えることを確かめた。

以上の二つの実験をベースにこれらを組み合わせた構成での実験を行った。構成を図 5 に示す。(1) は Web サービスのクライアントとサーバ間にアクセス制御サーバを直列に配置する構成である。(2) はアクセス制御サーバによるチェックを行った後に、クライアントからサーバにアクセスする方式である。実験結果からは、後者のほうが、より融通が利き、安全性を確保しやすい方式だと考える。

今後の課題としては、図 6 (2) の構成において、Web サービスサーバがアクセス制御情報のチェックを行うためにアクセス制御サーバとの間にインタ

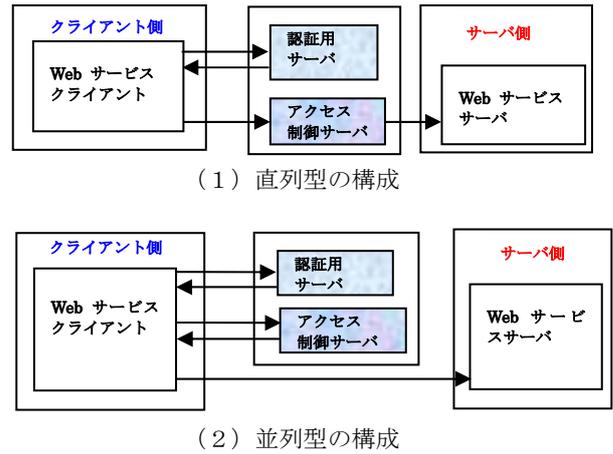


図 5. 認証とアクセス制御を組み合わせた構成.

フェースを持たせることなどがある。

なお、本実験において、認証用サーバには米国 Quadrasis 社の SOAP Content Inspector (SCI) を利用した。また XACML による制御を実現するために Sun Microsystems 社が提供しているパッケージである SunXACML-1.2 を利用した。

### 文献

- 1) 中尾 一, 野口 健一郎, 門脇 吉彦 (2004) SAML を利用した Web サービスの認証方式の検討, FIT (情報科学技術フォーラム) 2004. pp.267-268.

■Report■ By a grant Reserch Institute for Integrated Science, Kanagawa University

## Mechanistic Aspects of Bioluminescence and Chemiluminescence

Masakatsu Matsumoto<sup>1,3</sup>, Mamoru Ohashi<sup>1</sup>,  
Nobuko Watanabe<sup>1</sup> and Ken Fujimori<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: matsumo-chem@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Bicyclic dioxetane bearing a (3-cyanoethenyl) phenyl group was found to be triggered by the Michael addition of a malonate anion with an accompanying emission of red light. 3-Adamantylidene-4-methoxy-1,2-dioxetanes bearing a 4-(3-hydroxy)phenyl substituted with a podand-type group, namely, 1,4,7-trioxaoctyl, 1,4,7,10-tetraoxaundecyl, or 1,4,7,10,13-pentaoxa-tetradecyl were synthesized and their base-induced chemiluminescent decomposition was examined in an aqueous system. Optically active dioxetanes bearing a naphthyl naphthol moiety were also synthesized. They exhibited chemiluminescence in molecular recognition.

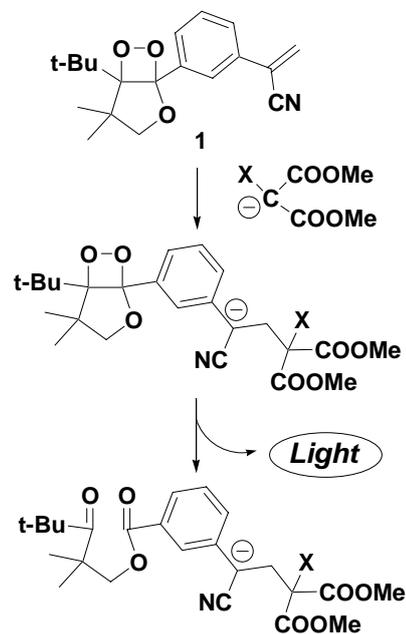
**Keywords:** dioxetane, chemiluminescence, Michael addition, molecular recognition

### Introduction

High-energy molecules, 1,2-dioxetanones, are believed to participate as a precursor emitting light for bioluminescences of the firefly, and the jellyfish *Aequorea Victoria*. However, the detail mechanistic aspects, especially singlet-chemiexcitation process, are yet remained as unfinished business to be investigated more and more. Our project is to solve such crucial problem from the viewpoint of design for highly efficient dioxetane-based chemiluminescent substrates.

### Chemiluminescent decomposition of a dioxetane bearing a 3-(1-cyanoethenyl)-phenyl moiety induced by Michael addition of an anion of malonate<sup>9)</sup>

Thermally stable dioxetane bearing a 3-(1-cyanoethenyl) phenyl group (1) was synthesized. Michael addition of an anion of malonate to a dioxetane (1) took place to give an intermediary dioxetane bearing a benzylic anion, which decomposed rapidly with accompanying emission of crimson light. When an anion of chloromalonate was used as a base, intramolecular cyclopropanation of 1 occurred concurrently with the Michael addition induced chemiluminescent decomposition (Scheme 1).

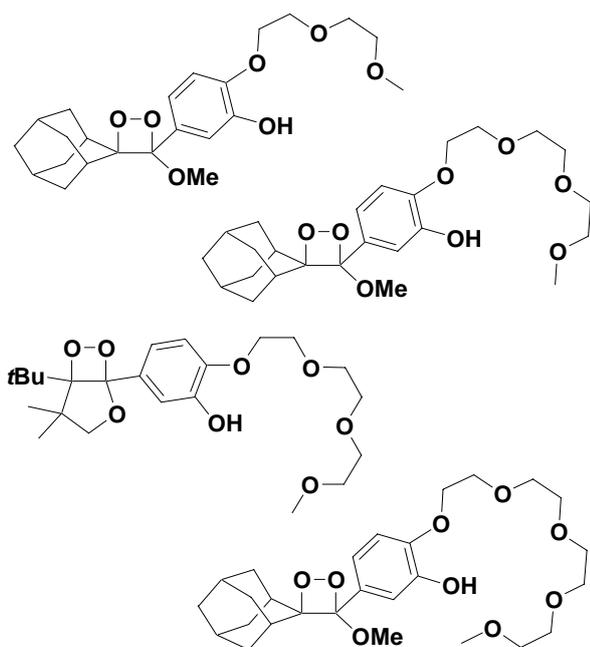


Scheme 1.

### Electron-transfer-induced chemiluminescent decomposition of dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl substituted with a podand-type group<sup>9)</sup>

3-Adamantylidene-4-methoxy-1,2-dioxetanes bearing a 4-(3-hydroxy)phenyl substituted with a podand-type group, namely, 1,4,7-trioxaoctyl, 1,4,7,10-tetraoxaundecyl, or 1,4,7,10,13-pen-

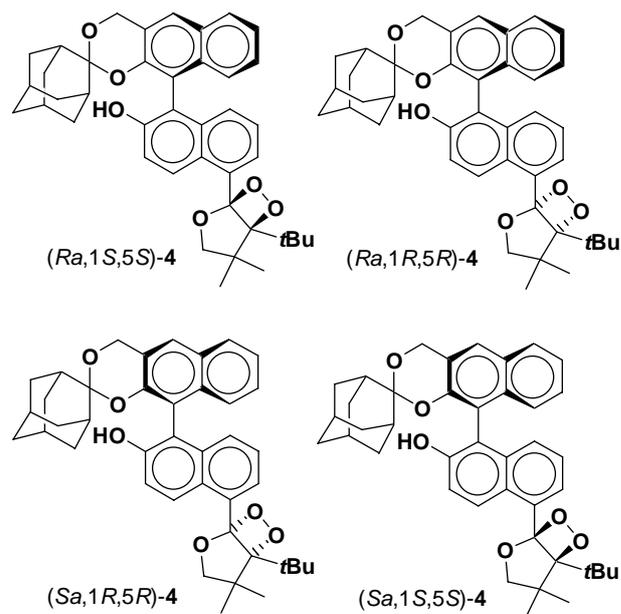
taoxatet - radeacyl were synthesized. A bicyclic dioxetane, 5-*t*-butyl - 4, 4-dimethyl-2, 6, 7-trioxabicyclo [3.2.0]heptane, bearing a 3-hydroxy-4-(2,5,8,11-tetraoxadodecyl)phenyl at the 1-position was also synthesized. On treatment with tetrabutylammonium fluoride in DMSO or acetonitrile, all these dioxetanes decomposed rapidly with accompanying emission of flash blue light. In NaOH / H<sub>2</sub>O system, these dioxetanes decomposed also rapidly to emit light though the chemiluminescent efficiency was significantly decreased. However, the introduction of a podand-type substituent, namely, 2,5,8,11-tetraoxadodecyl was rather effective to improve both chemiluminescent efficiency and ET-induced decay-rate of dioxetane (Scheme 2).



Scheme 2.

### Chemiluminescence in molecular recognition: base-induced decomposition of optically active dioxetanes bearing a bisnaphthol moiety with a complex of optically active crown ether / potassium *t*-butoxide<sup>9</sup>

Four optically pure isomers of dioxetane bearing a naphthyl-naphthol moiety decomposed by the action of complex of optically active crown ether with potassium *t*-butoxide to afford light with  $\lambda_{\max}^{\text{CL}}$  and shape of spectrum different from each other (Scheme 3).



Scheme 3.

### Advanced Chemistry of Dioxetane-Based Chemiluminescent Substrates Originating from Bioluminescence<sup>9</sup>

High-energy molecules, 1,2-dioxetanes, have received a great deal of attention because of their unique property to decompose thermally into electronically excited carbonyl products. Their chemistry originates from studies on molecular mechanisms of bioluminescence and has a history of over 30 years. However, the luminescent efficiency of the dioxetanes realized could hardly be compared with bioluminescence until a dioxetane bearing an aryl group oxidized easily was found to afford efficient chemiluminescence by the intramolecular CIEEL (chemically initiated electron exchange luminescence) mechanism. Nowadays, the CIEEL-type dioxetanes are being applied to the modern biochemical and biomedical analyses. In this review, the advanced chemistry of the CIEEL-type dioxetanes as a highly efficient chemiluminescent substrate is described focusing on their molecular design and synthesis. Singlet chemiexcitation processes for the intramolecular CIEEL-decay of dioxetanes and triplet-chemiexcitation processes for thermolysis of dioxetanes are also discussed.

### References

- 1) Matsumoto M, Mizuno T and Watanabe N (2004) Chemiluminescent decomposition of a dioxetane

bearing a 3-(1-cyanoethenyl)-phenyl moiety induced by Michael addition of an anion of malonate. *Tetrahedron Lett.* **45**: 3779-3782.

- 2) Watanabe N, Motoyama T, Matsumoto Y and Matsumoto M (2005) Electron-transfer-induced chemiluminescent decomposition of dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl substituted with a podand-type group. *ITE Letters* (in press).
- 3) Matsumoto M, Hamaoka K, Takashima Y and Yokokawa M, Yamada K, Watanabe N, Ijuin HK (2005) Chemiluminescence in molecular recognition: base-induced decomposition of optically active dioxetanes bearing a bisnaphthol moiety with a complex of optically active crown ether / potassium t-butoxide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2005**: 808-810.
- 4) Matsumoto M (2004) Advanced Chemistry of Dioxetane-Based Chemiluminescent Substrates Originating from Bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol. C, Photochem. Reviews* **5**: 27-53.

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## NMR 量子コンピュータ

小澤 宏<sup>1</sup> 天野 力<sup>2,6</sup> 岡部建次<sup>3</sup> 坂口 潮<sup>4</sup> 福見俊夫<sup>5</sup> 峯岸安津子<sup>2</sup>

## NMR Quantum Computer

Hiroshi Ozawa<sup>1</sup>, Chikara Amano<sup>2,6</sup>, Kenji Okabe<sup>3</sup>, Ushio Sakaguchi<sup>4</sup>,  
Toshio Fukumi<sup>5</sup>, Atsuko Minegishi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Function Production, Faculty of Engineering, Yokohama National University, Yokohama-City, Kanagawa 240-8501, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Department of Information Systems, Faculty of Information and Culture, Surugadai University, Hanno-City, Saitama 357-8555, Japan

<sup>4</sup> Department of General Education, Faculty of Commerce, Kumamoto Gakuen University, Kumamoto-City, Kumamoto 862-8680, Japan

<sup>5</sup> Department of Management, Faculty of Management, Matsuyama University, Matsuyama-City, Ehime 790-8578, Japan

<sup>6</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: amano@chem.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** The quantum computer is a potential computing machine which employs interacting quantum two level systems as quantum bits. We studied a problem simulating a  $C^n$ NOT gate by a combination of CNOT gates and 1-bit phase rotation gates. The results are that, of  $8(n-3)$   $C^2$ NOT gates,  $8(n-5)$  gates can be simulated by two CNOT and two 1-bit gates, 8 gates by 3 CNOT and 4 1-bit gates, and residual 8 gates by 48 CNOT and 52 1-bit gates.

**Keywords:** quantum computer,  $C^2$ NOT gate, Shor's algorithm, oracle unitary transformation

量子コンピュータ (Deutsch, 1985; Feynman, 1986) は、相互作用する量子 2 準位系の集合 (例えば分子内核スピン) を量子的なビットとして用いることにより、情報処理を行なおうという発想である。量子ビットの状態をユニタリー変換して計算を実行し、その最終状態を観測して結果を得る。量子コンピュータが魅力的なのは、量子コンピュータによれば、ある種の問題が、もっとも優れた古典的な方法に比べ、指数関数的に高速に解けるからである。一例として、Shor (1994)による整数の素因数分解アルゴリズムをあげることができる。

Shorの方法を含む多くの量子アルゴリズムは、ユニタリー変換  $U_f: |x\rangle|y\rangle \rightarrow |x\rangle|y+f(x)\rangle$  (+は 2 進和) をオラクルとして用いている。この変換は、1 番目、2 番目のレジスターの長さをそれぞれ  $n, m$  とするとき、各  $x$  に対し、高々  $m$  個の  $C^n$ NOT ゲート ( $n$  個の量子ビットで条件付けられた NOT ゲート) でインプリメントすることができる。また  $n$  が 5 以上の  $C^n$ NOT ゲートは、量子ビットが 1 つ余分

に存在するとき (すなわち  $n+2$  量子ビットの系において)、 $8(n-3)$  個の  $C^2$ NOT ゲートでシミュレート可能であることが見いだされている (Barenco ら, 1995)。

ユニバーサルな量子コンピュータを構成するための基本ゲートには、いくつかの組み合わせがある。我々は、2 量子ビットに対する CNOT ゲートと 1 ビットゲート (1 量子ビットの位相回転) とを基本ゲートに選び、これらのゲートで  $C^n$ NOT ゲートを効率よくシミュレートする方法について考察した。

( $C^2$ NOT ゲート単独のシミュレートには少なくとも 6 個の CNOT ゲートと 8 個の 1 ビットゲートが必要であると推定されている。) 結果は、 $8(n-3)$  個の  $C^2$ NOT のうち、 $8(n-5)$  個は 2 個の CNOT と 2 個の 1 ビットゲートのみで、8 個は 3 個の CNOT と 4 個の 1 ビットゲートで、残る 8 個は合計 48 個の CNOT と 52 個の 1 ビットゲートでシミュレートできる、という点に集約される。すなわち量子ビットが 1 つだけ余分に存在すれば、 $n$  が 5 以上の  $C^n$ NOT

ゲートは  $32n-4$  個の基本ゲート ( $16n-8$  個の CNOT ゲートと  $16n+4$  個の 1 ビットゲート) でシミュレートすることができ、これは Barenco らが得た基本ゲート数のおよそ  $2/3$  に相当する。

なお、 $U_f$ において  $x$  は  $\{0, \dots, 2^n-1\}$  の範囲に広がっているため、 $U_f$ 全体をインプリメントするには、

指数関数的に多数のゲートが必要である。すなわち Shor の方法のようなオラクル  $U_f$ の存在を仮定したアルゴリズムは、それが古典的方法に比べ指数関数的に高速なものではあっても、量子コンピュータを用いてもなお、実行は指数関数的に困難である。

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## 速度定数と抗酸化性 ; UV 照射による OH 生成

天野 力<sup>1,3</sup> 長崎 淳<sup>1</sup> 中嶋康乃<sup>1</sup> 大石不二夫<sup>1</sup>  
西本右子<sup>1</sup> 峯岸安津子<sup>1</sup> 渡部徳子<sup>2</sup>

### Rate Constant and Anti-oxidant Property; OH Generation by UV-irradiation

Chikara Amano<sup>1,3</sup>, Jun Nagasaki<sup>1</sup>, Yasuno Nakajima<sup>1</sup>, Fujio Oh-ishi<sup>1</sup>,  
Yuko Nishimoto<sup>1</sup>, Atsuko Minegishi<sup>1</sup> and Tokuko Watanabe<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Management, Aoyama Gakuin Women's Junior College, Shibuya-Ku, Tokyo 150-8366, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: amano@chem.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** The anti-oxidant property toward hydroxyl radicals was expressed by reaction rate constants for basic organic substances and some amino acids. The hydroxyl radicals were generated by UV-irradiation of hydrogen peroxide. The pH was controlled in the range 6.5–7.5 and the dependence on the concentration of anti-oxidant substances was examined.

**Keywords:** anti-oxidant property, reaction rate constants, hydroxyl radical, organic substances, amino acid, UV-irradiation

## 序論

活性酸素が健康に悪影響を及ぼす場合があること、また、ある種の物質が活性酸素の効果的な消滅作用すなわち抗酸化性を持つこと、が指摘されてから久しい<sup>1,2)</sup>。著者等は活性酸素の一つのヒドロキシルラジカルに対する物質の抗酸化性を反応速度定数により定量的に表現する研究を行ってきた。ヒドロキシルラジカルの生成にはフェントン反応系を用いてきた。信頼性向上のため、もう一つのヒドロキシルラジカル生成系である過酸化水素の紫外線光分解<sup>3)</sup>を用いて同様の研究を行い、その結果と前の結果を比較検討する。目標はヒドロキシルラジカルに対する種々の物質の抗酸化性を反応速度定数として定量的に表現し、速度定数の値に基づき物質の抗酸化性を理解することである。具体的には分子内の基の抗酸化性の加減が得られることを期待している。その理解の上で効果的な抗酸化物質の探索および合成のための分子設計を目指している。

## 材料と方法

抗酸化性の測定には ESR スピントラッピング法を用いた。スピントラッピング試薬として DMPO を用いた。紫外線照射装置は Ushio UV (500W) を使用

した。抗酸化物質として基本的な有機物であるアルコール類、カルボン酸類、アミン類、およびアミノ酸類を用いた。各試薬の濃度は過酸化水素 0.20 M、DMPO 88 mM、抗酸化物質 0.25 mM–0.25 M である。解析の妥当性を確かめるため、また、電離性物質の場合には分子と解離イオンの異なる速度定数を求めるため、速度定数の抗酸化物質濃度依存性を広い濃度範囲で測定した。溶液の pH は塩酸と水酸化ナトリウムにより 6.5–7.5 の範囲に調節した。溶液内で起きる反応の速度式を検討して、抗酸化性を反応速度定数により表現する式を導出した。ヒドロキシルラジカルに対する DMPO と抗酸化物質 (SODL) の競合反応



から次の式が得られる。

$$\frac{k_2}{k_1} \cong \frac{b(a-x)}{cx} = \frac{b(1-f)}{cf} \quad (2)$$

ここで  $a, b, c$  は OH, DMPO, SODL の各初期濃度

表 1. 基本的有機化合物の抗酸化性 (速度定数)

物質	速度定数/ $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (文献値)
グリシン	0.0023 (0.017)
バリン	0.40 (0.76)
ロイシン	0.50 (1.7)
イソロイシン	0.80 (1.8)
リシン	0.20 (0.35)

表 2. アミノ酸類の抗酸化性 (速度定数)

物質	速度定数/ $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (文献値)
メタノール	1.5 (0.97)
エタノール	2.5 (1.9)
蟻酸	5.0 (0.13)
酢酸	0.15 (0.085)
メチルアミン	0.15 (1.8)
エチルアミン	1.5 (5.1)

(M)、 $x$ は DMPO-OH の最終濃度 (M)、 $f = x/a$  は信号減衰率である。文献値  $k_1 = 2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  を用いて、 $k_2$ を計算した。

## 結果

抗酸化物質は速度定数の濃度依存性の違いから、(1) 速度定数が濃度に依存しないもの (メタノール、エタノール、メチルアミン、エチルアミン、グリシン)、(2) 濃度に比例するもの (蟻酸、酢酸、バリン、ロ

イシン、イソロイシン)、(3) 濃度に指数関数的に依存するもの (リシン)、の3種に分類される。速度定数は一般には抗酸化物質の濃度に依存するが、それらの平均値を文献値とともに表 1-2 にまとめた。

## 討論

(1) 濃度依存性を理解する。(2) 濃度依存性から中性分子とそれが解離して生じるイオンの各速度定数を求める。(3) 文献値との違いを検討し、速度定数の信頼性の向上をはかる。(4) 得られた速度定数に基づいて物質の抗酸化性の大小について検討する。(5) フェントン反応によるヒドロキシルラジカル生成法を用いた同趣旨の実験結果との比較を行う。今後は以上のことを明らかにしたい。また、濃度の高い領域で得られた反応生成物ラジカルのスペクトルを同定し、反応機構を決定することも大切である。

## 文献

- 1) Totter JR (1980) Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 1763-1767.
- 2) Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E and Nishimura S (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* **327**: 77-79.
- 3) Finkelstein E, Rosen GN, Rauchman EJ (1980) Spin trapping. kinetics of the reaction of the superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 4994-4999.

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## Ge-73 NMR分光法による有機ゲルマニウム化合物の構造の研究

竹内 敬人<sup>1</sup> 高山 俊夫<sup>2</sup>

### Study of the structure of organogermanium compounds with the aid of Ge-73 NMR Spectroscopy

Yoshito Takeuchi<sup>1</sup> and Toshio Takayama<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kanagawa University, Yokohama-City, Kanagawa 221-8686, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: yoshito@qf6.so-net.ne.jp

**Abstract:** High-resolution solid-state MAS <sup>73</sup>Ge NMR spectra of hexavalent germanium compounds, i.e., diiodogermylene (**1a**) and bis(1-pyrrolyl)(*meso*-tetraphenylporphyrinato)germanium (**3a**) were determined. To the best of our knowledge, this is the first example of high-resolution solid-state <sup>73</sup>Ge NMR spectra of hexacoordinated germanium nuclei.

**Keywords:** hypervalency (hypercoordination), hexacoordination, Ge-73 NMR, diiodogermylene

Ge-73核は四極子核であり、さらに磁気回転比が低い  
ため、最も測定が困難な核として知られている。  
我々は以前に世界で初めて有機ゲルマニウム化合物  
の固体高分解能マジック角回転(MAS)Ge-73 NMR  
の測定に成功した。

この成功に力を得て、我々は高配位ゲルマニウム  
化合物、すなわち4個以上の原子価を持つゲルマニ  
ウム化合物の固体高分解能NMRの測定を企てた。

Ge-73核の測定には、核の回りの電場勾配の対象  
性が高いことが必須である。一方、これまでに知ら  
れている高配位ゲルマニウム化合物のほとんどは、  
ゲルマニウムを中心とするひずんだ三方両錐、ある  
いは非対称な四面体構造を持ち、信号が観測できる  
可能性は無かった。

一方、diiodogermylene (GeI<sub>2</sub>)は気相および溶液  
中では折れ曲がった3原子分子であり、対称性から  
見て信号が観測される可能性は無い。しかし、この  
分子は固相(結晶)ではゲルマニウムを中心とする  
正八面体構造をとるから、ゲルマニウムは6個のヨ  
ウ素原子に対称的に取り囲まれている。すなわちゲ

ルマニウムは六配位である。

そこでGeI<sub>2</sub>のGe-73 NMRを測定したところ、予  
期とおり、溶液試料は信号を与えなかったが、固体  
試料はδ -213.4に半値幅 273 Hz.の信号を与えた。  
これは高配位ゲルマニウム化合物の世界最初の固体  
高分解能 MAS スペクトルである。

対称性が良ければ、高配位化合物でも信号を与  
えることが確認されたので、我々は bis(1-pyrrolyl)  
(*meso*-tetraphenylporphyrinato)germanium を合  
成した。この化合物ではゲルマニウムは正八面体  
の中心にあって6個のピロール環に囲まれた六配位構  
造である。

測定の結果、予期通り、δ -259に半値幅 156 Hz  
の信号が観測された。<sup>1)</sup>これは高配位有機ゲルマニ  
ウム化合物での最初の観測例となる。

#### 文献

- 1) Takeuchi Y, Nishikawa M and Yamamoto H (2004)  
*Magn. Reson. Chem.* **42**: 907-909.

■報告書■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## メタクリル樹脂用ジクロロメタン代替無害接着剤の探索

大石不二夫<sup>1,2</sup> 笠井美由紀<sup>1</sup>

### Searching for harmless substitute solvents for dichloromethane to adhere PMMA solvening

Fujio Ohishi<sup>1,2</sup> and Miyuki Kasai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: fujio@chem.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) is good solvent to adhere PMMA, so it is used widely in industrial fields. It has a bad effect, however, on organisms and pollutes environment. Its solution and vapor have a toxic effect on blood and nerve centers. It is also said to cause mutation of the gene. When it is burned, dichloromethane generates phosgene ( $\text{CCl}_2\text{O}$ ) which is known as a poison and air polluting substance. It is a serious problem that dichloromethane is harmful to our health. The purpose of this study is to search for reagents that have as high performance for adhesives as dichloromethane, and that don't have a bad effect on organisms and the environment. The specimens were PMMA plates (1mm×1cm×5cm) made by injection molding, with an average molecular weight between 100,000 and 150,000. First, we selected several solvents were PMMA. Then, solvents were analyzed with FT-IR and TG/DTA for chemical changes, and the peeling test for measuring the adhesion strength, compared with dichloromethane. It was proposed that *Acetone*, *Ethylene glycol monomethyl ether* and *2-Ethoxy ethanol* are possible and the results substitutes dichloromethane for adhering PMMA.

**Keywords:** PMMA plates, harmless solvent, adhesion effect, adhesion strength, chemical change

## 序論

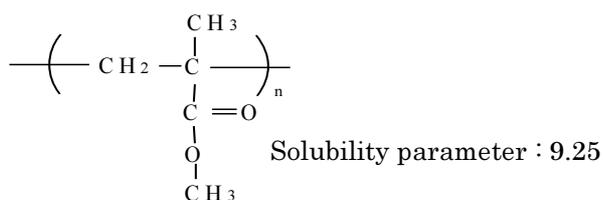
メタクリル樹脂の接着剤として従来使われてきたジクロロメタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )は経口摂取により血液および中枢神経系に影響を及ぼすほか、突然変異原性がある。また加熱すると分解し、非常に有害な気体ホスゲン( $\text{CCl}_2\text{O}$ ) (別名: オキシ塩化炭素) を発生<sup>1)</sup>させるので、生体や環境に悪影響を及ぼす物質として近年大きな問題として取り上げられてきた。本研究では従来使われてきたジクロロメタンと同じような機能を持ち、かつ生体や環境に悪影響を及ぼすことのない溶剤の探索を行うことを目的とする。本研究ではまず文献調査を行い、溶剤として利用できそうな化合物をピックアップして、実際にメタクリル樹脂への接着効果があるかどうか (メタクリル樹脂が溶けてくっつくか、溶けないか) 予備実験を行う。予備実験の方法はメタクリル樹脂の試験片 (縦 5cm、

横 1cm の長方形) を 2 枚用意し、一枚に溶剤を付け、溶剤を付けた面ともう 1 枚の試験片を重ね合わせて行う。この予備実験で効果が見られたものをさらに詳しく研究し、ジクロロメタンを使ったときの結果を比較しながら、メタクリル樹脂の溶剤として適しているのかということ判断する。また本研究ではジクロロメタンを使用した時の力の学的強度だけを比較するのではなく、赤外吸収スペクトルと熱分析を行い、化学的特性の変化の比較も行う。

## 材料と方法

### メタクリル樹脂

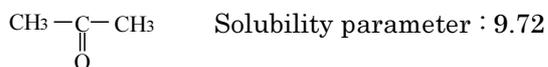
PMMA (メタクリル酸メチル) と少量のアクリル酸の低級エステル類との共重合体であって、分子量 5~30 万程度のものとされている。<sup>2)</sup>



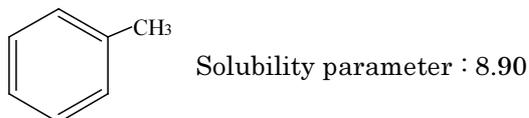
**溶剤**

本研究では文献調査をもとに、エーテル、ケトン、芳香族炭化水素を中心に行った。その中でも予備実験において効果が確認された溶剤 6 種類と比較実験の為のジクロロメタンの合計 7 種類の溶剤について研究を行った。7 種類の溶剤は以下に示す。

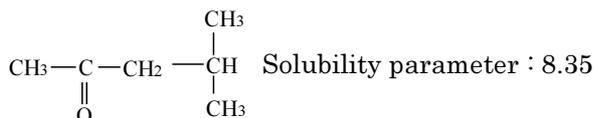
• Acetone



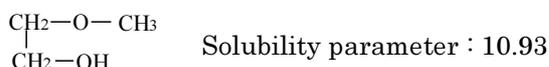
• Toluene



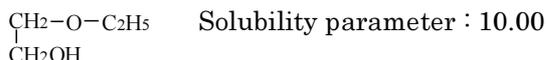
• 4-Methyl-2-pentanone



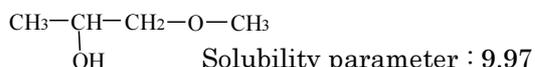
• Ethylene glycol monomethyl ether



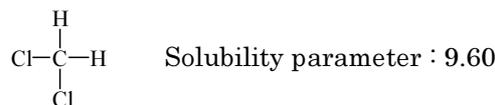
• 2-Ethoxy ethanol



• Propylene glycol monomethyl ether



• Dichloromethane



**赤外吸収スペクトル法**

メタクリル樹脂に溶剤を塗布することにより、化学構造(官能基)に変化がないかを調べる目的で赤外吸収スペクトル測定を行う。本研究の試料は硬い性質を有すること、試料に溶剤を塗布したときに表面に凹凸が生じる可能性があることなどを考慮し、固体のまま測定できる顕微 FT-IR はレンズを試料に押し付ける際に接触不良を起こす可能性があり、本研究においては不向きであると判断した。このことより溶剤を付着させたアクリル板を測定するのではなく、一度溶剤で溶解したメタクリル樹脂の溶液をシャーレに流し込み、真空乾燥機に入れ、得られたフィルムをさらに細かい粉体にし、基準となるアクリル板自体の測定はメタクリル樹脂を削り、細かく粉砕したものを FT-IR (拡散反射法) により測定した (Table 1)。

Table 1. IR measurement conditions

Apparatus	FT/IR 350 (JASCO)
Scan speed	2mm/sec
Resolution	2/cm

**熱分析**

メタクリル樹脂に溶剤を塗布することにより、化学的に変化がないかを調べる目的で本実験を行う。熱分析は TG (熱重量測定) と DTA (示差熱分析) について行う。特に TG ではメタクリル樹脂そのものと、溶剤で溶かしてフィルムにしたものの温度と重量の差(減量率)を測定することで熱分解反応の過程を詳しく調べ、比較する目的を持つ。Table 2 は ~

Table 2. TG/DTA measurement conditions

Apparatus	TG8120 (Rigaku)
Reference	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Sample pan	Al
Atmosphere	Air
Rate	4.0°C/min
Max temperature	500°C

### ピーリング試験

従来使用されている  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  と新溶剤を使用したときの接着強度を比較する目的で行なう。

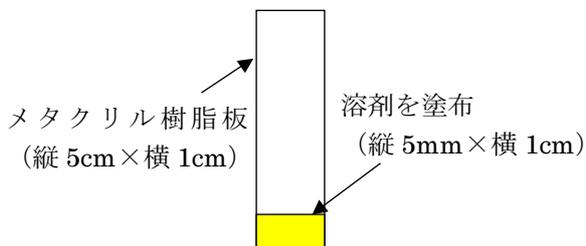


Fig.1. Peeling test sample.



Fig.2. Peeling test sample (side).

縦 5cm×横 1cm のメタクリル樹脂板を 2 枚用意し、一枚に Fig.1.に示した通り溶剤を縦 5mm×横 1cm に塗布し、もう一方を上から接着し、これを試験片とした。溶剤を塗布していない側 (Fig.2 では右側にあたる) の下面の板だけピーリング試験機に固定し、測定器に接続した上面を垂直に引っ張るようにして試験を行った。

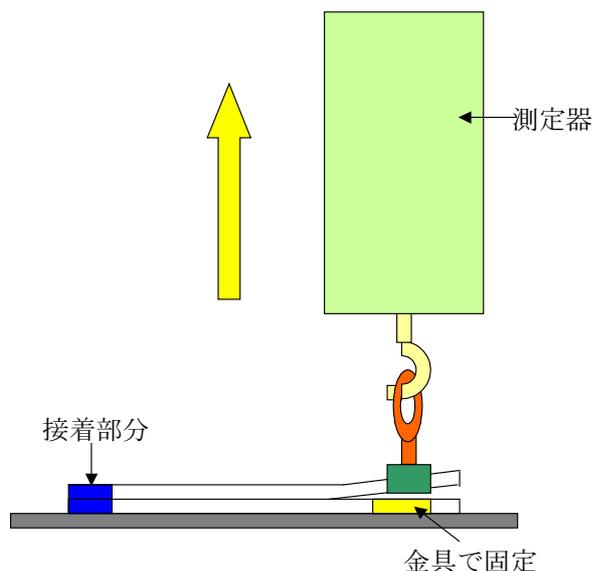


Fig.3. System of the peeling test.

### 結果と討論

#### 赤外吸収スペクトル法

溶剤をメタクリル樹脂に付着させた時の化学構造の変化がないかを調べる目的で行った。実験結果は Fig. 4 に示す。またその帰属は Table 4 に示す。

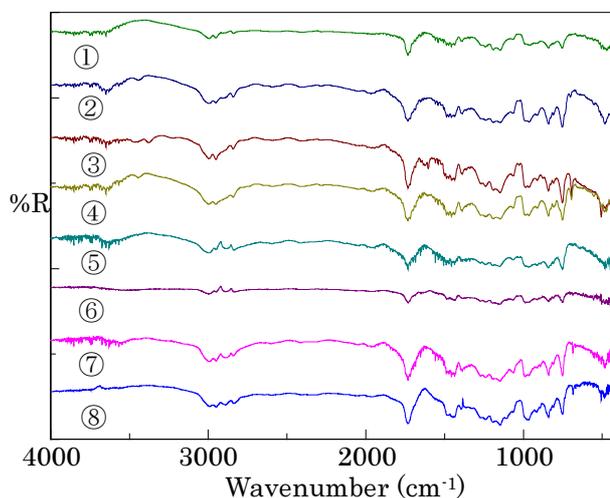


Fig.4. IR spectra of the PMMA and PMMA film.

- ① PMMA, ② PMMAfilm (solvent: Dichloromethane), ③ PMMA film (solvent : Acetone), ④ PMMA film (solvent : Toluene), ⑤ PMMA film (solvent : 4-Methyl-2-pentanone), ⑥ PMMA film (solvent : Ethylene glycol monomethyl ether), ⑦ PMMA film (solvent : 2-Ethoxy ethanol), ⑧ PMMA film (solvent : Propylene glycol monomethyl ether).

Table.4. Spectra assignment<sup>9)</sup>

Wavenumber	Assignment
2970 $\text{cm}^{-1}$	C-H stretching vibration of the methyl group
2840 $\text{cm}^{-1}$	C-H stretching vibration of the methylene group
1730 $\text{cm}^{-1}$	C-O-C stretching vibration of the methyl ester
1470 $\text{cm}^{-1}$	C-H deformation vibration of the methyl ester
1450 $\text{cm}^{-1}$	Deformation vibration of the methyl group
1385 $\text{cm}^{-1}$	C-H deformation vibration
1150 $\text{cm}^{-1}$	C-O-C stretching vibration of the methyl ester
960 $\text{cm}^{-1}$	C-H deformation vibration
750 $\text{cm}^{-1}$	C-H deformation vibration of the methyl ester

### 熱分析

溶剤をメタクリル樹脂に付着させた時、接着効果があるものの、物性の変化（例えば化学構造の変化や耐熱に関する変化）が起こってしまうようでは、溶剤としてあまり好ましいものとは言えない。本実験では溶剤がメタクリル樹脂に与える物性の変化（熱反応過程）を調べる目的で行った。メタクリル樹脂を各々の溶剤に溶解させ、真空乾燥機でフィルムにし、さらに細かくしたものを試料とした。Figs.5-11はそれらの結果を示す。

### ピーリング試験

本研究では7種類の溶剤に関してFT-IR、熱分析を行ったが、トルエンにおいては毒性が高く、無害溶剤探索という本研究の目的から逸脱するため、ピー

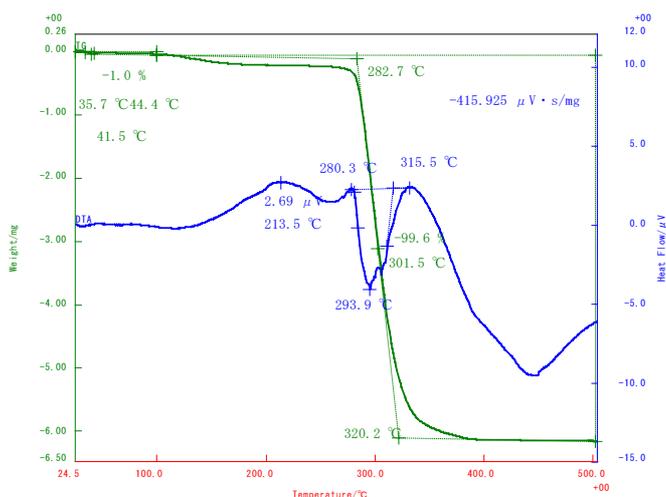


Fig.7. TG/DTA curve of PMMA film (solvent: acetone).

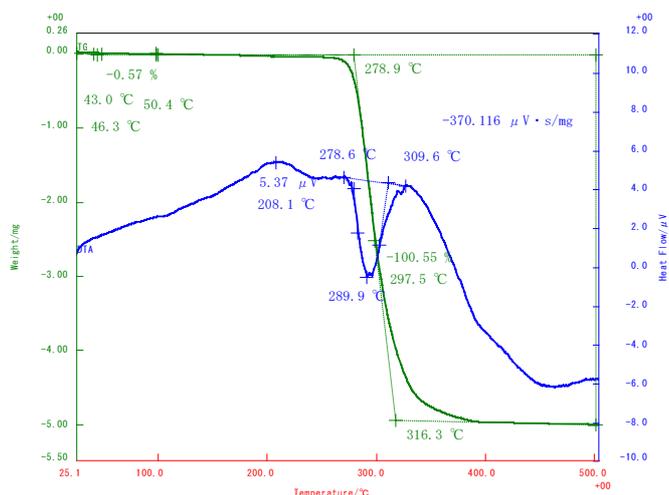


Fig.5. TG/DTA curve of PMMA

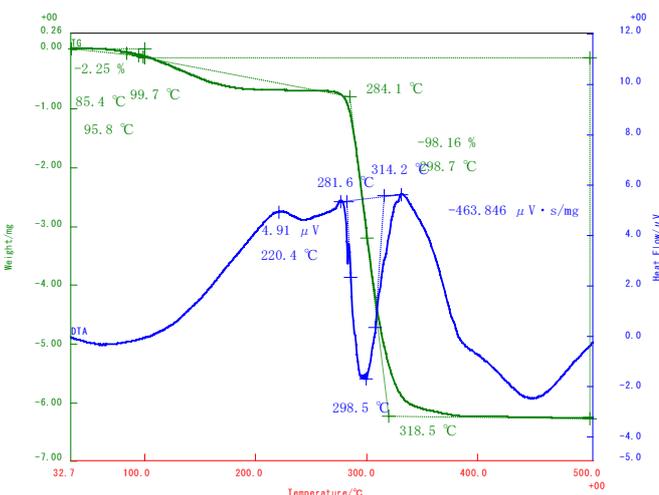


Fig.8. TG/DTA curve of PMMA film (solvent: toluene).

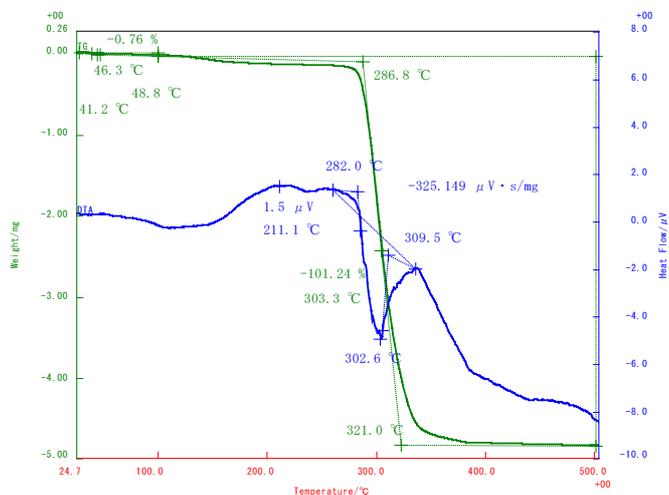


Fig.6. TG/DTA curve of PMMA film (solvent: dichloromethane).

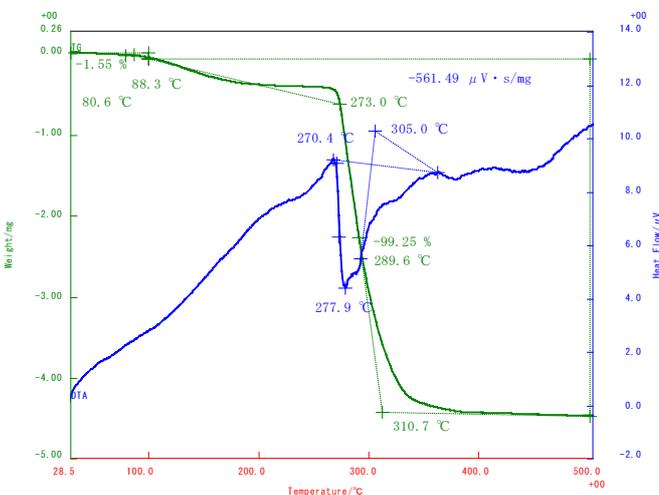


Fig.9. TG/DTA curve of PMMA film (solvent: 4-methyl-2-pentanone).

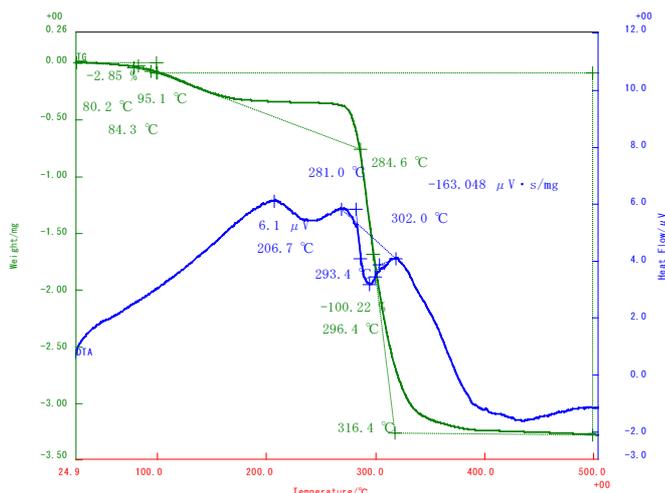


Fig.10. TG/DTA curve of PMMA film (solvent: ethylene glycol monomethyl ether).

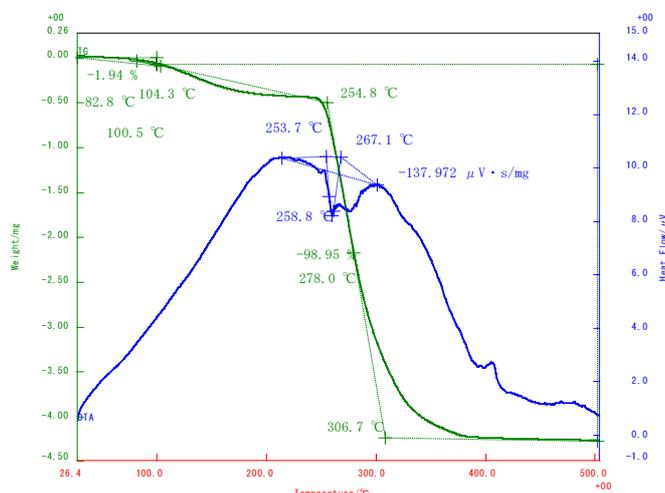


Fig.11. TG/DTA curve of the PMMA film (solvent: 2-ethoxy ethanol).

リング試験はトルエンを除いた 6 種類の溶剤で行うことにした。本実験で溶剤を剥離した際にかかる力学的強度を比較する目的で行った。試験結果は Table.5. に示す。

ピーリング試験でアセトンの平均値は 9.2N であり、ジクロロメタンに近い値が得られた。またジクロロメタンの平均に及ばないものの、エチレングリコールモノメチルエーテルもかなり強度が高いことが確認された。一方で 4-メチル-2-ペンタノンでは平均値 6.2N と低い値が確認された。

**結論**

FT-IR、熱分析から今回使用した全ての溶剤に関して、メタクリル樹脂に化学的変化を及ぼすものはなかった。しかしピーリング試験結果より、4-メチル-2-ペンタノンとプロピレングリコールモノメチルエーテルは接着強度が弱く、ジクロロメタンの代替

Table 5. Value of the peeling test

	n=1	n=2	n=3	Ave
Dichloromethane	8.5N	9.4N	9.7N	9.2N
Acetone	7.1N	9.2N	11.2N	9.2N
4-Methyl-2-pentanone	5.3N	6.4N	7.0N	6.2N
Ethylene glycol monomethyl ether	7.9N	7.9N	8.5N	8.1N
2-Ethoxy ethanol	6.8N	7.3N	7.3N	7.1N
Propylene glycol monomethyl ether	6.3N	6.4N	6.7N	6.5N

溶剤としては問題が残る。また芳香族化合物も接着に関してはある一定の効果が得られたものの、無害という観点から考えると、その探索はかなり厳しいものと考えられる。現時点ではアセトンが最も有力であり、エチレングリコールモノメチルエーテルと、2-エトキシエタノールも代替溶剤として使用できると判断した。

**今後の課題**

今年度は 6 種類の新しい溶剤を確認できたが、ケトン、エーテル化合物の中には今回用いた溶剤以外にもジクロロメタンの代替として機能できる可能性があり、さらに新しい溶剤の探索も今後の課題である。今年度代替溶剤として挙げられた溶剤も含め、来年度は接着の作業性という観点からも研究を行う必要がある。作業性を上げるということより、混合溶媒の探索を行うことも今後の課題と言える。また今年度は強度測定についてピーリング試験を用いたが、使用環境に合わせた促進劣化試験とその強度測定も必要なのではないかと考えられる。空気中の湿気の影響や冷熱サイクル、振動付加における耐久性の評価も重要になってくると言える。さらにヒノキやヒバの成分を用いたジクロロメタンの消臭剤も開発されており、その効果に関して今後の研究課題となっている。ヒノキの成分に関しては様々な溶剤に対しての消臭効果（例えばトルエンの場合約 10 分程度）が確認されており、消臭作用に伴う毒性の変化についてさらに研究を進める必要があると考えられる。

**文献**

- 1) 藤原鎮男監訳 (1990) ザックス有害物質データブック. 丸善株式会社, 東京.
- 2) 瓜生敏之 堀江一之 白井振作共著 (1998) ポリマー材料. 東京大学出版会, 東京.
- 3) 堀口博著 (1993) 赤外吸光図説総覧. 三共出版, 東京



monomolecular layers containing nitrobenzyl ester,  
Nakayama H, Yamaguchi K (2003) *Polym. Prep.*

*Jpn.* **52**: 820.

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## ヒノキチオール金属錯体の合成、X線構造解析および抗菌活性

野宮健司<sup>1</sup> 清水克也<sup>2</sup> 木村卓央<sup>3</sup>

### Synthesis, X-Ray Crystal Structures and Antimicrobial Activities of Transition-Metal Complexes with Hinokitiol Ligand

Kenji Nomiya<sup>1,4</sup>, Katsuya Shimizu<sup>2</sup> and Takao Kimura<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Materials Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Specialty Chemicals Research and Development Center Nobeoka Department, Asahi Kasei Corporation, Nobeoka, Miyazaki 882-0847, Japan

<sup>3</sup> Technical Development Division, Tokuriki Chemical Research Corporation, Sagami Factory, Yamato, Kanagawa 242-0012, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: nomiya@chem.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** There exist at least three different polymorphs in the copper(II) complex [Cu(hino)<sub>2</sub>] with a hinokitiol ligand (Hhino; 4-isopropyltropolone). In addition to deep-green plate crystals **1a** and deep-green rod crystals **1b**, whose crystal structures have been recently reported, novel green needle crystals **1c** of [Cu(hino)<sub>2</sub>] were found, the crystal structure of which was here determined by single-crystal X-ray analysis. Since only one crystal structure has been reported for the copper(II) complex [Cu(trop)<sub>2</sub>] with a tropolone ligand (Htrop), the polymorphism found in the crystals of [Cu(hino)<sub>2</sub>] would be due to the presence of the isopropyl group on the tropolone ring. The synthetic conditions giving the three polymorphs in good yields were found and the crystals were characterized with elemental analysis, FT-IR, TG/DTA and X-ray powder diffraction (XPD) measurements, as well as solution molecular weight measurements for **1a**. The solid-state magnetic behaviors or the temperature-dependent magnetic susceptibilities were measured with Superconductivity Quantum Interference Devices (SQUID): **1a** showed a weak ferromagnetic interaction, **1b** showed a paramagnetic nature with  $S = 1/2$ , while **1c** showed a weak antiferromagnetic interaction. The antimicrobial activities for selected bacteria, yeasts and molds were also measured in the water-suspension system: **1a** and **1b** showed no activity, while **1c** showed modest activities, and these activities were compared with those of the neutral Hhino and the anionic hino<sup>-</sup> ligands.

**Keywords:** copper(II) complex with hinokitiol, crystal and molecular structures, polymorphism, X-ray powder diffraction, temperature-dependent magnetic susceptibilities, antimicrobial activities

天然系抗菌剤のヒノキチオール (Hhino; 4-イソプロピルトロポロン) を配位子とした銅(II)錯体 [Cu(hino)<sub>2</sub>] を合成した。合成条件により、3種類の異なる結晶構造が存在すること(多形現象)を見いだした。Hhino と CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O を 2 : 1 モル比で、水 : エタノール = 1 : 1 の混合溶媒の量を変えて還流した後、室温で slow evaporation して、濃緑色板状結晶 **1a** (収率 70%) および濃緑色柱状結晶 **1b** (収

率 76.5%) を得た。また一度単離したこれらの結晶を水 : エタノール = 1 : 1 の混合溶媒中で再び還流して、冷蔵庫内で slow evaporation して緑色針状結晶 **1c** (収率 65.3%) を得た。それらを元素分析、TG/DTA、FTIR、UV-vis 吸収、ESR、粉末X線回折、SQUID 測定、単結晶X線解析などでキャラクターゼーションした。いずれの分子構造も Cu<sup>2+</sup> : hino<sup>-</sup> = 1 : 2 型の平面正方形であるが、柱状結晶お

よび針状結晶にはトロポロン環 4-iPr 基の相対的位置に関する *trans*-型の monomer だけが含まれていたが、板状結晶には *cis*-および *trans*-型異性体の monomer および dimer が含まれていた。板状結晶および柱状結晶サンプルは抗菌性を全く示さなかったが、針状結晶サンプルは広いスペクトルの抗菌活性を示した<sup>1,2)</sup>。

## 文献

1) Nomiya K, Yoshizawa A, Kasuga NC, Yokoyama H

and Hirakawa S (2004) Synthesis, solid state characterization and antimicrobial activities of three different polymorphs of a copper(II) complex with 4-isopropyltropolone (hinokitiol). *Inorg. Chim. Acta* **357**: 1168-1176.

2) Nomiya K, Yoshizawa A, Tsukagoshi K, Kasuga NC, Hirakawa S and Watanabe J (2004) Synthesis and structural characterization of silver(I), aluminium(III) and cobalt(II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver (I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities. *J. Inorg. Biochem.* **98**: 46-60.

■報告書■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## ケナフ植生による重金属抽出

黒澤祥子<sup>1</sup> 大石不二夫<sup>1,3</sup> 鈴木祥弘<sup>2</sup> 澤上航一郎<sup>2</sup>

### Heavy Metal Extraction by Kenaf Vegetation

Shoko Kurosawa<sup>1</sup>, Fujio Ohishi<sup>1,3</sup>, Yoshihiro Suzuki<sup>2</sup> and Koichiro Sawakami<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, KANAGAWA University, Hiratsuka-City, kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Science, Faculty of Science, KANAGAWA University, Hiratsuka-City, kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: fujio@chem.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Kenaf (British great Kenaf, scientific name *Hibiscus cannabinus* L) is an annual plant of Malvaceae Hibiscus L. of West African origin, and is remarkable as a new pulp resource. Its ability to fix carbon dioxide is excellent because growth is rapid, and it is reported that its ability equals that of tropical forests. In addition, it is possible to use it for soil cleaning and water quality purification. This research, focussed on kenaf's high water absorption capacity from the soil and its ability, to remove heavy metals from the soil, especially lead, and to reduce ground water pollution. Kenaf was grown in Hyogo Prefecture and kenaf and sorghum were grown in the tropical simulation room in our campus. These plants were burnt to ash, and the total quantity of absorbed lead was measured by atomic absorption spectrometry. Lead absorbed from the soil by kenaf vegetation was also clarified in samples processed with nitric acid. A large amount of lead was accumulated in the wood part but not so much was accumulated in the bark or the living parts of the plant. It is recommended that you should harvest to absorb the heavy metal efficiently while growing up.

**Keywords:** kenaf, sorghum, lead, atomic absorption spectrometry, ground pollution

## 序論

### 背景

地球は地殻に覆われ、地殻は岩石と土壌からなり、土壌は岩石が長年にわたり雨風などにより風化したもので、土壌の厚さは全陸地平均で約 20cm しかない。「土」という字は「一」が地面を「十」が地面に生育する植物を表し、「壤」は「豊穰」と同じ意味で穀物が良く実ることを意味する。つまり土壌は、植物の生育基盤であり、人間も含めた動物に食糧を供給している。また、植物・動物の遺体や排泄物を土壌中の生物が分解し、土壌は植物の栄養源となっている。このように、土壌は大気や水と並び、陸地の植物、微生物、昆虫、鳥類、魚類、哺乳類などの生態系維持を欠くことのできない重要な役割を果たしている。

土壌・地下水汚染とは、汚染物質が土壌に浸透して土壌を汚染するのみならず、地下水まで汚染する

ことであり、地質汚染や地下環境汚染ともいう。重金属類は、比重が 4 以上と重く、土壌に吸着されやすく、水にも溶けやすい（特に酸性水）ので、土壌汚染や地下水汚染を起こす。

現代文明は、「地下資源文明」といわれるほど、地下資源に依存している。地下から金属、石炭、石油、石灰石、土石などの地下資源を大量に採掘し、これらを原燃料として工業製品を大量に生産し、大量に消費し、最後に大量に廃棄している。そして資源採掘、生産、消費および廃棄の各プロセスにおいて、重金属類、化学物質、放射性物質などの汚染物質を環境中に排出し、環境を汚染する。環境汚染は、大気、水質、土壌、生物などさまざまな媒体で発生し、植物などとしてこれらを体内に取り込む人間にも影響する。

大気汚染や水質汚濁と異なり、土壌・地下水汚染

は目に見えない地下で起こり、蓄積性汚染なので発見しにくく、発見されても対策が困難な場合が多く、汚染の浄化には長い時間と多額の費用を必要とする特徴がある。汚染源としては、工場の工程・施設・床面などからの汚染物質の漏洩、汚染物質を含む工場排水の地下浸透、汚染物質を含む廃棄物処分場からの排水や地下浸透などが多い。汚染物質としては、重金属類、化学物質、放射性物質などと多岐にわたる。

また、ケナフ（英名 Kenaf 学名 *Hibiscus cannabinus* L.）は、西アフリカ原産のアオイ科（Malvaceae）フヨウ属（*Hibiscus* L.）の一年草の植物であり、新パルプ資源として注目を浴びている。成長が早いため二酸化炭素の固定能力が優れており、その能力は熱帯雨林にも匹敵することが報告されている。土地の有効利用を考え栽培を行えば森林保護にも繋がり、さらに土壌改良や水質浄化にも利用できる。今まで報告されているケナフが吸収する元素や金属は、窒素（N）、リン（P）、ナトリウム（Na）、ホウ素（B）、カルシウム（Ca）、鉄（Fe）、マグネシウム（Mg）、マンガン（Mn）、ニッケル（Ni）、亜鉛（Zn）、銅（Cu）、カドミウム（Cd）、鉛（Pb）、セレン（Se）などがある。

### 目的

本研究では、ケナフの持つ土壌からの水分など高い吸収能力を活用して、土壌中の重金属、特に鉛を土壌中から除去し、土壌汚染を改善することを目的とする。最終的には宅地や農地などへの再利用を目標に掲げる。

兵庫県で栽培したケナフ、さらに校内の熱帯シミュレーションシステムで栽培したケナフを乾燥させて、茎を皮と木質部に分ける。これらの試料を灰化させ、硝酸で処理した試料を原子吸光分析測定することによって、ケナフがどれだけ鉛を吸収したかが分かり、ケナフ植生による土壌中の鉛吸収性を解明する。

## 試料と方法

### 試料

本研究では、兵庫県にある工場の敷地内と校内の熱帯シミュレーションシステムでの水耕栽培及び別の汚染土壌を用いて栽培したケナフを使用する。

ケナフと比較を行うために、トウモロコシ科のソルガムを兵庫県の工場敷地内で栽培しているものを用いる。また、ケナフやソルガムの栽培前後で土壌中の鉛の濃度を測定するために、土壌を採取し、測定を行う。

10月の兵庫県のケナフは地表から120cmのところまで上下に区切り、ソルガムは地表から100cmのところまで上下に区切った。また、土壌の表土は根にまわり付いていた土を採取し、深土は約30cm以下の土を採取した。それぞれの試料の概要を表1に示す。

表1. 試料

試料	育生場所等	種類
ケナフ	兵庫県 水耕栽培 別土壌	EVERGRADES41 (アメリカ産)
ソルガム	兵庫県	ファーストソルゴー (サカタの種)
土壌	兵庫県 別土壌	— —

### 原子吸光分析法

AAS（フレイム原子吸光分光法）やFLAA（フレイムレス原子吸光分光法）では、重金属元素を原子の蒸気にして、中空陰極ランプを用いて特定の波長の光を原子蒸気に当てる。このときに光の一部は原子にエネルギーを与えて原子の電子状態を励起させ、特定の波長の光の吸収が光電子増倍管やフォトダイオードで検出される。原子の数が多くほど、エネルギーを失う光の量も増加するので、光の吸収量は原子の濃度に比例する。また、吸収される光の波長は原子の種類によって異なるため、これらの原子の励起状態に適した様々な波長の光を照射する単色光ランプを使うことにより、様々な重金属の濃度を測定できる。

フレイム原子吸光分光法では試料原子化部でアセチレンなどを燃焼させ、そのアセチレンの燃焼で発生する炎（フレイム）中に試料溶液を噴霧して、炎の中で検液中に溶存する重金属を原子蒸気化している。非常に感度が高く、試料中の鉛元素の定性及び定量を行う。

本研究では原子吸光分析の検量線法を用いるために、基準の溶液の鉛の濃度を 5 ppm、3 ppm、2 ppm、1 ppm、0.5 ppm、0 ppm に設定した。

試料の調整方法は、植物体は乾燥させて粉末状にし、1g 測り取ったものを灰化させてから、0.1 mol/l の硝酸に溶かす。土壌試料は、まず純水で洗浄して乾燥させてから 1g 測り取り、0.1 mol/l の硝酸に溶かす。

表 2. 原子吸光分析の測定条件

分析機器	島津原子吸光フレーム分光光度計
分析線波長	283.3 nm
	AA-660

結果

ケナフが鉛をいくら吸収したか、また土壌からどの程度の鉛が減少したかを調べるために原子吸光分析を行った。測定結果を示した表を表 3~5 に示す。土壌の鉛の濃度の変化および植物体の鉛濃度の変化を図 4~7 に示す。

また、測定した際の検量線のグラフおよび近似線の式を図 1~3 に示す。

表 3. 原子吸光分析の結果

Sample	Conc.(ppm)	absorbance
検量線用標準溶液	0	0
	0.5	0.012
	1	0.024
	2	0.047
	3	0.07
	5	0.116
未知 10000 倍希釈	0.531	0.012
未知 100 倍希釈	41.59	0.82
未知試料	93.93	1.591

表 4. 原子吸光分析の結果

Sample	Conc.(ppm)	absorbance
検量線溶液	0	0
	0.5	0.012
	1	0.024
	2	0.049
	3	0.071
	5	0.119
ケナフ 木質部 まびき	0.581	0.014
ケナフ 葉 まびき	0.194	0.004
ケナフ 皮 まびき	0.096	0.001
ソルガム 茎 まびき	0.169	0.003
ソルガム 葉 まびき	0.744	0.018
5 月兵庫 表土①	3.242	0.078
5 月兵庫 深土①	0.185	0.004
5 月兵庫 表土②	4.763	0.113
5 月兵庫 深土②	0.275	0.006
5 月兵庫 表土③	4.03	0.096
ケナフ 葉 未知濃度土壌	0.204	0.004
ケナフ 木質部 未知濃度土壌	0.407	0.009
ケナフ 皮 未知濃度土壌	0.211	0.004
10 月兵庫 ケナフ 表土①	5.642	0.133

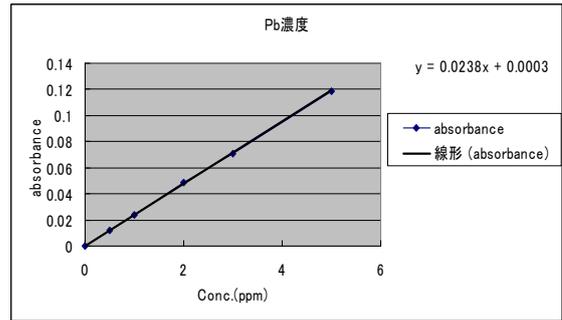


図 1. 表 3 の試料を測定した際の検量線および近似線式.

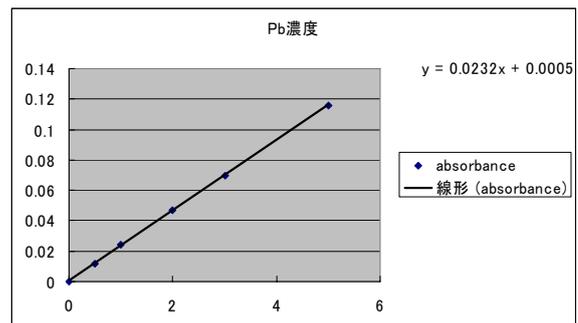


図 2. 表 4 の試料を測定した際の検量線および近似線式.

表 5. 原子吸光分析の結果

Sample	Conc.(ppm)	absorbance	
検量線溶液	0	0	
	0.5	0.011	
	1	0.024	
	2	0.047	
	3	0.073	
	5	0.117	
5 月兵庫 深土③	100 倍希釈	0.711	0.017
10 月兵庫 ケナフ 深土①	100 倍希釈	0.408	0.01
10 月兵庫 ケナフ 深土②	100 倍希釈	0.859	0.021
10 月兵庫 ケナフ 深土③	100 倍希釈	0.394	0.009
10 月兵庫 ソルガム 深土②	5 倍希釈	1.698	0.041
10 月兵庫 ソルガム 表土②	5 倍希釈	2.029	0.049
10 月兵庫 ケナフ 表土②		3.347	0.079
10 月兵庫 ケナフ 表土③		5.081	0.119
10 月兵庫 ソルガム 表土①		5.959	0.139
10 月兵庫 ソルガム 深土①		2.189	0.052
10 月兵庫 ソルガム 表土②		3.335	0.079
10 月兵庫 ソルガム 深土③		1.932	0.046
ケナフ 10 月兵庫 葉 上		0.23	0.005
ケナフ 10 月兵庫 葉 下		0.397	0.009
ケナフ 10 月兵庫 皮 上		-0.013	0
ケナフ 10 月兵庫 皮 下		0.02	0
ケナフ 10 月兵庫 木質部 上		0.088	0.002
ケナフ 10 月兵庫 木質部 下		0.423	0.01
ケナフ 10 月兵庫 落ち葉		0.425	0.01
ケナフ 10 月兵庫 根		0.47	0.011
ケナフ 10 月兵庫 生殖 (つぼみ)		0.021	0
ケナフ 10 月兵庫 葉 上 2		0.257	0.006
ソルガム 10 月兵庫 茎 上		0.201	0.005
ソルガム 10 月兵庫 茎 下		0.328	0.008
ソルガム 10 月兵庫 葉 上		0.523	0.012
ソルガム 10 月兵庫 葉 下		0.572	0.014
ソルガム 10 月兵庫 根		0.576	0.014

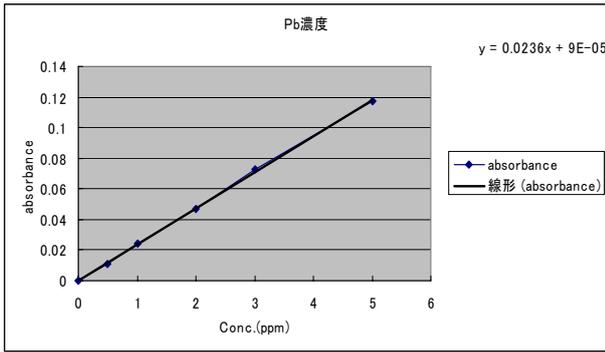


図 3. 表 5 の試料を測定した際の検量線および近似線式.

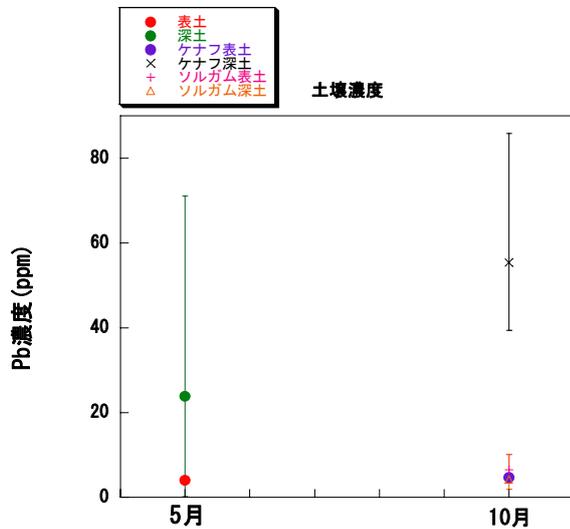


図 4. 土壌の鉛の濃度の変化.

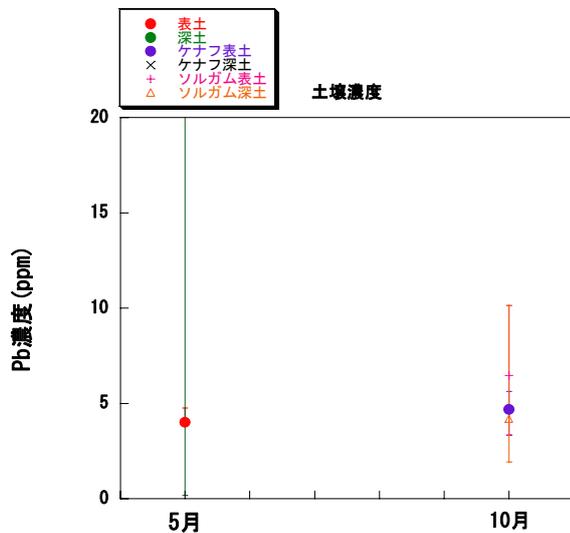


図 5. 図 4 のスケール変更した土壌の鉛の濃度の変化.

土壌の鉛の濃度は、5月に比べると10月の土壌の方が全体的に濃度が濃くなってしまった。このことは、8月の植物体と比較したときに10月の方が濃度が低くなっていることから、植物が鉛を毒だと判断し体内に吸収した鉛を排出してしまったのではないかと考えられる。

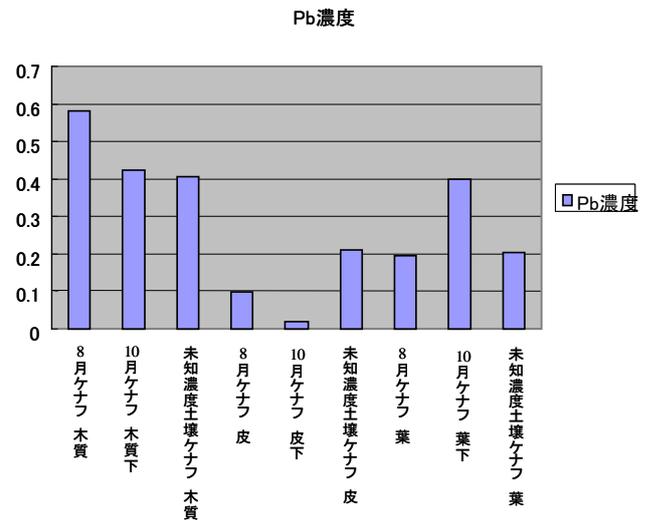


図 6. ケナフの Pb 濃度の変化.

ケナフの茎は皮よりも木質部の方が鉛を多く吸収している。このことより、植物の生きている部分である皮には鉛があまり蓄積されず、死亡している部分である木質部に多く鉛を蓄積していると考えられる。

ケナフでは、根から多くの鉛が検出された。落ち葉からは茎の部分で一番濃度が高かった木質部の下部と同等な濃度の鉛が検出された。

間引きをした8月の植物と10月に刈り入れをした植物を比較すると、ケナフでは葉以外の植物体から10月より8月の方が鉛を多く検出した。しかし、ソルガムでは葉の方が茎よりも鉛の濃度が高いことがわかった。

熱帯シミュレーションシステムにおける未知濃度土壌で栽培したケナフは、木質部に多く鉛が検出された。しかし、土壌の鉛の濃度が圧倒的に高いのに吸収した量は尼崎のケナフと大きな差は見られなかった。

ケナフおよびソルガムに共通しているのは、ケナフの場合120cm以下、ソルガムの場合100cm以下の植物体の方が鉛を多く吸収している。ソルガムでは葉に多く鉛が検出された。また根からも同等な濃度の鉛が検出された。

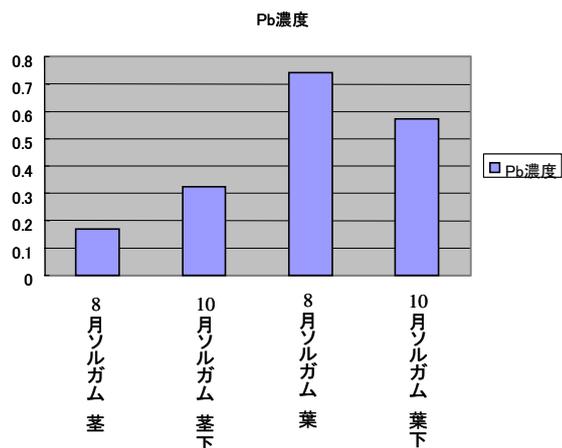


図 7. ソルガムの Pb 濃度の変化.

## 討論

ケナフは成長期に多く鉛を吸収し、成長が終わると逆に有毒と判断した物質を体外に排出してしまうと考えられる。ゆえに、効率良く重金属を吸収させるには、

成長途中で刈り入れた方が良いと考えられる。

また、ケナフよりソルガムの方が鉛を吸収しているので、より多くの重金属を吸収させるにはソルガムを使用したほうが良いと考えられる。

今後の課題として、水耕栽培を行い、重金属類の不純物を注入しない状態でケナフの体内にどのような金属が存在しているかを ICP 測定で確認する。そうすることで、汚染された土壌で栽したケナフがどの程度汚染物質を吸収したかが分かると考えられる。また、8月の間引きでの土壌の濃度を調べることによって、土壌中の鉛の濃度の変化傾向がわかる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力を賜ったスミコンセルテック株式会社の森田正氏、二見達也氏、全面的なご指導ご鞭撻を賜わり、ご協力等いただきました西本研究室の西本右子先生、金生谷猛氏、本研究室の岸本龍介氏に深く感謝申し上げます。

■報告書■ 2004 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## 機能水の微生物の増殖効果

井上和仁

### Effect of Proliferation of Microorganisms in “Functional Water”

Kazuhito Inoue

Department of Biological Sciences and <sup>2</sup>Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan  
E-mail: inoue@bio.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** There is a growing interest in special kinds of treated water with properties which differ from those of ordinary water. The aim of this research is to study the effect of the proliferation of microorganisms in “Functional Water”.

**Keywords:** functional water, magnetic treatment, ultraviolet light irradiation, ultrasonic wave treatment, bound

ある種の水溶液に何らかの処理を施すことで、ある機能を持たせた水を、一般的に“機能水”と呼ぶ<sup>1)</sup>。水溶液に電場、磁場、超音波、圧力などを加えたり、光や音をあてたり、電解したり、膜を通過させたり、鉱物やセラミックスと接触させたり、脱気したり、気体を吹き込んだり等々、様々な処理を施すことによりいろいろな機能水を調製することが可能である<sup>1)</sup>。このうち、0.1%以下の塩化ナトリウムや塩化カリウムなどの強電解質を添加した水溶液を電解して得られた強酸性電解水は強い殺菌作用を持つこと

が知られている<sup>2,3)</sup>。この場合、殺菌作用は塩化物塩の電気分解によって生じる次亜塩素酸による作用であり、水溶液の pH や温度は次亜塩素酸の水溶液中での電離平衡に影響するので電解水の安定性に大きく関与していることが報告されている<sup>4)</sup>。

本研究は、生物学的な観点から、機能水の微生物の増殖効果を調べ、有効な防菌・抗菌法を検討することを目的としている。本年度は、予備的な調査研究を開始し、数種の細菌の培養を行った(表1)。

表 1. 本研究で準備した細菌種

種名	分類群	摘要
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	プロテオバクテリア	光合成細菌
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	プロテオバクテリア	光合成細菌
<i>Blastochloris viridis</i>	プロテオバクテリア	光合成細菌
<i>Acidophilium rubrum</i>	プロテオバクテリア	好酸性細菌
<i>Acidosphaera rubrifaciens</i>	プロテオバクテリア	好酸性細菌
<i>Rizobium meliloti</i>	プロテオバクテリア	根粒細菌
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	プロテオバクテリア	植物病原菌
<i>Heliophilum fasciatum</i>	グラム陽性菌群	光合成細菌
<i>Heliobacillus mobilis</i>	グラム陽性菌群	光合成細菌
<i>Staphylococcus aureus</i>	グラム陽性菌群	黄色ブドウ球菌
<i>Chlorobium tepidum</i>	緑色硫黄細菌群	光合成細菌
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	緑色滑走細菌群	光合成細菌
<i>Synechocystis sp. PCC6803</i>	シアノバクテリア	ラン藻
<i>Anabaena PCC7120</i>	シアノバクテリア	ラン藻

### 文献

- 1) 西本右子 (1999) 機能水の分析. *FRAGRANCE JOURNAL* 3:23-26.
- 2) 岩沢篤郎, 中村良子, 重山かの, 丹羽友和, 西本右子 (2002) 強酸性電解水の有効塩素測定法. *防菌防黴誌* 30(10):627-633
- 3) 岩沢篤郎, 中村良子, 丹羽友和, 西本右子 (2002) 強酸性電解水の殺菌効果に対する pH の影響. *防菌防黴誌* 30(10):635-643.
- 4) 西本右子, 井上 啓 (2004) 電解水の安定性に対する pH および温度の影響. *機能水研究* 2(2):71-74.

■報告書■ 2004年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

## 光合成細菌を利用した環境保全のための基盤技術開発

井上和仁<sup>1,2,4</sup> 桜井英博<sup>3</sup> 増川 一<sup>1</sup> 中原昌明<sup>2</sup>

### The Study of Basic and Technological Development for Environmental Preservation using Photosynthetic Prokaryote

Kazuhito Inoue<sup>1,2,4</sup>, Hidehiro Sakurai<sup>3</sup>, Hajime Masukawa<sup>1</sup>, Masaaki Nakahara<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences and

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293

<sup>3</sup> Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8050

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: inoue@bio.kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Technological development for environmental preservation is a subject of pressing need in the 21st century. The aim of this research is to develop a basic technology for environmental preservation using phototrophic prokaryotes.

**keywords:** photosynthetic bacteria, cyanobacteria, environmental preservation, iron-sulfur cluster, hydrogen production

水素発生、微生物ポリマー、廃棄物処理、環境修復など環境保全のための技術開発は急務の課題である。本研究は生理生化学、遺伝子工学などの基礎研究を通じ、光合成細菌やシアノバクテリアを利用した環境保全のための基盤技術の開発を目的とし、本年度は次のような研究を行った。

(1) 緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の鉄硫黄クラスターアッセムブリファクターに関する研究

(2) シアノバクテリアの水素生産性向上に向けたニトロゲナーゼの改良に関する研究

#### (1) 緑色硫黄細菌 *Chlorobium tepidum* の鉄硫黄クラスターアッセムブリファクターに関する研究

鉄硫黄クラスターはフェレドキシン、鉄硫黄型反応中心、ニトロゲナーゼ等の電子受容体成分であるが、その合成過程についてはほとんど不明のままであった。最近、窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* や大腸菌 *Escherichia coli* などの研究から IscR、IscS、IscU、IscA、HscA、HscB といった鉄硫黄クラスターの合成や鉄硫黄タンパク質のアッセムブリ過程に関与するファクターが存在することが明らかになってきた。*A. vinelandii* や *E. coli* などでは、これらのアッセムブリファクターをコードする遺伝子がゲノム上で *iscRSUA-hscBA-fdx* という遺伝子クラスターとして存在する。しかしながら *C. tepidum* のゲノム上には *iscRSUA-hscBA-fdx* 遺伝子クラス

ターは見られず、各遺伝子は数個の遺伝子のまとまりとして染色体上に散在している。また、*iscSU* は1コピーしか持たず、*iscA* は見つからない。本研究は、*C. tepidum* の鉄硫黄クラスターアッセムブリ過程を明らかにするために、*C. tepidum* の IscS と IscU の大腸菌内での発現系を構築し、次のような結果を得た。

*C. tepidum* の *iscS* を His-Tag が付加する形で発現ベクター pET23b ベクターにクローニングし、大腸菌株 BLR(DE3)pLysS 内に導入した。標準的な条件 (1 mM IPTG、25°C、5 時間) で誘導したところ、目的タンパクはすべて不溶性画分に封入体を形成してしまっただけで発現条件を検討し、より緩やかな発現条件 (10 μM IPTG、14°C、5 時間) で、目的タンパク質を可溶性画分に発現させることができた。His-Tag を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより IscS を精製し、SDS-PAGE によりほぼ均一のバンドになるまで精製できた。アフィニティークロマトグラフィーで分離された目的タンパク質を含む溶液は茶色をしており、そのまま数時間放置するとその色が薄くなり沈殿が生じた。しかし、溶出されたタンパク質画分を直ちに pH 9.0 の緩衝液に対して透析を行うことで色の変化も起こらず沈殿も見られなかった。これは、アフィニティークロマトグラフィーを行う際の pH が 8.0 であり、この pH では IscS が容易に変性してしまうことを示唆し

ている。続いて、精製過程で変性した IscS を用いてピリドキサルリン酸 (PLP) 存在下で再構成されるかを調べた。再構成前には 450 nm 付近に見られた吸収ピークが再構成後には PLP に特徴的な約 400 nm 付近にシフトした。これは PLP が IscS に結合し、再構成されたことを示唆する。

次に、*C. tepidum* の *iscU*(CT1994) を発現ベクター pET-23b にクローニングして IscU 大量発現系 (pET-23b::*iscU*) を作製した。pET-23b::*iscU* を導入した BLR(DE3)pLysS は  $Abs_{600} = 0.5$  になるまで振盪培養し、最終濃度 1 mM の IPTG を加え 20°C、120 rpm で 5 時間振盪した。菌体は 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT に懸濁し、超音波破碎装置を用い 50 W で破碎した。粗抽出液は 55°C、30 分間熱処理し、硫酸アンモニウム (硫酸) 分画法により粗精製し、Ether-トヨパール 650M (Tosoh)、DEAE-トヨパール 650M (Tosoh) 及び Mono Q 5/50 GL (Amersham Biosciences) カラムを用い精製した。Ether-トヨパールカラムは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT / 1.5 M  $(NH_4)_2SO_4$  で、DEAE-トヨパールカラムと Mono Q カラムは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT で平衡化し、それぞれ  $(NH_4)_2SO_4$  と NaCl の直線的濃度勾配でタンパク質を溶出した。Mono Q カラムを用いた精製には ÄKTA FPLC システム (Amersham Biosciences) を使用した。ESR スペクトルの測定は ESR 装置 (E500-10/12, Bruker Biospin) を用いた。pET-23b::*iscU* を導入した BLR(DE3)pLysS は  $Abs_{600} = 0.5$  になるまで振盪培養し、最終濃度 1 mM の IPTG を加え 20°C、120 rpm で 5 時間振盪した。回収した菌体を懸濁し、超音波破碎後に遠心分離して得た可溶性画分に大量発現した約 24 kDa の目的タンパク質を確認した。粗抽出液を熱処理し、遠心分離して回収した上清に対し 35・50% 飽和の硫酸で分画し目的タンパク質を含む沈殿を得た。回収した沈殿は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM DTT / 1.5 M  $(NH_4)_2SO_4$  に溶解し、Ether-トヨパールカラムに吸着させた。 $(NH_4)_2SO_4$  濃度 1 M 付近で溶出した目的タンパク質を含む画分を回収し、硫酸濃縮、透析脱塩後に DEAE-トヨパールカラムに吸着させた。NaCl 濃度 180 mM 付近で溶出した目的タンパク質を含む画分を回収し、透析脱塩後に Mono Q カラムに吸着させた。溶出した画分を回収

し、SDS-PAGE により目的タンパク質の精製度を確認した。精製したタンパク質の吸収スペクトルは、[2Fe-2S] クラスターの存在に特徴的な 330、420 及び 460 nm 付近に吸収極大を示した。また ESR 測定から精製された IscU には [2Fe-2S] 型の鉄硫黄クラスターが結合していることが示唆された。

## (2) シアノバクテリアの水素生産性向上に向けたニトロゲナーゼの改良に関する研究

大気中の  $CO_2$  を始めとする温室効果ガス濃度の顕著な上昇を受けて、地球温暖化に対する懸念から再生可能エネルギー源の開発に対する関心が世界的に高まりつつある。再生可能エネルギーの生物的生産方法としては、木材などバイオマスの直接燃焼のほか、発酵微生物を利用したメタン、水素の生産、光合成生物を利用した水素の生産などがある。われわれは長期戦略的視点から、ラン色細菌の光合成系、ニトロゲナーゼ系を利用した水素生産の研究開発計画を提案している。これまでに *Anabaena* PCC 7120 株で生成した水素を再吸収するヒドロゲナーゼの遺伝子 *hupL* 変異株を作製し、水素生産性を野生株の 4-7 倍に増大させることが出来た。本研究では、*hupL* 変異株を基に、水素生産性をさらに向上させると同時に高い活性を長期間持続させるため、*Anabaena* PCC 7120 野生株と *hupL* 株を親株として、ニトロゲナーゼの活性中心クラスターに配位するホモクエン酸の合成酵素遺伝子 (*nifV*) 破壊株を作製した。*Anabaena* PCC 7120 は、*nifV1* と *nifV2* の 2 コピー持つため、それらの一方または両方を破壊した 3 種の変異株、*nifV1*、*nifV2*、*nifV1/nifV2* 株を野生株と *hupL* 変異株のそれぞれから作製し、破壊株の水素生産の活性、持続性をガスクロマトグラフィーにより調べた。その内の一株は、*hupL* 株と比べ水素生産の最大活性がアルゴン気相下で約 2 倍増大し、窒素ガスを含む気相下ではさらに顕著に増大する結果を得た。さらに、基質還元を触媒する活性部位を持つニトロゲナーゼ  $\alpha$  サブユニットに部位特異的変異を導入した株を作製するため、*Anabaena* PCC 7120 のゲノムライブラリーを作製し、ニトロゲナーゼ構造遺伝子 *nifH*、*nifD*、*nifK* を単離し、まず *hupL* 変異株から *nifD* 変異株を作製した。

## 2004 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： 生物科学科 教授 齊藤光實  
 運営委員： 情報科学科 助教授 張 善俊  
             情報科学科 教授 中田穰治  
             化学科 教授 大石不二夫  
             化学科 教授 天野 力  
             生物科学科 教授 鈴木季直  
             生物科学科 教授 小笠原 強

#### (2) 顧問・特別所員・客員研究員

顧 問： 藤原鎮男、門屋 卓、村田健郎、  
           竹内義尚  
 特別所員： 小幡行雄、倉田吉喜、田仲二朗、  
             藤原 讓、釜野徳明、大橋 守、  
             猪木慶治、高木伸司、鈴木秀穂、  
             速水 格、村上 悟  
 客員研究員： 藤林俊生、平野哲也、松浦育敏  
             藤原昭子、豊泉和枝、河合 忍、  
             中原昌明、小石眞澄、高梨雅彦、  
             坂井善隆

#### (3) 理学部産官学連携推進委員会

委 員 長： 化学科 教授 竹内敬人  
 副委員長： 化学科 教授 大石不二夫  
 総合理学研究所所長： 生物科学科  
   教授 齊藤光實  
 情報科学科： 教授 中田穰治  
 化 学 科： 教授 松本正勝  
 生物科学科： 助教授 鈴木祥弘  
 情 報 系： 情報科学科 教授 桑原恒夫  
 広報委員： 情報科学科 教授 後藤智範  
 産官学連携推進室： 課 長 田口澄也  
 産官学連携推進室平塚： 調査役 鈴木一利

### 2 セミナー・シンポジウム・講演会

#### (1) 第 20 回湘南ハイテクセミナー

— 機器分析入門 —  
 日時： 2004 年 6 月 15 日(火)・16 日(水)  
           10 時～16 時 30 分  
 会場： ひらつかスカイプラザ  
           (平塚MNビル 11 階・第 2 会議室)  
 主催： 神奈川大学総合理学研究所  
 後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「分析総論」  
杉谷善則(神奈川大学理学部化学科)
- 2) 「NMR 分析」  
天野 力(神奈川大学理学部化学科)
- 3) 「環境分析」  
功刀正行(国立環境研究所)
- 4) 「赤外分光」  
古川行夫(早稲田大学理工学部化学科)
- 5) 「質量分析」  
大橋 守(神奈川大学総合理学研究所)
- 6) 「有機材料分析」  
宇野佳孝(株式会社日東分析センター)

#### (2) 第 21 回湘南ハイテクセミナー

— 研究開発と分析技術 —  
 日時： 2004 年 12 月 2 日(木)・3 日(金)  
           10 時～16 時 30 分  
 会場： KU ポートスクエア  
           (みなとみらいクイーンズタワー14 階)  
 主催： 神奈川大学総合理学研究所  
 共催： 神奈川大学みなとみらい  
           エクステンションセンター  
 後援： 日本分析化学会関東支部  
 演題・講師：

- 1) 「超微量分析の新展開」  
原口紘丞(名古屋大学大学院工学研究科)
- 2) 「研究開発と NMR 分析」  
渡部徳子(青山学院女子短期大学家政学科)
- 3) 「分析システムのマイクロ集積化」  
金 幸夫(東京大学大学院工学系研究科)
- 4) 「研究開発と IR 分析」  
古川行夫(早稲田大学工学部化学科)
- 5) 「研究開発と X 線分析」  
河合 潤(京都大学大学院工学研究科)
- 6) 「研究開発と有機材料分析」  
志智雄之(株式会社日産アーク)

#### (3) 第 15 回神奈川大学平塚シンポジウム

— 21 世紀の理科教育 —  
 日時： 2005 年 3 月 19 日(土)  
           10 時 30 分～16 時 40 分  
 会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
           (61 号館 332 室 AV 教室)  
 主催： 神奈川大学理学部化学科

- 神奈川大学総合理化学研究所  
共催： 日本化学会  
演題・講師：
- 1) 「中学校における理科教育の現状  
～私のつたない経験より～」  
新倉順治(北海道門別町立富川中学校)
  - 2) 「学力差に応じた理科教育の現状」  
泉 由香里(神奈川県向上高等学校)
  - 3) 「理数コースにおける理科教育」  
池田博明(神奈川県立西湘高等学校)
  - 4) 「化学的な視野を広げる授業を目指して」  
守本昭彦(東京都立砂川高等学校)
  - 5) 「神奈川大学全国高校生理科・科学論文  
大賞から見た最近の高校理科」  
永田一清(神奈川大学工学部)
  - 6) 「21世紀における生命科学の発展と理科  
教育」  
大矢禎一(東京大学大学院)
  - 7) 「環境の世紀における生物教育のあり方」  
鈴木善次(大阪教育大学名誉教授)
  - 8) 「化学は3Kか3Iか？」  
竹内敬人(神奈川大学理学部)
- (4) ハイテク・リサーチ・センター公開シンポジウム  
－高度機能を持つ分子－  
生物ホトニクス基盤技術開発－  
日時： 2004年11月20日(土)  
10時～16時30分  
会場： 神奈川大学横浜キャンパス(2号館)  
主催： 神奈川大学大学院理学研究科ハイテ  
ク・リサーチ・センター  
共催： 神奈川大学総合理化学研究所  
神奈川大学大学院理学研究科  
後援： 日本化学会  
演題・報告者：
- 1) 「生命現象解析への利用を目指した光機  
能分子の創出」  
小笠原 強・鈴木季直・竹内敬人・  
平田善則・松本正勝・山口和夫  
(神奈川大学理学部)
  - 2) 「資源循環を意識した光合成およびバイ  
オミメティック・ホトニクス」  
井上和仁・齊藤光實・鈴木祥弘・中山 堯・  
野宮健司・森 和亮(神奈川大学理学部)
- 演題・講師：
- 1) 「Natural Products Chemistry and  
Nature」  
中西香爾(コロンビア大学)
  - 2) 「生命現象解析のための蛍光プローブの  
創出」  
長野哲雄(東京大学大学院)
  - 3) 「生命・細胞はどのように誕生したか－  
“シズン” ゲノムの完全解読から解く」  
黒岩常祥(立教大学)
- (5) 講演会  
日時： 2004年5月27日(木)  
16時50分～18時20分  
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
(67号館228室)  
主催： 神奈川大学大学院理学研究科  
神奈川大学総合理化学研究所  
神奈川大学大学院理学研究科ハイ  
テク・リサーチ・センター  
演題： 「陸生ラン藻の乾燥応答遺伝子の発  
現解析」  
講師： 加藤 浩  
(三重大学生命科学研究支援セン  
ター)
- (6) 講演会  
日時： 2004年7月15日(木)  
15時10分～16時10分  
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
(67号館228室)  
主催： 神奈川大学総合理化学研究所  
共催： 神奈川大学生物科学科  
神奈川大学大学院理学研究科生物科学  
演題： 「アフリカツメガエル初期胚を用い  
た試験管内における器官形成」  
講師： 後原綾子  
(東京大学大学院総合文化研究科生  
命環境科学系)
- (7) 講演会  
日時： 2004年10月23日(土)  
13時30分～  
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
(67号館304室)  
主催： 神奈川大学総合理化学研究所  
演題： 「サケの勉強会」  
講師： 兵藤 晋(東京大学海洋研究所)
- (8) 講演会  
日時： 2004年11月15日(月)  
15時10分～16時10分

会場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス  
(67号館 305室)  
主催： 神奈川県総合理学研究所  
演題： 「キッチン・キトサンのお話」  
講師： 平林靖彦(森林総合研究所)

## (9) 講演会

日時： 2004年11月17日(水)  
13時30分～  
会場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス  
(67号館 304室)  
主催： 神奈川県総合理学研究所  
演題： 「Hematopoietic stem cells: From  
bench to bedside」  
講師： 齊藤頼子  
(Center for Regenerative Medi-  
cine and Technology, Massachu-  
setts General Hospital, Harvard  
Medical School)

## (10) 講演会

日時： 2005年1月31日(月)

15時～

会場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス  
(67号館 207室)  
主催： 神奈川県総合理学研究所  
神奈川県大学院理学研究科ハイ  
テク・リサーチ・センター  
演題： 「Structural and biological asp-  
ects of copper complexes」  
講師： Milan Melnik (Slovak University of  
Technology)

## (11) 講演会

日時： 2005年2月14日(月)  
15時10分～  
会場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス  
(67号館 204室)  
主催： 神奈川県総合理学研究所  
演題： 「NMR法によるRNAの構造と機  
能の解析」  
講師： 河合剛太(千葉工業大学)

## 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、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。

### 2 研究論文の種類

総説(Review)、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、報告書は原著に準ずる。掲載する研究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、報告書については次の4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。

#### (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 245×170mm 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、結果、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、 $\mu$  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、結果、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が、特に制限しない。

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、結果、討論、謝辞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 10P とする。

項目の見出しと小見出しの間は1行スペースをあける。

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。

- 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) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 3) 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.
- 4) 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(1) : 34-44.
- 5) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版、東京.
- 6) 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.
- 7) 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.

#### (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。

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。

#### (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。

図の説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図の説明文に限り、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。

#### (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°C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 投稿

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、別紙に記入して提出する。

## 6 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。

## 7 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。

## 8 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。

## 9 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。

## 10 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、出版権は神奈川大学総合理学研究所に属する。

## 編集後記

平成元年の神奈川大学理学部開設と前後して設立された神奈川大学総合理学研究所は、爾来、理学部における研究と教育の活性化を促進し、より一層充実させる役割を担って活動を続けて来ております。

「年報」は、総合理学研究所の各年の事業および所員の研究成果を公表する機関誌として設立初年度から発行されて来ました。

昨年度、No.15号が発行されたことから、これを機会に機関誌のより一層の発展を期し、体裁を改め、理学部および大学院理学研究科の学内紀要の機能もあわせ持つ理学専門の科学誌にすることとなり、昨年4月に、改訂のためのワーキンググループがつけられ、活動を始めました。

12月には、総合理学研究所の斉藤光實所長を顧問とする編集委員会が正式に組織され、英名を主とする Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌)を誌名とする新しい科学誌が発行されることになりました。なお、巻数については、これまでの総合理学研究所活動の継続を考慮して、「年報」の号数を引き継ぐことにし、本誌は16巻からスタートすることに致しました。

編集委員会発足から発行まで十分な期間がなく、編集上、不手際なことがらも続出し、投稿者の皆様には大変ご迷惑をおかけ致しました。特に、科学誌の体裁を整える上では、原稿の書式が統一されてい

ることが基本的な条件となるため、多くの方々にご無理なお願いを致しました。しかし、幸いにも、皆様のご理解とご協力を賜り、本誌が無事発行できたことは大変喜ばしく、改めてお礼申し上げます。

本誌が科学誌として再出発した目的の一つには、若手研究者が研究成果を公表できる場を増やしたいということも含まれています。総合理学研究所の研究助成の有無に拘わらず、自由に研究論文を投稿されることを期待しています。本誌は、国立情報学研究所を通じてオンライン化されますので、研究成果は広く世界に発信されます。また、本誌は、所員以外の投稿も歓迎しています。博士研究員、大学院生、意欲的な学部学生の諸君が、個人の資格で論文を投稿し、研究の成果を世に問うことは有意義なことであり、積極的に取り組んで頂きたいと思えます。

出発したばかりの本誌ですが、編集に関わった者として、将来、多くの原稿が投稿されるようになり、各巻に幾つかの号数が必要となるような国際的科学誌へと発展することを夢見ています。最後になりましたが、編集委員の皆様のご努力に感謝し、本誌が、総合理学研究所、理学部、大学院理学研究科における研究の活性化に役立ち、ともに益々発展出来ることを祈願しつつ筆を納めます。

[神奈川大学総合理学研究所、  
理学部生物科学科 鈴木季直]

### 神奈川大学理学誌編集委員会

委員長

鈴木季直 生物科学科

委員

天野 力 化学科

石岡俊也 情報科学科

井上和仁 生物科学科

加部義夫 化学科

張 善俊 情報科学科

### Science Journal of Kanagawa University

Editor-in-Chief

Suechika Suzuki Department of Biological Science

Editors

Chikara Amano Department of Chemistry

Shunya Ishioka Department of Information Science

Kazuhito Inoue Department of Biological Science

Yoshio Kabe Department of Chemistry

Zhang Shan Jun Department of Information Science

### Science Journal of Kanagawa University Vol. 16

発行日	2005年5月25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	光和サービス株式会社

神奈川大学総合理学研究所

*Research Institute for Integrated Science of Kanagawa University*