

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.19 2008

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

巻頭言

鈴木季直	1
------------	---

原 著

DWT-Based Watermarking Using QR Code Shanjun Zhang and Kazuyoshi Yoshino	3
An Alternatively Spliced Site in the Proline-Rich Region of Microtubule-Associated Protein 4 Plays an Important Role in Microtubule Stabilization Kiyotaka Tokuraku, Hatsune Moriyama, Kazuyuki Matsushima and Susumu Kotani	7
Characterization of Third 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase in <i>Ralstonia pickettii</i> T1 Masahiko Takanashi, Mari Shiraki and Terumi Saito	13
Benzothiazolylphenol-substituted Ketoester is a Useful Fluorescent Probe for Detection of the Mitochondrion in Sea Urchin Sperm Makoto Kazama, Keiichirou Kanda, Masatoshi Tanimura, Akiya Hino, Masakatsu Matsumoto and Suechika Suzuki	19
不斉ナノ空間の構築と不斉認識・不斉合成反応 木原 伸浩、森 和亮	27
薬剤処理やアンチセンス核酸注射によるゼブラフィッシュの後天的アルビノ個体の作製方法の探索 茂木和枝、永井 敦、日野晶也、豊泉龍児	33
クロロフィル分子の多様性に基づく光合成の光エネルギー変換系の基本原理の解明化 三室 守、鞆 達也、土屋 徹、野口 巧、大久保 辰則、秋本 誠志、 横野 牧生、井上 和仁	39
シロイヌナズナに対する倍数化処理の減数分裂期染色体に及ぼす影響に関する研究 岩元明敏、杉山宗隆、安積良隆	45
ピーマン果実の成熟に伴う色素変化と有色体の超微形態形成 吉田正幸、早津 学、鈴木季直	51
C ₄ 植物アオビユ黄化子葉光照射に伴う葉緑体の形態形成 柏木美由紀、吉田顕二、酒井美和子、濱元千絵子、鈴木季直	57

短 報

ポリ酸塩の欠損部位を新しい化学反応空間に利用したポリ酸塩ベースの触媒設計 野宮健司、力石紀子、栗嶋 進、長谷川 剛、木村卓央	67
---	----

神奈川県真鶴に生息するクロフジツボの死殻に穿孔するイシマテガイ <i>Leiosolenus curtus</i> (Bivalvia: Mytilidae) の殻形態 大和田正人	71
報告書	
神奈川県湘南ひらつかキャンパスで見られる草木の染色体を観察してみようプロジェクト 平成 19 年度報告 安田政尚、茂木亜矢子、安積良隆	75
テクニカルノート	
走査型電子顕微鏡による花粉観察のための最適処理法の検討 重田英子、岩元明敏、風間 真、鈴木季直	81
研究交流	
ドイツ生活の紹介 内野圭一	87
事業報告	91
投稿規定	94
編集後記	98

■ 巻頭言 ■

総合理学研究所の発展を期して

鈴木季直

神奈川大学総合理学研究所 所長

Looking forward to Development of the Research Institute for Integral Science

Suechika Suzuki

Director of the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

私儀、所員皆様のご指名を頂きまして、本年四月より、前齊藤光實所長の後任として総合理学研究所所長に就任致しました。この場をお借りして、就任のご挨拶を述べさせていただきます。

総合理学研究所は、神奈川大学学則第4条に基づき、理学に関する研究と調査を行い、学問の向上と発展に寄与することを目的として、湘南ひらつかキャンパスの理学部開設に伴って設置されました。爾来、理学部教員を兼任する教員が中心となり、本学における理学研究の発展のために円滑に運営されてきております。特に、研究、教育、広報を研究所活動の三本柱とされた齊藤光實前所長の研究所運営構想は、実現された幾つかの具体的な事業とともに大いに評価されるものであり、今後もより発展させなければならないものと考えます。

研究と広報の両面性を備えた具体的な事業として実現されたものの一つは、本誌、*Science Journal of Kanagawa University* (神奈川大学理学誌) の出版であります。本格的な科学誌の体裁を整えた本誌の発行により、研究所が推進する学内外の研究者との共同研究や理学部における研究成果の公開の場が広がりました。所員である教員の他に、大学院生の研究成果発表の場としても活用され、その意味では、本誌の発行は若手研究者育成のための教育の一環としても役立っています。本年度以降も、本誌をより充実させるための努力を重ねる所存です。

研究所は独自の予算を持ち、学内外研究者との研究を促進するために毎年共同研究を公募し、採用された応募研究には助成金を配付しています。かつては研究所が環境問題等の特定課題を設定したこともありましたが、ここ数年は自由課題とし、採択件数も絞り、できる限り若手の研究者を支援する方針で選考を行ってきました。これについても暫くはこの方針に沿って共同研究支援を継続したいと考えてお

ります。

研究所が行う教育に関する事業としては、従来、独自の講演会開催や、講演会共催、サマースクールへの資金援助などが行われて来ています。これらの継続はもとより、可能な具体的教育活動について検討し、実現させなければならないと感じています。

広報に関して具体的に実現されたものとしてホームページの公開があります。昨年度、担当の豊泉龍児先生のご努力により、ホームページにリンクして既刊の *Science Journal of Kanagawa University* の全論文も閲覧できるようになりました。今後、より充実した内容を含むホームページへの改編を行っていきたいと考えています。

本年は、本学理学部が創設されてから 20 年目になります。大学および学部中心で既に幾つかの記念事業の計画が検討されています。総合理学研究所としても、例えば、公開研究発表会や記念学術出版などの記念事業を企画できれば幸いです。今後、運営委員を中心にして検討したいと考えています。

地球温暖化による様々な環境異変が報じられる中で 21 世紀以降に人類が地球の自然をどこまで自然のまま引き継いでゆけるかが問われています。自然科学に関わる実学は数多くあっても、問題解決のための基盤は理学によって与えられると確信しています。幸いにも、私達は理学の一翼を担う立場で研究と教育に携わっており、総合理学研究所はその活動を支えるために機能しうる組織です。本学理学部および大学院理学研究科の円滑な発展を期し、微力ながら、職責を果たして参る所存です。最後になりましたが、総合理学研究所の今後の活動に所員皆様これまで以上の篤いご支援とご協力を賜りますようお願い申し上げます。

■Full-Length Paper ■ By a grand of Research Institute for Integral Science, Kanagawa University

DWT-Based Watermarking Using QR Code

Shanjun Zhang^{1*} and Kazuyoshi Yoshino²

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

² Department of Welfare Systems Engineering, Kanagawa Institute of Technology, Atsugi-City, Kanagawa 243-02, Japan

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

Abstract: Increased commercial activity on the Internet and media industries demands protection of multimedia contents. In this paper, we introduce a novel watermarking method to embed QR codes in digital images. The method is based on discrete wavelet transform (DWT). The original image is divided into blocks, and QR codes are added to particular bits of LL2 level coefficients of the selected block according to the visual masking effect of the human visual system. It has been shown that this method is robust for JPEG compression and has good transparency. The embedded information can be extracted correctly even if the images are compressed to 11% of the original according to the contents of the images.

Keywords: QR code, watermark, discrete wavelet transform, human visual system, JPEG.

Introduction

As digital image technology and its applications are growing quickly, digital images are now widely distributed on the Internet and other media ^{1,2)}. The start of digital broadcasting makes it even more necessary to provide protection mechanisms against unauthorized processing and the use of multimedia contents. One of the most difficult problems in digital video watermarking is watermark recovery from images with possible perturbations, including, for example, degradation due to noise or compression, transformation by filtering, resampling, and other intentional or unintentional operations ³⁻⁸⁾. The watermark should be selected and be properly dealt with such that it does not corrupt the visual effect of the original image and is detectable only with knowledge of the embedding secrets of the original image.

QR Code is a type of 2-D (two-dimensional) symbology developed by Denso Wave (a division of Denso Corporation at that time) and released in 1994. It is capable of handling all types of data, such as numeric and alphabetic characters, Kanji, Kana, Hiragana, symbols, binary, and control codes. Up to 7,089 characters can be encoded in

one symbol. It has large Kanji- and Kana-holding capability, and has error correction capability. Data can be restored even if the symbol is partially dirty or damaged.

In this paper, we describe a novel method to embed the QR code into still digital images. Most of the recent work in watermarking can be grouped into two categories: spatial domain methods, and frequency domain methods. Because frequency domain methods have better robustness than spatial domain, almost all techniques embed watermarks in the frequency domain, such as DCT and DWT ^{9, 10)}. To increase robustness against JPEG degradation of the watermarked image, we embed the watermark in low frequency domains of DWT. Simultaneously, the visual masking effects of the human visual system are considered to prevent the visual degradation of the watermarked image.

In the next section, we describe the proposed method in detail. In Section 3, we provide results demonstrating the high robustness of the approach to JPEG compression. Concluding remarks are in Section 4.

Method

The original image is divided into a set of 4x4 blocks. Each block is transformed into level two with Daubechie mother wavelet function. Watermark signals are the embedded in the low frequency domain of the blocks. As the human eye is more sensitive to changes in the simple region of the image than the complex region, which is known as the visual masking effect, variations of the low frequency components are checked for adjacent blocks to decide if they should be used for embedding by the watermark signals. To increase the robustness, a series of binary codes of the double-sized QR code are used as watermark signals.

Figure 1 shows two-level wavelet decomposition of an image. The coefficients of the LL2 of the DWT of the selected block will be used to embed the watermark signals. After the LL2 component of a block is transformed into a binary integer, a bit will be replaced by a binary integer taken from the watermark series. The bigger the value of k, the more robust the embedded watermark, while the watermarked image obtained by reverse wavelet transform may be degraded easier. In this paper, k=5 was selected.

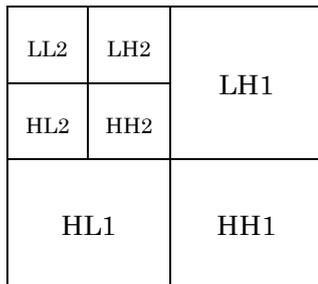


Fig. 1. 2D wavelet transform.

If the LL2 component of a block is represented by $x = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_k, x_{k-1}, x_{k-2}, \dots, x_n)$, and the watermark bit of the corresponding block is y , then the kth bit of x will be replaced by y , and the $(k-1)$ th bit of x will be replaced by its reverse value. The remaining lower bits are the same as the kth bit, so the embedded LL2 component becomes \tilde{x} .

$$\tilde{x} = (x_1, x_2, x_3, \dots, y, \bar{x}_{k-1}, y, \dots, y)$$

In this way, the kth bit of the embedded information can be protected from rounding errors of the decimal value. Fig. 2 shows an example of bit embedding.

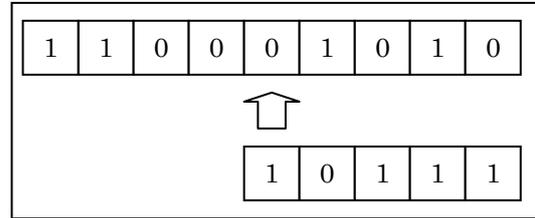


Fig. 2. An example of bit embedding.

Results and Discussion

Using the method described above, a set of binary series can be embedded in all divided blocks of the image. Because the low frequency domain was changed and usually the low frequency domain has the most energy of the image so that small changes to this band may induce serious degradation of the watermarked image, it is necessary to make a trade-off between the invisibility and detectability of the watermarked image. Fig. 3 and 4 show watermarked images embedded using the bit series obtained from the QR code shown in Fig. 5. We can hardly see a difference between Fig. 3(a)

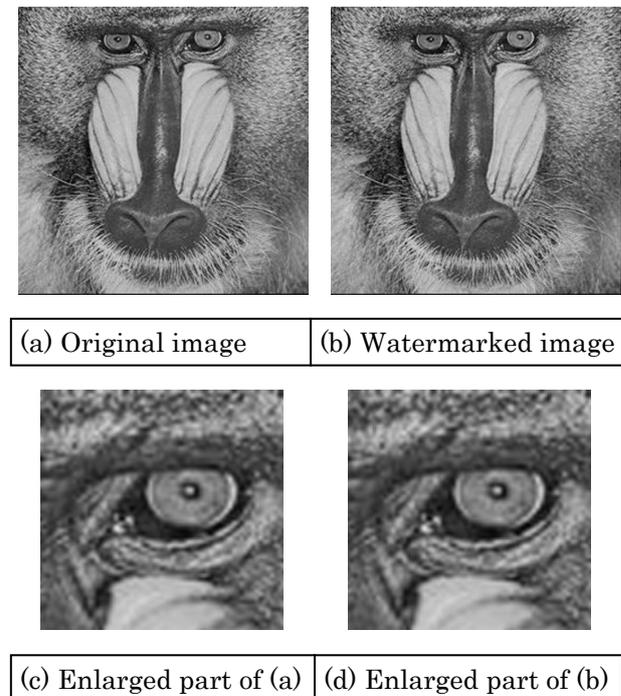


Fig. 3. An example of watermarking. (a) original image, (b) watermarked image, (c) enlarged part of (a), (d) enlarged part of (b).

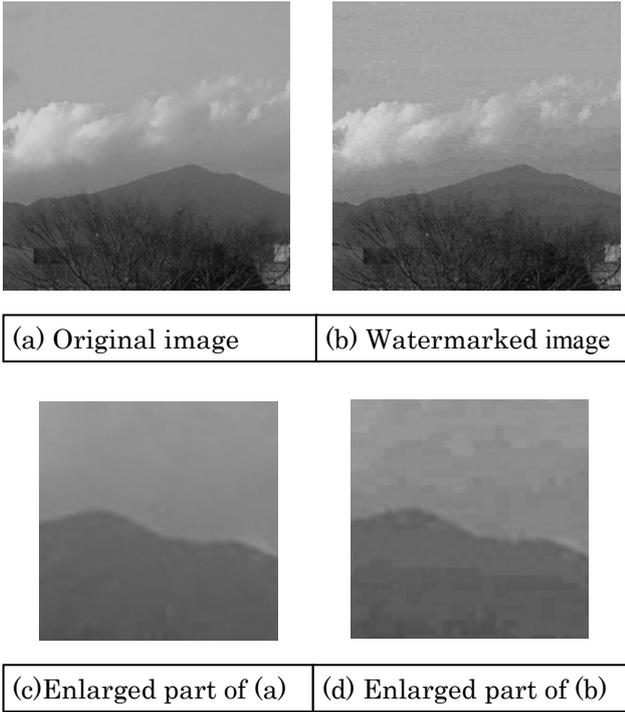


Fig. 4. Example of watermarking for an image with a smooth area.

and Fig. 3 (b), but the difference between of Fig. 4 (a) and Fig. 4 (b) can easily be detected. To solve this problem, we make the use of the human visual masking effect, and compare the low frequency components of neighboring blocks. If the differences of low frequency components of a block are not as big as those of neighboring blocks, the information will not be embedded in that block. The sum of the horizontal and vertical differences will be compared with a threshold so as to pick out the blocks to be embedded. Fig. 6 showed the improved results with the original image showed in Fig. 4 (a). Fig. 6 (a) is corresponded to Fig. 4 (b), and Fig. 6 (b) to Fig. 4 (d).

The watermark can be extracted through the following steps. (1) The host image and probably corrupted watermarked image are divided into 4x4 blocks in the same way. (2) Each block undergoes 2nd level discrete wavelet transform, and then the low frequency component of the block is compared with neighboring blocks. (3) If the sum of the horizontal and vertical variances of the value is bigger than a previously defined threshold, the *k*th bit of the value will be extracted as one of the watermark bit series. (4) The extracted bit series are rearranged into QR

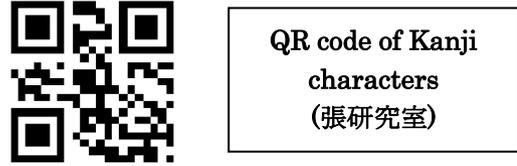


Fig. 5. Example of a QR code.

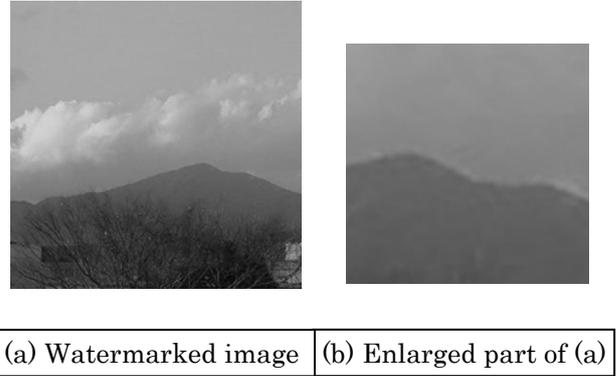


Fig. 6. Improved result.

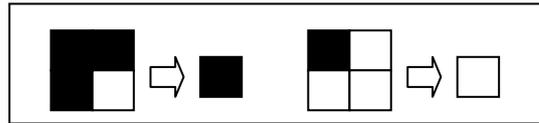


Fig. 7. Recover QR code by designation.

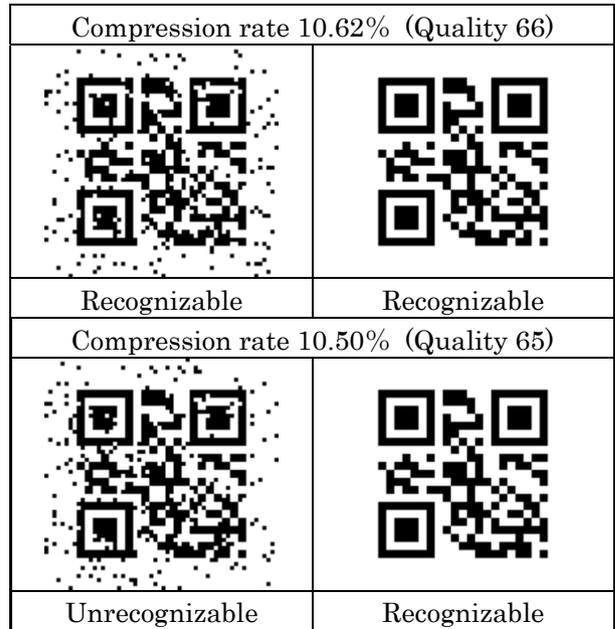


Fig. 8. Tolerance to JPEG compression.

code binary images, which will be read by the QR code recognizer.

To raise the robustness for the watermarked image to JPEG compression, we firstly double the size of the QR code image, and then use the binary bit series of the image as the embedding message. After the embedded bit series are extracted, they are represented by double-sized QR codes, and then a designation method is used to recover the corrupted bits.

Finally, the QR code of original size is used to show the real signature message.

As shown in Fig. 7 double-sized pixels in the extracted QR code are used to recover the original QR code by designation. Because the four pixels are extracted from different blocks of the watermarked image, if more than three of them are wrong, the finally extracted bit may be wrong. This method enhanced the robustness of watermark detection.

The efficiency of the method was checked by lena, mandrill and a landscape picture of 512x512. A QR code representing the affiliation of one author was used as the signature message. Fig. 8 shows the tolerance of the watermark method to JPEG compression. General UNIX commands of cjpeg and djpeg are used to compress and decompose the watermarked images. The compression rates and compression quality can be controlled by parameters. The threshold was selected appropriately so that over 3364 blocks can be used to embed the bits of the QR code.

Conclusion

In this paper we propose a robust method of embedding QR code into the DWT domain of divided blocks of the still image. The proposed method is highly robust to compression and

additive noise. The signature message of the bit series is embedded in a fixed position (k th) bit of the LL2 value, which is unfavorable for main raising the security, but this can be improved by introducing a random key to dynamically change the value of k in a scope.

Future work will concentrate on making the method more practical by modifying the technique such that the host image is not required to provide over 4000 blocks to embed the watermark.

References

- 1) Cline HE, Lorenzen WE, Kikinis R and Jolesz F (1990) Threedimensional segmentation of MR images of head using probability and connectivity. *Comput J. Assist. Tomogr.* **14** (6):1037-1045.
- 2) Pitas I (1996) A method for signature casting on digital images. *IEEE Int. Conf. on Image Process.* **3**: 215-218.
- 3) Villasenor JD, Belzer B and Liao J (1995) Wavelet filter evaluation for image compression. *IEEE Trans. Image Process.* **4** (8):1053-1060.
- 4) Swanson MD and Tewfik AH (1996) A binary wavelet decomposition of binary images. *IEEE Trans. on Image Process.* **5** (12):1637-1650.
- 5) Zeng W and Liu B (1997) On resolving rightful ownerships of digital images by invisible watermarks. In: *Proceedings of the IEEE International Conference on Image Processing, Vol., 1.* pp.552-555.
- 6) Cox IJ, Kilian I, Leighton T and Shamoon T (1997) Secure spread spectrum watermarking for multimedia. *IEEE Trans. on Image Process.* **6** (12):1673-1687.
- 7) Wolfgang B, Podilchuk CI and Delp EJ (1998) The effect of matching watermark and compression transforms in compressed color images. In: *Proceedings of the IEEE International Conference on Image Processing, Vol., 1.* Chicago, IL. pp. 440-444.
- 8) Zhu W, Xiong Z and Zhang Y-Q (1999) Multiresolution watermarking for images and video. *IEEE Trans. Circuits & Systems Video Tech.* **9** (4): 545-550.
- 9) Lumini A and Maio D (2000) A wavelet-based image watermarking scheme In: *Proc. Int. Conf. Information Technology: Coding and Computing.* pp.122-127.
- 10) Alattar AM (2004) Reversible watermark using the difference expansion of a generalized integer transform. *IEEE Trans. Image Process.* **13**: 1147- 1156.

■Full-Length Paper■

An Alternatively Spliced Site in the Proline-Rich Region of Microtubule-Associated Protein 4 Plays an Important Role in Microtubule Stabilization

Kiyotaka Tokuraku^{1,4}, Hatsune Moriyama², Kazuyuki Matsushima³
and Susumu Kotani³

¹ Department of Chemical Science and Engineering, Miyakonojo National College of Technology, Miyakonojo-City, Miyazaki 885-8567, Japan

² Department of Bioscience and Bioinformatics, Faculty of Computer Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, Fukuoka-City 820-8502, Japan

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: tokuraku@miyakonojo-nct.ac.jp

Abstract: We previously reported that the microtubule-stabilizing activity of a microtubule-associated protein (MAP) 4 variant, with a deletion in the Pro-rich region (MAP4-SP), was lower than that of a variant with a full length Pro-rich region (MAP4-LP). However, it remained unclear whether the deletion of the specific site in the Pro-rich region is responsible for the reduction of the microtubule-stabilizing activity. To answer this question, we examined the microtubule-stabilizing activities of four different MAP4 variants, MAP4-SP, MAP4-LP, and two additional MAP4-LP variants lacking a part of the Repeat region, and considered the correlation between the activity and the structure. When microtubules assembled in the presence of each of the MAP4 variants were treated with nocodazole for disassembly, the MAP4-SP-induced microtubules were significantly less stable than the other variant-induced microtubules. Another set of experiments, in which the microtubules were allowed to disassemble by dilution, yielded similar results: the MAP4-SP-induced microtubules were significantly less stable than the other variant-induced microtubules. The results clearly indicated that the microtubule-stabilizing activity of MAP4 depends on the specific, alternatively spliced site in the Pro-rich region.

Keywords: microtubule, microtubule-associated protein 4 (MAP4), Pro-rich region, microtubule stability and dynamics, alternatively splicing

Introduction

Microtubule-associated protein (MAP)* 4, which is known as a ubiquitous MAP, plays important roles in the dynamic functions of microtubules *in vivo*^{1,2)}. MAP4 consists of an amino-terminal projection domain and a carboxyl-terminal micro-

tubule-binding domain, with the latter further divided into the proline rich (Pro-rich) region, the Repeat region, and the Tail region¹⁾. We have cloned several MAP4 variants generated by alternative splicing, and examined their functions³⁻⁶⁾. We recently reported that the microtubule-stabilizing activity of a neural variant of MAP4, with a deletion in the Pro-rich region (MAP4-SP), was lower than that of the full length version (MAP4-LP), both *in vitro* and *in vivo*⁵⁾. Nguyen *et al.* (1997) reported that the overexpression of intact MAP4 stabilized cytoplasmic microtubules and slowed down cell growth,

***Abbreviations:** MAP, microtubule-associated protein; Pro-rich, proline rich; SP, short Pro-rich; LP, long Pro-rich; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; RB, reassembly buffer; LPA₃T, MAP4 fragment containing the long Pro-rich region, the Repeat region with three AP sequences, and the Tail region; LPA₄T, MAP4 fragment containing the long Pro-rich region, the Repeat region with four AP sequences, and the Tail region; LPA₅T, MAP4 fragment containing the long Pro-rich region, the Repeat region with five AP sequences, and the Tail region; SPA₅T, MAP4 fragment containing the short Pro-rich region, the Repeat region with five AP sequences, and the Tail region.

without inducing mitotic arrest or cell death⁷. The expression of MAP4-SP, which is less competent in stabilizing microtubules, may facilitate the elaborate regulation of microtubule dynamics in a living cell. Since the expression of the MAP4-SP variant is restricted to neural cells⁴, we suppose that the variant may contribute to the dynamic behaviors of neural cells in particular⁵.

Although it is evident that MAP4-SP has lower microtubule-stabilizing activity, it still remains unclear whether the deletion of a specific site in the Pro-rich region is responsible for the reduction in the activity, since we have compared only limited numbers of MAP4 variants⁵. In addition, the microtubule-binding domain fragment of MAP4-LP used in the experiment bundled microtubules, while that of MAP4-SP did not⁴; therefore, the accurate assessment of the microtubule-stabilizing activity may have been hampered by the formation of microtubule bundles.

In this study, we examined the microtubule-stabilizing activity of four types of MAP4 variants, including MAP4-SP. Since the polypeptide length, the net charge, and the microtubule bundling activity differed among these variants^{3,4}, we expected that a careful examination of these variants would reveal the factor responsible for the reduction in the microtubule-stabilizing activity. The results showed a strong dependency of the microtubule-stabilizing activity on the alternatively spliced site in the Pro-rich region.

Materials and Methods

Microtubule-binding domain fragments of the MAP4 variants were purified from *Escherichia coli* cells expressing the fragments, as described previously^{3,4}. Porcine brain tubulin was prepared by the standard method^{8,9}. Protein concentrations were determined by the method of Lowry *et al.*¹⁰, using bovine albumin as the standard. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out according to the method of Laemmli¹¹, using 10% gels.

Microtubule stability assay

The microtubule-stabilizing activity of the MAP4 variants was analyzed as described previously⁵. Tubulin (15 μ M) was polymerized in the presence

of the MAP4 variants (2 μ M) in reassembly buffer (RB: 100 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, pH 6.8, 0.1 mM ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, and 0.5 mM MgCl₂) containing 0.5 mM GTP, at 37°C for 30 min. The samples were treated with nocodazole (50 μ g/ml) or were diluted 10-fold by adding pre-warmed RB. After a 10 min incubation, the treated samples and the untreated control sample were centrifuged at 16000 x g for 30 min. The pellets were resuspended in the original volume of RB. The supernatant and the pellet solutions were supplemented with a set volume of SDS-PAGE loading buffer, and a 15 μ l aliquot of each sample was analyzed by electrophoresis on a 10% gel. For quantitative analysis, representative gels were prepared from three independent experiments. The amounts of tubulin on the polyacrylamide gels were quantified by image analysis (NIH image, NIH, USA).

Results

Preparation of the Proteins

In this study, we used four MAP4 fragments (Fig. 1A), each corresponding to the entire microtubule-binding domain of one of the MAP4 variants^{3,4}. Three of the four fragments contain the intact Pro-rich region (LPA₅T, LPA₄T, and LPA₃T), while the other has a deletion in the region (SPA₅T). The fragments were renamed to show the length of the Pro-rich region explicitly. LPA₅T, LPA₄T, LPA₃T, and SPA₅T correspond to the former PA₅T, PA₄T, PA₃T³, and SP⁴, respectively. The MAP4 fragments and the tubulin were purified to homogeneity (Fig. 1B).

Stability of microtubules assembled in the presence of the MAP4 variants

To assess the microtubule-stabilizing activities of the MAP4 variants, we examined the resistance of microtubules against disassembly induced by the addition of nocodazole or dilution, as described previously⁵. Microtubules assembled *in vitro* in the presence of the MAP4 variants were treated with nocodazole or were diluted with pre-warmed RB, and then the samples were centrifuged to recover the microtubules remaining in the pellet fractions. Fig. 2 shows the percentage of the

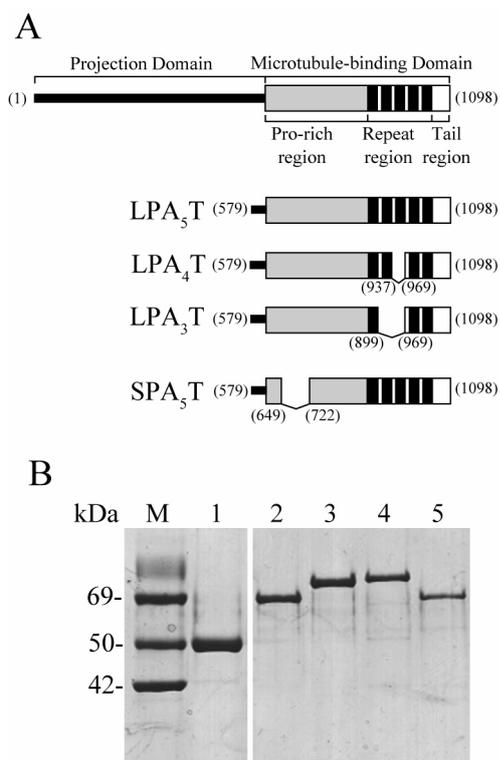


Fig. 1. Schematic structures of the microtubule-binding domain fragments of MAP4 variants, and SDS-PAGE patterns of the proteins used in this study. (A) Schematic structures of intact MAP4, LPA₅T, LPA₄T, LPA₃T, and SPA₅T. The numbers in parentheses indicate the amino acid positions of intact MAP4. (B) SDS-PAGE of the purified proteins. Lane M is the molecular mass markers: bovine serum albumin (69 kDa), porcine tubulin (50 kDa), and rabbit actin (42 kDa). Lane 1, porcine tubulin; lane 2, LPA₃T; lane 3, LPA₄T; lane 4, LPA₅T; lane 5, SPA₅T.

amount of sedimented tubulin in each sample relative to that of each untreated sample (100%). The SPA₅T-induced microtubules were clearly less resistant to nocodazole treatment than the LPA₅T-induced microtubules (Fig. 2A). Although the LPA₃T and LPA₄T-induced microtubules were also more susceptible than the LPA₅T-induced microtubules, the effect was not as pronounced as that on the SPA₅T-induced microtubules. The same is true of the dilution experiment (Fig. 2B). The SPA₅T-induced microtubules were much less stable than any of the MAP4-LP variant (LPA₃T, LPA₄T, and LPA₅T)-induced microtubules. The results clearly indicated that the SPA₅T-induced microtubules are less stable, and in other words, more dynamic. The dilution was more effective than the nocodazole treatment in depolymerizing the SPA₅T-induced microtubules: The percentage

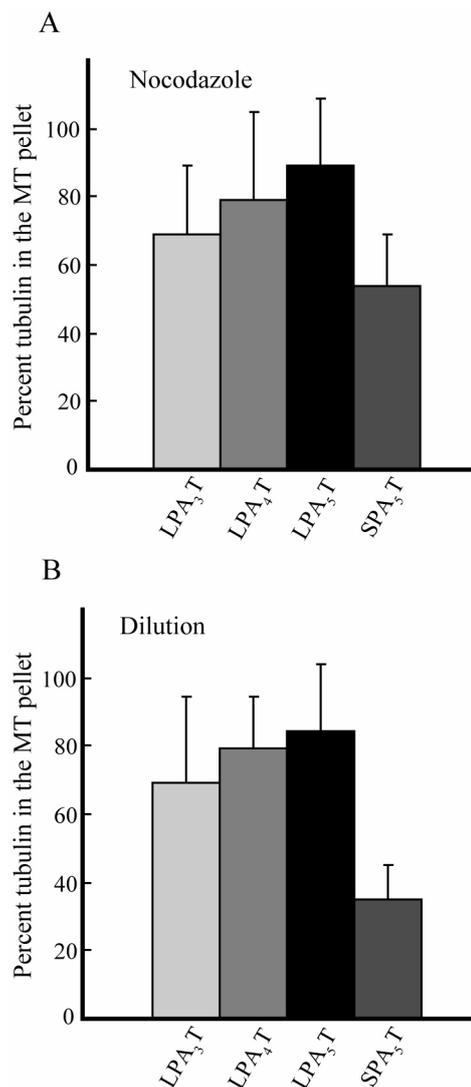


Fig. 2. Stability of microtubules assembled in the presence of the MAP4 variants. Tubulin (15 μ M) was polymerized in the presence of each MAP4 variant (2 μ M). The samples were supplemented with 50 μ g/ml of nocodazole (A) or were diluted 10-fold by the addition of pre-warmed RB (B). After a 10 min incubation, the treated samples were centrifuged. The amount of pelleted tubulin in each sample was quantified, as described in the Materials and Methods, and the results are presented as the percentages of the untreated sample (100%). Data are averaged from three independent experiments. Error bars denote S.D.s.

of microtubules remaining was 35% in the diluted sample, while it was 54% in the nocodazole-treated sample. Meanwhile, the two treatments showed similar effects on the depolymerization of the other three fragment-induced microtubules.

Discussion

In this study, we revealed that the microtubule-stabilizing activity of MAP4 strongly depends on the specific site in the Pro-rich region. Although

a deletion within the Repeat region also affected the stability of the microtubules against nocodazole treatment and dilution, the effect was only marginal, as compared with the deletion within the Pro-rich region.

Protein-protein interactions are generally affected by the polypeptide length and the charge¹²⁾. Although we previously reported the modulation of the microtubule-stabilizing activity of MAP4 by a deletion in the Pro-rich region⁴⁾, it still remained unclear whether the primary factor in the reduction of the microtubule-stabilizing activity was the deletion of the specific sequence in the Pro-rich region or simply the length and/or the charge of the polypeptide. To address this issue, we prepared four MAP4 variants with different polypeptide lengths and net charges in this study. Table 1 summarizes the parameters of the MAP4 microtubule-binding domain fragments used in this study. The data in the table show that all three of the parameters (length, net charge, and bundling activity) of SPA₅T, in addition to the deletion in the Pro-rich region, are different from those of LPA₅T. Apparently, it is difficult to specify which factor is dominant in lowering the activity of SPA₅T. In fact, the microtubule-stabilizing activities of LPA₅T, LPA₄T and LPA₃T decreased in that order, which correlates well with the order of the three parameters, raising the possibility that the low microtubule-stabilizing activity of SPA₅T is associated with a general length and/or charge effect, and is not specific to the alternative splicing in the Pro-rich region. However, the activity of SPA₅T is much less than those of the others. Especially, the difference in the activity between SPA₅T and LPA₃T should be noticed. The polypeptide length of SPA₅T (448-amino acid residues) is similar to that of LPA₃T (451-amino acid residues), and their net charges are the same (+41). In addition, both fragments lack microtubule bundling activity^{3,4)}. Despite these similarities, the microtubule-stabilizing activity of SPA₅T was significantly lower than that of LPA₃T, indicating that the difference in the microtubule-stabilizing activity does not depend on the polypeptide length, net charge, or microtubule bundling activity. In other words, MAP4 regulates its microtubule-stabilizing activity by alternatively splicing a

Table 1. Parameters of the microtubule-binding domain fragments of MAP4 variants.

Variant names	LPA ₃ T	LPA ₄ T	LPA ₅ T	SPA ₅ T
Length [a. a.] ^a	451	489	520	448
Net charge ^b	+41	+46	+52	+41
Bundling ^c	–	+	++	–
Nocodazole [%] ^d	69 ± 20	79 ± 25	89 ± 19	54 ± 15
Dilution [%] ^e	70 ± 25	79 ± 15	84 ± 19	35 ± 9

^{a,b}Length and Net charge of MAP4 fragments, calculated from amino acid sequence data.

^cBundling activities reported by Tokuraku *et al.*³⁾ and Matsushima *et al.*⁴⁾.

^{d,e}Microtubule-stabilizing activities from Figure 2.

specific site in the Pro-rich region.

Why is the microtubule-stabilizing activity of MAP4 reduced by the absence of a part of the Pro-rich region? Intact MAP4 enhances the rescue frequency without decreasing the catastrophe frequency, and reduces the shortening lengths^{13,14)}. Mandelkow *et al.*¹⁵⁾ found that the tips of shrinking microtubules have the protofilaments coiled inside out, and concluded that the protofilaments of shrinking microtubules peel outward, and consequently, the microtubules rapidly depolymerize (Fig. 3A). According to our hypothesis¹⁶⁾, the Pro-rich region of MAP4 facilitates the lateral association of protofilaments by bridging them. If so, then the shrinking of a microtubule will stop at the MAP4-bound region (Fig. 3B), and it subsequently will be rescued. The microtubule-stabilizing activity of the MAP4-SP fragment (SPA₅T) was

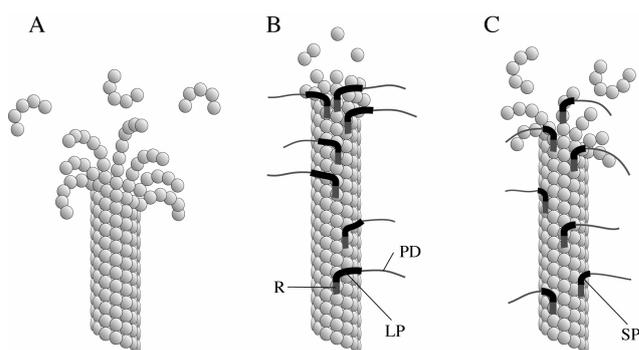


Fig. 3. Schematic illustration of disassembling microtubules in the presence or absence of MAP4 variants. (A) The first step in microtubule disassembly is the coiling of the protofilament tips. Consequently, the lateral bonds between them are disrupted; after that, they peel off, and subsequently break apart. (B) MAP4-LP enhances the lateral association of protofilaments by bridging them; therefore, the disassembly does not proceed over the MAP4-bound region because the peeling is blocked by the bridging. (C) The short Pro-rich region cannot bridge the adjacent protofilaments efficiently enough to stop the disassembly. PD, R, LP, and SP indicate projection domain, Repeat region, long Pro-rich region, and short Pro-rich region, respectively.

significantly lower than those of the other MAP4-LP fragments (LPA₃T, LPA₄T, LPA₅T), suggesting that the region essential for the protofilament bridging activity is missing in the MAP4-SP variant (Fig. 3C). The mechanism by which the missing sequence contributes to the bridging will be clarified by further experiments.

MAP4 variants are derived from a single gene by alternative RNA splicing¹⁾. The expression of these variants depends on the tissue types and the developmental stages^{4,17)}. As reported by Matsushima *et al.*⁴⁾, the expression of the MAP4-SP variant, which lacks part of the Pro-rich region, was restricted to neural cells⁴⁾. Since we demonstrated that the structure of the Pro-rich region dictates the microtubule-stabilizing activity of MAP4 in this study, it is quite possible that this variant contributes to the dynamic behaviors of neural cells, as speculated previously⁵⁾.

References

- 1) Tokuraku K, Katsuki M and Kotani S (2002) Structural and functional analyses of microtubule-associated protein 4. *Recent Res. Devel. Biochem.* **3**: 315-333.
- 2) Olson KR, McIntosh JR and Olmsted JB (1995) Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J. Cell Biol.* **130**: 639-650.
- 3) Tokuraku K, Matsushima K, Matui T, Nakagawa H, Katsuki M, Majima R and Kotani S (2003) The number of repeat sequences in microtubule-associated protein 4 affects the microtubule surface properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 29609-29618.
- 4) Matsushima K, Aosaki M, Tokuraku K, Hasan MR, Nakagawa H and Kotani S (2005) Identification of a neural cell specific variant of microtubule-associated protein 4. *Cell Struct. Funct.* **29**: 111-124.
- 5) Hasan MR, Jin M, Matsushima K, Miyamoto S, Kotani S and Nakagawa H (2006) Differences in the regulation of microtubule stability by the pro-rich region variants of microtubule-associated protein 4. *FEBS Lett.* **580**: 3505-3510.
- 6) Hasan MR, Matsushima K, Yue JM, Nakagawa H, Miyamoto S and Kotani S (2006) Functional analyses of a neural cell specific variant of microtubule-associated protein 4. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **17**: 3-11.
- 7) Nguyen HL, Chari S, Gruber D, Lue CM, Chapin SJ and Bulinski JC (1997) Overexpression of full- or partial-length MAP4 stabilizes microtubules and alters cell growth. *J. Cell Sci.* **110**: 281-294.
- 8) Shelanski ML, Gaskin F and Cantor CR (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**: 765-768.
- 9) Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY and Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1858-1862.
- 10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- 11) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**: 680-685.
- 12) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) *Molecular biology of the Cell*, 4th edn. Garland Science, New York.
- 13) Ookata K, Hisanaga S, Bulinski JC, Murofushi H, Aizawa H, Itoh TJ, Hotani H, Okumura E, Tachibana K and Kishimoto T (1995) Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* **128**: 849-862.
- 14) Permana S, Hisanaga S, Nagatomo Y, Iida J, Hotani H and Itoh TJ (2005) Truncation of the projection domain of MAP4 (microtubule-associated protein 4) leads to attenuation of microtubule dynamic instability. *Cell Struct. Funct.* **29**: 147-157.
- 15) Mandelkow EM, Mandelkow E and Milligan RA (1991) Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J. Cell Biol.* **114**: 977-991.
- 16) Tokuraku K, Katsuki M, Nakagawa H and Kotani S (1999) A new model for microtubule-associated protein (MAP)-induced microtubule assembly. The Pro-rich region of MAP4 promotes nucleation of microtubule assembly in vitro. *Eur. J. Biochem.* **259**: 158-166.
- 17) Chapin SJ, Lue CM, Yu MT and Bulinski JC (1995) Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains. *Biochemistry* **34**: 2289-2301.

■Full-Length Paper■ By a grand of Research Institute for Integral Science, Kanagawa University

Characterization of Third 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase in *Ralstonia pickettii* T1

Masahiko Takanashi¹, Mari Shiraki¹ and Terumi Saito^{1, 2}

¹ Laboratory of Molecular Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: 43saito-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We previously reported that *Ralstonia pickettii* T1, a bacterium growing on extracellular poly-3-hydroxybutyrate (PHB), have two 3-hydroxybutyrate dehydrogenases (BDH1 and BDH2). By analysis of knockout mutants of *bdh1* or *bdh2* using anion-exchange column chromatography, it was shown that a novel BDH besides BDH1 and BDH2 was present in *R. pickettii* T1. The third BDH (BDH3) was partially purified by column chromatography, and the enzyme had the N-terminal amino acid sequence different from those of BDH1 and BDH2. In Southern blotting with *bdh2* as a probe, *bdh3* was detected and cloned, and the purified gene product of *bdh3* expressed in *Escherichia coli* showed higher specific activity than those of BDH1 and BDH2.

Keywords: 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, poly-3-hydroxybutyrate, *Ralstonia pickettii* T1

Introduction

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is a natural biodegradable polymer that is biosynthesized and accumulated as an internal reserve of carbon and energy in many microorganisms¹⁻⁶. In bacteria, it has been believed that 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (BDH; EC 1.1.1.30), which catalyzes the oxidation of 3HB to acetoacetate or the reverse reaction, is involved in the metabolism of 3-hydroxybutyrate (3HB) as degradation products of intracellular or extracellular PHB. However, most studies on bacterial BDHs have reported on their biochemical properties⁷⁻¹⁷, but not on the physiological property.

In a PHB-accumulating bacterium *Shinorhizobium meliloti*, it was reported recently that the expression of the transcriptional fusion gene *bdh-lacZ* was associated with the growth phase, when the expression level increased from the lag to log phase and leveled off at the stationary phase¹⁸. In addition, a bacterium growing on extracellular PHB, *R. pickettii* T1, had a substantial BDH activity in growth on various carbon sources, such

as nutrient broth, succinate, and citrate as well as 3HB and PHB as carbon sources¹⁹. In summary, it is not necessarily true that BDH works only to utilize 3HB.

In this study, we report the characteristics of a novel BDH (BDH3) isolated from *bdh2* mutant of *R. pickettii* T1.

Materials and Methods

Strains, plasmids, and cultivation conditions

Ralstonia pickettii T1 (BBCM/LMG 18351) was precultured in nutrient broth (NB) (Difco Laboratories, Sparks, Md.), and the cultures were inoculated into a minimal medium (MM; 11.6 g/l Na₂HPO₄·12H₂O, 4.6 g/l KH₂PO₄, 2.0 g/l NH₄Cl, 1.0 g/l MgSO₄·7H₂O, 0.2 g/l FeCl₃·6H₂O, and 84 μM CaCl₂·2H₂O)²⁰ with a carbon source and ampicillin (Ap; 50 μg ml⁻¹) which was incubated at 30°C for 24 h. *bdh* mutants of *R. pickettii* T1 were cultured in NB or MM with a carbon source plus Ap (50 μg ml⁻¹) and chloramphenicol (Cm; 34 μg ml⁻¹). *Escherichia coli* strains were cultured

at 37°C overnight in Luria-Bertani (LB) medium with Ap (50 µg ml⁻¹), Cm (34 µg ml⁻¹), and/or tetracycline (Tc; 10 µg ml⁻¹) when necessary. pUC19 (Takara, Kyoto, Japan), pET23b (Novagen, Madison, Wis.), and pZJD2²¹ were used for cloning, expression, and construction of knockout mutants, respectively.

Enzymatic assay, protein assay, electrophoresis, and immunoblotting

Enzyme activity of BDH3 was measured in the presence of 0.5 mM NAD⁺ and 3 mM D(-)-3HB in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). Protein concentration was determined with bovine serum albumin (BSA) as a standard²². Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the method of Laemmli²³, and immunoblotting was carried out with a transfer buffer (25 mM Tris-HCl [pH 8.3], 192 mM glycine, and 20% [v/v] methanol) using a semi-blotter (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) according to the method of Towbin²⁴.

Analysis of *bdh1* mutant and *bdh2* mutant

To construct *bdh1* mutant ($\Delta bdh1$) and *bdh2* mutant ($\Delta bdh2$) of *R. pickettii* T1, suicide vectors (pZJDT11 and pJZDT12) were prepared. The *bdh* mutants were constructed by homologous recombination according to the methods of Simon et al²⁵. The internal sequence of *bdh1* or *bdh2* was amplified from template pTB118 (pUC19 carrying a 1.8-kb *Bam*HI fragment containing *bdh1*) and pTB215 (pUC19 carrying a 1.5-kb *Pst*I fragment containing *bdh2*), and the PCR fragments were inserted into pZJD2 to yield pZJDT11 and pJZDT12. The primers used were 5'-ATGCAGCTCAAAGGAAAGTCC-3' and 5'-GG-TGGCCTGGTTGACGGACGCCTC-3' for *bdh1* and 5'-ACATGAGCAAGGCATCGGA-3' and 5'-G-TTCTTCTGCCGCATGCCG-3' for *bdh2*.

R. pickettii T1 wild type, $\Delta bdh1$, and $\Delta bdh2$ were precultured in NB overnight, and then inoculated into 500 ml of MM with 0.15% (w/v) PHB as a sole carbon source. The cells were cultured at 30°C for 24 h, except that $\Delta bdh1$ needed 48 h to obtain the minimum necessary cell weight, and harvested by centrifugation. The pellet was resuspended with 5 volumes of buffer A

(20 mM Tris-HCl [pH 8.0] and 20% glycerol), and sonicated. The cell extracts were applied to a Q Sepharose Fast Flow (FF) column (5 × 3 cm; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) equilibrated with buffer A. After a wash with buffer A, BDHs were eluted and separated with a linear NaCl gradient (0–0.2 M, 500 ml) in buffer A. Active fractions were collected, and the total activity of BDH(s) of each peak was determined.

Purification of BDH3 from *bdh2* mutant

$\Delta bdh2$ was cultured at 30°C for 24 h in 5 liters of MM with 0.15% (w/v) PHB, and the cells were harvested by centrifugation. The pellet was re-suspended with 5 volumes of buffer A, and sonicated. The cell extracts were centrifuged at 15,000 × g for 40 min at 4°C, and the supernatant was applied to a Q Sepharose FF column (5 × 5 cm; GE Healthcare) equilibrated with buffer A. After a wash with buffer A, BDHs were eluted with a linear NaCl gradient (0–0.2 M, 500 ml) in buffer A. Active fractions (180 ml) were mixed with 20 ml of 1 M Tris-HCl (pH 8.0) and 53 g of ammonium sulfate, and applied to a TOYOPEARL phenyl-650M (1.5 × 6 cm; Tosoh, Tokyo, Japan) equilibrated with buffer B (0.1 M Tris-HCl [pH 8.0], 20% glycerol, and 2 M ammonium sulfate). After a wash with buffer B, the enzyme was eluted with a linear ammonium sulfate gradient (2–0 M, 200 ml) in buffer B. Active fractions were dialyzed against buffer C (20 mM phosphate [pH 7.0] and 20% glycerol) for 4.5 h, and applied to a red-Sepharose CL-4B column (1.5 × 7 cm)¹⁷ equilibrated with buffer C. After a wash with buffer C, the enzyme was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) with 20% [v/v] glycerol, 1 mM 3HB, and 0.5 mM NAD⁺. After dialysis against buffer C, the enzyme was stored at -20°C.

Cloning of *bdh3* and purification of gene product of *bdh3* expressed in *E. coli*

To clone *bdh3*, Southern hybridization was performed with a [α -³²P]-labeled *bdh2* as a probe according to standard techniques²⁶. The *bdh2* fragment (798-bp) was amplified from pETT12 as a template with primers: 5'-ATATATACATATGCTTAAAGGCAAGACGG-3' and 5'-TCGGATCCTATTGCGGAACCAGCC-3'. A 4.2-kbp *Pst*I fragment,

including *bdh3*, was isolated and inserted into the cloning vector pUC19 digested with *Pst*I. The resultant plasmid (pTB342) was digested with *Bam*HI and *Pst*I, yielding pTB319 carrying a 1.9-kbp *Bam*HI-*Pst*I fragment, including *bdh3*. The nucleotide sequence of *bdh3* and the adjacent regions was determined, and analyzed with the GENETYX-WIN/ATSQ (version 5.1; Software Development, Tokyo, Japan).

To overexpress *bdh3* in *E. coli*, *bdh3* was amplified from pTB319 as a template with primers: 5'-CCGGATCCATATGACTACCACCC-CCTCTGCGCC-3' and 5'-CCGGATCCTTACTG-CGCGGTCCAGCCCGTC-3'. The PCR products were inserted into the expression vector pET23b to yield pETT13. *E. coli* BLR (DE3)/pLysS (Novagen) harboring pETT13 was cultivated at 37°C to reach the optical density at 600 nm of 0.3 to 0.5. The expression of *bdh3* was induced with the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (final 0.1 mM), and cultured at 18°C overnight. The pellet was harvested by centrifugation, and resuspended with 5 volumes of buffer A, and then sonicated. The supernatant was applied to a TOYOPEARL DEAE-650M [2.5 \times 3.5 cm; Tosoh] and a red-Sepharose CL-4B [5 \times 8 cm]), and the gene product was purified according to the procedures described previously¹⁹⁾.

The nucleotide and amino acid sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ nucleotide sequence databases under accession number AB330992 for *bdh3* of *R. pickettii* T1.

Results

Isolation of BDH3 from *bdh2* mutant and characterization of BDH3

R. pickettii T1 wild type, $\Delta bdh1$, and $\Delta bdh2$ were grown on MM with PHB, and BDH1 and BDH2 were separated with anion-exchange column chromatography (data not shown).

In the wild type, two peaks of BDH activity appeared at approx. 0.1 M and 0.15 M of a linear NaCl gradient (0 to 0.2 M). The two peaks were termed peak (I) (BDH1_{RpT1}) and peak (II) (BDH2_{RpT1}). $\Delta bdh1$ had peak (II), but did not peak (I), whereas $\Delta bdh2$ had the two peaks like in the wild type.

To identify the BDH of peak (II) in $\Delta bdh2$, the enzyme was partially purified. The protein showed a subunit molecular mass of approx. 28 kDa on SDS-PAGE, which differed from that of either BDH1_{RpT1} (31 kDa) or BDH2_{RpT1} (31 kDa) (data not shown). The BDH partially purified had 630 units mg⁻¹ of specific activity, which was higher than BDH1_{RpT1} (180 units mg⁻¹) and BDH2_{RpT1} (85 units mg⁻¹) (Table 1)¹⁹⁾. The N-terminal amino acid sequence of the BDH besides BDH1_{RpT1} in $\Delta bdh2$ was determined chemically to be MTTTPSAAPLA-GKTALVTGSTSGIGLGIK, whose sequence differed from BDH1_{RpT1} and BDH2_{RpT1}¹⁹⁾.

Cloning and genetic properties of *bdh3*

To clone the gene of a novel BDH (BDH3), Southern blotting was carried out with the DNA fragments of *bdh2* as a probe (Fig. 1). In addition to the strong signal bands of *bdh2* (at 3.8 kbp in the *Bam*HI-digest; at 1.5 kbp in the *Pst*I-digest), a weak signal band at 4.2 kbp in *Pst*I-digested was observed. The DNA fragment of 4.2 kbp was inserted into pUC19, and cloned by colony hybridization with *bdh2* as a probe.

The cloned *Pst*I fragment (4,217 bp) contained an open reading frame (ORF) of 795 bp (72% G+C content) that coded for 264 amino acid residues whose predicted molecular weight was 26,910. The amino acid sequence deduced from the ORF had a putative N-terminal coenzyme-binding motif (GxxxGxG) and putative active-site residues (Ser¹³⁹, Tyr¹⁵², and Lys¹⁵⁶ with the numbering of alcohol dehydrogenase from *Drosophila melanogaster* [AF175211]) conserved in many dehydrogenases²⁷⁾.

The amino acid sequence of BDH3 had 39% identity with BDH1 (AB239333), 66% identity with BDH2 (AB239334), and 50–70% identity with BDHs from other bacteria. BDH3 showed greater similarity with BDH2, but less similarity with BDH1.

Purification of the gene product of *bdh3* from *E. coli*

bdh3 was expressed in *E. coli*, and the gene product (BDH3_{Eco}) was purified by two steps of column chromatography. The specific activity of

Table 1. Partial purification of BDH3 from *bdh2* mutant^a

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)
crude extract ^b	770	680	1.1	100
Q Sepharose	630	160	3.9	100
phenyl-650-M	620	49	13	98
red-Sepharose	490	0.78	630	78

^a BDH3 was purified from 37 g in wet weight of *bdh2* mutant cells.

^b Cell extract contained BDH1 (130 units), which was separated from BDH3 by a linear NaCl gradient (0–0.2 M) in a Q Sepharose FF column.

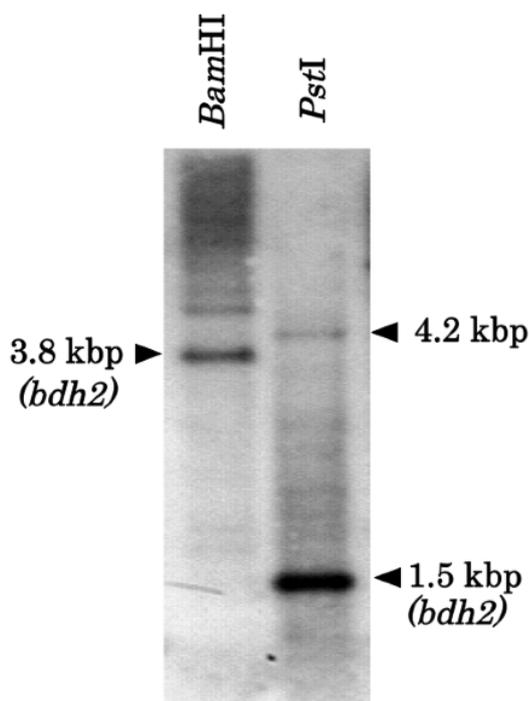


Fig. 1. Southern blotting to clone *bdh3*. Chromosomal DNA of *R. pickettii* T1 digested with *Bam*HI- or *Pst*I was blotted on the nylon membrane, and hybridized with *bdh2* fragment as a probe. Arrows indicate the positions of *bdh2* and *bdh3*.

the purified BDH3_{Eco} (1,200 units mg⁻¹) was higher than those of BDH1_{Eco} (450 units mg⁻¹) and BDH2_{Eco} (360 units mg⁻¹) purified from *E. coli* (Table 2)¹⁹. BDH3_{Eco} showed a subunit molecular mass of approx. 28 kDa on SDS-PAGE (data not shown), corresponding to that of BDH3_{RpT1}. The N-terminal amino acid sequence of BDH3_{Eco} corresponded to that of BDH3_{RpT1}.

Table 2. Purification of the gene product of *bdh3* expressed in *E. coli*^a

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)
crude extract	34000	1200	28	100
DEAE 650-M	37000	94	390	110
red-Sepharose	37000	30	1200	110

^a The enzyme was purified with 2.0 g in wet weight of *E. coli* cells.

Discussion

We recently described that *R. pickettii* T1, a bacterium growing on an extracellular PHB, has two BDHs (BDH1 and BDH2) with different biochemical and physiological properties¹⁹.

In analysis of mutants lacking *bdh1* or *bdh2*, it was indicated that *R. pickettii* T1 has the third BDH (BDH3) different from BDH1 and BDH2. We could not detect the presence of BDH3 until the mutant lacking BDH2 was examined with column chromatography, because BDH3 was always accompanied by BDH2 in the process of purifying BDH2 so far. It was interesting that BDH3 had 2 to 3-fold greater specific activity than BDH1 and BDH2 (Table 1 and 2)¹⁹. Possibly, BDH3 is better than BDH1 and BDH2 in utilization of 3HB.

The cloning of *bdh3* was achieved with difficulty, that is, *bdh3* was detected with very weak signal in Southern blotting with *bdh2* as a probe regardless of greater homology between *bdh2* and *bdh3* (Fig. 1). Perhaps, *R. pickettii* T1 contains three BDHs or more. It has not ever been reported that multiple BDHs were identified and characterized biochemically in a bacterium, although it was reported that some *Rhizobium* strains produce multiple forms of BDH in electrophoresis²⁸.

In this study, it was demonstrated that *R. pickettii* T1 contains three BDHs (BDH1, BDH2, and BDH3), and a novel BDH (BDH3) differs greatly from BDH2 in specific activity despite the similarity in the amino acid sequence. Probably, these three BDHs play different physiological

roles in utilization of 3HB in *R. pickettii* T1.

References

- 1) Anderson AJ and Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**:450–472.
- 2) Bergmeyer HU, Gawehn K, Klotzsch H, Krebs HA, and Williamson DH (1967) Purification and properties of crystalline 3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem. J.* **102**:423–431.
- 3) Dawes EA and Senior PJ (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* **10**:135–266.
- 4) Jackson FA and Dawes EA (1976) Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J. Gen. Microbiol.* **97**:303–312.
- 5) Senior PJ and Dawes EA (1971) Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**:55–66.
- 6) Senior PJ and Dawes EA (1973) The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**:225–238.
- 7) Steinbuchel A and Schlegel HG (1989) Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:168–175.
- 8) Delafield FP, Cooksey KE and Doudoroff M (1965) β -Hydroxybutyric dehydrogenase and dimer hydrolase of *Pseudomonas lemoignei*. *J. Biol. Chem.* **240**:4023–4028.
- 9) Jurtshuk P, Manning S and Barrera CR (1968) Isolation and purification of the D(-)- β -hydroxybutyric dehydrogenase of *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* **14**:775–783.
- 10) Kover J, Matyskova I and Matyska L (1986) Kinetics of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **871**:302–309.
- 11) Kruger K, Lang G, Weidner T and Engel AM (1999) Cloning and functional expression of the D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase gene of *Rhodobacter* sp. DSMZ 12077. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:666–669.
- 12) Lotter LH and Dubery IA (1989) Metabolic regulation of β -hydroxybutyrate dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffii*. *Water S. A. (Pretoria)* **15**:65–70.
- 13) Nakada T, Fukui T, Saito T, Miki K, Oji C, Matsuda S, Ushijima A and Tomita K. (1981) Purification and properties of D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *J. Biochem.* **89**:625–635.
- 14) Sara T, Patricia S and Yaacov O (1990) Purification and characterization of D(-)- β -hydroxybutyrate dehydrogenase from *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* **136**:645–649.
- 15) Schindler J and Schlegel HG (1963) D(-)-beta-hydroxybuttersaeure dehydrogenase aus hydrogemonas H16. *Biochem. Z.* **339**: 154–161.
- 16) Shuster CW and Doudoroff M (1962) A cold-sensitive D(-)- β -hydroxybutyric acid dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **237**:603–607.
- 17) Takanashi M, Shibahara T, Shiraki M and Saito T (2004) Biochemical and genetic characterization of a D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from *Acidovorax* sp. strain SA1. *J. Biosci. Bioeng.* **97**:78–81.
- 18) Aneja P and Charles TC (1999) Poly-3-hydroxybutyrate degradation in *Rhizobium (Shinorhizobium) meliloti* isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **181**:849–857.
- 19) Takanashi M and Saito T (2006) Characterization of two 3-hydroxybutyrate dehydrogenases in poly(3-hydroxybutyrate)-degradable bacterium, *Ralstonia pickettii* T1. *J. Biosci. Bioeng.* **101**:501–507.
- 20) Stinson MW and Merrick JM (1974) Extracellular enzyme secretion by *Pseudomonas lemoignei*. *J. Bacteriol.* **119**:152–161.
- 21) Penfold RJ and Pemberton M (1992) An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene* **118**: 145–146.
- 22) Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitative analysis of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
- 23) Laemmli UK (1971) Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- 24) Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350–4355.
- 25) Simon R, Priefer U and Puhler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria, *Bio/Technology* **1**: 37–45.
- 26) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 27) Persson B, Krook M and Jornvall H (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenase and related enzyme. *Eur. J. Biochem.* **200**:537–543.
- 28) Fottrell PF and O'Hara A (1969) Multiple forms of D(-)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase in *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* **57**: 287–292.

■Full-Length Paper■

Benzothiazolyphenol-Substituted Ketoester is a Useful Fluorescent Probe for Detection of the Mitochondrion in Sea Urchin Sperm

Makoto Kazama^{1,3}, Keiichirou Kanda¹, Masatoshi Tanimura²,
Akiya Hino¹, Masakatsu Matsumoto² and Suechika Suzuki¹

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

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

³ To whom correspondence should be addressed. e-mail: ft101653@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: One of the ketoesters derived from benzothiazolyphenol-substituted dioxetane, benzothiazolyphenol-substituted ketoester (TPKE), demonstrates fluorescence in a 0.1 M NaOH ¹⁾. In this study, the fluorescent staining of a living cell with TPKE was demonstrated by fluorescence microscopy. When sperm from two species of sea urchins—*Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina*—were used as biological materials, TPKE showed a fluorescent signal in the midpiece that was composed of a single mitochondrion. The ratio of fluorescent signal intensity to background noise (S/N) was high in the sperm stained with 1.0–5.0 µg/ml TPKE in normal artificial seawater (pH 8.0). The S/N ratio decreased in acidic seawater (pH 6.0); acidic conditions repress respiratory activity in sea urchin sperm. Moreover, in the presence of the respiratory chain inhibitor antimycin A and the uncoupler carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone, the sperm showed faint or no fluorescence in normal artificial seawater (pH 8.0). Sea urchin sperm stained with TPKE after fixation showed faint or no fluorescence. These results suggest that TPKE is a potential fluorescent probe of living sea urchin sperm mitochondria with high respiratory activities.

Keywords: sea urchin sperm, mitochondrion, fluorescence microscopy, dioxetane, ketoester

Introduction

Chemiluminescent and fluorescent substrates are powerful tools in many assays and other applications in the modern fields of biology and medicine. Examples of high-energy chemiluminescent molecules with applications in high-sensitivity biochemical and biomedical analyses are 1,2-dioxetanes ^{1, 2)}. Dioxetanes have good thermal stability; however, they decompose exclusively into the corresponding ketoesters on prolonged heating in hot xylene. A typical dioxetane, namely, benzothiazolyphenol-substituted dioxetane (TPOX), undergoes base-induced chemiluminescent decomposition to the corresponding ketoester TPKE; this ketoester demonstrates fluorescence in a 0.1 M NaOH solution ¹⁾. The characteristics of the ketoester make it a candidate fluorescent probe; however, there are

no reports of the application of this ketoester in cell staining and other biological assays.

The use of this ketoester in staining and/or detection conditions would require basic conditions. To examine whether this ketoester could be used as a fluorescent probe to stain cells, base-resistant biological materials are needed. We selected the sea urchin sperm as the base-resistant cell. Sea urchin generally releases sperm into sea water, which has a pH value of 7.8–8.2. The pH of artificial sea water (ASW) is generally adjusted to 8.0 in the experiments of development and fertilization in sea urchin ³⁾. The intracellular pH of the sea urchin sperm increases at the initiation of the flagellar motion brought about by the Na⁺/H⁺ exchange across the plasma membrane ⁴⁾.

Another advantage of sea urchin sperm is their simple structure; they are classified as primitive sperm with a single torus-shaped mitochondrion surrounding the flagellum at the base of the nucleus^{5,6}. Such a structure would permit easy recognition of the region that stains with fluorescent substrates under an optical microscope. These properties of sea urchin sperm make them suitable for experiments on staining with dioxetanes and their corresponding ketoesters.

The aim of the present study is to prove the potential of dioxetane-derived ketoesters as probes for fluorescence microscopy. We examined whether sea urchin sperm stained with TPKE and three other dioxetane chemiluminescent substrates, namely, TPOX, adamantyl-derivative TPOX (TPOX-Ad), and benzothiazolylresorcinol-substituted dioxetanes (TROX) (Fig. 1). We report cell staining with these substrates and the physiological conditions in which the detection of fluorescent or chemiluminescent substrates in sea urchin sperm is feasible.

Materials and Methods

Chemicals

Three dioxetanes—TPOX, TPOX-Ad, and TROX—and TPKE a ketoester-derived TPOX (Fig. 1), were prepared as described by Matsumoto *et al.*¹¹. These compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) and stored at 4°C. Other fluorescent substrates 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Wako Pure Chemical In-

dustries, Ltd., Osaka, Japan) and MitoTracker Green FM (M7514; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, U.S.A.) were dissolved in DMSO to produce 50 µg/ml and 0.1mM stock solutions, respectively. The stock solution of DAPI was stored at 4°C and that of MitoTracker Green FM was stored at -20°C.

ASW composed of 420 mM NaCl, 9.0 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 24.5 mM MgCl₂, 25.5 mM MgSO₄, 2.15 mM NaHCO₃, and 10 mM HEPES (N-2-hydroxylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; Dojindo Laboratory, Kumamoto, Japan). The pH was adjusted to 6.0–9.0 by addition of HCl or NaOH. All the reagents used in ASW preparation were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Paraformaldehyde was purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, U.S.A.). The respiratory inhibitor antimycin A (AMA) and the respiratory uncoupler carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) were purchased from SIGMA-ALDRICH Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). These were stored as 20 mg/ml and 15mM stock solutions in DMSO, respectively, at -20°C.

Biological materials

Two species of sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina*, were used for the experiment during their breeding seasons. *A. crassispina* was collected from Sagami Bay, Kanagawa, Japan. *P. depressus* was purchased from Misaki Marine Biological Station, Tokyo University. Sea urchin gametes were obtained by injecting 0.5 M KCl into the coelom to induce spawning. The sperm samples were subsequently stored on ice as "dry sperm" (approximately 20 × 10⁹ sperm/ml) until use.

The staining of sperm was initiated with a 1000-fold dilution of dry sperm into ASW containing with a fluorescent substrates. The treatment of sperm was performed at staining process with the presence of 100 µg/ml antimycin A (AMA), 75 µM carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), or 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO). The staining and treating process was terminated after 30 min. After centrifugation (1,000 g, for 5 min at 4°C), the suspensions were substituted twice with fresh

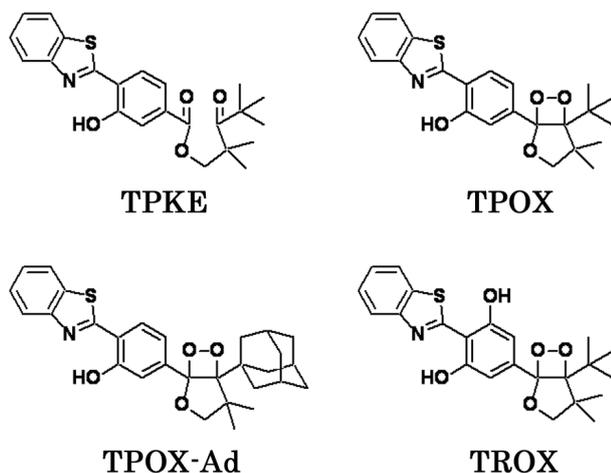


Fig. 1. Schemes of TPKE and three dioxetanes.

ASW.

Image analyses

The sperm were observed using a fluorescence microscope system (BX 51 equipped with a 100 W Hg lamp, and mirror units of U-MWU2 and U-MWIB3; Olympus Corporation, Tokyo, Japan). After staining with TPKE and three dioxetanes, fluorescent images were obtained with an exposure time of 10 sec and bright field images, with an exposure time of 1/5.5 s, by using a Penguin 150CL camera (Pixera Co., San Jose, CA, U.S.A.) connected to the fluorescence microscope system. Fluorescent and bright-field images were acquired with the same field of view.

All images were imported into, resized, and trimmed using the Adobe PhotoShop 7.0 software (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA). All fluorescent images were converted into 8-bit gray-scale images for image analyses. The average pixel intensities of selected fluorescent regions were measured by using the Adobe PhotoShop 7.0 software. The fluorescent intensities were determined by the average of S/N values, i.e., ratio of the average signal intensity of the fluorescent region to that of the same square area of absence sperm regions as background noise.

The results were expressed as mean \pm (standard deviation) S.D. of the S/N value from ten or more sperm on three or more images acquired independently under the same experimental conditions. Statistical analyses were performed using a Student's *t* test (two-tailed, unpaired). A *p* value less than 0.01 was considered to be statistically significant.

Results

Sperm morphology and TPKE staining

The midpiece of the sea urchin sperm in normal ASW (pH 8.0) is closely pressed against the sperm head, and the flagellum extends directly back from the head through the midpiece^{5, 6}.

Sperm of the sea urchin *P. depressus* were suspended without fixation and washing in ASW (pH 8.0) containing 10 μ M TPOX.

After fixation with 1% paraformaldehyde in ASW, the sperm of *P. depressus*, were stained with DAPI and MitoTracker Green (Fig.2).

DAPI and MitoTracker Green are commercial fluorescent substrates that stain nuclei and mitochondria, respectively. The blue color emitted by DAPI on UV excitation was identified to originate from a sperm head with a conical or triangular shape (Fig.2 B). The region from which green color was emitted on excitation with blue light was observed to be elliptical or round (Fig.2 C).

The shape and location of the region of green fluorescence indicated that the region stained by MitoTracker Green was the midpiece. Merged images confirmed these observations (Fig.2 D); the locations of the nucleus and mitochondrion of the sea urchin sperm are consistent with those reported in previous studies^{5, 6}.

Sperm after fixation with 1% paraformaldehyde in ASW showed no fluorescence and chemiluminescence with 10 μ g/ml TPKE in ASW. However, the sperm without paraformaldehyde was allowed to observe the fluorescent before substitution fresh ASW as shown in Fig. 3. The whole sperm was stained; however, no specific staining with TPKE was observed. To obtain a clearer image, fluorescence was determined under different staining conditions such as different pH values of ASW and different TPKE concentration. Additionally, washing as substitution of fresh ASW was performed after the staining.

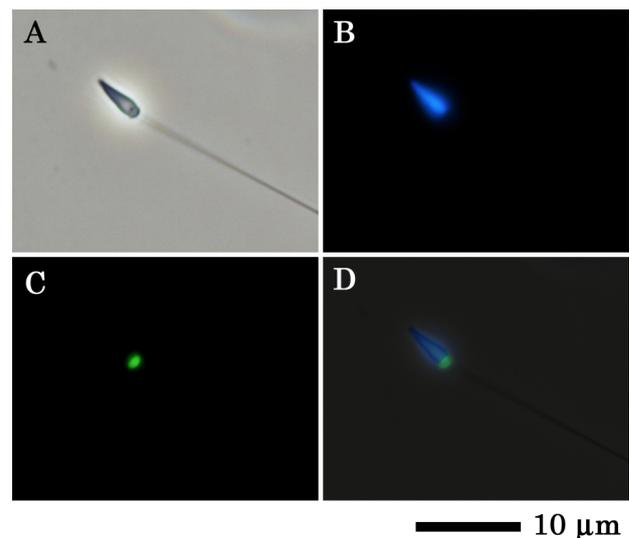


Fig. 2. Fluorescent images of the sperm of *P. depressus*. After fixation, sea urchin sperm were stained with DAPI and MitoTracker Green. The images were captured with a UV (B) or a blue (C) excitation filter. The bright fluorescence is shown in (A). The image (D) is obtained by merging images (A), (B), and (C).

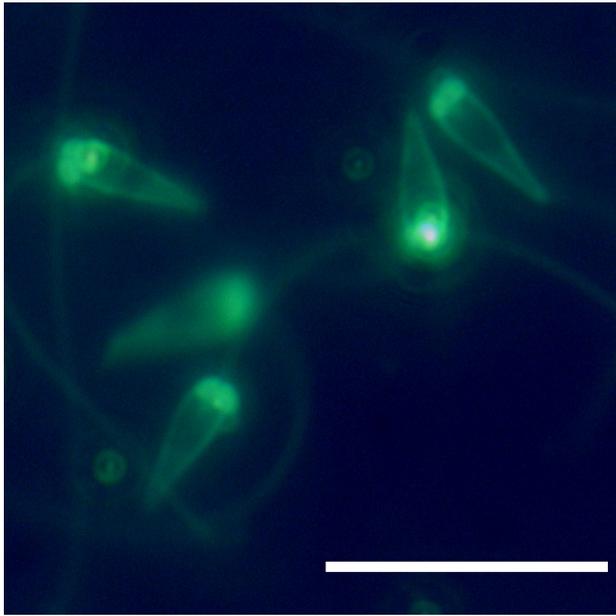


Fig. 3. Fluorescent images of sea urchin sperm stained with TPKE. Sperm of the sea urchin *P. depressus* were suspended without fixation and washing in ASW (pH 8.0) containing 10 μM TPOX. The bar represents 10 μm.

Staining process under different pH value

To compare the degrees of fluorescence of sperm when different pH values of ASW were used (pH 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0), *P. depressus* sperm were suspended without fixation in each of the ASW containing 5.0 μg/ml TPKE. Sperm images were acquired after termination of the staining process. Typical images are shown in Fig. 4. In ASW with pH 6.0 and 7.0, sea urchin sperm showed faint fluorescent signals from the midpiece. Strong fluorescence was observed in the sperm suspension in ASW of pH 8.0. Fluorescence was detected only in the midpiece.

Occasionally, other regions demonstrated faint fluorescence.

The image analyses are shown in Fig. 5. The ratio of the signal intensities of the fluorescent regions (S/N; midpiece region/background) in ASW of pH 8.0 was significantly ($p < 0.01$) higher than in ASW of pH 6.0 and 7.0. However, the S/N values in ASW with pH 9.0 and pH 8.0 were the same; therefore, there was no significance ($p = 0.085$). It was suggested that the sea urchin sperms in basic ASW (pH 8.0 – 9.0) demonstrated strong fluorescent signals.

TPKE concentration

To determine TPKE concentration to stain *P. depressus* sperm in ASW (pH 8.0), the staining performed with various concentrations of TPKE ranging from 0–10 μg/ml (Fig. 6 and 7). Before acquiring the images, we washed the sea urchin sperm twice with fresh ASW (pH 8.0) after the staining process.

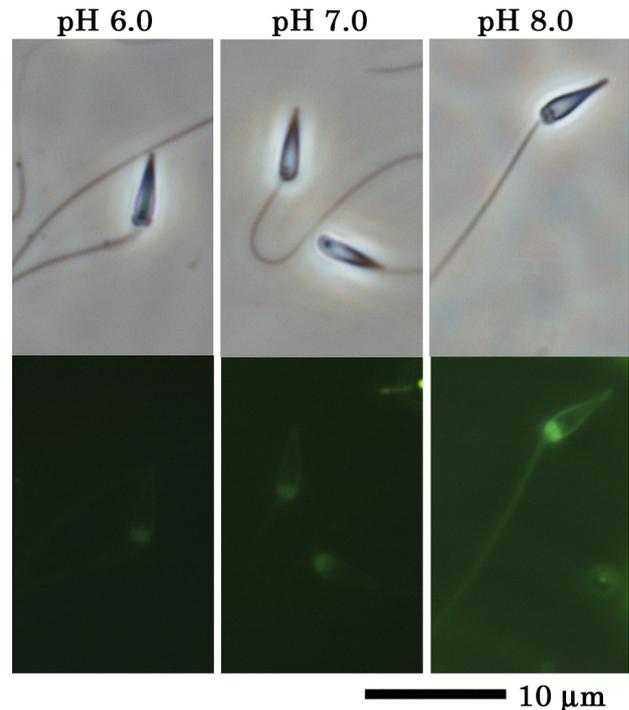


Fig. 4. Sperm stained with TPKE in ASW with different pH values. Sea urchin sperm were stained with 5.0 μM TPKE in ASW with pH adjusted between 6.0–9.0. These images were captured after each wash with fresh ASW.

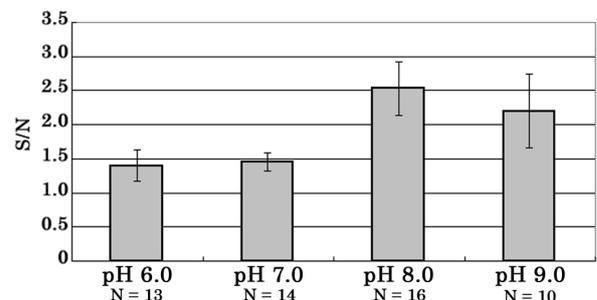


Fig. 5. The fluorescence intensity in the sperm midpiece in ASW with different pH values. The mean of S/N are represented as the fluorescent intensities. These sperm were stained with 5.0 μM TPKE. The N indicates the number of sperm counted in 3 or more images. The bar represents S.D.

Clearer fluorescent images were obtained with TPKE concentrations ranging from 1.0–10 $\mu\text{g/ml}$. In these images, strong fluorescent signals showed as the midpiece of sperm. The fluorescence intensities of sperm stained with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ or less TPKE were weak; however, a higher fluorescence intensity was observed in the case of sperm stained with 1.0–10 $\mu\text{g/ml}$ TPKE. The image of sperms with 10 $\mu\text{g/ml}$ TPKE demonstrated clear fluorescent signal at the midpiece, as was the

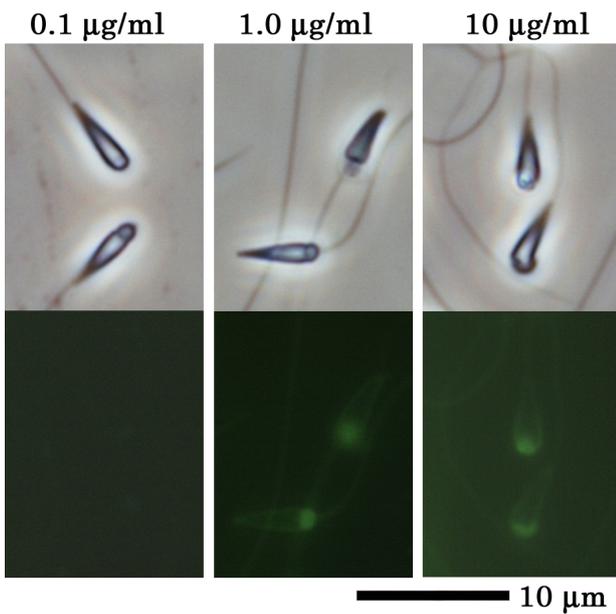


Fig. 6. Fluorescent images obtained with various TPKE concentrations. Sea urchin sperm were stained with 0–10 μM TPKE in ASW (pH 8.0).

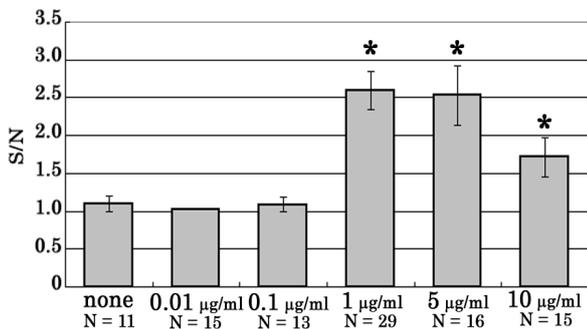


Fig. 7. The fluorescent intensity in the sperm midpiece after staining with various TPKE concentrations. The mean of S/N values are represented (The bar represents S.D). The sperms were stained with 5.0 μM TPKE. * indicates statistical significance ($p < 0.01$ compared with absence of TPKE). The n indicates the number of sperms counted in 3 or more images.

case with sperms stained with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ TPKE. The S/N of sperm stained with 1.0, 5.0, and 10 $\mu\text{g/ml}$ TPKE were significantly higher ($p < 0.01$, Fig. 7), however, the S/N of sperm stained with 10 $\mu\text{g/ml}$ TPKE was lower than that with 1.0 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$ TPKE. Thus, appropriate staining of the sea urchin sperm could be achieved with TPKE concentrations of 1.0–5.0 $\mu\text{g/ml}$.

Relationship between respiratory activity and TPKE signal

As previously mentioned, the strong green fluorescent signals were identified to correspond to the midpiece of a sea urchin sperm. The midpiece is a single mitochondrion that carries out aerobic respiration. In order to examine the requirement for TPKE staining to the mitochondrial activity, sperm were suspended in ASW (pH 8.0) containing a respiratory chain inhibitor AMA and an uncoupler FCCP.

Fig. 8 shows typical images of sea urchin *P. depressus* sperm stained with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ TPKE in the presence of AMA or FCCP, and in their absence. Whether treated with AMA or FCCP, the sperm showed faint or no fluorescent signals. These sperm showed mitochondrial deformation that the mitochondrion was spherical and removed to a lateral side⁶⁾. In contrast, clear fluorescent signals and no mitochondrial deformation were showed in the sea urchin sperm that had been stained with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ TPKE in ASW containing 0.5% DMSO as co-solvent of AMA or FCCP. The S/N of that fluorescence is no significant compared with the absence of DMSO ($p = 0.062$).

The S/N of the sperm stained with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ TPKE in the presence of AMA and FCCP showed in Fig. 9. This analysis with bar graph revealed that the S/N values of a sperm stained with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ concentration of TPKE. After fixation with 1% paraformaldehyde, and in the presence of AMA and FCCP, the S/N values of the sperm stained with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ TPKE were significantly lower than that of the sperm treated with 0.5% DMSO as the co-solvent ($p < 0.01$, Fig. 9). Hence, restrictions in the respiratory activity decreased the fluorescent intensity in sea urchin sperm stained with TPKE.

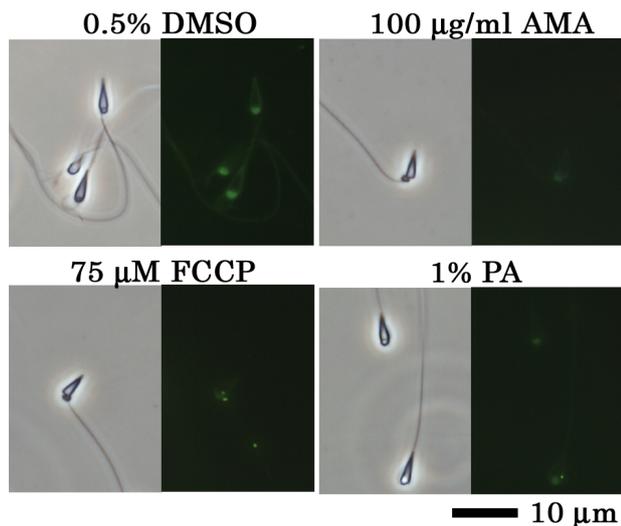


Fig. 8. Fluorescent images of sea urchin sperm stained with TPKE after the treatments. These sperm were stained with 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPKE in the presence of 0.5% DMSO, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AMA, and 75 μM FCCP. 1% PA indicates the sperm stained after fixation in 1% paraformaldehyde.

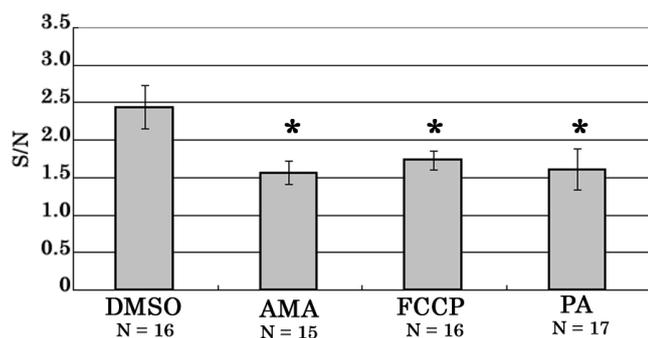


Fig. 9. The fluorescent intensity in the sperm midpiece stained with TPKE in the presence of reagents. The mean of S/N values are represented. These sperm were stained with 1.0 μM TPOX in the presence of 0.5% DMSO, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AMA, and 75 μM FCCP without fixation, * indicates statistical significance ($p < 0.01$ in sperms stained in the presence of 0.5% DMSO).

The three dioxetanes

TPKE is derived from TPOX, in which the chemiluminescence is induced by bases such as NaOH. We attempted to detect the fluorescent and chemiluminescent signals of the sperms of the sea urchin *A. crassispina* by microscopy after staining with TPOX and two other dioxetanes—TROX and TPOX-Ad. These dioxetanes and TPKE were used at a concentration of 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in ASW (pH 8.0); this concentration and pH were

determined condition to use TPKE in sperm of *P. depressus*.

All the four substrates showed no chemiluminescence in the sperm under the microscope. TPKE showed a clear fluorescent signal at the midpiece of the sperm of the sea urchin *A. crassispina*, like as the case of *P. depressus* (Fig. 10). The S/N value of the sperm in this image is 2.48. In the case of the three dioxetanes, namely, TPOX, TROX, and TPOX-Ad, the midpiece showed green (S/N = 1.89), faint green (S/N = 1.58), and blue (S/N = 1.40) fluorescence, respectively. However, these three fluorescent signals were weak. The highest fluorescence was observed with TPKE staining.

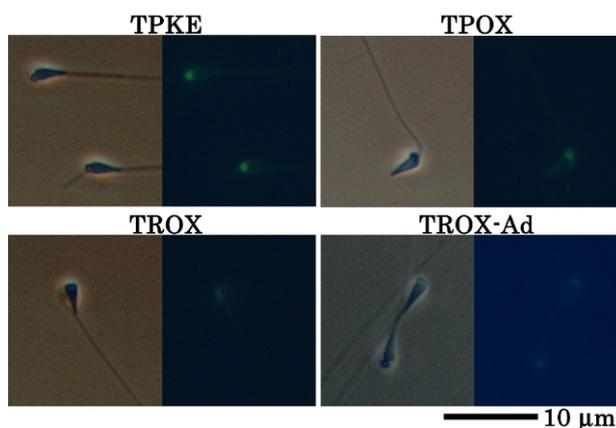


Fig. 10. *A. crassispina* sperms stained with TPKE and 3 dioxetanes. *A. crassispina* sperm were stained with 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPKE and 3 dioxetanes in ASW (pH 8.0). These typical images were obtained after each wash with fresh ASW.

Discussion

The sea urchin sperm is a single cell with a simple structure that is detectable using appropriate fluorescent probes. TPKE is a fluorescent substrate produced by base-induced chemiluminescent TPOX decomposition¹⁾. Sea urchin sperm stained with TPKE emitted a fluorescent signal from the region corresponding to the midpiece, which is composed of a single mitochondrion. During staining, TPKE concentration was adjusted in the range of 1.0–5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in ASW (pH 8.0) to acquire clear images; the fluorescent intensity, as denoted by the S/N values, was higher in this range of TPKE concentration. At the lower TPKE concentrations, no or faint fluorescent signals were

revealed. Background fluorescent intensity increased with higher TPKE concentrations.

Higher S/N value is more desirable for observation. In this study, sperm suspensions were washed by centrifugation (3000 *g*, for 10 min at 4°C) with fresh ASW twice after staining. Further rounds of washing with fresh ASW may be required to minimize background fluorescent intensity. Another disadvantage of TPKE staining was that real-time detection of the fluorescent signal was not possible. All fluorescent images in this study were acquired after an exposure time of 10 sec. Detection systems with a greater sensitivity may be able to overcome this problem.

TPKE is produced by the base-induced chemiluminescent decomposition of TPOX¹⁾. TPOX chemiluminescence is induced by bases such as NaOH. The fluorescence efficiency of TPOX was estimated in an NaOH solution. The S/N fluorescence intensity values in ASW with pH values of 8.0 and 9.0 were higher than in the case of ASW with pH values of 6.0 and 7.0. Although evidence for the pH dependency of TPKE fluorescence is insufficient, the use of basic ASW helped obtain clear images. The elevation of TPKE fluorescence is probably dependent on the pH of ASW.

From another viewpoint, acidic ASW restricts the respiratory activity in sea urchin sperm⁷⁻⁹⁾. AMA or FCCP, which are an inhibitor and an uncoupler of the mitochondrial respiratory chain¹⁰⁾, are also effective for mitochondrial disruption in sea urchin sperm^{6, 11, 12)}. Under these conditions, faint or no fluorescence was observed with TPKE. Moreover, faint or no fluorescence was observed even after fixation. Consequently, the TPKE signal of sea urchin sperm decreases under conditions inducing low respiratory activity.

Sea urchin spawn, fertilize, and live in sea water. The respiration, intracellular pH, and motility of sea urchin sperm increase with elevation in the sea water pH^{7,13)}. Motility of sperm in sea water is initiated by extracellular Na⁺/intracellular H⁺ exchange^{4,14)}. Simultaneously, the oxygen consumption increases owing to the production of adenosine diphosphate (ADP) by adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis in the flagella¹²⁾. Before the initiation of flagellar motion, the respiratory activity of sea urchin remains in state

4, the idle state^{12, 15)}. Hence, clear images of the TPKE signal were obtained by mitochondrial activation of sea urchin sperm.

The fluorescence of several mitochondrial fluorescent probes are dependent on the membrane potentials across the mitochondria of living cells; these probes include rhodamine 123; methyl σ (6-amino-3'-imino-3H-xanthen-9-yl) benzoate monohydrochloride¹⁶⁾, JC-1; 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbo-cyanine iodide¹⁷⁾, and so on. TPKE fluorescence may indicate mitochondria with intact respiratory activity, and it may depend on the potentials across mitochondrial membrane.

TPKE showed fluorescence in the mitochondrion of living sea urchin sperm; however, three dioxetanes—TPOX, TROX, and TPOX-Ad—showed no or faint fluorescence. The faint fluorescence may be derived from the corresponding ketoesters that contaminated or decomposed spontaneously. Further research on these ketoesters is required to clarify how stronger fluorescence can be induced and to subsequently develop fluorescent probes.

Acknowledgments

The authors thanks to Manazuru Facility for Science Education, Yokohama National University; Misaki Marine Biological Station, Tokyo University, for material collection. The authors gratefully acknowledge financial assistance provided by Hi-Tech Research Center Project from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan.

References

- 1) Matsumoto M, Akimoto T, Matsumoto Y and Watanabe N (2005) Bicyclic dioxetanes bearing a 4-(benzoazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl moiety: chemiluminescence profile for base-induced decomposition in aprotic medium and in aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **46**: 6075–6078.
- 2) Matsumoto M and Watanabe N (2005) Structural aspects of 1,2-dioxetanes active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**: 1899–1920.
- 3) Foltz KR, Adams NL and Runft LL (2004) Echinoderm eggs and embryos: procurement and culture. In: *Methods Cell Biol., Vol. 74*. Etensohn CA, Wray GA, Wessel GM, eds., Elsevier Academic Press, California. pp 39–74.

- 4) Nishioka D and Cross N (1978) The role of external sodium in sea urchin fertilization. In: *Cell Reproduction*. Dirksen ER, Prescott D, Fox CF eds., Academic Press, New York. pp 403–413.
- 5) Bernstein MH (1962) Normal and reactive morphology of sea urchin spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **27**: 197–209.
- 6) Kazama M, Asami K and Hino A (2006) Fertilization-induced changes in sea urchin sperm: mitochondrial deformation and phosphatidylserine exposure. *Mol. Reprod. Dev.* **73**: 1303–1311.
- 7) Mohri H and Yasumasu I (1963) Studies on the respiration of sea urchin spermatozoa. V. The effect of P_{CO2}. *J. Exp. Biol.* **40**: 573–586.
- 8) Christen R, Schackmann RW and Shapiro BM (1983) Metabolism of sea urchin sperm. Interrelationships between intracellular pH, ATPase activity, and mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **258**: 5392–5399.
- 9) Suzuki N and Garbers DL (1984) Stimulation of sperm respiration rates by speract at alkaline extracellular pH. *Biol. Reprod.* **30**: 1167–1174.
- 10) Scheffler IE (1998) Mitochondria and pharmacology. In: *Mitochondria*. Wiley-Liss., New York. pp 342–345.
- 11) Hiruma T, Hino A, Fujiwara A and Yasumasu I (1982) Inhibition of respiration in sea urchin spermatozoa following interaction with fixed unfertilized eggs. V. Inhibition of electron transport in a span of mitochondria respiratory chain between cytochrome *b* and cytochrome *c* in sea urchin spermatozoa, induced by the interaction with glutaraldehyde fixed eggs. *Dev. Growth Differ.* **24**: 17–24.
- 12) Christen R, Schackmann RW and Shapiro BM (1983) Interactions between sperm and sea urchin egg jelly. *Dev. Biol.* **98**: 1–14.
- 13) Christen R, Schackmann RW and Shapiro BM (1982) Elevation of the intracellular pH activates respiration and motility of sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Biol. Chem.* **257**: 14881–14890.
- 14) Schackmann RW, Christen R, Shapiro BM (1984) Measurement of plasma membrane and mitochondrial potentials in sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* **259**: 13914–13922.
- 15) Hino A, Hiruma T, Fujiwara A and Yasumasu I (1980) Inhibition of respiration in sea urchin spermatozoa with unfertilized eggs. IV. State 4 respiration in spermatozoa of *Hemicentrotus pulcherrimus* after their interaction with fixed unfertilized eggs. *Dev. Growth Differ.* **22**: 813–820.
- 16) Johnson LV, Walsh ML and Chen LB (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 990–994.
- 17) Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M and Chen A (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3671–3675.

■原 著■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

不斉ナノ空間の構築と不斉認識・不斉合成反応

木原 伸浩^{1,2} 森 和亮¹

Construction of Chiral Nano-Space toward Chiral Recognition and Asymmetric Reaction

Nobuhiro Kihara^{1,2}, Wasuke Mori¹

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

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

Abstract: Synthesis of axially chiral dicarboxylic acids with a rigid and straight structure was studied. The preparation of copper salt of this type of dicarboxylic acid was also studied. Optically active 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthalene-4,4'-dicarboxylic acid 2a was prepared from the corresponding bromide 3 via cyanation followed by hydrolysis although the reaction proceeded in very low yield. We found that 2a could be effectively prepared from 3 via palladium complex-catalyzed vinylation followed by KMnO₄ oxidation. Direct carboxylation of 3 via lithiation followed by the reaction with CO₂ was unsuccessful because of the instability of the monolithiated intermediate. The synthesis of optically active allene-1,3-dicarboxylic acid 9 was investigated. The optical resolution of racemic 9 via the quinine salt was unsuccessful due to slow decomposition, therefore, diastereomeric resolution of (-)-menthyl ester was investigated. A copper (II) salt of racemic 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthalene-3,3'-dicarboxylic acid 15 was prepared. X-ray crystallographic analysis of the single crystal of 15-Cu (II) showed a 2D infinite sheet structure, where each sheet was composed of only one of the enantiomers of 15. The crystal had micropores of 4.15 Å diameter, which well corresponded to the value obtained from the micropore size distribution measurement. Because of the micropore structure, the crystal showed a large surface area (BET: 642 m²g⁻¹, Langmuire: 919 m²g⁻¹).

Keywords: axially chiral dicarboxylic acid, open frame network, chiral nano-space, copper (II) salt, micropore

序論

分子はその結晶状態において基本的に密に充填した構造を取る。しかし、分子間相互作用などが働くことで、密に充填するよりも安定な結晶形が存在する場合、ナノスケールの空隙を持つ結晶構造を取ることになる。このような空隙では、ファン・デル・ワールス力が強く働き、空隙の形状に支配された小分子の取り込み・認識・吸着など、特徴的な性質が現われることになる。

このような空隙を作り出すための基本的なモチーフとして、遷移金属のカルボン酸塩は極めて強力なものである¹⁾。二価の遷移金属イオンにカルボン酸イオンが配位する際には、多くの場合、図1に示す

ようなランタン型の二核錯体構造を取る。4つのカルボン酸イオンは金属-金属中心核が作る軸の周りに4回回転対称性を持つように配置しており、また、それぞれの金属イオンには配位子（通常は水）が配位しているが、それぞれの配位子は金属-金属軸上に配置している。

ここで、カルボン酸として二価のカルボン酸を用い、配位子として二座配位子を用いると、二核錯体を格子点とする格子が作られる。ジカルボン酸も配位子も剛直で直線構造を有するならば、図1に示した二核錯体構造は非常に安定であるため、得られる錯体は閉じることなく三次元的に広がった無限格子

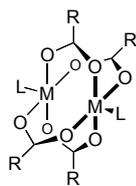


図 1. 遷移金属カルボン酸塩の一般構造.

を与えることになる (図 2)。このような無限格子は柱の間に安定な空間を持つ。そのようにして作られるナノスケールの空間は、用いるカルボン酸や配位子の構造によって、そのサイズだけでなく形状や空隙内にある官能基も自由に制御することができ、ひいては、空隙の性質をも制御することができる。

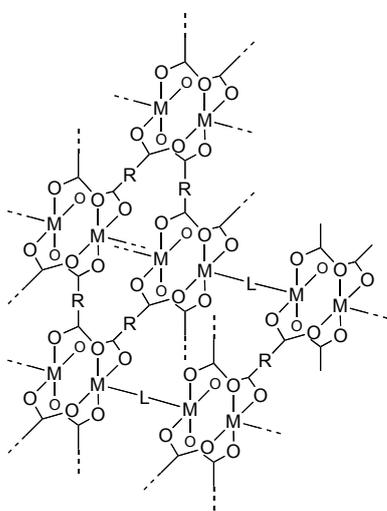


図 2. 二座配位子で架橋された遷移金属(II)カルボン酸塩の作る三次元無限格子.

空間に高度な非対称性を導入すると、不斉な性質が現われる。不斉空間は、不斉認識・不斉合成の場として非常に重要であるが、特に、遷移金属カルボン酸塩から作られるナノスケールの空間に不斉を導入すれば、空間の形状で制御される特異な不斉制御が可能になると期待できる。

我々は、そのような観点から、カルボン酸として不斉ジカルボン酸を用いた不斉ナノ空間の構築を検討した。安定なナノ空間を構築するためには、ジカルボン酸が剛直な構造をもっている必要がある。そこで、シクロペンタン環により 2 つのカルボキシ基が固定された樟脳酸を用いた。樟脳酸銅(II)は、樟脳酸が配位子としても働き、期待したような無限格子構造を形成したが、配位した樟脳酸により空隙が埋められ、空隙を持たなかった。一方、ピラジンや 4,4'-ビピリジンを用いると、[110]方向にそれぞれ約 $2.8 \text{ \AA} \times 3.5 \text{ \AA}$ と約 $7.0 \text{ \AA} \times 3.5 \text{ \AA}$ の空隙を持つ無限格子構造の結晶が得られた。また、CD スペクトルから、これらの空隙が不斉環境を持つこと

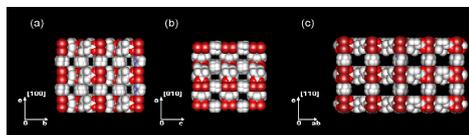
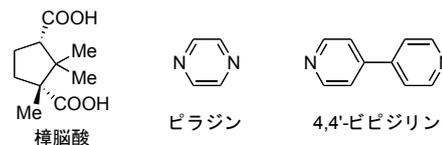


図 3. 樟脳酸、ピラジン、4,4'-ビピリジン、および樟脳酸銅(II)ピラジン錯体の結晶構造：(a) [100]方向から、(b) [010]方向から、(c) [110]方向からそれぞれ見たもの。

も明らかとなった (図 3)。

しかし、樟脳酸は直線構造ではないので、類似のジカルボン酸で常に無限格子が得られるとは限らない。また、樟脳酸は天然物であるので、様々な形状や大きさのナノ空間を得ることは難しい。

一般に、直線構造を持つカルボン酸は不斉を持たない。しかし、軸不斉を利用すれば、直線構造と高度の不斉を両立できる。実際、軸不斉をもつ化合物を利用することで優れた不斉触媒や不斉分子認識場が構築されてきた^{2, 3)}。したがって、軸不斉を有するジカルボン酸や配位子を用いて遷移金属塩やその錯体を合成すれば、高度な不斉環境を有するナノ空間が構築できるものと考えられる。

本研究では、いくつかの軸不斉ジカルボン酸の合成とそれによる遷移金属錯体の合成を検討した。

結果と討論

1,1'-ジナフタレン-4,4'-ジカルボン酸誘導体の合成

1,1'-ジナフタレン-2,2'-ジオール 1 は最も重要な軸不斉を有する化合物である (図 4)。1 は入手も容易なため、1 を基本骨格とする様々な分子システムが広く検討されている。ここで 1 の 4,4'位を利用すれば 1 を基本骨格とする直線型のジカルボン酸や軸配位子が得られると考えられる。このような軸不斉カルボン酸や配位子を用いて遷移金属塩やその錯体を合成すれば、高度な不斉環境を有するナノ空間が構築できるものと考えられる。また、1 の水酸基を利用すれば、そのような細孔で不斉反応を行うことも期待できる。

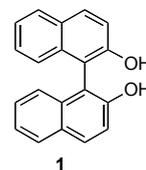


図 4. 1,1'-ジナフタレン-2,2'-ジオール.

そこで、ジカルボン酸として **2** を分子設計した (図 5)。一連の置換基を持つジカルボン酸 **2** は、**2a** から官能基変換で合成できるものと期待できる。**2a** は文献³⁾既知の化合物であり、臭化物 **3** から 4,4'位のシアノ化と続く加水分解で合成できると報告されている。しかし、**3** のシアノ化は効率が悪いだけでなく、シアノ化体 **4** の加水分解には厳しい反応条件が必要である。実際、文献^{4,5)}に従って **3** をシアン化銅(I)と反応させたところ、**4** は得られたものの、その収率は 7%に過ぎなかった。これでは **2** を用いて様々な遷移金属錯体を合成することはできない。そこで、(*R*)-**1** から合成した(*R*)-**3** を用いて、効率良く **2** に誘導することを検討した。

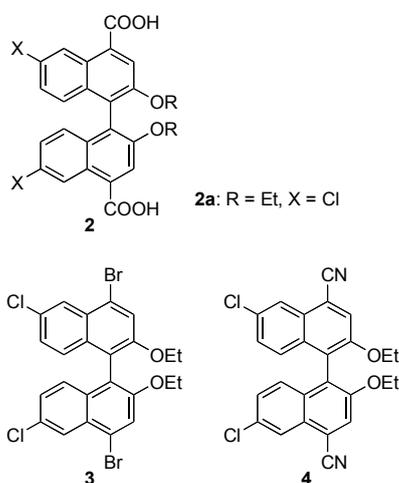


図 5. 標的ジカルボン酸 **2** とその前駆体。

まず、**3** をハロゲン-金属交換反応でリチオ化した後、直接カルボン酸化することを考えた (図 6)。**3** をブチルリチウムでリチオ化し、ドライアイスで処理した。しかし、期待したカルボン酸 **2a** は得られず、複雑な分解生成物とともにプロトン化された **5** が得られるのみであった。

これは、リチオ化体と二酸化炭素との反応が遅いからであると考え、ドライアイスの代わりに、容易に取り扱える (Boc)₂O を用いて同様に反応を行った (図 7)。反応混合物の EI-MS によって **6** が含まれていることは確認できた。しかし、¹H-NMR スペク

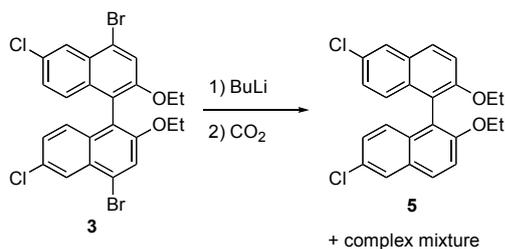


図 6. 直接カルボキシ化の試み。

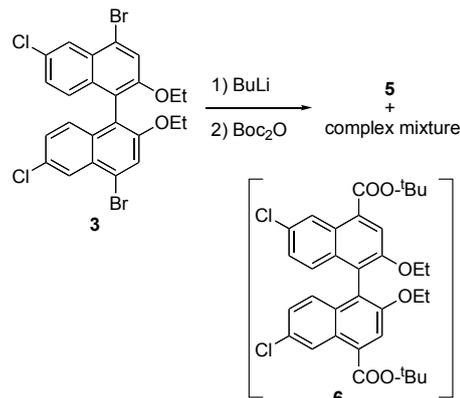


図 7. Boc₂O によるカルボキシ化の試み。

トルから、tert-ブチルエステルの割合は極くわずかであり、主生成物はやはりプロトン化された **5** のようであった。

完全に無水で反応を行なうことにより **5** の生成を抑えることができると期待し、リチオ化した後、ドライアイスから発生させた二酸化炭素を吹き込んで反応させたところ、**5** を副生することなく **2a** を得ることができたがその収率は極めて低いものであった。

そこで、直接カルボキシ化するのではなく、いったんビニル化してから **6**、酸化的にカルボキシ化することを検討した (図 8)。熊田-玉尾カップリング反応条件で **3** をビニル Grignald 試薬と反応させようとしたが、ビニル体 **7** は得られなかった。ビニルボランとの鈴木-宮浦反応やビニルスズとの右田-Stille 反応も全く進行しなかった。この原因をいろいろ検討したところ、**3** が単体硫黄を含んでおり、これが反応を妨害していることが明らかとなった。単体硫黄は、**3** の合成の際に過剰の臭素を除くのに用いたチオ硫酸ナトリウムに由来するものである。そこで、**3** から硫黄を除きビニル化を再び検討したところ、鈴木-宮浦反応によっても、右田-Stille 反応によっても、いずれも定量的にビニル体 **7** を得ることができた。

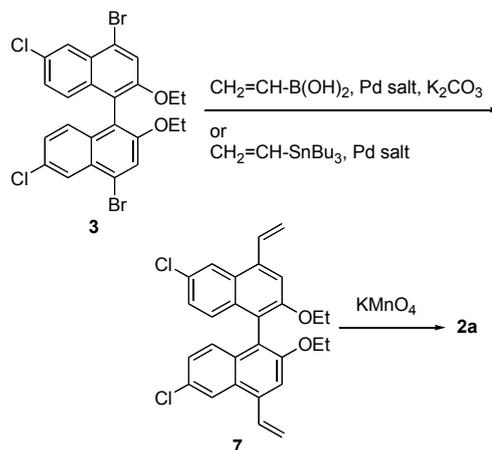


図 8. ビニル化と酸化によるカルボン酸合成。

ビニル体 7 は過マンガン酸カリウムで酸化することでカルボン酸 2a とすることができたがその収率は低い。酸化条件が強すぎ、ナフタレン核の酸化まで進行しているようであるので、より穏やかな条件での酸化をさらに検討している。

一方、単体硫黄を含まない 3 で再び直接カルボキシ化を検討した。しかし、やはり主生成物は複雑な分解生成物であった。分解生成物の中にモノブロモ体が見られないことから、モノリチオ体 8 が不安定な化合物なのであろうと推定される (図 9)。

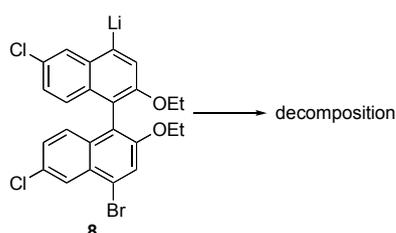


図 9. 不安定なモノリチオ体.

アレン-1,3-ジカルボン酸の合成と光学分割

1,1'-ジナフタレン-2,2'-ジオール 1 以外にも様々な軸不斉化合物があるが、それらは十分に活用されているとは言えない。また、1 を基本骨格とするとカルボキシ基間の距離が広くなりすぎ、細孔の大きさを小さくすることが難しい。そこで、軸不斉ジカルボン酸として、アレン-1,3-ジカルボン酸 9 に着目した (図 10)。9 でナノ空間を構築すれば、9 の作る急峻な軸不斉により優れた不斉場が得られるものと期待できる。

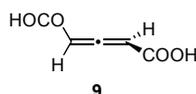


図 10. アレン-1,3-ジカルボン酸.

9 は Jones らによる唯一の合成研究がある程度で⁷⁾、合成的にはほとんど利用されていないが、キニーネとのジアステレオマー塩とすることで光学分割できることが報告されている⁸⁾。そこで、Jones の報告に従い⁷⁾、市販の but-3-yn-1-ol から合成した 10 の Jones 酸化を行なった (図 11)。その結果、酸化と異性化が同時に起こり、9 を含む混合物が得られた。9 は未反応の 10 を含んでいたが、再結晶等の精製手段では 10 を除くことはできなかった。また、残存する 10 を酸化して除くことも検討したが、反応混合物を再び Jones 酸化条件に晒したところ、9 の分解が見られ、純粋な 9 を得ることはできなかった。そこで、10 を含んだままで 9 を取り扱い、光学分割の過程で同時に精製も行なうこととした。

9 をキニーネとの塩にし、再結晶によって水に対

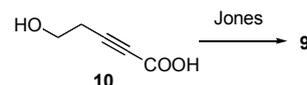


図 11. 9 の合成.

する溶解性の低いジアステレオマー塩を得ることを検討した。しかし、9 のキニーネ塩は除々に分解していき、純粋な塩が得られなかっただけでなく、塩の中での 9 の割合の著しい低下が見られた。これは、9 が比較的熱安定性の低いカルボン酸であることによるものであると考えられる。実際、644 mg のラセミ体の塩から、光学活性な 9 はわずかに 25 mg (27%) しか得られないと報告されており⁸⁾、実用的な光学分割法ではないと考えられる。

そこで、9 を光学活性アルコールでエステル化し、ジアステレオマー分離してから 9 を再生することを検討した。光学活性アルコールとして (*R*)-1-フェニルエタノール 11 を選びエステル化を検討した (図 12)。しかし、エステル化するために 9 を EDC で活性化したところ直ちに分解してしまい、エステルは得られなかった。これは 9 の活性エステル 12 が熱的に不安定であるためと考えられる。

9 やその誘導体は必ずしも熱的に安定ではないの

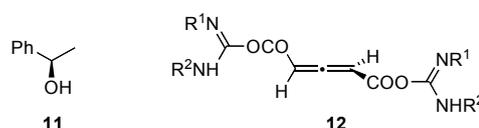


図 12. 光学活性アルコール 11 と不安定な活性エステル 12.

で、9 を直接光学分割するのではなく、光学的に純粋な 9 の前駆体から 9 を誘導することを検討することにした。加藤らは、9 のメントールエステルが、再結晶によって容易にジアステレオマーに分割できることを報告している⁹⁾。しかも、9 のエステルはトリエチルアミンによって軸不斉が反転ラセミ化するため、トリエチルアミンの存在下で結晶化を行なうと、原理的に定量的に一方のジアステレオマーだけを得ることができるとされている。そこで、9 の (-)-メントールエステル 13 を合成し、そのジアステレオマー分離を検討した (図 13)。13 をトリエチルアミンの存在下で結晶化させようとしたが、うまく結晶化しなかった。13 には不純物としてその前駆体 14 が混じっていただけでなく、結晶化条件で 13 に対して系中の何らかの求核剤が攻撃し、13 の分解が起こったものと考えられる。電子吸引性置換基を複数有するアレンにはアニオン重合性が報告されていることから^{10, 11)}、トリエチルアミン存在下で再結晶を行なうためには条件の徹底的な検討が必要であると考えられる。

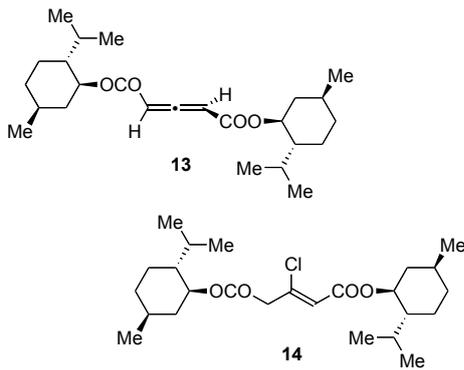


図 13. 光学活性アレン-1,3-ジカルボン酸前駆体 13 と、13 の合成前駆体 14.

1,1'-ジナフタレン-3,3'-ジカルボン酸誘導体を用いた銅(II)塩の合成

市販されている 1,1'-ジナフタレン-2,2'-ジオール 1 のカルボン酸誘導体としては、ナフトエ酸から容易に合成できる 2,2'-ジヒドロキシ-1,1'-ジナフタレン-3,3'-ジカルボン酸 15 がある (図 14)。そこで、まずラセミ体の 15 を用いて銅(II)塩を作成し、その結晶構造を検討した。

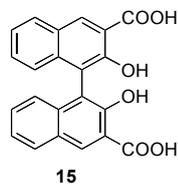


図 14. 2,2'-ジヒドロキシ-1,1'-ジナフタレン-3,3'-ジカルボン酸.

ギ酸銅(II)と 15 をギ酸存在下で反応させ、15 の銅(II)塩一水和物の緑色板状結晶を得た。この結晶構造解析に成功したので図 15 に ORTEP 図を示す。

15 が銅の二核構造中心に配位し、ナフタレン環同士をつなぐ結合部位で曲がることで二次元無限格子状のシートを形成している。(R)-15 の配位で作られるシートと (S)-15 の配位で作られるシートが交互に積層する結晶構造になっており、シートの 1 枚 1 枚はホモキラルである。

シートの積層状態を図 16 に示す。a 軸および b 軸方向から細孔を確認できた。しかし、c 軸方向からは細孔が見られなかった。

細孔は $[110]$ 方向から見た時に最大となる。その時の様子を図 17 に示す。細孔を作る酸素-酸素間距離は 7.190\AA で、酸素のファンデルワールス半径が 3.04\AA であるから、細孔径は 4.15\AA となる。

図 18 に吸着等温線と細孔径分布測定結果を示す。また、比表面積と細孔体積を表 1 に示す。細孔径は 4.4\AA であり、単結晶 X 線構造解析の結果とよく一致

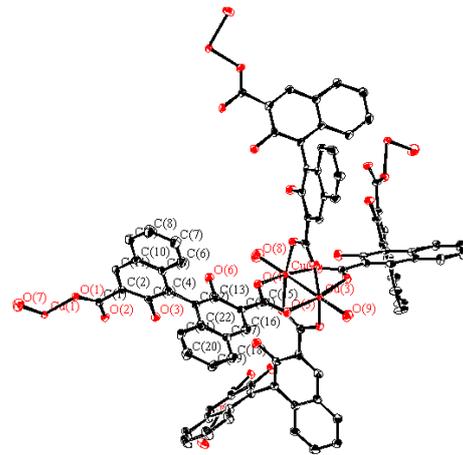


図 15. 15-Cu(II)塩一水和物の結晶構造 (ORTEP, 30% probability level) .

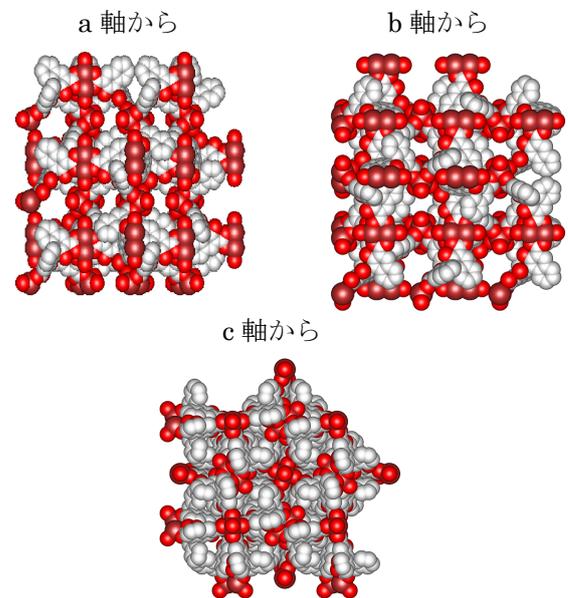


図 16. 15-Cu(II)塩一水和物の積層構造 (a 軸、b 軸、c 軸それぞれの方向から見たもの) .

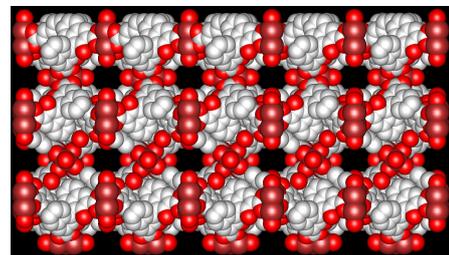


図 17. $[110]$ 方向から見たパッキング図.

した。

以上の結果から、光学活性な 15 を用いて同様に銅(II)塩を合成すれば、形状が制御された不斉ナノ空間が構築できるものと期待できる。

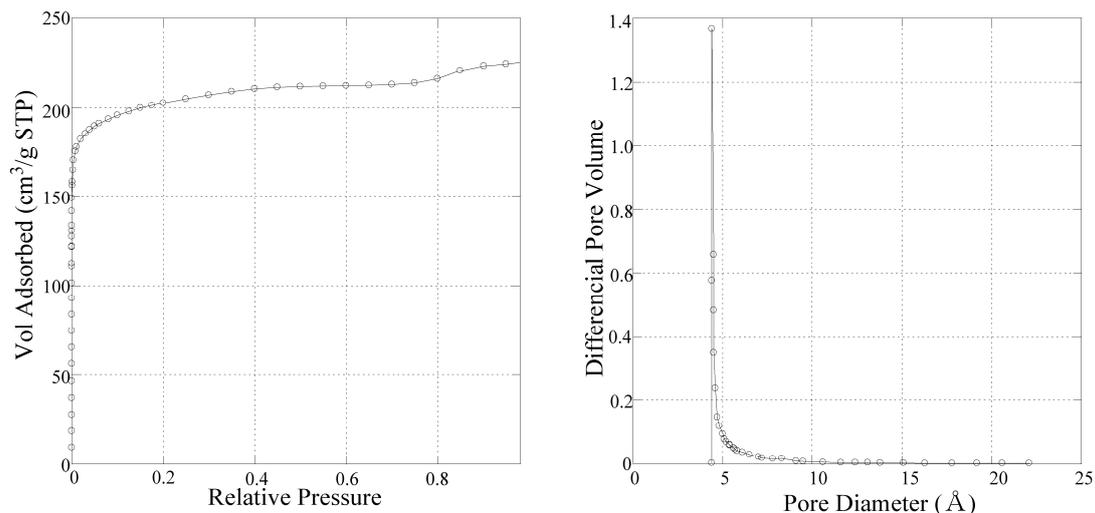


図 18. 15-Cu(II)塩一水和物の等温吸着曲線と細孔径測定.

表 1. 15-Cu(II)塩の細孔のパラメータ

BET 比表面積 ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	642
Langmuir 比表面積 ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	919
最大細孔体積 ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	0.313

謝辞

単結晶 X 線構造の測定及び解析にご協力いただきました名古屋大学物質科学国際研究センター異和行教授と名古屋大学院理学研究科太田俊氏に感謝いたします。本研究は 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成の下に行われました。また、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「配位空間の化学」で行われたものです。

文献

- 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.
- Seyden-Penne J (1995) *Chiral Auxiliaries and Ligands in Asymmetric Synthesis*. Wiley, New York.
- Cram DJ and Cram JM (1994) *Container Molecules and Their Guests*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Cui Y, Evans OR, Ngo HL, White PS and Lin WB (2002) Rational design of homochiral solids based on two-dimensional metal carboxylates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 1159-1161.
- Lee SJ and Lin WB (2002) A chiral molecular square with metallo-corners for enantioselective sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4554-4555.
- Tsuji J (1995) *Palladium Reagents and Catalysts*. Wiley, Chichester.
- Jones ERH, Mansfield GH and Whiting MC (1954) Acetylenic compounds. XLVII. The prototropic rearrangements of some acetylenic dicarboxylic acids. *J. Chem. Soc.* 3208-3212.
- Agosta WC (1964) Absolute configuration of pentadienedioic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 2638-2642.
- Katoh T, Noguchi C, Kimura H, Fujiwara T, Ichihashi S, Nishide K, Kajimoto T and Node M (2006) A practical improvement of crystallization-induced asymmetric transformation of allene-1,3-dicarboxylates. *Tetrahedron Asymm.* **17**: 2943-2951.
- 横澤勉, 遠藤剛 (1989) ヘテロコムレン類およびアレン誘導体の重合反応. *有機合成化学協会誌* **47**:1068-1077.
- 遠藤剛, 横澤勉 (1992) アレン誘導体の重合と反応性高分子への期待. *高分子* **40**:82-85.

■原 著■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

薬剤処理やアンチセンス核酸注射によるゼブラフィッシュの 後天的アルビノ個体の作製方法の探索

茂木和枝^{1,4} 永井 敦² 日野晶也^{1,2,3} 豊泉龍児^{1,2,3}

Screening for an Efficient Procedure to Generate Non-Congenital Albino Zebrafish using Chemical Compounds or Antisense Oligonucleotides

Kazue Mogi^{1,4}, Atsushi Nagai², Akiya Hino^{1,2,3} and Ryuji Toyoizumi^{1,2,3}

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

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

³ High-Tech Research Center, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyoik02@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Zebrafish is a good model organism for developmental biology and biomedical research. In its early developmental stages, zebrafish is very transparent, and the speed of development is rapid, however, its larva is highly pigmented, and thus it is almost impossible to observe the internal organs using non-invasive methods. Here we report the effects of antisense morpholino oligonucleotides (MO) and organic compounds which target zebrafish melanogenesis. Antisense MO for zebrafish *tyrosinase* and phenyl-thiourea (PTU) are highly effective to reduce the pigmentation of melanosomes in melanophores. Arbutin and Kojic acid are partially effective, and Fullerene C₆₀ is not effective for inhibiting zebrafish melanogenesis. Except for pigmentation, all these reagents did not disrupt normal embryogenesis and the left-right specification of the heart. After 8-day treatment with PTU, we succeeded in visualizing the shape of the brain ventricle by injecting with Qdot 655 (red nanocrystal). The inhibition of melanogenesis is useful for the study of brain development using zebrafish larvae.

Keywords: melanocyte, melanin, zebrafish, cerebral ventricle, Qdot

序論

哺乳類はメラニン細胞(melanocyte)に酵素 Tyrosinase を発現し、体表などの黒色色素(melanin)を産生している。ヒトは美容のために、皮膚の Tyrosinase 活性や Tyrosinase 産生の抑制に有効な成分を含む化粧品を塗布するが、各有効成分の安全性の検定には主に培養細胞や哺乳類の成体を用いられている。しかしながら、成体が無反応のレベルの僅かな毒性にも敏感に反応する形態形成期の胚を用いてその発生毒性を検定することが、安全性のチェックのために重要である。

zebrafish (*Danio rerio*)は、neural crest 由来の色素細胞、即ち黒色色素胞(melanophore)、黄色色素胞(xanthophore)、虹色色素胞(iridophore)の3種類

の色素細胞を持っている。zebrafish 胚においては、受精後 72 時間程度でほぼ全ての器官が形成され、黒色色素胞の分化も 48 時間後には視認され、72 時間後には十分な量の melanosome(黒色色素胞内で産生される黒色〜黒褐色の細胞小器官)が形成される。従って、zebrafish 胚は Tyrosinase 阻害剤の安全性の検定には好適な実験系となる。本研究では、Tyrosinase 阻害剤として既に安全性が確認済みとされ、多くの化粧品に含まれる Arbutin ならびに Kojic acid について発生毒性の検定を行った。Arbutin^{1,2)} や Kojic acid³⁾は、メラニン形成の初期段階において重要な Tyrosinase の合成とその活性を抑制する効果があるとされている。また、最近、

melanosome 形成の抑制効果、つまりは美白効果があるとされ一部の化粧品において使用され始めた Fullerene C₆₀⁴⁾ の発生毒性の検定も行った。Fullerene は炭素原子(C)が複数個結合し球状構造を形成した分子の総称であり、物理的に安定しており、化学的には僅かな反応性を示す非水溶性の分子である。

メラニン色素の生合成において Tyrosinase が重要な役割を果たしているが、Tyrosinase の合成阻害や活性阻害が、胚の形態形成に及ぼす影響についてはあまり研究されていない。そこで我々は、*tyrosinase* mRNA の翻訳を阻害する morpholino oligonucleotides (*tyrosinase* MO)を卵割期胚の割球に微量注射し、Tyrosinase の生成を阻害した上で胚の形態を観察した。また、Tyrosinase 阻害剤として知られている 1-phenyl-2-thiourea (PTU)^{5,6,7)}を用いて、zebrafish 胚の黒色色素形成と形態形成、心臓の左右性への影響についても調査した。

材料と方法

14 時間-10 時間の明暗周期、水温 28°C で飼育中の zebrafish 雌雄成魚から採卵し、良卵と思われる卵を選択した。1-2 細胞期の割球中に、zebrafish *tyrosinase* の翻訳開始点領域に相補的な配列(5'-TGG AGA GAC ATG ATG ATG AAG AGT C-3')を有する人工核酸 morpholino oligonucleotides (*tyrosinase* MO)を 8.3mg/ml の濃度で 2.3nl (注射量 19ng)を微量注射し、48 well plate の 1 穴に 1 胚ずつ入れ、28.5°C で 48 時間、Fish Ringer 溶液中で発生させた。同腹胚を同様に Fish Ringer 溶液を満たした 48well plate 中に 1 胚ずつ入れ無処理群として、同一孵卵器内で発生させた。培養 48 時間後の孵化直後に外部形態、心臓の左右性、黒色色素胞の大きさと色濃度(色の黒さ)について各個体を判定した。判定に際し、0.1%(w/v) MS222 を 3.5-9cm ペトリ皿に満たした Fish Ringer 溶液に数滴滴下した溶液で稚魚に麻酔をかけ、観察を行った。対照実験として、*human β-globin* のスプライシング領域に相補的な配列(5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3')を有する MO を、卵割期胚の割球に 2.8mg/ml の濃度で 2.3nl (注射量 6.4ng)微量注射し、同様に 48 時間培養し、形態形成および色素分化について観察した。

Fullerene C₆₀、1-phenyl-2-thiourea (PTU)、Arbutin、Kojic acid の化合物投与実験は、採卵直後または 24-28°C で 1 日間飼育した上で、sphere 期 (Fullerene C₆₀ 処理群)、dome 期 (PTU 処理群)、90% epiboly 期 (Arbutin, Kojic acid 処理群)に達した胚を

用いた。実験群は、4 種類の化合物のいずれか 1 種類を含む 0.5-1ml の Fish Ringer 溶液中で発生させた。無処理群は、これらの化合物を無添加の Fish Ringer 溶液中で発生させた。孵化直後に、胚の外部形態、心臓の左右性、黒色色素胞の大きさと色濃度(色の黒さ)について各個体を判定した(一部は孵化前に判定した)。胚は、受精膜に囲まれた状態で、あるいは受精膜をピンセットで除去した後に、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX16) に装着した写真撮影装置 (同 DP-12) または高感度冷却 CCD カメラ (KEYENCE VB-7000/7010) を用いて写真撮影した。

Fullerene C₆₀ 処理においては、実験群の胚は Fullerene C₆₀-DMSO (dimethylsulfoxide) 飽和溶液を Fish Ringer 溶液で 100 倍希釈した溶液中で、対照群の胚は 1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で、無処理群の胚とこれらを同時に発生させた。

PTU 処理においては、PTU を DMSO に溶解し 20mM の stock solution 溶液とし、これを 100 倍希釈した 200 μM 溶液中で実験群の胚を発生させた。対照群の胚は 1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で、無処理群の胚とこれらを同時に発生させた。Arbutin と Kojic acid は超純水に溶解し、Arbutin 処理や Kojic acid 処理実験を行った。7.3mM または 73 mM Arbutin/Fish Ringer 溶液、あるいは 10 mM または 20mM Kojic acid/Fish Ringer 溶液を用いて胚を培養し、同時に採卵した無処理群(両処理で共通)の胚と同じ温度で同調させて発生させた。

Dome 期から PTU 処理し、8 日間 PTU 存在下で培養した稚魚を用い、赤色蛍光を発する超微粒子(量子ドット)懸濁液である Qdot655 溶液 2.3nl を脳室内に微量注射した。背側頭部の中央部分に注射針を刺し、背側表皮よりもやや下側にある脳室内に、針の先端部分が存在していることを確認しながら注射した。注射直後に、高感度冷却 CCD カメラ (KEYENCE VB-7000/7010) を装着した蛍光顕微鏡下で B 励起を行い、脳室内における Qdot の分布を観察した。

結果

以下、観察結果を処理のカテゴリ毎に記す。全ての実験系において特定の型の奇形が多く生じることは無かった。また、各処理の内臓形成に対する影響の指標として心臓の左右性の判定を行ったが、実験群の心臓逆位発生率は対照群や無処理胚と大きな差はなかった。

アンチセンス核酸の微量注射

Tyrosinase の生成を阻害するために、*tyrosinase*

mRNA の翻訳を抑制する morpholino oligonucleotides (*tyrosinase* MO)を卵割期胚の割球に 19ng 微量注射し 48 時間培養したところ、実験群では、黒色色素胞の低形成がはっきりと観察された (n=14)。黒色色素胞の形成が殆ど生じず、白化した胚も観察された(n=4/14, 図 1A)。

一方、Fish Ringer 溶液のみに入れて培養した無処理群の胚では、すべての胚に黒色色素の高濃度の形成が観察された(n=56/56, 図 1B)。対照実験として、1 細胞期胚の割球に *human β-globin* MO を 6.4ng 微量注射し、48 時間培養したところ、すべての胚において、同腹の無処理胚と同様に、黒色色素胞の形成に変化は見られなかった(*human β-globin* MO 注射胚; n=4, 無処理胚; n=48; 図 1C, D)。

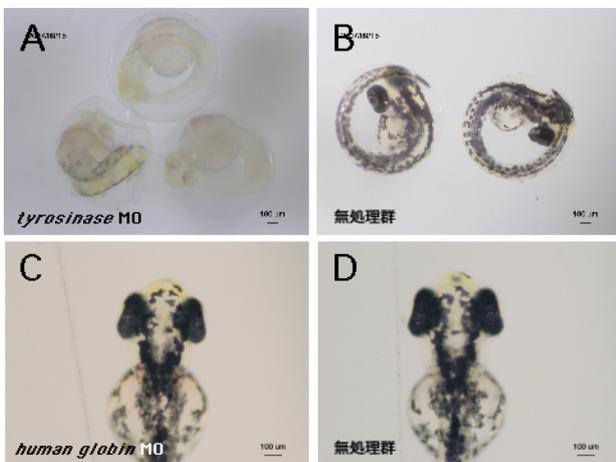


図 1. zebrafish *tyrosinase* の翻訳開始点領域に相補的な antisense morpholino oligonucleotide の melanin 形成に対する効果。

Fullerene 処理

Fullerene C₆₀は、zebrafish の黒色色素胞の大きさや色の濃さに変化をもたらさなかった(n=435, 図 2A)。1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で培養した対照群の胚(n=193)、Fish Ringer 溶液のみで培養した無処理群の胚(図 2B; n=301)のいずれにおいても、すべての胚で黒色色素の形成が観察された(表 1)。

Fullerene C₆₀ 処理を行った実験群では、無処理群や対照群に比べ奇形の発生率が高くなっていた。

PTU 処理を行ったすべての胚において、melanin 色素合成が非常に強く阻害されていた。培養 48 時間後に、白化した胚を顕微鏡下で観察したところ、黒色色素胞の着色を確認することはできなかった(n=133, 図 2C, 表 1)。PTU 処理は胚を白化させたが、稚魚の外部形態の形態形成に大きな影響を与えることはなかった(表 1)。白化した稚魚を、PTU 溶液に入れ培養を続けると、判定時の培養 48 時間後には、黄色色素胞(xanthophore)と虹色素胞

(iridophore)の色素が観察され、稚魚の体表には黄色と白銀色の斑点が生じた。PTU 処理を行った場合には、dome 期まで発生させた胚を用いても(n=133)、3-10 体節期の胚を用いても(n=36)、黒色色素胞の発色前に PTU 処理しさえすれば、処理開始発生段階にかかわらず胚は白化することがわかった。対照実験として、1% DMSO/Fish Ringer 溶液中で培養した胚は、無処理胚(図 2D)同様に黒色色素胞が観察され、形態形成にも大きな異常は見られなかった(表 1)。

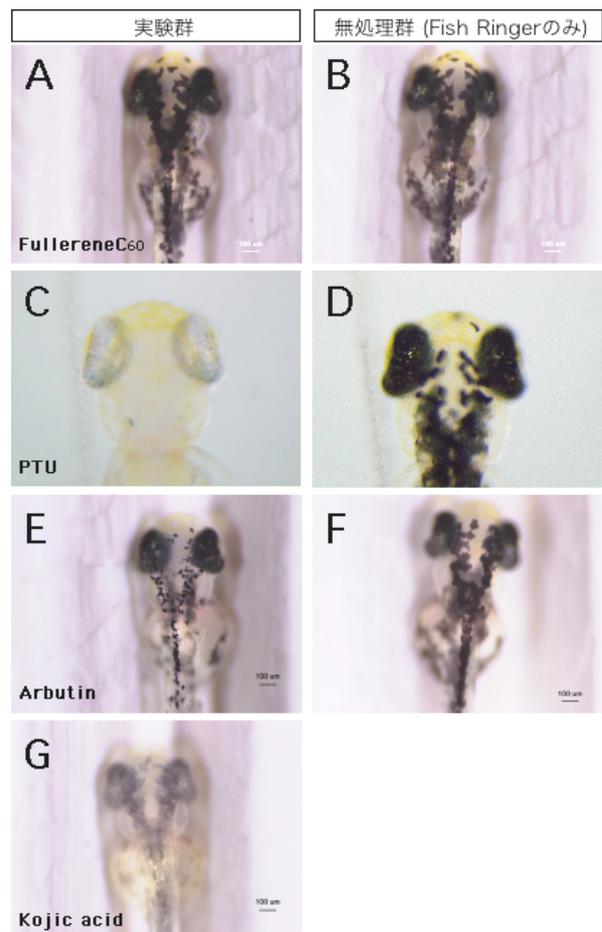


図 2. 各種有機化合物の zebrafish 黒色色素胞に対する効果。PTU は黒色色素胞のメラニン合成を完全に抑制し、Arbutin と Kojic acid は完全ではないが抑制した。

Arbutin 処理

Arbutin 処理胚では、無処理胚と比較すると、黒色色素胞の色(黒さ)自体には変化はないが、黒色色素胞の表面積が小さくなるという変化が主に観察された。特に、73mM の Arbutin 処理胚では、色素判定を行った胚のうち、25%(n=34/135)の胚において、黒色色素胞の大きさが小さくなる効果が現れた(図 2E; 図 2F は同時に培養した無処理群)。その効果を主因として、黒色色素胞に覆われる面積が減り、体表全体が明るく感じられた(n=39/135, 表 1)。一方、

このような効果に関しては個体差が大きく、黒色色素胞に変化が認められない個体も多かった (n=101/135, 表 1)。

Kojic acid 処理

Kojic acid 処理胚では、主に黒色色素胞の色濃度が薄くなった。20mM 処理胚においては、眼の色素性網膜を含む体全体の黒色色素胞の色が薄くなり (n=103/142, 図 2G, 表 1)、Arbutin よりも白化効果が高いことと、その効果に個体差が少ないことが分かった。Arbutin あるいは Kojic acid 処理後、奇形や心臓逆位が無処理群より増加することはない。

PTU 処理後の稚魚への Qdot 注射

PTU 溶液に浸し 28.5°C で 8 日間培養し続けた稚魚を観察したところ、黒色色素胞の形成が完全に抑制された状態が保たれ脳神経系は外部から容易に観察することができた。そこで我々は、白化した稚魚の脳室内に Qdot 溶液 2.3nl を微量注射し、蛍光顕微鏡下で Qdot の脳室内での分布を観察した。zebrafish の脳室はチューブ状に細長く、注射した Qdot は注射と同時に脳室内に素早く拡散した。稚魚は白化し、頭部はかなり透明化していたことから、可視光下で観察した場合にも、脳室内における赤色の Qdot 溶液を容易に観察することができた(図 3A)。また蛍光顕微鏡下では、脳室内に拡散した Qdot 溶液を非常に明るい赤色蛍光として観察することができ、可視光下よりも鮮明かつ詳細に Qdot の分布を観察できた(図 3B)。しかしながら、PTU 処理した 8 日目の稚魚では、脳室は非常に狭く、Qdot の拡散をもとに脳室内液流の流動パターンを観察することはできなかった。

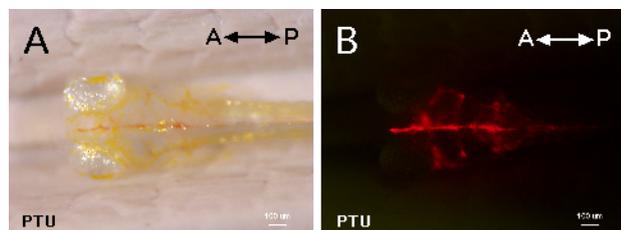


図 3. PTU 処理を 8 日間継続した稚魚の脳室内に Qdot を微量注射。左は通常の冷光を用い明視野下で観察した。脳室内に Qdot が認められる。右は B 励起波長下での蛍光観察。脳室内の Qdot の分布が鮮明かつ詳細に観察される。

討論

melanin 生成には、Tyrosinase が関与していることが知られている。Tyrosinase は、その最初の段階である tyrosin から DOPA への水酸化反応と、DOPA から DOPA キノンへの酸化反応を触媒し、この反応

が melanin 生成の律速段階とされている。今回、tyrosinase mRNA の翻訳を阻害する tyrosinase MO を卵割期胚の割球に微量注射し Tyrosinase タンパク質の合成を阻害した実験は、黒色色素胞の着色を阻害して胚を白化させ、先行研究⁸⁾の結果を支持した(図 1A)。また、dome 期から Tyrosinase 阻害剤 PTU で処理した実験は、tyrosinase MO 注射胚の場合と同様に胚の白化を誘導し、黒色色素胞の着色を完全に抑制した(図 2C, 表 1)。これらの結果は、melanin 色素合成経路の一箇所を遮断すると melanin 生成は抑制され、melanosome の形成ないしその黒化に影響を及ぼすことが示唆された。

黒色色素胞の着色が実験的に抑制され白化した実験群の胚/稚魚において、これらの多くはほぼ正常に胚発生し、心臓の左右性も対照群や無処理群と同程度に保たれていた。従って、黒色色素胞の形成、特に melanin 合成の経路は、太陽光の紫外線から体を保護するために胚発生後期に重要な役割を担っているものの、胚の形態形成に直接関与する経路とはならないと考えられる。zebrafish 胚を 28.5°C で培養した場合に、24hpf(受精後 24 時間後)には、眼の色素性網膜に最初の黒色色素沈着が見られることから、黒色色素胞の形成は黄色色素胞や虹色素胞の形成よりも機能的に重要であり、それ故これらに先行して分化するのではないかと考えられる。

このように、黒色色素胞の形成は機能的には有用な生体反応であるが、我々の日常生活においては肌を白く保ちたいという美への願望があり、これに基づいた消費者のニーズに対応するために melanin 生成を抑制する様々な化粧品が開発されている。今回実験に用いた PTU、Arbutin、Kojic acid は、白化に有効な濃度のアッセイでは胚発生に殆ど影響せず、黒色色素胞の形成を抑える結果を示した。Arbutin と Kojic acid は黒色色素胞に対して異なる抑制効果を示したが(図 2E, G)、これは両化合物の Tyrosinase に対する作用機構の相違が原因だと思われる。Arbutin 単体のみで作用させた場合よりも、Aloesin と混合して作用させた場合には相乗効果が生じ、より一層黒色色素形成が抑制されたという報告がある⁹⁾。今回は単独で用いた Arbutin と Kojic acid の混合溶液に胚を浸漬することで、更なる白化効果が期待できるかも知れない。

一方、Fullerene C₆₀は、zebrafish 胚の黒色色素胞の着色に殆ど影響を与えることはなかったが(図 2A, 表 1)、これは魚類と(Fullerene が白化効果を示す)ヒトとの黒色色素の形成機構の差異を反映している可能性がある。調製直後の Fullerene C₆₀-DMSO 飽和溶液のスペクトルを測定したとこ

表 1. 各種有機化合物の zebrafish 黒色色素胞形成、ならびに形態形成、心臓の左右性に及ぼす影響

		処理胚数	生存数	黒色色素胞の大きさ			黒色色素胞の色濃度						
				正常	心臓逆位	奇形	小	やや小	正常	なし	薄い	やや薄	正常
FullereneC ₆₀	Fish Ringerのみ	361	301 (83)	208 (69)	52 (17)	48 (16)	0 (0)	0 (0)	301 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	301 (100)
	1% DMSO/FR	222	193 (87)	111 (58)	45 (23)	37 (19)	0 (0)	0 (0)	193 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	193 (100)
	実験群	557	435 (78)	206 (47)	80 (18)	189 (43)	0 (0)	0 (0)	435 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	435 (100)
PTU	Fish Ringerのみ	192	143 (74)	100 (70)	22 (15)	21 (15)	0 (0)	0 (0)	143 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143 (100)
	1% DMSO/FR	138	109 (79)	78 (72)	15 (14)	16 (15)	0 (0)	0 (0)	109 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	109 (100)
	200 μ M	186	133 (72)	90 (68)	21 (16)	22 (17)	ND	ND	ND	133 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Arbutin	Fish Ringerのみ	144	143 (99)	105 (73)	30 (21)	9 (6)	0 (0)	0 (0)	143 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143 (100)
	7.3mM	144	142 (99)	120 (85)	20 (14)	2 (1)	2 (1)	6 (4)	134 (94)	0 (0)	0 (0)	5 (4)	137 (96)
	73mM	143	135 (94)	110 (81)	18 (13)	9 (7)	17 (13)	17 (13)	101 (75)	0 (0)	22 (16)	17 (13)	96 (71)
Kojic acid	Fish Ringerのみ	144	143 (99)	105 (73)	30 (21)	9 (6)	0 (0)	0 (0)	143 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143 (100)
	10mM	144	143 (99)	120 (84)	13 (9)	10 (7)	0 (0)	7 (5)	136 (95)	0 (0)	0 (0)	10 (7)	133 (93)
	20mM	144	142 (99)	106 (75)	21 (15)	15 (11)	0 (0)	0 (0)	142 (100)	0 (0)	7 (5)	96 (68)	39 (27)

大きさと色濃度に分けて判定

()内の数字は、生存率は処理数を、他は生存数を分母とした割合 (%)

ND; not detected

ろ、260 nm と 330 nm に吸収極大がある波形が得られ、この波形は同溶液を 1 週間以上室温保存した場合にも変化しなかった。従って、Fullerene が分解し、黒色色素胞に対する効果を失ったとは考えにくい。Fullerene と Arbutin または Kojic acid との混合実験を行い、zebrafish 黒色色素胞形成に相乗的な抑制効果を示すか検討したい。水酸化フラレンは水に可溶であるので、これを用いれば(中間溶媒として有用であるが高濃度では毒性を示す)DMSO を用いずに溶液浸漬実験が可能となる。高濃度の水酸化フラレンを用いて黒色色素胞の形成/着色に対する影響を観察したい。

PTU 処理を胚期から長期にわたって行い持続的に黒色色素胞の形成を抑制した結果、本来頭部全体が黒色色素に覆われる培養 8 日目の稚魚において、脳室を外部から容易に観察しやすい状態が得られた。この状態下では、Qdot 溶液の脳室内注射により、zebrafish の狭隘で入り組んだ脳室形態が明瞭に可視化され、その内部の液流を観察できると期待される(図 3)。しかしながら、稚魚が生後 8 日目とまだ若いこともあり、脳室内の空間は大変狭く、ツメガエル幼生では比較的容易に観察することの出来た脳室内液流¹⁰⁾の有無を zebrafish 稚魚で観察するのは困難であった。PTU 処理個体を更に長期間培養し、より大きく成長させた稚魚を用いて実験するのが望ましいと考えられる。その場合には、PTU 処理による黒色色素胞の着色の抑制と共に、日増しに細胞数を増す黄色色素胞や虹色色素胞の増殖分化や着色の抑制も考慮しなければならないと予想される。PTU 処理胚は黒色色素胞の着色は抑制したが黄色色素胞や虹色色素胞の着色は抑制できなかったことから、PTU 処理単独では、成長した生後 10 日目以降の稚魚における脳室形態やその内部の液流を可視

化することは日増しに困難になると予想される。黄色色素胞や虹色色素胞形成を薬剤等により抑制する方法は未開発である。今後は 3 種類の色素胞形成を共に抑制し、完全に透明化した胚を発生させ、zebrafish 胚/稚魚における脳内液流の観察を可能とする実験系を開発したい。

本研究は、大量の卵が年間を通じて得られ、成熟個体の飼育も容易なモデル脊椎動物の zebrafish の胚のみを解析系として用いたが、今後は研究を無脊椎動物、特にウニなどの棘皮動物に拡張し、他の実験動物の色素形成の抑制による内部構造の可視化の研究にも取り組みたい。

謝辞

本研究は、研究課題「薬剤による後天的アルビノ(白子) 個体の作製方法の探索」として 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成を受けて行いました。所長ならびに所員各位に深謝いたします。

文献

- 1) Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y and Fukuda M (1991) Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* 101: 609-613. (in Japanese)
- 2) Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K and Kuriki T (2004) Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 510-514.
- 3) Kang HS, Kim HR, Byun DS, Son BW, Nam TJ and Choi JS (2004). Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.* 27: 1226-1232.
- 4) Xiao L, Matsubayashi K and Miwa N (2007) Inhibitory effect of the water-soluble polymer-wrapped derivative of fullerene on UVA-induced

- melanogenesis via downregulation of tyrosinase expression in human melanocytes and skin tissues. *Arch. Dermatol. Res.* **299**: 245-257.
- 5) Karlsson J, von Hofsten J and Olsson PE (2001) Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar. Biotechnol.* (NY) **3**: 522-527.
 - 6) Elsalini OA and Rohr KB (2003) Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Dev. Genes Evol.* **212**: 593-598.
 - 7) Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH and Yoon TJ (2007) Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res.* **20**: 120-127.
 - 8) Pickart MA, Sivasubbu S, Nielsen AL, Shriram S, King RA and Ekker SC (2004) Functional genomics tools for the analysis of zebrafish pigment. *Pigment Cell Res.* **17**: 461-470.
 - 9) Jin YH, Lee SJ, Chung MH, Park JH, Park YI, Cho TH and Lee SK (1999) Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* **22**: 232-236.
 - 10) 松谷武嗣, 茂木和枝, 日野晶也, 小笠原強, 竹内重夫, 豊泉龍児 (2006) アルビノ-アフリカツメガエル胚に対する微量注射技術を用いた半透明な脳室形態並びに脳室内液流の可視化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **17**: 53-61.

■原 著■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

クロフィル分子の多様性に基づく光合成の光エネルギー変換系の 基本原理の解明化

三室 守^{1,2}、鞆 達也¹、土屋 徹^{1,2}、野口 巧³、大久保 辰則³、
秋本 誠志⁴、横野 牧生⁵、井上 和仁⁶

Study on the Principle of Photosynthetic Light Energy Conversion Based on Divergence of Chlorophyll Molecules

Mamoru Mimuro^{1, 2, 7}, Tatsuya Tomo¹, Tohru Tsuchiya^{1, 2}, Takumi Noguchi³,
Tatsunori Okubo³, Seiji Akimoto⁴, Makio Yokono⁵ and Kazuhito Inoue⁶

¹ Department of Technology and Ecology, Hall of Global Environmental Research, Kyoto University, Kyoto-City, Kyoto 606-8501, Japan,

² Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto-City, Kyoto 606-8501, Japan,

³ Institute of Materials Science, University of Tsukuba, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8573, Japan,

⁴ Molecular Photoscience Research Center, Kobe University, Kobe-City, Hyogo 657-8501, Japan,

⁵ The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo-City, Hokkaido 060-8628, Japan,

⁶ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Hyogo, Kanagawa 259-1293, Japan.

⁷ To whom correspondence should be addressed. E. mail: mamomi@mm1.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

Abstract: The composition of photosystem II (PSII) in the chlorophyll (Chl) *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC 11017 was investigated to enhance the general understanding of the energetics of the PSII reaction center. We first purified photochemically active complexes consisting of a 47 kDa chlorophyll protein (CP47), CP43' (PcbC), D1, D2, cytochrome *b*₅₅₉, PsbI, and an unknown small polypeptide. The pigment composition per two pheophytin (Phe) *a* molecules was 55 ± 7 Chl *d*, 3.0 ± 0.4 Chl *a*, 17 ± 3 α -carotene, and 1.4 ± 0.2 plastoquinone-9. A special pair was detected by a reversible absorption change at 713 nm (P713) together with a cation radical band at 842 nm. FTIR difference spectra of the specific bands of a 3-formyl group allowed assignment of the special pair. The combined results indicate that the special pair includes a Chl *d* homodimer. The primary electron acceptor was shown by photoaccumulation to be Phe *a*, and its potential was shifted to a higher value than that in the Chl *a*/Phe *a* system. The overall energetics of PSII in the Chl *d* system adapt to changes in the redox potentials, with P713 as the special pair utilizing lower light energy at 713 nm. Our findings support the idea that changes in photosynthetic pigments combine with modification of the redox potentials of electron transfer components to give rise to energy changes in the total reaction system.

Keywords: Chlorophyll, Energetics, Photosynthesis, Reaction center, *Acaryochloris marina*.

序論

地球上に棲息する生物の生命維持装置である光合成は、太陽をエネルギー源とするエネルギー変換過程であり、その機構の解明と応用は人類の持続的生存に大きな意義を持つ。光合成反応系は、光合成生物

の35億年の進化によってもたらされたものであり、機構の解明には生物進化の観点からの解析も重要となる¹⁾。

光合成生物は、酸素を出す光合成反応を営む酸素

発生型光合成生物と、酸素を出さない光合成反応を営む無酸素型光合成生物に分類される²⁾。後者には光合成細菌(紅色光合成細菌、緑色光合成細菌など)が含まれるが、我々が日常目にする機会が多くないために、研究の対象にされることは限定的である。しかし、反応原理の解明には歴史的にも多用された³⁾。一方、酸素発生型光合成生物は我々の身近にあることもあり、また、酸素呼吸に必要な酸素の供給源という意味でも解析が進められている。

光合成光反応系を駆動するためには光エネルギーの吸収が第一に必要であり、そのために光合成生物は色素を持つ^{2, 3)}。光合成色素として、クロロフィル(Chlorophyll, 以下 Chl と略記、光合成細菌にあってはバクテリオクロロフィル)、カロテノイド、さらにフィコビルンがある。前2者はあらゆる光合成生物に含まれるが、フィコビルンは、シアノバクテリア、灰色藻、紅藻、クリプト藻に含まれるのみである。

酸素発生型光合成生物には一般的には Chl *a* と β -carotene が含まれる。Chl *a* はふたつの機能を持つ³⁾。ひとつは光を集め、光化学反応を行う特異な Chl *a* (反応中心 Chl) へエネルギーを渡す役目であり、光化学では増感剤としての機能である。他は、電子伝達系において電子供与体、もしくは電子受容体として機能する場合である。ふたつの機能はともに重要であるが、エネルギー変換という視点からは、後者の電子移動反応への寄与が最も重要な機能といえることができる。

酸素発生型原核光合成生物であるシアノバクテリアでは色素の多様性が知られている³⁾。多くの種は Chl *a* のみを持つのであるが、加えて Chl *b* を持つ種(*Prochloron*, *Prochlorothrix*) や、ビニル基がふたつあるジビニル型の Chl *a* と Chl *b* を持つ種(*Prochlorococcus*)、分子構造としては Chl *c* と同様にポルフィリン骨格を持ち、Chl *a* 生合成の中間体であるジビニルプロトクロロフィリドを持つ種な

どがある。こうした色素の多様性が見いだされているが、反応中心で電子供与体として機能するのは Chl *a* (型) であり、Chl *b* (型)、Chl *c* (型) はアンテナとしての機能を持つのみである。

1996年、宮下らによって発見されたシアノバクテリア、*Acaryochloris marina* MBIC 11017 は主要な色素として Chl *d* を持つ^{4, 5)} (図1)。Chl *d* は1943年、アメリカの Manning と Strain によって紅藻の第2のクロロフィルとして発見されたが⁶⁾、存在量が少なく、再現性に乏しかったこと、1959年には Chl *a* の分解産物に見いだされたこと⁷⁾、などから、それ以降は天然に存在する色素とは考えられなくなっていた⁷⁾。しかし、1996年の *A. marina* の発見によって天然に存在することが判明した。さらに2004年、村上らは紅藻の表面に付着するシアノバクテリア *Acaryochloris* sp. 淡路株が真の Chl *d* の生産者であることを明らかにし、60年来の謎が解明された⁸⁾。淡路株は16S rRNA の塩基配列に基づく系統解析の結果、*A. marina* MBIC 11017 の亜種とされた⁸⁾。

A. marina MBIC 11017 の色素分析の結果、主要な色素は Chl *d* であるものの、Chl *a* も微量ながら必ず存在し、かつその含量は細胞培養時の光条件によって変化することが見いだされた⁹⁾。複数の色素が混在する場合、電子供与体などの電子伝達成分にはどちらが使われるか、その理由は何か、などが光合成電子伝達系の普遍的な理解には極めて重要な情報をもたらす。そこで我々はこの研究において、電子伝達体の同定を試みた。今回は特に従来、ほとんど実体が明らかにされていなかった光化学系 II (PS II) の解析を行った。そのためには純度の高い標品が必要であり、その単離方法から検討することとした。

材料と方法

細胞の培養

シアノバクテリア、*Acaryochloris marina* MBIC 11017 の培養には IMK 培地を用いて、光合成条件下で行った^{6, 9)}。光強度は $15 \mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \text{s})$ 、温度 25 度、空気を通気しながら培養した。特に二酸化炭素濃度を上げた空気を使うことはしなかった。

PS II 複合体の単離・精製

細胞を集菌し、洗浄後、フレンチプレスで破壊した。未破壊の細胞などを遠心操作で取り除いた後、さらに遠心操作でチラコイド膜分画を集めて、一旦、凍結保存した。解凍後、界面活性剤 (DM) を

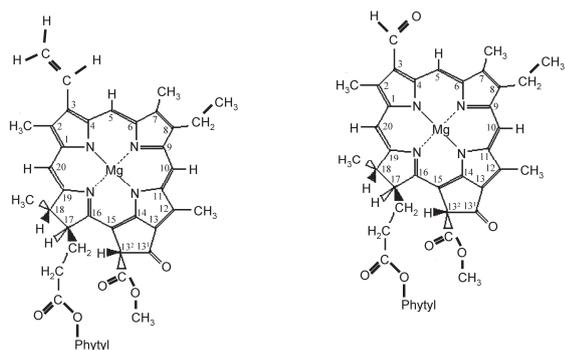


図1. クロロフィルの分子構造. 左, Chl *a*; 右, Chl *d*.

用いて複合体の遊離を促し、遠心操作で複合体を含む画分を集めた。さらに2種類のカラムクロマトグラフィー (DEAE-Toyopearl 650S と UnoQ) とショ糖密度勾配遠心操作により精製を行った。構成するサブユニットは SDS-PAGE で、また色素は HPLC (JASCO, MD-915) を用いて分析した¹⁰⁾。

分光学的測定

吸収スペクトルは、日立 557 分光光度計、もしくはキャリー500 分光光度計で、蛍光スペクトルは日立 850 分光蛍光光度計で測定した¹¹⁾。FTIR スペクトルは Bruker IFS-66/S で測定した¹²⁾。時間分解蛍光スペクトルは、時間相関単一光子計測法により蛍光減衰曲線を得た後、計算によってスペクトルを再構築した^{9, 11)}。蛍光寿命は convolution 計算によって算出した^{9, 11)}。吸収変化は、日立 0080D フォトダイオードアレイ分光光度計を用い、光源とフィルターの組み合わせで測定した¹³⁾。

結果

PS II 複合体の性質

精製した複合体は2量体であった。そのサブユニット組成は、PsbA (D1), PsbB (CP47), PsbD (D2), *cyt b₅₉₉* α -subunit, CP43' (PcbC) が主要なもので、その他に *cyt b₅₉₉* β -subunit と PsbI が同定された (図2)。さらにひとつのポリペプチドが見いだされたが、部分的なアミノ酸配列からもその同定はできなかった。PS I に対して作られた抗体は全く反応を示さないことから、過去の報告の中で最も純度の高い複合体であることが判明した。

光化学反応活性

単離された複合体について、DPC (diphenylcarbazide) を電子供与体とし、DCIP (2,6-dichlorophenol-indo-

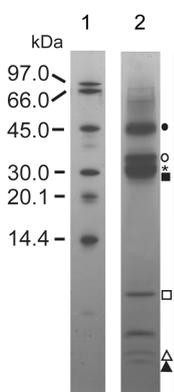


図2. レーン1, MWマーカ; レーン2, 精製 PSII 複合体。●CP47, ○D2, ★D1, ■CP43', □*cyt b₅₉₉* α -subunit, △PsbI, ▲*cyt b₅₉₉* β -subunit。

phenol) を電子受容体とする光化学反応活性を測定すると、230 $\mu\text{mol/mg Chl/hr}$ という活性を示した。この値は、この複合体を用いて解析を行うのに十分の試料であることを示している。

色素組成

複合体中に4種の色素、Chl *d*, Chl *a*, Phe *a*, α -carotene を見いだした。2分子の Phe *a* に対する相対含量は、 55 ± 7 Chl *d*, 3.0 ± 0.4 Chl *a*, 17 ± 3 α -carotene ($n=4$) であった。Chl *a* は確かに存在していた。他のシアノバクテリアで知られている結晶構造を基準に考えると *A. marina* の PS II 標品には Chl *d* の量がやや多いが、これは CP43 ではなく、CP43' が含まれていることに起因すると考えられる。

第2次の電子受容体であるキノン (plastoquinone-9) の含量も同様に定量を行った。2分子の Phe *a* に対して、 1.4 ± 0.2 分子が検出された。完全な複合体の場合、2分子のキノンの存在が期待されるが、それに近い値となった。少なくとも Q_A は結合していることが明らかとなった。*cyt b₅₉₉* の含量は 55 Chl *d* に対して1分子であり、Phe *a* の含量を基にすると、PS II あたり1分子が存在すると考えられた。

吸収スペクトルと蛍光スペクトル

室温で測定された吸収スペクトル (図3) では 702 nm に極大が観測された。二次微分スペクトルを求めると、697 nm にも成分が見いだされた。さらに 715 nm 付近にも成分が見いだされた。以前の報告では 725 nm にも成分が観測されていたが、これは純度の低い試料を使つての測定であつたためと考えられた。 α -carotene に由来する吸収帯が 490 nm に見いだされた。

液体窒素温度での蛍光スペクトルを測定すると、さらに成分が明瞭になった (図3)。435 nm 光で励起した時、大半の光は主要な色素である Chl *d* に吸収されるが、一部は Chl *a* も同時に励起することができる。この条件下では 680, 700, 728 nm に蛍光極大が観測された。前者の起源は必ずしも明瞭で

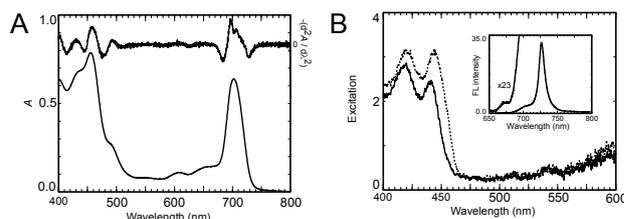


図3. 精製 PS II 複合体の室温吸収スペクトル (A), 77 K 蛍光スペクトル (B)。

はなく、後 2 者は Chl *d* に由来することが明らかであった。前者の起源を明らかにするために、励起スペクトルを測定した。680 nm でモニターした場合、443 nm と 418 nm にバンドが検出された。前者は Chl *a* の、また後者は Phe *a* のソーレー帯に一致する。これらの結果から、680 nm 付近の蛍光は Chl *a* と Phe *a* の混合したバンドであること、吸収スペクトルでは判別が困難であった Chl *a* と Phe *a* の存在が明らかになった。

電子供与体の同定

2 種類の方法で同定を試みた。まず光照射前後の吸収変化を求めた (図 4)。その結果、713 nm に負の極大を示し、842 nm 付近に正の極大を持つ差スペクトルが得られた。前者は電子供与体の褪色に対応し、後者はカチオンラジカルの生成に対応することが判明した。この測定により電子供与体は Chl *d* であることが判明した。

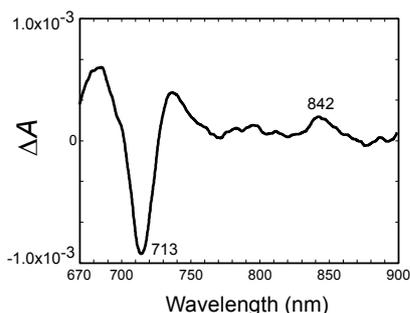


図 4. 精製 PS II 複合体の光照射における吸収変化。

次にフーリエ変換赤外分光法 (FTIR) により同定を試みた (図 5)。3 種類の試料、すなわち *A. marina* の PS II 複合体、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis* と略記) から調製した PS II コア標品、さらにホウレンソウから調製した BBY 粒子 (PS II を多く含むチラコイド膜標品)、について、カチオンとニュートラルとの間の差スペクトルを測定した (図 4)。1800 cm^{-1} から 1100 cm^{-1} の領域は C=O 伸縮振動とクロリン環の振動についての情報を与える。3 種類の試料ともによく似たスペクトルを与えた。正の 1725-1723 cm^{-1} と 1711 cm^{-1} 、これに対応する 1680-1620 cm^{-1} のバンドは 13¹位のケト基の伸縮振動を示す。1680-1620 cm^{-1} は主にポリペプチドの情報を与える。1617-1150 cm^{-1} 領域は、CC 伸縮振動、CN 伸縮振動、CH 偏角振動など複雑に組み合わさった信号であり、したがってこの領域は指紋領域と呼ばれ、Chl 分子種の違いを明瞭に示す。

しかし、クロリン環の振動を示す領域のスペクト

ルを精査すると違いが明瞭になった。1170, 1182, 1220, 1286, 1492, 1521 cm^{-1} のバンドは、*Synechocystis* とホウレンソウではほとんど差がないが、*A. marina* の PS II 複合体においては 2-5 cm^{-1} ほど違いがあるのが観測された。これらの差異は、*A. marina* の PS II 電子供与体が Chl *a* とは異なり、Chl *d* であることを示唆している。決定的な証拠は Chl *d* に特有の 3 位のフォルミル基 (-CHO) に特異的な信号を検出することによってもたらされた (図 5B)。フォルミル基の CH 伸縮振動は 2700 cm^{-1} 領域に特異的なバンドを示すことが知られており、さらにそれは *A. marina* の PS I 複合体において実証されている¹⁴⁾。我々は *A. marina* の PS II 複合体について 2723 と 2696 cm^{-1} に明瞭なバンドを検出した (図 5B)。一方これらのバンドは *Synechocystis* とホウレンソウでは観測されなかった。この結果は、*A. marina* の PS II の電子供与体が Chl *d* であることを端的に示した。

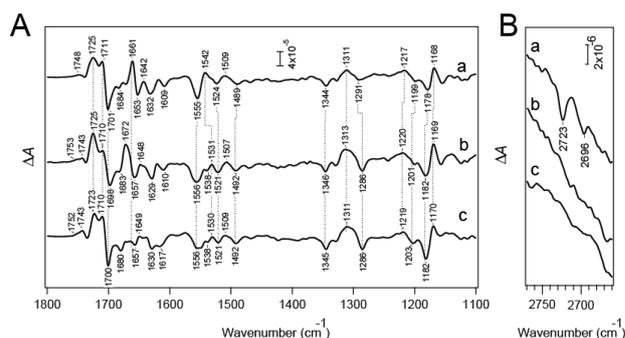


図 5. 精製 PS II 複合体の光誘起 FTIR 差スペクトル (a: *A. marina*, b: *Synechocystis*, C: spinach)。

これら 2 種類の観測の結果、*A. marina* の PS II の電子供与体は Chl *d* の 2 量体であることが明らかになった。電子供与体を P680 に倣って P713 と名付けた。

電子受容体の同定

電子受容体に関しては、他のシアノバクテリアとの色素組成の比較から Phe *a* がその候補と考えられてきたが、それは証拠に基づいたものではなく、単に推測の域を出なかった。我々は光化学反応に伴う吸収変化によってその同定を試みた。ホウレンソウや他のシアノバクテリアから単離された PS II 複合体では、sodium dithionite を添加した条件で還元された Phe *a* の蓄積が観測されている¹⁵⁾。同様の測定を試みたが信号は全く得られなかった (図 6 点線)。この条件で電荷再結合に起因する遅延蛍光を測定すると、全く信号が得られないことが判明した。

これは電荷分離反応が起こっていないことを示していた。そこで Phe a から電子を受け取るキノン分子を除くことによって還元された Phe a の蓄積を観測することを試みた。その結果、546 nm に還元された Phe a の蓄積による負の吸収バンドを観測でき (図 6 実線)、電子受容体が Phe a であることが初めて実証された。sodium dithionite 存在下では Phe a の還元が観測されなかった原因として、Phe a の電位が高くなっていることが考えられた。

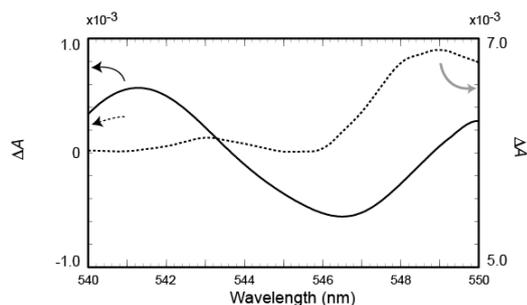


図 6. 精製 PS II 複合体の光還元による Phe a の蓄積。

その他の因子

液体窒素温度での時間分解蛍光測定と、蛍光減衰曲線の測定により、Chl a の蛍光波長領域に明瞭な遅延蛍光を観測した (図 7)。これは電荷再結合に起因し、液体窒素温度では 10 ナノ秒領域に観測される成分である。観測結果は Chl a が電子伝達系に含まれることを示している。しかし、その電子伝達経路での局在性は現時点では明らかではない。データは示さないが、FTIR、差吸収スペクトルによって Chl z が 2 分子共に Chl d であることが判明した。

討論

従来我々は、遅延蛍光が Chl a の領域にしか観測されないこと、また、Chl d の酸化電位が Chl a よりも低い可能性があり、水分解に十分の酸化電位を確保するのが難しいと考えられること、のふたつの理

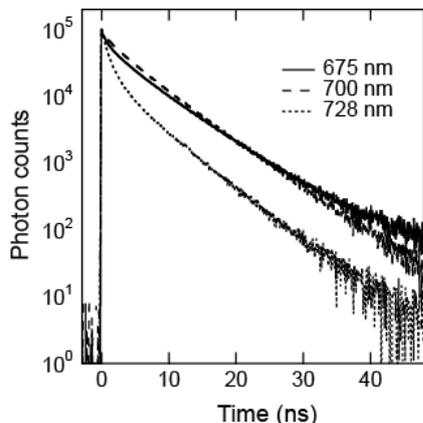


図 7. 精製 PS II 複合体の各波長における蛍光減衰曲線。

由により、PS II の電子供与体は Chl a であることを主張してきた^{9, 11)}。しかし、今回の実験結果は異なる事実を示した。すなわち、*A. marina* の PS II の電子供与体は Chl d の 2 量体であること、電子受容体 (Phe a) の還元電位が上がっていること、が明らかとなった。また、ドイツのグループは、PS II 電子供与体の酸化電位は他のシアノバクテリアと同じであることを強く示唆するデータを報告している¹⁶⁾。これらの結果を総合すると、電子伝達系の構築に関しての一般則を導くことができる。それは、電子伝達系の酸化側の電位は変わらず、P680 と P713 の違いによって生じる獲得できる光エネルギーの差 (約 0.1 V) は、還元側の電位を調整することで実現するというものである。こうした構築原理は、色素として Chl a が使われている限り知ることのできない情報であり、色素の多様性を考察することによって初めて得られた情報である。この意味で、色素の多様性が単に形質変異のひとつとして見られるのではなく、新たな構築原理の導出に有意であることが証明された意義は大きい。

光合成色素の多様性はシアノバクテリアでは顕著であるが、葉緑体を獲得した後は特定の系統群では組成は固定され、ほとんど変化しない。唯一の例外が褐藻、珪藻など Chl c を含む分類群であり、その多様性はよく知られている¹⁷⁾。しかしこれらの多様性はアンテナとして機能する色素の多様性であり、今回我々が観測した電子伝達成分としての多様性ではない。シアノバクテリアで観測される色素、特に Chl 分子種の多様性は、電子伝達系の構築、その原理などに関する情報を与える。その意味で多様性を基に反応原理を知ることができる特異な系である。この考えを発展させると、遺伝子操作によって人為的に色素種を変えた時の反応系の変化を見ることによる解析方法も考えられる。進化過程を作り出すことで、自然の種を対象にしているだけでは観測されない現象に遭遇することもあると考えられる¹⁸⁾。

謝辞

この研究は神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「テトラピロール光受容体の分子機構に関する研究」の援助と科学研究費補助金 (学術創成研究) の補助を得て遂行された。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Blankenship RE (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science, Malden, MA
- 2) 三室 守 (2008) これからの光合成研究-生物物理の視点から. *生物物理*. 印刷中.
- 3) Mimuro M, Kobayashi M, Murakami A, Tsuchiya

- T and Miyashita H (2007) Structure and function of antenna systems: Oxygen evolving cyanobacteria. In: *Primary Processes of Photosynthesis: Principles and Apparatus, Part 1*. Renger G, ed., RSC Publishing, Cambridge, UK. pp. 261-299.
- 4) Miyashita H, Ikemoto H, Kurano N, Adachi K, Chihara M and Miyachi M (1996) Chlorophyll *d* as major pigment. *Nature* **383**: 402.
 - 5) Miyashita H, Adachi K, Kurano N, Ikemoto H, Chihara M and Miyachi M (1997) Pigment composition of a novel oxygenic photosynthetic prokaryote containing chlorophyll *d* as the major chlorophyll. *Plant Cell Physiol.* **38**: 274-281.
 - 6) Manning WM and Strain HH (1943) Chlorophyll *d*, a green pigment of red algae. *J. Biol. Chem.* **151**: 1-19.
 - 7) Holt AS and Morley HV (1959) A proposed structure for chlorophyll *d*. *Can. J. Chem.* **37**: 507-514.
 - 8) Murakami A, Miyashita H, Iseki M, Adachi K and Mimuro M (2004) Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* **303**: 1633.
 - 9) Mimuro M, Akimoto S, Gotoh T, Yokono M, Akiyama M, Tsuchiya T, Miyashita H, Kobayashi M and Yamazaki I (2004) Identification of the primary electron donor in PS II of the Chl *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *FEBS Lett.* **556**: 95-98.
 - 10) Tomo T, Okubo T, Akimoto S, Yokono M, Miyashita H, Tsuchiya T, Noguchi T and Mimuro M (2007) Identification of the special pair of photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 7283-7288.
 - 11) Mimuro M, Akimoto S, Yamazaki I, Miyashita H. and Miyachi S (1999) Fluorescence properties of Chlorophyll *d*-dominating prokaryotic alga, *Acaryochloris marina*: Studies using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1412**: 7-46.
 - 12) Sugiura M, Rappaport F, Brettel K, Noguchi T, Rutherford AW and Boussac A (2004) Site-directed mutagenesis of *Thermosynechococcus elongatus* photosystem II: The O₂-evolving enzyme lacking the redox-active tyrosine D. *Biochemistry* **43**: 13549-13563.
 - 13) van Gorkom HJ, Pulles MPJ and Wessels JSC (1975) Light-induced changes of absorbance and electron spin resonance in small photosystem II particles. *Biochim Biophys Acta* **408**: 331-339.
 - 14) Sivakumar V, Wang R, and Hastings G (2003) Photo-oxidation of P740, the primary electron donor in photosystem I from *Acaryochloris marina*. *Biophys. J.* **85**: 3162-3172.
 - 15) Tomo T, Mimuro M, Iwaki M, Kobayashi M, Itoh S and Satoh K (1997) Topology of pigments in the isolated photosystem II reaction center studied by selective extraction. *Biochim. Biophys. Acta* **1321**: 21-30.
 - 16) Shevela D, Nöring B, Eckert H-J, Messinger J and Renger G (2006) Characterization of the water oxidizing complex of photosystem II of the chl *d*-containing cyanobacteria *Acaryochloris marina* via its reactivity towards endogenous electron donors and acceptors. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**: 3460-3466.
 - 17) Jeffrey SW, Mantoura RFC and Wright SW (1997) *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods* UNESCO Publishing.
 - 18) Mimuro M and Tanaka A (2004) The *in vivo* and *in vitro* reconstitution of pigment-protein complexes, and its implication in acquiring a new system. *Photosynth. Res.* **81**: 129-137.

■原 著■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

シロイヌナズナに対する倍数化処理の減数分裂期染色体に及ぼす影響に関する研究

岩元明敏¹ 杉山宗隆² 安積良隆^{3,4}

Effect of Polyploidizing Treatment on Chromosome Behavior during Meiosis of *Arabidopsis thaliana*

Akitoshi Iwamoto¹, Munetaka Sugiyama² and Yoshitaka Azumi^{3,4}

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Gakugei University, Koganei-City, Tokyo 184-8501, Japan

² Botanical Gardens, Graduate School of Science, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0001, Japan.

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

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

Abstract: We observed chromosome behavior during meiosis of *Arabidopsis thaliana* just after polyploidization. Two strains of *A. thaliana*, Columbia (Col) and Landsberg *erecta* (Ler), were treated with colchicine to induce polyploid lines, and the treated generations were analyzed. Flow cytometric analysis revealed that a tetraploid line was obtained from the treated Col and an octoploid line from the treated Ler. Meiotic chromosomes of pollen mother cells of these polyploid lines were visualized by DAPI staining and observed. Both lines underwent meiosis as normal, as did most of the established tetraploid lines on the whole. At metaphase I, however, their numbers of bivalent chromosomes were fewer than expected and chromosome alignment of the octoploid was occasionally disturbed. There was no significant difference between the fertility of diploid and tetraploid, but that of octoploid was significantly reduced, which might be correlated with the disturbance of chromosome configuration.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, polyploid, colchicine, meiosis, DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole), fertility

序論

植物においては、基本染色体が倍加することによって生じた高次倍数体が多く分類群で普遍的に見られ、種分化と関連があることが多くの研究により示唆されている¹⁾。したがって、倍数化が植物に与える影響を明らかにすることは、植物の進化を考える上で重要なテーマの1つである。

倍数化は様々な面で植物の成長を向上させ、一般的には植物体の環境適応能力の増大させると考えられている²⁾。一方、動力学的な解析により、倍数化によって、確かに細胞体積を増大させる能力は高まるが、細胞分裂の能力は染色体が倍加した分だけ低下していることが示唆されている³⁾。これらのことから、植物の倍数化と成長変化との関連性を解明するため

には、倍数体の細胞分裂時における染色体の動態を明らかにする必要がある。

これまでも倍数体の染色体に関する研究は数多く行われており、例えば染色体の精査による倍数体の起源の推定⁴⁾、倍数化にともなうゲノム構造の変化の解析⁵⁾などが精力的に進められている。しかし、こうした染色体の研究は、交雑起源と考えられる異質倍数体に焦点が当てられているものが大半であり、同質の染色体が倍加した場合に染色体がどのような動態を示すのかは十分に明らかになっていない。

我々はこれまでにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) の Columbia (Col)、Landsberg *erecta* (Ler) それぞれの野生型系統にコルヒチンによる同

質倍数化処理を行い、4倍体系統を作出した。そして、この4倍体が数世代経て安定化したところで、減数分裂している細胞について、正確な染色体数、及びその動態を調べ、2倍体との比較を行った⁶⁾。

減数分裂は、受精によって起こる染色体倍加に備えて、予め染色体数を半減させ、染色体数を保つための分裂である。この減数分裂が正常に行われない場合、その後の配偶子形成に大きな影響を及ぼし、稔性にも違いが生じる。減数分裂では1回だけ染色体が複製された後、2回の有糸分裂が起きる。それぞれ第一分裂、第二分裂と呼ばれ、体細胞分裂と同様に前期、中期、後期、終期からなる。減数第一分裂の前期は、染色体が細い糸状に見える細糸期（レプトテン期）、相同染色体がペアリングし始める合糸期（ザイゴテン期）、完成したシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が互いに接着する太糸期（パキテン期）、シナプトネマ構造が崩壊し染色体がさらに凝縮する複糸期（ディプロテン期）、凝縮がほぼ完成する移動期（ディアキネシス期）の5つの時期に分けられる。第一分裂中期には相同染色体が連結して形成される二価染色体が赤道面に並び、第一分裂後期でその相同染色体同士が分離して、核相としては n となる。第二分裂ではそれぞれの染色体を形成している姉妹染色分体が分離する。相同染色体が分離する時期や姉妹染色分体が分離する時期は染色体数を精度良く数えることができ、倍数体の染色体数を確認する上でも重要である。

倍数化した植物体においては、相同染色体も倍加するため、対合する相手が複数存在することになる。すなわち、上述した第一減数分裂中期において、1つの染色体が2つあるいは3つの相同染色体と対合して、異常を起こす可能性があると考えられる。しかし、倍数化してから数世代後の植物体の解析結果では、コルヒチン処理によって倍加した染色体は減数分裂時に2倍体の染色体と同じような挙動を示し、減数分裂過程を正常に終了していることが分かった⁶⁾。つまり、倍数化後、数世代を経て安定した植物体では、第一減数分裂の中期で特に混乱が見られなかった。このことから、倍数化が安定する過程で、相同染色体同士が何らかの認識を行い、正常に減数分裂を終了させるためのシステムが形成されることが予測された。

そこで、本研究では倍数化処理（コルヒチン処理）を行った世代に関して、倍数化が起きていることを確認した上で、その植物体の減数分裂時の染色体を詳細に観察し、これにより倍数化が安定する前の世代の染色体の動態を明らかにすることを目的とした。また、材料として、倍数化後数世代を経て安定化し

ている植物体の解析でも用いた4倍体（Col）に加え、8倍体（Ler）についても作出・観察を行い、より高次の倍数体での染色体の動態も解析した。

材料と方法

倍数化系統の作出

シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* L.）の野生型 Columbia (Col)、Landsberg *erecta* (Ler) 両系統の種子を1%スクロース入りMS培地に播種し、無菌的に育てた。3枚目の本葉が展開し始めたところで、プレートの蓋を開けて植物体の茎頂にコルヒチンゲル（アガロース0.1%、コルヒチン0.5%）を5 μ lをのせ、蓋を閉じて2日間静置した。コルヒチンゲルを除去してから植物体をバーミキュライトの入ったポットに植え替え、30-60 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ の白色光下（連続明期）、24 $^{\circ}C$ 、湿度60%の条件で、1000倍希釈のハイポネックスを週に一度与えながら栽培した。植え替え後、4-6週間経過した個体の茎葉を採集し、Johnstonetらの方法⁷⁾に従い、チョッピング法によってフローサイトトメーター（Ploidy Analyser PA, Partec）で倍数性を確認した。なお、対象として同じ条件で栽培した無処理の野生型 Col の倍数性も確認した。これによって染色体の倍加が認められた個体の花序を採取し、ファーマー液（Ethanol, Acetic Acid; 3:1）中、室温で一晩置いて固定し、その後は-20 $^{\circ}C$ で保存した。

消化展開法

倍数化が確認された個体の花粉母細胞の染色体試料作製はAzumiらの方法に従った⁸⁾。固定した試料を10 mM クエン酸緩衝液（pH4.5）中で洗った後、cytohelicase (Sigma)、cellulase “ONOZUKA” R-10 (Yakult)、pectolyase (Kikkoman)（各0.4% (w/v)）を含む同緩衝液中、適宜脱気をしながら、37 $^{\circ}C$ 3時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4 $^{\circ}C$ で保存した。

消化した花序をシャーレ上の60%酢酸中に移した後、適当な大きさの蕾を取り出し、同じく60%酢酸を滴下したスライドガラス上で解剖した。薬をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、45 $^{\circ}C$ のホットプレート上に1分間静置した。氷冷したファーマー液を周囲に滴下し、緩やかに混和させた後、ファーマー液を捨て、スライドを乾燥させた。DAPI 溶液 (Vector) を滴下し、カバーガラスを載せた後、顕微鏡（オリンパスBX61）で観察した。

稔性の確認

倍数化が確認され、減数分裂の染色体動態の観察を

行った個体について、1つの角果（鞘）あたりに含まれる総種子数と成熟した（稔性があると考えられる）種子の数をそれぞれ無作為に選んだ5つの鞘について測定した。また、成熟した種子数を総種子数で除したものを稔性を示す指標として算出した。また、対照としてコルヒチン処理をしていない野生型（2倍体）、コルヒチン処理をしたが倍数化が確認されなかった個体（2倍体）についても同様の測定を行った。

結果

4倍体植物 (Col) , 8倍体植物 (Ler) の作出と倍数性の確認

コルヒチン処理を行った Col および Ler 系統の植物体について、フローサイトメーターによる倍数性の測定を行ったところ、野生型の Col (図 1 A) と比較して、2C にピークがなく、4C 以降のみピークが見られる植物体 (Col) (図 1 B) と、8C 以降のみピークが見られる植物体 (Ler) (図 1 C) が見つかった。これらはそれぞれコルヒチン処理により倍数化し、4倍体 (Col) および8倍体 (Ler) になった個体であると考えられる。以降の解析では、これらを4倍体、8倍体として用いることとした。

これらの植物体はいずれもコルヒチン処理の影響によって矮性化していたものの、枯死せずに成長を続け、花序を形成し種子をつくった。矮性化が起きているため、倍数化していても倍数化して数世代を経て安定化した個体のように各器官および植物体全体の成長の促進は認められなかった。

4倍体 Col の染色体観察

第一減数分裂において、この4倍体では既にザイゴテン期 (図 2 A) の段階から、2倍体の結果⁶⁾と比較して染色体の量が増えていることが蛍光量から明らかであった。このことはフローサイトメーターでの測定 (図 1 A, B) を裏付けた。この蛍光量の違いはディプロテン期 (図 2 B) になるとより顕著になった。さらに、第一分裂中期においては凝縮した二価染色体が観察され、蛍光量が多かったために明確に本数を数えることはできなかったものの、10本よりは明らかに少なかった (図 2 C)。さらに、その後、第一分裂後期で両極に数本ずつの染色体移動していることが観察された (図 2 D)。

また、第二分裂後期においては、染色体は問題なく分配されており、基本的に正常に減数分裂が進んでいることが確認できた (図 2 E)。

図 1. 野生型植物体及び倍数化処理 (コルヒチン処理) を行った植物体のフローサイトメーターを用いた倍数性の測定結果. (A) 野生型 Col (2倍体). (B) コルヒチン処理した Col (4倍体). (C) コルヒチン処理した Ler (8倍体).

8倍体 Ler の染色体観察

4倍体 (Col) と同様に、8倍体 (Ler) においても第一減数分裂のザイゴテン期 (図 3 A) の段階から、2倍体の結果⁵⁾と比較して蛍光が明らかに強く、染色体が倍加していることが示された。また、4倍体

(Col)の結果(図2A)と比較した場合も蛍光量はかなり多く、8倍体化しているというフローサイトメーターでの測定結果を裏付けた(図1B,C)。ディプロテン期(図3B)においても、4倍体(図2B)とはどちらの蛍光量が多いかやや不明瞭だが、2倍体よりは明らかに蛍光量が多いことが確認できた。

第一分裂中期(図3C)においては、2倍体、そして4倍体(図2C)よりも赤道面に並んでいる二価染色体が多いことが観察された。また、4倍体の場合と同様に、蛍光量が多いため正確な本数を数えることができなかったものの、8倍体化した時の基本染色体数である20本よりは少ないことが確認できた。また、この第一分裂中期では、赤道面に並ばず、不規則な配置になる染色体が見られた(図3C, 白矢印)。こうした不規則な配置は4倍体ではまれにしか見つからず、8倍体は比較的高い頻度で観察された。

その後、第一分裂後期で両極に染色体が移動していることが観察された(図3D)終期では分配された染色体の本数は、蛍光量が多いこともあって正確には数えることができなかったが、少なくとも4倍体で観察された10本(図2E)より多いことは明らかであった。

また、さらに減数分裂の過程が進んだ第二分裂後

期においては正しく分配された染色体が観察され、全体として減数分裂が正常に行われていることが確認できた(図3E)。

倍数化処理した植物体の稔性

Colにおいては、未処理の野生型(2倍体)と倍数化処理はしたものの倍加しなかった個体(2倍体)では、総種子数、成熟種子数はほとんど差がなく、稔性についても若干の低下は見られたものの、有意な差ではなかった(図4A)。これに対し、実際に倍加して4倍体になった植物では、野生型、倍加しなかった処理個体に比べて全種子数、成熟種子数が大きく低下したが、稔性には有意な差は見られなかった(図4A)。

一方、Lerについては未処理の野生型(2倍体)に比べて倍数化処理はしたものの倍加しなかった個体(2倍体)では、全種子数、成熟種子数ともに有意に減少していた。特に成熟種子数の差は大きく、このため稔性も倍数化処理した個体は大幅に低下していた(図4B)。倍数化が起きて8倍体になった個体ではこの低下傾向がさらに大きく、全種子数、成熟種子数はともに野生型はもちろん、倍加しなかった処理個体よりも有意に低下していた。また、稔性についても同様の傾向が見られた(図4B)。

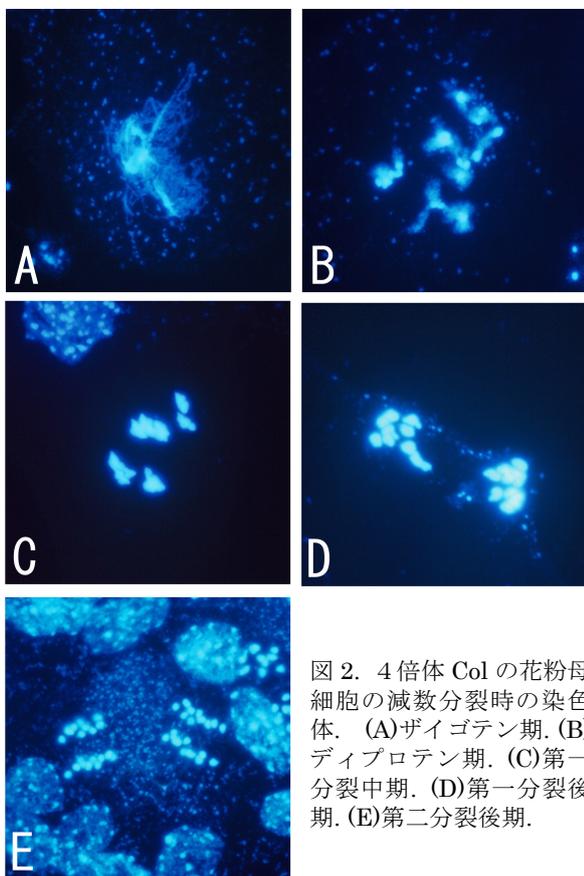


図2. 4倍体 Col の花粉母細胞の減数分裂時の染色体. (A) ザイゴテン期. (B) ディプロテン期. (C) 第一分裂中期. (D) 第一分裂後期. (E) 第二分裂後期.

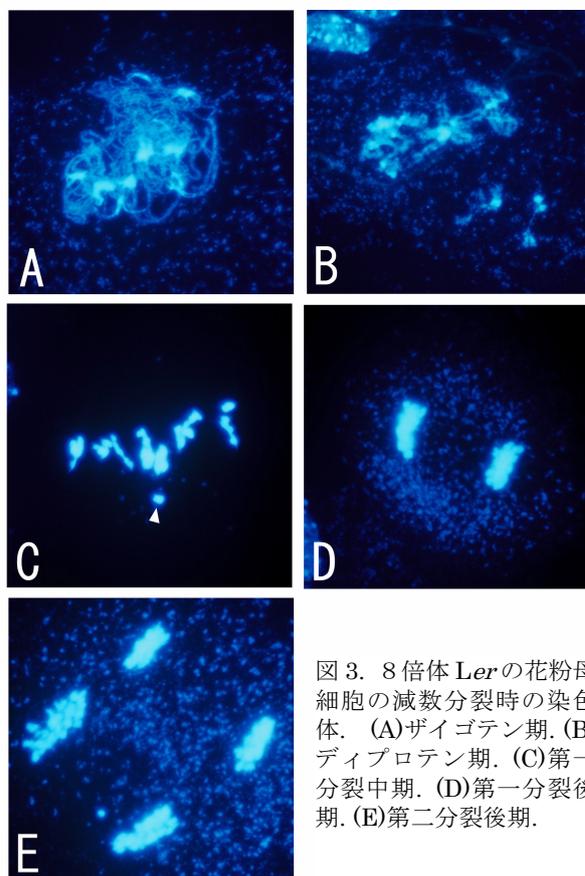


図3. 8倍体 Ler の花粉母細胞の減数分裂時の染色体. (A) ザイゴテン期. (B) ディプロテン期. (C) 第一分裂中期. (D) 第一分裂後期. (E) 第二分裂後期.

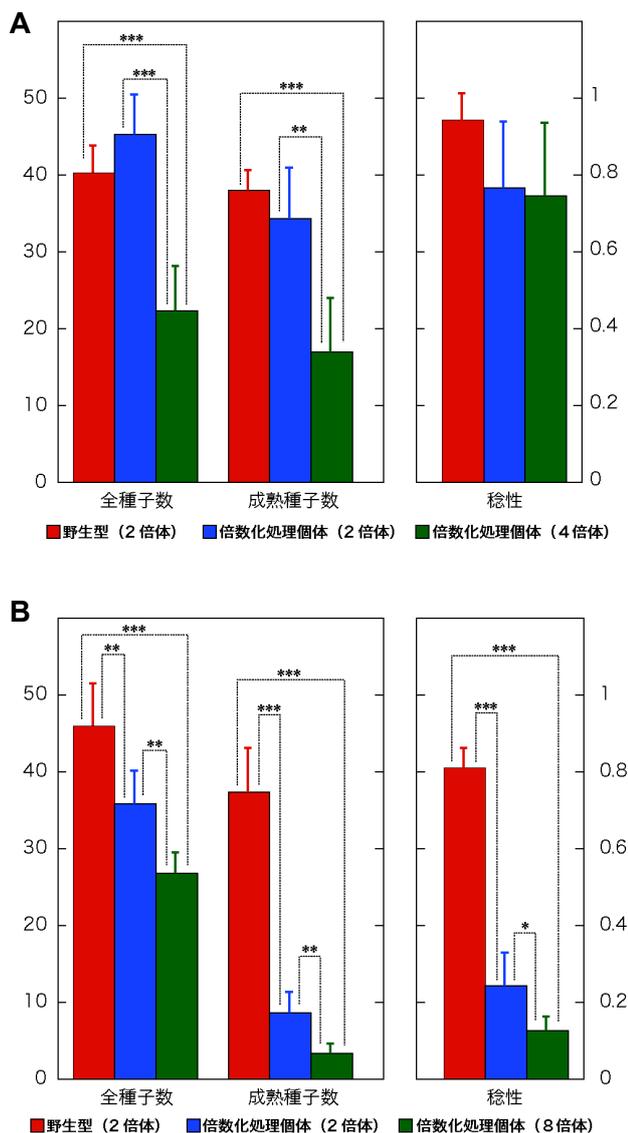


図 4. 倍数化世代の種子数と稔性. 倍数化処理をしていない個体(赤), 倍数化処理したが倍数化していない個体(青), 倍数化処理した個体(緑). 点線と記号はそれぞれの群を比較した t 検定の結果を示す. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05. バーは標準偏差 (n = 5). (A) Col の全種子数, 成熟種子数, 稔性.(B) Ler の全種子数, 成熟種子数, 稔性.

討論

安定化した倍数体との染色体の挙動の違い

これまでに解析をおこなった倍数化してから数世代を経た倍数体(安定化倍数体)の減数分裂時における染色体の動態⁶⁾と同様に、今回解析をおこなった倍数化処理世代の倍数体においても、減数分裂の過程には大きな混乱はなく染色体の整列、分配が行われていることが分かった。しかし、第一分裂中期について、安定化世代の4倍体では基本的に倍加した10本の二価染色体が観察されたのに対し、倍数化処

理世代では4倍体、8倍体ともに倍加した数(10本および20本)の二価染色体が明確には見られず、基本的にそれより少ない数の染色体が赤道面に整列している様子が観察された。

このことは相同染色体を認識するメカニズムが倍数化世代と安定化世代では異なる可能性を示唆している。今後、染色体の動態をより精査し、いくつかのマーカーを用いたFISH解析も行うことによってこの点が明らかになっていくと期待される。

稔性と倍数性との関連

Colの結果から、4倍体では倍数化によって、全種子数と成熟種子数が大きく低下し、雌蕊の形成に影響が出ていることが示された。一方で、稔性にはほとんど変化がなかったことから、配偶体形成に関しては影響がないと考えられる。また、Lerの結果から、8倍体については全種子数、成熟種子数がともに減少したことに加え、稔性についても有意な低下が見られた。このことから、8倍体では配偶体の形成にも影響が出ていることが示唆される。4倍体と8倍体の間で、全体的な減数分裂に大きな違いはなかったが、第一分裂中期で赤道面に並ばない不規則な染色体が8倍体では4倍体よりも比較的高い頻度で観察されており、これが稔性に影響を及ぼしていることも考えられる。

しかし、野生型と倍加しなかった倍数化処理個体を比較すると、Colでは両者に大きな差がなかったのに対し、Lerでは処理個体で全種子数、成熟種子数、稔性全てが有意に減少していた。このことから、Lerの方がColに比べてコルヒチンによる倍数化処理の影響を受けやすく、稔性への影響も異なる可能性がある。したがって、今回の解析だけでは、稔性の低下が高次倍数化による影響であると判断することはできない。同じ系統で4倍体、8倍体、さらに高次の倍数体を作成し、倍数化が進むことによって減数分裂、稔性それぞれにどのような影響を与えるかを明らかにする必要がある。

謝辞

本研究は神奈川県総合理学研究所共同研究助成(課題:シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)同質倍数体の生理および遺伝的特性の解析)のもとに行われた。

文献

- 1) Soltis DE, Soltis PS and Tate JA (2003) Advances in the study of polyploidy since *Plant speciation*. *New Phytol.* **161**: 173-191.
- 2) Donald A Levin (1983) Polyploidy and novelty in

- flowering plants. *Am. Nat.* **122**: 1-25.
- 3) Iwamoto A, Satoh D, Furutani M, Maruyama S, Ohba H and Sugiyama M (2007) Insight into the basis of root growth in *Arabidopsis thaliana* provided by a simple mathematical model. *J. Plant Res.* **119**: 85-93
 - 4) Lim KY, Matyasek R, Kovarik A and Leitch AR (2004) Genome evolution in allotetraploid Nicotiana. *Biol. J. Lin. Soc.* **82**: 599-606
 - 5) Scheid OM, Afsar K and Paszkowski J (2003) Formation of stable epialleles and their paramutation-like interaction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genet.* **34**: 450-454.
 - 6) 早川俊, 岩元明敏, 安積良隆 (2007) シロイヌナズナの倍数体の減数分裂期染色体の動態解析. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **18**: 71-75
 - 7) Johnston JS, Bennett MD and Price HJ (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei *Am. J. Bot.* **86**: 609-613
 - 8) 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 Sci.* **5**: 1-6

■原 著■

ピーマン果実の成熟に伴う色素変化と有色体の超微形態形成

吉田正幸¹ 早津 学^{1,2} 鈴木季直^{1,2,3}

Pigment Changes and Ultrastructural Morphogenesis of Chromoplasts during Fruit Ripening of Pimentos

Masayuki Yoshida¹, Manabu Hayatsu^{1,2}, and Suechika Suzuki^{1,2,3}

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

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

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

Abstract: The correlative change of pigments with chromoplast morphogenesis in the pericarp of yellow and red pimentos during fruit ripening was examined by pigment spectrophotometry and electronmicroscopy. The metamorphosis of plastids, chloroplasts to chromoplasts, occurred with the decrease of chlorophyll contents and the appearance of newly synthesized carotenoids, chloroxanthin in yellow pimentos and possibly capsanthin and/or capsorubin in red pimentos. As ripening proceeded, in plastids, plastoglobuli increased in both number and size, in contrast with the degradation of grana-stack and the fragmentation of stromal thylakoids. The plastids of yellow-ripe fruit pericarps contained exclusively plastoglobuli of various sizes at the center of stroma, indicating G (globular)-type chromoplasts, while the plastids of red-ripe fruit pericarps included a few enlarged plastoglobuli and electron-dense inclusions of various configurations, which possibly transformed from plastoglobuli to finally form needle-shaped carotenoid crystalloids. They were determined as an intermediate-type between G-type and F (filament)-type chromoplasts, and it was reconfirmed that, during chromoplast maturation, needle-shaped carotenoid crystalloids are formed by the elongation of enlarged plastoglobuli, concomitant with the increase of carotenoid contents.

Keywords: fruit ripening of pimentos, chlorophyll, carotenoid, pericarp plastid, chromoplast morphogenesis

序論

多くの果実は成熟に伴い果色が変化する。この色変化の原因は主に果皮細胞内の色素成分変化によるものであり、その色素成分変化には色素体の微細構造変化が伴うと考えられている¹⁻³⁾。成熟に伴う果皮の色素成分変化および色素体の微細構造変化については、トマト *Lycopersicon esculentum* Mill.^{4,5)} やトウガラシ *Capsicum annuum* L. var. *annuum*⁶⁻⁸⁾ などで研究されており、近年では、成熟に伴うクロロフィル分解や各種カロチノイド合成の分子調節機構も明らかにされつつある⁹⁾。

有色体に含まれるカロチノイドは、ストロマ中で顆粒、繊維状結晶様体、針状または平板状の結晶などの形をなし、これらの特徴を示す有色体はそれぞ

れGタイプ(globular type)、Fタイプ(filament type)、Cタイプ(crystalline type)として区別されている¹⁾。特に、トウガラシでは、黄色成熟果実にはGタイプの有色体、赤色成熟果実にはFタイプの有色体が含まれることが知られており⁶⁻⁸⁾、また、赤色果までの成熟段階で黄色を含む多様な色変化を示す五色トウガラシでは色素成分の変化に伴いGタイプの有色体はFタイプの有色体に変化することが報告されている⁸⁾。シントウガラシの栽培変種であるピーマンの果実にも成熟すると果皮が黄色になるものと赤色になるものがある。本研究では、ピーマンの黄色系果実と赤色系果実の成熟過程をそれぞれ3段階に分け、成熟に伴う色素成分変化および色素体の微細構



図 1. 成熟中のピーマン果実. A. 黄色系ピーマン. 果色は黄緑色から成熟期の黄色へと変化しつつある. B. 赤色系ピーマン. 成熟中の果実で、緑色部と赤色部の境界に橙色部が見られる.

造変化を観察し、既知のトウガラシ果皮有色体に関する知見と比較検討した。

クロロフィルの抽出と定量

各段階の果皮と緑葉から抽出した試料の湿重量(0.1~0.5 g)を測定して乳鉢に入れ、摩砕液酸性化防止のための炭酸カルシウム(0.1 g)と石英砂を加え、適時90%アセトン(0.5 ml)ずつ加えながら摩砕した。摩砕液を遠心管(IWAKI2325-015/15 ml)に移し、遠心機(TOMY LT-015)を使い850 gで10分間遠心した。上清を遠心管からメスフラスコに回収し、遠心管に残った沈殿にはさらに90%アセトンを加え、懸濁し、再度遠心した。この操作を二度繰り返し、回収した上清(抽出液)の全量をメスフラスコで測定した。

分光光度計(JASCO-V630)を用い、波長400~700 nm (0.5 nm step)の範囲で抽出液の吸光度を測定した。測定された吸光度のうち、663、645、630 nmの値を用い、SCOR-UNESCO(1966)¹⁰⁾により、湿重

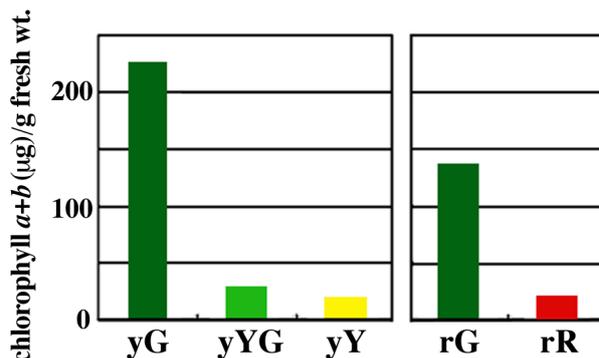


図 2. ピーマン果皮のクロロフィル量. 黄色系(yG, yYG, yY)および赤色系(rG, rR)の両者で、成熟に伴いクロロフィル量は激減している. yG:黄色系緑色期, yYG:黄色系黄緑色期, yY:黄色系黄色期, rG:赤色系緑色期, rR:赤色系赤色期.

量1 gあたりの各クロロフィル量を計算した。

カロチノイドの抽出と定性

各段階の果皮と緑葉から抽出した試料の湿重量(0.1~0.5 g)を測定して乳鉢に入れ、摩砕液酸性化防止のための炭酸カルシウム(0.1 g)と石英砂を加え、適時イソプロパノール(0.5 ml)ずつ加えながら摩砕した。摩砕液を、クロロフィル抽出と同じ方法で遠心したが、沈殿の再摩砕ではイソプロパノールの代わりにヘキサン(~3 ml)を用いた。ヘキサンによる摩砕と遠心を二度繰り返し、イソプロパノールとヘキサンによる遠心の上清を同一遠心管内に集め、蒸留水を加えて二層に分離させたものを更に850 gで3分間遠心した。遠心後、上層のヘキサン液を別の遠心管に移し、再度蒸留水を加えた後、上層を別の遠心管に移した。この操作を二度行ない、イソプロパノールを完全に除去し、ヘキサンの抽出液に硫酸ナ

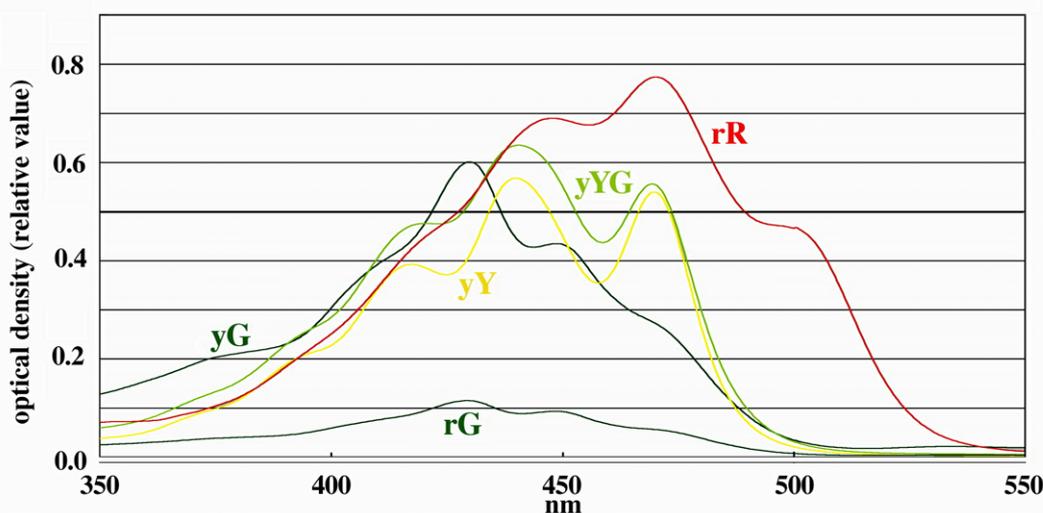


図 3. ピーマン果皮カロチノイドの吸光スペクトル. 各段階のピーマン果実の果皮領域から、ヘキサンでカロチノイドを抽出し、抽出液の吸光度を測定した. yG:黄色系の緑色果実, yYG:黄色系の黄緑色果実, yY:黄色系の黄色果実, rG:赤色系の緑色果実, rR:赤色系の赤色果実.

トリウムを加え、850 gで3分間遠心し、抽出液から水を除去した。

分光光度計(JASCO-V630)を用い、ヘキサンのブランク測定後、波長 250~700 nm (0.5 nm step)の範囲で抽出液の吸光度を測定し、吸光スペクトルのピーク波長に基づく定性¹⁾を試みた。

微細構造観察法

成熟各段階の果実の果皮および緑葉から摘出した組織片を6%グルタルアルデヒド(GA)溶液と2%四酸化オスmium(OsO₄)溶液で二重固定し、アセトン系列で脱水した後、樹脂(Quetol 812)に包埋し、40°Cで24時間、60°Cで24時間加熱して樹脂を重合させた。包埋試料からウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N)で厚さ70 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX)で観察した。

結果

果実の成熟に伴う色素変化

黄色系のピーマンでは、緑色の若い果実は成熟に伴い徐々に黄緑色に変化し、完熟時には鮮やかな黄色になる。果色で分けられた3段階のクロロフィル量は、緑色(yG)期では225.4 μg/g wet.wt.、黄緑色(yYG)期では30.1 μg/g wet.wt.、黄色(yY)期では15.4 μg/g wet.wt.であった(図2)。果色に黄色が認められるようになると共に果皮のクロロフィル量は激減した。赤色系のピーマンでは、クロロフィル量は、緑色果実で136.6 μg/g wet.wt.であったが、赤色果実では極端に減少しており、14.9 μg/g wet.wt.であった(図2)。一方、緑色果実のクロロフィル量との比較のために測定された緑葉では、黄色系で1999.5 μg/g wet.wt.、赤色系で1584.9 μg/g wet.wt.であり、緑色果皮のおよそ10倍量のクロロフィルが含まれていた。

図3は、黄色系および赤色系ピーマンの成熟各段階の果皮に含まれるカロチノイドの吸光スペクトル(λ 350-550 nm)を示している。波長350から550 nmの領域におけるスペクトルピークは、黄色系ピーマンの緑色果実では412、430、449、470 nmであり、最大吸収ピークは430 nmであった。一方、黄緑色および黄色の果実ではピークは416、440、470 nmで、440 nmの最大吸収ピーク波長は前段階の緑色果実のそれとは異なっていた。また、最大吸収ピークに続く第二の大きなピークの波長は470 nmであったが、同波長における緑色果実でのピークと比べると極めて顕著に増大していた。このピーク変化は、果色の黄色化に伴う新たなカロチノイド色素の

合成増加を示唆した。赤色系ピーマンの緑色果実のスペクトルピークは412、430、449、470 nmで、緑色果実におけるピークと一致していた。一方、赤色果実の吸収スペクトルは、最大吸収波長を470 nmとする三つのピーク、447、470、500 nmからなり、そのスペクトルパターンは他のものとは著しく異なっており、果実の成熟に伴い、赤色系のカロチノイドが合成されていることを示した。

果実の成熟に伴う果皮色素体の微細構造変化

ピーマン果実の緑色果皮色素体と比較するために、成長緑葉に含まれる色素体の微細構造を観察した(図4A)。色素体はレンズ状または長楕円体の形状を示し、ストロマ中に多数のストロマチラコイドと良く発達したグラナ、および好オスmium性のプラスト顆粒やデンプン粒を含む典型的な葉緑体であった(図4A)。これに対し、黄色系緑色果実の果皮に含まれる色素体は同様の形状と内部構造を示したが、内膜系の発達程度は低く、グラナを構成するチラコイドの重なり数は1/2以下であり、両者のクロロフィル量の違いが反映されていた(図4B)。黄緑色果実の色素体は厚さが増加してレンズ状から膨らんだ楕円体の形状に変化しており、内部のグラナチラコイドの重なりは緑色果実のそれよりやや減少していた(図4C)。また、プラスト顆粒の数は著しく増加し、一部の顆粒では直径の増加が認められた。一方、この段階では、色素体内に殆どデンプン粒は見られなかった。成熟した黄色果実の果皮では、色素体の形状はおおよそ球状であった。内部の微細構造は典型的なGタイプの有色体¹⁾の特徴を示しており、グラナは消失し、チラコイドは包膜の内側で併走するか、もしくは少数の断片的チラコイドがストロマ内に無秩序に分散分布していた(図4D)。ストロマ中央部は、増大した多数のプラスト顆粒で占められており、成熟以前の段階で見られた顆粒の電子密度が常に高く一定であったのに対し、低電子密度の顆粒も数多く含まれていた。また、一部の顆粒は押し潰されて、切片像でその断面が楕円や菱形のような形状に変化していた。

赤色系緑色果実の果皮に含まれる色素体の形状と内部構造は、黄色系緑色果実のそれと同じであった(図5A)。橙色果実の果皮色素体は球に近い形を示し、ストロマ内には数枚のチラコイドからなる痕跡のグラナと少数の断片化したチラコイドが観察された。一方、プラスト顆粒は、黄色系成熟果実果皮の色素体での特徴に良く似ており、ストロマ全体に分散分布していた(図5B)。成熟した赤色果実では、果皮色素体はほぼ球状であり、内部の微細構造はGタイプ

と F タイプ有色体¹⁾の両方の特徴を示していた。内膜系は完全に消失し、数と大きさは著しく増加したプラスト顆粒がストロマ中央部の殆どを占めており(図 5C)、球状のプラスト顆粒とともにオタマジャクシ形、紡錘形および繊維状の高電子密度構造が観察

された。これらの構造の高倍率観察は、オタマジャクシ形と紡錘形の構造が、それぞれ、球状プラスト顆粒の一ヶ所またはその反対側との二ヶ所から突出して伸長したものであり、繊維状構造はその突出伸長が著しく進んだものであることを示唆した(図 5D)。

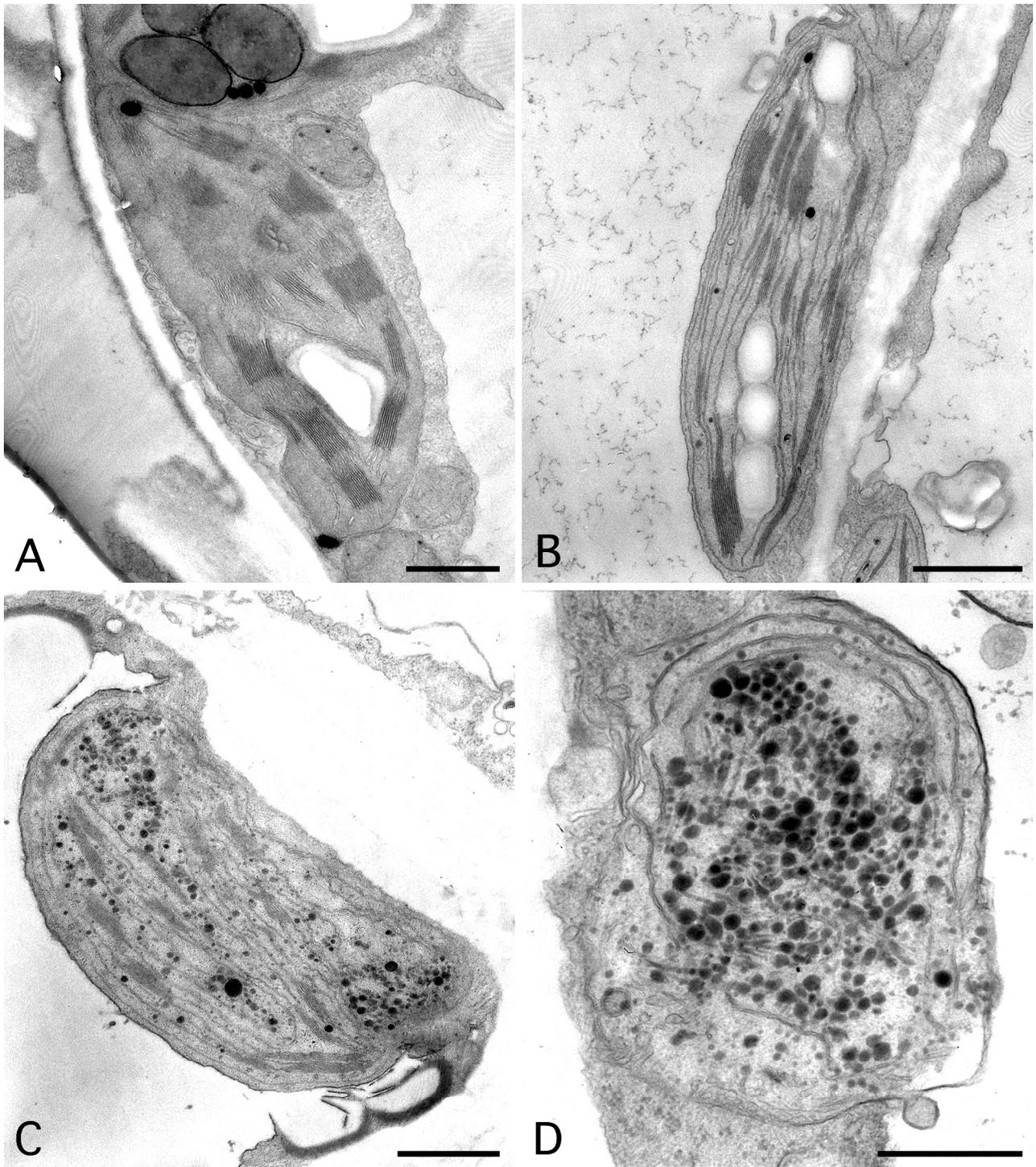


図 4. ピーマン葉の色素体および黄色系果実の成熟に伴う果皮色素体. A. 葉の色素体. 多数の良く発達したグラナ, ストロマチラコイド, デンプン粒, プラスト顆粒を含む成熟葉緑体. B. 緑色果実の果皮色素体. グラナ, インターグラナチラコイド, デンプン粒, プラスト顆粒を含む葉緑体. C. 黄緑色果実の果皮色素体. ストロマチラコイドの数は多いが, グラナを構成するチラコイドの数は少ない. 多数のプラスト顆粒および少数の増大したプラスト顆粒を含む. D. 成熟した黄色果実の果皮色素体. グラナは含まず, 包膜の内側に併走するチラコイドが顕著. ストロマ中央部に大きさが様々な多数のプラスト顆粒を含む黄色有色体. スケール: 1 μ m.

討論

黄色系および赤色系の若い緑色果実のクロロフィル量は、成長緑葉に含まれる量よりはるかに少量であった。しかし、果皮色素体の微細構造観察は、かなり良く発達したグラナとインターグラナチラコイ

ドの存在と、しばしばデンプン粒が色素体内に含まれることを示した。また、緑葉の退化葉緑体や有色体では多数のプラスト顆粒が見られることが知られているが^{8, 12, 13)}、緑色果皮の色素体内のプラスト顆粒の数は少なく、緑色果皮の色素体はかなりの光合

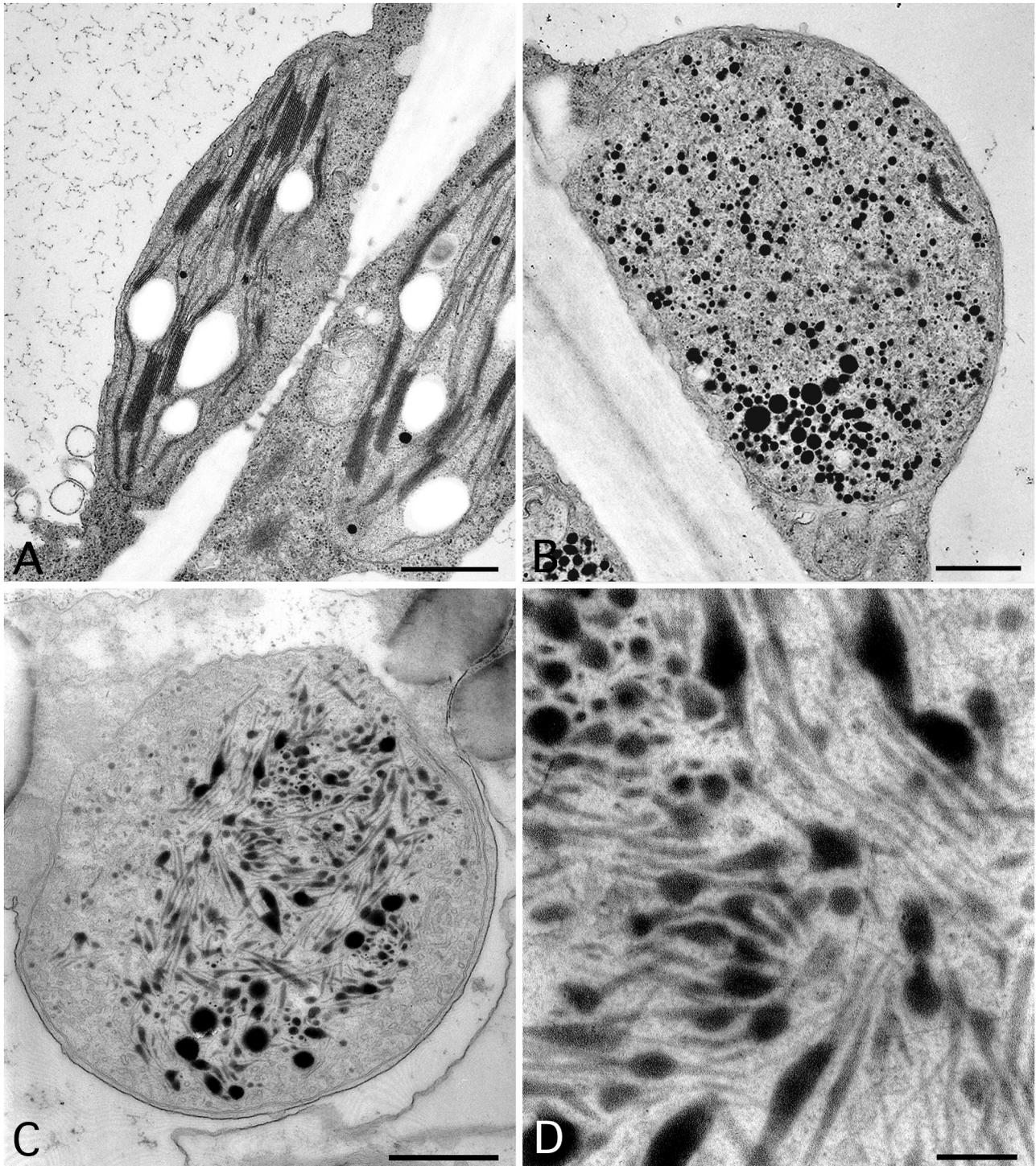


図 5. ピーマンの赤色系果実の成熟に伴う果皮色素体. A. 緑色果実の果皮色素体. グラナ, ストromaチラコイド, プラスト顆粒を含む葉緑体. B. 橙色果実の果皮色素体. 断片化した少数のチラコイドと大小様々なプラスト顆粒を含む. C. 成熟した赤色果実の果皮色素体. 内膜系チラコイドは殆ど含まず, ストroma中央部に大小様々な多数のプラスト顆粒を含む. プラスト顆粒針状化への様々な変形段階を示す赤色有色体. D. 赤色有色体のプラスト顆粒とその変形. 球形, オタマジャクシ形, 紡錘形, 繊維状構造が認められる. スケール: 1 μm (A-C), 0.2 μm (D).

成活性を持つ若い葉緑体と考えられる。果実の成長に伴い果色が緑から黄色あるいは赤色に変化し始めるとともにクロロフィル量は減少し、色素体内ではグラナ・インターグラナチラコイドの三次元構造の構築崩壊が認められた。グラナ・インターグラナチラコイドの三次元構築はクロロフィルのチラコイド膜内局在によって補償されており¹⁴⁾、内膜系の崩壊は有色体形成開始に伴うクロロフィル分解の結果と考えられる。

黄色系と赤色系の若い緑色果実の果皮からそれぞれ抽出された色素の吸光スペクトルは一致しており、4つのスペクトルピークが確認された。既知のヘキササン溶媒中における各種カロチノイドの吸光スペクトルピーク¹¹⁾との比較検討によりカロチノイドの同定を試みたが、既知のカロチノイドでピークの波長が全て一致するものはなかった。しかし、黄色系の黄緑色および黄色果実から抽出された色素の3つの吸光スペクトルピークの波長はニューロスポリネと完全に、クロロキサンチン(417、440、470 nm)とほぼ一致¹¹⁾していた。同様に、赤色系成熟果実の果皮から抽出された色素の吸光スペクトルピークの比較では、これに近似のカロチノイドにはリコピン(446、472、505 nm)、リコキサンチン(444、472.5、503 nm)、カプソルビン(444、474、506nm)、カプサンチン(-、474.5、504 nm)などが該当した。各種トウガラシ果実の主要なカロチノイドとしてカプサンチンとカプソルビンが報告されている^{8,15)}ことから赤色果実果皮のカロチノイドはこれらの両者またはいずれかに近いカロチノイドである可能性が高い。

微細構造観察の結果は、黄色系成熟果実の果皮に含まれる色素体がGタイプの有色体¹⁾であり、同時に五色トウガラシの果実に見られるYタイプの有色体⁸⁾と一致することを示した。一方、赤色系成熟果実の果皮に含まれる色素体は増大したプラスト顆粒とその変形と見られる多様な形状の構造を含んでいた。五色トウガラシやシシトウガラシの完熟赤色果実の果皮有色体(Rタイプの有色体)ではプラスト顆粒の殆どが繊維状結晶様体に変化しているが、成熟に伴い果色が黄色から赤色へと変化する五色トウガラシの赤色化の初期には同様の構造が観察されており⁸⁾、赤色系ピーマン果実果皮の色素体はYとRの中間タイプの有色体と考えられる。シシトウガラシの赤色果実に含まれるカロチノイドの35%はカプサンチンであり¹⁵⁾、五色トウガラシではプラスト顆粒の繊維状結晶様体への変形にカプサンチンやカプソルビン

の合成と増加が必要であることが示唆されている⁸⁾。ピーマンの赤色系成熟果実の果皮に含まれる色素体が、トウガラシ類のYとRの中間タイプの有色体であったことは、色素の吸光スペクトルがカプサンチンやカプソルビンのそれと微妙に異なっていることと関係していると思われる。より正確なカロチノイドの定性を行うことが今後の課題である。

文献

- 1) Frey-Wyssling A and Kreutzer E (1958) The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of *Capsicum annum* L. *J. Ultrastruct. Res.* 1:397-411.
- 2) Kirk JTO and Tilney-Bassett RAE (1967) *The Plastids*. Freeman WH and Co., London.
- 3) 鈴木季直 (1977) 葉緑体の退化と有色体. *光合成器官の細胞生物学*. 石田政弘, 植田勝巳 遠山 益編, 共立出版, 東京. pp. 116-137.
- 4) Harris WM and Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. I. Ultrastructure of low-pigment and high-beta mutants. *Am. J. Bot.* 56:369-379.
- 5) Harris WM and Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am. J. Bot.* 56:380-389.
- 6) Spurr AR and Harris WM (1968) Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum annum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. *Am. J. Bot.* 55:1210-1224.
- 7) Spurr AR (1971) Morphological changes in ripening fruit. *Hortiscience* 5:33-35.
- 8) Suzuki S (1974) Ultrastructural development of plastid in cherry pepper during fruit ripening. *Bot. Mag, Tokyo* 87:165-178.
- 9) Bovier F and Camara B (2006) The role of plastids in ripening fruits. In: *The Structure and Function of Plastids*. Wise RR and Hooper JK, eds., Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 419-432.
- 10) SCOR-UNESCO WG (1966) Determination of photosynthetic pigment in sea water. *Monogr. Oceanogr. Methol.* 1: 9-18.
- 11) Davies BH (1965) Analysis of carotenoid pigments. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin TW, ed., Academic Press, London. pp.489-532.
- 12) Hudak J (1981) Plastid senescence, 1. Changes of chloroplast structure during natural senescence in cotyledons of *Sinapis alba* L.. *Phytosynthetica* 15:174-178.
- 13) Biswal WC, Biswal B and Raval MK (2003) *Chloroplast Biogenesis. From Proplastid to Genontoplast.*, Kluwer Academic Publishers, London.
- 14) Weier TE and Benson AA (1967) The molecular organization of chloroplast membrane. *Amer. J. Bot.* 54:389-402.
- 15) Curl AL (1962) The carotenoids of red bell pepper. *J. Agric. Food Chem.* 10:504-509.

■原 著■

C₄植物アオビユ黄化子葉光照射に伴う葉緑体の形態形成

柏木美由紀¹ 吉田顕二¹ 酒井美和子¹ 濱元千絵子^{2,3} 鈴木季直^{1,2,4}

Morphogenesis of Chloroplasts during the Illumination in Etiolated Cotyledons of a C₄ Plant *Amaranthus*

Miyuki Kashiwagi¹, Kenji Yoshida¹, Miwako Sakai¹, Chieko Hamamoto^{2,3}
and Suechika Suzuki^{1,2,4}

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

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

³ Application and Research Group, Electron Optics Division, JEOL Ltd., Akishima-City, Tokyo 196-8558, Japan

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

Abstract: To investigate the development of plastids in various leaf tissues of a NAD-ME type C₄ plant, *Amaranthus patulus* Bertoloni, structural changes of etioplasts under continuous illumination were observed by means of an electron microscope. Before the illumination, all etioplasts in epidermal cells including guard cells, mesophyll cells, bundle sheath cells, and vascular parenchymatous cells were small and spherical in shape, and contained prolamellar bodies with extending single-thylakoids. After the illumination, the plastids elongated, and the disorganization of prolamellar bodies and the formation of primary grana occurred at first in epidermal plastids, secondary in mesophyll plastids, then in bundle sheath plastids, and finally in vascular parenchymatous plastids. This difference of start for plastid morphogenesis among leaf tissues may be reflected simply by those anatomical arrangement for light exposure. The function of peripheral reticulum found in mesophyll and bundle sheath chloroplasts and the crystalline inclusion in epidermal plastids was also discussed.

Keywords: *Amaranthus* cotyledon, chloroplast morphogenesis, etioplast metamorphosis, prolamellar body, crystalline inclusion

序論

サトウキビの光合成初期産物が C₄ ジカルボン酸であることが 1965 年に Kortschak ら¹⁾により発見され、新たな光合成系として C₄ ジカルボン酸経路が Hatch and Slack²⁾によって明らかにされて以来、多くの植物の光合成が研究され、現在では 8000 種以上の C₄ ジカルボン酸経路により光合成を行なう C₄ 植物が知られている³⁾。

光合成初期産物が 3 炭素化合物である C₃ 植物では、光合成は主に葉肉細胞で行なわれる。これに対して、C₄ 植物の光合成は、葉肉細胞と維管束鞘細胞の分業で行なわれており、二酸化炭素は葉肉細胞の C₄ 経路で同化され、C₄ 化合物として維管束鞘細胞に

輸送され、脱炭酸を経て、カルビン-ベンソン回路(C₃ 回路)に取込まれて再同化される。良く発達した維管束鞘細胞の存在は、C₄ 植物に特有な形態学的特徴であり、この二酸化炭素固定の分業は必然的に葉の細胞分化との相関を示し、機能と細胞分化との相関に関する多くの研究がなされている。最近では、それぞれの細胞に特異的な酵素の遺伝的発現が光と温度に影響を受けることや葉の組織の加齢に依存することが示唆されている⁴⁾が、その詳細は必ずしもまだ明確ではない。

C₄ 植物は、C₄ 経路の脱炭酸酵素が NADP-リンゴ酸酵素 (nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate-malic enzyme)である NADP-ME 型、NAD-リンゴ酸酵素 (nicotinamide adenine dinucleotide-malic enzyme)である NAD-ME 型、PEP カルボキシキナーゼ phosphoenolpyruvate carboxykinase)である PCK 型の 3 つのサブタイプに分類されており、オキサロ酢酸から還元されるそれぞれの C₄化合物は NADP-ME 型ではリンゴ酸、NADP-ME 型と PCK 型ではアスパラギン酸であることが知られている⁵⁾。また、この分類は、維管束鞘細胞に含まれる葉緑体(以下、維管束鞘葉緑体または色素体)の内膜系の違いとも対応し、NADP-ME 型 C₄植物では、維管束鞘葉緑体は発達したグラナを欠き、良く発達したグラナを持つ葉肉細胞の葉緑体(以下、葉肉葉緑体または色素体)と典型的な二型性を示すが、NAD-ME 型および PCK 型の C₄植物では、維管束鞘葉緑体も良く発達したグラナを持ち、葉肉葉緑体と内膜系における二型性を示さないことが知られている⁶⁾。NADP-ME 型 C₄植物における二型性葉緑体の形態形成も葉肉細胞と維管束鞘細胞の光合成回路特異的酵素の違いと相関しており、この型の典型的植物であるサトウキビとトウモロコシでは、維管束鞘葉緑体のグラナは、葉の細胞分化と関連した葉緑体の発達過程で一旦形成されるが成熟化に伴って消失することが報告されている^{7,8)}。一方、葉緑体の二型性が顕著でない NAD-ME 型や PCK 型の C₄植物では、細胞分化に伴う色素体の形態形成についてはあまり研究されていない。暗所に置かれた植物では、内膜系の発達は抑制されて色素体内にプロラメラボディが形成されるが、光照射により短時間で内膜系の発達が促進されることが知られている⁹⁾。今回、筆者らは、NAD-ME 型における色素体の形態形成、特に内膜系の発達過程を明らかにするために、黄化処理した C₄植物アオビユに光を照射した後の葉の各細胞内に含まれる色素体の微細構造変化を透過型電子顕微鏡で観察した。

材料と方法

野外で自生していたアオビユ(ホソアオゲイトウ) *Amaranthus patulus* Bertoloni (図 1 A)から前年度に採集しておいた種子を滅菌シャーレ内の脱脂綿上に播種し、水を適度に含ませた後、容器全体を完全に遮光し、温室(30°C)内に置いて発芽成長させた。一週間後に 25°C に保たれた培養装置に移し、遮光を解除して $\sim 20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を照射した。光照射開始から 0、2、6、12、48 時間後のアオビユ(図 1. B-D)のそれぞれの子葉を摘出して $0.5 \times 2 \text{ mm}^2$ の小片に細切し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した 6%グルタルアルデヒド液に浸漬し、室

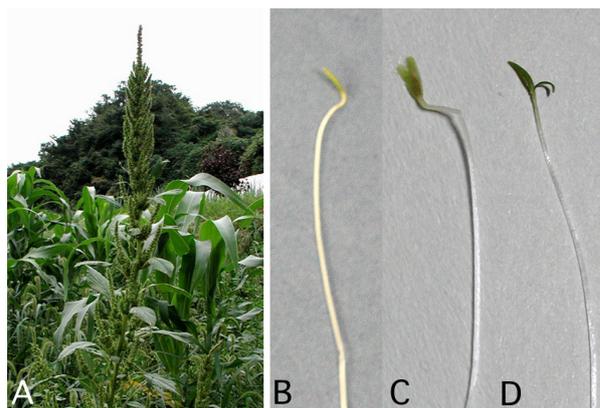


図 1. アオビユ(ホソアオゲイトウ). A. 野外自生の成長植物. B. 播種後暗所で1週間黄化処理された芽生え. C. 黄化処理に続く光照射12時間後の芽生え. D. 黄化処理に続く光照射48時間後の芽生え.

温下で1時間、更に4°C下で23時間前固定した。光照射0時間となる暗所対照試料の前固定は安全暗灯のみを点灯した暗室内で行なった。0.1 M リン酸緩衝液で洗浄した後、DW で希釈した 2%四酸化オスミウム液により室温下で1時間と4°C下で23時間後固定した。二重固定後に、試料をアセトン系列で脱水し、Epoxy 樹脂に包埋して熱重合させた。また、明所対照試料として、明所で発芽させたアオビユの一週間後の子葉と、鉢に移植してから約2ヶ月後の成長葉も同様に処理した。樹脂包埋試料からウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N)で厚さ 70 nm の超薄切片をダイヤモンドナイフを用いて作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色して透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX)で観察した。

結果

成長植物緑葉組織細胞の観察

アオビユの緑葉は典型的なクランツ構造¹⁰⁾を示し、よく発達した維管束鞘細胞が維管束を取り囲んでいた(図 2)。維管束鞘細胞内では色素体も含めて殆どの細胞小器官は求心的に維管束側に向かって分布していたが、対照的に液胞は遠心的領域に分布していた(図 2、3B)。維管束鞘細胞を取り囲む細胞壁のうち、隣接する葉肉細胞との間の細胞壁は維管束鞘細胞間や維管束細胞との間の細胞壁より厚かった。葉肉細胞内では中心部に液胞が局在し、色素体は細胞膜に近接して分散分布していた(図 2、3A)。維管束鞘細胞は小さく、液胞も未発達であるため電子密度の高い細胞として観察された(図 2、3C)。一方、表皮系では、表皮細胞はかなり大きく、液胞も極度に発達して細胞中央部を占め、細胞質基質は細胞膜に沿って薄い層として観察された(図 2、3D)。孔辺細胞は表皮細胞より小さく、液胞も大きな領域を占めてい

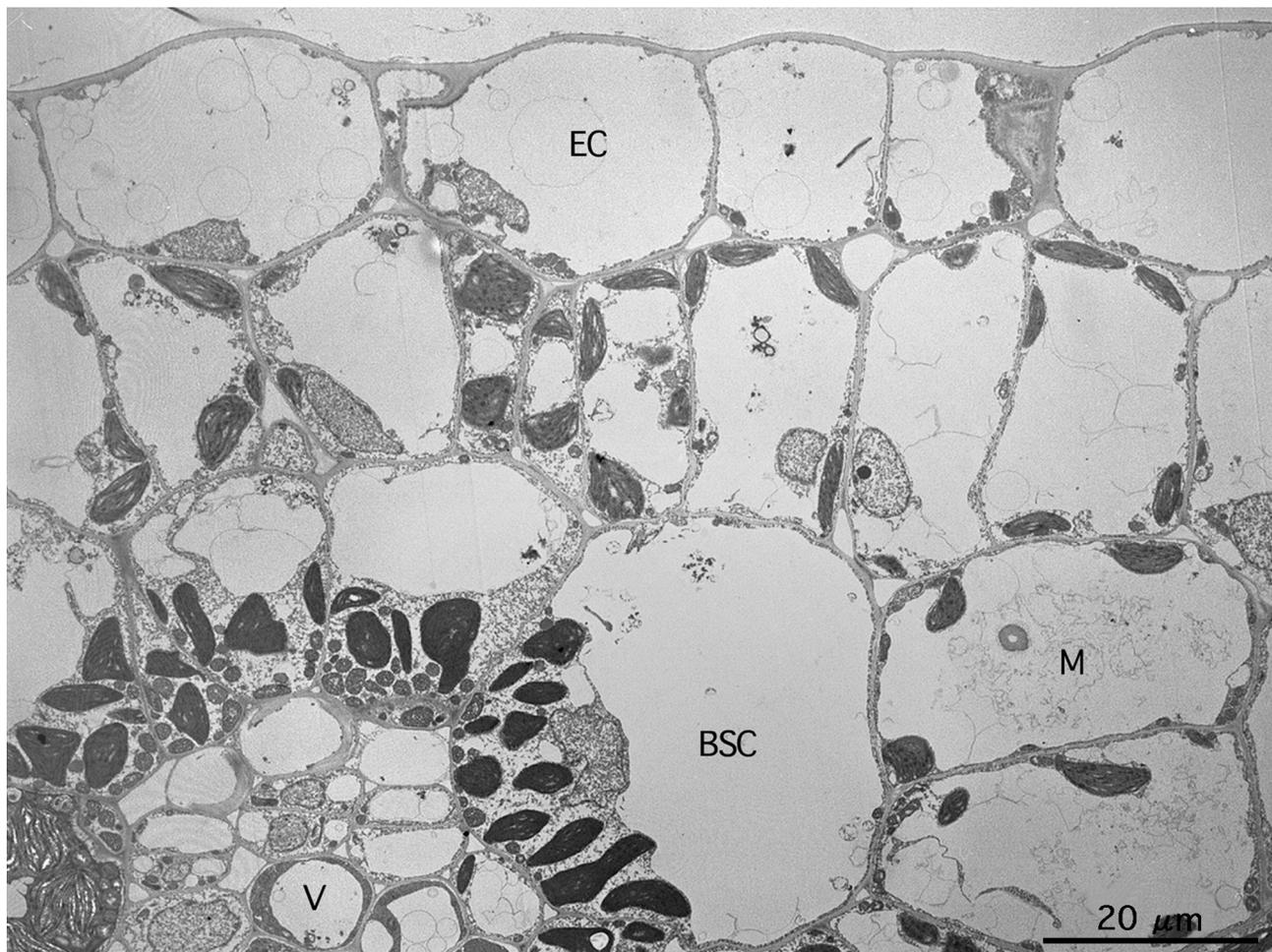


図 2. アオビユ緑葉の横断切片像. 維管束(V)を維管束鞘細胞(BSC)が取り囲み, それに隣接した葉肉細胞(MC)とその外側に表皮細胞(EC)層が見られる. 維管束鞘細胞内の色素体は求心的に配列.

なかったが、細胞壁は他の細胞と比べて明確に肥厚していた(図 2、3E)。

葉肉細胞と維管束鞘細胞の色素体は良く発達した葉緑体で、10〜20層にチラコイドが積み重なったグラナとグラナ間を連結するストロマチラコイドからなる内膜系を含んでおり、ストロマ内には多数の大きなデンプン粒とプラスト顆粒が観察された(図 4A、B)。色素体の内側包膜に沿って小管の連続からなる網状構造(peripheral reticulum; 周縁網状体)が葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体で共に観察されたが、その規模は葉肉葉緑体の方がより顕著であった。葉肉細胞と維管束鞘細胞の色素体が大きなものでは長径で 10 μm 以上に達するのに対して、維管束鞘細胞や表皮系の細胞に見られる色素体は長径でおよそ 3 μm であり、グラナとストロマチラコイドからなる内膜系も含まれるが、グラナの積み重なりは数層で少なく、貯蔵デンプンからなると思われるデンプン粒を含む未発達の色素体であった(図 4C-D)。これらの色素体のストロマ中にはしばしば高電子密度の結

晶様体が観察された(図 4E、F)。

黄化処理植物子葉組織細胞の観察

暗所で発芽成長させたアオビユの黄化子葉(図 1B)の各組織細胞の色素体を観察した。いずれの色素体も球状または楕円体状で、内部にプロラメラボディや貯蔵デンプン粒を含む典型的なエチオプラストの特徴を示していた(図 5)。葉肉細胞と維管束鞘細胞のエチオプラストはほぼ同じ大きさで、長径 3.5〜4.0 μm であり、プロラメラボディから多数の長い単一チラコイドが伸びていた(図 5A、B)。特に、葉肉細胞のエチオプラストでは、プロラメラボディから伸びた複数の単一チラコイドが包膜に沿って互いに平行に配列するパラレルチラコイドが観察された(図 5A)。一方、維管束鞘細胞と表皮系細胞内のエチオプラストは小さく、長径およそ 2.5 μm で、プロラメラボディから伸びる単一チラコイドの数や長さも、維管束鞘細胞ではかなり良く発達していたが、葉肉細胞や維管束鞘細胞のエチオプラストと比べる

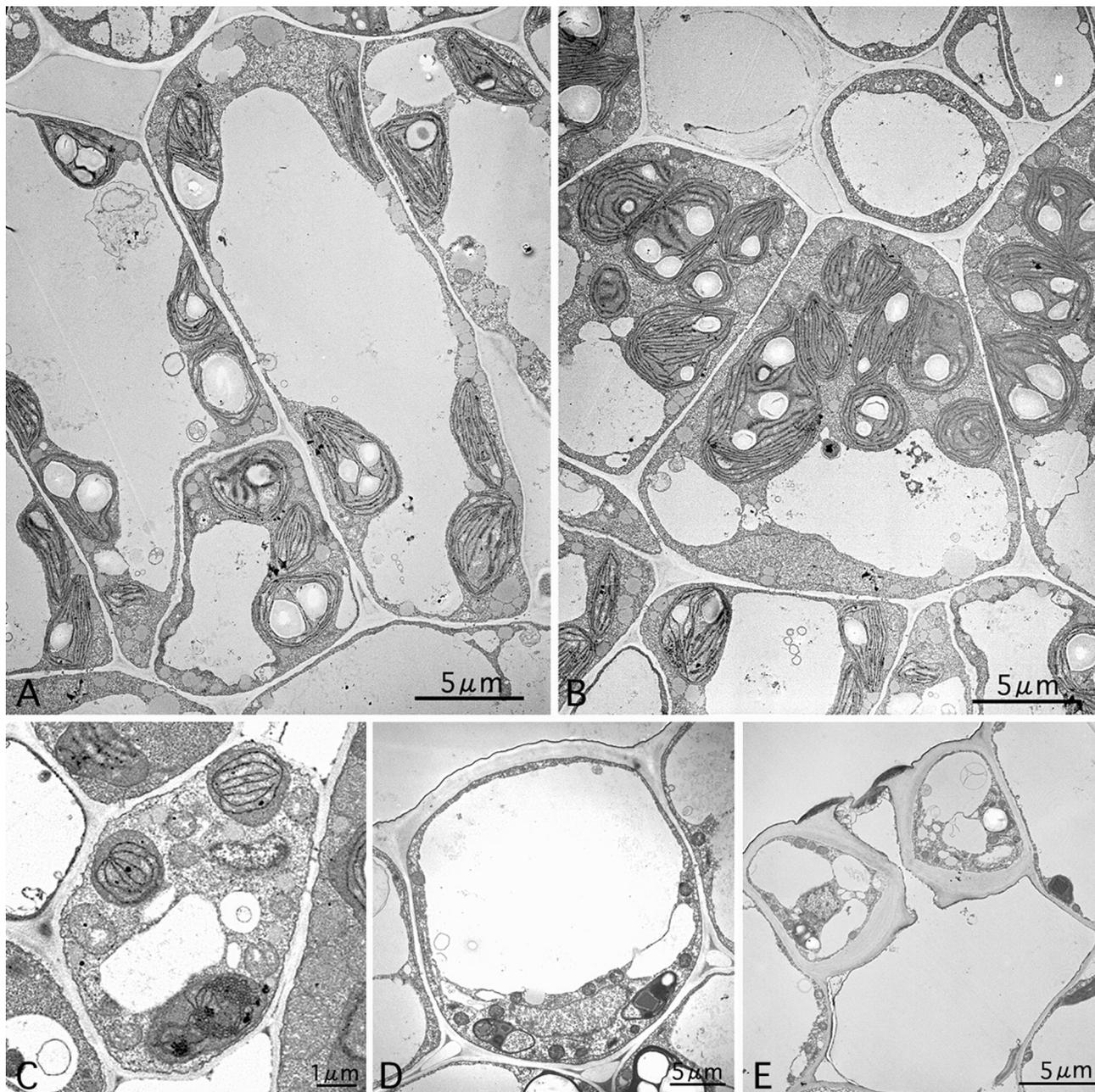


図3. 緑葉各組織の細胞. 葉肉細胞(A), 維管束鞘細胞(B), 維管束柔細胞(C), 表皮細胞(D), 孔辺細胞(D). 各細胞に含まれる色素体の大きさや内膜系発達の違いに注目. 葉肉細胞と維管束鞘細胞の色素体は良く発達した葉緑体で多数の澱粉粒が含まれている.

と小規模であった(図5C-E)。なお、表皮細胞内のエチオプラスト内には緑葉の表皮細胞色素体内で観察されたものと同様の結晶様体が含まれていた(図5D)。

光照射に伴う色素体内膜系変化の観察

暗所で発芽成長したアオビユを明所に移すと、黄化葉は徐々に緑化し、48時間後には明所で発芽成長させたものと殆ど同じ色あいの緑葉になった(図1D)。明所に移してから色素体で生ずる内膜系の変化には細胞間で経過の違いが認められたが、いずれの色素

体でもプロラメラボディの崩壊と消失に伴うグラナおよびストロマチラコイドの発達が見られた。

図6は、葉肉細胞における色素体内膜系の変化を示している。明所に移して2時間後には、プロラメラボディから伸びていたチラコイド間に局所的な接触が生じ、初期(一次)グラナが形成され始めていた。明所に移して6時間後にはプロラメラボディは完全に消失し、一方、最大で5層程度の重なりから成るグラナが多数形成されていた(図6B)。明所に移してから2時間後では色素体はまだ球状で、エチオプラストの特徴を維持していたが、6時間後には偏平化

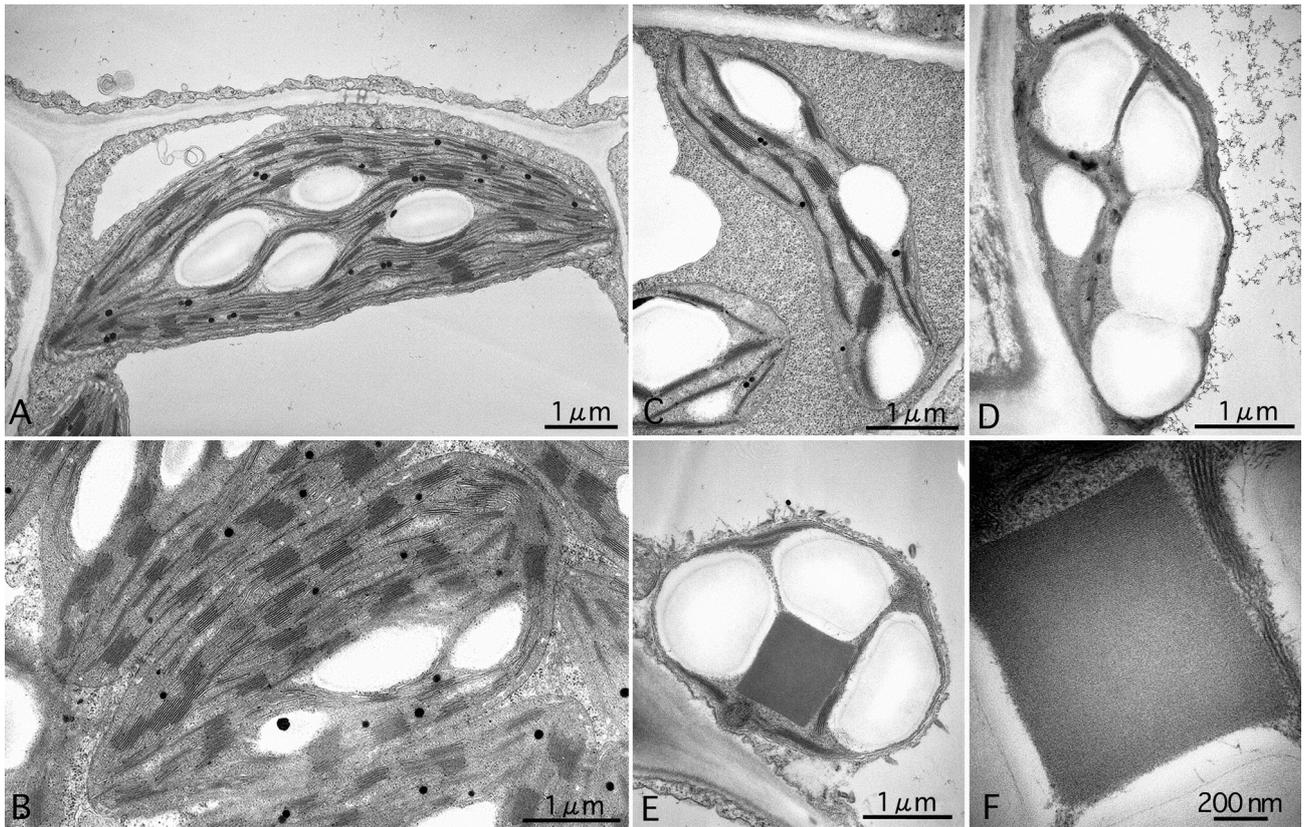


図 4. 緑葉各組織細胞の色素体. 葉肉細胞(A), 維管束鞘細胞(B), 維管束柔細胞(C), 孔辺細胞(D), 表皮細胞(E)の各色素体および表皮細胞色素体ストロマ中に見られる結晶様体(F).

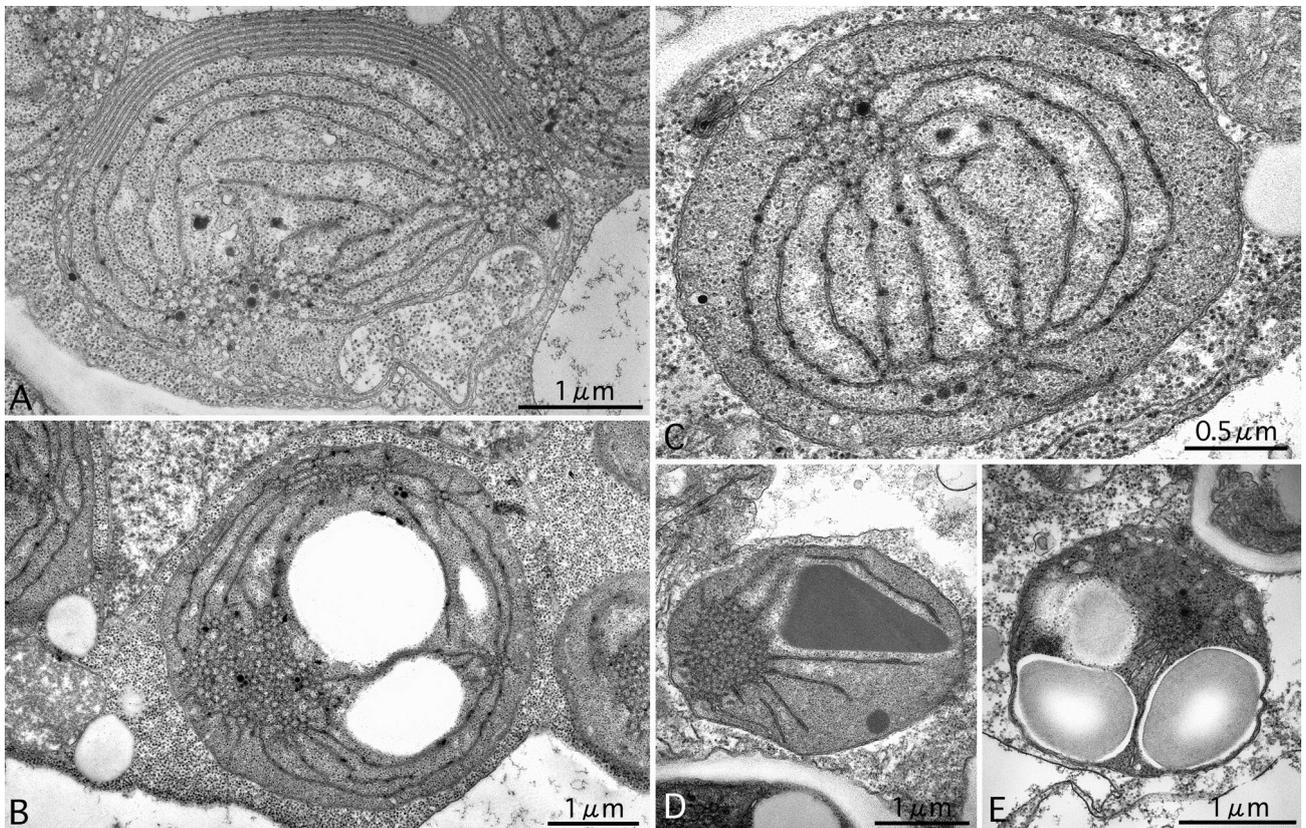


図 5. 黄化子葉各組織細胞の色素体. 葉肉細胞(A), 維管束鞘細胞(B), 維管束柔細胞(C), 表皮細胞(D), 孔辺細胞(E)の色素体. 各色素体はプロラメラボディを含み, 葉肉細胞の色素体では平行チラコイドが顕著. 表皮細胞の色素体には結晶様体が見られる.

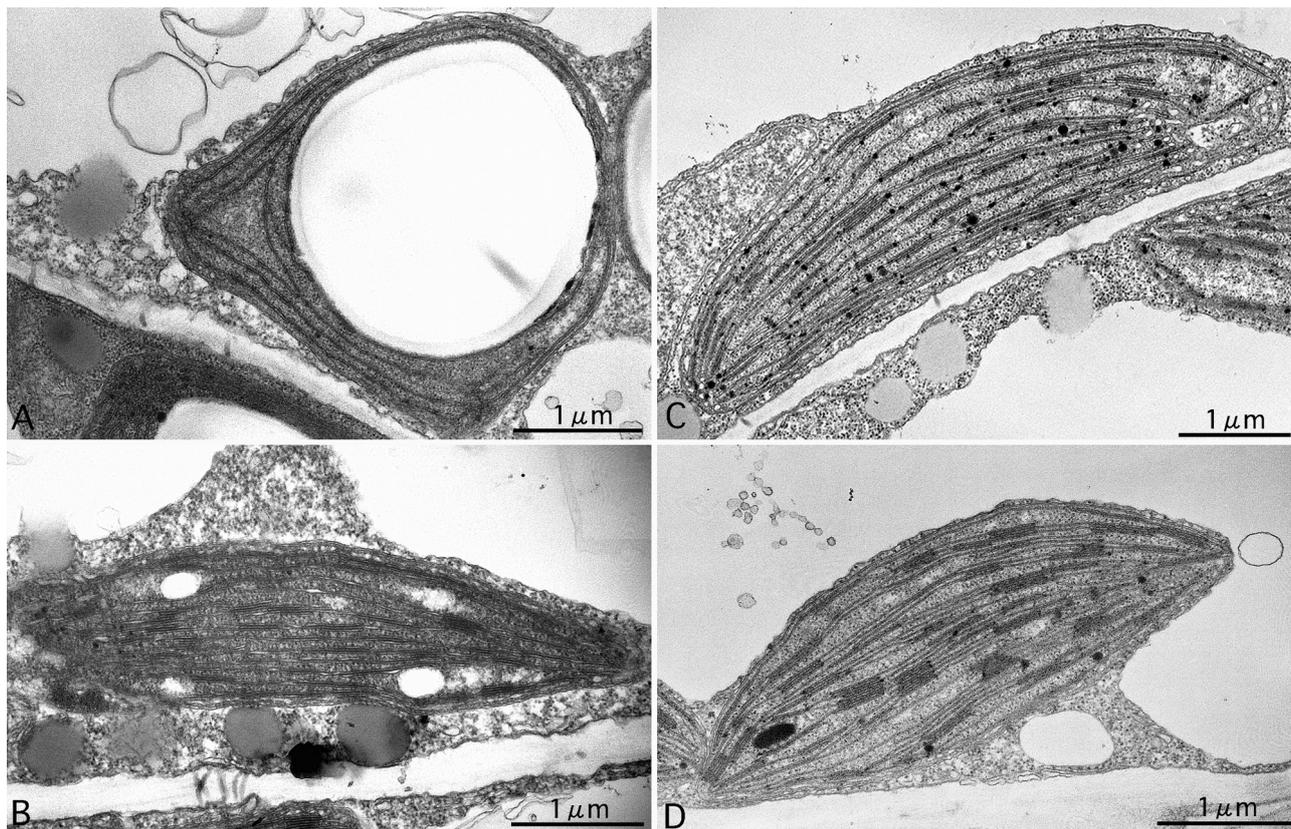


図 6. 黄化植物光照射後の葉肉細胞色素体の発達. 明所に移してから 2 時間後(A), 6 時間後(B), 12 時間後(C), 48 時間後(D)の色素体. 2 時間後にはプロラメラボディはほぼ消失し、痕跡構造が残されている. 光照射時間が長くなるにつれてグラナの積み重なりは増加し、形状も球状からレンズ状へと変化している.

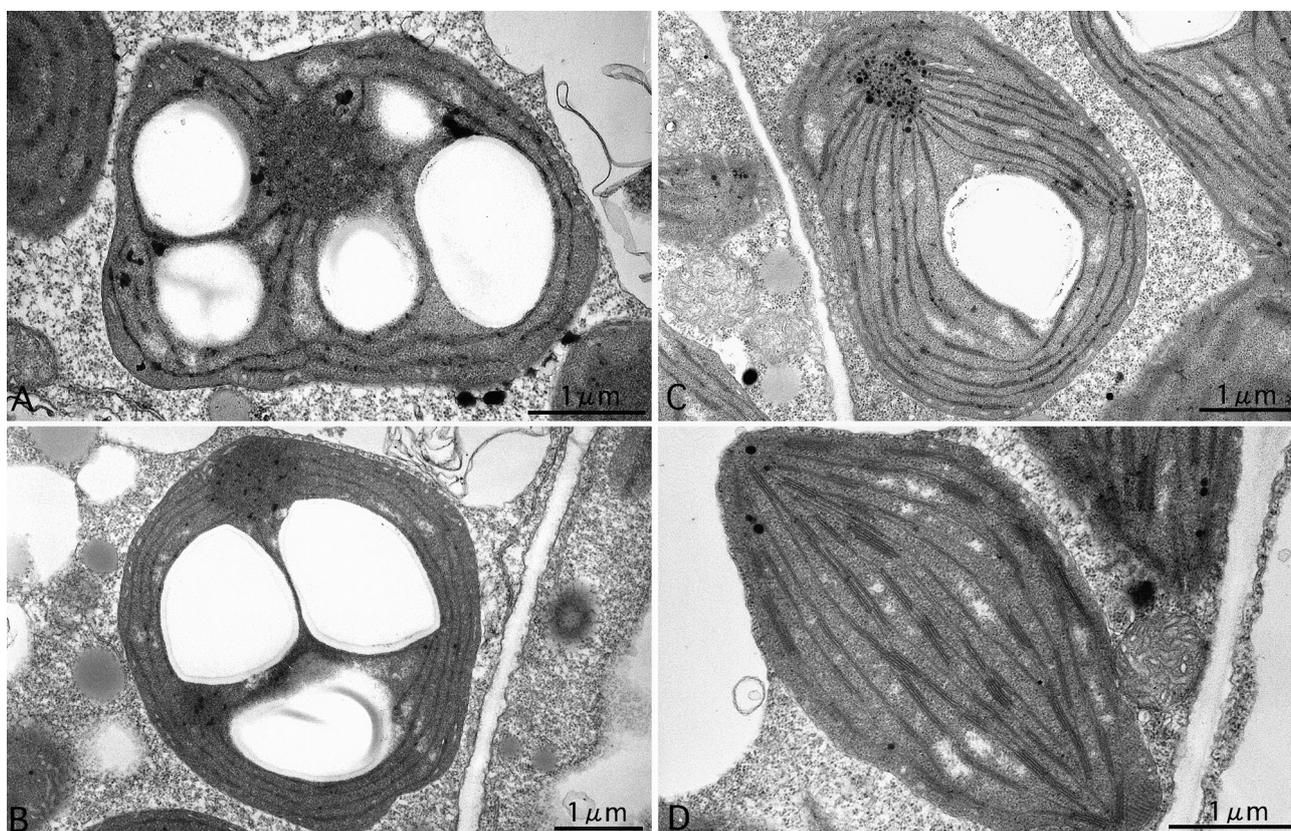


図 7. 黄化植物光照射後の維管束鞘細胞色素体の発達. 明所に移してから 2 時間後(A), 6 時間後(B), 12 時間後(C), 48 時間後(D)の色素体. 12 時間後にも痕跡的プロラメラボディが見られ、葉緑体の特徴が明確なものは 48 時間後の色素体である.

して細長い楕円体となり、ストロマチラコイドはその長軸に平行に配列されていた。明所に移して 12 時間後には、色素体の形状はレンズ状に変化し、グラナの積み重なりも 5 層以上のものが出現し、包膜直下には周縁網状体小胞も観察された(図 6C)。明所に移して 48 時間後には色素体内のグラナの積み重なりは更に増え、最大で 10 層のものも見られた。グラナの規模は成熟緑葉の葉肉細胞葉緑体で観察されたものにまで達していないが、十分に発達した葉緑体であった(図 6D)。

図 7 は、維管束鞘細胞における色素体内膜系の変化を示している。維管束鞘細胞の色素体では植物を明所に移してから 12 時間後でもなおストロマ内に痕跡的なプロラメラボディが観察された(図 7A-C)。色素体の形状も 12 時間後までほぼ球状で、エチオプラストの特徴を残しており、貯蔵デンプン由来のデンプン粒もかなり残されていて葉肉細胞の色素体より変化はかなり遅延されていた。色素体の内膜系では、明所に移してから 6 時間後に辛うじて初期グラナが見られたが(図 7B)、グラナとストロマチラコイドのみからなる内膜系を持つ葉緑体は 48 時間後に始めて観察された(図 7D)。

図 8 は、黄化植物を明所に移してから 12 時間および 48 時間後のアオビユ子葉の維管束鞘細胞に見られる色素体を示している。12 時間後でもなお痕跡的なプロラメラボディが残っており、48 時間後の内膜系もグラナの積み重なりは最大でも 7 層程であり、重なり範囲(グラナ円盤の直径)も小さかった。色素体は球状からやや楕円体に変形していたが、大きさは長径で 3 μm 程度で、色素体の発達は抑制されていた(図 8 B)。

図 9 は、黄化植物を明所に移してから 12 および 48 時間後のアオビユ子葉の表皮系細胞に見られる色素体を示している。表皮系では、明所に移してから 2 時間後に既にプロラメラボディは消失して初期グラナが形成されており、12 時間後には成熟緑葉で見られる色素体のそれにほぼ匹敵するグラナの積み重なりを示し、葉の組織の中では最も速やかに変化が進行した。しかし、顕著な形状変化は見られず、最終的なサイズも長径でおよそ 3 μm 程度であった。なお、表皮細胞の色素体は、明所に移した後のどの段階でも高頻度でストロマ中に結晶様体を含んでいた。

討論

NAD-ME 型 C₄ 植物アオビユにおける色素体内膜系の発達過程を明らかにするために、黄化植物に光を照射した後の子葉各組織細胞内に含まれる色素体の

微細構造変化を観察した。黄化植物子葉各組織細胞内の色素体はすべてストロマ中にプロラメラボディを含んでおり、植物を明所に移すと、これらのプロラメラボディは徐々に小さくなり、チラコイドが伸展し、随所でグラナが形成された。この内膜系の変化(発達)過程の概略は組織細胞間で差はなかったが、時間経過において異なっていた。プロラメラボディが崩壊し始め、初期グラナが形成される段階は、表皮系色素体で最も早く生じ、葉肉色素体、維管束鞘色素体の順で起こり、維管束鞘細胞の色素体では最も遅く生じた。組織間で色素体の発達にずれが生じていることの最も単純な解釈は、入射する光の方向に沿った表面から深部への組織分布状態の反映とすることである。一方、典型的な NADP-ME 型 C₄ 植物のトウモロコシでは、色素体内膜系のこの変化は葉肉色素体より維管束鞘色素体の方が早く生ずることが報告されており¹¹⁾、今回の結果と一致しない。しかし、トウモロコシやサトウキビでは維管束鞘色素体は発達初期に一旦グラナを形成し、その後グラナを欠く成熟葉緑体へと変化することが知られている^{7, 8)}。これらの植物に見られる維管束鞘色素体の発達段階は他の色素体より多くの段階を経ることが必要であり、そのことが維管束鞘色素体の発達進行を加速しているものと思われる。NAD-ME 型のアオビユでは、維管束鞘葉緑体と葉肉葉緑体とで内膜系の違いはなく、光照射後に組織間で色素体の発達にずれが生ずることを組織分布に起因したものと解釈することは妥当と思われる。

NADP-ME 型 C₄ 植物では葉肉葉緑体と維管束鞘葉緑体とでグラナの有無による二型性が認められるが、NAD-ME 型 C₄ 植物ではグラナの有無において両者に違いはなく二型性は成立しない⁶⁾。しかし、今回の観察でも、例えば、緑葉では維管束鞘葉緑体の方が葉肉葉緑体より大きく、細胞内で求心的に配列するなど、葉のクランツ構造に由来すると思われる微細構造学的特徴の違いが認められた。色素体包膜内膜の陥入と分岐により形成されると思われる周縁網状体 *peripheral reticulum* も、例外はあるが^{12, 13)}、殆どが C₄ 植物の葉緑体で観察されている特徴的な構造である¹⁴⁾。アオビユではこの構造は葉肉葉緑体でより顕著であり、この結果はこれまでの報告^{8, 14)}と良く一致していた。

緑葉、黄化葉および黄化植物光照射後のどの段階でも表皮細胞の色素体内には、ストロマのかなりの領域を占める結晶様体が観察された。アオビユの成長した緑葉では、表皮細胞や維管束鞘細胞の色素体中に結晶様体が観察されることは既に報告されており、内膜系が未発達で、専ら光合成活性が低いと思

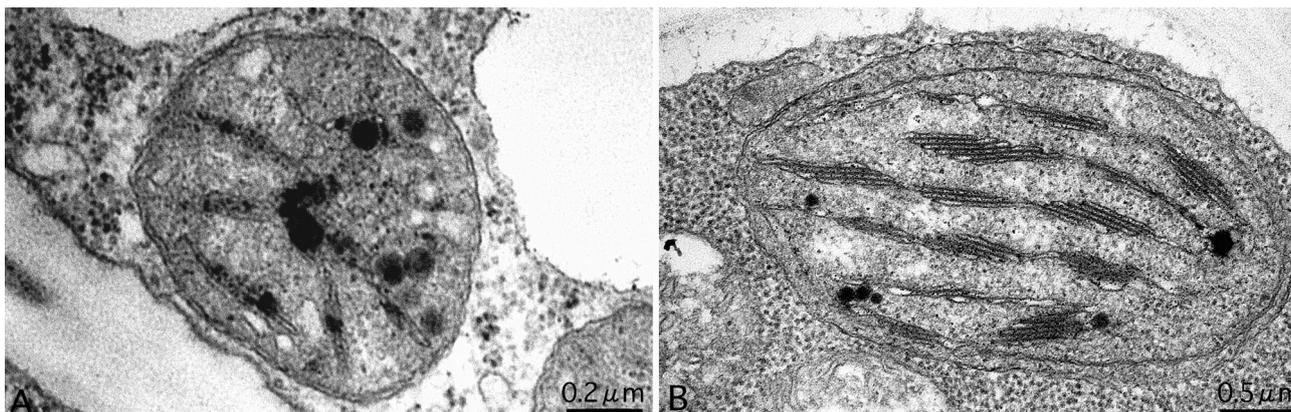


図 8. 黄化植物光照射後の維管束柔細胞色素体の発達. 明所に移してから 12 時間後(A)および 48 時間後(B)の色素体. 48 時間後でも色素体は小さく、グラナの積み重なりも少ない.

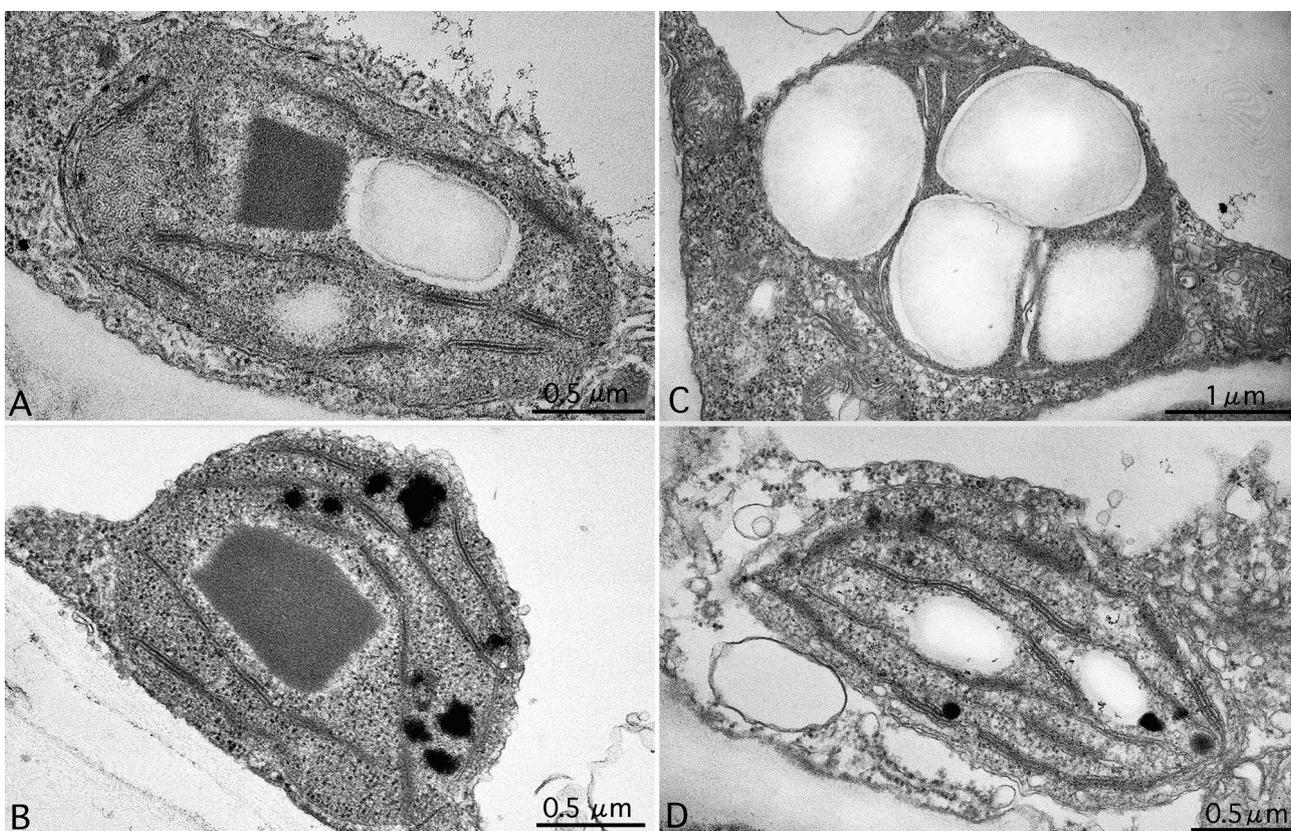


図 9. 黄化植物光照射後の表皮系細胞色素体の発達. 明所に移してから 12 時間後(A)および 48 時間後(B)の表皮細胞色素体と 12 時間後(C)および 48 時間後(D)の孔辺細胞色素体. 48 時間後でも色素体は小さく、グラナの積み重なりも少ない.

われる色素体内に見られることから、過剰蓄積された Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) である可能性が指摘されていた¹⁵⁾。実際に、抗 Rubisco 抗体を用いた免疫電顕法による観察では抗体が表皮細胞の色素体内結晶様体に良く結合する結果が得られている(Suzuki 他、未発表)。今回、光照射後の黄化色素体の発達過程を観察したが、表皮細胞色素体内の結晶様体がこの光照射に伴って

量と質において変化している徴候は得られなかった。これらの色素体では早期にグラナ形成や色素体成長が抑制されると思われるので、継続的な光合成酵素群の合成は起こらず、結晶様体の成長増大や顕著な形状変化が見られないのかも知れない。

文献

- 1) Kortschak HP, Hartt CE and Burr GO (1965) Carbon dioxide fixation in sugar cane leaves. *Plant Physiol.*

- 40:209-213.
- 2) Hatch MD and Slack CR (1966) Photosynthesis by sugar cane leaves: A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.* 101:103-111.
 - 3) Sage RF and Monson RK (1999) Preface. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. xiii-xv.
 - 4) Dengler NG and Nelson T (1999) Leaf structure and development in C₄ plants. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 133-172. pp. 116-137.
 - 5) Hatch MD, Kagawa T and Craig C (1975) Subdivision of C₄-pathway species base on differing C₄ dicarboxylating features. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:111-128.
 - 6) Kanai R and Edwards GE. (1999) The biochemistry of C₄ photosynthesis. In: *C₄ Plant Biology*. Sage RF and Monson RK, eds., Academic Press, San Diego. pp. 49-87.
 - 7) Laetch WM and Price I (1969) Development of dimorphic chloroplast of sugar cane. *Amer. J. Bot.* 56: 77-87.
 - 8) Suzuki S and Ueda R (1974) Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids in C₄-plants. I. The relationship between development of plastids and leaf cell differentiation during germination in *Zea mays* L.. *Sci Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* 15:237-354.
 - 9) Kirk TO and Tilney-Basset RAE (1967) *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*. WH Freeman and Co., London.
 - 10) Haberlandt G (1882) Vergleichende Anatomie des Assimilatorischen Gewebesystems der Pflanzen. *Jahrb. Wiss. Bot.* 13:74-188.
 - 11) Suzuki S (1974) Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids in C₄-plants. II. Development of etioplasts under illumination in *Zea mays* L.. *Sci Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku* 15 : 255-263.
 - 12) Pallas JE and Mollenhauer HH (1972) Physiological implication of *Vicia faba* and *Nicotiana tabacum* guard cell ultrastructure. *Amer. J. Bot.* 59:504-514.
 - 13) Taylor AO and Craig AS (1971) Plant under climatic stress. II. Low temperature high light on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiol.* 47:719-725.
 - 14) Laetsch WM (1971) Chloroplast structural relationships in leaves of C₄ plants. In: *Photosynthesis and Photorespiration*. Hatch MD, Osmond CB and Slatyer RO, eds., Wiley-Interscience, New York. Pp323-349.
 - 15) Suzuki S (1978) Crystalline inclusion in epidermal and vascular plastids of the mature *Amaranthus* leaf. *J. Electron Microsc.* 27:141-143.

■短 報■ 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ポリ酸塩の欠損部位を新しい化学反応空間に利用した ポリ酸塩ベースの触媒設計

野宮健司^{1,4} 力石紀子¹ 栗嶋 進² 長谷川 剛² 木村卓央³

Preparation of Acid and Oxidation Catalysts Utilizing Lacunary Sites of Polyoxometalates as Useful Chemical Reaction Field

Kenji Nomiya^{1,4}, Noriko Chikaraisi Kasuga¹, Susumu Kurishima²,
Takeshi Hasegawa² and Takao Kimura³

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

² R&D Center, KIMOTO CO., LTD, Chuou-ku, Saitama-City, Saitama 338-0013, Japan

³ Technical Development Division, Tokuriki Chemical Research Corporation, Sagami Factory, Yamato-City, Kanagawa 242-0012, Japan

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

Abstract: Three olefin-containing organosilyl derivatives supported on the mono-lacunary Dawson polyoxometalate (POM), $[\alpha_2\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}\{\text{(RSi)}_2\text{O}\}]^{6-}$ ($\text{R} = \{\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\}$; **1**, $\{\text{CH}_2=\text{CHCOO}(\text{CH}_2)_3\}$; **2** and $\{\text{CH}_2=\text{CH}\}$; **3**), as Me_2NH_2 salts, which can act as precursors for the immobilization of the POMs in polymer networks, were obtained by the 2:1 molar ratio reaction of the organosilyl precursor $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ with $\text{K}_{10}[\alpha_2\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}] \cdot 19\text{H}_2\text{O}$ in acidic $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ mixed solutions. These compounds were unequivocally characterized with complete elemental analysis, TG/DTA, FT-IR, solution (^1H , ^{13}C , ^{29}Si , ^{31}P , and ^{183}W) NMR, and X-ray crystallography. X-ray crystallography revealed that the two organic chains connected through an -Si-O-Si- bond were grafted onto the mono-lacunary site of the POM. The four-coordination of each Si atom was attained with the bridging oxygen atom, the terminal organic group R in the organosilyl group, and two of the four oxygen atoms in the mono-lacunary site of the POM. In the solid-state, two POMs (**1**, **3**) were represented as C_1 symmetry, on the other hand, **2** could be depicted as an approximate C_s symmetry. In the solution, all POMs were represented as C_s symmetry owing to mobility of the organic chains.

Keywords: polyoxometalate, lacunary site, organosilyl group, immobilization, acid-catalyst

序論

分子性の金属酸化物クラスターであるポリ酸塩 (polyoxometalate) は均一系の酸触媒、酸化触媒として広く研究されている。均一系で行われている触媒反応を不均一系化することができれば、触媒の分離、回収、再生が容易になる。そのためポリ酸塩の不均一系化に関する研究は非常に関心が高い²⁾。報告されている固定化方法は「物理的相互作用」、「イオンの相互作用」、「配位結合」を利用した固定化などに大別される。しかし、物理的相互作用による固定化では溶液と接したときにポリ酸塩の流出の問題があり、イオンの相互作用による固定化ではフリー

アシッド型のポリ酸のプロトンを残したまま固定化ができない、配位結合による固定化では活性サイトを固定化に利用しているため触媒活性が低下してしまうなどの問題がある。いずれの方法もフリーアシッド型ポリ酸の不均一系酸触媒の調製には適していない。一方、ラジカル重合が可能な反応性二重結合を含む無機-有機ハイブリッド化合物はそのポリ酸塩をフリーアシッド型に変えることが出来れば、ポリ酸塩の酸性度を低下させることなく固定化に利用することができる。本報告では末端にオレフィン (メタクリル基、アクリル基、ビニル基) を含む無

表 1 オレフィン含有ハイブリッド型ポリ酸塩

$(\text{Me}_2\text{NH}_2)_6[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}\{\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}\}_2\text{O}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$(\text{Me}_2\text{NH}_2)_6[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}\{\text{CH}_2=\text{CHCOO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}\}_2\text{O}] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2
$(\text{Me}_2\text{NH}_2)_6[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}(\text{CH}_2=\text{CHSi})_2\text{O}] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3

機-有機ハイブリッド Dawson 型ポリ酸塩を合成した(表1)。フリーアシッド型の前駆体である水溶性の Me_2NH_2 塩の合成を行い、それぞれの結晶構造を明らかにした³⁾。

結果と討論

無機-有機ハイブリッド型ポリ酸塩の合成

合成法の例としてメタクリル基を含むハイブリッド型ポリ酸塩 (1) の合成方法を示す(図1)。

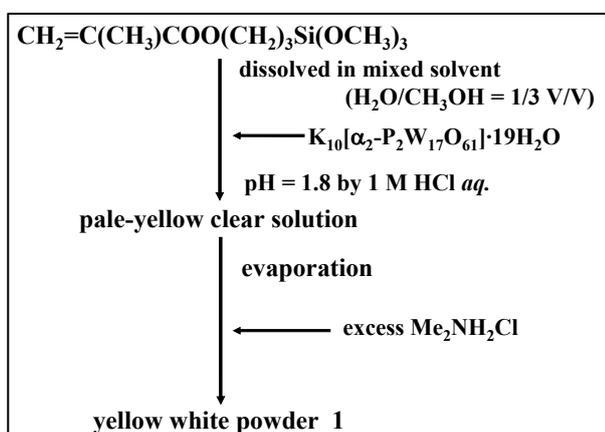


図 1. メタクリル基含有ポリ酸塩の合成法。

メタクリル基を含むシランカップリング剤を水とメタノールの混合溶媒に溶解し、別途合成した Dawson 型一欠損種 $\text{K}_{10}[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}] \cdot 19\text{H}_2\text{O}$ をその溶液に加えた。塩酸を加えて反応溶液の pH を 1.8 に調整することでシランカップリング剤とポリ酸塩の欠損部位の末端酸素を反応させ、メタクリル

基を含む有機鎖をポリ酸塩中に導入した。反応溶液を濃縮し、過剰量のジメチルアンモニウムクロリドを加えることで Me_2NH_2 塩として、1 を収率 81.6% で得ることができた。アクリル基、ビニル基を有する化合物 (2, 3) についても同様の方法で合成を行い、それぞれ 72.1, 73.1% の収率で得ることができた。結晶化はメタノール又はエタノールを外部溶媒に使用した vapor diffusion 法により行った。キャラクタリゼーションは(³¹P, ²⁹Si, ¹⁸³W, ¹H, ¹³C) NMR、FT-IR、TG/DTA、全元素分析、単結晶 X 線構造解析で行った。

キャラクタリゼーション

得られた化合物の単結晶 X 線構造解析の結果を示す(図2)。R 値はそれぞれ 6.23 % (1), 6.78 % (2), 13.77 % (3) であった。ポリ酸塩の構造は一欠損 Dawson 型ポリ酸塩 1 つに対して 2 つのオルガノシリル基が導入された 1 : 2 型構造であった。導入されたオルガノシリル基は Si-O-Si 結合により架橋されてポリ酸塩の欠損部位に導入されていた。結晶状態でのポリアニオン全体としての対称性は有機鎖の配向により異なり、1 および 3 では C_i 対称、2 では C_s 対称となっていた。

また、1, 2 については、導入されたオルガノシリル基中の Si-O-Si の結合角がそれぞれ 1 (131.2°), 2 (125.9°) であり、すでに報告されている Keggin 型三欠損種の化合物 $[\alpha\text{-PW}_9\text{O}_{34}(\text{tBuSiO})_3(\text{SiCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)]^{3-}$ (173.7°)⁴⁾ と比較して、鋭角な角度でポリ

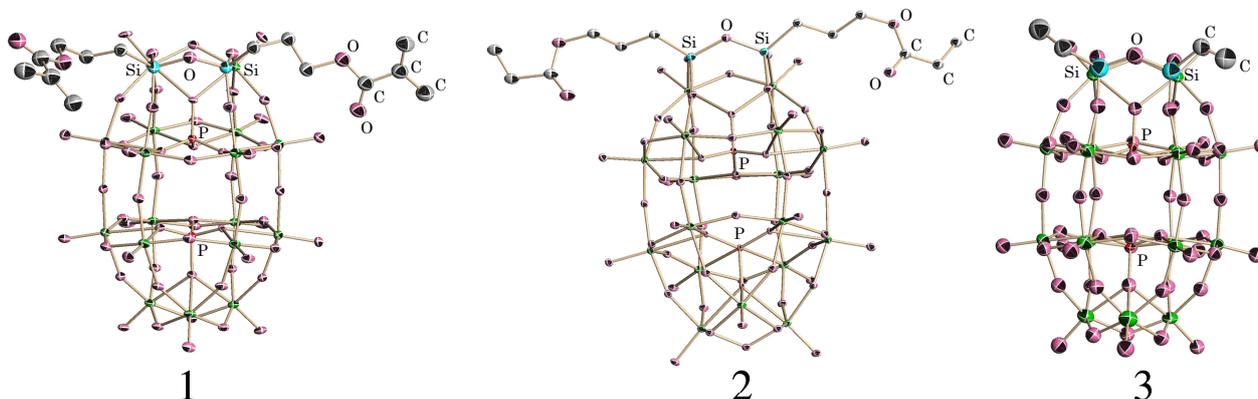


図 2. 化合物 1~3 の分子構造。

酸骨格に組み込まれていた。

10^{-3} - 10^{-4} torr で一昼夜真空乾燥後に測定した 3 つの化合物 1・3 の全元素分析および TG/DTA の測定結果より、それぞれの組成を表 1 のように決めた。この結果は単結晶 X 線構造解析の結果と対応していた。KBr 法による FT-IR の結果、3 種類の化合物で Dawson 構造に基づく吸収 (700 - 1200 cm^{-1}) が確認された。さらに導入されたオレフィンの二重結合に基づく吸収が 1400 cm^{-1} 付近に観測された。1, 2 ではメタクリル基、アクリル基の $\text{C}=\text{O}$ に基づく吸収が 1700 cm^{-1} 付近に観測された。

D_2O 中で測定した ^{31}P NMR では、すべての化合物で Dawson 骨格中の非等価な 2 つの P 原子に基づく共鳴のみが観測されており、得られた化合物が単一種として得られたことを確認した。また、すべての化合物において、前駆体の Dawson 型一次損種 ($[\alpha_2\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}]^{10-}$) と比較すると、欠損部位に近いほうの ^{31}P 共鳴ピーク (-6.9 ppm) が大きく高磁場側にシフトして約 -10.3 ppm 付近に観測された。これはオルガノシリル基がポリ酸塩に導入された効果による。DMSO- d_6 中で測定した ^{29}Si NMR ではすべて一本線スペクトルで観測された (-54.1 ; 1, -54.2 ; 2, -67.6 ; 3)。このことよりポリ酸塩中に組み込まれた 2 つの Si 原子は溶液中では等価な状態にある。また、3 のみが Si に直接結合しているビニル基の影響を受けて高磁場側に大きくシフトして観測された。

DMSO- d_6 中で測定した 1・3 の ^{183}W NMR の結果を図 3 に示す。すべての化合物で C_s 対称に基づくスペクトルが得られた。3 では低磁場側のピークが重なって 8 本線スペクトルで観測されたが、1, 2 では強度比 2:1:2:2:2:2:2:2 の 9 本線スペクトルで観測された。ピークの位置は各化合物とも大きな変化はなく有機鎖の違いによる影響は観測されていない。

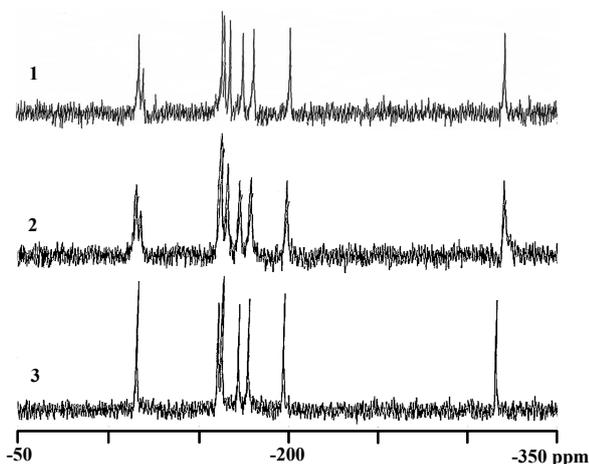


図 3. 化合物 1-3 の ^{183}W NMR.

い。溶液中の NMR 測定結果から、得られた 3 種類のポリ酸塩は溶液中では、有機鎖の運動性のため平均化されており、対称性はすべて C_s 対称であった。

また、 D_2O 中で測定した ^1H , ^{13}C NMR ではポリ酸塩中に導入された有機鎖に基づくピークがすべて観測されており、ポリ酸骨格内に有機鎖の導入がなされたことが確認された。これにより溶液中でも導入されたオルガノシリル基はポリアニオンから脱離することなく結合していることがわかる。

以上の結果より 3 種類のオルガノシリル基を含む新規無機-有機ハイブリッド型ポリ酸塩が合成された。

まとめ

反応性二重結合を含む有機鎖が導入された Dawson 型ポリ酸塩を 3 種類新たに合成した。単結晶 X 線構造解析より、それらの構造を決めた。それらは固体状態で有機鎖の配向により対称性が異なっていた。溶液中の各種 NMR 測定では、固体状態とは異なりすべて C_s 対称に基づくスペクトルが観測された。これは溶液中での有機鎖の運動性のためであると考察した。

今回合成した 3 種類の化合物はいずれもラジカル重合可能な二重結合を有しており、共有結合を介してポリ酸塩をポリマー中に固定化することが可能である。この方法は今までに提案されてきている固定化方法とは異なり、フリーアシッド型ポリ酸塩の酸性度を保持したまま固定化することが可能である。

謝辞

本研究は、研究課題「ポリ酸塩の欠損部位を新しい化学反応空間に利用したポリ酸塩ベースの触媒設計」として 2007 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成を受けて行いました。

文献

- Hill CL, Ed. (1998) Polyoxometalates *Chem. Rev.* **98**: 1-390
- Kato CN, Tanabe A, Negishi S, Goto K and Nomiya K (2007) An Efficient $\text{PMo}_{11}\text{VVO}_{40}^{4-}$ /Silica Material Having Cationic Ammonium Moiety: Synthesis, Characterization, and Catalytic Performance for Oxidation of Alcohols with Dioxygen *Chem. Lett.*, **34**: 238-239.
- Hasegawa T, Shimizu K, Seki H, Murakami H, Yoshida S, Yoza K and Nomiya K (2007) Polymerizable Inorganic-Organic Hybrid. Syntheses and Structures of Mono-Lacunary Dawson Polyoxometalate-Based Olefin-Containing Organosilyl Derivatives *Inorg. Chem. Commun.* **10**:

- 1140-1144.
4) Agustin D, Coelho C, Mazeaud A, Herson P, Proust A and Thouvenot R (2004) Synthesis and Spectroscopic Characterization of the Heterosilylated Anions $[PW_9O_{34}(tBuSiO)_3(SiR)]^{3-}$ (R =

-CH₃, -CH=CH₂, -CH₂CH=CH₂, -(CH₂)₄-CH=CH₂)
-X-ray Crystal Structure of $[nBu_4N]_3[PW_9O_{34}(tBuSiO)_3(SiCH_2-CH=CH_2)]$. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **630**: 2049-2053.

■短 報■

神奈川県真鶴に生息するクロフジツボの死殻に穿孔する
イシマテガイ *Leiosolenus curtus* (Bivalvia: Mytilidae) の殻形態

大和田正人^{1,2}

Shell form of *Leiosolenus curtus* boring into dead shells of *Tetraclita japonica*
in Manazuru, Kanagawa Prefecture, Japan

Masato Owada^{1,2}

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt125365@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: *Leiosolenus curtus* (Lischke, 1874) was collected from dead shells of *Tetraclita japonica* (Pilsbry, 1916) in Manazuru, Kanagawa Prefecture, Japan. It is known that *L. curtus* bores into limestone, sandstone, and mudstone, however, *L. curtus* boring into dead shells of *T. japonica* has not been reported. In this study, the shell form of *L. curtus* boring into dead shells was described, and compared with that of the standard *L. curtus* boring into calcareous sandstone. The shell size of the former is smaller, and the shell shape is more inflated and relatively spherical. In the latter, the calcareous encrustation, deposited on the periostracum, forms vertical folds around the ventral margin, but in dead shell-boring *L. curtus*, this is smooth. In *L. curtus* boring into calcareous sandstone, the relative growth equation showed that the shell length grew more rapidly than the shell height, and in *L. curtus* boring into dead shells, the proportions do not vary regarding shell growth. *Leiosolenus* has been classified on the basis of the shell form and calcareous encrustation. These two parameters, however, easily change according to the properties of the substratum. Thus, information on the substratum is also necessary for the classification of *Leiosolenus*.

Keywords: Mytilidae, boring bivalves, *Leiosolenus curtus*, *Tetraclita japonica*, morphology, biocorrosion

序論

神奈川県真鶴に生息するクロフジツボ *Tetraclita japonica* の死殻からイガイ科の穿孔性貝類であるイシマテガイ *Leiosolenus curtus* が採集された。イシマテガイは房総半島以南から九州にかけて分布し、潮間帯から水深約 20 m まで生息する。殻形は前後に長い葉巻型であり、二次殻と呼ばれる殻表の沈着物は後縁部で厚く、腹縁部では襞状になる。現在までに石灰岩、砂岩、泥岩に穿孔することが知られているが、クロフジツボの死殻に穿孔することは報告されていない¹⁻³⁾。そこで、本研究はクロフジツボの死殻に穿孔する個体の殻形態について記載し、石灰質砂岩に穿孔する標準的な個体と比較した。

材料と方法

神奈川県真鶴町白磯に生息するクロフジツボの死殻から 26 個体、神奈川県大磯町照ヶ崎の石灰質砂岩から 13 個体のイシマテガイを採集し、産状を観察した (図 1)。採集した個体をデジタルマイクロスコープ (VHX-600, KEYENCE) で撮影し、殻長 (L)、殻高 (H)、殻幅 (W) を万能投影機 (V-12A, Nikon) で測定した。測定した値から殻高に対する殻長の比率 (L/H) と殻幅に対する殻高の比率 (H/W) を計算し、3D-shell diagram を作成した。さらに、殻高に対する殻長の相対成長式を求めた。

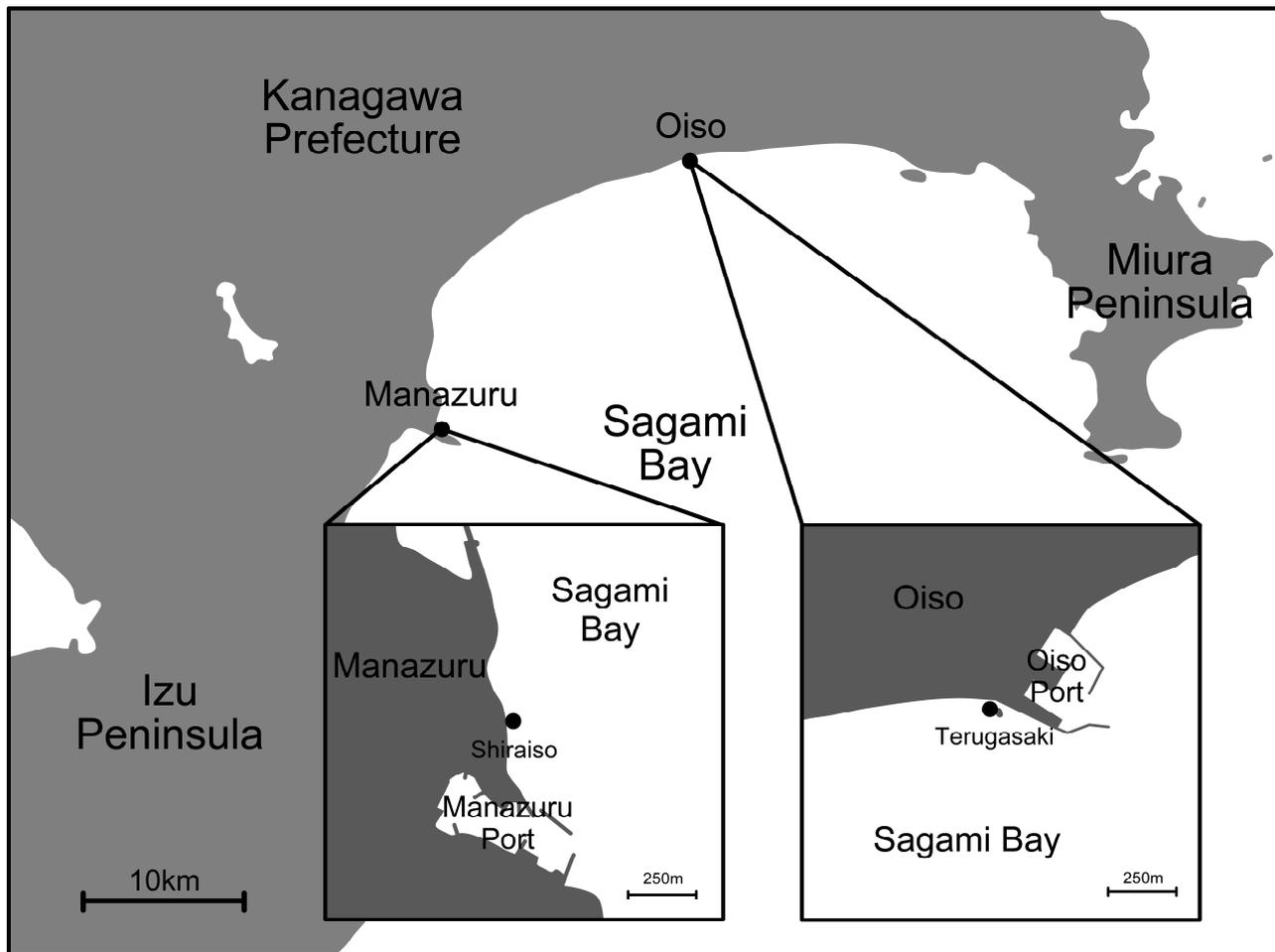


図 1. イシマテガイの採集場所. 採集した場所を●で示した. 枠内ではより詳細な地図で採集場所を示している.

結果

産状

神奈川県真鶴町白磯に生息するクロフジツボは火成岩に固着していた。火成岩には生きた個体だけではなく死んだ個体も固着しており、さらにその死殻に固着した個体も見られた。殻径は最大で約 4 cm、殻厚は最大で約 1 cm であった。イシマテガイは死殻にのみ穿孔していた。穿孔の方向は一定ではなかったが、死殻から突出する個体は見られなかった。神奈川県大磯町照ヶ崎の石灰質砂岩は周囲 20 m 以上の大きな堆積岩であった。そこに穿孔するイシマテガイの方向は一定ではなかったが、石灰質砂岩から突出する個体は見られなかった。

殻形態

クロフジツボの死殻に穿孔する個体の殻長は 6.9–26.8 mm、殻高は 3.1–10.2 mm、殻幅は 3.0–9.4 mm であった。石灰質砂岩に穿孔する個体の殻長は 13.9–51.0 mm、殻高は 5.7–17.8 mm、殻幅は 5.3–15.9 mm であった。クロフジツボの死殻に穿孔する個体の体サイズは石灰質砂岩に穿孔する個体よ

りも小さく、最も体サイズの大きい個体どうしを比較すると殻長で約 2 倍の差がある (図 2)。クロフジツボの死殻に穿孔する個体の L/H は 2.18–2.72、 H/W は 0.98–1.12 であった。石灰質砂岩に穿孔する個体の L/H は 2.42–3.15、 H/W は 1.03–1.22 であった。クロフジツボの死殻に穿孔する個体の殻体はよく膨らみ、殻形は石灰質砂岩に穿孔する個体よりも球形に近い (図 3)。腹縁部の二次殻は石灰質砂岩に穿孔する個体では襞状であったが、クロフジツボの死殻に穿孔する個体では平滑であった。殻高に対する殻長の相対成長式はクロフジツボの死殻に穿孔する個体では $y=2.290x^{1.027}$ 、石灰質砂岩に穿孔する個体では $y=1.848x^{1.154}$ であった。クロフジツボの死殻に穿孔する個体では成長に伴うプロポーションの変化はほとんどないが、石灰質砂岩に穿孔する個体では成長に伴って殻長が相対的に大きくなる (図 4)。

討論

3D-shell diagram はクロフジツボの死殻に穿孔する個体の殻体が石灰質砂岩に穿孔する個体に比べてよく膨らむことを表している。さらに、殻高に対す

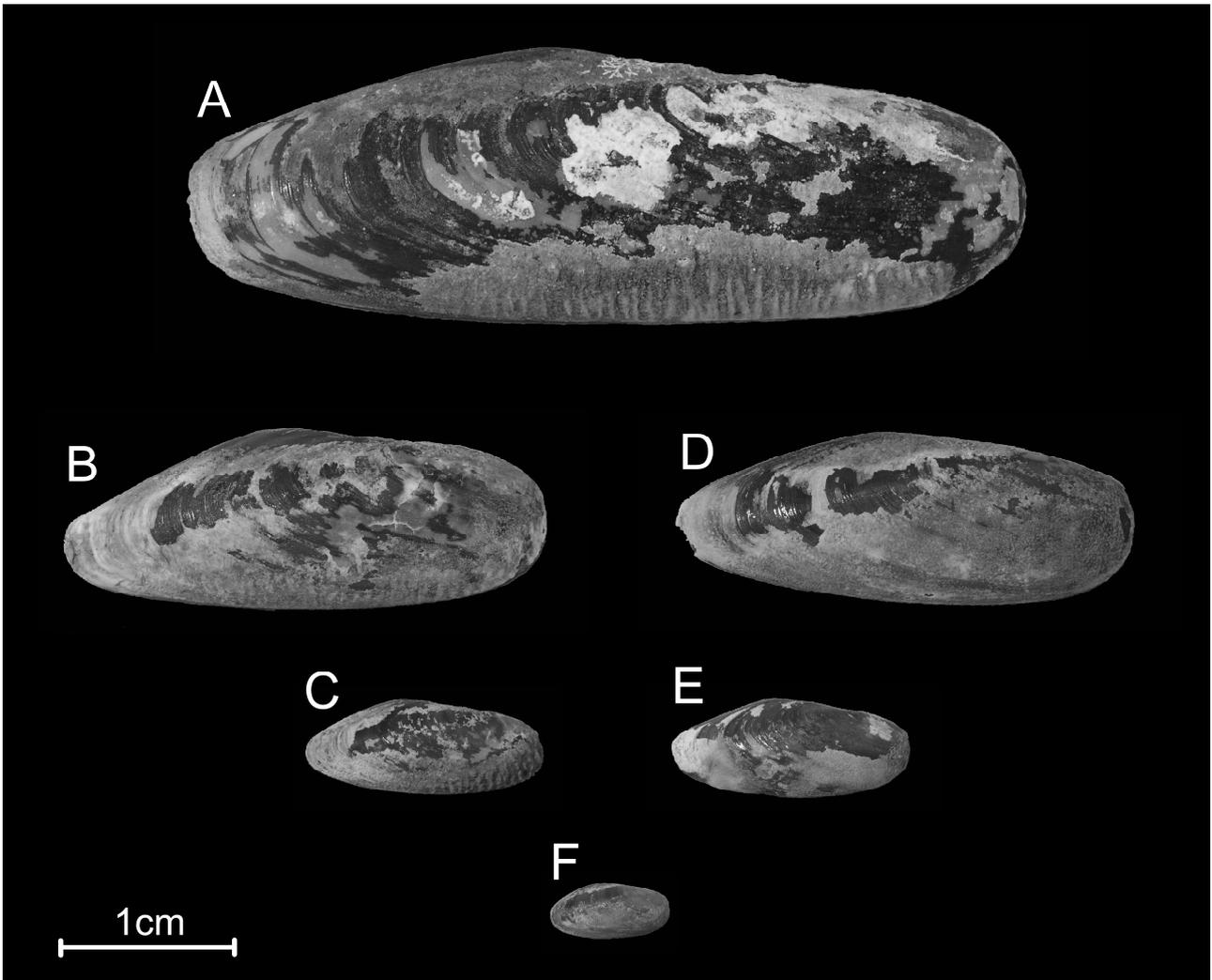


図2. イシマテガイの殻体. 代表的な個体の左殻を示した. A, B, C: 石灰質砂岩に穿孔する個体. D, E, F: クロフジツボの死殻に穿孔する個体.

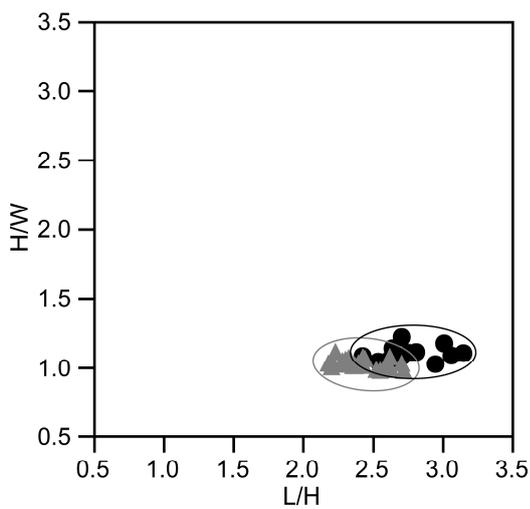


図3. 3D-shell diagram. 左下にプロットされる個体ほど球形に近い殻形を持ち, 右上にプロットされる個体ほど小判形に近い殻形を持つ. ●: 石灰質砂岩に穿孔する個体. ▲: クロフジツボの死殻に穿孔する個体.

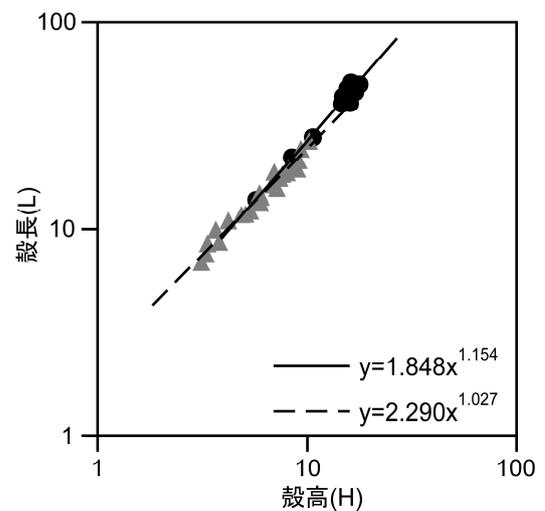


図4. 殻高に対する殻長の相対成長式. 実線は石灰質砂岩に穿孔する個体の相対成長式を示し, 破線はクロフジツボの死殻に穿孔する個体の相対成長式を示す. ●: 石灰質砂岩に穿孔する個体. ▲: クロフジツボの死殻に穿孔する個体.

る殻長の相対成長式はクロフジツボの死殻に穿孔する個体の殻形は成長しても変化しないことを示している。したがって、クロフジツボの死殻に穿孔する個体は比較的膨らみの強い幼貝の殻形を保ったまま成長すると考えられる。しかし、体サイズは石灰質砂岩に穿孔する個体に比べて極めて小さい。

イシマテガイは基盤に含まれるカルシウムを溶解することで穿孔するため、カルシウム含有量の少ない火成岩には穿孔できない^{4, 5)}。また、クロフジツボの死殻は基盤としては非常に薄いため、そこに穿孔する個体はそのまま成長するとやがて基盤から突出してしまう。基盤から突出した個体はすぐに捕食される。したがって、クロフジツボの死殻に穿孔する個体は殻長の成長に強い制限を受ける。殻長の成長に制限を受けた場合、殻体の膨らみを増すように成長することで体サイズを増加できる。クロフジツボの死殻に穿孔する個体は殻長の成長を殻高と殻幅に割り振ることで体サイズを増加すると考えられる。しかし、殻高と殻幅は殻長から独立して自由に成長できない。クロフジツボの死殻に穿孔する個体の体サイズが石灰質砂岩に穿孔する個体に比べて小さいのはそのためだろう。

イシマテガイ属は基盤を穿孔するときに自分の殻体も溶解してしまうことがある。殻体の溶解は殻皮に損傷のある箇所で行われ、殻皮の損傷は基盤との摩擦で起こる。二次殻には殻皮を摩擦による損傷から防御する機能があると考えられている (Owada, 未発表データ)。殻皮の損傷はイシマテガイが溶解できない鉱物を多く含む基盤ほど大きい。石灰質砂岩

には溶解できない鉱物が多く含まれており、そこに穿孔する個体の二次殻はそれらと擦れることで襞状になると考えられる。クロフジツボの死殻に穿孔する個体の二次殻が平滑なのは、そこには溶解できない鉱物がほとんど含まれていないためだろう。

イシマテガイ属の種分類は殻形と二次殻の形態に基づいて行われている。しかし、殻形や二次殻は穿孔する基盤の性質によって大きく変化する。今後は基盤の性質についても十分に考慮する必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり、神奈川大学理学部生物科学科准教授の金沢謙一先生、東京大学名誉教授の速水格先生から終始ご指導とご鞭撻を頂きました。また、神奈川大学理学部生物科学科金沢研究室の大学院生の皆様から有用なコメントを頂きました。この場を借りてお礼を申し上げます。

文献

- 1) 波部忠重 (1977) 日本産軟体動物学, 二枚貝/掘足類. 北隆館, 東京.
- 2) 肥後俊一, 後藤芳央 (1993) 日本及び周辺地域産軟体動物総目録. エル貝類出版局, 大阪.
- 3) 黒住耐二 (2000) イガイ科. 日本近海産貝類図鑑. 奥谷喬司編. 東海大学出版, 東京. pp.429-436.
- 4) Bolognani-Fantin AM and Bolognani L (1979) The pallial gland of *Lithophaga lithophaga* (L.): a histochemical and biochemical approach of the rock boring problem. *Malacologia*. 18: 587-589.
- 5) Jaccarini V, Bannister WH and Micallef H (1968) The pallial glands and rock boring in *Lithophaga lithophaga* (Lamellibranchia, Mytilida). *J. Zool. Lond.* 154: 397-401.

■ 報告書 ■

神奈川大学湘南ひらつかキャンパスで見られる草木の染色体を
観察してみようプロジェクト平成 19 年度報告

安田政尚¹ 茂木亜矢子¹ 安積良隆^{1,2}

2007 Report of the “Let’s Observe Plant Chromosomes Found
Shonan Hiratsuka Campus, Kanagawa University” project

Masanao Yasuda¹, Ayako Mogi¹ and Yoshitaka Azumi^{1,2}

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Our laboratory (Azumi laboratory, Kanagawa University) started the project “Let’s Observe Plant Chromosomes Found on Shonan Hiratsuka Campus, Kanagawa University” in April 2007. The objective of this project is to introduce a hidden part of plants, meiotic chromosomes, to the public and to share our interest in plants with the general public. As children are increasingly becoming disinterested in science, we hope that this project will increase their interest in nature and science. This is the first report of our activity. So far, we have succeeded in observing all stages of meiosis in three kinds of plants, *Brassica rapa* L., *Lamium amplexicaule* L., and *Solanum nigrum* L.

Keywords: plant chromosome, meiosis, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorescent microscope

序論

神奈川大学湘南ひらつかキャンパスは平塚市の西北部に位置し、自然豊かな環境にある。このキャンパスには様々な草木が生育している。神奈川大学・理学部・生物科学科・安積研究室は、この環境を生かし、植物に対する関心を高め、より深く理解するきっかけを作るべく、身近な植物の染色体を見るというプロジェクトを平成 19 年 4 月より展開することにした。染色体は細胞が分裂する時に観察されるが、細胞分裂には体細胞分裂と減数分裂とがある。減数分裂の方が多くの識別できるステージがあり、変化に富んでいる。全てのステージを観察しようとするとなかなか難しい面もあるが、より多くのステージを観察することができれば、その喜びはひとしおではないかと思われる。減数分裂を行う細胞は、開花する前の花の雄蕊や雌蕊の中にあるので、蕾の見られる時期にしか材料を手に入れることはできないが、冬以外の季節ではいずれかの植物の蕾を入手し、実験を行うことができるので、減数分裂期の染色体を観察することにした。

減数分裂は、子の世代の染色体と親の世代の染色

体の数を一定に維持し、有性生殖を行う生物に必須の過程である。生物にとって危険な行為である染色体数の半減を実行しつつ、生物はこの過程を経ることによって、配偶体を形成する。減数分裂によって生物は有性生殖が可能になり、その種における多様性もたらされた。

植物の雄蕊を構成する葯では、花粉母細胞が成熟すると減数第一分裂と第二分裂を連続的に行い、1 個の花粉母細胞 (2n) から 4 個の花粉小胞子 (n) が作られる。減数分裂の 2 つの分裂はそれぞれ前期、中期、後期、終期からなり、第一分裂前期はさらに 5 つのステージに細分され、減数分裂全体で 12 ステージに分けられる。第一分裂前期のレプトテン期 (細糸期) で細い糸状の染色体が見え始め、続くザイゴテン期 (合糸期) では相同染色体同士がペアリングし始め、ペアリングした部分がレプトテン期より太い糸状の染色体として見られる。ペアリングした部分では相同染色体同士がシナプトネマ構造を挟んで並走している。そして、パキテン期 (太糸期) ではシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が互

いに端から端まで密着する。さらに太い糸状の染色体が見られ、ディプロテン期（複糸期）にはシナプトネマ構造が崩壊するが、キアズマ（交叉）によって連結が保たれた二価染色体の凝縮が起こる。ディアキネシス期（移動期）に染色体の凝縮がほぼ完了し、連結された状態の n 個の二価染色体が赤道面へ移動を始める。第一分裂中期に赤道面への二価染色体の整列が完了する。第一分裂後期に二価染色体を構成する相同染色体は分離し、互いに別々の極への移動を開始する。第一分裂終期に n 個の染色体を持つ 2 個の娘核が形成され、第二分裂へ移行する。第二分裂では各々の染色体を形成する姉妹染色体に分離が起こり、第一分裂で形成された娘核のそれぞれの染色体が分裂し、最終的に 1 個の母細胞から 4 個の娘細胞が生じる。さらに詳しいことは成書¹⁻³⁾を参照していただきたい。

植物では上記のような減数分裂期の染色体の観察が古くから行われてきたが、このような染色体の挙動や減数分裂の進行を制御する仕組みについては長らく未解決の問題であった。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) がモデル植物に採用されて以来、植物でも分子生物学的・分子遺伝学的手法が取り入れられるようになり、植物の減数分裂に関しても多くの分子レベルでの研究が行われるようになってきた⁴⁾。その結果として減数分裂期の相同組換えや対合に必要な遺伝子、あるいはそれらの遺伝子の産物の働きが理解されるようになってきている⁵⁻⁷⁾。

旧来の染色体の観察法に加え、植物染色体の観察・解析を行うための新たな方法も開発されてきている。消化展開法もその方法の 1 つである⁸⁾。花粉母細胞の細胞壁をサイトヘリカーゼなどの酵素を用いて消化した後、スライドガラスに貼り付けると、平面的で染色体同士の重なりが少ない標本を作製することができ、鮮明で再現性の高い染色像が得られる。DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) は紫外線の照射によって励起され、青い蛍光を発する。特に AT を豊富に含む DNA 二重螺旋の小さな溝に特異的に結合し、染色体以外の細胞構成要素にはほとんど結合せず、染色体のみを鮮明に染色することができる。染色条件が簡単で熟練を要せず、誰にでもでき、失敗の少ない染色法である。さらには消化展開された染色体上の個々の領域を蛍光プローブで識別し、追跡調査するための FISH (fluorescent *in situ* hybridization) 法なども開発されている⁹⁾。

このような背景のもと、本研究室のシロイヌナズナを用いた染色体研究に日常的に使われている簡便な DAPI 染色法を用いて、キャンパス内で見られる

身近な植物の染色体を観察・報告し、植物への関心を高めてもらおうとプロジェクトを開始した。本報告は平成 19 年度安積研究室卒業研究生安田政尚と茂木亜矢子の卒業研究論文^{10, 11)}を編集し直したものである。

材料と方法

植物材料

神奈川県湘南ひらつかキャンパス内で見られる草木を研究対象とし、本年度はアブラナ (*Brassica rapa* L.)、ホトケノザ (*Lamium amplexicaule* L.)、イヌホウズキ (*Solanum nigrum* L.) を使用した。

染色体標本の作成は基本的に Ross らの方法⁸⁾に従っているが、以下に我々の方法を簡単に説明する。

固定

健康に生育している植物の花序（大きな花を形成する植物は蕾）を採取し、ファーマー液（エタノール：酢酸 = 3 : 1）に浸して、常温（25℃）で一晩放置した。その後は -30℃ で保存した。蕾の細胞内色素のため、ファーマー液の色が濃い色に変った場合は -30℃ で保存する前にファーマー液を入れ替えた。

減数分裂期の蕾の推定

ファーマー液で固定した花序を Mill-Q 精製水に 10 分間浸した。これを 2 回繰り返した後、実体顕微鏡下で花序から蕾（蕾が大きい場合は葯）を取り出した。スライドガラスに Mill-Q 精製水を適量（基本的には 5 μ l）垂らし、その中に蕾を置き、解体した。Mill-Q 精製水が乾かないうちに DAPI (1.5 $\times 10^{-3}$ μ g / μ l) (VECTOR) を 5 μ l 垂らし、その上にカバーガラスを置き、葯を軽く潰した。蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX60) を用いて、紫外線を照射し、観察を行った。未消化であるため立体的に見えるが、減数分裂期の細胞を探し、減数分裂を行っている時期の蕾の大きさを断定した。

消化

減数分裂期と考えられる蕾を含む花序を Mill-Q 精製水に 10 分間浸した。これを 2 回繰り返した後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) に 10 分間浸した。これを 2 回繰り返した後、花序を酵素液 (0.4% サイトヘリカーゼ、セルラーゼ、ペクトリアーゼ、800 u/ml β -グルクロニダーゼ) に浸し、15 分間の脱気を 2 回繰り返した。37℃ に 1 時間放置した後、再び 15 分間脱気を行い、再び 37℃ に 2 時間放置した。2 時間後にクエン酸緩衝液に 10 分間浸した。これを

2 回繰り返した後、4°Cで保存した。蕾の消化はこれを基本にして蕾の大きさと形状を考慮し、酵素液の濃度と消化時間を調整した。

染色体標本の作成と観察

実体顕微鏡下で消化した花序を解体し、蕾を取り出した。このとき、減数分裂期の観察を容易にするため、蕾の萼や花弁などを取り除き、なるべく葯だけを取り出した。予め 60% 酢酸で洗ったスライドガラスに 60% 酢酸を 5 μ l 垂らし、その中に取り出した蕾を置き、潰した。ただし、スライドガラスに垂らす 60% 酢酸は植物の蕾の大きさに応じて変更する。スライドガラス上の蕾の残渣を取り除いた後、スライドガラスを 45°Cのホットプレートの上に置いた。約 1 分後にスライドガラスをホットプレートから降ろし、予め氷冷しておいたファーマー液で数回にわけて洗った。ファーマー液で洗った後、スライドガラスを立て掛けて乾かした。乾いたスライドガラスに DAPI を 5 μ l 滴下し、カバーガラスを被せ、軽く潰して、四辺をマニキュアで封入した。

蛍光顕微鏡を用いて紫外線照射下で DAPI を励起させ、染色体を観察した。観察した染色体の中から減数分裂期の細胞を撮影する。

結果

神奈川県湘南ひらつかキャンパス内には春から秋にかけて、様々な種類の草本・木本の植物の花を見ることができる。本年度は実験材料として蕾を集め易い草本植物に挑戦してみた。

アブラナ *Brassica rapa* L.

湘南ひらつかキャンパスでは 4 月ごろアブラナ(ナタネとも呼ばれる)の黄色い花が、バスの通る外周道路沿いや圃場などに咲いているのをよく目にする。観賞用あるいは肥料とする油粕をとるために植えられたものであるが、学外でも様々なところで見られる非常に身近な植物である。アブラナの染色体を示した時、多くの人がアブラナの花を容易に思い浮かべることができ、親近感があって興味を抱きやすいのではないかと考え、これを観察してみることにした。アブラナはアブラナ科アブラナ属に属する。一般にアブラナ科の植物は 4 枚の花弁を持ち、それが十字架のような形をとることから、以前は十字花科と呼ばれていた。アブラナ属の黄色い花を咲かせる植物は、ナノハナと呼ばれている。

観察に適した蕾の大きさは、消化した状態で縦の長さがおおよそ 1.0 mm から 1.5 mm であった。また、同一の蕾内でも葯の大きさが異なり、蕾よりも葯の

大きさが指標となるとわかり、その大きさは縦の長さがおおよそ 0.7 mm から 1.1 mm であった。

減数第一分裂前期の細糸期に入ると糸状の染色体が観察され始めた。強く光っている領域があり、この部分は DAPI 染色だけでは確認できないがセントロメア領域ではないかと考えられる。合糸期になると、相同染色体間の対合が進行し、染色体の一本一本がはっきりと見え始め、太糸期には対合が完成する。この時期に相同染色体間の組換え反応が進んでおり、その結果として相同染色体間で乗り換え(交叉)が起きているものと考えられる。複糸期になると染色体の長軸方向の凝縮が著しくなり、相同染色体が交叉部分で連結されたまま、太く、短くなる。凝縮が完了する移動期には、幾つかの染色体で交叉している部分も観察することができた。第一分裂中期には 10 対の相同染色体が赤道面に整列し、後期には相同染色体が分離し、極への移動を開始した。終期には極への移動は完了し、染色体は脱凝縮して核を形成した。第一分裂終了時に細胞質分裂が起こる連続型の減数分裂と、細胞質分裂が起こらない同調型の減数分裂があるが、アブラナの場合は同調型であった。第二分裂前期には再び染色体は凝縮して見え始め、中期には 2 つの赤道面に整列した。後期には姉妹染色体が分離し極へ移動した。終期には 4 つの極に染色体が集合し、やがて核を形成した。この後、細胞質分裂が起こり、1 つの花粉母細胞中に 4 つの花粉小胞子が見られる四分子が形成された。

ホトケノザ *Lamium amplexicaule* L.

湘南ひらつかキャンパスでは 4 月から 6 月ごろにかけてあちこちで、ホトケノザの花が咲いているのを見ることができる。シソ科オドリコソウ属の越年草で、道端や田畑のあぜなどによく見られる雑草である。

ホトケノザの蕾は葉と茎の間に、茎を中心に円状に非常に小さな蕾が生じ、葉に包み込まれている。このため、植物体の先端を含めて 3 段までの蕾の周囲を取り巻く葉を含めて採取した。

ホトケノザでは減数分裂期の細胞を観察できる蕾の大きさは 0.6~0.8 mm であった。この蕾は葯が固定と消化した後では透明である。葯が赤色または白色を呈している蕾ではすでに花粉が形成されている。ホトケノザの花粉は楕円形で、緑色に呈した分厚い細胞壁が観察できる。

ホトケノザの花粉母細胞が行う減数分裂はアブラナと同様、一般的に知られている過程を経ることがわかった。細糸期では細胞の全体に非常に細い糸状の染色体が複雑に絡み合っていて広がり、合糸期と太糸

期を経て、太く見える対合した染色体部分が多くなり、細胞中央に集合していくように見えた。複製期では糸状の染色体がさらに太く、短くなっていった。移動期には高度に凝縮し、相同染色体が9つの対をつくっているのが観察された。第一分裂中期には相同染色体は赤道面に並び、後期に入ると次第に分離し、終期には分かれた染色体は別々の極へ到達した。第二分裂前期では、第一分裂終期の後半に起きる脱凝縮した染色体が、それぞれの娘核で再び凝縮が起こる。ただし、第二分裂中期で、それぞれの娘核の赤道面に並んだ。第二分裂後期では青い帯が十字に見られ、第二分裂終期で4つの娘核が形成された。ホトケノザの減数分裂も第一分裂後に細胞質分裂が起こらない同調型であった。

ホトケノザの染色体数は調べた限り文献には記載されておらず、今回得られた移動期から第一分裂後期の染色体像から、ホトケノザの染色体数を $2n = 18$ と断定した。

イヌホウズキ *Solanum nigrum* L.

ナス科ナス属の日本全土の畑や道端に自生する、丈が 20~60 cm に生長する一年草植物である。キャンパス内では夏から秋にかけてイヌホウズキの花を見ることができる。茎の途中に花序を出し、直径 7~10 mm の白い花を 4~8 個つける。萼は杯形で 5 裂し、花冠は白色、皿形で深く 5 裂し、反返る。開花した花の葯は黄色で雌蕊の柱頭を囲むように存在する。液果は直径 6~7 mm の球形で若いうちは緑色だが、成熟すると光沢のない黒色となる。有毒である。名前はホオズキやナスに似ているが役に立たないことに由来する。別名バカナスとも呼ばれる。

蕾の消化は基本とする酵素液の濃度で行った。未消化で蕾の花粉母細胞を観察することで、蕾 1.5~2.0 mm で減数分裂期の細胞を観察できた。蕾 1 個の細胞を広げた 1 枚のプレパラートから最大で 9 段階の減数分裂期ステージが観察できた。従って、1 個の蕾の中で花粉母細胞の減数分裂の進行は同調性が非常に低い。観察した細胞では、染色体数が多く、染色体同士が重なり、イヌホウズキの染色体数を断定することが困難であった。文献にはイヌホウズキの染色体は $2n = 24$ 、あるいは 72 と紹介されているが、実際に観察したイヌホウズキの染色体の数はおよそ $2n = 60$ であった。減数分裂期の染色体はアブラナやホトケノザと同様の減数分裂期の挙動を示した。減数分裂の進行は第一分裂前期の細糸期には複雑に絡み合った糸状の染色体が広範囲に広がり、太糸期にかけて次第に太くなり、ほぼ凝縮が完了した染色体を移動期に見ることができた。第一分

裂中期に赤道面に相同染色体が一行に並び、次第に分離を始め、2 個の娘核を形成した。第二分裂で姉妹染色体が分離し、4 個の娘細胞が形成された。イヌホウズキも第一分裂後に細胞質分裂が起こらない同調型であった。染色体像がぼやけている部分があり、通常の濃度での消化では完全には花粉母細胞の細胞壁を消化することはできなかった。

討論

湘南ひらつかキャンパス内にはおそらく何百種もの自生あるいは植栽された植物が生育していると思われる。本年度は 3 種類の植物について減数分裂の全ステージの染色体を観察することができた。この他にも、タイワンユリ (*Lilium formosanum* A.Wallace)、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、メマツヨイグサ (*Oenothera biennis* L.)、ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thunb)、ハハコグサ (*Gnaphalium affine* D.Don) などについても挑戦してみたが、全ステージを揃えるに至っていない。神奈川大学湘南ひらつかキャンパス内で採取したアブラナは染色体数が $2n=20$ であったことから(図 1)、日本在来種である *Brassica rapa* L. ver. *nippo-oleifera* であることを確かめることができた。ホトケノザに関しては、未同定と思われる染色体数を、本年度の研究により $2n = 18$ と断定することができた(図 2)。イヌホウズキに関しては、花粉母細胞の細胞壁の消化の難しさと染色体数の多さのため、染色体数の同定に至っていない(図 3)。文献的にも様々な染色体数が報告されており、ゲノムの倍数化が起こりやすい植物なのかもしれない。キャンパス内に生育しているイヌホウズキが単一の染色体数を保持するものかどうかに興味を持たれる。消化の条件を検討してより良い染色体像を得られるようにし、この点をさらに調べてみたいと考えている。

DAPI を用いた染色は、染色自体は非常に簡便であるが、観察するのに蛍光顕微鏡が必要である。中学校や高等学校の理科室には装備されていないのが普通ではないかと考えられるので、そういった場所でこういった実験を実施するのは難しいと思われる。しかし、最近では様々な大学で高大連携と称し高校などに開かれた態勢をとってきているので、実際に実験を希望する場合には大学と相談すると良いと思う。神奈川大学では 1 日体験入学、オープンキャンパス、学園祭などの時に多くの研究室が研究室を一般に公開し、話をする機会を設けている。大いに活用していただきたい。

DAPI 染色法は、蛍光顕微鏡といった機材が必要はあるが、誰がどの植物の染色体に対して実験を行っ

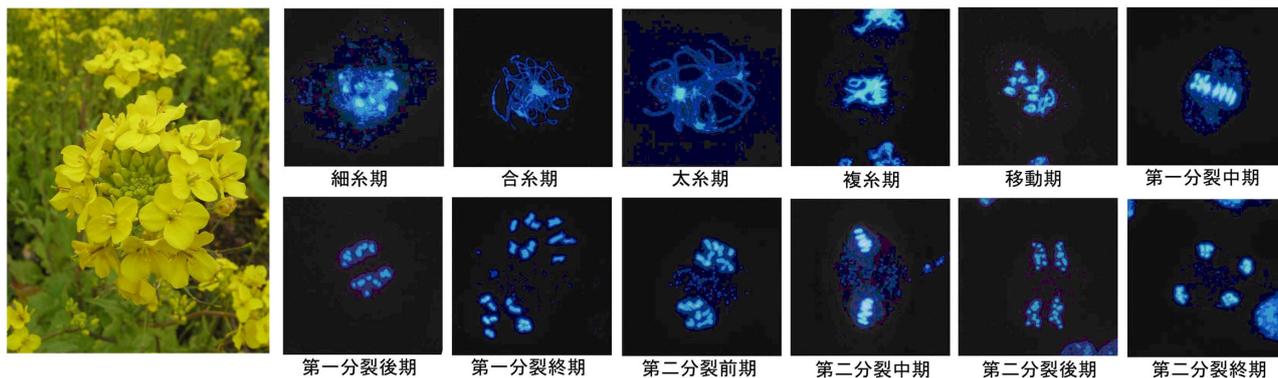


図 1. アブラナ *Brassica rapa* L. ver. *nippo-oleifera* の花と花粉母細胞で見られる減数分裂期染色体. 染色体の数は $2n=20$ であった.

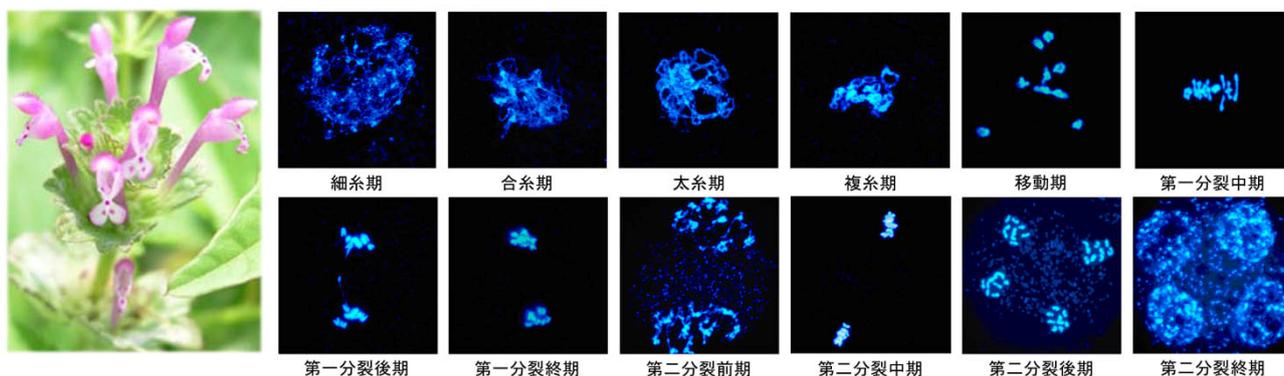


図 2. ホトケノザ *Lamium amplexicaule* L. の花と花粉母細胞で見られる減数分裂期染色体. 染色体の数は $2n=18$ で合った.

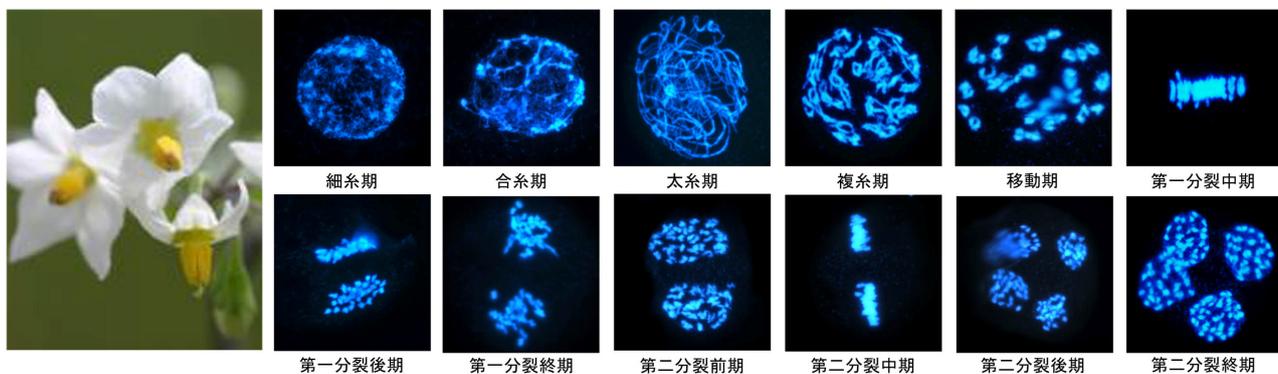


図 3. イヌホウズキ *Solanum nigrum* L. の花と花粉母細胞で見られる減数分裂期染色体. 染色体の数はおよそ 60 であった.

でも、同等の再現性の高い染色体像を得ることが出来る。従って、異なる実験者が異なる場所で実験を行ったとしても、結果を比較することが可能である。現段階では湘南ひらつかキャンパス内の植物を材料に実験を行っているが、将来的には多くの人にこのプロジェクトに参加していただき、様々な場所の可能な限り多くの植物の染色体を比較することができれば、もっともっと面白くなっていくものと期待している。

謝辞

本プロジェクトを支えてくれた平成 19 年度の安積研究室の卒業研究生の早川俊君、西久保研太君、近藤裕輔君、松本一恵さんに、この場を借りてお礼を申し上げます。

文献

- 1) 堀田康雄 (1988) 減数分裂と遺伝子組換え. 東京大学出版会, 東京.
- 2) Bhojwani SS and Bhatnagar SP; 足立泰二、丸橋亘

- 訳 (1995) *植物の発生学. 植物バイオの基礎*. 講談社, 東京.
- 3) 田中一郎 (1999) *よくわかる遺伝学 - 染色体と遺伝子*. サイエンス社, 東京.
 - 4) Azumi Y (2005) 挿入変異体から得られた植物の減数分裂の分子機構に関する最近の知見について. *Plant Morphology* **16**:31-60.
 - 5) Azumi Y, Liu D, Zhao D, 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.
 - 6) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**:206-216.
 - 7) Kuromori T, Azumi Y, Hayakawa S, Kamiya A, Imura Y, Wada T and Shinozaki K (2008) Homologous chromosome pairing is completed in crossover defective *atzip4* mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**: 98-103.
 - 8) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1999) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
 - 9) 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 Sci.* **5**: 1-6.
 - 10) 安田政尚 (2008) 2007年度植物の減数分裂期染色体画像データベースの構築. 神奈川大学理学部生物科学科卒業論文.
 - 11) 茂木亜矢子 (2008) 簡便な減数分裂期染色体観察法の開発に関する研究. 神奈川大学理学部生物科学科卒業論文.

■テクニカルノート■

走査型電子顕微鏡による花粉観察のための最適処理法の検討

重田英子¹ 岩元明敏^{1,2} 風間 真^{1,3} 鈴木季直^{1,3,4}

Examination of the Most Suitable Preparation Method for Pollen Observation by Scanning Electron Microscope

Eiko Shigeta¹, Akitoshi Iwamoto^{1,2}, Makoto Kazama^{1,3} and Suechika Suzuki^{1,3,4}

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

² Present address: Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Gakugei University, Koganei-City, Tokyo 184-8501, Japan

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

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

Abstract: To examine the most suitable method to prepare pollen for scanning electron microscope observation, several fixation methods and dehydration (or drying) methods were applied to *Arabidopsis* and lily pollen obtained from flowers before and after flowering. Light and confocal laser microscope observations revealed that, in both plants, pollen obtained before flowering was swollen and wet, while that obtained after flowering was shrunken and dry. For scanning electron microscopy, pollen was unfixed or fixed with 50% (eventually 100%) acetone, FAA (5% formalin with 50% ethanol and 5% acetic acid) or 6% glutaraldehyde solutions. It was then dried naturally in air or artificially by either critical point-dry or freeze-dry machines, respectively. The results indicated that, for scanning electron microscope observation of dry pollen, the most suitable treatment is natural drying without fixation. On the other hand, to observe wet pollen, the combination of FAA or glutaraldehyde fixation with artificial drying using either machines is preferable, and fixation with acetone is unsuitable.

Keywords: pollen, *Arabidopsis*, lily, preparation methods, scanning electron microscopy

序論

種子植物の生殖器官である花の雄蕊で形成される雄性配偶体の花粉の表面には、種や属によって異なるそれぞれに固有の微細構造的特徴が認められ、それらの植物を分類するための重要な形質の一つとなっている。特に、化石化した植物を対象とする古生物学分野では花粉の形態観察は種の同定に極めて有効であることが知られている。この分野を含め、花粉の外部形態観察は古くから光学顕微鏡で行われており、様々な観察のための試料処理法が開発されている¹⁾。一方、最近では、より高分解能で観察できる電子顕微鏡が花粉の微細構造研究に活用され、花粉の表面構造観察では走査型電子顕微鏡(以下、走査電顕)が用いられるが、観察のための試料処理法は十分に検討されていない。従来、いくつか

の方法が開発されてきたが、その多くは外壁しか残っていない化石化した花粉を対象としたものであり、現生植物の“生きた”花粉を観察する試料処理法を検討することが必要である。本学生物科学科では、2003年度から夏季休暇中に3年生対象の電子顕微鏡実習を行っており、自由な観察試料選択では高い頻度で花粉が取りあげられており、その都度、一般的な電顕観察用試料処理法で対応して来た。しかし、ここでも、“生きている”花粉をより自然の状態を観察できる方法を確立する必要があると感じ、今回、シロイヌナズナとテッポウユリの花粉を対象として最適となる試料処理法の検討を行った。

材料と方法

神奈川県理学部植物育成棟で栽培した野生型シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* Heynh. および市販のテッポウユリ *Lilium longiflorum* Thunb. から、開花前と開花後に花粉を採取した。

光学顕微鏡観察のため、花粉を小試験管内の100%グリセリン液に包埋し、水流アスピレーターによる脱気を施してからスライドガラスに載物し、カバーガラスで封じてプレパラートを作製した。グリセリン液への包埋直後と24時間後に光学顕微鏡(Olympus BH2)で観察した。

共焦点レーザー顕微鏡による観察のため、採取した花粉を0.1%のオーラミンOを含むリン酸緩衝液(pH 7.2)で蛍光染色²⁾し、スライドガラスに載物後にカバーガラスで封じ、プレパラートを作製した。プレパラート作製から24時間後に共焦点レーザー顕微鏡(Bio-Rad Radiance2100)で観察した。

走査電顕観察用の最適試料作製方法を検討するために、採集した花粉を数種の化学固定法と脱水(または乾燥)法との組み合わせた以下の6つの方法で処理した。

- (1) 無固定で自然乾燥
- (2) アセトン固定後に自然乾燥
- (3) FAA固定後に臨界点乾燥
- (4) FAA固定後に凍結乾燥
- (5) グルタルアルデヒド固定後に臨界点乾燥
- (6) グルタルアルデヒド固定後に凍結乾燥

花粉の化学固定には3つの方法を試みた。第1のアセトン固定法では、花粉を室温下で50%アセトンに浸潤して1分間超音波洗浄装置で処理し、800gによる遠心(5分間)分離後に100%アセトンに置換した。100%アセトンによる800gの遠心を各5分間で2回繰り返した後、沈澱中の花粉を濾紙上に回収した。第2の固定法では、FAA(ホルマリン5%、エタノール50%、酢酸5%)混合液を固定液とし、花粉を、室温下、12時間この液で処理した。第3の固定法では、透過型電子顕微鏡観察用試料の化学固定で一般的に良く使われるグルタルアルデヒド(以下GA)を用いた。リン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した6%GA液中に花粉を浸漬し、4℃下で12時間固定した。

脱水(または乾燥)にも次の3つの方法を試みた。第1の方法は自然乾燥法である。花粉を濾紙上に置き、室温下で1週間大気中に静置して乾燥させた。第2の方法として、走査電顕観察のために一般的に行なわれている臨界点乾燥法を用いた。無固定または化学固定された花粉のそれぞれをエタノール系列(50、60、70、80、90、95、99.5、100%; 各1時間)

で脱水し、更に12時間、100%エタノール中に置いた後、800gの遠心(5分間)で花粉を沈澱分離させ、エタノールと酢酸イソアミル(1:1)混合液で30分間処理した。その後、同条件の遠心を行ない、混合液を100%の酢酸イソアミルに置換し、再度遠心を繰り返して、酢酸イソアミルへの置換を完全にした。花粉を含む沈澱を少量(1ml)の100%酢酸イソアミルで懸濁し、30分後に臨界点乾燥装置(JEOL JCPD-5)で処理して乾燥させた。第3の方法として凍結乾燥法を用いた。前法と同じエタノール系列による脱水を行った後、同条件の遠心を行ない、エタノールとt-ブチルアルコール(1:1)混合液で30分間処理した。その後の処理も前法の酢酸イソアミルをt-ブチルアルコールに変えて同じように操作し、凍結乾燥装置(JEOL JFD-310)で処理して乾燥させた。

乾燥された試料は、走査電顕用試料台に両面テープを介して接着させ、イオンコーター(JEOL JFC-1100E)で白金をコーティングし、走査電顕(JOEL JSM840A)で観察した。

結果と討論

水を含む自然状態に近い花粉の形態

図1は、開花前(A、B)と開花後(C、D)に採集したシロイヌナズナの花粉をグリセリン液に包埋した直後と24時間後に観察した光学顕微鏡写真である。開花前の花粉は、グリセリン液包埋直後で殆ど自然の状態に近いもの(図1A)とグリセリン液包埋24時間後のもの(図1B)とで形状に違いはなく、直径およそ20 μ mの膨らんだ球形であった。一方、開花後では、グリセリン液包埋直後の花粉(図1C)は長楕円体であったが、グリセリン液包埋24時間後の花粉(図1D)は、開花前の花粉と同様に膨らんだ球形であった。花粉は葯の開裂によって空気中に放出されてから雌蕊の柱頭に達するまでは植物本体から水分供給を受けられないため、開花後の放出直前の葯内花粉は予め乾燥に耐えられるような形状を確保している。このことから、一般に、花粉自体には乾燥型と膨潤型があることが知られている。従って、開花後のグリセリン液包埋直後の花粉(図1C)は乾燥型の形状を示しており、一方、グリセリン液包埋24時間後の花粉(図1D)は液中で水分を吸収した膨潤型の特徴を示していると考えられる。開花前では、まだ十分な水分が供給されているため採集直後でも花粉は膨潤型を示したと考えられる。

図2は、開花前(A、B)と開花後(C、D)に採集したテッポウユリの花粉をグリセリン液に包埋した直後と24時間後に観察した光学顕微鏡写真である。シロイヌナズナの花粉とくらべると、膨潤型での花粉

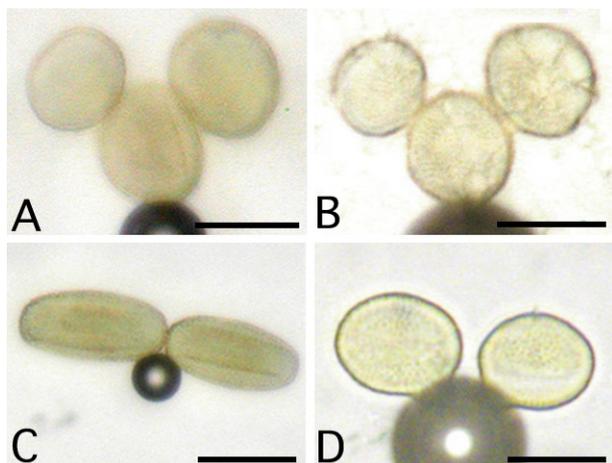


図 1. シロイヌナズナの花粉の光学顕微鏡像。開花前に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(A)と 24 時間後の花粉(B), および、開花後に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(C)と 24 時間後の花粉(D). スケール: 20 μm .

直径が 70–100 μm ではるかに大きいことと形状がやや膨らんだレンズ状を呈していることを除けば、それぞれの処理法による花粉の形態的特徴は同じであり、開花後に採集した花粉のうち、グリセリン液包埋直後の花粉のみが乾燥型を示した。

共焦点レーザー顕微鏡は、通常の光学顕微鏡より高分解能で走査電顕像に近いイメージを与える。図 3 は、開花後に採集したシロイヌナズナとテッポウユリの蛍光染色花粉の共焦点レーザー顕微鏡像である。いずれの花粉も、その表面には網目状の模様が明瞭に観察されており、これらの花粉外壁が網目型であることを示している。蛍光染色液中で十分に吸水しているため花粉は膨潤型であり、開花前に採集した花粉も同様の形態的特徴を示した。

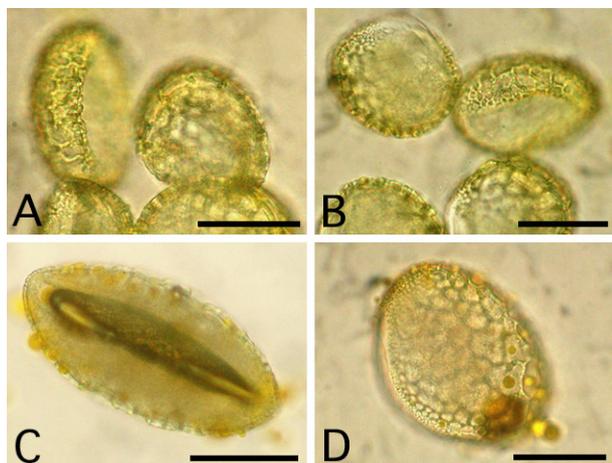


図 2. テッポウユリの花粉の光学顕微鏡像。開花前に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(A)と 24 時間後の花粉(B), および、開花後に採集し、グリセリン液に包埋した直後の花粉(C)と 24 時間後の花粉(D). スケール: 50 μm .

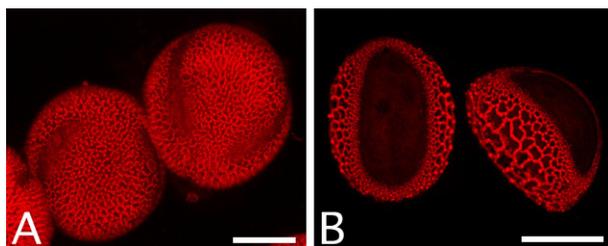


図 3. 開花後に採集したシロイヌナズナ(A)とテッポウユリ(B)の花粉の共焦点レーザー顕微鏡による蛍光染色像。スケール: 10 μm (A), 50 μm (B).

脱水(乾燥)後の花粉の形態

図 4 は、開花前に採集したシロイヌナズナの花粉に種々の固定法と脱水(乾燥)法を試みた結果を示す走査電顕像である。いずれの条件下でも花粉は光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で確認された膨潤型を示した。花粉は亜三角錐形の間口型で、3 つの発芽口を持ち、花粉型としては三溝型であった。また、前述したように外壁は網目型で、表面には明瞭な網目状の畝が観察された。開花後に採集したシロイヌナズナの花粉を同様に処理した結果(図 5)では、無固定で自然乾燥させた花粉(図 5A)のみが長楕円体の乾燥型形状を示し、他の処理法の組み合わせでは、観察された花粉はいずれも膨潤型であった。また、アセトン固定後に自然乾燥した花粉(図 5B)では変形が生じており、この処理法の組み合わせは、目的が膨潤型の花粉を観察する場合であっても適していないと考えられる。しかし、膨潤型の花粉を観察する場合であれば、他の 4 つの処理法の組み合わせはいずれも適用しうるものと考えられる。

図 6 は、開花前に採集したテッポウユリの花粉に種々の固定法と脱水(乾燥)法を試みた結果を示す走査電顕像である。花粉は、良く知られているように、レンズ状長楕円体形の間口型で、1 つの発芽口を持ち、花粉型としては単溝型であり、外壁は網目型であった⁴⁾が、無固定で自然乾燥した花粉(図 6A)では、外壁表面の網目が不明瞭で、表面を何らかの物質が覆っているように思われた。この物質は時に花粉表面を被覆しているとされるカロース³⁾である可能性が高い。花粉処理法の違いによってシロイヌナズナの場合よりも形状に多くの違いが生じていた。固定液が有機溶媒を含む場合には外壁表面の網目を構成する畝が不明瞭でやや変形しており、一部では崩壊しているような状態を呈し、網目を欠く開口部には表面に何らかの物質が粘着しているようであった(図 6B-D)。一方、固定に GA を用いたものでは形状は整っており、表面の網目および開口部の構造も明瞭であった(図 6E, F)。開花後に採集したテッポウユ

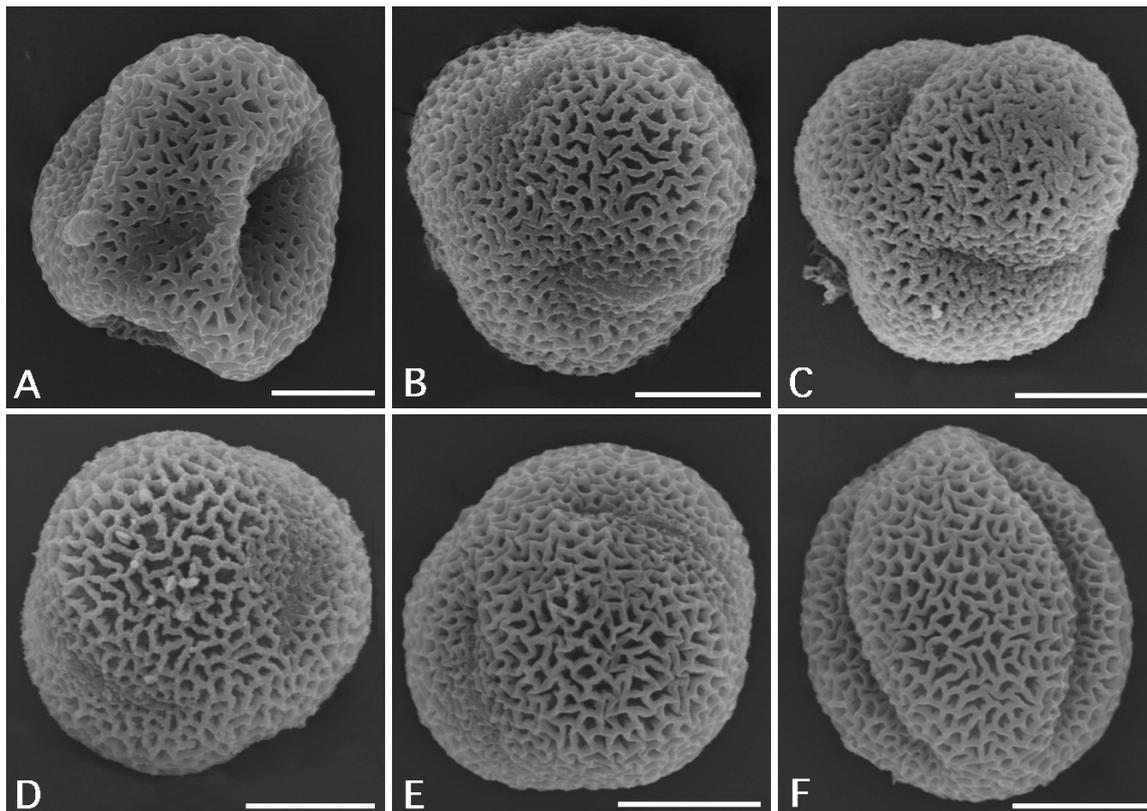


図 4. 開花前に採集したシロイヌナズナ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 5 μm.

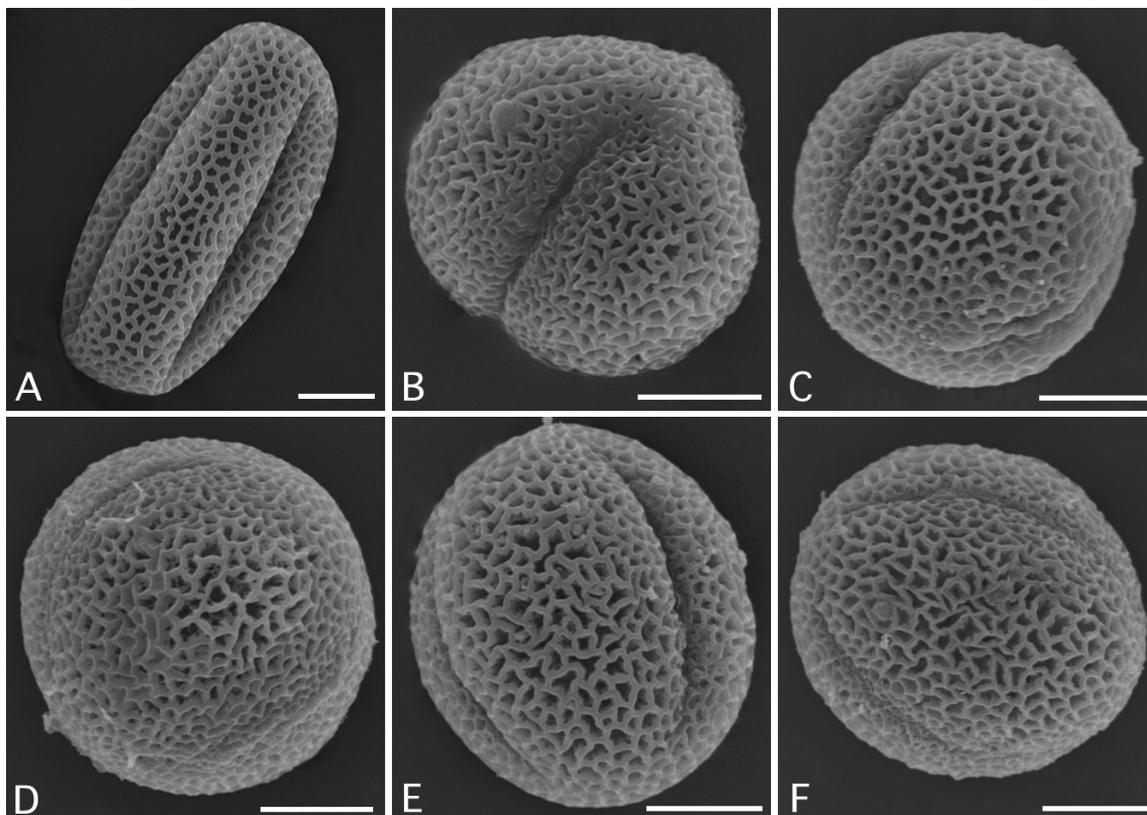


図 5. 開花後に採集したシロイヌナズナ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 5 μm.

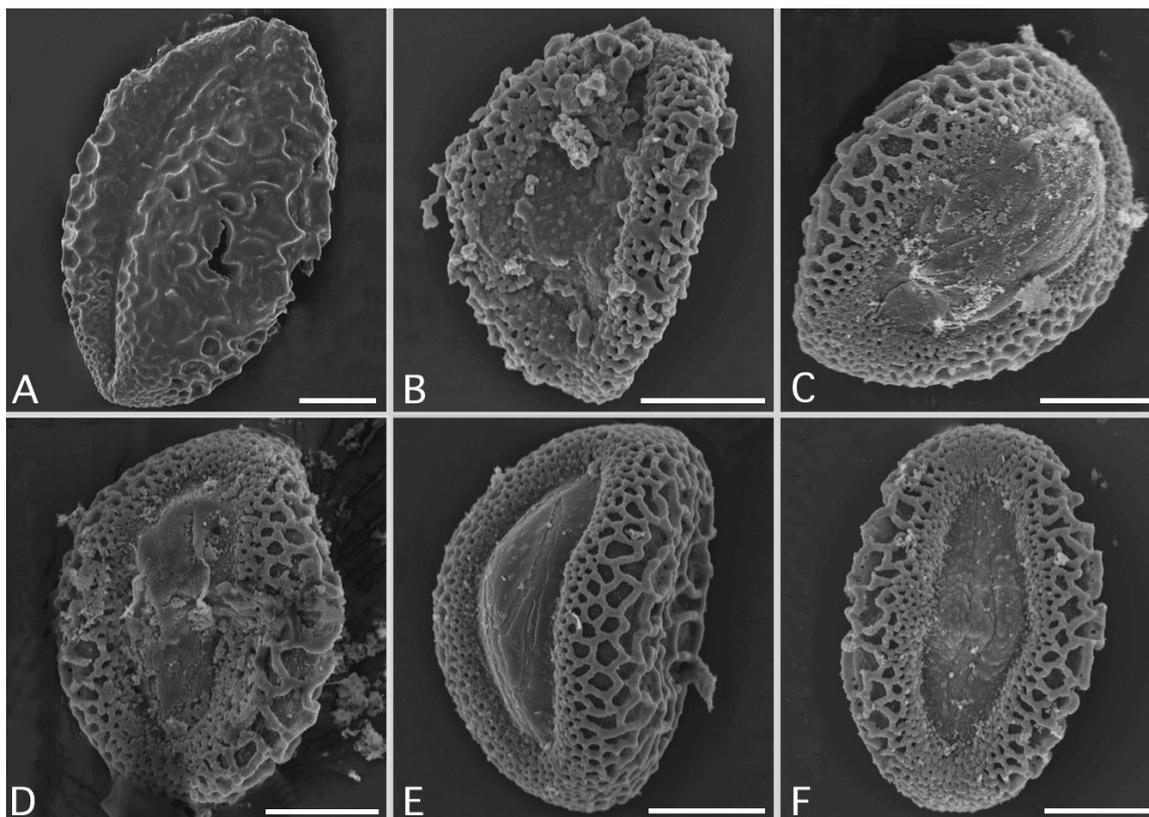


図 6. 開花前に採集したテッポウユリ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 20 μm .

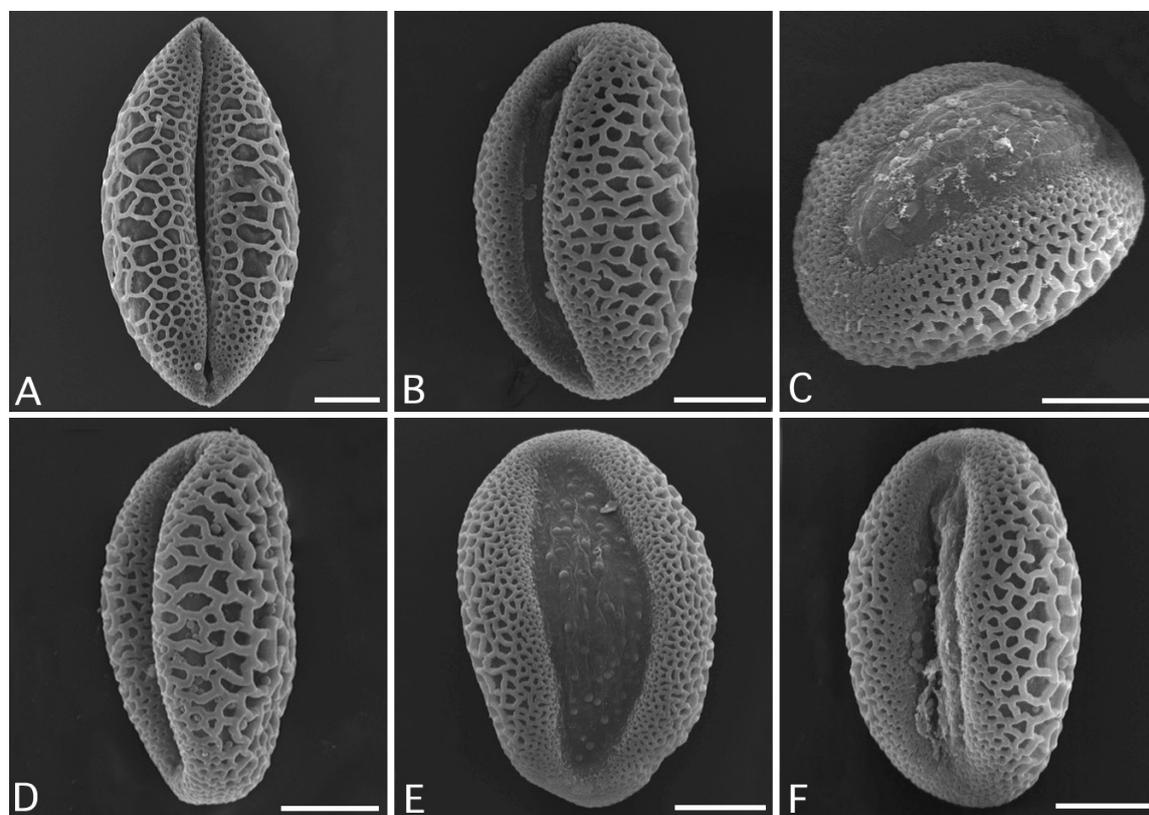


図 7. 開花後に採集したテッポウユリ花粉を種々の固定法と脱水(乾燥)法で処理した場合の走査電顕像. A. 無固定・自然乾燥. B. アセトン固定・自然乾燥. C. FAA 固定・臨界点乾燥. D. FAA 固定・凍結乾燥. E. GA 固定・臨界点乾燥. F. GA 固定・凍結乾燥. スケール: 20 μm .

りの花粉を同様に処理した結果(図 7)では、両端の尖鋭化が認められる無固定で自然乾燥させた花粉(図 7A)を除き、形状は概ねレンズ状長楕円体型であり、光学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察された結果と良く対応しており、特に FAA 固定後に臨界点乾燥を行なった花粉は膨潤型として最も良く一致していた。いずれの処理法の組み合わせでも表面の網目構造や開口部は明瞭に観察された。

最も自然に近い状態の花粉を観察するための固定法および脱水または乾燥法を検討するために、これらの手法の組み合わせで開花前の花粉(基本的に膨潤型)と開花後の花粉(基本的に乾燥型)を処理したが、結論として、乾燥型の花粉を観察する場合には、いかなる水溶液処理も好ましくなく、無固定で自然乾燥することが最も適していると考えられる。一方、膨潤型の花粉を観察する場合には、基本的に何らかの化学固定をすべきであるが、アセトン固定は適していないと考えられる。シロイヌナズナでは GA 固定が、テッポウユリではやや FAA 固定が良好な結果を与えており、最終的には花粉種ごとに最適手法の検討が必要になると思われる。膨潤型花粉の乾燥法については臨界点乾燥法と凍結乾燥法で質的に大

きな差違はなく、いずれの方法でも良い結果をもたらすと考えられる。今回の評価では、かなり低倍で観察された走査電顕像を対象にしたが、高倍率観察でどのような処理法の違いが認められるかについては今後の課題である。

謝辞

本研究の遂行にあたり、野生型シロイヌナズナの種子をご提供下さいました神奈川大学理学部安積良隆博士に感謝の意を表します。

文献

- 1) 日本花粉学会編 (2002) *花粉学事典* 第4版. 朝倉書店, 東京.
- 2) Nishikawa S-I, Zinkl GM, Swanson R, Maruyama D and Preuss D (2005) Callose (b-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* 5:22.
- 3) Fikimoto R, Fuji T and Sekimoto H (1998) A newly identified chemotactic sexual pheromone from *Closterium ehrenbergii*. *Sex Plant Reprod.* 11:81-85.
- 4) Iwanami Y, Sasakuma T and Yamada Y (1988) *Pollen: Illustrations and Scanning Electronmicrographs*. Kodansha/Springer-Verlag, Tokyo.

■ 研究交流 ■

ドイツ生活の紹介

内 野 圭 一

Introduction of German life

Keiichi Uchino

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

はじめに

著者は、2006年度の一年間、ドイツのシュトゥットガルト大学 (Universität Stuttgart) の微生物学研究所において客員研究員として研究を行った。同大学の Dieter Jendrossek (員外) 教授 (図 1.) から、本学の齊藤光實教授に対して、共同研究の申し出があり、著者がその研究を行うためにドイツに派遣されることになったという経緯である。今回、その間の報告をする機会を得たので、ここに報告する。

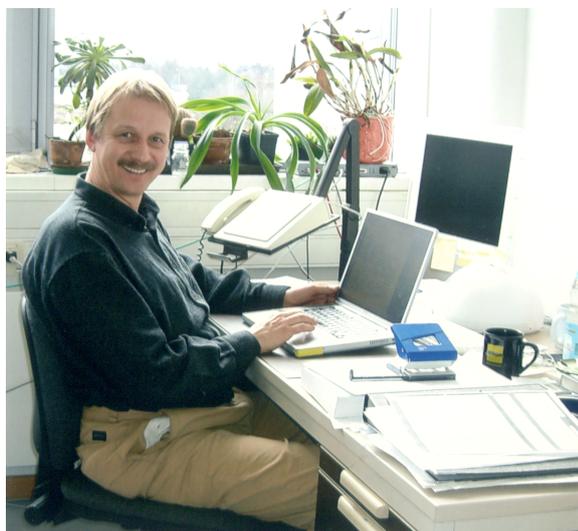


図 1. D. Jendrossek 教授. 研究室にて.

シュトゥットガルトは、ドイツ連邦共和国 Baden-Württemberg 州の州都であり、ドイツを代表する工業都市で (中央駅の屋根の上でベンツのマークが回っていた)、ダイムラー、ボルシェやボッシュなどドイツを代表する世界的な企業の本社がおかれている。そのためか、シュトゥットガルト大学も工学が中心で、工学を学ぶための留学生、特に中国の留学生が多く、地元のドイツ人の学生が言うには、「女性よりも中国人が多い」そうである (シュトゥットガルトにおいて基本的にアジア出身者の扱

いはこの様であり、日本の評価も決して高くないと感じた)。大学には、ゲストハウスがあり、招かれた研究者が一時的に滞在することができる。著者も、最初の4か月をそこで過ごした。所属先の微生物学研究所は、生物工学に関する研究所が6つ集まった建物の一部を占め、本学湘南ひらつかキャンパス2号館の半分程度の大きさだった。正教授1名、員外教授2名、ポストドクター1名、博士課程の学生10名程 (数名が外国人)、そして、数名の技官と修士レベルの学生、秘書等で構成されていた。当初、ドイツ語どころか英語での挨拶すらままならず、非常に困ったが、研究に関しては、専門分野だったこともあり、問題無かった。設備に関しては、やや旧式な物が多かったが、概ね本学のレベルと同じ程度であった。ただし、隣の生化学研究所では、300 Lの細菌培養装置があったり、地下にスーパーコンピュータを備えていたりと、設備は充実していた。この研究所では、博士課程の学生は、給料を貰って研究を行っていて、わずかな在学費用を払うものの、日本との違いに驚いた (特に著者は私費で滞在していたため)。

実験を始めるに当たっては、安全ガイダンスのようなものを個人的に受けたが、教授の話では、これを受けないと実験させられない決まりだそうである。消火器の位置、非常時の連絡先、防護メガネ、手袋、白衣等の着用、危険物、危険な微生物の取扱い、夜間に一人で実験しないことなどであった。防護メガネなどについては、着けなくても構わないが、何かあった時に保険料が全額支払われない可能性を示唆された。自己責任だそうである。試薬の保管は本学の如く鷹揚であったが、一方、発癌性物質、有毒物質、放射性物質の取扱いについては、過剰と思われるほど神経質で、多少皮膚についたくらいでメタノールの危険性について何度も注意されたし、R I

室に関しては、設備があるにも関わらず、使わせてくれなかった(被爆国でもないのに)。細菌の処分法では、遺伝子操作の有無に拘らず、全て滅菌処理した後、廃棄していた。日本でもこうした物の規制は強化されていく傾向にあり、いずれは、そのようになるのかもしれない。

研究手法に関しては、教授には、労働に対する効果を最大にするように頭を使うことを繰り返し指導された。当初、「とにかく何でもやってみる」という姿勢で実験を行っていたが、目標とするデータを取れるように実験計画を立てるようとか、同じような実験を何度も繰り返さないように試料を保存しておくようとか、実験を行う前に考えることをしばしば喚起された。実験計画段階や、実験の途中経過の段階でも、どのように実験を行って、結果をまとめるかについて、頻りに議論を行い、2 時間を超える事も少なくなかった様に記憶している。参加者間では平等に発言できるように示唆され、実際、そのように努力されていたせいか、意見交換がよく行われたのは、研究を進めるにあたって概ね好ましいことではあった。気に入らない事や納得できない事を問い詰めるドイツ人的気質も意見交換に寄与したかとおもう。実験して結果を示すまで、あるいは、ドイツ人がその結果を再現するまで信用されないこともあり、あまり意味の無い話し合いもないでもなかったが。当時、韓国の研究者がクローン作製のデータを偽造したことが問題になったため、全般的に(東アジアの)信用が落ちていて、ドイツ人が追試して再現性があっても、「たまには韓国人も本当のことを言うらしい」と言われるほどであった。今でも変わらないかもしれないが。

議論や、研究生活を思い返してみると、「理論に現実を合わせる」というのは極端な言い方ではあるが、そのようなドイツ式の思考様式がしばしば感じられた。哲学では、イギリスの経験主義に対して、ドイツの理性主義があるが、彼らは理性主義的な考え方を自然に備えているため、何も意識しなくとも、その人なりの考えがデータに先行するのだろう。それまでは、経験主義的な姿勢であったので、その考えの対極に位置する考え方を見られたことが大きな収穫であったと思う。また、学生が面倒くさがりの上にあまり実験をしない割には、結果を一応出しているらしいので、効率の良い実験手法として見習うべきところが大きいと思う。ただ、ドイツ人で土日に、あるいは平日夜遅くまで実験する人は稀であったが、そのような状態を教授は危惧していたことも一応紹介しておく。

講演会が多かったのは良い点かと思う。月に1 回程

度、国内外から大学、企業を問わず研究者を招いて講演会を行っていて、望めば英語で話してくれた。研究所内でも、日常会話ならともかく、専門用語が頻出する議論においては、主に英語で話す人が、少なくとも著者以外にもいたので、研究所内での英語の使用頻度については、低くはなかったかと思う。特に1 か月とか、半年とかの短期留学生の受け入れが時々あったので、本学でも短期留学生の受け入れが活発であれば、全体の英語学習に役立つかと思う。8 月の終わりには、アメリカ合衆国のミネアポリスの国際学会に行く機会があった。その際には、英語で話せることと、アメリカ人の海外の人を受け入れる雰囲気を感じることができて感動したことを今でもはっきりと覚えている。空港に日本語の表記があった時には、日米間の親密さが(少なくとも表面的には)窺われ、シュトゥットガルトとの違いに驚いた。(ただ、後でわかったところでは、ドイツ国内においても、ベルリンやミュンヘン等の国際都市では、日本人の扱いはそれほどぞんざいではない。)アメリカ合衆国には、一週間ほどの滞在だったので、さほど理解が進まなかったかと思われるが、受けた印象は、外国人に寛大である以外は、テレビや映画で得られる所と大差なかった。そういう意味では、シュトゥットガルトは、面白い街かとおもう。帰った時の反動は、辛かったが。

2006 年は、偶然サッカーの世界カップの開催国がドイツであったため、日本人ほどのお祭り騒ぎではないにせよ、盛り上がりを見せた。著者は、Stuttgart で行われた 3 位決定戦を観戦する機会を得られた。その試合がドイツ対ポルトガルだったため、非常に盛り上がった。その時の会場へ行く時に、ドイツ人サポーター達の間で歌われていた歌をついでに紹介する。”Stuttgart ist shoen shoener als Berlin” (シュトゥットガルト (3 位決定戦会場) は



図 2. リヒテンシュタイン城にて(左端, 著者).

ベルリン（決勝会場）より遥かに良い）。

最後に

今回のドイツ滞在が初の海外生活であったが、大変有意義なものであったと実感している。良くも悪くもドイツは先進国であり、わが国よりも進歩し、墮落していて、学ぶべきところが多かったが、大陸理性主義を本場で見る事ができたのが特に良かった。研究に関しても、当初の予定を上回る成果を出し、論文としても形に残せたので、問題ないかと思う。ただ、個人的な意見としては、特別ドイツ文化が好きでなければ、ドイツ語を話せない状態でドイツの地方都市に行くのは、お勧めできない。Jendrossek

教授は、2010年に学会を Stuttgart で開かれる予定であるそうで、その時まで研究を続けていたら、是非参加したい。

謝辞

公私にわたってお世話を頂いた Jendrossek 教授と齊藤光實教授には、この場を借りてお礼申し上げます。微生物学研究所の皆さん、特に Gebauer 氏と井上博士（現在第一製薬）には、様々な事で助けて頂きました。ワールドカップのチケットを手に入れてくれた友人の山崎氏（株Adeka）にも感謝致します。

2007 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 教授 中田穰治
 情報科学科 准教授 張 善俊
 化学科 教授 野宮健司
 化学科 教授 大石不二夫
 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、
 武内義尚
 特 別 所 員： 猪木慶治、鈴木秀穂、村上 悟
 竹内重夫
 客員研究員： 豊泉和枝、中原昌明、河合 忍、
 濱元千絵子、松島一幸
 木村卓央、岸 康人、王 斌
 齊藤保直、増川 一

(3) 理学部産官学連携推進委員会

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 水野智久
 化 学 科： 教授 松本正勝
 生物科学科： 准教授 鈴木祥弘
 情 報 系： 情報科学科 教授 桑原恒夫
 広 報 委 員： 化学科 教授 天野 力
 産官学連携推進室： 課長 田口澄也
 産官学連携推進室平塚： 部長 梶川 隆

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第26回湘南ハイテクセミナー

—機器分析入門—

日時： 2007年6月7日(木)・8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
 後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「分析総論」
杉谷嘉則(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」
渋川雅美(埼玉大学大学院理工学研究科)
- 4) 「質量分析」
明石知子(横浜市立大学大学院総合科学研究科)
- 5) 「赤外分光」
高柳正夫(東京農工大学大学院共生科学技術研究院)
- 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27回湘南ハイテクセミナー

—研究開発と分析技術—

日時： 2006年12月4日(火)・5日(水)
 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

後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「研究開発におけるNMR分析」
嶋田一夫
- 2) 「研究開発と IR 分光」
古川行夫(早稲田大学工学部化学科)
- 3) 「環境分析」
功刀正行(独立法人国立環境研究所)
- 4) 「超微量分析の新展開」
原口紘丞(社団法人国際環境研究協会)
- 5) 「X線分析と研究開発」
田沼繁夫(独立行政法人物質・材料研究機構)
- 6) 「研究開発と材料分析」
志智雄之(株式会社日産アーク)

(3) 第18回神奈川大学平塚シンポジウム

日時： 2007年3月15日(土)
 13時00分～17時00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
神奈川大学総合理学研究所
- 共催： 日本化学会
- 演題・発表者：
- 1) 「教員採用試験にむけて」
藤枝隆博(神奈川大学理学部化学科4年)
 - 2) 「小規模学校における理科教育の現状と課題」
奥秋賢一(山梨県上野原市立島田中学校教諭)
 - 3) 「採用試験合格記」
吉原 功(さいたま市立浦和南高等学校臨時的任用教諭)
 - 4) 「理数科新設について」
山口文男(神奈川県立弥栄西高等学校教諭)
 - 5) 「高大連携教育を考える」
神崎夏子(早稲田大学理工学術院客員講師)
 - 6) 「高校教科「情報」の補助教材の提案」
野口健一郎(神奈川大学理学部教授)
 - 7) 「化学入門について」
野宮健司(神奈川大学理学部教授)
 - 8) 「理学部の総合理学プログラムについて」
齊藤光實(神奈川大学理学部教授)
 - 9) 「総合学科の現状と課題」
石川裕二(横浜清陵総合高等学校校長)
 - 10) 「科学教育における国際化とは？」
竹内敬人(神奈川大学名誉教授)
- (4) 講演会
日 時： 2007年7月20日(金)
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(61号館332室)
主 催： 神奈川大学総合理学研究所
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
演 題： 「アニオンリビング重合法を用いた含フッ素ポリマーの分子設計」
講演者： 杉山賢次(東京工業大学大学院理工学研究科助教)
- (5) 講演会
日 時： 2007年9月10日(月)
15時10分～16時40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
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
- ンター
神奈川大学総合理学研究所
- 演 題： 「質量分析法による糖および複合脂質等の構造解析・・・異性体の認識」
講演者： 大橋陽子(理化学研究所脳科学総合研究センター)
- (6) 講演会
日 時： 2007年11月2日(金)
14時～16時
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(61号館228室)
主 催： 神奈川大学総合理学研究所
演題・講演者：
1) 「大学におけるソフトウェア教育の問題点」
宮本衛市(はこだて未来大学情報アーキテクチャ学科教授)
2) 「室蘭工業大学におけるサテライトベンチャービジネスラボラトリーの研究活動(感性工学)について」
久保 洋(室蘭工業大学情報工業科教授)
- (7) 講演会
日 時： 2007年11月9日(金)
15時10分～16時40分
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館305室)
主 催： 神奈川大学大学院理学研究科
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
神奈川大学総合理学研究所
演 題： 「有機合成反応の創出考え方とコツ」
講演者： 細見 彰(筑波大学名誉教授、学習院大学客員教授)
- (8) 講演会
日 時： 2007年11月19日(月)
15時10分～15時50分
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館209室)
主 催： 神奈川大学総合理学研究所
演 題： 「国内における遺伝子組換え植物の分布状況について」
講演者： 中嶋信美(国立環境研究所生物圏環境研究領域主任研究員)
- (9) 講演会
日 時： 2007年12月13日(木)
15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： 「2成分から成るフラビン拡散型のモノオキシゲナーゼの結晶構造」
 講演者： 久野玉雄(独立行政法人理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター)

(10) 研究発表会

日時： 2007年11月5日(月)
 15時10分～16時40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
 共催： 神奈川県大学生物学科
 演題・発表者：
 1) 「化学誘導変異系統群 TILLING を用いたイネの逆遺伝学」
 鈴木 温(前国立遺伝学研究所研究員)
 2) 「シロイヌナズナの減数分裂期染色体の挙動を制御するしくみについて」
 安積佳隆(神奈川県理学部生物学科助教)

(11) ハイテク・リサーチ・センター研究発表会

日時： 2007年10月13日(土)
 9時50分～17時30分
 会場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス(61号館332室)
 主催： 神奈川県ハイテク・リサーチ・センター
 共催： 神奈川県総合理学研究所
 演題・発表者：
 1) 「光リソグラフィーを利用したマイクロアレイの開発」
 山口和夫(神奈川県理学部化学科)
 2) 「ナノ細孔を持つ光触媒の開発と環境・エネルギー問題への展開」
 森 和亮(神奈川県理学部化学科)
 3) 「微視的異方性環境で働く蛍光・発光物質の開発」
 松本正勝(神奈川県理学部化学科)
 4) 「溶液中の芳香族閉殻イオン種の光励起状態の動的挙動の解明」
 平田善則(神奈川県理学部化学科)
 5) 「欠損型ポリ酸塩の化学反応空間を利用した新規機能性ポリ酸塩の構築」
 野宮健司(神奈川県理学部化学科)

6) 「環境影響を考慮した光感応性物質の評価法の確立」
 西本右子(神奈川県理学部化学科)
 7) 「脊椎動物発生の蛍光ツールを用いた解析」
 豊泉龍児(神奈川県理学部生物科学科)
 8) 「海氷藻類の一次生産を補助する色素系の解析」
 鈴木祥弘(神奈川県理学部生物科学科)
 9) 「電子顕微鏡技法による細胞調節系イオン動態の解析」
 鈴木季直(神奈川県理学部生物科学科)
 10) 「微生物ポリエステルと関連化合物の代謝」
 齊藤光實(神奈川県理学部生物科学科)
 11) 「蛍光分子を利用した細胞骨格成分の即時観察」
 小谷 亭(神奈川県理学部生物科学科)
 12) 「高度の選択性を有する有機反応場の開発」
 木原伸浩(神奈川県理学部化学科)
 13) 「ケイ素・ゲルマニウムの特性を活かした光機能性超分子の合成」
 加部義夫(神奈川県理学部生物科学科)
 14) 「光合成微生物を利用した光一水素エネルギー変換系の構築」
 井上和仁(神奈川県理学部生物科学科)
 15) 「役に立つ分子の設計-機能分子のコツ」
 齋藤 烈(日本大学工学部次世代工学技術研究センター)
 16) 「植物は如何にして水から酸素を作るか？」
 野口 巧(筑波大学大学院数理物質科学研究科)

投稿規定

Science Journal of Kanagawa University

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 掲載論文の種類

研究論文は、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。

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

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

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

A4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30mm、下辺20mm、左辺20mm、右辺20mm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10mm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、 μ などのギリシャ文字や数学記号などを部分的に異なる字体にすることは差し支えない。

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

(5) 論文構成

研究課題名、著者名、研究課題名(英語)、著者名(英語)、所属(英語)、Abstract(英文)、Keywords(英語)、序論、材料と方法、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: 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（和文の句読点は用いない）。

図の番号および説明文の文字サイズは9Pとする。

図はできるだけ分かりやすいものとし、図中の文字や記号は高さ3～5 mm程度にする。写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

(14) 単位

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

(15) 作製見本

希望者には作製見本を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁（報告書）

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

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

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

多人数による共同研究のうち、

- (1) 各研究者が全員原著と同等の論文（短報の場合も含めて）を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は3の規定に準じて作製する。
- (2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、

フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は3の規定と同じである。

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

5 原稿の体裁（テクニカルノート）

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

6 原稿の体裁（研究交流報告）

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

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

7 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。

8 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。

9 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。

10 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。

11 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。

12 著作権等

掲載論文の内容についての責任は著者が負うものとする。その著作権は著者に属するが、著作権は神奈川大学総合理学研究所に属する。



編集後記

Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌) 第 19 巻を皆様のお手元にお届け致します。第 19 巻では原著論文 10 報、短報 2 報、報告書 1 報、テクニカルノート 1 報、研究交流 1 報の計 15 の論文を掲載致しました。この中には総合理学研究所の 2007 年度研究助成を受けた論文 7 報を含みます。情報系、化学系、生物系にわたって学術的価値の高い共同研究論文を投稿していただきました。また、研究交流では本年 3 月に神奈川大学大学院理学研究科博士課程を修了したばかりの若き博士(理学)である内野さんに、ドイツで過ごした 1 年間に渡る生活について寄稿していただきました。後に続く大学院生の皆さんには大きな刺激となることでしょう。今後も本学の理学研究科博士後期課程を修了する方、また、論文博士として神奈川大学理学研究科より博士の学位を授与される方からの論文投稿を期待しております。

折しも、この第 19 巻が発行される直前の 2008 年 5 月には神奈川大学創立 80 周年記念式典が営まれました。同時に本年は神奈川大学湘南ひらつかキャンパス

開設・理学部開設 20 周年にもあたります。このキャンパスで教育を受け巣立って行った卒業生の数も理学部だけで 5000 人近くになるのではないのでしょうか。学会や産業界から注目される研究もこのキャンパスで多数展開されてきました。次の創立 100 周年に向けて、本学における学術研究の振興に本誌がいささかなりとも貢献できます事を編集委員会一同願っており、今後とも努力を重ねる所存です。皆様のさらなるご協力、ご支援をお願い申し上げます。

最後になりましたが、本誌を前身の「総合理学研究所 年報」から新しいスタイルの Science Journal of Kanagawa University への大きな衣替えに尽力されてきた鈴木季直教授が、今年度から総合理学研究所所長に就任されたことをご報告致します。これまでの本誌へのご尽力に感謝するとともに、今後所長として総合理学研究所の発展に大きな手腕を発揮されることを祈願しております。

[神奈川大学総合理学研究所、
理学部生物科学科 井上和仁]

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
長澤倫康	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 Sciences
Editors	
Chikara Amano	Department of Chemistry
Michiyasu Nagasawa	Department of Information Sciences
Kazuhito Inoue	Department of Biological Sciences
Yoshio Kabe	Department of Chemistry
Zhang Shan Jun	Department of Information Sciences

Science Journal of Kanagawa University Vol. 19

発行日	2008 年 6 月 30 日
編集者	Science Journal of Kanagawa University 編集委員会
発行者	神奈川大学総合理学研究所
発行所	〒259-1293 平塚市土屋 2946 Tel. 0463-59-4111(内 2500) Fax. 0463-58-9684
印刷所	光和サービス株式会社

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