

# SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

# KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

# Vol. 20 2009

## Number 1

神奈川大学総合理学研究所

*Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University*

目 次

総 説

Iron Metabolism and Microtubules

Mohammad Rubayet Hasan, Susumu Kotani and Hiroyuki Nakagawa ..... 1

原 著

Synthesis of a Bicyclic Dioxetane Substituted with 3-(Acetylsulfanyl)-Phenyl Group and its Base-Induced Chemiluminescent Decomposition

Nobuko Watanabe, Yuusuke Maniwa, Hiroyuki Takahashi and Masakatsu Matsumoto ..... 11

イオン注入したダイヤモンド半導体の MeV 級イオンビーム照射による電氣的活性化の研究  
— 高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の研究 (3) —

中田穰治、星野 靖、斎藤保直、川崎克則、服部俊幸 ..... 17

視線追跡装置を用いたチェンジブラインドネスの研究

張 善俊、吉野和芳 ..... 39

イトマキヒトデ中心体 DNA のリアルタイム PCR を用いた定量解析の検討

河合 忍、根本心一、日野晶也 ..... 45

シャコの血糖上昇ホルモンの精製および構造決定

大平 剛、真壁健太郎、鈴木道生、長澤寛道、片山秀和、水藤勝喜、朝比奈潔、泉 進 ..... 51

トウモロコシ根の重力応答に伴う Ca イオン動態の解析

早津 学、鈴木季直 ..... 57

タツナミガイ体壁網状筋の興奮収縮連関と収縮 - 弛緩に伴う細胞内 Ca 動態に関する生理学および細胞化学的研究

川村秀二、田原聖一、今井政直、望月大影、鈴木季直 ..... 65

短 報

Movement of Ferritin Oligomers in Hepatoma Cells

Sayaka Koikawa, Mohanmad Rubayet Hasan, Makoto Tominaga, Shigeaki Miyamoto,  
Susumu Kotani and Hiroyuki Nakagawa ..... 77

ポリ酸塩の欠損部位を新しい化学反応空間とした無機 - 有機ハイブリッド化合物の設計と合成

野宮健司、力石紀子、松永 諭、坂井善隆、長谷川 剛、木村卓央 ..... 81

相模湾に生息するウミウシ類 (ドーリス目) の食性

渡辺麻実、大和田正人、金沢謙一 ..... 85

潮間帯に生息するカサガイ類の防御行動の比較 十亀孝維、大和田正人、金沢謙一	89
--	----

## 研究交流

第四回神奈川大学-国立台湾大学学術交流国際会議 木原 伸浩	93
----------------------------------	----

2008 年度神奈川大学理学研究所事業報告	105
-----------------------	-----

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

編集後記	113
------	-----

■ Review ■

## Iron Metabolism and Microtubules

Mohammad Rubayet Hasan<sup>1</sup>, Hiroyuki Nakagawa<sup>2</sup> and Susumu Kotani<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Division of Gastroenterology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 1M9, Canada

<sup>2</sup> Division of Biology, Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka-city, Fukuoka 814-0180, Japan

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

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

**Abstract:** Iron is required as a co-factor for a number of enzymes involved in fundamental biological processes such as respiration, photosynthesis and DNA synthesis. However, free iron is highly insoluble at physiological pH, and is incompatible with life because of inorganic reactions with oxygen that generate harmful oxy radicals. Thus, the bioavailability of iron in the physiological environment is maintained by a number of iron binding proteins in a highly regulated manner. Among the principal members of the iron homeostatic proteins is ferritin, which is ubiquitously distributed in almost all living organisms ranging from unicellular bacteria to higher animals. As a multisubunit, nanocage protein with a mineral cavity for iron, ferritin safely stores iron in cells, preventing deleterious, abiotic reactions. Although ferritin has been extensively studied, and the mechanisms by which it assimilates and releases iron have been demonstrated, the cytoplasmic dynamics of ferritin and/or iron are still poorly understood. Recent studies have indicated the association of cytoplasmic ferritin with the cytoskeletal network, in particular, with microtubules, which makes it probable that the regulation of the subcellular distribution and traffic of bio-iron is one of the important roles of microtubules, along with their well-known roles in cell morphology, cell division, and intracellular transport. This article first describes our general knowledge and understanding of iron metabolism, and later focuses on the recent progress and perspectives of the studies related to the cytoplasmic distribution and dynamics of ferritin in association with microtubules.

**Keywords:** iron, iron metabolism, ferritin, microtubules, microtubule-associated proteins

### Biological significance of iron

Iron is an indispensable element for all species of life on earth. The most common iron-containing biological substance is the heme group, which is a complex of iron and porphyrin. Hemoglobin in red blood cells contains the heme group, in order to carry oxygen throughout the body, which is an essential event for respiration in vertebrates including human<sup>1)</sup>. A human body contains about 3-4 g of iron, of which 60% is found in red blood cells, while 30% is stored in the liver. Iron deficiency in humans causes anemia. Myoglobin in muscle cells also contains the heme group to store and supply

oxygen for muscle contraction. Although present in lower quantities, no less important are the iron-binding proteins in the electron-transport chains, including another class of heme-binding proteins, the cytochromes, in the respiratory complexes, and ferredoxin, which contains the Fe-S cluster, in the photosystem protein complexes. Various redox enzymes contain iron in their active sites, such as ribonucleotide reductase, which is essential in DNA synthesis. The iron-dependent biological reactions are based on the redox status of the element, that is, the interconversion between ferrous [Fe(II)] and ferric [Fe(III)] ions with the concomitant electron transfer under slightly basic conditions<sup>2-5)</sup>.

In sharp contrast to its essential role in many biological reactions that are crucial for life, free

\***Abbreviations:** DcytB, duodenal cytochrome B; DMT1, divalent metal transporter 1; Tfr1, transferrin receptor; MAP(s), microtubule-associated protein(s); IRE(s), iron-responsive element(s); IRP, iron regulatory protein.

iron is toxic to cells because of its reactivity with oxygen at physiological pH, producing insoluble rusts and deleterious oxy radicals. Iron is therefore rarely free in the physiological environment. Moreover, too much and too little iron are both incompatible with life, as observed in several iron-related human diseases, such as iron deficiency in anemia and iron overload in hereditary hemochromatosis<sup>(6-8)</sup>. Therefore, organisms have evolved specific mechanisms to regulate the intake, circulation, and metabolism of iron. The sophisticated iron regulatory mechanisms provide organisms with the ability to precisely maintain the iron level in order to supply cells with the necessary iron at an effective concentration when required, and to prevent the deleterious effects of excess iron.

Despite the enormous biological significance of iron, the detailed metabolic pathways of the element at the subcellular level have long been unclear. In the last few decades, studies on proteins associated with iron homeostasis provided new insights into intracellular iron metabolism: Several proteins responsible for iron transport in and out of the cell were identified, and the involvement

of microtubules in cytoplasmic iron transport was suggested.

### Iron metabolism in humans

Iron acquisition, circulation, and storage in the human body are tightly regulated (Fig. 1). Most of the iron in the body is recycled: aged red blood cells are processed in the hematopoietic organs, especially the splenic sinus, and the released iron is bound to a blood plasma iron carrier protein, transferrin, and recirculated throughout the body. Humans do not systematically excrete iron, but they do lose a small but steady amount by sweating, bleeding, and shedding of the epithelial cells. This steady loss is compensated by strictly controlled iron uptake<sup>(2, 9, 10)</sup>.

In the digestive system, the cells responsible for iron absorption are found in the duodenal epithelium. Dietary iron is reduced from Fe(III) to Fe(II) to become soluble by a reductase, duodenal cytochrome B (DcytB)\*, on the apical region of the duodenum. A neighboring transmembrane protein, divalent metal transporter 1 (DMT1)<sup>(11-13)</sup>, transports Fe(II) from the intestinal lumen to the

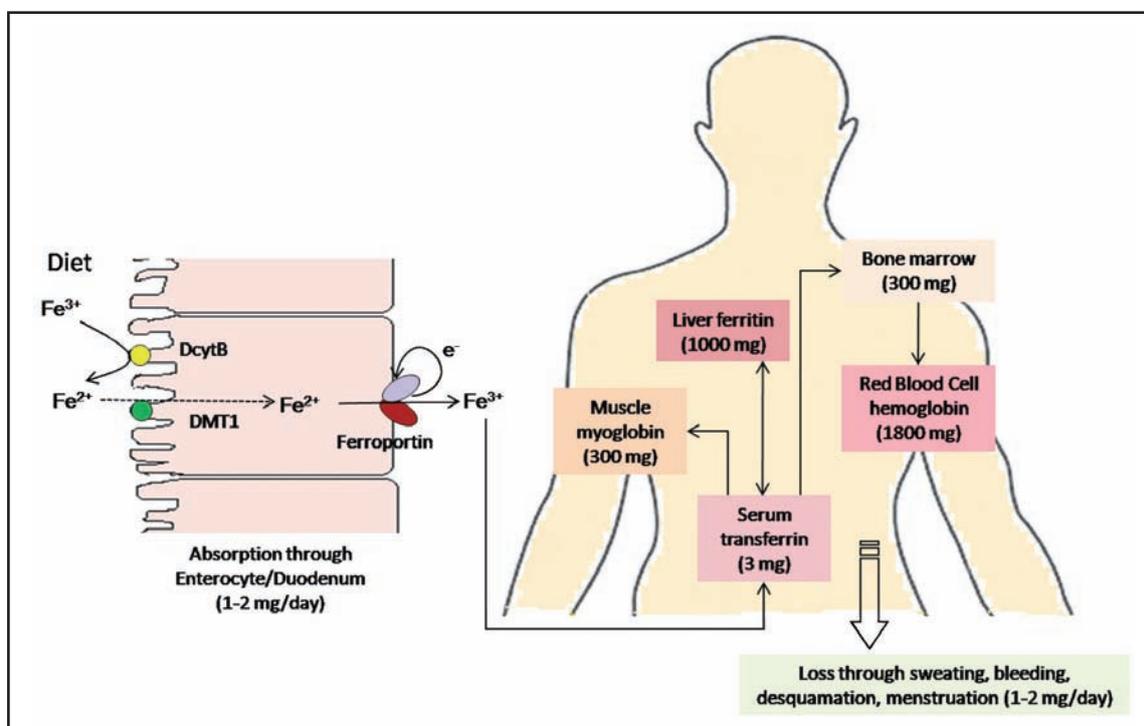


Fig. 1. Iron acquisition and distribution in the human body. Iron absorbed by enterocytes, through the combined activities of a reductase (DcytB) and a transmembrane transporter (DMT1), is exported to the bloodstream at the basolateral side by ferroportin. The exported iron is circulated throughout the body in the transferrin-bound form. Although about two-thirds of body's iron remains associated with hemoglobin in developing and mature erythrocytes, a significant proportion is stored in the liver, and is mostly associated with ferritin<sup>(9, 11)</sup>.

cytosol of the epithelial cells. Although some of the iron remain in the cytosol in the ferritin-bound state, which is discussed in the following section, most of it is exported from the duodenal epithelial cells by ferroportin<sup>14-16</sup>, another transmembrane iron transporter protein localized in the basolateral membrane, to circulate through the entire body. The exported iron is oxidized to Fe(III) and is carried to the target cells by the bloodstream in transferrin-bound form.

Transferrin is a 75kDa blood plasma glycoprotein, that contains two Fe(III) binding sites, and is the most important Fe(III) transporter in the human circulatory system<sup>17</sup>. Transferrin tightly binds Fe(III) ions at neutral pH, and releases them under acidic conditions. The iron-bound transferrin in the blood is assimilated by target cells through receptor-mediated endocytosis. The target cells express transferrin receptor 1 (TfR1), which receives the transferrin-Fe(III) complex, on their surface. The endocytotic vesicles are supplemented with H<sup>+</sup> by the H<sup>+</sup>-ATPase to lower the intravesicular pH. In the acidified endosome, Fe(III) is released from transferrin, reduced to Fe(II), and transported to the cytoplasm by DMT 1. The cytoplasmic iron is immediately complexed with ferritin. Meanwhile, the iron-free transferrin, along with TfR1, returns to the cell surface via recycling endosomes, and is released to the blood plasma to bind new Fe(III) ions<sup>18</sup>.

### Ferritin: a natural reservoir of bioavailable iron

Once it is transported to the cytoplasm, the surplus iron binds to a cytoplasmic ion storage protein, ferritin, in the Fe(III) form. In this way, cells control the hazardous effects of iron, while maintaining a soluble pool of iron in the cytoplasm. One ferritin molecule stores about 4,500 Fe(III) ions.

Ferritin is a quasi-spherical polymeric protein consisting of 24 subunits, with a total molecular mass of about 450 kDa, and is present in a variety of cell types, such as bacteria, plants and animals<sup>19</sup>. There are two classes of mammalian ferritin subunits, the H subunit and the L subunit, and their ratio in the 24-mer complex depends on the relative expression levels of the two genes in different cell types. The two subunits are homologous and

have similar molecular masses (about 20 kDa), but they play distinct roles in iron uptake: the H subunit catalyzes the oxidation of Fe(II), the initial step in the iron storage process, while the L subunit induces the nucleation of the iron core made of Fe(III)<sup>20</sup>. A genetic study using mice suggested that the H subunit is more important for life<sup>21</sup>. A homopolymer exclusively consisting of H subunits exists in some non-mammalian species, such as avians and plants.

Despite the oligomeric nature of ferritin, we refer to the 24-mer ferritin as the 'ferritin molecule' or simply 'ferritin' in this paper. When we use the term 'ferritin oligomer', it does not refer to the 24-mer oligomer, but rather refers to the aggregated structure formed by a number of 24-mer ferritin molecules.

Under the electron microscope, a ferritin molecule appears as a hollow, cage-like structure with an external diameter of about 11-13 nm (Fig. 2). An electron-dense structure with a diameter of about 8 nm is usually observed in the center of each molecule, which corresponds to the iron core.

### Regulation of iron metabolism by gene expression

As we mentioned, the intracellular iron level is mainly controlled by two proteins, TfR1, which is responsible for the cytoplasmic entry of the iron, and ferritin, which controls the cytoplasmic iron levels by sequestering and releasing the iron. Consequently, one of the best ways to control intracellular iron metabolism is to control the cytoplasmic content of these proteins. Interestingly, the genes encoding the two proteins are controlled by similar manners of post-translational regulation<sup>22</sup>.

The mRNAs of ferritin and TfR1, along with those of some other iron-related proteins, such as

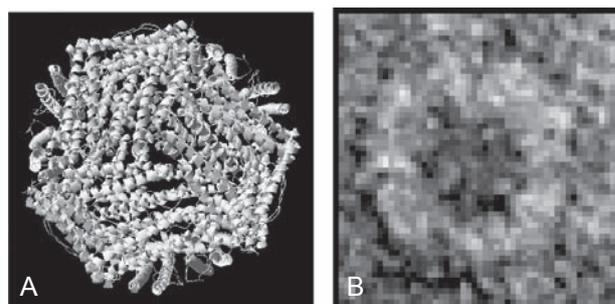


Fig. 2. Ferritin structure. A. Assembled ferritin cage (bullfrog M ferritin, pdb 1MFR). B. Electron micrograph of bovine adrenal gland ferritin<sup>26</sup>.

DMT1 and ferroportin, contain short, conserved sequences called iron-responsive elements (IREs). IREs are a family of 28-nucleotide, stem-loop structures found in the 3' or 5' untranslated regions. IREs may function in ribosome binding, or the mRNA stability. An aconitase homolog, iron regulatory protein (IRP), binds to IREs in an iron-dependent manner, and thereby regulates mRNA translation. For example, IRP blocks translation initiation of ferritin during iron starvation, by tightly binding to the 5'-untranslated region IRE of the ferritin mRNA. When iron is available for IRP, it binds the iron and releases the mRNA, due to the low RNA-binding activity of the iron-bound form. In the mean time, IRP reduces the translation of TfR1 by leaving the TfR1 mRNA. The IREs of the TfR1 mRNA are situated at the 3'-untranslated region, and constitute the endonuclease cleavage site. Consequently, the binding of IRP hinders the cleavage of the mRNA to ensure

its longer life span. The iron-bound IRP released the mRNA, and thus destabilizes it.

The post-translational regulation of iron metabolism can be summarized as follows (Fig. 3). Under iron-deficient conditions, TfR1 expression is up-regulated, while ferritin expression is down-regulated. Therefore, the iron uptake of the cell is augmented, and intracellular iron is readily available because it is not sequestered by ferritin. Iron overload brings the opposite situation. The low content of TfR1 leads to low iron uptake, and the high ferritin concentration counteracts the cytoplasmic accumulation of available iron.

Although the expression of ferritin and TfR1 is thus regulated, how they behave in the cell once they are expressed is another important problem. Although the recycling of membrane-bound TfR1 has been well-studied, as described in the previous section, little is known about the cytoplasmic dynamics of ferritin, such as its localization and

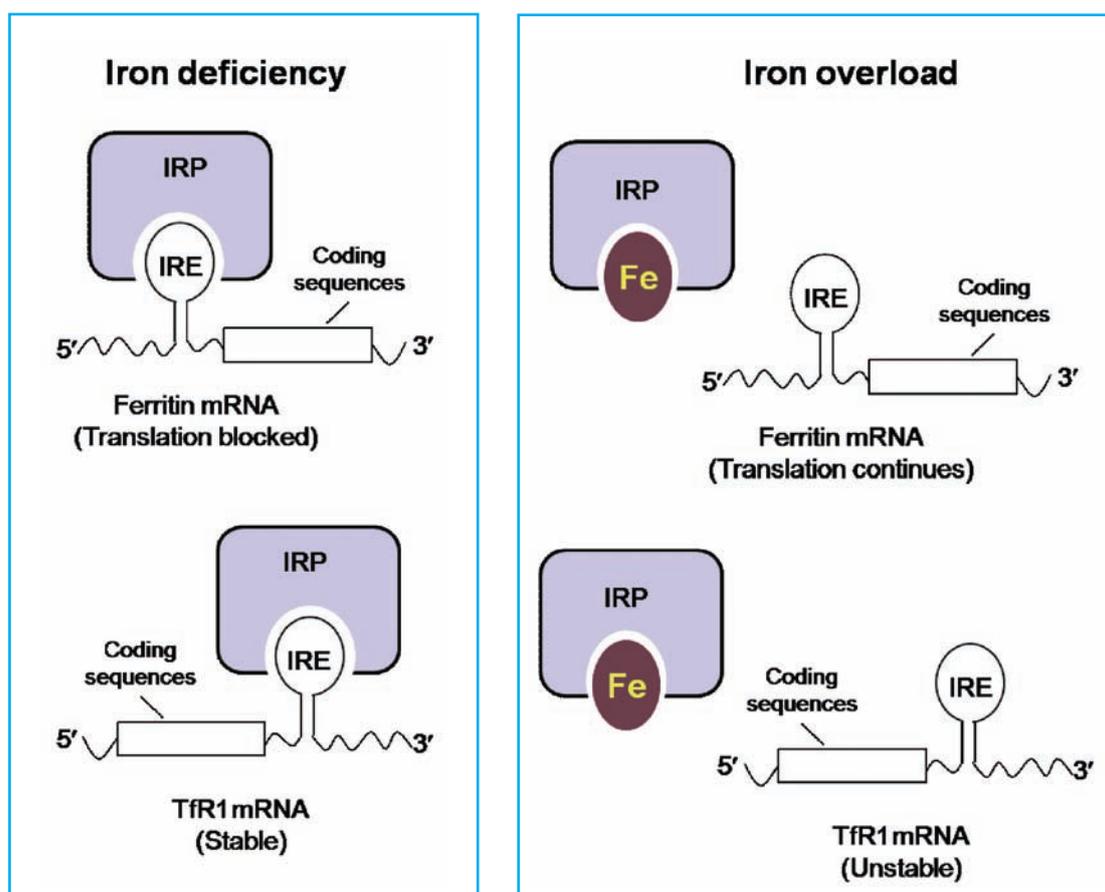


Fig. 3. Translational regulation of iron metabolism. Binding of IRPs to the IRE stem loop structure at the 5'-untranslated region of ferritin mRNA blocks ribosome binding and the subsequent ferritin translation, while binding of IRPs to the IREs at the 3'-untranslated region of TfR1 mRNA promotes the translation of TfR1 by RNA stabilization. The IRE-IRP interaction is regulated by cytoplasmic iron.

displacement, which are undoubtedly crucial for the control of iron metabolism.

### Microtubules and ferritin

Microtubules are ubiquitous cytoplasmic structures made of tubulin, the unit molecule, and some accessory proteins. Microtubules, along with microtubule-dependent motor proteins, play a crucial role in the cytoplasmic transport of macromolecules and vesicles. Since tubulin, the primary component of the microtubule is a conserved protein, many studies have focused on the variety of accessory proteins, with diverse regulatory functions. The biochemical characterization of accessory proteins immediately followed the mass purification of mammalian brain microtubule proteins in the mid 1970's, and the major accessory proteins, termed microtubule-associated proteins (MAPs), were extensively studied thereafter. Since mammalian brain MAPs, which were readily available for biochemical use at that time, occur exclusively in neurons, some researchers, including ourselves, recognized the importance of other MAPs ubiquitous to various kinds of cells and tissues. One of our best achievements with the ubiquitous MAPs was the identification of bovine MAP4<sup>23,24</sup>.

In 2000, we reported a new, ubiquitous MAP with a molecular mass of 250 kDa from bovine adrenal medulla<sup>25</sup>. This MAP is unique among the other well-known MAPs, such as MAP1, MAP2, MAP4, and tau, in that it has a globular shape, and that its affinity to microtubules is rather weak, both *in vitro* and *in vivo*. Subsequent characterizations revealed that this MAP is identical to bovine adrenal ferritin<sup>26</sup>. Interestingly enough, syncolin<sup>27</sup>, another high-molecular mass MAP from chicken erythrocytes, was also later revealed to be avian ferritin<sup>28</sup>. The two groups used totally different materials, and completely different approaches, and yet they reached to the same conclusion that ferritin binds to microtubules. This suggests the *in vivo* role of microtubule networks in regulating the cytoplasmic dynamics of ferritin.

In the second half of this article, we will elaborate on the subject of ferritin-microtubule interactions, focusing on our recent achievements.

### **In vitro effect of ferritin on microtubules**

In the adrenal gland crude extracts, ferritin cycles with microtubules during the assembly-disassembly based microtubule purification<sup>25</sup>, which is the classical strategy to identify MAPs. The microtubule-binding activity is evidently intrinsic to the ferritin molecule: commercially available ferritin, apo-ferritin, and bovine liver ferritin purified through the standard procedure bind equally well to microtubules; conversely, the ferritin purified from the adrenal MAP fraction shows iron binding activity indistinguishable from that of authentic ferritin<sup>26</sup>. Ferritin-microtubule binding is susceptible to ionic strength, and is inhibited by the presence of other MAPs, suggesting that the binding is based on a mechanism similar to that of MAPs, although ferritin contains no known microtubule-binding motifs. One of the noticeable difference in the activity between ferritin and authentic MAPs is that ferritin does not promote microtubule assembly<sup>25</sup>. Although ferritin may elongate microtubules, since the addition of ferritin to a preformed microtubule fraction, which inevitably contains a trace amount of free tubulin, further augmented the polymerization, ferritin mixed with totally unpolymerized tubulin resulted in the formation of amorphous aggregates instead of microtubules. Syncolin, the avian ferritin, reportedly bundles microtubules, hence the name syncolin<sup>27</sup>. However, we have no evidence that bovine ferritin also bundles microtubules.

As we mentioned earlier, the ferritin 24-mer consists of a variety of combinations of the H and L subunits. At present, it is not clear whether the microtubule-binding activity of the 24-mer ferritin is affected by its subunit content. We have proved that the ferritins from adrenal gland, liver, and spleen bind to microtubules without any detectable differences, which disproves the importance of the composition. However, it should be noted that the ferritin-microtubule interaction was originally identified in adrenal ferritin<sup>25</sup> and avian ferritin<sup>27</sup>; the former is abundant in H subunits, and the latter consists exclusively of H subunits, which may suggest the domination of the H subunit in the interaction.

The ferritin-microtubule interaction was also observed by electron microscopy<sup>26</sup>. The ferritin

molecules are situated on the microtubule surface at irregular intervals. Intriguingly, the ferritin molecules sometimes assemble into larger aggregates on microtubules (Fig. 4A). Although ferritin aggregation has long been described<sup>29, 30</sup>, its biological significance is not yet clear. As described in the following sections, this aggregate seems to be the functional form of ferritin; accordingly, we hereafter call it the ‘ferritin oligomer’.

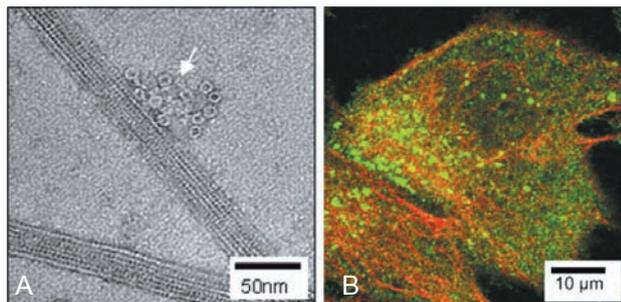


Fig. 4. Ferritin microtubule interaction. A. Ferritin oligomers associated with microtubules assembled *in vitro* as revealed by electron microscopy<sup>26</sup>. B. Co-localization of ferritin (green) and microtubules (red) in HepG2 cells, observed by indirect immunofluorescence microscopy<sup>31</sup>.

### Oligomerization of ferritin in the presence of microtubules

The ferritin-microtubule interaction is apparently dominated by a simple equilibrium, since an increase in the ferritin concentration led to an increase in the co-precipitable ferritin in the *in vitro* sedimentation experiments. In contrast, when the concentration of microtubules was increased, it did not lead to a steady increase in the co-precipitable ferritin. Instead, a certain amount of ferritin still remained in the supernatant, even after the addition of a considerable amount of microtubules<sup>31</sup>, suggesting that the ferritin population was heterogeneous regarding the microtubule binding property. Detailed analyses revealed that most of the oligomeric ferritin was recovered in the microtubule-bound fraction, while the monomeric ferritin tended to remain in the unbound fraction, and that the microtubule-binding ferritin contained a larger amount of iron than the unbound ferritin.

Although the iron contents of the microtubule-bound and unbound ferritins were different, it is clear that iron does not play the principal part in the ferritin-microtubule interaction, because apo-ferritin, ferritin totally devoid of iron, binds to mi-

cro-tubules<sup>26</sup>. A specific protein-protein interaction is probably the basis of the interaction. Nevertheless, it is still possible that the ferritin-bound iron positively affects the binding by increasing the net surface charge of ferritin oligomers required to bind to the acidic microtubule surface<sup>25, 26</sup>. Although we have no evidence that microtubules have any positive roles in ferritin oligomerization at present, it should be noted that oligomeric ferritin is always associated with microtubules, as revealed by our electron microscopic observations, and that no ferritin oligomers are found in the ferritin samples in the absence of microtubules, which correlates well with the sedimentation experiments showing the preferential binding of the oligomers.

The higher iron content of microtubule-bound ferritin oligomers can be explained from a perspective different from the electrostatic microtubule-ferritin interaction. The three fold axes pores (8 in a 24-mer cage) in ferritin (Fig. 2A) have recently been identified as iron exit pores<sup>32-35</sup>. The pores were suggested to be gated, to control the release of iron from ferritin. Generally, little or no iron is released from ferritin *in vitro* and the iron release requires reductants and an Fe chelator. The gated pores are believed to regulate the access of these factors to the ferritin iron core. It appears possible that oligomerization and the subsequent microtubule-binding negatively affect the gate function, and thus the oligomers are naturally iron-rich.

### Microtubule-dependent subcellular localization of ferritin

Immunofluorescence studies have revealed that ferritin appears as punctate structures in cultured mammalian cells<sup>25, 31</sup>. These structures are likely to represent the ferritin oligomer observed in the test tubes, rather than the monomeric (24-mer) form. Since punctate ferritin staining is found in various types of cultured cells, we consider that oligomerization is a general feature of mammalian ferritin. In the meantime, blurry staining is observed throughout the cytoplasm, which may represent the distribution of monomeric ferritin.

Although the association of the oligomeric structures with microtubules was not evident in single-stained images, double-staining experiments

clearly revealed their co-localization (Fig.4B). In addition, the structures completely lose their cytoplasmic alignment when the microtubule networks are disrupted<sup>25, 31</sup>. The association of the punctate structures with microtubules agrees well with the *in vitro* results showing the preferential binding of oligomeric ferritin to microtubules. The microtubule-dependent oligomeric structures were even more prominent when the cytoplasmic ferritin content was increased by the injection of fluorescently labeled ferritin<sup>31</sup>. In real time observations, the structures were revealed to move along microtubules<sup>36</sup>. These results may be related to the physiological studies showing that the disruption of microtubules greatly affects the release of cytoplasmic ferritin to serum or bile<sup>37, 38</sup>. In contrast to avian blood cell ferritin, which is reportedly localized along the marginal band microtubules<sup>28</sup>, microtubule-like fibrous staining patterns similar to those of MAPs were not evident in any cell line tested.

From these results, it is reasonably concluded that the iron rich ferritins form oligomers and bind to microtubules in the course of ferritin-dependent iron metabolism. Microtubule-directed movements may be responsible for the cytoplasmic dynamics of ferritin oligomers, although experimental evidence is still insufficient in this respect.

The effect of the iron concentration in the culture medium on cytoplasmic ferritin localization was also examined. Suppose that cytoplasmic iron immediately binds to ferritin, and the iron-bound ferritin in turn forms oligomers to bind to microtubules, an increase in the iron concentration in the culture medium will result in the accumulation of microtubule-bound ferritin oligomers, while, a decrease in the iron concentration will lead to the loss of cytoplasmic ferritin oligomers. When the iron concentration in the culture medium was increased by the addition of ferric ammonium citrate, a well-known iron uptake activator effective in a wide range of cell lines, the number of cells with ferritin oligomers gradually increased, with the concomitant over-expression of ferritin<sup>31</sup>. On the other hand, the depletion of culture medium iron by the iron chelator deferoxamine did not result in the most easily predicted outcome, that is, the total loss of the cytoplasmic ferritin oligom-

ers. A certain population of ferritin oligomers still remained even under the low iron conditions<sup>31</sup>. The persistency of the ferritin oligomer seemed to depend on the presence of microtubule networks. The ferritin oligomers completely disappeared in the regions where the microtubule network is scarce, such as the tips of neurites extending from neuroblastoma cells, while they were still found associated with the microtubules in the microtubule-dense areas.

### Physiological implications of ferritin-microtubule interactions and future directions

As we have seen, there is now considerable evidence for the interaction between ferritin and microtubules both *in vitro* and *in vivo*. The next important challenge is to unveil the biological significance of the interaction. Although Infante *et al.*<sup>28</sup> proposed that ferritins cover the surfaces of microtubules and protect them from iron mediated oxidative damage, our data indicated that ferritin oligomers were associated with microtubule surfaces at irregular intervals<sup>26, 31</sup>, making it unlikely that they would effectively protect microtubules from oxy-radicals. Instead, it appears that microtubules play an integral role in iron metabolism, by acting as a docking platform for ferritin and thereby modulating the intracellular traffic of iron. Although ferritin has been studied for many years as a cytoplasmic reservoir of iron, and a number of proteins related to the transmembraneous import and export of iron have been identified, important questions concerning the cytoplasmic dynamics of iron and ferritin have not been answered: How is iron delivered to ferritin in the cytoplasm? How does ferritin iron move inside the cells? How is iron released from ferritin for export or intracellular use?

Since microtubules play an important role in the TfR1-mediated endocytosis of transferrin iron<sup>39</sup>, the association of ferritin with microtubules could bring ferritin close to the endocytic vesicles for the rapid uptake of iron released from the vesicles ((1) in fig.5). In a similar way, microtubules may guide ferritin iron towards the cell surface for ferroportin-mediated iron export<sup>40</sup> ((2) in Fig.5). We are now designing experiments to investigate these ideas. Since one of the iron isotopes, <sup>59</sup>Fe, is

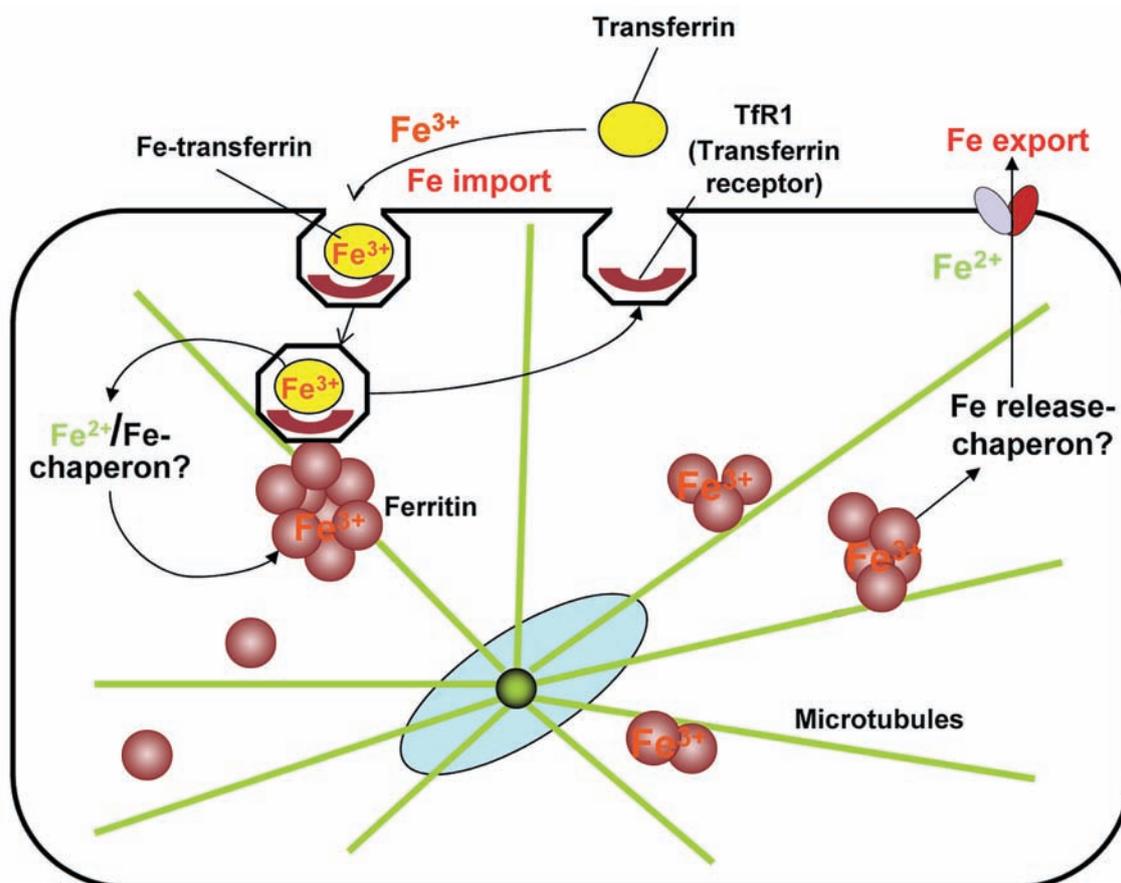


Fig. 5. Proposed role of microtubules in iron metabolism. Microtubules facilitate (1) ferritin iron uptake from endocytotic vesicles containing imported transferrin iron (left), and/or (2) the release of ferritin iron for use in other subcellular compartments, or for export through ferroportin (right).

a practical radioactive tracer used in various ferrokinetic analyses, we may take advantage of the isotope and label cultured cells to examine the specific activity of ferritin (cpm  $^{59}\text{Fe}/\text{ng}$  ferritin) after manipulating microtubules. We are sure that such experiments will answer many of the remaining questions, and will add the role of iron metabolism regulation to the diverse biological functions of microtubules.

## References

- 1) Fraústo da Silva JJR and Williams RJP (2001) *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford University Press, Oxford
- 2) Bothwell TH and Finch CA (1962) *Iron Metabolism*. Boston, Little, Brown.
- 3) Andrews NC (2000) Iron metabolism: Iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **1**:75-98.
- 4) Lill R and Muhlenhoff U (2006) Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**: 457-486.
- 5) Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ and Frazer DM (2007) Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biomaterials.* **20**: 665-674.
- 6) Chasteen ND, Harrison PM (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* **126**: 182-194.
- 7) Theil EC (2000) Ferritin. In: *Handbook of Metalloproteins*. Messerschmidt A, Huber R, Poulos T and Wiegardt K, eds, John Wiley & Sons, Chichester. pp. 771-781.
- 8) Theil EC (2004) Iron, ferritin, and nutrition. *Annu Rev Nutr.* **24**: 327-343.
- 9) Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* **341**: 1986-1995.
- 10) Ganz T and Nemeth E (2006) Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta.* **1763**: 690-699.
- 11) Mackenzie B and Garrick M (2005). Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **289**: 981-986.
- 12) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL and Hediger MA. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* **388**: 482-488.
- 13) Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF and Andrews NC (1997) Mi-

- crocytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet.* **6**: 383-386.
- 14) De Domenico I, McVey WD and Kaplan J (2008) Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**: 72-81.
  - 15) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC and Zon LI (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**: 776-781.
  - 16) McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW and Simpson RJ (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* **5**: 299-309.
  - 17) Aisen P and Listowsky I (1980) Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 357-393.
  - 18) Aisen P (1998) Transferrin, the transferrin receptor and the uptake of iron by cells. *Metal Ions Biol Syst* **35**: 535-631.
  - 19) Harrison PM and Arosio P (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* **1275**: 161-203.
  - 20) Levi S, Yewdall SJ, Harrison PM, Santambrogio P, Cozzi A, Rovida E, Albertini A and Arosio P (1992) Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *Biochem J.* **288**: 591-596.
  - 21) Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B and Beaumont C (2000) Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem.* **275**: 3021-3024.
  - 22) Theil EC. (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem.* **265**: 4771-4774.
  - 23) Kotani S, Murofushi H, Maekawa S, Sato C and Sakai H (1986) Characterization of microtubule-associated proteins isolated from bovine adrenal gland. *Eur. J. Biochem.* **156**: 23-29.
  - 24) Tokuraku K, Katsuki M and Kotani S (2002) Structural and functional analyses of microtubule-associated protein 4. *Rec. Res. Devl. Biochem.* **3**: 315-333.
  - 25) Katsuki M, Tokuraku K, Nakagawa H, and Kotani S (2000) Purification and characterization of a new, ubiquitously distributed class of microtubule-associated protein with molecular mass 250 kDa. *Eur. J. Biochem.* **267**: 23-29.
  - 26) Hasan MR, Morishima D, Tomita K, Katsuki M and Kotani S (2005) Identification of a 250 kDa putative microtubule-associated protein as bovine ferritin. Evidence for a ferritin-microtubule interaction. *FEBS J.* **272**: 822-831.
  - 27) Feich P, Foisner R and Wiche G (1991) Immunolocalization and Molecular Properties of a High Molecular Weight Microtubule-bundling Protein (Syncolin) from Chicken Erythrocytes. *J. Cell Biol.* **112**: 689-699.
  - 28) Infante AA, Infante D, Chan MC, How PC, Kutschera W, Linhartova I, Mullner EW, Wiche G and Propst F (2007) Ferritin associates with marginal band microtubules. *Exp. Cell Res.* **313**: 1602-1614.
  - 29) Harrison PM, Gregory DW. (1965) Evidence for the existence of stable "aggregates" in horse ferritin and apoferritin. *J Mol Biol.* **14**: 626-629.
  - 30) Williams MA, Harrison PM. (1968) Electron-microscopic and chemical studies of oligomers in horse ferritin. *Biochem J.* **110**: 265-280.
  - 31) Hasan MR, Koikawa S, Kotani S, Miyamoto S and Nakagawa H (2006) Ferritin forms dynamic oligomers to associate with microtubules in vivo: Implication for the role of microtubules in iron metabolism. *Exp. Cell Res.* **312**: 1950-1960.
  - 32) Takagi H, Shi D, Hall Y, Allewell NM, Theil EC (1998) Localized Unfolding at the Junction of Three Ferritin Subunits. A Mechanism for Iron Release? *J. Biol. Chem.* **273**: 18685-18688.
  - 33) Jin W, Takagi H, Pancorbo NM and Theil EC (2001) "Opening" the Ferritin Pore for Iron Release by Mutation of Conserved Amino Acids at Interhelix and Loop Sites. *Biochemistry* **40**: 7525-7532.
  - 34) Liu X, Jin W and Theil EC (2003) Opening Protein Pores with Chaotropes Enhances Fe Reduction and Chelation of Fe from the Ferritin Biomineral. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 3653-3658.
  - 35) Liu X and Theil EC (2005) Ferritins: Dynamic Management of Biological Iron and Oxygen Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **38**: 167-175.
  - 36) Koikawa S, Hasan MR, Tominaga M, Miyamoto S, Kotani S and Nakagawa H (2009) Movement of ferritin oligomers in hepatoma cells. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **20**: 77-80.
  - 37) Ramm GA, Powell LW and Halliday JW (1990) Effect of colchicine on the clearance of ferritin in vivo. *Am J Physiol.* **258**: 707-713.
  - 38) Ramm GA, Powell LW and Halliday JW (1996) Effect of the microtubular inhibitor vinblastine on ferritin clearance and release in the rat. *J Gastroenterol Hepatol.* **11**: 1072-1078.
  - 39) Jin M and Snider MD (1993) Role of Microtubules in Transferrin Receptor Transport from the Cell Surface to Endosomes and the Golgi Complex. *J. Biol. Chem.* **268**: 18390-18397.
  - 40) De Domenico I, Vaughn MB, Li L, Bagley D, Musci G, Ward DM and Kaplan J (2006) Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J.* **25**: 5396-5404.

■ Full-Length Paper ■ By a grant of Research Institute for Integral science, Kanagawa University

## Synthesis of a Bicyclic Dioxetane Substituted with 3 - (Acetylsulfanyl) - Phenyl Group and Its Base-induced Chemiluminescent Decomposition

Nobuko Watanabe<sup>2</sup>, Yuusuke Maniwa<sup>1</sup>, Hiroyuki Takahashi<sup>1</sup> and Masakatsu Matsumoto<sup>1,2</sup>

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

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

**Abstract:** Bicyclic dioxetane bearing a 3-(acetylsulfanyl)phenyl group, 1-[3-(acetylsulfanyl)phenyl]-5-tert-butyl-4,4-dimethyl-2-oxabicyclo[3.2.0]heptane, was synthesized from the corresponding aryl-substituted dihydrofuran by means of singlet oxygenation. When this dioxetane was treated with potassium tert-butoxide in DMSO, it decomposed rapidly to emit yellow light with moderate chemiluminescence efficiency (ca 0.2 %). The singlet chemiexcitation efficiency was estimated to be more than 10 %. The dioxetane was found to display chemiluminescence with accompanied by considerable solvatochromism:  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 538 \text{ nm}$  in DMSO, but 570-595 nm in H<sub>2</sub>O.

**Keywords:** dioxetane, phenylsulfanyl acetate, chemiluminescence

### Introduction

It has recently been reported that dioxetane bearing a 3-(disulfanyl)phenyl moiety **1** reacts with a thiolate anion to produce unstable dioxetane **2** substituted with a phenylthiolate anion, which decomposes rapidly with an accompanying emission of light<sup>1,2)</sup>. One advantage of this type of chemiluminescence has been exemplified for the construction of highly sensitive analytical system to detect acetyl choline esterase (Fig. 1). However, the stoichiometry for nucleophilic S-S bond cleavage leading to chemiluminescence is not necessarily clear, since a nucleophile such as thiolate anion and hydroxide ion should more or less attack a sul-

fur atom in disulfanyl moiety to produce a thiolate anion not desired. On the other hand, an acylsulfanylphenyl moiety would generate a phenylthiolate anion exclusively on treatment with various nucleophiles. Thus, we attempted to synthesize a dioxetane substituted with 3-(acetyl sulfanyl)phenyl group as a representative and to examine its base-induced chemiluminescent decomposition.

### Materials and Methods

#### General

Melting points were measured with a Yanako MP-S3 melting point apparatus and are uncorrected. IR spectra were taken on a JASCO FT/IR-300

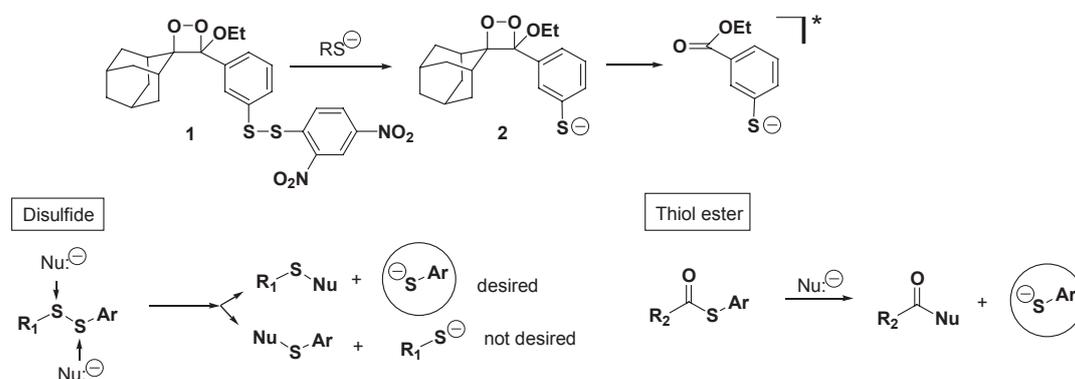


Fig. 1. Thiolate ion-induced chemiluminescent decomposition of a dioxetane bearing a 3-(disulfanyl)phenyl moiety.

fourier transform infrared spectrometer.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra were recorded on JEOL JNM-EX400 or JEOL JNM-ECP500 spectrometers. Deuteriochloroform (99.8 atom % enriched, Merck or Isotec) was used for the NMR solvent.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  chemical shifts were reported in  $\delta$  value based on internal TMS ( $\delta_{\text{H}} = 0$ ) or solvent signal ( $\text{CDCl}_3$   $\delta_{\text{C}} = 77.0$ ) as reference, and coupling constants ( $J$ ) were reported using Hz as the unit. Mass spectra were obtained by using JEOL JMS-AX-505H or JEOL (AccTOF) mass spectrometers. Reagents were purchased from Aldrich, Tokyo Chemical Industries, and/or Wako Pure Chemical Industries.

#### Synthesis of 5-(3-bromophenyl)-4-tert-butyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (5)

A solution of 1-(3-bromobenzyl oxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-one (6) (26.2 g, 80 mmol) in DMSO (90 mL) was added dropwise over 40 min to a solution of *t*-BuOK (11.7 g, 104 mmol) in DMSO (100 mL) at room temperature under a nitrogen atmosphere and was stirred for 1.5 h. The reaction mixture was poured into sat. aq.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (500 mL) and then extracted with AcOEt (500 mL). The organic layer was washed twice with sat. aq. NaCl (500 mL), dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated in vacuo. The crude product, namely 2-(3-bromophenyl)-3-*tert*-butyl-3-hydroxy-4,4-dimethyl tetrahydrofuran, was used for the next reaction without further purification. Physical properties of the purified product were as follows. Colorless columns melted at 97.5-98.0 °C (from hexane);  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  0.88 (s, 9H), 1.19 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.55 (s, 1H), 3.81 ( $q_{\text{AB}}$ ,  $J = 8.3\text{Hz}$ , 2H), 4.98 (s, 1H), 7.19 (t,  $J = 7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.38 (d with fine coupling,  $J = 7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.45 (d with fine coupling,  $J = 7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.63 (broad s, 1H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  20.1, 26.5, 28.0, 37.9, 48.2, 81.9, 83.5, 85.1, 122.4, 128.0, 129.6, 131.2, 132.2, 142.8 ppm; IR (KBr) 3511, 2911, 2880, 1569, 1472, 1062, 767, 721  $\text{cm}^{-1}$ ; Mass ( $m/z$ , %) 328 ( $\text{M}^+2$ , 2), 326 ( $\text{M}^+$ , 2), 271 (10), 185 (36), 171 (24), 127 (39), 85 (100), 55 (68).

Next, dehydration of a hydroxytetrahydrofuran described above was carried out. Pyridine (64.8 mL, 0.80 mol) was added to a solution of 2-(3-bromophenyl)-3-*tert*-butyl-3-hydroxy-4,4-

dimethyl tetrahydrofuran (24.5 g, 80 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL) at room temperature under  $\text{N}_2$  atmosphere and was stirred for 10 min.  $\text{SOCl}_2$  (7.59 mL, 10.4 mmol, 1.30 eq) was added to the reaction mixture at 0 °C and was stirred for 3 h. The reaction mixture was poured into sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$  and then extracted with AcOEt. The organic layer was washed twice with sat. aq. NaCl, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel with hexane / AcOEt (19 : 1) to give 5-(3-bromophenyl)-4-*tert*-butyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (5) as a colorless solid in 94 % yield (23.2 g). 5: Colorless granules melted at 137 °C (from hexane-ether);  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (s, 9H), 1.35 (s, 6H), 3.90 (s, 2H), 7.45 (t with fine coupling,  $J = 7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.56 (dt,  $J = 7.8$  and  $1.3\text{Hz}$ , 1H), 8.06-8.09 (m, 2H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  27.3, 32.5, 32.6, 47.3, 83.2, 121.8, 126.6, 128.6, 129.4, 131.1, 132.8, 138.2, 148.5 ppm; IR (KBr) 2969, 2870, 2262, 2547, 1687, 1589, 1442, 1051, 698, 538  $\text{cm}^{-1}$ ; Mass ( $m/z$ , %) 310 ( $\text{M}^+2$ , 15), 306 ( $\text{M}^+$ , 18), 295 (91), 293 (72), 185 (24), 183 (25), 97 (46), 83 (42), 55 (100).

#### Synthesis of 4-tert-butyl-3,3-dimethyl-5-(3-methyl sulfanyl)phenyl-2,3-dihydrofuran (7)

A solution of 5-(3-bromophenyl)-4-*tert*-butyl-2,3-dihydrofuran (5) (1.57 g, 5.08 mmol) and sodium methylthiolate (442 mg, 6.31 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (15 mL) was stirred under  $\text{N}_2$  atmosphere at room temperature for 130 min. The reaction mixture was poured into sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aq. solution and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with sat. aq. NaCl, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel and eluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - hexane, 1:3 ~ 1:2) to give starting material 5 (351 mg, 22.3 %) and 4-*tert*-butyl-3,3-dimethyl-5-(3-methyl sulfanyl)phenyl-2,3-dihydrofuran (7) as a colorless oil in 56.5 % yield (793 mg).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  1.05 (s, 9H), 1.33 (s, 6H), 2.48 (s, 3H), 3.87 (s, 2H), 7.07 (dt,  $J = 7.2$  and  $1.7\text{Hz}$ , 1H), 7.17-7.25 (m, 3H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  15.9, 27.4, 32.4, 47.2, 53.4, 83.1, 125.9, 126.4, 126.7, 128.0, 128.2, 136.8, 149.6 ppm; IR (KBr): 2958, 2866, 1647, 1577, 1469, 1400, 1362, 1304, 1203, 1053, 1011, 964, 787, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;

Mass (m/z, %) 276 (M<sup>+</sup>, 34), 261 (100), 205 (26), 151 (29), 123 (4), 109 (13), 91 (5), 77 (4), 57 (45).

#### Synthesis of 4-*tert*-butyl-5-(3-hydrosulfanyl)phenyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (8)

To a solution of sodium benzylthiolate (13.7 mmol, prepared *in situ* from benzylthiol and sodium hydride) in *N,N*'-dimethylimidazole (10 mL), 4-*tert*-butyl-3,3-dimethyl-5-(3-methylsulfanyl)phenyl-2,3-dihydrofuran (7) (1.11 g, 4.0 mmol) was added and stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at 160 °C for 1 h. The reaction mixture was poured into sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl, and then extracted with AcOEt. The organic layer was washed twice with sat. aq. NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. Thus, 3.54 g of crude 4-*tert*-butyl-5-(3-sulfanyl)phenyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (8) was obtained as pale brown oil, and it was used for the next reaction without further purification.

#### Synthesis of 5-(3-acethylsulfanyl)phenyl-4-*tert*-butyl-2,3-dihydrofuran (4)

To a solution of crude 4-*tert*-butyl-5-(3-sulfanyl)phenyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (8) (3.54 g) in AcOEt (10 mL), triethylamine (4.0 mL, 29 mmol) and acetic anhydride (1.5 mL, 16 mmol) was added under N<sub>2</sub> atmosphere at 0 °C, and stirred for 3.5 h. The reaction mixture was poured into sat. aq. NaCl and extracted with AcOEt. The organic layer was washed with sat. aq. NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica gel and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexane (1:2 ~ 2:1) to give 5-(3-acethylsulfanyl)phenyl-4-*tert*-butyl-2,3-dihydrofuran (4) as an oil in 92 % yield (1.12 g). 4: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1.07 (s, 9H), 1.34 (s, 6H), 2.42 (s, 3H), 3.88 (s, 2H), 7.33-7.39 (m, 4H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 27.3, 30.1, 32.4, 32.6, 47.2, 83.1, 126.5, 127.6, 128.6, 130.8, 133.8, 135.8, 137.2, 148.9, 193.5 ppm; IR (liquid film): 3055, 2959, 2869, 1706, 1469, 1265, 1119, 1051, 1006, 738 cm<sup>-1</sup>; Mass (m/z ; %) 304 (M<sup>+</sup>, 54), 289 (100), 246 (22), 233 (13), 191 (30), 179 (35), 137 (27), 108 (12), 57 (27).

#### Synthesis of 1-(3-acethylsulfanyl)phenyl-5-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptane (3)

A solution of 5-(3-acethylsulfanyl)phenyl-4-*tert*-

butyl-2,3-dihydrofuran (4) (100 mg) and TPP (0.7 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was irradiated with a 940 W Na-lamp under O<sub>2</sub> atmosphere at 0 °C for 1 h. The photolysate was concentrated and chromatographed on silica gel. Elution with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexane (2:1) gave 1-(3-acethylsulfanyl)phenyl-5-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptane (3) as pale yellow crystals in 94 % yield (105 mg). 3: colorless columns melted at 87.0-88.5 °C (from hexane-diethyl ether); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1.01 (s, 9H), 1.16 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.44-7.45 (m, 2H), 7.68-7.70 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 18.4, 25.0, 26.8, 30.2, 36.7, 44.8, 80.2, 105.0, 116.2, 128.1, 123.6, 129.2, 134.4, 135.2, 137.1, 193.1 ppm; IR (KBr): 2959, 2907, 1703, 1477, 1295, 1109, 1036, 997, 961, 801, 699, 621 cm<sup>-1</sup>; Mass (m/z ; %): 304 (M<sup>+</sup>, 5), 289 (7), 179 (100), 139 (39), 108 (9), 85 (28), 57 (52).

#### Chemiluminescence measurement

Chemiluminescences were measured using JASCO FP-750 spectrometer and/or Hamamatsu Photonics PMA 11 multi-channel detector.

#### In potassium *tert*-butoxide / DMSO system

Freshly prepared solution of potassium *tert*-butoxide in DMSO (1.0 x 10<sup>-1</sup> mol dm<sup>-3</sup>, 2 mL), which was thermostated beforehand at 25 °C, was transferred to a quartz cell (10 x 10 x 50 mm) and the latter placed into the spectrometer, which was thermostated with stirring at 25 °C. After 1-2 min, a solution of dioxetane 3 in DMSO (1.0 x 10<sup>-3</sup> M, 1 mL), which was thermostated at the same temperature as that of the above *tert*-butoxide solution, was added with a syringe with immediate starting of measurement. The intensity of the light emission time-course was recorded and processed according to the first-order kinetics. The total light emission was estimated by comparing it with that of an 3-adamantylidene-4-methoxy-4-(3-*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl-1,2-dioxetane, whose chemiluminescent efficiency (Φ<sup>Cl</sup>) has been reported to be 0.29 in TBAF / DMSO and was used here as standard<sup>5)</sup>.

#### In NaOH / H<sub>2</sub>O system.

Freshly prepared solution of NaOH in H<sub>2</sub>O (1.0 x 10<sup>-1</sup> mol dm<sup>-3</sup>, 2.9 mL), which was thermostated

beforehand at 45 °C, was transferred to a quartz cell (10 x 10 x 50 mm) and the latter placed into the spectrometer, which was thermostated with stirring at 45 °C. After 1-2 min, a solution of dioxetane 3 in DMSO ( $1.0 \times 10^{-3}$  M, 0.1 mL), which was thermostated at the same temperature as that of the above NaOH solution, was added with a syringe with immediate starting of measurement. The other procedures were similar to the case described for potassium *tert*-butoxide / DMSO system.

## Results and Discussion

### Synthesis of a bicyclic dioxetane substituted with 3-(acetylsulfanyl)phenyl group

To synthesize dioxetane substituted with 3-(acetylsulfanyl)phenyl group (3), a bicyclic dioxetane, namely, 1-aryl-5-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptane, was chosen as a basic skeleton, which is known to be thermally persistent<sup>3)</sup>. First, we synthesized dihydrofuran bearing a 3-(acetylsulfanyl)phenyl group (4), as a precursor leading to dioxetane 3.

Synthesis of dihydrofuran 4 starting from 5-(3-bromo phenyl)-4-*tert*-butyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (5) is illustrated in Fig. 2. Dihydrofuran 5 was easily synthesized from 7-(3-bromophenyl)-2,2,4,4-tetra methyl-6-oxaheptan-3-one (6), which was prepared from 2,2,4,4-*te*-

tramethylpentan-1,3-diol and 3-bromobenzyl chloride in two steps, according to a method reported.<sup>4)</sup> When dihydrofuran 5 was treated with sodium methanethiolate in DMF at 150 °C for 7 h, ipso-substitution occurred to give dihydrofuran 7 having a 3-(methylsulfanyl)phenyl group in 56.5 % yield after chromatographic purification. Next, the demethylation of methylsulfanyl group in 7 was attained using sodium benzylthiolate in hot DMF to give dihydrofuran substituted with 3-(hydrosulfanyl)phenyl group 8. A hydrosulfanyl group of dihydrofuran 8 was acetylated with acetic anhydride without purification to give the desired precursor (4) in 80 % yield based on 7, since the hydrosulfanyl group was easily oxidized with air to give disulfide 9.

When a solution of dihydrofuran 4 and a catalytic amount of tetraphenylporphyrin (TPP) in dichloromethane was irradiated with a 940 W Na-lamp under an oxygen atmosphere at 0 °C for 1 h, dioxetane 3 was produced exclusively. Dioxetane 3 was purified by column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ), and its structure was determined by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, Mass, and HRMass spectral analysis. Dioxetanes 3 decomposed into the corresponding keto ester 10 exclusively on prolonged heating in hot xylene, though it was thermally very stable at room temperature (Fig. 3).

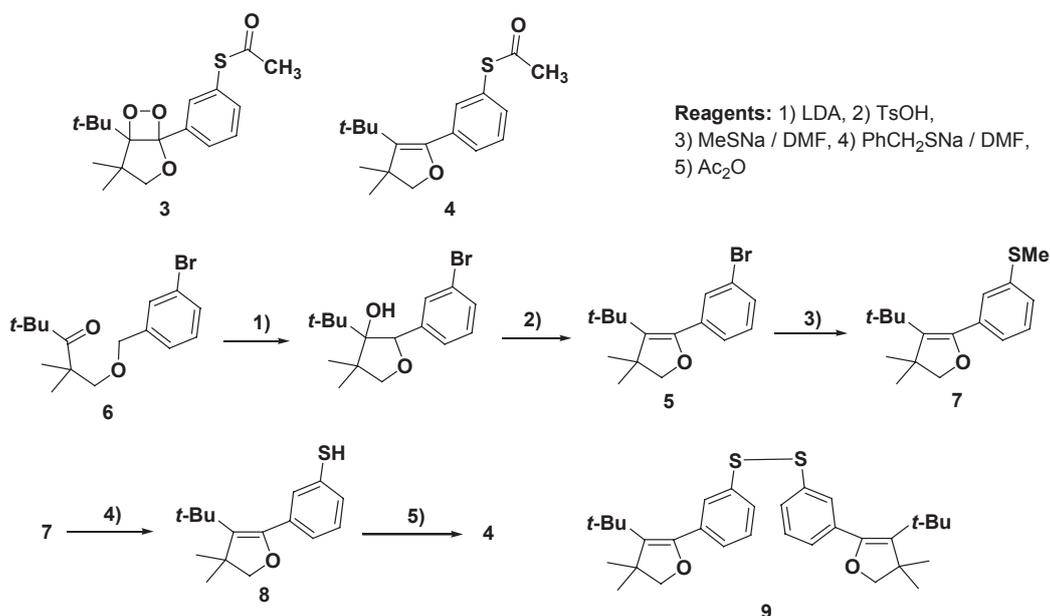


Fig. 2. Synthesis of a dioxetane 3 substituted with 3-(acetylsulfanyl)phenyl group.

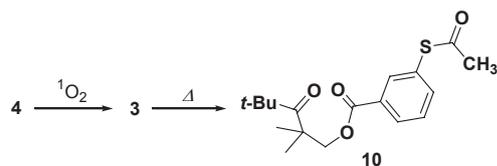


Fig. 3. Singlet oxygenation of a precursor dihydrofuran 4 giving a dioxetane 3 and its thermolysis giving 10.

### Oxide ion-induced chemiluminescent decomposition of a bicyclic dioxetane substituted with 3-(acetylsulfanyl)phenyl group

When a solution of dioxetane 3 in DMSO ( $1.0 \times 10^{-3}$  M, 1 mL) was added to a solution of *t*-BuOK in DMSO ( $1.0 \times 10^{-1}$  M, 2 mL) at 25 °C, 3 decomposed rapidly to afford yellow light with maximum wavelength  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 538$  nm, chemiluminescent yield  $\Phi^{\text{CL}} = 2.1 \times 10^{-4}$ , and the rate of decomposition  $k^{\text{CTID}} = 5.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . These results are summarized in Table 1 together with the chemiluminescent properties reported for the decomposition of hydroxyphenyl-analog 11 in tetrabutylammonium fluoride (TBAF) /DMSO system<sup>7</sup>. Product analysis of the spent reaction mixture after neutralization showed that *m*-(hydrosulfanyl)benzoate 12, dimeric ester 13, which should be produced from thiol 12 during the work-up, and *t*-butyl acetate were produced in 77, 10, and 90 % yields, respectively. This finding suggests strongly that *t*-butoxide ion attacked the acetyl group of 3 to afford *t*-butyl acetate and unstable dioxetane bearing a sulfidophenyl anion 14, which decomposes into keto ester 15 with the accompanying emission of yellow light as illustrated in Fig. 4. The decomposition of 14 would be induced by the intramolecular charge-transfer

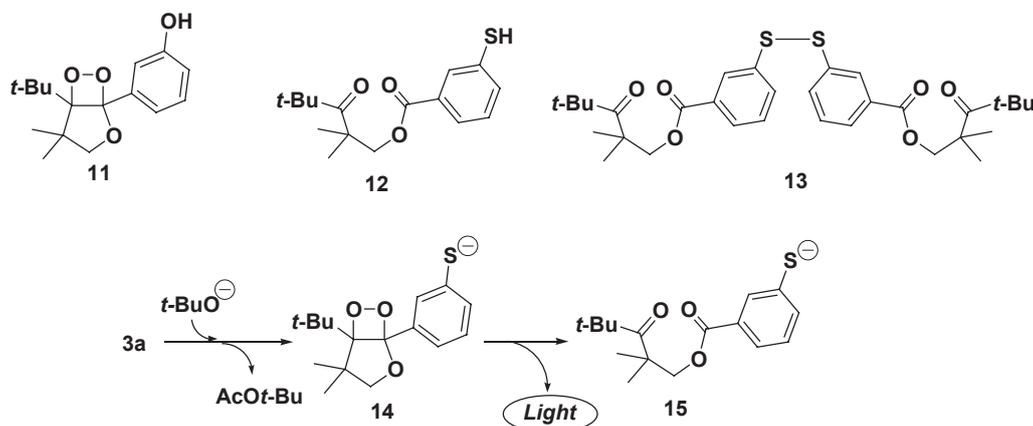


Fig. 4. Base-induced chemiluminescent decomposition of dioxetane 3.

Table 1. Base-induced chemiluminescent decomposition of dioxetane 3a and 15

	<i>t</i> -BuOK / DMSO <sup>a)</sup>	NaOH / H <sub>2</sub> O <sup>b)</sup>	Bu <sub>4</sub> N <sup>+</sup> OH / H <sub>2</sub> O <sup>b)</sup>
3	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} / \text{nm}$	538	595
	$\Phi^{\text{CL,c)}$	$2.1 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-6}$
	$k^{\text{CTID}} / \text{s}^{-1}$	$5.8 \times 10^{-3}$	$1.4 \times 10^{-3}$
11	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} / \text{nm}$	466 <sup>d)</sup>	467
	$\Phi^{\text{CL,c)}$	0.20 <sup>d)</sup>	$1.1 \times 10^{-5}$
	$k^{\text{CTID}} / \text{s}^{-1}$	0.15	$8.6 \times 10^{-4}$

a) A solution of dioxetane 3a in DMSO ( $1.0 \times 10^{-3}$  M, 1 mL) was added to a solution of *t*-BuOK in DMSO ( $1.0 \times 10^{-1}$  M, 2 mL) at 25 °C.

b) A solution of dioxetane 3a in DMSO ( $1.0 \times 10^{-2}$  M, 0.1 mL) was added to a solution of NaOH in H<sub>2</sub>O (1.0 M, 2.9 mL) or to a solution of Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> in H<sub>2</sub>O (0.5 M, 2.9 mL) at 45 °C.

c) Chemiluminescence yields ( $\Phi^{\text{CL}}$ ) were based on the reported value for 3-adamantylidene-4-(3-*tert*-butyldimethylsiloxy)phenyl-4-methoxy-1,2-dioxetane:  $\Phi^{\text{CL}} = 0.29$  in TBAF / DMSO<sup>8)</sup>.

d) The values in TBAF / DMSO system<sup>5)</sup>.

(CT) from the sulfidophenyl group to dioxetane ring as in the case of base-induced chemiluminescent decomposition of dioxetane bearing a 3-hydroxyphenyl group 11. In fact, sulfidobenzoate 15 generated from ketoester 12 in a basic DMSO exhibited fluorescence with maximum wavelength  $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 538$  nm, the spectrum of which coincided with that of chemiluminescence from 3. Since fluorescence yield ( $\Phi^{\text{fl}}$ ) of 15 was estimated to be  $2.2 \times 10^{-3}$ , singlet-chemiexcitation efficiency ( $\Phi_{\text{S}} = \Phi^{\text{CL}} / \Phi^{\text{fl}}$ ) was calculated to be 0.12 for chemiluminescent decomposition of 3 in a basic DMSO. This value of  $\Phi_{\text{S}}$  is lower than that for hydroxyphenyl-analog 11 (Table 1), though it remains high, compared with the thermal decomposition of dioxetanes.

An important application of dioxetanes active to

ward the intramolecular CT-induced decomposition is in the modern chemiluminescent biological and medical analysis which requisites in general aqueous system, as used for analytical system detecting acetyl choline esterase with reagent 1<sup>1</sup>. Thus, the base-induced decomposition of 3 was carried out in an aqueous system. On treatment with NaOH (1.0 M) in H<sub>2</sub>O at 45 °C, dioxetane 3 decomposed to emit light with  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 595 \text{ nm}$ ,  $\Phi^{\text{CL}} = 1.6 \times 10^{-6}$ , and  $k^{\text{CTID}} = 5.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . These chemiluminescent properties are summarized in Table 1 together with those for dioxetane 11 bearing a 3-hydroxyphenyl group<sup>6</sup>. Table 1 demonstrates that the behavior of 3 was considerably different from that of 11 for chemiluminescent decomposition in NaOH / H<sub>2</sub>O system. The  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$  for 3 shifted to a 57nm longer region from the *t*-BuOK / DMSO system to the NaOH / H<sub>2</sub>O system, whereas in such a solvatochromism, little change of  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$  was observed for dioxetane 11. On the other hand, marked decrease of  $\Phi^{\text{CL}}$  was observed for 11 in NaOH / H<sub>2</sub>O (1/18000 of  $\Phi^{\text{CL}}$  in TBAF / DMSO), while decrease of  $\Phi^{\text{CL}}$  in an aqueous system is apparently relieved considerably for 3 (1/1300  $\Phi^{\text{CL}}$  in *t*-BuOK / DMSO). When tetrabutylammonium hydroxide (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>OH<sup>-</sup>) was used instead of NaOH as a base for the chemiluminescent decomposition of 3,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$  was shifted to blue, both  $k^{\text{CTID}}$  and  $\Phi^{\text{CL}}$  increased considerably (Table 1). Such effect of Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>OH<sup>-</sup> has not been observed for the base-induced decomposition of dioxetanes bearing a hydroxyarene moiety in an aqueous system.

### Conclusion

Bicyclic dioxetane bearing a 3-(acetylsulfanyl)phenyl group 3 and its base-induced chemiluminescent decomposition was investigated. Dioxetane

3 was found to give yellow light with moderate chemiluminescence efficiency (ca 0.2 %) in potassium tert-butoxide / DMSO system, while giving yellowish orange light with 0.001-0.0002 % yield in an aqueous system. The singlet chemiexcitation efficiency was estimated to be more than 10 % in DMSO.

### References

- 1) Sabelle S, Renard P-Y, Pecorella K, de Suzzoni-Dézard S, Créminon C, Grassi J, and Mioskowski C (2002) Design and synthesis of chemiluminescent probes for the detection of cholinesterase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 4874-4880.
- 2) Watanabe N, Akai Y, Maniwa K and Matsumoto M, (2005) Synthesis of thermally stable dimeric dioxetane. *ITE Lett.* **6**: 131-134.
- 3) Matsumoto M, Watanabe N, Kasuga NC, Hamada F, and Tadokoro K (1997) Synthesis of 5-alkyl-1-aryl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0] heptanes as a chemiluminescence substrate with remarkable thermal stability. *Tetrahedron Lett.* **38**: 2863-2866.
- 4) Matsumoto M, Murakami H, and Watanabe N (1998) Thermal decomposition of 1-(aminophenyl)-5-tert-butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptanes: unusual O-O bond cleavage competing with normal fragmentation of 1,2-dioxetanes. *Chem. Commun.* **1998**: 2319-2320.
- 5) Matsumoto M, Watanabe N, Ishikawa A and Murakami H (1997) Base-induced cyclization of 1-benzyloxy-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ones: intramolecular nucleophilic addition of a benzy ether to the carbonyl moiety without the Wittig rearrangement or protophilic decomposition *Chem. Commun.* **1997**: 2395-2396.
- 6) Trofimov AV, Mielke K, Vasil' ev RF and Adam W (1996) Chemically initiated electron exchange luminescence of siloxyaryl-substituted spiroadamantyl dioxetanes: kinetics and excited state yields. *Photochem. Photobiol.* **63**: 463-467.
- 7) Matsumoto M and Watanabe N (2005) Structural aspects of 1,2-dioxetanes active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence decomposition *Bull. Chem. Soc. Jpn, Accounts* **78**: 1899-1920.

■原 著■ 2008 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## イオン注入したダイヤモンド半導体の MeV 級イオンビーム照射による 電気的活性化の研究 — 高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の研究 (3) —

中田稷治<sup>1,4</sup> 星野 靖<sup>1</sup> 斎藤保直<sup>1</sup> 川崎克則<sup>2</sup> 服部俊幸<sup>3</sup>

Research for Electrical Activation of Ion-implanted Diamond Semiconductors  
Using MeV Ion Beam Irradiation  
— Research for Formation of High-Quality Diamond Epitaxial Thin Layers  
on the Diamond Substrates and Evaluation of These Layers —

Jyoji Nakata<sup>1,4</sup>, Yasushi Hoshino<sup>1</sup>, Yasunao Saito<sup>1</sup>, Katsunori Kawasaki<sup>2</sup>  
and Toshiyuki Hattori<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup> Research Laboratory of Nuclear Reactor, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

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

**Abstract:** The first aim of our research is to obtain high-quality epitaxial diamond layers on the diamond substrates using microwave plasma CVD (Chemical Vapor Deposition) method. And the second is to obtain p-type and n-type diamond substrates (or epitaxial layers) using ion implantation method. Epitaxial layers deposited in the year 2006-2007, however, contained much nitrogen atoms near the concentration of Ib-type diamond substrates, that is, several hundreds of ppm. Furthermore, thicknesses of these deposited layers were very thinner than expected. We reexamined all deposition processes and apparatus, such as mass-flow-meter of hydrogen and methane gasses, changed the material element of sample-holder from Molybdenum to Carbon, in order to avoid adsorption of Molybdenum atoms during deposition. However, we could not get satisfactory results even after above mentioned improvement. Thus, we have largely changed deposition conditions of microwave plasma CVD processes. As a result, we have obtained high-quality diamond epitaxial layers of several microns thicknesses. These layers contained few nitrogen atoms under the detection limit of secondary ion mass spectroscopy. Furthermore, heavy ions contamination on the epitaxial layers was not entirely observed, as far as Rutherford Backscattering Spectroscopy measurement was concerned. We also observed surface morphology of epitaxial diamond layers on the very flat type-Ib diamond substrates using atomic force microprobe, however, showing considerable amounts of uneven structures. These uneven structures would be made much flatter under the condition of shorter deposition time, corresponding to a few microns thicknesses of epitaxial layers. We implanted Boron ions into type-IIa high-quality diamond substrates, and measured electrical properties of implanted substrates, using Hall-effect measurement method. We found that resistivity of implanted type-IIa diamond substrates show logarithmic increase versus inverse of absolute measurement temperature. The activation energies of these samples show different two phases. One is low energy range from 0.2 to 0.4 eV, and the other value is 1.7 eV. The later denotes nitrogen activation, contained in the substrate very little below the 1 ppm concentration. The former exhibits activation of defects introduced by ion implantation, or activation of implanted dopant Boron atoms.

**Keywords:** diamond, epitaxial layer, ion-implantation, Hall effect, microwave plasma, CVD

### 序論

ダイヤモンド半導体は、バンドギャップが広く絶縁耐性が高いなど電気的特性に優れ、耐熱性や耐放射線特性などの物理的性質を持つことから次世代半導体デバイスとして注目されている。

図1はダイヤモンド半導体の適用背景を示したものである。エレクトロニクスでは主に、1) 電力、交通産業に代表されるエネルギーエレクトロニクス、2) 情報通信産業の情報通信エレクトロニクス、3) 航空宇宙や原子力に代表される極限環境エレクトロニクスに分類される。エレクトロニクスの拡大によりエネルギー関連のデバイスでは、高パワー化、低損失化、高速制御化が要求される。また情報通信関係では、高周波数化、高密度化、高速化が要求される。一方、極限環境で使用される航空宇宙では、高温動作や耐放射線化が要求される。これらの要求条件に対して、Si から SiC やダイヤモンドデバイスが検討されている。

表1はダイヤモンドとシリコンの諸特性を示したものである。ダイヤモンドでは禁制帯幅がSiに比べ5倍である。この禁制帯幅が広い物質は、電子の励起を制御するための熱エネルギーが多く必要とな

り高温下での動作が可能となる。またダイヤモンドは格子振動を介した熱伝導が非常に大きく、Siに比べ18倍の熱伝導率をもっているため発生した熱を逃がしやすく、高パワー化が期待できる。さらに電子が固体物質中を移動する際の最大速度を示す飽和電子ドリフト速度が高い。この数値が大きいほどキャリアの移動速度に対する許容値が大きいことにより高速動作するデバイスの素材として優れていると言える。また、絶縁破壊は、絶縁体（ダイヤモンド

表1. ダイヤモンドとシリコンの諸性質

		ダイヤモンド	シリコン
禁制帯幅 [eV]		5.5	1.1
熱伝導率 [W/cm・K]		20	1.5
飽和電子ドリフト速度 [cm/s]		$2.5 \times 10^7$ ( $7 \times 10^6$ )	$1 \times 10^7$
絶縁破壊電界 [V/cm]		( $3.5 \times 10^6$ )	$3 \times 10^5$
ホール移動度 [cm <sup>2</sup> /V・s]	電子	2000	1500
	正孔	2100	450

( )内の数値はダイヤモンド膜

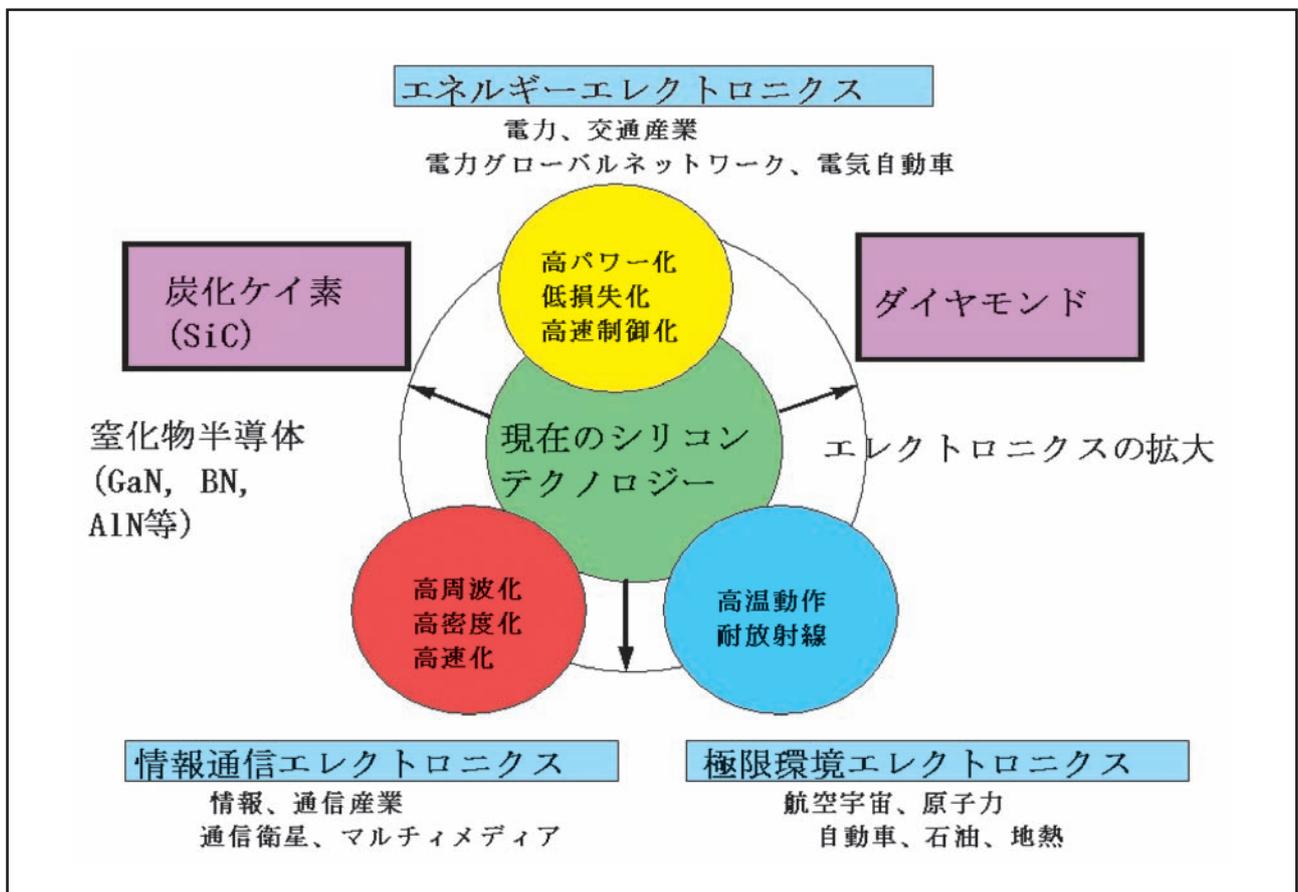


図1. ダイヤモンドの適用背景.

ド半導体) を介して導体間に放電現象が起きて導通する現象である。この絶縁破壊電圧が高いと導体間を隔離している絶縁体が高電圧に耐えることができる。ホール移動度は、固体物質中でキャリアが移動する際の移動のし易さを表す数値で、より高速デバイスに適しているのはダイヤモンドである。これらのように Si と比較すると、ダイヤモンドはより優れた数々の特徴があることが分かる。

しかし、ダイヤモンド半導体はドーパントイオン注入時、あるいは注入後の熱処理により、ダイヤモンド中にグラファイトが形成される問題や、ダイヤモンド格子が非常に緻密であるため通常の熱処理では注入ドーパント原子が置換位置に入らず、電気的に活性化することができない等の問題がある。そのため通常の熱処理によるイオン注入層の電気的活性化が困難で、ダイヤモンド半導体の  $n$  型化はできていないのが現状である。

上記の外部状況とは独立に著者は 23 年に及ぶ NTT 研究所時代に、2.5-MeV Van-de-Graaff 型加速器による MeV 級イオンビーム照射とそれを利用した物性実験、或いは小型 SOR(Synchrotron Orbital Radiation) 光源用超伝導電子蓄積リングの設計、製造に携さわった。即ち、一貫して、加速器科学、又はそれを利用した物性物理学の分野で仕事をしてきた。

その中でも特に Van-de-Graaff 加速器を利用したイオンビーム誘起結晶成長法 (Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization, IBIEC) は、著者の代表的な業績である。IBIEC は著者が Si に MeV 級イオンビームを照射することにより、通常の熱処理温度 (550-600°C) より遥かに低温 (200-300°C) で非晶質 Si 層が下地の単結晶 Si 基板に対してエピタキシャル単結晶成長することを見出したのが世界最初である<sup>1,2)</sup>。その後、世界各地でこの研究が活発に行なわれた<sup>3-17)</sup>。対象も Si だけではなく、Ge, SiGe, BP, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等さまざまな材料に広がり、この現象が観測されている。理論的検討も活発に行なわれ、この現象を説明する各種モデルが提案された<sup>18-20)</sup>。

通常イオン照射は照射損傷を誘起し、結晶性を低下させる方向に作用する。しかし、IBIEC により通常の熱処理よりも遥かに低温において、非晶質層がエピタキシャル成長して、むしろ逆に結晶性が増加する方向に作用する。このような一見逆説的な現象がなぜ起きるのか、さまざまなモデルが提案され議論されている。基板単結晶界面付近で非晶質層内部に誘起される何らかの形の欠陥 (空格子点や未結合手等) が低温結晶化或いは欠陥回復に寄与していること、また 照射イオンの電子的非弾性散乱が単結晶化を増速することも分かってきた<sup>21-23)</sup>。しかし、

この現象を総括的かつ定量的に説明するモデルは未だ提案されていない。

この IBIEC という非熱平衡過程を利用した結晶化の方法を、通常の熱平衡過程である熱処理では全く電気的に活性化が不可能な、イオン注入ダイヤモンドの電気的活性化に利用できないかと着想した。ダイヤモンドに IBIEC を適用したという報告は、著者等による検討以外ない。

この IBIEC を Si に応用した例では、この非熱平衡過程という特徴を最大限に生かして、Si の固溶限界を超えて高濃度 ( $10^{21}/\text{cm}^3$ ) に As イオン注入でドーパされた Si に対しても、その注入した As の 80% 以上を置換位置に入れて電気的に活性化させることに成功している。

前記したように 40 年以上に及ぶ世界中の努力にも拘わらず、通常の熱処理によるイオン注入ダイヤモンドの  $n$  型化は実現出来ていない。唯一、Prince が酸素イオン注入により、 $n$  型を形成したとの報告があるが<sup>24,25)</sup>、 $n$  型ドーパントではない酸素イオン注入で  $n$  型がどうしてできるのか (ダブルドナーなのか) とか、あるいは酸素そのものの性質ではなく、酸素イオン注入による欠陥が誘起した  $n$  型層ではないかとか議論の余地があり、ドーパントイオン注入による  $n$  型活性化と断定するには至っていない。

これらの問題を解決するため、当研究室では IBIEC による非熱平衡過程を利用したアニールを行なう前に、先ず、1000 °C 程度の高温状態でダイヤモンドにドーパントをイオン注入し、電気的活性化を目指すことにした。即ち、高温イオン注入により、注入中に形成されるダイヤモンドのグラファイト化を極力防止することを目指したプロセスである。しかし、グラファイト化を防止するだけではなく、高温イオン注入したドーパントイオンが母材 C 原子のダイヤモンド格子置換位置に注入後に取り込まれて電気的に活性化しなければならない。そのために先ず、高温イオン注入が可能な中電流イオン注入装置を 2006 年 3 月に導入した。現在、高温イオン注入条件とデバイス特性の関係を検討している。

この中電流イオン注入装置を用いて高温イオン注入し、グラファイト化を抑制できたとしても、注入ドーパントイオンが高温イオン注入後にダイヤモンド半導体の格子置換位置に取り込まれない可能性も考えられる。即ち、高温イオン注入だけでは電気的に活性化しない場合も有り得る。その時にはさらに IBIEC プロセスを試みて MeV 級イオン照射により注入ドーパント原子を電気的に活性化させることになる。

一方、ダイヤモンド半導体には高品質のダイアモ

ンド薄膜形成がプロセス上不可欠であり、マイクロ波プラズマ CVD 装置を試作し、高品質ダイヤモンド薄膜の形成の研究を平行して行なっている。最終的にはこの高品質ダイヤモンド薄膜にイオン注入によりドーパンと原子を導入し、これを電氣的に活性化させることが最終目標である。

次に 2005 年度から 2007 年度にかけて行なってきた研究経過の概要を述べる。

## 研究経過

2005 年度においてはマイクロ波プラズマ CVD 装置の改良を行った。高品質ダイヤモンド薄膜の形成には以前から通産省 電子技術総合研究所（電総研、現在の経済産業省 産業技術総合研究所、産総研）と共同研究を行った結果、800℃で数十時間の膜形成時間が必要であり、装置の耐熱性が問題となった。

そこでこの問題を解決するために冷却機構を設計し、マイクロ波電力を従来の 500W から 750W まで上げて薄膜形成をすることが可能となった。形成膜の評価については、SIMS 分析（二次イオン質量分析）を用いた不純物の有無の評価、ホール効果測定装置を用いた電氣的特性評価を開始した。ただし、ホール効果測定ではオーミックコンタクトが取れない問題や電流がリークして測定できない問題があった。

2006 年度からは、電氣的特性評価を目的にホール効果測定の詳細な検討を始めた。2005 年度までの電極構造は、Au/PtRh/Ti 構成での形成膜としていた。Au 膜は超音波ボンディングする Au ワイヤーとの接続を密にすることに、PtRh は Ti の酸化防止と Au との合金化を防ぐために、Ti はホール効果測定でオーミックコンタクトを取るために用いていた。

本来は Au/Pt/Ti という三層構造にすべきであるが、Pt が高価なこととたまたま PtRh ターゲット金属が手元にあったので上記の電極構造にした。この電極構成では超音波ボンディング時にワイヤーが剥がれる問題が生じた。剥がれた面を光学顕微鏡で観察した結果、PtRh 部で剥げやすいことが分かった。そこで、PtRh を取り除いても Ti の酸化は防止できると考えた。最終的に Au/Ti 構成で電極形成し、Au ワイヤーをボンディングした結果、ダイヤモンド基板の電極に Au ワイヤーを取り付けることが可能となった。また、膜形成時に使用するマスクの寸法が大きく電極がダイヤモンドの側面に接触しそこで電流がリークしていることが分かったのでマスク構造を変更した。電流リークの他の問題としてホール効果測定時にアルミナセラミック製の試料ホルダーの汚れからのリークを考慮する必要があることが分かりその原因の調査を始めた。

## 問題点の所在と研究の進め方

2007 年度には上記に示した従来手法では再現性良くダイヤモンド薄膜形成ができないこと、またイオン注入ダイヤモンド試料の電氣的測定評価がホール効果測定装置により再現性良く測定できないという問題点が新たに出てきた。具体的な問題点を下記に示す。

### ①高品質ダイヤモンド薄膜の形成

- 1) 購入したダイヤモンド基板の平坦度不良により、薄膜形成後に凹凸ができる。
- 2) ダイヤモンド膜形成の膜厚の再現性が取れない。
- 3) 膜の品質が悪い。

### ②イオン注入ダイヤモンドの電氣的活性化

- 1) ホール効果を測定するための電極形成の再現性がとれない。（この問題についてはマグネトロンスパッタ装置の条件検討から始めた。）
- 2) 高抵抗材料のホール効果測定条件の改善が必要。

そこで、当研究室の研究項目を①高品質ダイヤモンド薄膜の形成と②イオン注入ダイヤモンドの電氣的活性化の 2 つに分類し、それぞれを個別に検討することとした。

まず「高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価」では、購入したダイヤモンド Ib<sup>①</sup> 基板の表面の凹凸が大きい問題があったため 2007 年度は基板の平坦化を検討した。方法としては、基板上に C をイオン注入し、表面をグラフィート化してそれをエッチングすることにより平坦化した。しかし 2008 年度購入したダイヤモンド Ib 基板は平坦度が元々良好だったので、2008 年度以降の実験はダイヤモンド基板をそのまま使用し高品質薄膜形成用基板として使用している。

一方「イオン注入ダイヤモンドの電氣的活性化」では、本来は前項の高品質ダイヤモンド薄膜を形成後、不純物をイオン注入して活性化させ p 型、n 型の特性評価を行う。研究の効率化を考慮し、純度の高いダイヤモンド IIa 基板を使用してイオン注入条件の検討とホール効果測定のための電極形成、ホール効果測定条件の解明を中心に検討した。また当研究室における最終目標は、ダイヤモンド薄膜に P などの 5 価の不純物をイオン注入法で導入し、n 型不純物半導体を作製することである。その前段階として、高温イオン注入の効果を把握するため、まず高品質ダイヤモンド薄膜に B をイオン注入し電氣的に活性化させ p 型のダイヤモンド半導体を作製することとした。次項目からそれぞれの検討結果を述べる。

## 方法と結果

### おおまかな実験の流れ

高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の実験の流れは以下のようにになっている。

- 1) Ib 基板に平坦化処理を行う。<sup>注2)</sup>
- 2) 基板をマイクロ波プラズマ CVD 装置にセットし薄膜形成を行う。
- 3) 光学顕微鏡、AFM、SIMS、RBS 及びラマン分光装置で基板を評価する。

### ダイヤモンド基板の平坦化

2006 年度、Ib 基板に 10 時間および 30 時間薄膜形成した結果、右の図 2 のように凹凸が生じた。<sup>27)</sup>

この結果から、10 時間薄膜形成させた基板の方が 30 時間薄膜形成させたものよりも凹凸が大きいことが分かる。この原因は元々の基板表面の凹凸が 10 時間薄膜形成基板では大きく残留し、薄膜形成時に蓄積し拡大していったものと推測した。

2007 年度においては、新たに購入した基板の表面自体が AFM 観測により荒れていることが判明し、さらに問題となった。そこで産業技術総合研究所で行われた平坦化処理工程を参考にし、以下の手順で平坦化処理実験を進めた。

- 1) 凹凸のある Ib ダイヤモンド基板に中電流型イオン注入装置により、ダイヤモンド構成原子である C のイオンを注入する。これにより、ダイヤモンド結晶構造を形成する  $sp^3$  結合<sup>注3)</sup>

<sup>注1)</sup> ダイヤモンド Ib 基板と IIa 基板。本実験で使用したダイヤモンド基板は Ib 基板と IIa 基板である。2 つの基板の違いは基板に含まれている N の量である。N の含有量は Ib 基板では 100 ppm 以上、IIa 基板は 1 ppm 以下である。高品質ダイヤモンド薄膜の形成では薄膜とダイヤモンド基板との界面が知りたいため Ib 基板を使用し、イオン注入ダイヤモンドの形成ではドーパントイオン注入させた B の性質を評価したいので IIa 基板を使用した。

<sup>注2)</sup> 前項で述べた通り 2008 年度に購入した Ib 基板を AFM で表面観察した結果、平坦な面であったのでこの工程は省略している。ただし一度使用した基板を再生できる技術でもあるので、今後はイオン注入ダイヤモンドの形成の実験などで役立つだろう。

<sup>注3)</sup>  $sp^3$  結合とは 1s 軌道にある 1 個の電子と 2p 軌道にある 3 個の電子が混成軌道を形成し、C 原子の原子核に対してテトラポットの方向（正三角錐の頂点の方向）に 4 つの結合手（電子）を伸ばしている状態である。ダイヤモンド構造においてはどの一つの C 原子をとっても、この方向に結合手が出ている結晶構造になっている。また、 $sp^2$  結合とは同様に 1s 軌道にある 1 個の電子と 2p 軌道にある 2 個の電子が混成軌道を形成し、C 原子核に対して平面的に正三角形の頂点方向へ結合手（電子）が出るような混成軌道を形成している状態である。残りの 1 個の電子は p 電子と呼ばれ、自由に動き回れる自由電子となっている。従って、グラファイトは導体であり、金属的な性質を持つ。

を破壊し、グラファイト結晶構造を形成する  $sp^2$  結合を多数形成する。

- 2) イオン注入後の基板をアルゴン雰囲気中で高温アニールを行い表面を多結晶グラファイト化する。すなわち、 $sp^2$  結合がイオン注入により多数形成されており、それらが、多結晶のグラファイトに成長する。
- 3) 酸洗浄を行い基板のグラファイト化した表面部分をエッチングする。酸の溶液で容易にグラファイトは基板から分離される。

イオン注入する際には注入エネルギーとドーズ量の両方の値を設定しなければならない。具体的なエネルギーとドーズ量の数値を決めるために過去におけるダイヤモンドへのイオン注入データを参考にした。まず、イオンの加速エネルギーを決定するため SRIM2008 というコードを用いてシミュレーションを行った。SRIM とは Stopping and Range of Ions

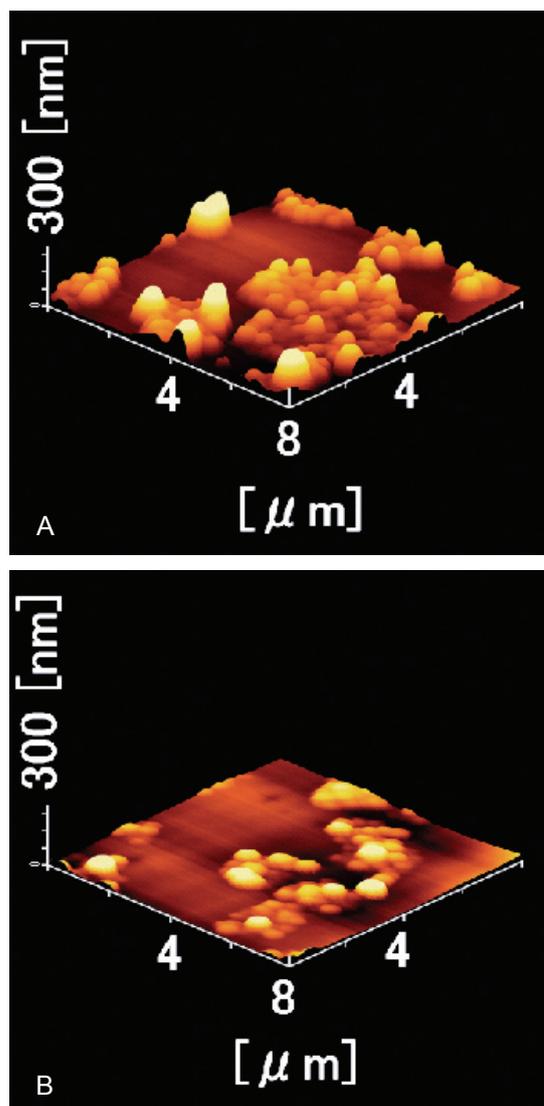


図 2. A. 10 時間薄膜形成 AFM 像図. B. 30 時間薄膜形成 AFM 像.

in Matters の略である。

図3にSRIM2008コードで計算したダイヤモンドへのCイオン注入欠陥分布(空格子点分布)を示す。図の縦軸は入射Cイオン1個に対して、深さ方向1オングストローム当たり何個の空格子点が発生するかを表わしている。従って縦軸の数値にドーズ量を掛けると、その深さにおける単位体積当たりの空格子点濃度が算出される。

20 keVでCイオン注入すると欠陥分布(空格子点分布)のピークは100 Å付近に、50 keVでCイオン注入すると分布のピークは600 Å付近にあることが分かる。そこで、ダイヤモンド基板をアモルファス化させる注入条件は、過去のデータも参考にしながら加速エネルギー20 keV、50 keVに対して、 $10^{16} / \text{cm}^2$  オーダーのドーズ量が必要だと予想した。従ってドーズ量の設定値を  $1.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$ 、 $3.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$ 、 $5.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$  に振り、それぞれを比較することにした。

図4は表2に示した5枚の基板のイオン注入後のAFM像である。これらの像から明らかなように、Cイオン注入後のIb基板はそれぞれ凹凸に差が出たが、イオン注入前の表面形態(ここには示されていない)とイオン注入後の形態とは殆んど変化しなかった。これは  $5 \times 10^{16} / \text{cm}^2$  程度の照射量では組成比を変化させるほどの量ではないからである。とくに図4Aに示した再利用基板の表面の凹凸は著しい

ことが分かった。

CイオンをIb基板に注入したことにより、基板表面にはダイヤモンドの結晶構造である  $sp^3$  結合を破壊した、アモルファス層(非晶質層)が形成される。イオン注入ドーズ量を増加させることにより、 $sp^3$  結合を殆ど消滅させたアモルファス層が形成される。この時、基板上の凹凸は殆んど変化しない。注入後アニール処理を行うことによりポリグラファイト層(多結晶層)に変化すると同時に凹凸が緩和される。

このグラファイト層形成には赤外線加熱炉を用い、アニール処理を行った。アニール条件は  $850^\circ\text{C}$ 、1時間でArを流量3 liter/minで流した。アニール後、Ib基板を目視すると全て表面は黒く変化していた。アニール後のAFM像を図5に示す。これらの図から縦軸スケールが40 nmであることを考慮すると著しく凹凸が緩和されたことが分かる。特に再利用基板の平坦化が著しい。

図4に示したようにCイオン注入後のIb基板は表面の凹凸にばらつきがあったが、アニール処理後の基板はどれも凹凸が軽減された。これはIb基板がポリ(多結晶)グラファイト化される時に平坦化が進むと同時に基板に付着されていた汚染物質がアニール処理によって除去されたことが考えられる。

最後に、Ib基板表面層の多結晶グラファイト層を除去するためエッチング処理を行う。エッチングに使

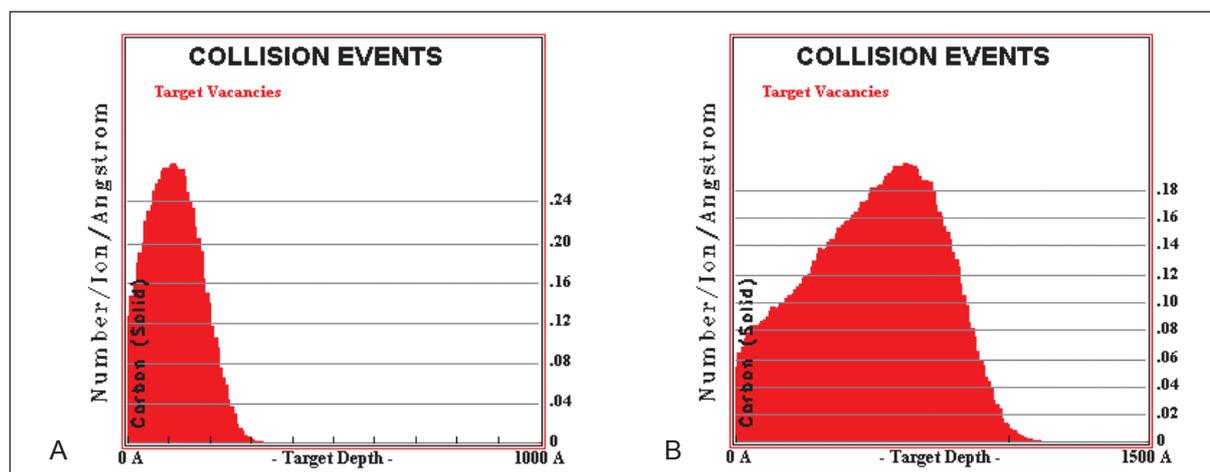


図3. A. 加速エネルギー20 keVの空格子点分布. B. 加速エネルギー50 keVの空格子点分布.

表2. 各種ダイヤモンド基板を平坦化するためのCイオン注入条件

基板	加速エネルギー	ドーズ量	基板の状態
1	20 keV	$1.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$	再利用
2	20 keV	$3.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$	2007年度購入新品
3	20 keV	$5.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$	2007年度購入新品
4	50 keV	$1.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$	2007年度購入新品
5	50 keV	$5.0 \times 10^{16} / \text{cm}^2$	2007年度購入新品

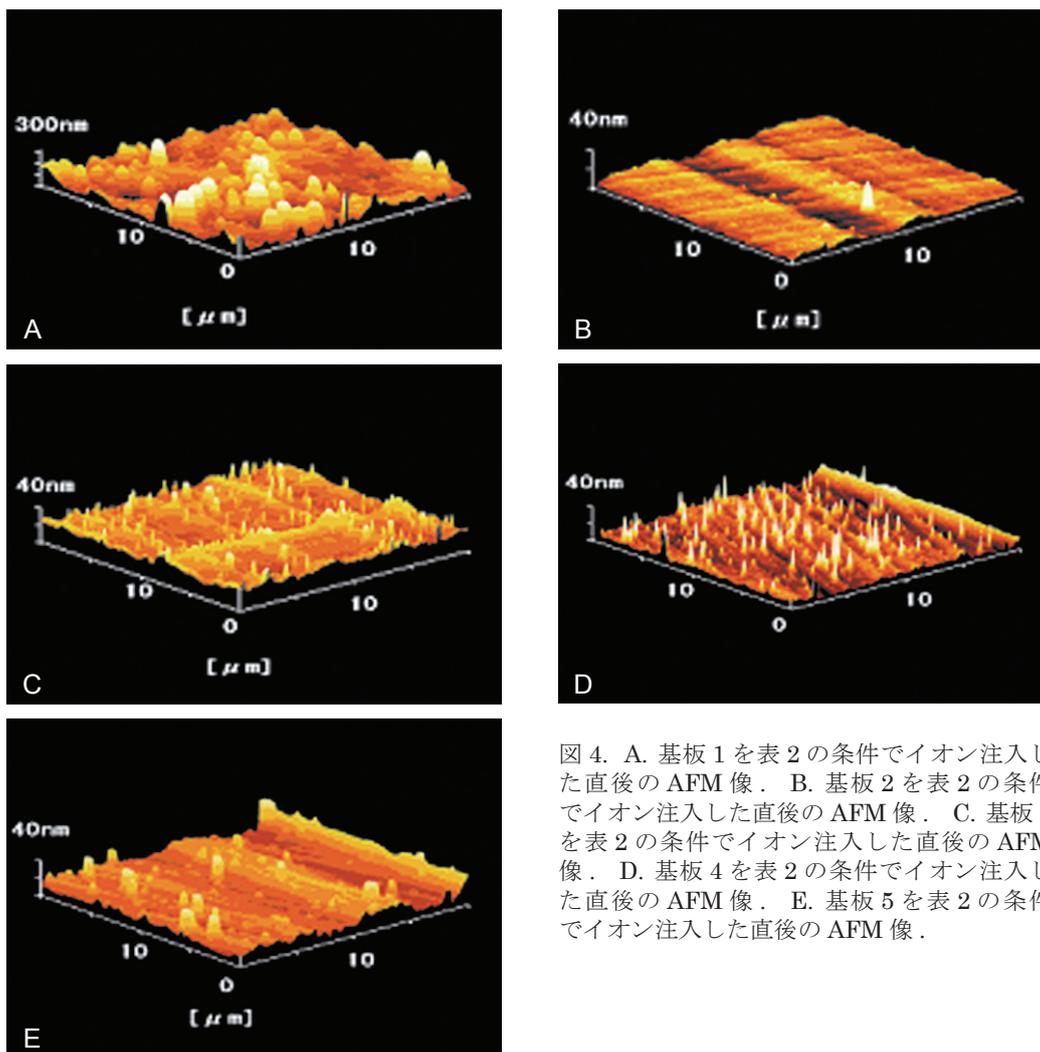


図4. A. 基板1を表2の条件でイオン注入した直後のAFM像. B. 基板2を表2の条件でイオン注入した直後のAFM像. C. 基板3を表2の条件でイオン注入した直後のAFM像. D. 基板4を表2の条件でイオン注入した直後のAFM像. E. 基板5を表2の条件でイオン注入した直後のAFM像.

用する薬品は硫酸と硝酸である。これを3:1の割合で混合しヒーターで30分、200℃に熱することでエッチングを行った。この工程で平坦化されたダイヤモンド層を表面に出すことができる。

エッチングを行った結果、20 keVでCイオン注入を行ったIb基板は全て元のIb基板の色に戻った。しかし50 keVでCイオン注入したIb基板はエッチング後も黒く変化した表面は変わらなかった。これは50 keVの加速エネルギーで設定したドーズ量ではイオン注入時に $sp^3$ 結合が多く存在し、アニール処理で全てグラファイト化できなかったためと考えられる。即ち、グラファイト化されない $sp^3$ 層に囲まれた $sp^2$ 層が残って黒色になっていると考えられる。

また20 keVでCイオン注入した試料でもドーズ量が $1 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>のものは平坦化できていないことが分かる。これはIb基板の表層をある程度グラファイト化させることはできたが、ドーズ量が少なかったために界面において十分にグラファイト化

せず $sp^3$ 結合が残ったためだと考えられる。加速エネルギーが20 keV、ドーズ量が $3 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>、 $5 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>でCイオンを注入したIb基板ではエッチング処理によってグラファイト層の完全除去に成功し平坦化することに成功した。

以上の結果から、図3に示されているように欠陥分布が表層に固まり、さらに深さ方向にテイルのない欠陥分布が望ましい。20 keVの加速エネルギーの方が、急峻な欠陥分布であることが分かる。図3A,Bに示したように50 keV注入の方がテイル部分の欠陥が奥まで分布し、 $sp^3$ 結合が残ることによりグラファイト化された $sp^2$ 結合がエッチングされずに残ってしまう。実際、アニール処理後のエッチングで表面が黒いグラファイト層が完全にエッチングされずに残ってしまった。

**長時間堆積ダイヤモンド薄膜形成の問題点とその克服**  
高品質ダイヤモンド薄膜の成長は過去2年に渡りIb基板上にマイクロ波プラズマCVD法により形成し

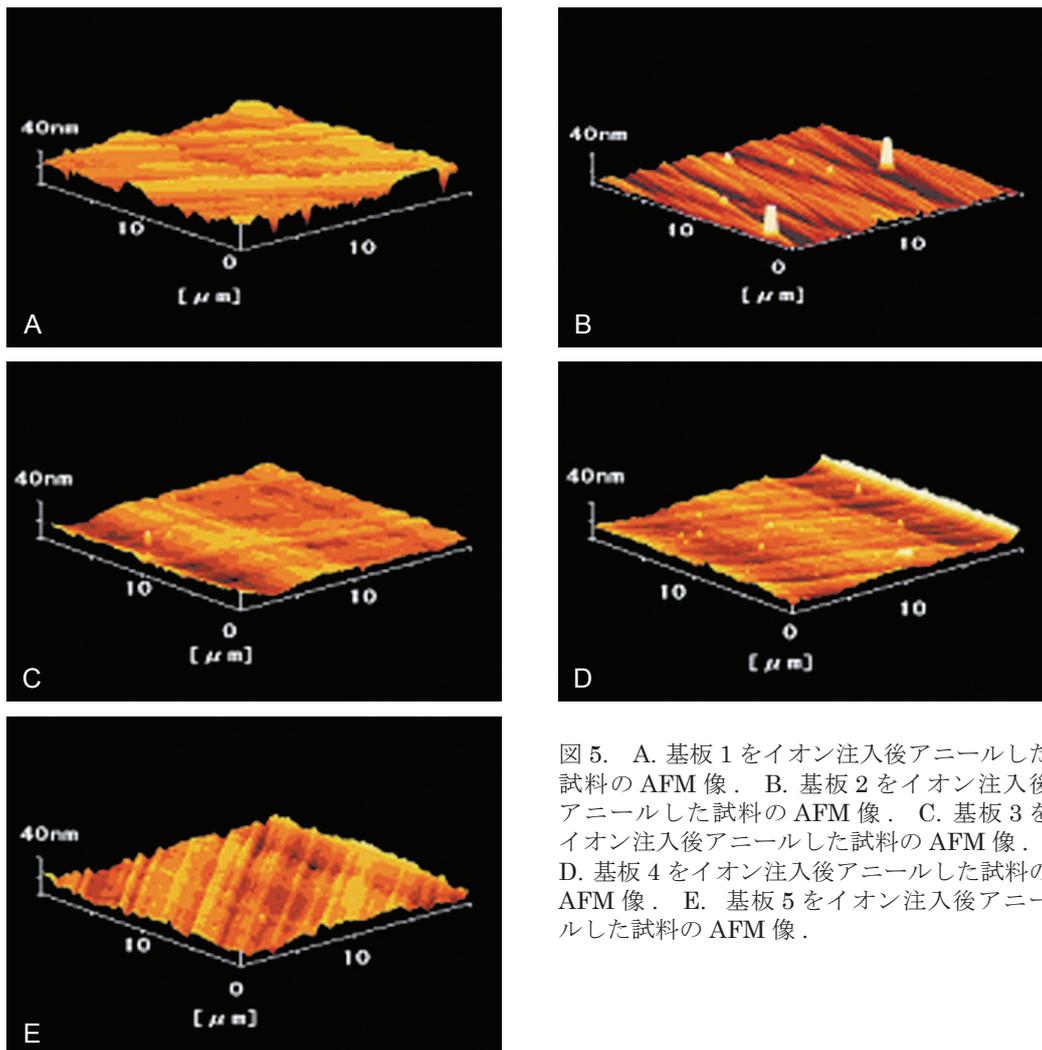


図5. A. 基板1をイオン注入後アニールした試料のAFM像. B. 基板2をイオン注入後アニールした試料のAFM像. C. 基板3をイオン注入後アニールした試料のAFM像. D. 基板4をイオン注入後アニールした試料のAFM像. E. 基板5をイオン注入後アニールした試料のAFM像.

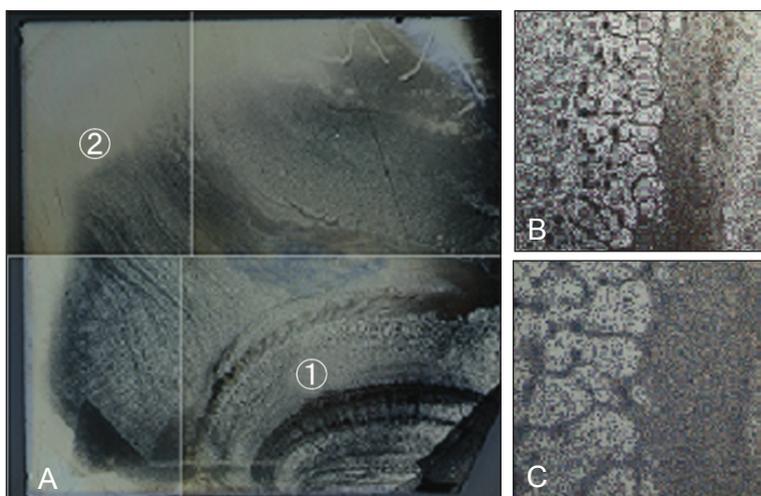


図6. A. 30時間成長のIb基板全体の光学顕微鏡像. B. A図の①の領域を200倍に拡大した図. C. A図の①の領域を500倍に拡大した図.

ようと試みてきた。マイクロ波プラズマ CVD 法とは薄膜形成法の一つで、石英出製の反応管内で加熱した基板上に薄膜成分を含む原料ガスを供給し、表面で化学反応で膜形成を行う方法である。この時に化学反応を活性化させる目的で、反応管内を減圧プラズマを発生させる。ダイヤモンド薄膜は  $\text{CH}_4$  ガスを  $\text{H}_2$  で低濃度に希釈し、マイクロ波を照射して分解することによって単結晶ダイヤモンドをエピタキシャル成長させることで形成している。

当研究室では 2006 年度、2007 年度と 10 時間程度の成長時間においては比較的、平坦な薄膜が形成できる条件を見出してきた<sup>26)</sup>。

そこで 2007 年度後半、Ib 基板上で 30 時間での薄膜形成を試みた。その結果、前ページ図 6 の光学顕微鏡像に示すようにひどく荒れた面ができてしまった。しかも、荒れの程度が基板面で一様でなく、図 6A の①の部分②の部分よりも荒れ方が著しいという場所による不均一さが観測された。

図 7 に、図 6A に示した①、②の箇所における AFM 像を示す。光学顕微鏡像から予測されるように、図 7A に示すように①の箇所においては AFM 像からも大きな凹凸が観測された。②の箇所については図 7B に示すように AFM でも比較的平坦であることが確認できた。さらに次ページマスフローメーター (Mass Flow Meter, MFM) 指示値の絶

対値校正の項で詳述しているように、この基板を SIMS 分析測定したところ、比較的平坦な②の箇所におけるダイヤモンド薄膜の厚さは  $0.1\mu\text{m}$  程度しかないことが分かった。

これら表面荒れと薄膜成長速度が極端に遅い原因を検討した結果、表面荒れについては CVD 中に基板を保持している Mo ホルダーが原因となっていること、またダイヤモンド薄膜の結晶成長速度が著しく遅いことは  $\text{CH}_4$  の流量、すなわち、MFM の指示値に問題があると推測した。

### Mo ホルダーが CVD 膜形成へ与える影響

図 7 に示した AFM の結果から基板の凹凸は  $\mu$  波プラズマ CVD 装置中での Ib 基板を保持する Mo ホルダーに原因があるのではないかと推測した。

図 8 に  $\mu$  波プラズマ CVD 装置の試料ホルダー部分の構造を示す。この図から明らかなように試料は Mo ホルダーに囲まれている。プラズマはこのホルダー全体を包み込むような形で存在している。プラズマにより、ホルダーからスパッタされた Mo 原子がラジカルあるいはイオン状態になって不純物として CVD ダイヤモンド膜中に取り込まれた可能性がある。それが原因となって CVD 膜の様な成長を阻害し、凹凸の多い薄膜になってしまったと考えられる。

そこで Mo に着目して SIMS 分析を行った。Mo

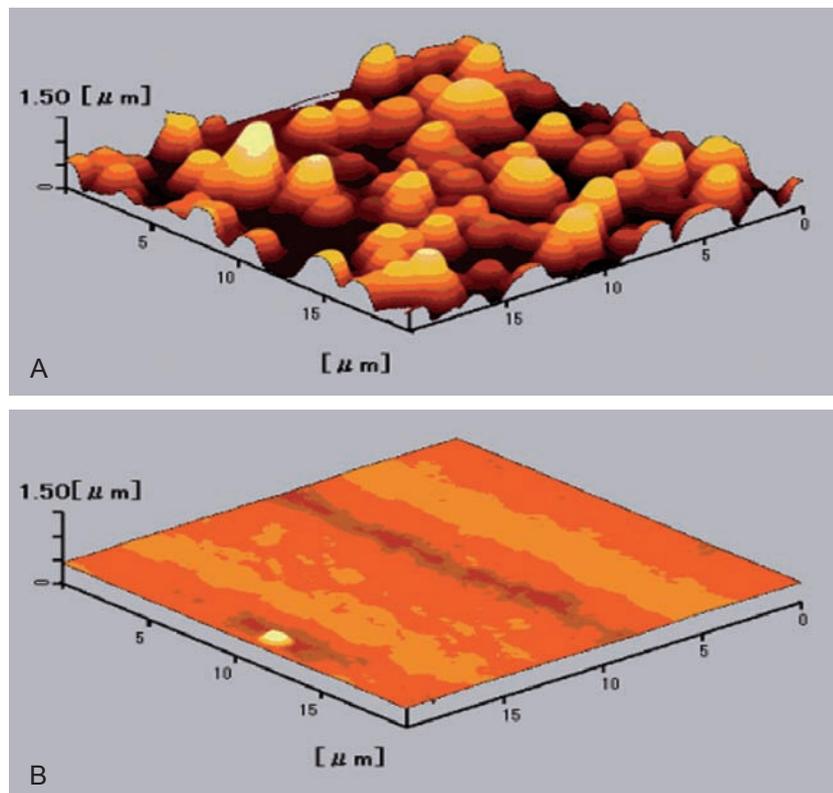


図 7. A. Ib 基板の①の箇所の AFM 像. B. Ib 基板の②の箇所の AFM 像.

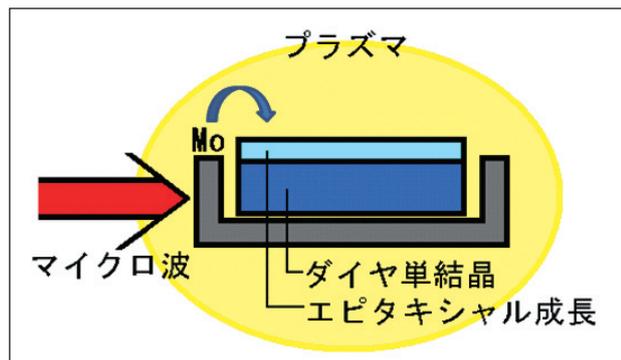


図8. マイクロ波プラズマ CVD 装置における試料近傍の構造.

の SIMS 分析に使用する一次イオンビームは、窒素原子分布の測定に使用する一次イオンビームである O (酸素) イオンと異なり、Cs (セシウム) イオンを使用している。

図 9A,B は図 6 の①と②の場所における SIMS 分析結果である。

図 9A,B から、①、②の両方の場所から Mo が検出された。より荒れている①の面は②の面と比べて 3 倍近くの Mo が測定されたことが分かる。この問題を解決するため、μ波プラズマ CVD 装置の Mo ホルダーをダイヤモンドと構成元素が同じ C ホルダーへと変更した。

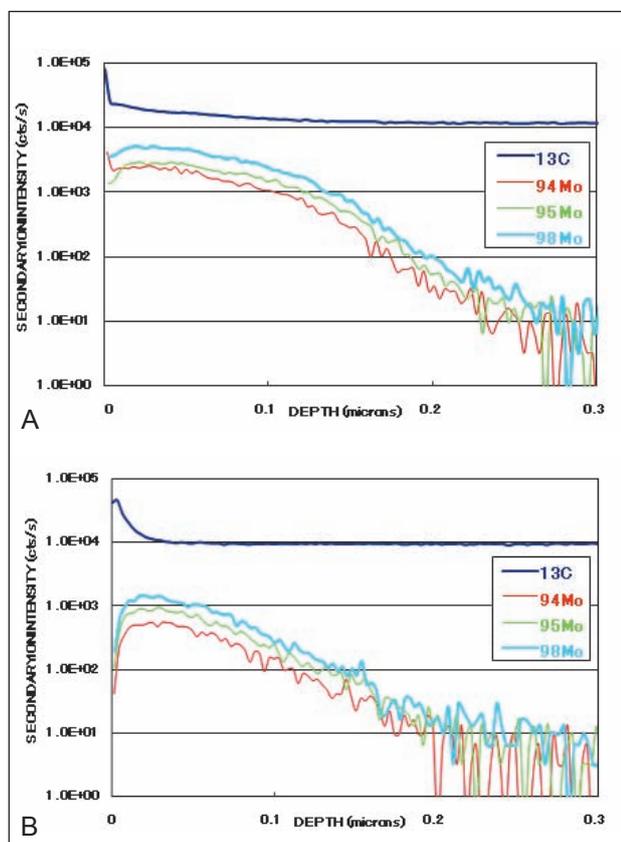


図 9. A. 図 6A の①の位置における SIMS 分析結果. B. 図 6A の②の位置における SIMS 分析結果.

### MFM 指示値の絶対値校正

図 6A の②の領域は Mo の影響が比較的少ない場所で、正常に近い形で薄膜形成が行われていると予想される。

図 10 は、②の領域において N と C に着目し SIMS 分析測定を行った測定結果である。この結果から実際に形成された薄膜の厚さは 0.1 μm 程度だということが読み取れる。この実験では 2μm 程度の成長を予想していたのに対し成長速度が極端に遅いことが分かった。この原因は CH<sub>4</sub> ガスと H<sub>2</sub> の流量比が設定値と実際の値とで異なっているためではないかと予想した。そこでより正確な流量に調整できる MFM に入れ替え、流量の絶対値測定を試みた。

2007 年度までプラズマを立てるために使用していた CH<sub>4</sub> ガス用の MFM の MAX 指定値は 10 sccm であったが、2008 年度より精密度を上げるため MAX 指定値が 1 sccm のものに新しく変更した。これによってより細かく流量を設定できるようになった。次ページの図 11A, B は従来の MFM と新しく購入した MFM である。次の図 12A, B は、これらの MFM のデジタル表示値と実際に測定される流量との関係を示したグラフである。

これらの測定値 (sccm, Standard CC per Minutes) は、以下のプロセスで導出した。CVD 装置の真空チャンバーの容積と温度 (室温 300 K) を仮定し、真空度の時間的変化を測定する。その傾きと理想気体の状態方程式を使って、標準状態に換算した時の単位時間当たりの流量 (sccm) を算出した。

その結果と、MFM 装置のデジタル表示値との差を誤差とした時、新しい MFM の誤差は平均 10 %、従来使用していた MFM の誤差は平均 20 %、また現在使用中の水素用 MFM (MAX 指定値 400 sccm) の誤差は平均 15 %であることが分かった。従来使用していた MFM から新しい MFM に変える事で 2008 年度においては 2007 年度より流量の誤差を少なく抑えることが可能になった。

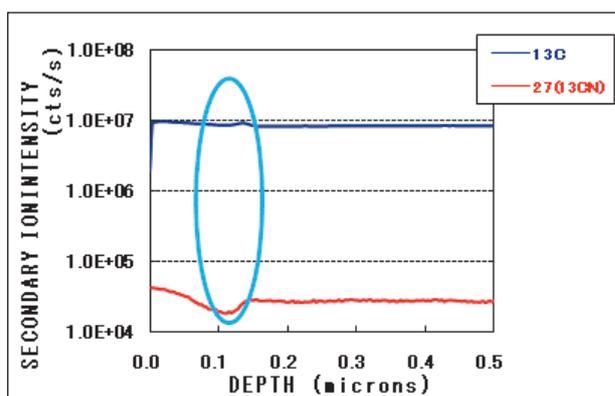


図 10. N と C に着目した SIMS 分析結果.

**装置改良後の CVD ダイヤモンド薄膜の形成と評価**

これまでの問題点であった Mo ホルダーと MFM を改善して Ib 基板にマイクロ波プラズマ CVD 装置で 10 時間薄膜形成を行った。

図 13A と B は成長前の基板表面と成長後の薄膜表面を AFM で測定した結果である。成長前後で縦軸のスケールが 20 nm 以下とほとんど変化がない事から非常に平坦な高品質の薄膜が形成されたと予

想した。そこでこの試料を SIMS 分析した。

図 14 は N に着目して定量 SIMS 分析を行った結果である。非常に高品質な薄膜が形成されていることを予測したが、膜と基板間で予想される N 濃度の差が観測されなかった。N 濃度の絶対量は  $3 \times 10^{19} / \text{cm}^3$  で 170 ppm 程度であり、Ib 基板そのものの N 濃度であった。即ち薄膜が全く生成されなかった。

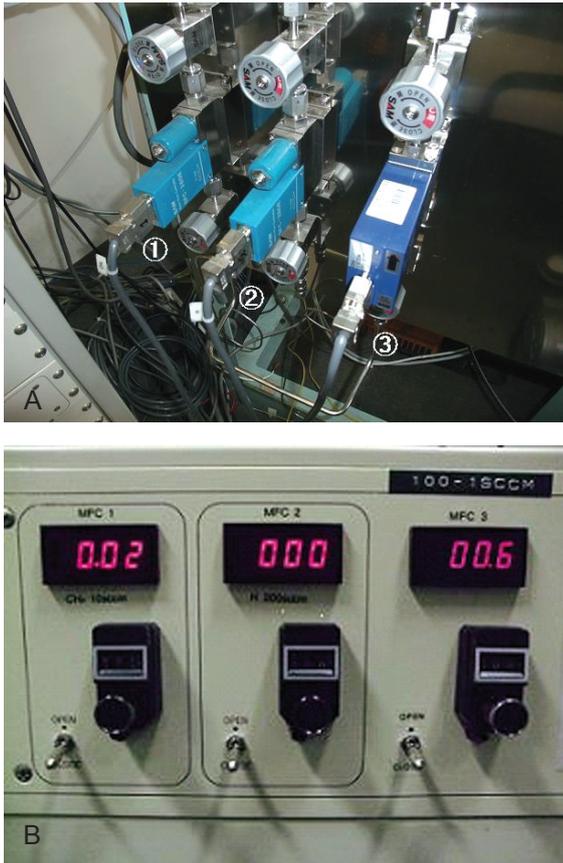


図 11. A. 3 個の MFM の写真 . ① 旧 CH<sub>4</sub> MFM (MAX 10 sccm). ② H<sub>2</sub> MFM (MAX 400 sccm). ③ 新 CH<sub>4</sub> MFM (MAX 1 sccm). B. MFM 調節ダイヤル . ① 旧 CH<sub>4</sub> MFM (MAX 10 sccm). ② H<sub>2</sub> MFM (MAX 400 sccm). ③ 新 CH<sub>4</sub> MFM (MAX 1 sccm).

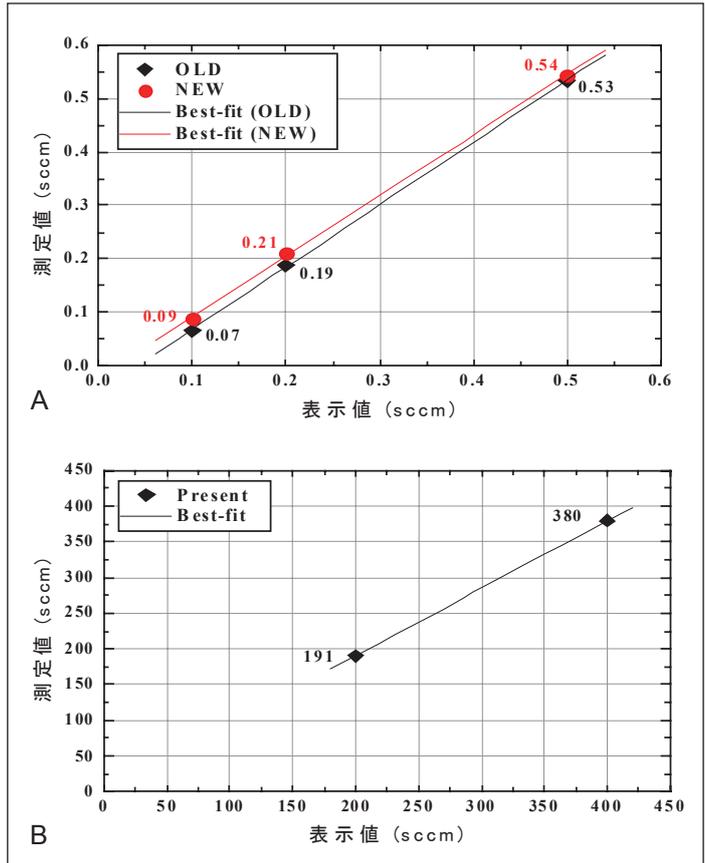


図 12. A. CH<sub>4</sub> マスフローメーターのデジタル表示値と実測値の比較 . B. H<sub>2</sub> マスフローメーターのデジタル表示値と実測値の比較 .

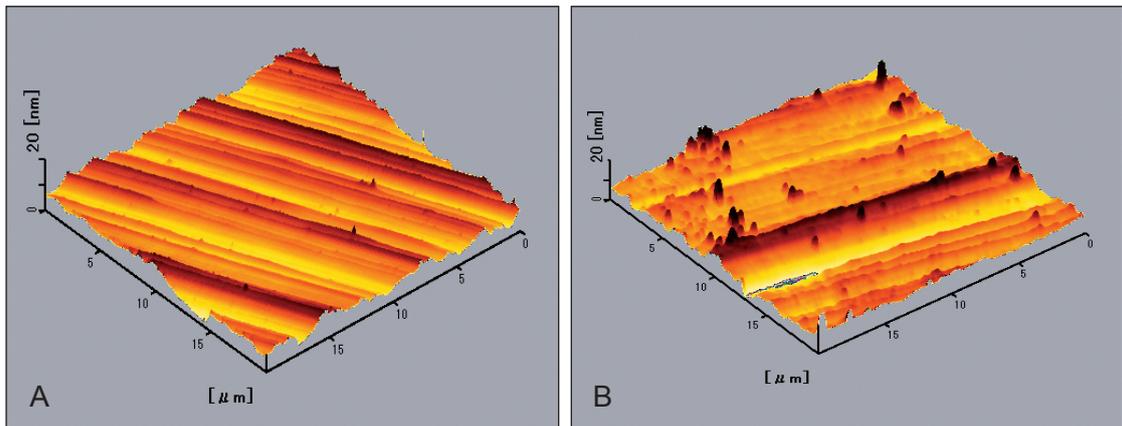


図 13. A. CVD 前の基板の AFM 像 . B. CVD 後の基板の AFM 像 .

### CVD 条件の大幅見直しと成長ダイヤモンド薄膜の各種分析評価

そこでこの問題を解決するため薄膜形成条件の大幅な変更を行った。従来は  $\text{CH}_4$  濃度や  $\mu$  波電力、基板温度を低く設定してゆっくりエピタキシャル成長を行い、高品質な薄膜を形成していた。しかし、ホルダーの素材を変更したり、MFPM を交換することで、プラズマ形成条件が変化し、薄膜成長速度が殆どゼロになったものと思われる。そこで、従来条件を大幅に見直し、表 3 に示す各種条件で成長させた。

### 光学顕微鏡による薄膜表面の評価

図 15 は表 3 中のそれぞれの条件で  $\mu$  波プラズマ CVD 装置によって Ib 基板上に形成したダイヤモンド薄膜を光学顕微鏡で観察した像である。倍率は 50 - 200 倍である。高倍率の像から条件②、③、④ではピラミッド状の結晶が、また条件③では大きさ  $100\mu\text{m}$  程度の大きさに結晶が成長していることが確認できる。条件⑤は光学顕微鏡では薄膜が形成されているかどうかは確認できなかった。

CVD 成長前の基板には研磨による細かいスクラッチが観察されるが、マクロな凹凸はほとんど観

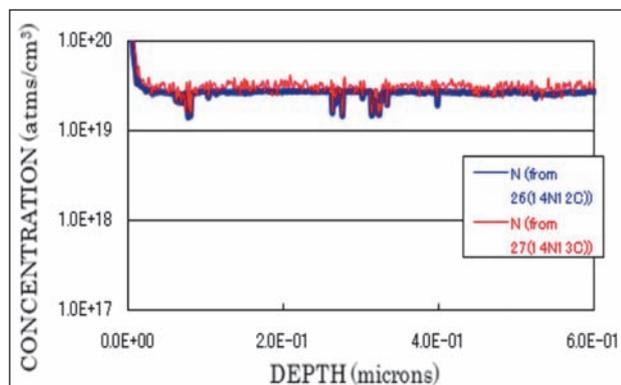


図 14. CVD ダイヤモンド膜成長後の試料の SIMS 分析結果。

表 3. 薄膜形条件

	条件①	条件②	条件③	条件④	条件⑤
成膜時間	10 時間				
メタン濃度	0.05 %	1.00 %	1.00 %	2.00 %	1.00 %
水素流量	400 sccm	100 sccm	100 sccm	50 sccm	100 sccm
メタン流量	0.2 sccm	1.0 sccm	1.0 sccm	1.0 sccm	1.0 sccm
マイクロ波電力	750 W	750 W	950 W	950 W	950 W
圧力	25 Torr	25 Torr	25 Torr	50 Torr	50 Torr
基板温度 (設定温度)	800 °C	800 °C	900 °C	900 °C	900 °C

察されない。一方、CVD 成長後の試料は、マクロな凹凸が増加している。現状の条件②、③、④の条件下での薄膜成長基板は、Ib 基板に比べて平坦度は低い。しかし、その中でも③の条件下では比較的大きな凹凸であり、③の 200 倍像で見ると明らかのように四角錐のピラミッド型の結晶成長が観測できる。これは基板が (100) 面であることから底面が正方形になり、ピラミッド型に結晶成長したものと思われる。

### AFM による薄膜表面の評価

次に CVD 成長前後の原子間力顕微鏡像を示す。

図 16A は 2008 年度購入基板の CVD 膜形成前の AFM 像である。基板の凹凸の程度は、縦軸スケールが 20 nm であることを考慮すると、極めて平坦であるといえる。これは 2007 年度購入基板には著しく凹凸があり、先に詳述したような基板の平坦化プロセスを行わなければならなかったのとは対照的である。従って 2008 年度購入基板については平坦化プロセスは行わずに、通常の洗浄プロセスのみで CVD 膜を形成した。

図 16D-F は CVD 膜形成後の AFM 像であるが、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  領域をスキャンしている。左から CVD 条件②、③、④である。縦軸のスケールは②は  $1\mu\text{m}$ 、③は 20 nm、④は  $800\text{nm}$  ( $0.8\mu\text{m}$ ) である。②は圧倒的に平坦であるように見えるが、スキャンする領域を  $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  に広げると図 16G-I に示したようにサブミクロン程度のマクロな凹凸が著しく増加している。このことは光学顕微鏡像からも確かめられる。総じていえば、条件③が現状では膜の凹凸が少なく、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  領域で見た時には極めて平坦である。

### SEM による薄膜表面の評価

#### [SEM 観察像]

図 15 の光学顕微鏡の像からピラミッドの頂点に存

在する黒い斑点（特に 200 倍の条件③の像にはっきり見える）が何であるかを確かめるために SEM 観察を行った。図 17 に示す SEM 像から、光学顕微鏡で観察された黒い斑点は、数〜十数ミクロンオーダーの炭素の塊のように見える。形は、何か層状な構造物にも見える。従ってグラファイトの塊である可能性がある。サイズは、CVD 条件によって多少違うように見えるが、有意な差かどうかは不明である。基板は (100) 面なので表面から成長する結晶形は、底面が正方形のピラミッド型になることは自然である。しかし、その頂上付近で結晶形が崩れ、グラファイト成長が起こった可能性がある。最良条件の③で 10 時間ではなく 1~2 時間成長すれば、ピラミッド

型ではなく、平面的に一様な成長が期待できる。

**SIMS 分析法による CVD 薄膜中の窒素不純物濃度分布**  
 図 18A の赤線で示す SIMS スペクトルは Ib 基板の窒素濃度を表わす。ほぼ 170 ppm であり、Ib 基板特有の多量の窒素が確認された。それに対して黒は条件③で CVD 成長したダイヤモンド薄膜の分布である。含有窒素は検出限界以下であり最大でも数 ppm 以下のレベルであることが分かった。膜厚は、数 mm 以上と考えられる。図 18B - E は他施設で 4 種類の Ib 基板に堆積した CVD ダイヤモンド薄膜の分析結果である。青は  $^{12}\text{CN}$  多原子分子の二次イオン強度、赤は  $^{13}\text{CN}$  の二次イオン強度で、強度比

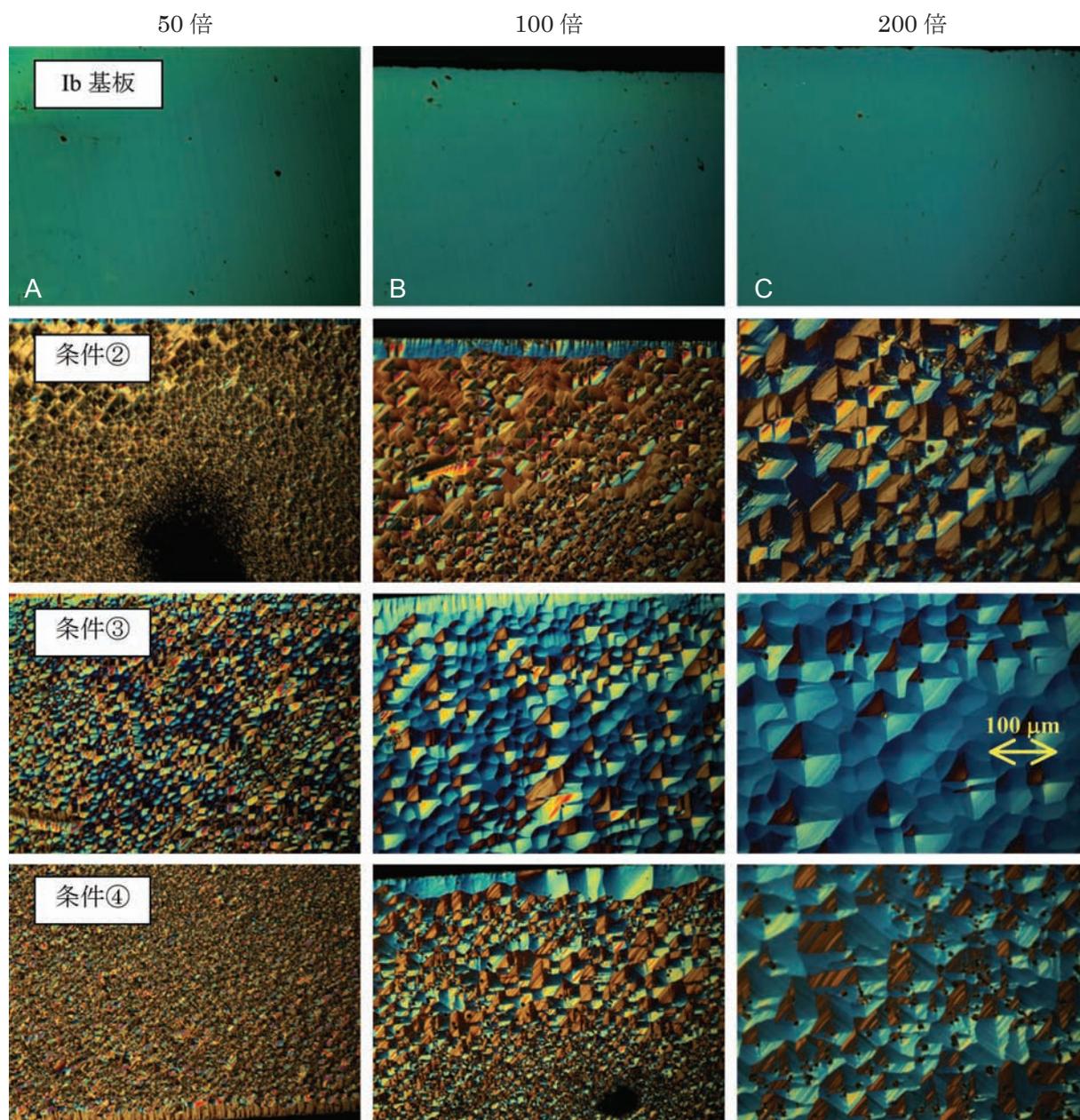


図 15. Ib ダイヤモンド基板と各条件で CVD 成長させた薄膜ダイヤモンドの微分干渉光学顕微鏡像。

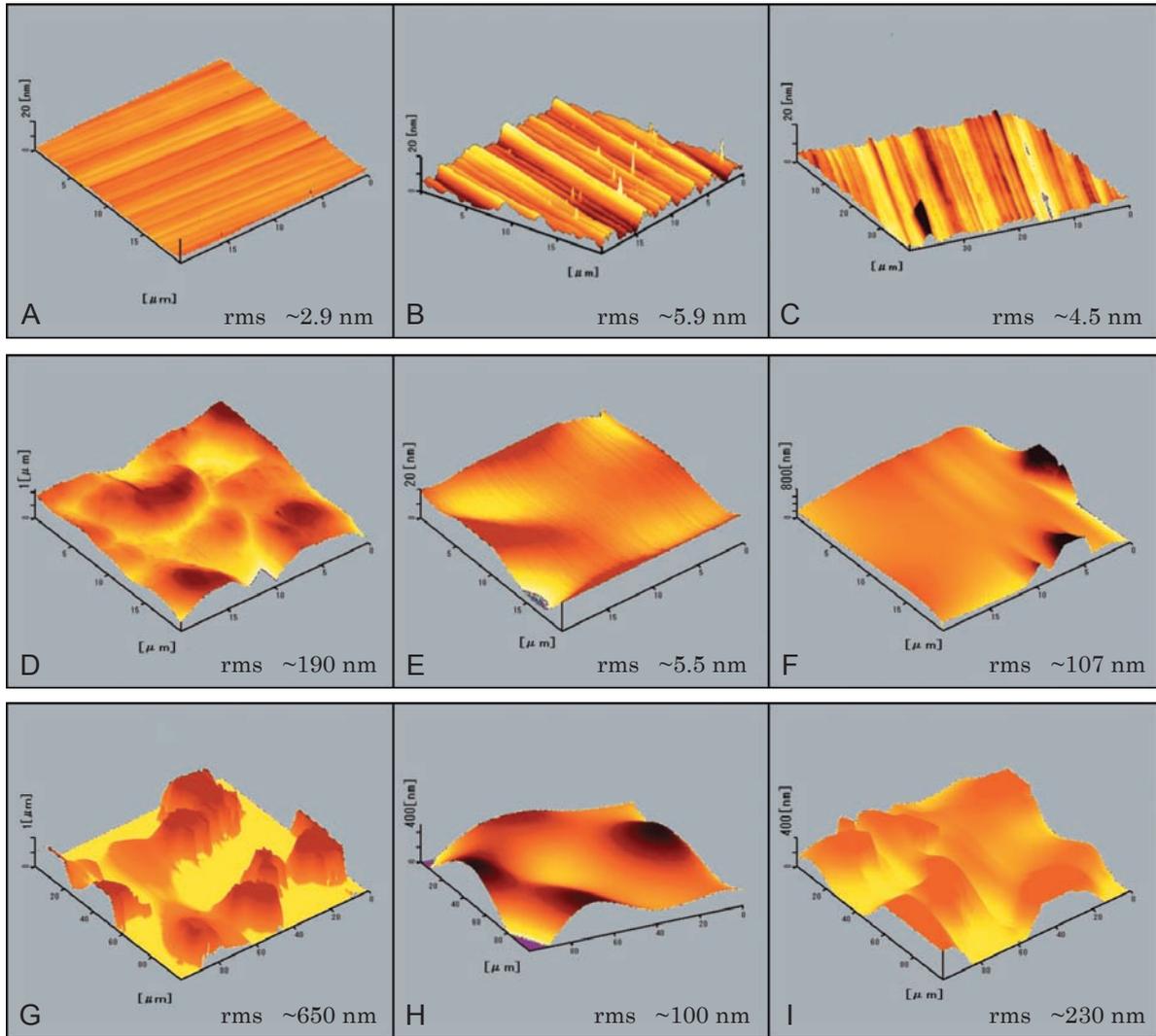


図 16. 原子間力顕微鏡像. A-C. CVD 成長前の AFM 像 ( $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$  領域) (左から条件②, ③および④). D-F. CVD 成長後の AFM 像 ( $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$  領域) (左から条件②, ③および④). G-I. CVD 成長後の AFM 像 ( $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  領域) (左から条件②, ③および④).

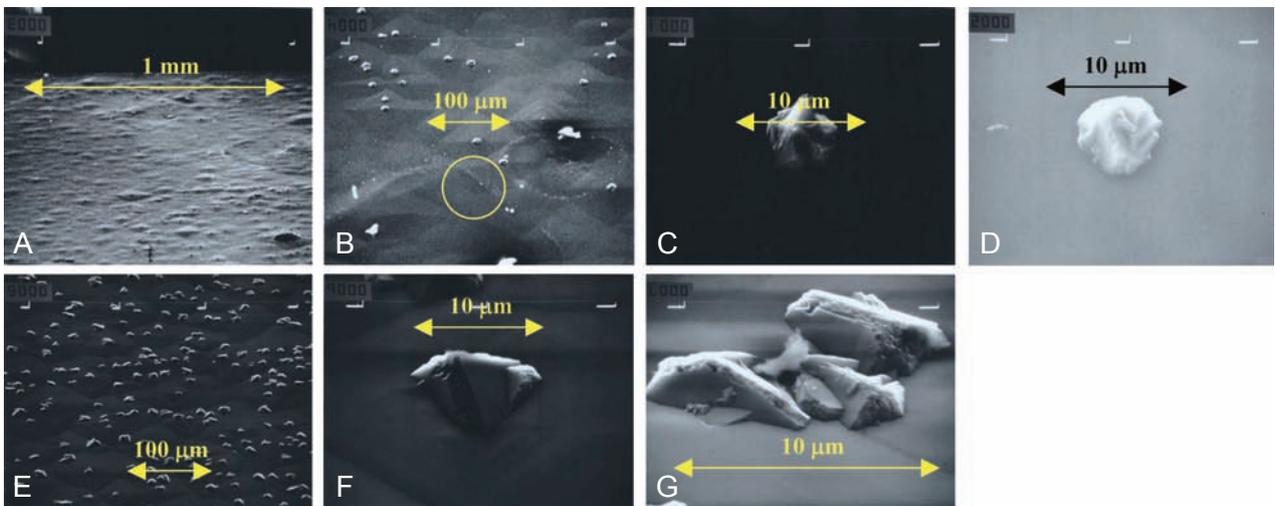


図 17. 条件③ (A-D) および④ (E-G) で成長させた表面の SEM 像.

は  $^{13}\text{C}$ N と  $^{12}\text{C}$ N の同位体存在比 1:100 になっている。これらの図から薄膜中に基板とほぼ同程度の濃度の N 不純物が含まれていることが分かる。図 18E の CVD 膜だけは N 濃度差が大きい、今回の結果は含有窒素量が遥かに小さく検知濃度以下に抑えられており、良好な結果である。

**RBS による薄膜の結晶性と膜中不純物評価**

①結晶性の評価— RBS チャネリング分析結果を図 19A に示す。Ib 基板よりは結晶性は悪い。Ib 基板の結晶性を 100 % として約 80 % 程度の結晶性であ

る。また、条件②③④の間では、それほど結晶性に差はない。図中 Pt、Ag 等の重金属の表面汚染が③試料において観測されているが、これは③試料を SIMS 分析した時に、表面チャージアップを防ぐために故意に蒸着したためであり、本来の CVD 膜に付着していたものではない。

図 19B は A のグラフにおいて縦軸を対数軸にして表示したものである。この図から母材の C 原子より高エネルギー側（高チャネル側）におけるスペクトルにおいてはノイズ以外現れておらず、殆んど元素が検出されていない。ただ、酸素とシリコンだけ

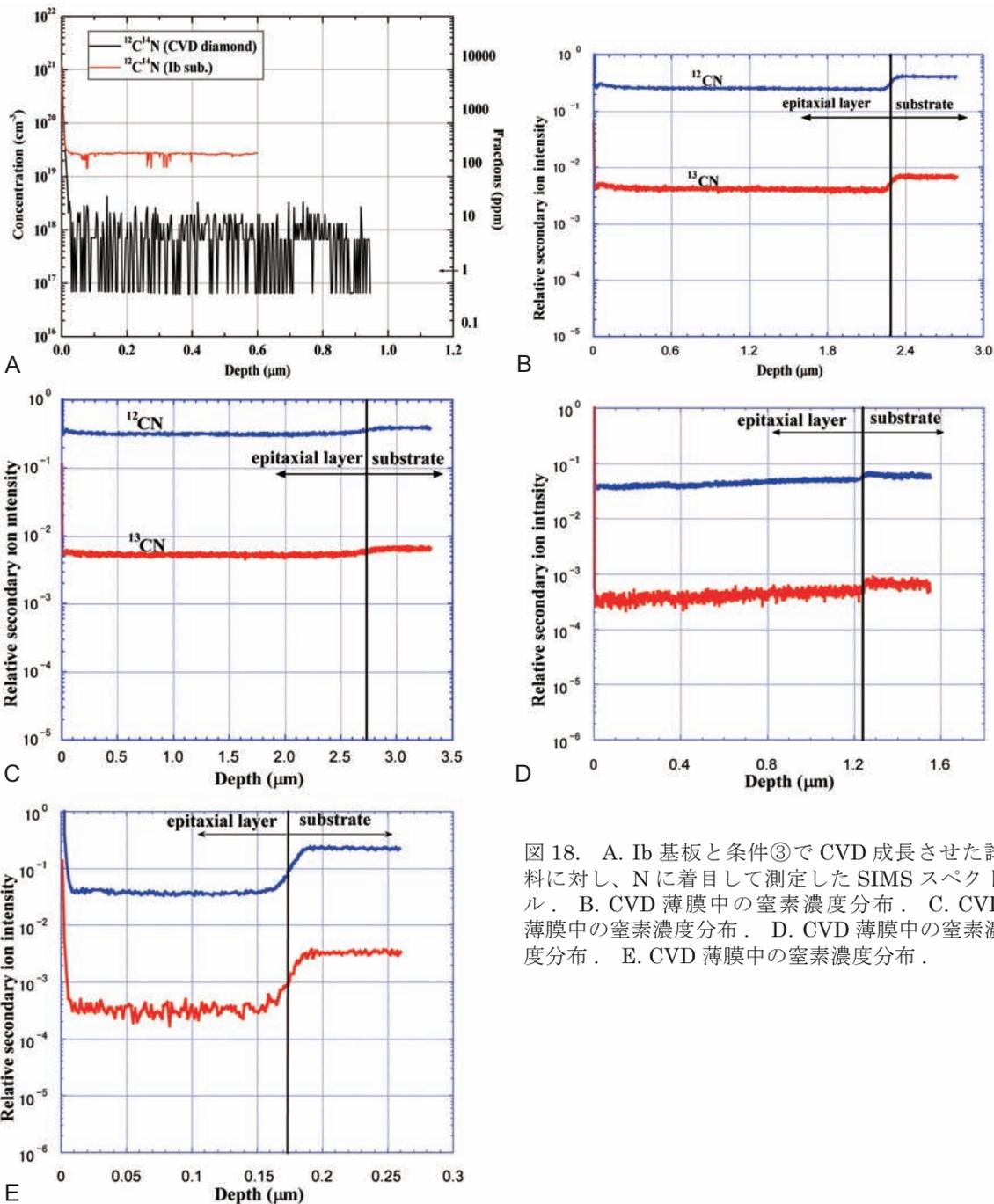


図 18. A. Ib 基板と条件③で CVD 成長させた試料に対し、N に着目して測定した SIMS スペクトル. B. CVD 薄膜中の窒素濃度分布. C. CVD 薄膜中の窒素濃度分布. D. CVD 薄膜中の窒素濃度分布. E. CVD 薄膜中の窒素濃度分布.

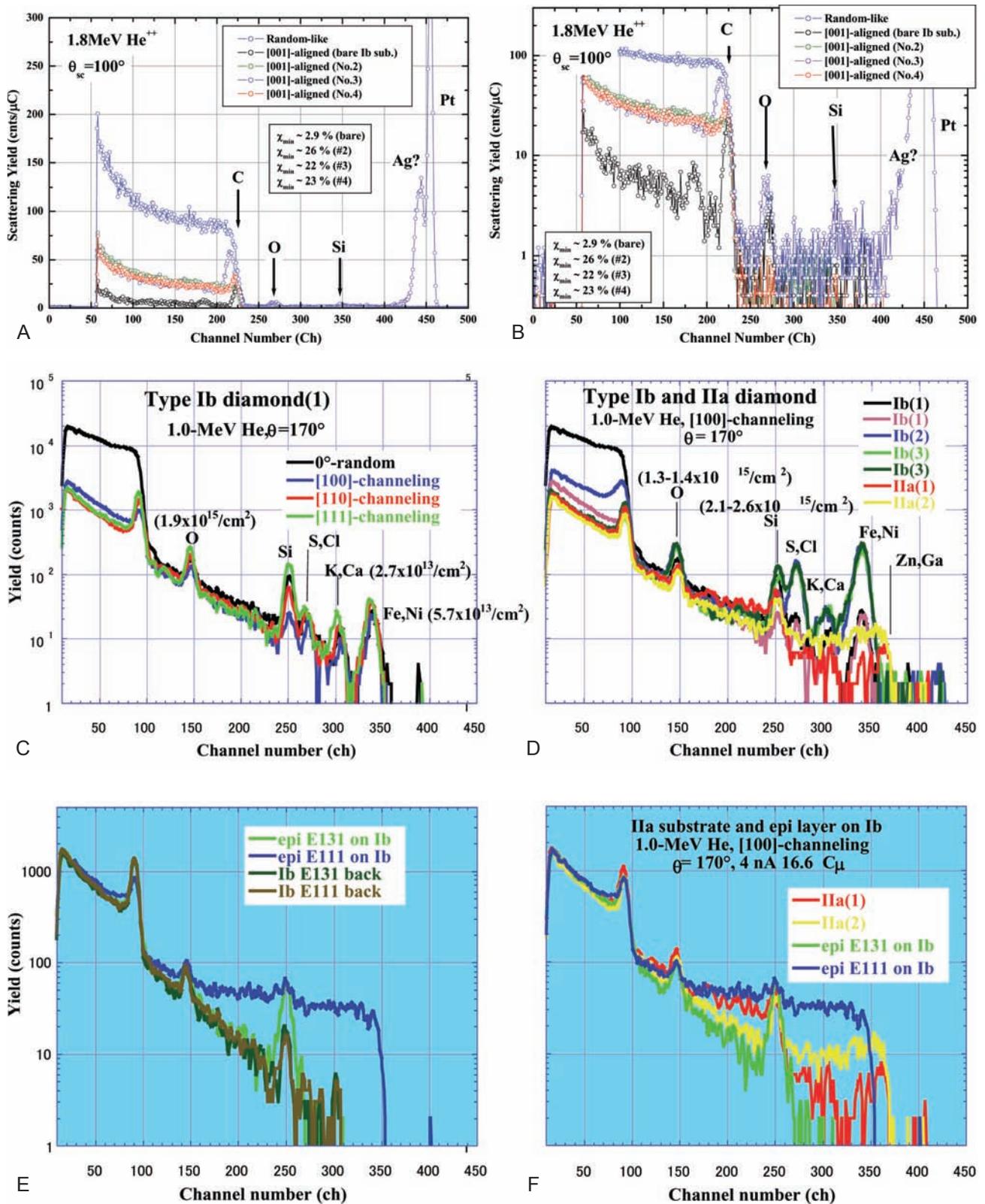


図 19. A. Ib 基板ダイヤモンドと各種条件で CVD 成長させた試料に対する RBS スペクトル (縦軸リニア) B. Ib 基板ダイヤモンドと各種条件で CVD 成長させた試料に対する RBS スペクトル (縦軸対数). C. Ib ダイヤモンド基板の各種チャネリングスペクトル. D. 各種 Ib 基板と IIa ダイヤモンド基板の各種チャネリングスペクトル E. Ib ダイヤモンド基板の各種チャネリングスペクトル F. 各種 Ib 基板と IIa ダイヤモンド基板の各種チャネリングスペクトル.

はわずかに検出されている。Ag と Pt については先に述べたように SIMS 分析時に故意に蒸着させたものである。結論として今回 CVD ダイヤモンド薄膜を堆積した試料からはすべてにおいて、重金属汚染はないと結論できる。

図 19C は数年前に取得した Ib 基板のチャネリングスペクトルである。この図から明らかなように今回の基板または CVD エピタキシャル層からは全く検出されていない鉄系の金属をはじめとして各種元素の表面汚染が顕著に観測された。しかも、100 ch から 300 ch にかけて斜めに収率が減少していることから、基板の奥深くまで一様に不純物がドーピングされていることが示唆されている。

図 19D は同じ頃取得した Ib 基板と IIa 基板のチャネリングスペクトルである。これらのスペクトルから明らかなように鉄系の重金属汚染だけではなく、さらに重い元素の汚染が認められる。高品質であるという IIa 基板からさえも重金属汚染が認められ、しかも、基板深くまで汚染元素が存在することをこれらのスペクトルが示している。

図 19E は別の Ib 基板にエピタキシャル CVD ダイヤモンド層を堆積した試料の裏（膜が堆積されておらず、Ib 基板そのもののスペクトル）と表（堆積された膜のスペクトル）のスペクトルを示したものである。この図から明らかなように、Ib 基板としては比較的汚染が少ないが、堆積した膜には鉄系の金属と思われる元素が奥深くまでドーピングされている（試料番号 E111）ことが分かる。一方、E131 基板については CVD 膜の汚染は比較的少ないが、Si については表面に基板よりも多くついていることが分かる。

図 19F は図 19D の二枚の IIa 基板と図 18E に示した二枚の Ib 基板に CVD 膜を堆積させた試料のスペクトルを同時に表わした図である。重金属汚染が広く IIa 基板のみならず、CVD エピタキシャル薄膜にも及んでおり、その分布も基板と膜中の奥深くまで及んでいることが明らかである。

このように重金属汚染に関しては Ib 基板の取得時期によっても大きく変化するし、IIa 基板にも多くの重金属汚染が認められる。また、CVD 膜にも堆積条件の違いにより、ドーピングされる重金属元素の種類と量が異なっている。これらの試料はいずれも、基板の取得時期が数年前であり、また CVD 堆積条件も現在使用している  $\mu$  波プラズマ CVD 装置ではなく他施設の装置なので、系統的にこれら重金属汚染源を特定することは現状では困難である。

以上をまとめると今回神奈川大学で試作した  $\mu$  波プラズマ CVD 装置で堆積した薄膜については、膜

中窒素濃度は SIMS 分析の検出限界以下であり、重金属汚染も殆んど認められない良好な膜であることが確認できた。

### ラマン分光法による薄膜の結晶評価

図 20A、B に示す  $1333\text{ cm}^{-1}$  におけるピークはダイヤモンド結晶特有のピークであり、 $2600\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは  $1333\text{ cm}^{-1}$  の高調波である。③の条件で成長させた CVD 膜（グラフ中では No. 3）の試料が二枚の Ib 基板とほぼ同様なスペクトルとなっており、良好な結晶性であることを裏付けている。バックグラウンドは Ib 基板より小さく、ピーク強度も小さい。このことが成長した CVD 膜の膜質とどのような関係があるのか、更なる検討が必要である。Ib 基板で観測される  $520\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは SiLO（横型フォノン）または SiTO（縦型フォノン）に起因するかも知れない。即ち、図 19C-F に示されているようにダイヤモンド基板表面は Si 原子が非常に付着しやすく、RBS 測定した殆んど基板試料で観測されている。それに対して今回成長させた CVD 膜には殆んど Si 原子が認められず、従って、 $520\text{ cm}^{-1}$  付近のラマンピークが観測されないと考えている。

図 20C に示した  $1333\text{ cm}^{-1}$  付近のピークの拡大図からピークの半値幅は基板も、②、③、④も殆んど有意な差はなかった。Ib 基板のピークが潰れているのは、おそらくソフトウェア的な問題と考えられる。即ち、ピーク強度の 4000 counts 以上はカットされている。外挿すると、結局どれもほとんど半値幅に変化はなかった。また、Ib 基板に対するピーク強度は、②：50%、③：57%、④：54% となり、半分程度である。ラマンスペクトルのピーク強度と半値幅が試料の結晶性や含まれている不純物濃度とどのように関係するのか今後定量的に検討していく。

## 討論

### ホール効果測定に伴う問題点と改善案

図 21 にホール効果測定する際の電極構造を示す。現在ホール効果測定において  $pn$  判定ができていない。まず、 $n$  型ドーパントである窒素を多量に含む Ib ダイヤモンド基板に対して、確実に  $n$  型判定ができるようにする必要がある。従来は直流磁場測定による  $pn$  判定を行っていたが、2008 年度は感度の良好で高精度な交流磁場測定を試みた。これはホール電圧の時間的変化と磁場の時間的変化の位相が合っている場合と反転している場合とで  $pn$  判定を行う方式である。例えば  $n$  型であれば両者の位相差は  $180$  度であり、反転している。 $p$  型であれば位相

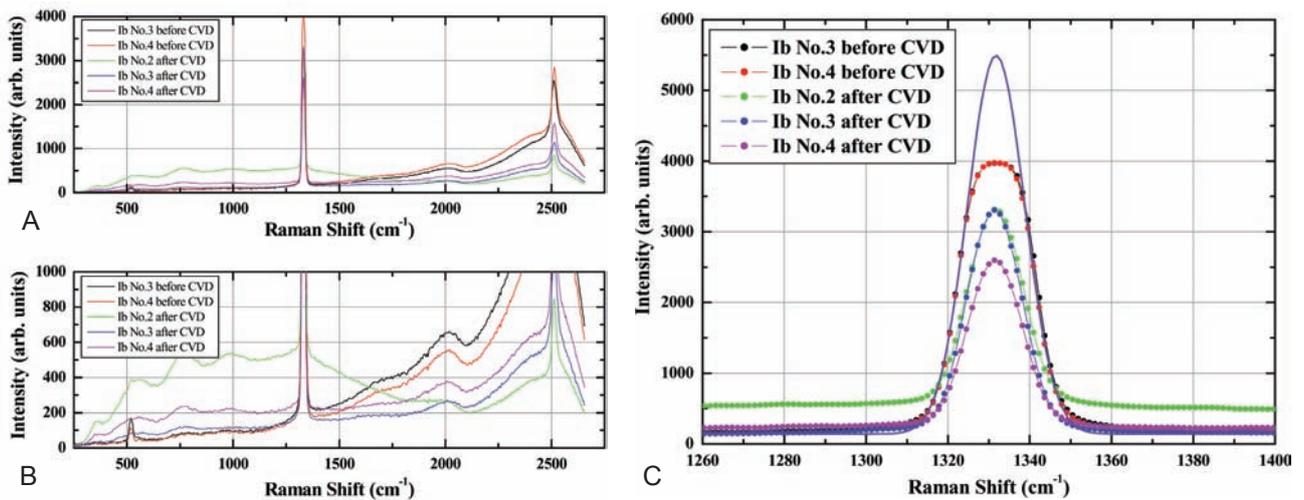


図 20. A,B. Ib ダイヤモンド基板と各種条件で CVD 成長させたダイヤモンド薄膜に対するラマン分光広範囲波長のスペクトル. B は A の縦軸拡大. C. ダイヤモンド特有の  $1333\text{ cm}^{-1}$  付近のみを拡大したスペクトル.

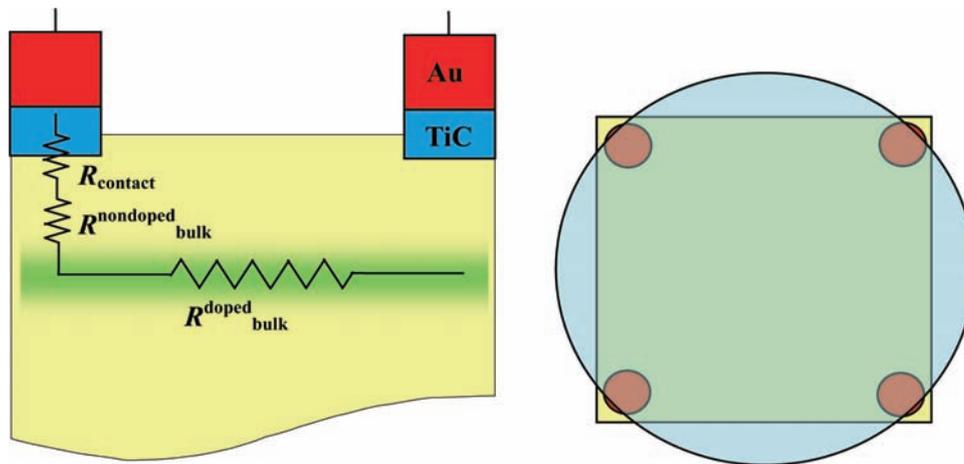


図 21. 電極の断面構造と上から見た構造図.

差はほぼ 0 度である。また交流磁場印加ホール測定には、高精度なノイズ除去演算が組み込まれており、ダイヤモンドなどの高抵抗材料に対して、信頼性の高いホール測定が可能になる。

### pn 判定に関する現状

室温 (RT) - 200 °C では、高抵抗のためコンプライアンス電圧が上限の 105V に達してしまうため測定不能となる。Ohmic 特性 (二つの電極間に流れる電流が二つの電極にかける電圧に比例すること) も確認できていない。

200 - 600 °C では、再現性よく位相も含めてキャリアタイプは n 型を示す。ただし高温になるにつれて、電流の極性反転に対するホール電圧の位相の反転が鈍くなる。

600 - 800 °C では、位相が全く反転せず pn 判定不能となる。

なお、二つの電極間に流す電流値は、 $1 \times 10^{-8}\text{ A}$

で設定している。pn 判定の基準としては、主にノイズ電圧と位相のズレなどであるが、ノイズ電圧も 600 °C 以上では、ホール電圧並みに高くなりデータの信頼性が著しく低下する。また、一度 600 - 800 °C 以上に加熱した試料に関して再測定を試みると、600 °C 以下でも (再現性よく) 測定不能となる。ノイズ電圧の上昇および位相がズレなくなる原因としては、昇温により何らかの原因で正負キャリアが同程度となり、有効的なキャリア濃度が減少したことなどが考えられる。これらを総合して検討した結果、有効なキャリア濃度が減少した原因として、以下の 3 つが挙げられる。

### 考えられる原因

① 600 °C 以上の温度における試料またはホルダーの汚染 (電氣的短絡など): ここで、ホルダーに使用されている絶縁物であるアルミナと Ib ダイヤモンドの抵抗率を考えた時、アルミナ自身を電流が

流れることは考えにくい。アルミナの比抵抗（文献値）は室温で  $1.0 \times 10^{14} \text{ W cm}$ 、 $900^\circ\text{C}$  で  $2.5 \times 10^6 \text{ W cm}$  である。即ち、ダイヤモンド Ib 基板の比抵抗の方がはるかに小さい。

従って、電極自身が接触しているダイヤモンド表面の汚染（表面伝導）が効いていると考えた方がいいと思われる。Ohmic 特性の変化を追跡すれば、何か手掛かりがつかめるかも知れない。

②  $600^\circ\text{C}$  以上において電極の化学的・電気的变化：現在の電極の形成温度は約  $550^\circ\text{C}$  であり、Hall 効果測定時に初めて  $550^\circ\text{C}$  以上に昇温される。Ohmic 特性の変化と共に各測定温度点における電気測定結果（比抵抗、シートキャリア濃度、移動度、 $pn$  判定等）を確認すれば、なんらかの変化の兆候をキャッチできるかも知れない。もし、変化がキャッチ出来れば、温度上昇途中で電極構造に化学的变化が起こらないかどうか確認する必要がある。一般的に、Ti と Au の間に挟む Pt は Au と Ti との合金化を防止するために付けられるが、 $600^\circ\text{C}$  以上において、Au と Ti（実際は、ダイヤモンドと反応して、TiC を形成している）の化学的变化を確認すべきである。即ち、金-Ti 合金が形成され、電気特性評価に影響してないか確認する必要がある。ダイヤモンドの電気測定を行う場合、Pt を Ti と金の間に挿入した三層の電極構造にしなければならないかも知れない。

一方、金の融点は約  $1000^\circ\text{C}$  程度であり、特に真空中での融点降下（蒸気圧降下）を考えると、 $800^\circ\text{C}$  で金電極部分からダイヤモンド表面に拡散が起こらないか検討する余地はある。ただし、産総研では金/Pt/Ti の三層構造で測定済みで特に問題は起きていない。しかし、ダイヤモンドは非常に高抵抗なので、ごく微量でも表面に広がれば致命的である。

### ③電極と半導体の間での Ohmic コンタクト

電極（金属）と半導体の接触部分で Ohmic コンタクトが十分取れているか確認する必要がある。Ohmic コンタクトを取りやすくするため電極と半導体の接触界面に多めにキャリアをドーピングすることが通常行なわれている。

- 1) 産総研におけるダイヤモンド測定の場合：電極と接するダイヤモンド表面部分に Ar または C 照射によってグラファイト化することを神奈川大学の提案によって実行し、良好な電気測定結果を得ている。
- 2) SiC の場合：特に表面層には多めにキャリアドーピングを行っている。
- 3) Si の場合：4-5 段で  $n$  型ドーパント（P 等）を多段注入し、最後は As などを低エネルギー

で注入し、 $n^+$  型にすることが行われている。

## 原因の確認方法

洗浄器具の汚染などを介して、試料やアルミナホルダーの汚染が問題になる可能性を探索する。具体的には以下の確認プロセスにより、試料の汚染が原因かまたはアルミナホルダーの汚染が原因かを確定できる。

### 【確認方法】

- i) レファレンスとして、試料無しでアルミナホルダー自身の電気測定を行なう。  
→ 高抵抗のため測定不能になることが予想される。このとき、温度は  $800^\circ\text{C}$  まで上昇させる。
- ii) 窒素が高濃度にドーピングされている（数百 ppm）Ib ダイヤモンド基板を室温（RT）-  $800^\circ\text{C}$  まで通常の Hall 効果測定を行う。  
→ 窒素は  $n$  型ドーパントなので  $200^\circ\text{C}$  程度以上から  $n$  型を示すことが期待できる。現状は  $500 - 600^\circ\text{C}$  くらいから  $pn$  判定不能になる。このとき、Ohmic 特性の変化とシート抵抗の絶対値もチェックする。
- iii) 再度室温に戻し、ii) の測定を繰り返す  
→ これまでの結果では、ii) の結果は  $500^\circ\text{C}$  以下の温度において再現していない。このことは最初の測定で  $500^\circ\text{C}$  以上に上げた時に、試料またはアルミナホルダーに何らかの不可逆変化が起きたことを意味する。このことを再確認する。
- iv) Ib ダイヤモンド基板のみを洗浄し、Hall 効果試料ホルダーは洗浄せずに再測定。  
→ もし測定可能であれば、試料が原因（ダイヤモンド基板表面の汚染か電極自体の化学的・電気的变化など）。つまりホルダーは汚染されていないか影響が無視できる。  
→ もし測定不可能であれば、試料またはホルダーに原因がある。
- v) iv) の実験で測定不能であった場合、Ib ダイヤモンド基板はそのままにし、Hall 効果試料ホルダーのみ洗浄して再測定。  
→ もし測定可能であれば、試料ホルダーの汚染が原因と断定できる。つまり試料は汚染されていないか影響が無視できる程度である。  
→ もし不可能であれば、試料に原因があると特定できる。

論理的には、以上で原因が特定できる。

## 改善提案

これまでの確認プロセスで、試料ホルダーが原因の

場合、改善はそれほど単純ではないが、いずれにしても汚染の主因を考える必要がある。現在考えられるものとしては、

- ①排気系からのオイルバック
- ②冷却用銅線
- ③これまでの汚染物の脱離による再汚染

などが考えられる。  
試料が原因の場合、

- ①表面汚染による表面伝導
- ②電極の化学的・電気的物性変化

のいずれかを特定する必要がある。そのためには、熱処理後の表面不純物や電極の組成変化を RBS または PIXE で調べる方法がある。(ダイヤモンドの場合、かなり電気特性測定が困難なため RBS または PIXE の検出限界以下の量でもすでに電氣的に測定不能という場合もあり得る。)

いずれにしても、600 °C 以上に昇温すると、見た目でもホルダーが汚染されていることが確認できるので、少なくともこれは要改善点である。例えば冷却用銅線を取り除くことで改善されるかも知れない。もし冷却用銅線が必要ならば、ホルダー構造を再考しなければならない。

現在の交流ホール測定において、磁場とホール電圧の時間依存性の位相差、即ち  $pn$  いずれかで  $0^\circ$  または  $180^\circ$  付近であるべき数値が、600 °C 以上で大きくずれて  $pn$  判定不可能になる理由が、以上考察してきた原因により説明が可能かどうかを検討しなければならない。例えば、

- ①試料表面汚染による電氣的短絡
- ②電極の化学的・電気的変化

があったと仮定した場合に、上記位相差現象が説明できるかどうか、検討していくことが必要である。

### IIa 基板に B イオン注入した試料のホール効果測定

前節で述べたように幾多の困難はあるものの、高品質な IIa 基板に B をホットイオン注入した試料のホール効果測定を試みている。即ち、本来は高品質なダイヤモンド薄膜を成長させ、その膜に各種ドーパントイオン注入を試みるのが目標であるが、未だ平坦な膜が形成できていない。そこで Ib 基板上に高品質ダイヤモンド薄膜を形成する研究と並行して元々高品質(含有窒素が少ないという意味)な IIa 基板にイオン注入することとした。

先ず、ダイヤモンド母材元素 C と殆んど原子半径が同じである、B イオン注入を行うことにした。B 注入量 ① 未注入、②  $1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ 、③  $6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 、④  $4 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 、⑤  $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$  の試料がある。いずれも B 注入エネルギーは 60keV であり、

注入中温度は 1000 °C である。すべての試料に対して Hall 効果(シート抵抗、活性化エネルギー)測定を行った。図 22 に示す。

黒色四角で示された未注入試料、即ち購入直後の洗浄しただけのバルク IIa 基板は非常に高抵抗であり、測定値も不安定で比抵抗の数値自体信頼がおけるものではない。それに対して  $1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$  照射した場合は、ほぼ 0.2 eV 程度の活性化エネルギーを示している。これはイオン注入によって形成される欠陥に起因する欠陥誘起伝導と思われる。しかし、600 °C 以上の温度では IIa 基板に含まれている極微量の窒素による 1.7 eV の活性化エネルギーを示した。本来この高温部分の活性化エネルギー 1.7 eV の測定点においては  $n$  型を示すべきであるが、判定不能の結果を得ている。これは前節で述べたように、Ib 基板でさえ、現状  $n$  型判定はできていないので、当然といえば当然の結果ではある。

一方、 $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$  の注入量程度では未注入試料と同程度の高抵抗で、シート抵抗の値自身も信頼が置けるものではなかった。

$4 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 、 $6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$  で注入した試料に緘しては、電流が流れはじめシート抵抗測定が可能になった。しかも、活性化エネルギーの値は 0.3-0.4 eV となり、ボロンのアクセプター準位にほぼ一致した。しかし、交流磁場ホール測定による  $pn$  判定では、300 - 600 °C の範囲で判定不能の結果が出た。

$4 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ 、 $6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$  でイオン注入した試料でも Ib 基板よりも高抵抗で  $pn$  判定がそもそも難しい。しかし、本当に判定不能なのか、即ち、本来的に③、④の条件でのイオン注入試料が  $p$  型半導体でもないし  $n$  型半導体でもないのか、それとも、前節で示したような改善策を施せば、 $p$  型と判定され得るのかということに関しては未だ結論が出ていない。

早急に改善策を施し、Ib 基板で 300 - 800 °C まで  $n$  型判定が可能になってから、再度③④試料の  $pn$  判定を試みるべきである。

図 23 に Ib ダイヤモンド基板に対して測定したシート抵抗値と交流磁場印加による  $pn$  判定結果を示す。ここで  $n'$  は印加電流の反転に対するホール電圧の位相反転が鈍くなり、 $pn$  判定の信頼性が低い点を示している。一方、前節で述べたように、300 - 600 °C の範囲では Ib 基板では  $n$  型であるという結果を得ている。これは Ib 基板が窒素を多く含んでいて  $n$  型判定がやりやすいことに起因している。

今後前節の改善策を施した後に再測定を試みる。

### まとめ

ダイヤモンド半導体が未来の半導体として如何に期

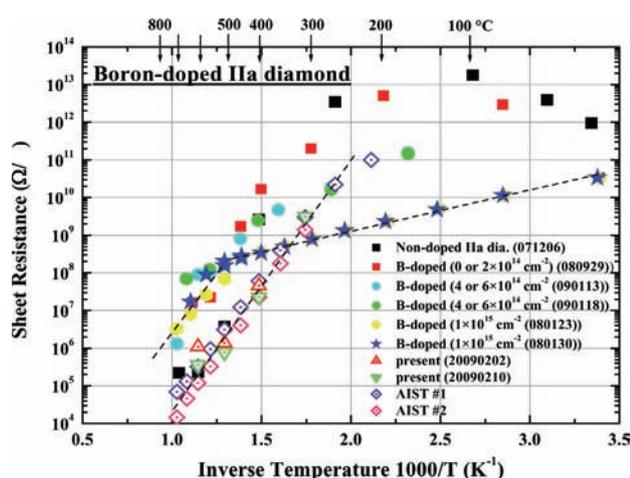


図 22. IIa ダイヤモンド基板にホットイオン注入した試料および Ib ダイヤモンド基板のシート抵抗の測定時絶対温度の逆数依存性。

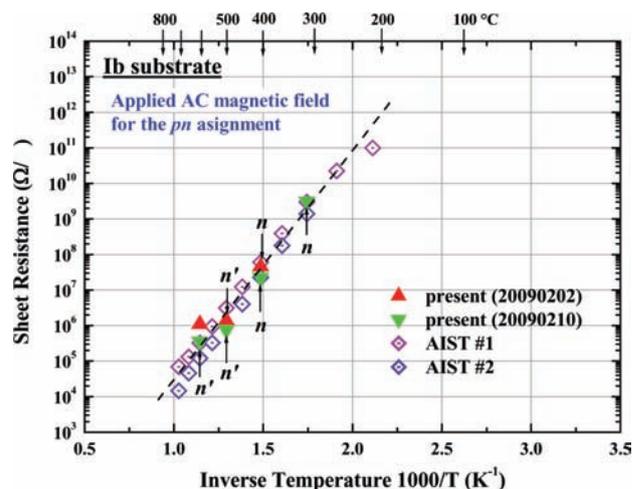


図 23. Ib ダイヤモンド基板のシート抵抗の測定時絶対温度の逆数依存性。

待されているのかということから、現在までに克服されていない問題点等に言及した。それを克服するための方策を述べ、それを実現するためにはどのようなプロセスで進めばいいかも示した。当研究室において、高純度、高品質のダイヤモンド薄膜試料を形成できるマイクロ波プラズマ CVD 装置を開発したことを報告した。この装置に改良を加え、さらに CVD 堆積条件を大幅に見直した。それにより窒素を殆んど含有せず、表面の重金属汚染がない極めて高品質なダイヤモンド薄膜を形成できたことを紹介した。しかし、10 時間という長い成長時間で堆積した CVD 膜は表面の凹凸が著しかった。これを克服するためには 1 - 2 時間程度の短い時間で厚さも 1 - 2  $\mu\text{m}$  程度の膜を成長させればよいと思われる、これらの CVD 成長ダイヤモンド薄膜の品質を評価するためには各種測定装置が必要であるが、現在までに、ラマン分光測定装置、AFM 装置、RBS 測定装置、STM 装置、私学助成によりホール効果測定装置と中電流型イオン注入装置が導入され、試料形成から評価に至る一貫したプロセスを大学内部で閉じた形で実現できるようになった。

2007 年度私学助成で導入した中電流型イオン注入装置を利用することにより、ダイヤモンド半導体のみならず、シリコン半導体や各種化合物半導体等に不純物をドーピングしたり、物質の組成を非熱平衡過程により改質することができるようになり、半導体のみならず、固体物性のあらゆる領域において研究の幅が広がった。

## 謝辞

この研究を遂行するにあたり、情報科学科の多くの先生方から、いろいろ財政的援助を頂き深く感謝い

たします。また、この研究は神奈川大学 学内共同研究制度からの補助を受けて遂行しています。また、経済産業省 産業技術総合研究所の小倉政彦研究員にはダイヤモンドのホール効果測定に伴うさまざまな問題点とその克服の仕方等、多くの助言をいただきました。ここに感謝いたします。

## 文献

- 1) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temperature recrystallization of amorphous silicon by high-energy ion beam. *Appl. Phys. Lett.* **40**: 686-688.
- 2) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel Low Temperature (<300°C) Annealing of amorphous Si by scanned high energy (~2.5 MeV) heavy ion beam. *Proc. of the 13th Conf. on Solid State Devices, Tokyo, 1981: Jpn. J. Appl. Phys.* **21**: 211-216.
- 3) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam-induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon. *Materials Science Reports* **5**: 319-379.
- 4) Linnros J, Svensson B and Holmen G (1984) Ion-beam induced epitaxial regrowth of amorphous layers in silicon on sapphire. *Phys. Rev.* **B30**: 3629-3638.
- 5) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1985) Proportionality between ion-beam induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev.* **B32**: 2770-2777.
- 6) Williams JS, Elliman RG, Brown WL and Seidel TE (1985) "Beam induced crystallization of amorphous silicon". *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **37**: 127.
- 7) Svensson B, Linnros J and Holmen G (1983) Ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum. & Methods.* **209/210**: 755-760.
- 8) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1984) Influence of energy transfer in nuclear collisions on the ion beam annealing of amorphous layers in silicon. *Appl. Phys. Lett.* **45(10)**: 1116-1118.
- 9) Elliman RG, Johnson ST, Pogony AP and Williams

- JS (1985) Ion beam induced epitaxial crystallization of silicon. *Nucl. Instrum. & Methods* **B7/8**: 310-315.
- 10) Williams JS, Brown WL, Elliman RG, Knoell RV, Mahr DM and Seidel TD (1985) The kinetics and microstructure of ion beam induced crystallization of silicon. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **37**: 79.
- 11) Linnros J, Elliman RG and Brown WL (1987) The composition between ion beam induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon; the role of the divacancy. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **74**: 477.
- 12) Heera V (1996) Comment on 'Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion-beam irradiation [J. Appl. Phys. 79, 682-698 (1996)] *J. Appl. Phys.* **80**: 4235-4236.
- 13) Kinomura A, Williams JS and Fujii K (1999) Mass effects on regrowth rates and activation energies of solid-phase epitaxy induced by ion beams in silicon. *Phys. Rev.* **B59**: 15214-15224.
- 14) Williams JS, Elliman RG, Brown WL and Seidel T E (1985) Dominant Influence of Beam-Induced Interface Rearrangement on Solid-Phase Epitaxial Crystallization of Amorphous Silicon. *Phys. Rev. Lett.* **55**: 1482-485.
- 15) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam induced epitaxial regrowth of amorphous layers in silicon on sapphire. *Mater. Sci. Rep.* **5**: 319-379.
- 16) Elliman RG, Williams JS, Brown WL, Leiberich A, Maher DM and Knoell RV (1983) Ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum. & Methods* **19/20**: 755-760.
- 17) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1984) Influence of energy transfer in nuclear collisions on the ion beam annealing of amorphous layers in silicon. *Appl. Phys. Lett.* **45(10)**: 1116-1118.
- 18) Jackson KA (1988) A defect model for ion-induced crystallization and amorphization. *J. Mater. Res.* **3(6)**: 1218-1226.
- 19) Heera V, Henkel T, Kogler R and Skorupa W (1995) Evidence for diffusion-limited kinetics of ion-beam-induced epitaxial crystallization in silicon. *Phys. Rev.* **B52**: 15776-15784.
- 20) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature crystallization and amorphization of amorphous Si layer on the crystalline Si substrate by high-energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev.* **B43**: 14643-14668.
- 21) Nakata J (1996) Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion-beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **79**, No.2: 682-698.
- 22) Nakata J (1997) Enhanced crystallization of amorphous Si containing hydrogen without oxygen during ion-beam irradiation at 310°C and during furnace annealing below 450°C. *J. Appl. Phys.* **82**, No.11: 5433-5445.
- 23) Nakata J, (1999) Annealing of ion-implanted defects in diamond by MeV ion-beam irradiation. *Phys. Rev.* **B60**: 2747-2761.
- 24) Prins JF (2000) n-type semiconducting diamond by means of oxygen-ion implantation. *Phys. Rev.* **B61**: 7191-7194.
- 25) Prins JF (1999) Towards improving the quality of semiconducting diamond layers doped with large atoms. *Diamond Relat. Mater.* **8**: 1635-1641.
- 26) Nakata J, Saito Y, Kawasaki K and Hattori T (2007) Research for electrical activation of ion-implanted diamond semiconductors, using MeV ion beam irradiation. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **18**: 45-53.

■原 著■

## 視線追跡装置を用いたチェンジブラインドネスの研究

張 善俊<sup>1,3</sup> 吉野和芳<sup>2</sup>

A Case Study of Change Blindness by Eye Tracing Apparatus

Shanjun Zhang<sup>1,3</sup> and Kazuyoshi Yoshino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Computer Science, the Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Welfare Systems Engineering, Kanagawa Institute of Technology, Atsugi-city, Kanagawa 243-0292, Japan

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

**Abstract:** When our attention is engaged in a visual task, we can be blind to events which would otherwise not be missed. Change blindness describes a well-known problem in human visual perception that when substantial changes in the visual field were separated by a period of blank, it is difficult for people to detect such changes. In this study, we exam the effects of the changes of color, size, position, and attention hints by investigating the characteristics of the eye movements and the variations of fixation of the subjects of 8 college students.

**Keywords:** change blindness, eye movements, attention, human visual system

### 序論

情報の伝達に重要とされているのが情報を得る際に視野から入る視覚情報である。我々は目に入るもの全体を見ているつもりでも全体の一部だけに注視して、視線移動によって視野内の小さな領域を見渡すことで全体を見ることになっている<sup>1,2)</sup>。この注視して見る箇所は空間認知過程における視覚的興味が生じた場合と考えられる。一般的な意識として静止している物体と動いている物体では動いている物体に目が行くだろう。例えば人ごみの中にいる自分のことを相手に見つけてもらう際に手を振ったりして早く気づいてもらうことができる。ただじっとしているだけではいつまでたっても見つけてもらえないことがある。このように我々は動くものに敏感に反応する習性がある。では静止している物体の場合、一体どのような条件なら人間はより早く反応し、視野内の変化や違いに気づくのだろうか。

チェンジブラインドネスとは人間の視覚認知における変化の見落としのことである<sup>3-8)</sup>。それは2枚の画像の間にブランク（空白）を挟んで交互に表示することによって、人間がその2枚の画像間の違いを見落とししてしまう現象である。またこのブランクの表示時間が長ければ長いほど前後の画像の変化に気づきにくくなる（図1）。それには2つの解釈がある。(1) 視覚フィールドの疎密性、つまりビジュアルシーンを表現する情報がまばらなので、視野内

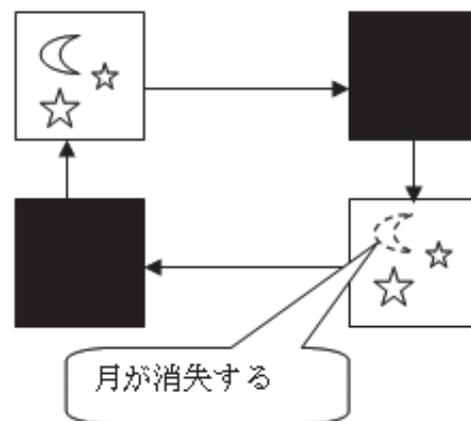


図1. チェンジブラインドネス.

の変化をすべて記録することができていない。(2) ビジュアルメモリの制限、これは全ビジュアルメモリの容量の制限と新視覚刺激の干渉によるものである。変化している物体に注意を集中することで、この制限を克服できる<sup>9-12)</sup>。

視線の動きは、人間の視覚処理活動を知る上での重要な手掛りとして、医学、生理学、心理学から工学まで研究されている<sup>13,14)</sup>。本研究はいくつかの条件を設定してチェンジブラインドネスの実験を行う。そのときの眼球運動はどのような動きをするのかを分析する。そして視線の動きには心理的な要素が影響してくるのかを検証するため、外部からの情報

を得ることによって視線の動きはどの様に変化するのかを探る。

## 材料と方法

### 実験にあたって

実験は全部で画像を 15 種類用意し、実験用プログラムは Java で作成。被験者は視力が正常な神奈川大学の学生 8 人に行ってもらった。その中でも実験に成功した 6 人のデータを元に本研究を進める。なお被験者を区別するため被験者は A,B,C,D,E,F というように名前をつける。被験者 A,B はキャリブレーションが上手いかず視線軌跡のデータは使用しないが発見時間は解析で使用した。

### 実験装置と実験手順

実験装置には nac 社のアイマークレコーダ EMR-8 視線追跡装置を用いた。これは角膜反射法を用いて瞳孔を検出し、被験者がどこを見ているのか、視線の動きを測定する装置である。記録や分析には nac 社のアイマークデータ解析システムを用いた。視野カメラレンズの画角は 44° で、表示画像のサイズはパソコン画面いっぱいにするように 1280 × 960 ピクセルにした。

実験の手順は図 2 に示されているように、まず被験者にパソコンの前に座らせて顎台に顎を乗せてもらい頭が動かないようにする。そして実験で用いる帽子にレンズがついた視線追跡装置をかぶってもらい、キャリブレーションをした後に、Java で作成したプログラムを実行させパソコン画面に刺激画像を順次に表示させる。それと同時にアイマークデータ解析システムを起動させ、視線の動きデータの記録を開始する。

実験では、2 枚のほぼ同じ画像を用意し、その間にブランクを挟み 0.75 秒刻みで画像を順番に表示し、被験者にどこが変化しているのかを気づくまで繰り返し表示していく。被験者が 2 枚の画像から変化を発見したら口頭で知らせてもらい、視線軌跡の記録と時間の計測を終了させる。実験を行って 20 秒経過した時点で被験者が変化を発見出来なかった場合、ヒントを口頭で伝える。例えば「画面の左半分に答えがある」などと大まかな表現にした。またこのヒントを与える事により視線にどのような変化があるかも観察する。

### 刺激データについて

実験の刺激データは、大きく分けて 5 種類に分類する。色、位置、サイズの変化、混雑度、ひっかけ（ヒント）などとする。まず色の変化については、同系

色と補色を利用し、どちらのほうが変化に早く気づくかを検証する。サイズについては長さ、大きさなどを検証する。同じ物体の大小、長短を用意し、サイズが変化することで発見時間を元に分析を行う。位置とは大まかに分けて左上、中央、右下の位置で変化をさせる。これは Z の法則を元に考えた。Z の法則とは人の視線は左上から Z を書くように視線が移動するというものである。これはホームページや広告、チラシなどを作る際に利用されている。見る人に効果的に訴えるように工夫されているのである。これを利用し、はたして人の視線は最初に左上に視線が行き、最後には右下に行くのかを検証する。混雑度とは物などが多く散乱している画像を使った実験と物が少ない殺風景な画像の中から変化している物体を探している時の 2 種類の視線を分析する。ひっかけ（ヒント）というのは同じ画像を使って実験を 2 回行い、ほぼ同じ画像が再び登場した場合被験者はどのような視線の動きをするのかを観察するものである。これは心理的な要素は視線にどのように影響するかを探る。もう 1 つが被験者に事前に真実のヒントを与えた場合と嘘のヒントを与えた場合、嘘だと気づいた場合の視線を検証する。また、これらの実験は種類ごとに実験を行うのではなくランダムに実験を行い、被験者に次にどのような変化になるのかを読まれないようにした。表 1 は実験

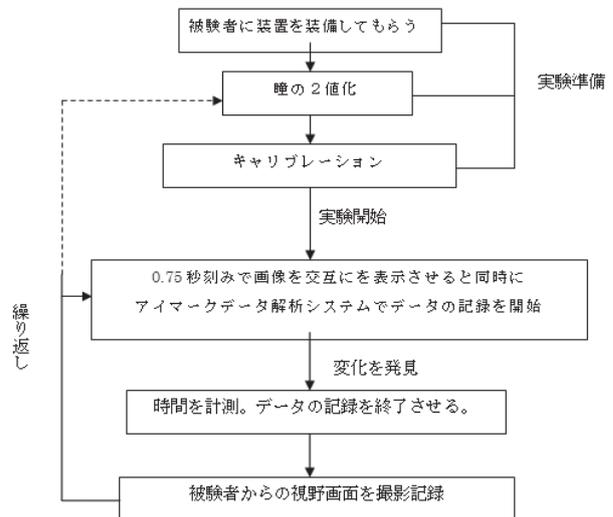


図 2. 実験の手順.



図 3. 15 種類の実験対象物体.

表 1. 15 種類の実験内容一覧

	変化の内容	変化した位置	変化した物体
1	色(黄色⇄オレンジ)	中央	ピリヤードの球
2	消失	右	電池
3	消失	左上	青い磁石
4	引っ掛け	右	ペットボトル
5	長さ	左	メジャー
6	〈正しい〉ヒント	やや中央	ピンクの磁石と洗濯ばさみ
7	消失(殺風景)	左	歯磨き粉
8	色(黄色⇄青)	中央	ピリヤードの球
9	消失	左	ペットボトル
10	消失	中央	緑の磁石
11	引っ掛け	右	ペットボトル
12	サイズ	右	電池
13	ウソのヒント	右下	白板消し
14	消失(混雑)	右下	歯ブラシ
15	消失	右下	傘

表 2. 被験者ごとの実験ごとの発見時間

被験者 実験 No.	A	B	C	D	E	F	全体の平均
1	12	10	25	11	40	36	22.3
2	18	15	24	8	19	44	21.3
3	6	13	16	12	7	32	14.3
4	35	20	41	27	24	28	29.1
5	20	8.5	23	12	16	31	18.4
6	25	13	4	9	4	5	10
7	3	5	12	7	5	6	6.3
8	5	34	3	4	4	4	6.4
9	3	3.5	2	12	4	7	5.3
10	7	14	12	15	4	6	9.6
11	12	20	10	20	4	4	11.6
12	15	19	55	43	53	41	37.6
13	46	44	50	61	45	49	49.2
14	23	16	7	11	15	4	12.6
15	9	4	10	11	24	23	13.5(s)

データの内容を示した。図 3 は実験データの一例で、左右の画像中大きなペットボトルの存在だけが違う。

### 結果と考察

全ての実験を終えて得た視線軌跡のデータと発見時間を元に分析を行う。発見時間は実験ごと、被験者ごとに分けて比較できるように表 2 にまとめた。図 4 は各被験者が図 3 に示されているペットボトルの消失に気づくまでに要した時間を棒グラフで示している。図 5 は 15 種類の実験ごとの全被験者の平均時間と被験者 D の結果を示している。図 6 は被験者 D の視線軌跡を示しており、図 7 は視線の停留点の軌跡を示してある。停留データとは被験者が 1 点を注視した時間を表すものであるが、データの所々に丸が存在している。この丸の大きさが注視時間を表している。停留データは丸が大きいのが目立ち、注視時間が長い箇所が多いことがわかり、丸が小さいのが注視時間が全体的に短いことがわかる。図 8 は実験中に視線の主な探索範囲を示してある。図 9 は被験者が実験 9 をやっている時、左目の水平と垂直の移動量を示してある。図 4 から図 9 に示されていた結果を各実験について調べた上で、以下はまず要素ごとに視線軌跡と発見時間から考察を行っていき、まとめとして全体を通しての視線の動きや要素について分析する。

#### 色の变化

色の变化 (実験 1、実験 8) では補色のほうが発見時間が同系色の变化よりも約 2 倍短いことから色の变化は目にわかりやすい変化をもたらすことが考えられる。また、ほぼ大体の被験者に言えることは同系色の場合の視線としては全体的に見回すような視

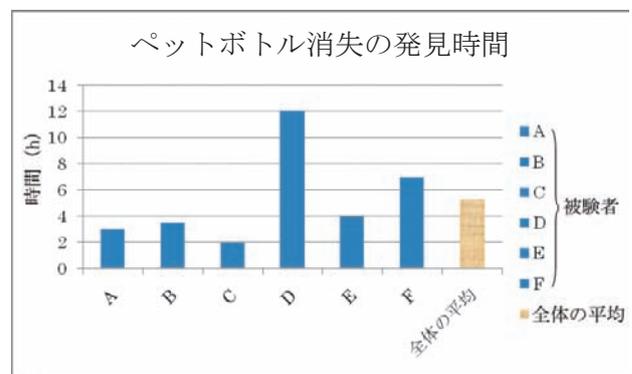


図 4. 各被験者がペットボトル消失に気づくまでの時間。

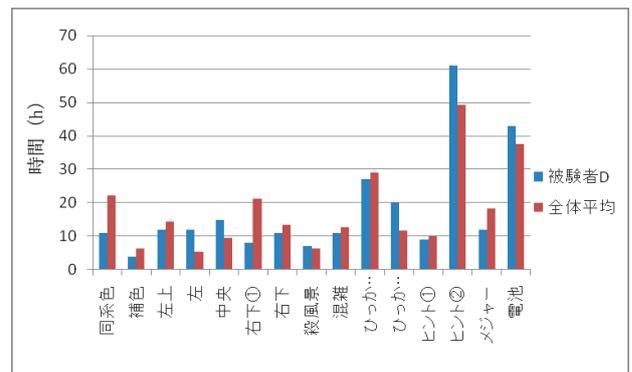


図 5. 実験ごとの変化に気づく時間。

線軌跡になっているが、補色の場合には全体を見回すことなく変化がある点に目が直接行っている。これは同系色も補色も同じ位置で変化しているために後に行った補色の变化でまずそこに目線が行った可能性もある。

#### 位置の変化

位置の変化 (実験 3、実験 10、実験 15) では発見時間の早い順より中央、右下、左上になっている。これは実験を行う前に仮定していた予想とは大分異

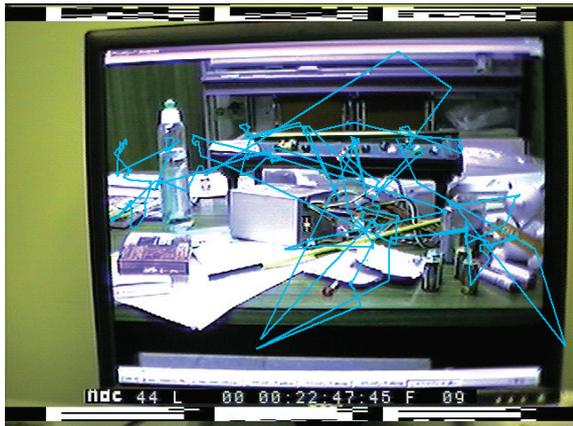


図 6. 被験者 D の実験中の視線の軌跡.

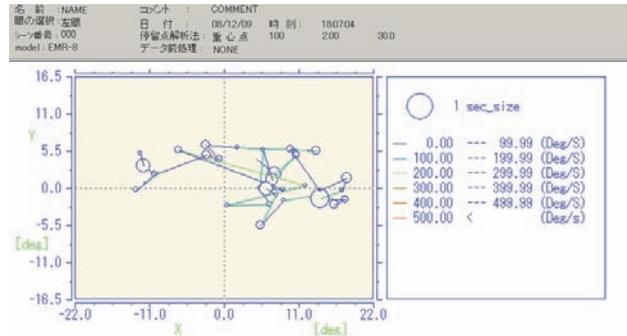


図 7. 被験者 D の視線の停留パターン.

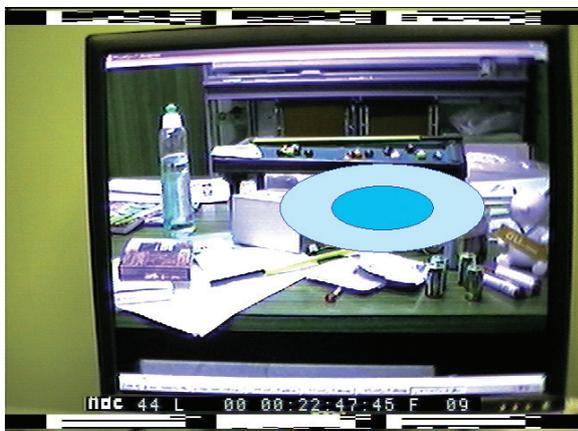


図 8. 実験中視線の主な探索範囲.



図 9. 試験者 D の左目の水平と垂直移動量.

なる結果となった。右下と左上の差は 0.8 秒差ではあるが視線軌跡から見てみると右下の場合はずっと左上に視線が行かず画面の中央や右側よりを見ている。これは先に左上の実験を行ったので次は左上に変化はないだろうと考えた視線をあえてあまりそちらに向けないという意識的な要素も考えられる。中央は平均して 9.6 秒と他の 2 つの実験よりも約 4 秒早い。というのも位置の実験だけではなく全体から言えることは目線のスタートが大体中央からというのが視線軌跡データからわかった。それもあって中央の変化には素早く気づいたのかもしれない。

### ひっかけ、ヒント

ひっかけ (実験 4、実験 11)・ヒント (実験 6、実験 13) については同じ物体が 2 度変化する実験と偽ったヒントを与える 2 種類の実験を行った。被験者の注意は実験結果に大きく影響することがわかった。ペットボトルが前後変化する実験では半数は真っ先にペットボトルを見ているが残りの半数は左のダーツの方から視線が動いている。実験を終えてから感想を聞いて見るとやはり発見時間の身近か

かった者はまたペットボトルが変化しているのではないかと考え視線がそちらに動いたと言う。また、発見時間の長かった者はペットボトルに変化があったから次は左側のダーツを見ていたが変化がないのでもしかしたらとペットボトルの方へ視線が向いたと話している。ヒントについては正しいヒントを与えた場合と偽りのヒントを与えた場合の 2 種類の実験を行っているが正しいヒントを与えた場合はまずほぼ全員がヒントに気づきそれを読んでから発見している。中にはヒントを読まずに変化を探し始めた者もいるが数秒してからヒントを読んで変化を見つけた。また偽りのヒントを与えた場合被験者はその偽りのヒントを信じ、視線がそちらに集まるが数秒経過するとそれが真実の情報じゃないと気づくと視線が画面全体に動き、20 秒経過し、正しいヒントを与え変化を発見した。これより画像に文章が表示されている場合は被験者はまずそれに注目することがわかった。これは物体や絵よりも文書に何か情報が記されているのではないかと瞬時に判断したためだと考えられる。このことより色や位置などの要素だけではなく、被験者の思考が視線に大きく影響し

ていることがこの実験よりわかった。

### 混雑度

混雑度の視点から検証する混雑 (実験 14)・殺風景 (実験 7) の実験では発見時間は殺風景の方が約 2 倍発見時間が短かった。殺風景の画像では物が固まっている左上に視線が集中している。一方混雑している画像では文章を読む時のように左右に視線が振れていて、一番下の段に視線が集中している。上下に視線が動く傾向はあまり見られなかった。これは画像が乱雑に物が散らばっているのではなく、上・中・下段に大きく区切られていることも要因と考えられる。

### サイズ、長さ

サイズ (実験 12)・長さ (実験 5) の実験では特に乾電池のサイズが変化する実験では偽りのヒントを与えた次に発見時間が長かった。長さの変化では全体的に視線が散らばりこれも発見に時間がかかったと言える。

### 全体を通して

一体どのような変化ならば我々はその違いに最も早く気づくのかこれまでの実験でわかった要素をまとめてみると、殺風景で変化している物体が補色であり、中央に位置していて、正しい情報 (ヒント) が与えられている場合で、逆に変化が分かりづらいパターンとは混雑している背景の中で変化している物体が同色であり、左に位置し、誤った情報が与えられている場合ということがわかった。視線軌跡を分析してみた結果、視線は上下の縦に動く人と左右の横に動く人に分かれた。これは縦の人のほうは発見が早いなどとは一概には断定出来なかったが、視線の動きには人それぞれに癖があることがわかった。今回の実験は色々な要素が影響してくるので位置の変化を実験にとってみても変化させる物体の色が違うだけで発見時間が変化してくる恐れや、変化させる物体が被験者の興味をそそるものだった場合、無意識にそちらの方へ視線が向くだろうし様々な要素が関係しているので、今後検証パターンをもっと増やし、様々な分析を行うことで要素ごとの性質をより明確にすることを課題とする<sup>15,16)</sup>。

### 文献

- 1) Bornstein R and Pittman T (1992) Perception without Awareness. London, Guilford Press.
- 2) Rensink RA (2000b) The Dynamic Representation of Scenes. *Visual Cognition* 7(1/2/3): 17-42.
- 3) Barraclough DJ and Lee D (2001) Familiarity with scenes but not individual objects enhances visual short-term memory. *Society for Neuroscience Abstracts* 27(1): 1113.
- 4) Rensink RA (2000c) On the Failure to Detect Changes in Scenes across Brief Interruptions. *Visual Cognition* 7(1/2/3): 127-145.
- 5) Angelone B, Levin DT and Simons DJ (2003) The relationship between change detection and recognition of centrally attended objects in motion pictures. *Perception*, 32: 947-962.
- 6) Rensink RA, O'Regan JK and Clark JJ (1997) To see or not to see: The need for attention to perceive changes in scenes. *Psychol. Science* 8: 368-373.
- 7) Rensink RA, O'Regan JK and Clark JJ (2000) On the failure to detect changes in scenes across brief interruptions. *Visual Cognition* 7: 127-145.
- 8) Becker MW, Pashler H and Anstis SM (2000) The role of iconic memory in change detection tasks. *Perception*. 29: 273-286.
- 9) Palmer J (1994) Set-size effects in visual search: The effect of attention is independent of the stimulus for simple tasks. *Vision Res.* 34(13): 1703-1721.
- 10) Castelano MS, and Henderson JM (2005) Incidental visual memory for objects in scenes. *Visual Cognition*. 12(6): 1017-1040.
- 11) Scott-Brown KC, Baker MR and Orbach HS (2000) Comparison blindness. *Visual Cognition* 7: 253-267.
- 12) Scott-Brown KC and Orbach HS (1998) Contrast discrimination, non-uniform patterns and change blindness. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 2159-2166.
- 13) 成田長人, 山田光穂 (1997) 画質の主観評価における眼球運動の分析. 映像情報メディア学会誌 51(11): 1915-1926
- 14) Jha AP (2002) Tracking the time-course of attentional involvement in spatial working memory: An event-related potential investigation. *Cognitive Brain Research* 15: 61-69.
- 15) Lages M, and Treisman M (1998) Spatial frequency discrimination: Visual long term memory or criterion setting? *Vision Research* 38:557-572.
- 16) Palmer J, Ames CT and Lindsey DT (1993) Measuring the effect of attention on simple visual search. *J. Exp. Psychol. Human Perception and Performance* 19: 108-130.

■原 著■ 2008 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## イトマキヒトデ中心体 DNA のリアルタイム PCR を用いた 定量解析の検討

河合 忍<sup>1,4</sup> 根本心一<sup>2</sup> 日野晶也<sup>1,3</sup>

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Quantitative Analysis of  
Centrosomal DNA in the Sperm and Oocytes of *Asterina pectinifera*

Shinobu Kawai<sup>1,4</sup>, Shin-ichi Nemoto<sup>2</sup> and Akiya Hino<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa, 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan

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

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt125307@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** In the most animals, only the centrosomes in sperm are involved in the formation of cell-division poles for mitosis in zygotes. The inheritance of paternal centrosomes depends on the loss of maternal centrosomes in the mature egg during meiosis. In starfish, maternal centrioles are not equivalent in terms of their intrinsic stability and reproductive capacity. The reproductive centrioles are successively cast off into polar bodies. As the mature egg is finally formed, it inherits a non-reproductive centriole. Further the maternal centriole and centrosome are destined to decay in starfish oocytes. Recently, we isolated novel DNA from centrosomes in the sperm of the starfish *Asterina pectinifera*. Similar DNA sequences are also found in the sperm of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* and the liverwort *Marchantia polymorpha*. In the present study, we investigated the optimal conditions for Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis, with a centrosome-specific DNA primer (CS-primer). This CS-primer was designed to amplify partial sequences (500bp) of the centrosomal DNA; nevertheless, in this study, we determined whether or not this primer would also be effective for quantitative PCR analysis. We determined the sequencing times for PCR cycles using several diluted template DNA solutions for quantitative analysis. We quantitatively compared the amounts of centrosomal DNA in individual immature oocytes using the standard curve for Real-time PCR of sperm DNA.

**Keywords:** *Asterina pectinifera*, Real-time PCR, centrosome, meiosis, oocyte

### 序論

ヒトデの卵成熟過程の研究は、他の生物に先駆けて卵成熟誘起ホルモンとして 1-メチルアデニンが同定されたことにより、イトマキヒトデを材料とした卵成熟過程の実験系が確立されている<sup>1)</sup>。イトマキヒトデの減数分裂は、人為的に卵成熟を 1-メチルアデニンを用いて誘導すると (20℃条件下) 約 2 時間で完了する。この場合卵成熟は 1-メチルアデニン処理から約 20 分で卵母細胞の卵核胞 (germinal vesicle ; GV) の崩壊 (germinal vesicle breakdown; GVBD) が生じ、60 分後に第 1 極体 (first polar body; 1pb) の放出、110 分後に第 2 極体

(second polar body; 2pb) の放出が完了する。その後、雌性前核が形成され 2 時間以内に卵成熟が完了する。卵成熟過程における卵の中心体はその過程において消失し、受精卵の細胞分裂 (卵割) に関与する中心体は精子の中心体に由来することが知られている<sup>2)</sup>。

卵成熟過程における中心体は、精子中心体とは対照的に受精までに消失することがイトマキヒトデで詳細に解明されている。卵減数分裂過程における中心体を構成する中心粒の電子顕微鏡を用いた解析により、中心体の複製を伴わない特徴的な分配機構が

あることが明らかとなっている<sup>3)</sup>。卵母細胞は減数分裂の前期において、2つの中心体がそれぞれ1対の中心粒を有している。中心体は母中心粒と娘中心粒で1対を成す。細胞分裂に先立って中心体の複製が生じる時、1対を成していたそれぞれの中心粒が新たな中心粒を新生し、新たな中心粒のペアを生み出す。従って、中心体の複製は構成する中心粒の半保存的複製を伴う特徴的なオルガネラである。ところが、イトマキヒトデの減数分裂過程では、第1減数分裂と第2減数分裂が続いて進行する間に、中心体の複製が生じない。その結果、第2減数分裂の分裂装置の2つの分裂極には中心粒が1つのみで構成される。1pbには1対の中心粒が分配されるが、2pbは1つの中心粒が分配され、第2減数分裂により卵の中には中心粒が1つのみで構成される不完全な中心体が残される<sup>3)</sup>。この中心体の複製を伴わない分配機構は、イトマキヒトデに限られるわけではない。同じ棘皮動物のウニの卵成熟過程においても同様に中心粒を1つしか持たない中心体で構成される分裂極が第2減数分裂の分裂極や2pbに分配される中心粒で確認されている<sup>4)</sup>。卵母細胞の中心体を構成する2つの中心粒は等価ではなく、複製能を持つ中心粒と複製能を持たない中心粒で構成されており、複製可能な中心粒が減数分裂の2回の分裂過程で選択的に極体に分配され、複製能を持たない中心粒が卵に残されることが明らかとなっている<sup>2,6)</sup>。更に、複製能を持たない中心粒は成熟卵の細胞質中で消失することが示されており、卵成熟を完了した成熟卵では1つだけ残された複製能を持たない中心粒が成熟卵の細胞質中で消失することが解明されている<sup>6)</sup>。

イトマキヒトデの卵の中心体消失機構は、1887年にTheodor Boveriによって提唱された『受精説』の証明であり、多くの動物の受精卵の細胞分裂の分裂極を形成する中心体は精子の中心体由来する父性遺伝することを意味する<sup>7)</sup>。中心体の遺伝情報は特定されていないが、我々はこれまでにイトマキヒトデの精子中心体から新奇のDNAを発見した<sup>8)</sup>。この新奇DNAの塩基配列から約500-bpを増幅するプライマー(CSプライマー)を設計し、これを用いたPCRによりヒトデ以外の生物においても、相同な配列をもつDNAが下等植物のゼニゴケやヒメツリガネゴケからも検出されている<sup>9)</sup>。

本研究は、CSプライマーを用いてイトマキヒトデの精子の中心体DNAを鋳型とするPCRにより増幅されるDNAを基準として、精子のDNAの希釈系列試料を作製し得られた検量線からイトマキヒトデの卵母細胞1個あたりの中心体DNAが精子の

何倍存在するかをリアルタイムPCRにより定量解析できるか否か検討した。卵母細胞は中心体を2つ有しておりゲノムDNA量は精子の4倍である。しかし、複製能を有する中心粒は卵母細胞1個あたり、2個の中心粒を持ち精子1細胞と等量の複製能を有する中心粒が存在する。CSプライマーを用いたリアルタイムPCRから予測される細胞あたりのDNA量を比較することを目的とした。また、卵成熟過程において消失する中心体と同様に中心体のDNAが卵成熟過程で消失するか否かについて、ウニの卵成熟過程をモデルとして、中心体を有する未成熟卵と中心体を失った成熟卵におけるCSプライマーによるPCRの比較解析をおこなった。

## 材料と方法

イトマキヒトデ *Asterina pectinifera* の精子は血球計算盤を用いて1 mL当たりの精子細胞数を計測した。8.6 × 10<sup>6</sup> cells / mLの精子から QIAGEN DNeasy Kit を用いて精子の total DNA を精製した。精子 total DNA は 100 μL に溶解し、10 倍毎に希釈系列 (10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>) を作製した。10<sup>-3</sup> に希釈した試料については更に、5 段階 (1/2、1/4、1/8、1/16、1/32) の希釈系列を作製した。卵母細胞は 1600 細胞の未成熟の卵母細胞 (GV 卵) から同様に DNA を精製した。GV 卵の total DNA は 200 μL に溶解させこれを GV 卵の DNA 試料とした。

## PCR の条件

HotSar Taq Master Mix (QIAGEN) を用いて、95°C 15 min、(94°C 1 min、53°C 30 sec、72°C 1 min) を 26 cycles または、35 cycles その後、72°C 10 min、4°C 10 min で増幅反応を行った。中心体 DNA の PCR による検出のための増幅及びリアルタイム PCR system による定量解析には、CS プライマー (1 μM) を用いて増幅した<sup>9)</sup>。ゲノム DNA の検出には、cyclin A の配列から設計した forward primer; 5'-ACCATTTGGCGAAGTTTTGA-3' と reverse primer; 5'-AGGTAATCTCATTTTCGTCCA-3' を (1 μM) 用いた。PCR 反応条件は、95°C 15 min、(94°C 1 min、55°C 30 sec、72°C 1 min) を 35 cycles その後、72°C 10 min、4°C 10 min で増幅反応を行った。

## リアルタイム PCR システムによる解析

精子の DNA の希釈系列から検量線作成のために、リアルタイム PCR 解析システム (MiniOpticon system, BIO RAD) を用いた。リアルタイム PCR による検出には iQ SYBR Green Supermix を使用した。CS プライマーを用いて、精子の中心体 DNA によ

る検量線を作成した。精子と同様に、GV 卵の精製 total DNA を鋳型にリアルタイム PCR によって増幅された DNA の増幅効率を得た。自動計測された増幅効率は 90~105% 以内の値を得た。精子による検量線のために、本実験では PCR 反応液中に含まれる DNA 量を精子の細胞数に換算して解析した。

## 結果

### イトマキヒトデの精子と GV 卵の PCR

イトマキヒトデの精子から抽出、精製した total DNA と等量の精子を血球計算盤により計測し、精製された精子 DNA は  $8.6 \times 10^6$  cells / mL に相当する結果を得た。得られた精子 DNA 溶液 100  $\mu$ L には、溶液 1  $\mu$ L 当たり換算すると  $8.6 \times 10^4$  cells/1  $\mu$ L の細胞に相当する DNA が溶解していると推定された。次に、この溶液を精子 DNA 原液として、1,000 倍に希釈した ( $10^{-3}$ ) DNA 溶液をもとに、順に 2 倍ずつ希釈 (1/2 倍, 1/4 倍, 1/8 倍, 1/10 倍, 1/16 倍, 1/32 倍) して希釈系列を作成した。

精子 DNA 溶液の希釈系列 ( $10^{-3}$ ,  $1/2 \times 10^{-3}$ ,  $1/4 \times 10^{-3}$ ,  $1/8 \times 10^{-3}$ ,  $1/16 \times 10^{-3}$ ,  $1/32 \times 10^{-3}$ ) の 6 系列について CS プライマーを用いて PCR による増幅を行った。26 cycles の PCR 産物は鋳型 DNA の希釈による濃度依存的に増幅された (図 1)。CS プライマーにより増幅された (500 bps) GV 卵の PCR 産物は、精子の  $1/8 \times 10^{-3}$  の PCR 産物よりは少なく、 $1/16 \times 10^{-3}$  の PCR 産物よりは多く増幅された。従って、GV 卵の DNA 溶液中には、精子の  $1/16 \times 10^{-3}$  倍希釈溶液よりは、多くの鋳型 DNA が含まれていることが示唆された。

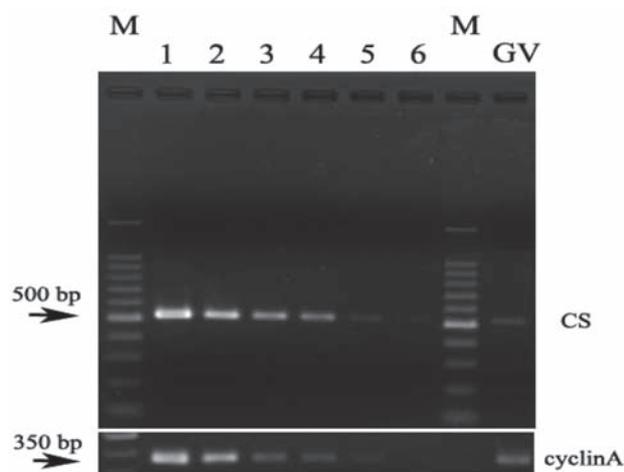


図 1. CS プライマー (上段) と cyclinA のプライマー (下段) を用いて増幅された PCR 産物の電気泳動像。レーン 1~6 は、順に  $10^{-3}$ ,  $1/2 \times 10^{-3}$ ,  $1/4 \times 10^{-3}$ ,  $1/8 \times 10^{-3}$ ,  $1/16 \times 10^{-3}$ ,  $1/32 \times 10^{-3}$  倍希釈系列による精子 DNA の PCR の結果。レーン GV は、GV 卵の DNA による PCR の結果。M は 100 bp ラダーマーカー。

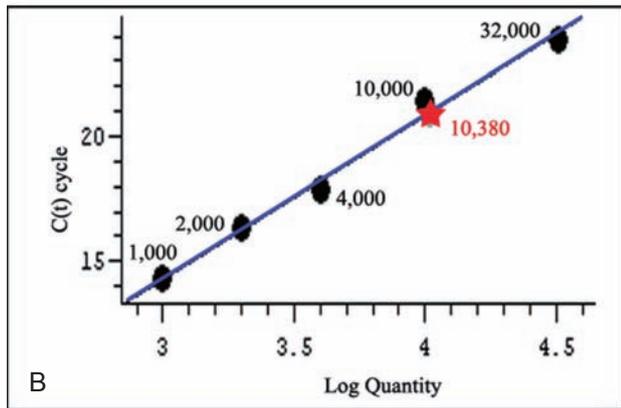
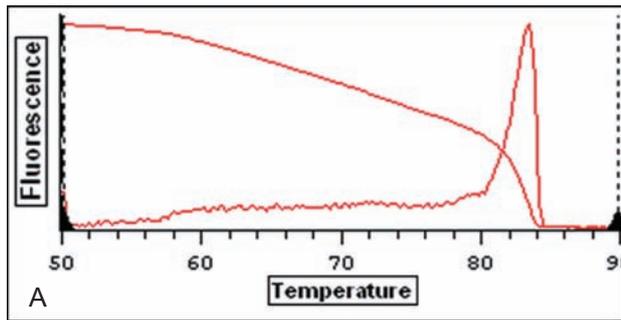
中心体の DNA に対して、精子及び GV 卵のゲノム DNA における PCR による増幅の比較のために、cyclin A の遺伝子を鋳型として、精子の同一希釈系列の DNA 溶液と GV 卵の DNA 溶液を用いた PCR を行った。図 1 に示した電気泳動像の結果から、CS プライマーを用いた PCR による PCR 産物の電気泳動像と同様に、cyclin A のプライマーを用いた PCR 産物は、精子の希釈系列の濃度に比例して増幅が確認された。しかし、GV 卵の DNA を鋳型とする PCR 産物は、精子の希釈系列の  $1/2 \times 10^{-3}$  希釈溶液よりは少なく、 $1/4 \times 10^{-3}$  希釈溶液よりは増幅されることが示唆された。

### リアルタイム PCR による精子 DNA の検量線

GV 卵の DNA 溶液による融解曲線から増幅された PCR 産物には非特異的な増幅産物はないことが示された (図 2A)。融解曲線のグラフから CS プライマーによる PCR において、プライマーダイマーなどの目的 PCR 産物以外の増幅はなく、プライマーの高い信頼度が確認された。精子 DNA を用いた PCR の結果から、CS プライマーを用いて、リアルタイム PCR による精子中心体 DNA の基準となる希釈系列として、 $10^{-3}$ ,  $1/2 \times 10^{-3}$ ,  $1/4 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $1/32 \times 10^{-3}$  の 5 段階の希釈系列により検量線を作成した (図 2B)。また、GV 卵の DNA 溶液 (DNA 溶液 1  $\mu$ L 当たり 8 細胞の DNA を含む) を鋳型とするリアルタイム PCR により増幅された PCR 産物で、精子の希釈系列から作成した検量線を用いて、GV 卵の DNA 量に相当する精子の希釈濃度を算出した。

イトマキヒトデ精子 DNA の希釈系列を基に作成した検量線から、GV 卵の中心体 DNA は  $10^4$  に近似する 10, 380 倍希釈の精子 DNA 溶液に相当する DNA がリアルタイム PCR 解析に用いた GV 卵の DNA 溶液に含まれることが解析結果から算出された。GV 卵の DNA 溶液から PCR により増幅される DNA の増幅効率は、103% であった (図 2B)。従って、増幅前の DNA をもとに 2 倍に増幅された DNA は 100% 近い効率で増幅されたと考えられる。

細胞数に換算して GV 卵の DNA 溶液 1  $\mu$ L 当たり 8 個の卵細胞が含まれた。精子検量線のグラフから求めた CS プライマーにより増幅される GV 卵の DNA 溶液 1  $\mu$ L に含まれる DNA は、精子の DNA ( $8.6 \times 10^4$  cells/1  $\mu$ L) の 10,000 倍希釈に相当すると考えられる。従って、1 個の GV 卵に含まれる CS プライマーにより増幅される DNA 量は 1 個の精子細胞に相当することとなり、精子と GV 卵に含まれる中心体 DNA 量は、等価 (GV 卵:精子 = 1:1) に存在する結果が得られた。



★は検量線上のGV卵の計測値を表す Efficiency = 103%  
r<sup>2</sup> = 0.99

図2. A. GV卵のDNAによるリアルタイムPCRの融解曲線. B. 精子DNAによる検量線.

**バフンウニの卵成熟過程におけるPCRの比較**

ウニは卵成熟過程が卵巣内で進行し、生殖期に放卵される卵は成熟を完了している<sup>4)</sup>。ウニの成熟卵は、減数分裂を完了すると、その過程で卵母細胞から放出される極体がヒトデの場合とはことなり、卵から分離するために放出される卵は極体から分離された成熟卵のみが得られる。未成熟のGV卵は生殖時期の初期に得ることができ、卵成熟の後に中心体を失うことから、バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) の未成熟卵と成熟卵におけるCSプライマーを用いたPCRによる解析を行った。未成熟卵、成熟卵ともに、ゲノムDNAのPCRによる増幅は、cyclin AのPCR産物の検出によって確認した(図3)。一方、中心体のDNAは、未成熟なGV卵からは増幅されたが、中心体を失った成熟卵からは増幅が確認されなかった(図3)。ゲノムDNAは成熟、未成熟に関わらず、cyclin AのPCR産物の増幅が確認されたことから、CSプライマーで増幅されるDNAはゲノムDNAとは異なり卵成熟過程において消失したと考えられる。

**バフンウニの精子の中心体DNAの継承**

バフンウニの精子は、CSプライマーによりイトマ

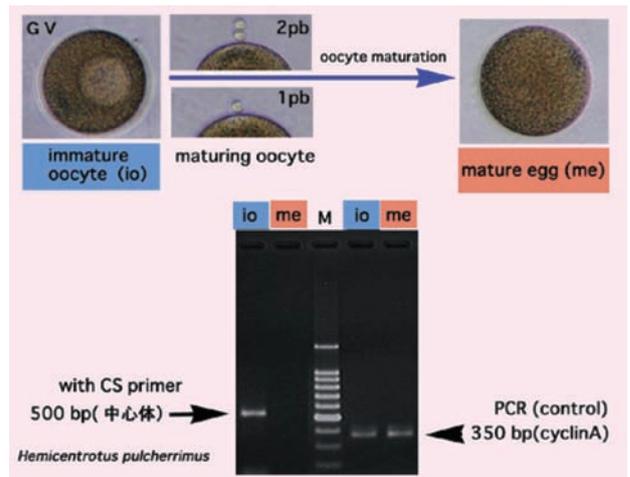


図3. バフンウニのGV卵と成熟卵のCSプライマーによるPCRの比較. レーンioはGV卵, レーンmeは成熟卵, Mは100 bp ラダーマーカー.

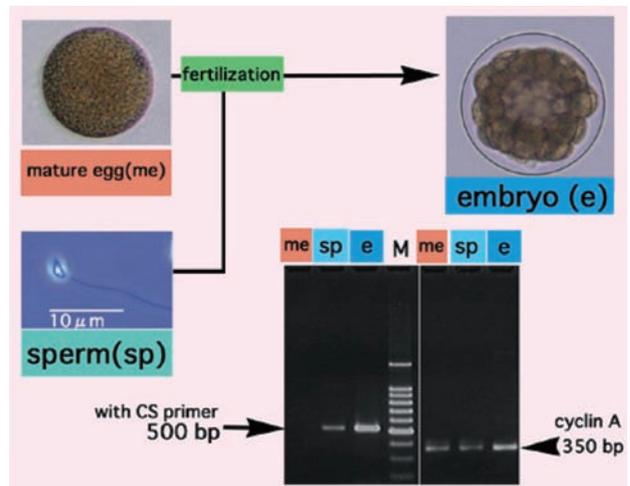


図4. バフンウニの成熟卵と精子, 受精卵のCSプライマーを用いたPCRによる比較. meは成熟卵, spは精子, eは胞胚期の受精後の胚のDNAによるPCR. Mは100 bp ラダーマーカー.

キヒトデと同様に、500 bp の DNA の増幅が可能である。そこで、バフンウニの精子から検出される、CSプライマーにより増幅されるDNAが次の世代に継承されるか否かを検証した。

バフンウニ精子と成熟卵により受精した受精卵は、卵割を繰り返し発生する。この卵割は精子の中心体が分裂装置を形成し中心体の複製を繰り返すたびに細胞分裂が生じる。バフンウニの精子と同様に、受精卵からもCSプライマーにより検出されるか否かを胞胚期の胚を用いて検証した。

胞胚期の胚 (embryo) からは精子と同様に、CSプライマーにより500 bpのPCR産物の増幅が確認された。また、ゲノムDNAと比較するために、胞胚のDNAを鋳型として、cyclin Aのプライマーを用いたPCRから350 bpのシングルバンドが増幅された(図4)。cyclin Aのプライマーを用いたゲノム

DNA の PCR と CS プライマーによる中心体 DNA の PCR の比較から、cyclin A が精子、卵の両方から受け継がれることは対照的に、中心体 DNA は精子から継承されることが示唆された (図 4)。

## 討論

リアルタイム PCR システムは、細胞内で発現する mRNA の発現量の定量解析に活用され、その定量解析において用いるプライマーは 150-bp から 200-bp が最適増幅サイズとされている。本研究で用いた CS プライマーは 500 bp を増幅するように設計されたプライマーであるが、増幅効率や融解曲線の結果から、プライマーのサイズは有効であったことが判明した。イトマキヒトデの GV 卵から DNA を精製し DNA 溶液 1  $\mu$ L あたり 8 個の未成熟卵から予測された DNA 量は、およそ精子 8 個分に相当することから、GV 卵と精子の中心体 DNA の予測量は等価であることがリアルタイム PCR の結果から算出された。

GV 卵は、精子の 2 倍の中心体を有し、ゲノム DNA は精子の 4 倍存在する (図 5 の模式図参照)。図 1 の cyclin A の PCR の結果からも、ゲノム DNA は精子の希釈系列の  $1/2 \times 10^3$  よりは少なく  $1/4 \times$

$10^3$  より多くの DNA があると予測される。従って、精子の細胞数 30 個に相当する DNA が GV 卵 8 個には含まれると算出される。GV 卵のゲノム DNA は、精子の 4 倍の DNA の含有が予測される。精子は減数分裂によって 2 回の分裂の後に、DNA 量が精母細胞の 4 分の 1 となる。このことから、今回の定量実験に用いた DNA が妥当な希釈系列であることが示唆された。

GV 卵 1 個から CS プライマーにより増幅される中心体 DNA 量が精子 1 細胞に相当することから、精子が有する 2 つの中心粒に対して、GV 卵が有する 4 つの中心粒が DNA を持つならば、4 つの中心粒の半分が精子の中心粒と等価であると考えられる。

一方、精子の中心粒は 2 つとも複製能を持つことが明らかとなっている<sup>2,4-6</sup>。GV 卵の 4 つの中心粒のうち複製能を有する 2 つの中心粒のみが DNA を有しているならば、GV 卵の 4 つの中心粒のうち、減数分裂で極体に分配される 2 つの複製能を有する中心粒のみが精子の中心粒と等価の DNA を持つことが考えられる。中心体の複製を保証する中心粒の複製能の正体が DNA であるならば、イトマキヒトデの精子から発見された新奇 DNA は、中心体複製を保証する遺伝物質の有力な候補であると考えられ

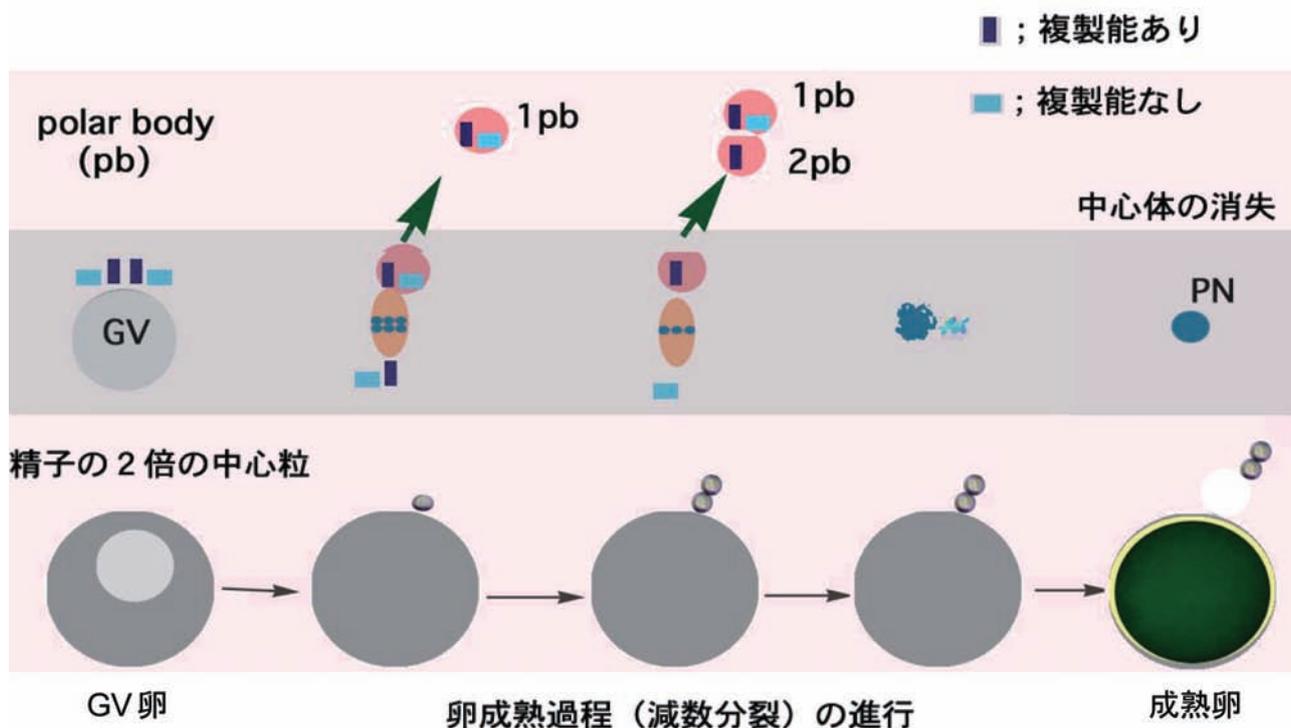


図 5. 卵成熟過程における卵中心体の消失と中心粒の複製能の分配機構の模式図。GV 卵は中心体を精子の 2 倍有している。GV 卵の有する中心粒のうち、2 つは複製能があり、残り 2 つは複製能がない。複製能がない中心粒は卵成熟過程において成熟卵の細胞質で消失する。卵の成熟過程 (減数分裂過程) において複製能を有する中心粒は全て極体 (pb) の中心体に放出される。複製能を有する中心粒は成熟卵内から失われる。雌性前核 (PN) が形成されるまでに卵内に残された複製能のない中心粒も消失することで成熟卵には中心体が失われる。

る。CS プライマーで増幅される配列が多く動物や蘚苔類植物からも検出され、その塩基配列が 95% 以上の極めて高い保存性を有する新奇の DNA であることが判明している。しかし、この DNA の機能や中心体のどのような機能に関与するかは今のところ不明である。中心体に局在する DNA が中心体の複製に関与するのであれば、中心体を有する生物には普遍的に存在し、中心体がない細胞もしくは生物には存在しないことが予測される。また、イトマキヒトデの卵成熟過程で明らかとなっている、卵中心体の複製能を有する中心粒と密接な相関関係があることが想定される。CS プライマーで増幅される DNA は、これらの条件を満たす極めて特異な DNA である。ウニを用いた解析の結果は、この DNA が卵成熟の完了に伴って卵から消失することが判明した。今後はさらに詳細に解析する必要がある。また、DNA の消失については、プローブを用いた定量解析を行なうことでより精度の高い定量解析が可能であると考えられる。

最近、卵母細胞の中心体に局在する RNA が発見された<sup>10)</sup>。しかし、この RNA は今のところ軟体動物の一種であるスピスラ以外からは検出されていない。従って、この RNA が中心体に必須の普遍的な遺伝情報である可能性は極めて低いと考えられる。我々がヒトデから発見した DNA は、この RNA とは対照的に動物や中心体を有する植物にも保存されることから、今後は、中心体を有する真核生物と酵母や細胞性粘菌など異なる中心体を持つ真核生物に、類似の DNA が存在するか否かを明らかにすることが必要である。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、研究材料の採集及び供給は、お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センターと、東北大学大学院生命科学研究科付属浅虫海洋生物学研究センターに協力を賜りました。ここに感謝いたします。本研究は、研究課題「イトマキヒトデ中心体

DNA のリアルタイム PCR を用いた定量解析の検討」として 2008 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) Kanatani H, Shirai H, Nakanishi K and Kurokawa T (1969) Isolation and identification of meiosis-inducing substance in starfishes. *Nature* **211**: 273-274.
- 2) Shirato Y, Tamura M, Yoneda M and Nemoto S (2005) Centrosome destined to decay in starfish oocytes. *Development* **133**: 343-350.
- 3) Kato HK, Washitani-Nemoto S, Hino A and Nemoto S (1990) Ultrastructural studies on the behavior of centrioles during meiosis of starfish oocytes. *Develop. Growth & Differ.* **32**: 41-49.
- 4) Nakashima S and Kato HK (2001) Centriole behavior during meiosis in oocytes of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Develop. Growth & Differ.* **43**: 437-445.
- 5) Uetake Y, Kato HK, Washitani-Nemoto S and Nemoto S (2002) Nonequivalence of maternal centrosomes/centrioles in starfish oocytes: selective casting-off of reproductive centrioles into polar bodies. *Devlop. Biol.* **247**: 149-164.
- 6) Tamura M and Nemoto S (2001) Reproductive maternal centrosomes are cast off into polar bodies during maturation division in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.* **269**: 130-139.
- 7) Moritz KB. and Sauer HW. (1996) Boveri's contributions to developmental biology – a challenge for today. *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 27-47.
- 8) Kawai S, Azumi Y, Kato HK and Hino A (1998) Isolation, purification and analysis of nucleic acids from a sperm tail fraction in *Asterina pectinifera*. *Zygote* **6** Suppl: 138.
- 9) Kawai S, Watai E, Sano T, Inoue K and Hino A (2007) Detection of the centrosomal DNA from the Sperm of Bryophyte *Marchantia polymorpha* L. and *Physcomitrella patens*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **18**: 19-25.
- 10) Alliegro MC, Alliegro MA and Palazzo RE (2006) Centrosome-associated RNA in sulf clam oocytes. *PNAS* **103**: 9034-9038.

■原 著■ 2008 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## シャコの血糖上昇ホルモンの精製および構造決定

大平 剛<sup>1,6</sup> 真壁 健太郎<sup>1</sup> 鈴木道生<sup>2</sup> 長澤寛道<sup>2</sup> 片山秀和<sup>3</sup> 水藤勝喜<sup>4</sup>  
朝比奈 潔<sup>5</sup> 泉 進<sup>1</sup>

### Purification and Structural Determination of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) from Mantis Shrimp *Oratosquilla oratoria*

Tsuyoshi Ohira<sup>1,6</sup>, Kentaro Makabe<sup>1</sup>, Michio Suzuki<sup>2</sup>, Hiromichi Nagasawa<sup>2</sup>, Hidekazu Katayama<sup>3</sup>, Katsuyoshi Suitoh<sup>4</sup>, Kiyoshi Asahina<sup>5</sup> and Susumu Izumi<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>3</sup> Department of Applied Biochemistry, Institute of Glycoscience, Tokai University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1292, Japan

<sup>4</sup> Aichi Prefectural Sea Farming Institute, Tahara-city, Aichi 441-3618, Japan

<sup>5</sup> College of Bioresource Science, Nihon University, Fujisawa-city, Kanagawa 252-8510, Japan

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

**Abstract:** Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is released from the X-organ/sinus gland complex located in the eyestalks. In this study, three major CHHs designated as Oro-CHH-A, -B, and -C in the sinus gland of mantis shrimp *Oratosquilla oratoria* were purified by reversed-phase HPLC and identified by N-terminal amino acid sequencing. Hyperglycemic activities of the three CHHs were examined by *in vivo* injection assay. Oro-CHH-A and -B showed very weak but no significant hyperglycemic activities, while Oro-CHH-C significantly increased hemolymph glucose level. Oro-CHH-C was the most abundant peptide in the sinus gland and showed strong hyperglycemic activity. Therefore, further structural analysis of Oro-CHH-C was possible. As a result of detailed structural analysis, its complete primary structure was determined; it consisted of 72 amino acid residues and possesses an amidated C-terminus. This is the first report of the isolation and the structural determination of the CHH molecules in stomatopod crustaceans.

**Keywords:** crustacean hyperglycemic hormone, mantis shrimp, Stomatopoda, sinus gland

## 序論

通常、甲殻類は複眼が頭部から突出しており、その複眼を支えている柄の部分を目柄と呼ぶ。この目柄内には X 器官と呼ばれる神経分泌細胞群が存在し、そこで数種類の神経ペプチドが合成され、サイナス腺と呼ばれる神経血液器官から血リンパ中へ放出される<sup>1)</sup>。この X 器官-サイナス腺系は昆虫の脳-アラタ体系や脊椎動物の視床下部-下垂体系と相同と考えられている。

X 器官-サイナス腺系で合成・分泌されるホルモンは現在多数のものが知られている。その中でも、血中のグルコース濃度を上昇させる甲殻類血糖上昇ホルモン (crustacean hyperglycemic hormone; CHH)、Y 器官での脱皮ホルモン(エクジステロイド)

の合成・分泌を抑制する脱皮抑制ホルモン (molt-inhibiting hormone; MIH)、雌の卵成熟を抑制する卵黄形成抑制ホルモン (vitellogenesis-inhibiting hormone; VIH)、大顎器官でのファルネセン酸メチル (昆虫の幼若ホルモンと類似した構造をもつ) の合成・分泌を抑制する大顎器官抑制ホルモン (mandibular organ-inhibiting hormone; MOIH) は甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) 族と呼ばれている 1 つのペプチドファミリーを形成している<sup>1,2)</sup>。CHH 族ペプチドの作用は大きく異なるものの、それらアミノ酸配列には相同性があり、アミノ酸 72 から 83 残基からなり、保存された 6 残基のシステインが分子内で 3 対のジスルフィド結合を形成しているとい

う特徴を持つ<sup>1)</sup>。

1989年にミドリガニ *Carcinus maenus* のサイナス腺から CHH が精製され、その全アミノ酸配列が決定された<sup>3)</sup>。それ以来、約 20 年間に経過した現在、100 を超える甲殻類の CHH 族ペプチドのアミノ酸配列がデータベースに登録されている<sup>4)</sup>。しかし、それら甲殻類の CHH 族ペプチドのほとんどはエビやカニなどの十脚類のものであり、十脚類以外では等脚類オカダンゴムシの CHH と VIH の 2 分子が報告されているに過ぎない<sup>5,6)</sup>。甲殻類は昆虫類に次いで地球上で繁栄している動物群であるが、現在の CHH 族ペプチドに関する情報は水産食資源として重要な十脚類に極端に偏ったものである。そのため、甲殻類全体における CHH 族ペプチドの共通性や種特異性についての考察は十分とは言えない。そこで、本研究では甲殻類の一種であり口脚目に属するシャコ *Oratosquilla oratoria* のサイナス腺から 3 種類の CHH を精製し、それらのアミノ酸配列を決定した。本研究が口脚類の CHH 族ペプチドを単離した世界で初めての報告である。

## 材料と方法

### 実験動物

実験で使用したシャコ *Oratosquilla oratoria* は、2007 年 5 月、8 月および 2008 年 3 月に愛知県一色漁港で水揚げされた雌雄混合の成体を現地の仲買業者より購入した。

### CHH 族ペプチドの精製

シャコを氷上で麻酔した後に眼柄をハサミで切除した。切除した眼柄は液体窒素を用いて凍結し、使用するまで -80 度で保存した。サイナス腺は実体顕微鏡下でピンセットとマイクロ剪刀を用いて外科的に摘出した。サイナス腺抽出物は Yang らの方法<sup>7)</sup>に従って調製した。次に、抽出物を Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters) に通して、10% アセトニトリル (MeCN) / 0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) で洗浄した後、60% MeCN / 0.05% TFA でシャコの CHH を含む画分を溶出した。それを遠心濃縮機で MeCN を除去した後、逆相 HPLC に供した。カラムは Shodex Asahipak ODP-50 4E (4.6 x 250 mm, 昭和電工) を使い、10% MeCN / 0.05% TFA から 60% MeCN / 0.05% TFA までの 40 分間リニアグラジエントで溶出を行った。流速は 1 ml/min、検出は 225 nm の波長で行い、溶出パターンを見ながらピーク毎にマニュアルで分取した。

### N 末端アミノ酸配列分析および質量分析

逆相 HPLC で精製したピーク産物を減圧濃縮した後、アミノ酸配列自動分析機 (model 491HT protein sequencer, Applied Biosystems) で各ピーク産物の N 末端アミノ酸配列を分析した。また、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) 型質量分析機 (AXIMA<sup>®</sup>-CFR, 島津製作所; Voyager-DE PRO spectrometer, Applied Biosystems) を用いて各ピーク産物の質量を測定した。

### 還元カルボキシメチル化反応

Yang らの方法<sup>8)</sup>に従って Oro-CHH-C を還元カルボキシメチル化反応に供した。前述と同様の逆相 HPLC で反応産物を精製し、質量分析と N 末端アミノ酸配列解析に供した。

### リシルエンドペプチダーゼ消化

Yang らの方法<sup>8)</sup>に従って Oro-CHH-C をリシルエンドペプチダーゼ (Wako) で消化した。そして、Ohira らの方法<sup>9)</sup>に従って消化断片を精製し、それらを質量分析と N 末端アミノ酸配列解析に供した。

### 血糖上昇活性の測定

シャコを用いた *in vivo* の投与実験は Yang らの方法<sup>7)</sup>に従って行った。シャコの CHH は 1  $\mu$ g ずつ 10 尾に注射した。ポジティブコントロールとしてシャコのサイナス腺抽出物 (1 個相当量) を、ネガティブコントロールとして燐酸緩衝生理食塩水 (PBS) のみを 10 尾に注射した。実験は 2008 年 3 月 7 日～9 日に愛知県栽培漁業センター内の屋外水槽を使用しておこなった。その間、シャコは自然水温の 100% 海水を用いて無給餌で飼育した。

## 結果

### シャコ CHH の精製

シャコのサイナス腺抽出物を逆相 HPLC で分画した結果、3 本の主要なピーク (P11、P17、P18) が観察された (図 1)。これらのマススペクトルを MALDI TOF-MS を用いて測定した結果、P11 は  $m/z$  8,671 (M+H)<sup>+</sup>、P17 は  $m/z$  8,642 (M+H)<sup>+</sup>、P18 は  $m/z$  8,589 (M+H)<sup>+</sup> のイオンピークがそれぞれ観察された。これまでの十脚類の研究から、CHH はサイナス腺中の主要なペプチドであること、CHH の分子量は 8,000 から 9,000 であることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。P11、P17、P18 のピーク産物はこれらの条件を満たしていることから、シャコの CHH である可能性が高いと考え、N 末端アミノ酸

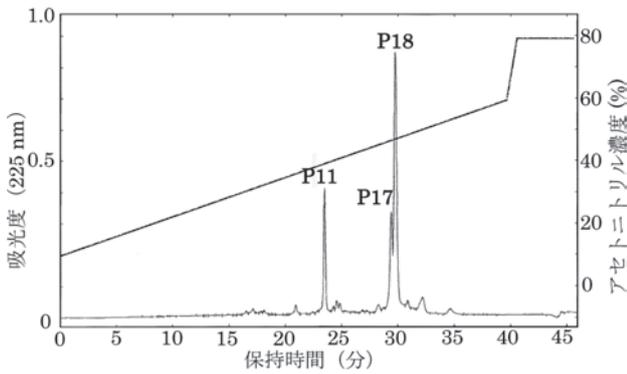


図1. 逆相 HPLC を用いたシャコのサイナス腺抽出物 (150 個相当量) の分離. 点線はアセトニトリル濃度を示す.

配列解析に供した。

### シャコ CHH の N 末端アミノ酸配列

P11、P17、P18 のピーク産物の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、それぞれ 71 残基目まで決定できたが、3 つとも 7、23、26、39、43、52 残基目のアミノ酸は同定できなかった (図 2)。これら 3 つのペプチドは、ともに十脚類の CHH と類似したアミノ酸配列を有していた。そこで、本研究では P11、P17、P18 を溶出順に Oro-CHH-A から C と命名した。

### シャコ CHH の血糖上昇活性

ポジティブコントロールとしてシャコのサイナス腺抽出物 (1 個相当量) をシャコの体腔に注射した結果、血糖値が  $58.2 \pm 17.9 \mu\text{g/ml}$  上昇した (図 3)。本研究で単離した Oro-CHH-A、Oro-CHH-B、Oro-CHH-C を  $1 \mu\text{g}$  ずつ注射したところ、それぞれ血糖値が  $32.2 \pm 12.7 \mu\text{g/ml}$ 、 $32.9 \pm 6.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $49.4 \pm 12.7 \mu\text{g/ml}$  ずつ上昇した (図 3)。これらの結果とネガティブコントロールの PBS 投与群の結果を比較したところ、サイナス腺抽出物注射群と Oro-CHH-C 注射群に統計的な有意差が観察された。

### Oro-CHH-C の全アミノ酸配列の決定

システイン残基の数と位置を同定するために、Oro-CHH-C を還元カルボキシメチル化反応に供した。反応産物のマスペクトルを測定した結果、 $m/z$  8,943 (M+H)<sup>+</sup> のイオンピークが観察された。この値は反応前の値 (8,589) と比べて 354 増加していた。還元カルボキシメチル化反応はシスチン一つにつき分子量が 118 増えることから、Oro-CHH-C には 3 対のジスルフィド結合、すなわち 6 個のシステイン残基が存在することが判明した。そして、反応産物を N 末端アミノ酸配列解析に供したところ、7、23、26、39、43、52 残基目に S-カルボキシメチルシス

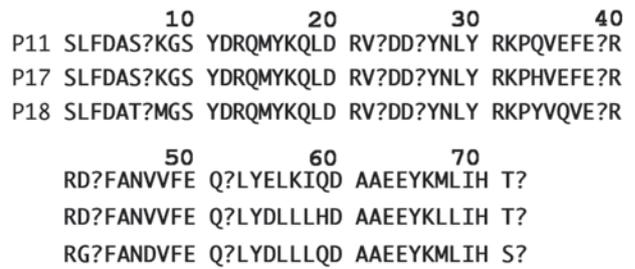


図 2. シャコ CHH の N 末端アミノ酸配列. ? は同定できなかったアミノ酸を示す.

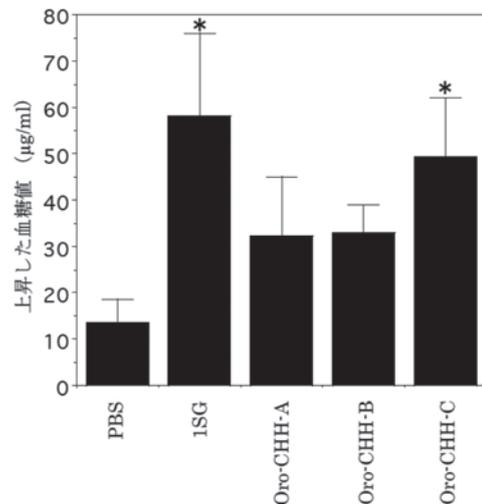


図 3. シャコ CHH の血糖上昇活性. PBS は磷酸緩衝生理食塩水注射群を、1SG はシャコのサイナス腺抽出物 (1 個相当量) 注射群を示している. 結果は各群 10 尾の平均値で示し、エラーバーは標準誤差を示す. \* は PBS 群と比べて有意差があった群を示している ( $P < 0.05$ , Fisher PLSD の多重比較検定).

テインが検出された。これらの結果から、未同定であった 7、23、26、39、43、52 残基目のアミノ酸はシステインであることが明らかとなった (図 4)。次に、C 末端のアミノ酸残基を決定するために、Oro-CHH-C をリシルエンドペプチダーゼで消化して、C 末端断片 K-C を得た (図 4)。断片 K-C のアミノ酸配列を解析したが、やはり C 末端アミノ酸は検出できなかった (Met-Leu-Ile-His-Ser-Xaa)。そこで断片 K-C のマスペクトルを測定した結果、 $m/z$  698.47 (M+H)<sup>+</sup> のイオンピークが観察された。この値は Met-Leu-Ile-His-Ser-Val-NH<sub>2</sub> というアミノ酸配列から計算した理論値 698.39 (M+H)<sup>+</sup> とほぼ一致した。これらの結果から、未同定であった 72 残基目の C 末端アミノ酸はバリンアミドであると結論づけた。Oro-CHH-C の全一次構造を図 4 に示した。

### 討論

本研究では 3 種類の CHH (Oro-CHH-A から C) をシャコのサイナス腺から単離し、それらの N 末

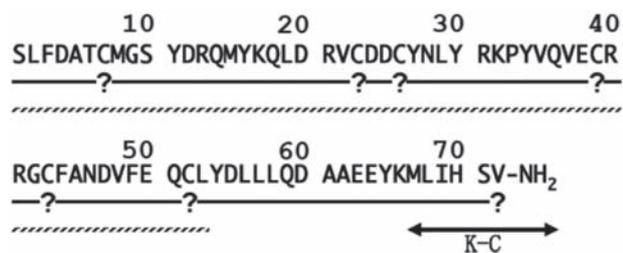


図4. Oro-CHH-Cのアミノ酸配列の決定. 実線はネイティブなOro-CHH-Cの、点線はS-カルボキシメチル化したOro-CHH-CのN末端アミノ酸配列解析の結果を示している. K-Cはリシルエンドペプチダーゼ消化で得たC末端断片を示す. ?は同定できなかったアミノ酸を示す.

端アミノ酸配列を解析した。それら3種類のCHHはお互いにアミノ酸配列がよく類似していたが、血糖上昇活性の強さに違いがみられた。すなわちOro-CHH-Cのみが統計的に有意にシャコの血糖値を上昇させた。しかし、本研究では各CHHを1 $\mu$ gずつ投与した時の血糖上昇活性しか調べていない。今後、構造と生物活性の関係を議論するためには、3種類のシャコCHHの詳細なドースレスポンスを調べていく必要がある。

3種類のシャコCHHの中で、Oro-CHH-Cが最もサイナス腺含量が多く、なおかつ血糖上昇活性が一番強かった。このことから、本研究ではOro-CHH-Cがシャコの主要なCHHではないかと考え、Oro-CHH-Cの全一次構造を決定した。Oro-CHH-Cと高い同一性を示した上位5つのアミノ酸配列を図5に示した。Oro-CHH-Cはザリガニの1種*Pontastacus leptodactylus*のCHHと60%、ザリガニの1種*Astacus fluviatilis*のCHHと60%、アメリカザリガニ*Procambarus clarkii*のCHHと60%、メキシコザリガニ*P. bowieri*のCHHと60%、ヤドカリ*Pagurus bernhardus*のCHHと58%の同一性を示した。一方、CHH以外のCHH族ペプチド(VIH、MIH、MOIH)とは約30%の同一性しか示さなかった(data not shown)。これらの結果は、Oro-CHH-Cが血糖上昇活性を示したことと矛盾しない。Oro-CHH-Cの6個のシステイン残基の位置

は他種のCHHでも保存されていた(図5)。また、図5に示した全てのCHHのC末端はバリンアミドで保存されていた。これらの結果より、Oro-CHH-AとBで未同定の7、23、26、39、43、52残基目のアミノ酸はシステイン、72残基目のアミノ酸はバリンアミドの可能性が高いと推測された。

CHHは血糖上昇活性に加えて脱皮抑制活性や卵黄形成活性を示すことが他の甲殻類で知られている。例えば、アメリカンロブスターのCHHは脱皮抑制活性を併せ持つことが示されている<sup>10)</sup>。また、クルマエビのCHHは卵黄形成抑制活性を示すことが明らかとなっている<sup>11)</sup>。これらの結果は、今回単離した3種類のシャコCHHにも血糖上昇活性以外の生物活性がある可能性を示唆している。この点を明らかにするためには、シャコを使った様々な生物検定系を新たに開発する必要があるが、それは容易なことではない。そのため、現時点では3種類のうちのどれか一つがCHHとして働いているのか、それとも複数が協調して血糖値を調整しているのかは分からない。今後、これらの点を明らかにしていきたいと考えている。

## 謝辞

本研究は2008年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「シャコの血糖上昇ホルモン(CHH)族ペプチドの精製および構造決定」で行われたものです。ここに謝意を表します。生物検定でご助力いただきました三重県栽培漁業センターの山根史裕技師に心より感謝いたします。

## 文献

- 1) Keller R (1992) Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48: 439-448.
- 2) Wainwright G, Webster SG, Wilkinson MC, Chung JS and Rees HH (1996) Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. *J. Biol. Chem.* 271: 12749-12754.
- 3) Kegel G, Reichwein B, Weese S, Gaus G, Peter-

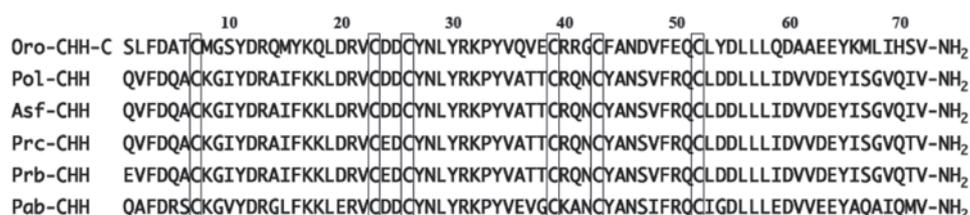


図5. Oro-CHH-Cと他種CHHのアミノ酸配列. システイン残基の位置はボックスで示した. Pol-CHH, *Pontastacus leptodactylus* CHH (Accession No. Q1RN83); Asf-CHH, *Astacus fluviatilis* CHH (P83800); Prc-CHH, *Procambarus clarkii* CHH (Q7KDP4); Prb-CHH, *P. bowieri* CHH (P55845); Pab-CHH, *Pagurus bernhardus* CHH (DQ450960).

- Katalinic J and Keller R (1989) Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett.* **255**: 10-14.
- 4) Chen SH, Lin CY and Kuo CM (2005) In silico analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Mar. Biotechnol.* **7**: 199-206.
  - 5) Martin G, Sorokine O and Van Dorsselaer A (1993) Isolation and molecular characterization of a hyperglycemic neuropeptide from the sinus gland of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). *Eur. J. Biochem.* **211**: 601-607.
  - 6) Gre've P, Sorokine O, Berges T, Lacombe C, Van Dorsselaer A and Martin G (1999) Isolation and amino acid sequence of a peptide with vitellogenesis inhibiting activity from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**: 406-414.
  - 7) Yang WJ, Aida K and Nagasawa H (1995) Amino acid sequences of a hyperglycaemic hormone and its related peptides from the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **135**: 205-212.
  - 8) Yang WJ, Aida K, Terauchi A, Sonobe H and Nagasawa H (1996) Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Peptides* **17**: 197-202.
  - 9) Ohira T, Tsutsui N, Nagasawa H and Wilder MN (2006) Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormones from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and their hyperglycemic activities. *Zool. Sci.* **23**: 383-391.
  - 10) Chang ES, Prestwich GD and Bruce MJ (1990) Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**: 818-826.
  - 11) Tsutsui N, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H, Wilder MN and Aida K (2005) The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **144**: 232-239.

■原 著■ 2008 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## トウモロコシ根の重力応答に伴う Ca イオン動態の解析

早津 学<sup>1,2</sup> 小野 真菜美<sup>2</sup> 伊豆川 朋子<sup>1</sup> 堀川夏呼<sup>1</sup>  
堀田道子<sup>1</sup> 笹本浜子<sup>3</sup> 鈴木季直<sup>1,2,4</sup>

Analyses of the Ca Ion Movement in Root-Tips during  
the Gravitropic Response of *Zea mays* L.

Manabu Hayatsu<sup>1,2</sup>, Manami Ono<sup>2</sup>, Tomoko Izukawa<sup>1</sup>, Natsuko Horikawa<sup>1</sup>,  
Michiko Hotta<sup>1</sup>, Hamako Sasamoto<sup>3</sup> and Suechika Suzuki<sup>1,2,4</sup>

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

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

<sup>3</sup> Faculty of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, Yokohama-city, Kanagawa 240-8501, Japan

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

**Abstract:** To provide information about the role of Ca and other ions in the regulation of gravitropic response, conventional electron microscopic observation of bulk and ultrathin sections and quantitative X-ray microanalysis of cryosections, obtained from the statenchyma of corn roots grown under gravity or simulated microgravity, were carried out. In columella cells of the statenchyma, amyloplasts were exclusively localized at the bottom of cells grown under normal gravity. In those cells of corn roots grown under simulated microgravity, amyloplasts were diffusely distributed in the columella cells, indicating that amyloplasts function as a statolith. In the quantitative X-ray microanalysis of cryosections, small amount of Ca was detected in the cytoplasmic matrix of columella cells in corn roots grown under simulated microgravity. However the concentration of K was significantly decreased in cytoplasmic matrix and vacuole of columella cells, although it could not change in cell walls surrounding these cells. This finding may indicate that, during gravitational disturbance, K ions move entirely toward the extracellular space. Further experiments are now needed to clarify the possibility that Ca ions play a role in regulating K ion movement during gravitropic response.

**Keywords:** corn roots, columella cells, gravitropism, Ca, X-ray microanalysis of cryosections

### 序論

殆どの植物が重力屈性により重力方向にその根を成長させることは良く知られている。この生理機能は、植物が体の支持と水分や栄養塩類を土壌から吸収できるように土壌に深く根を伸ばす時に重要である。Kordyum and Guikema<sup>1)</sup>によれば、この植物の根の重力屈性は三つの段階を経て生じていると考えられる。第一段階は重力刺激の受容、第二段階はシグナルの伝達、そして第三段階は刺激応答としての根の成長である。

第一段階の反応は、根の根冠に存在する重力感知細胞であるコルメラ細胞内のアミロプラストが平衡石として機能する平衡石説<sup>2,3)</sup>で説明される。第二

段階では、細胞骨格や小胞体などの細胞内構造、Ca イオンや他のメッセンジャー、および膜電位のような多くのファクターが、重力感知に応答して成長運動を導くために機能していると考えられている。しかし、それらのファクターが実際にどのようにそのシグナル伝達を達成しているかについては殆ど明らかにされていない。第三段階では、コロドニー-ウェント説<sup>4,5)</sup>で説明されているような植物ホルモンによる成長制御が働いていると考えられている。

Ca イオンは生物の様々な生理機能を細胞レベルで調節する重要な役割を果たしている<sup>6)</sup>。近年、電子電子顕微鏡を用いて生体機能を研究することがで

きる有効な技法がいくつか開発されており、中でも凍結切片-元素分析法<sup>7,8)</sup>はCaイオン動態の研究に極めて有効な電子顕微鏡技法である。本研究では、トウモロコシの根を材料とし、凍結切片-元素分析法により重力屈性第二段階における細胞内外のCaイオンやその他のイオンの濃度変化を測定し、その動態を明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### 試料の調整

疑似微小重力環境創出のために、種々の粉体や液体を混合する装置(YAYOI震盪器、YGG-1型)を改良して作製したクリノスタット(詳細、未発表)を用いた。

トウモロコシ(*Zea mays* L.)の種子を室温で24時間蒸留水に浸して吸水させた。底部にシリコンラバーを充填したプラスチックシャーレ内に水分を含んだ脱脂綿を敷き、その上に吸水種子を置き、移動しないように針で固定した。これらの種子を含む複数のシャーレを対照群、実験群に分け、温度22°Cのインキュベーター内に置いた。対照群のシャーレは底面が垂直になるよう壁に立て掛け、重力負荷がかかる方向に根が伸長できるようにした。一方、実験群のシャーレはクリノスタットに装着して重力方向を攪乱することにより植物に疑似微小重力環境を与えた。播種から3日後に約30 mmに伸長した根の根冠部を化学固定または凍結対象の試料とした。

### 微細構造観察

通常の超薄切片法による微細構造観察のため、対照群および実験群のトウモロコシの幼植物を含むシャーレ内に0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した3%グルタルアルデヒド(以下GA)液を入れて密閉し、室温下で1時間、4°C下で23時間前固定した。この間、対照群は重力下に、実験群はクリノスタット上で疑似微小重力下にある状態を維持した。シャーレから植物を取り出して根の根端部のみを切り取り、さらに3%GA液で2時間固定した後、蒸留水で希釈した2%四酸化オスミウム(以下OsO<sub>4</sub>)液と交換し、室温下で1時間、4°C下で23時間、後固定した。固定試料は、アセトン系列で脱水した後、Epoxy樹脂(Quetol 812)に包埋し、40°Cで24時間、60°Cで24時間熱重合させた。組織観察のために包埋試料からウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N)で厚さ約0.9 μmの切片を作製した。切片をスライドガラスに載せ、トルイジンブルーで加温染色した後、光学顕微鏡で観察した。また、微細構造観察のために同じ包埋試料から厚さ

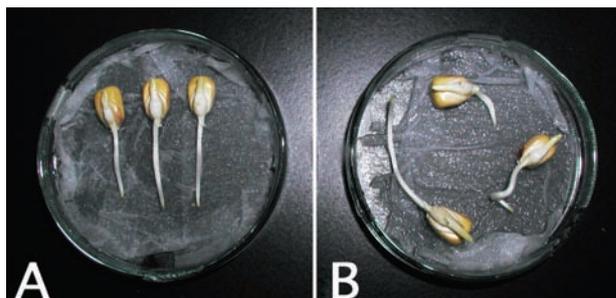


図1. 重力下で発根、成長させたトウモロコシ(A)と疑似微小重力下で発根、成長させたトウモロコシ(B)。

約70 nmの超薄切片を作製し、コロジオン膜を張ったCu-150メッシュに載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色をした後に透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX、JEM1230)で観察した。

走査型電子顕微鏡による根冠組織観察のため、幼植物から切り取り中心軸に沿って縦断した根の先端部を前述と同様に化学固定し、アセトンで脱水した後、アセトンとt-ブチルアルコールの混合液(1:1)とそれに続いてt-ブチルアルコールで置換し、凍結乾燥装置(JEOL JFD-310)で乾燥した。乾燥された試料を試料台に両面テープで接着固定し、イオンコーター(JEOL JFC-1100E)で白金をコーティングし、走査型電子顕微鏡(JEOL JSM-840A)で観察した。

### 試料の急速凍結と凍結置換

対照群および実験群のトウモロコシの根を根端から約1.5 mmで切り取り、中心軸に沿って縦断した後、凍結用キャリアに入れ、高圧凍結装置(Leica EM-PACT)で急速凍結した。凍結試料は専用コンテナに収納し、凍結切片作製まで液体窒素中(-196°C)に保存した。急速凍結が良好に行われたか否かを評価するために、一部の凍結試料を予め-80°Cに冷却した2%OsO<sub>4</sub>を含むアセトン中に入れ、-80°Cで3日間、-20°Cで2時間、+4°Cで2時間の凍結置換を施した。凍結置換後、Epoxy樹脂(Quetol 812)に包埋し、40°Cで24時間、60°Cで24時間熱重合させた。包埋試料からウルトラミクロトーム(Reichert Ultracut-N)で厚さ約70 nmの超薄切片を作製し、コロジオン膜を張ったCu-150メッシュに載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行った後、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM1230)で観察した。

### 凍結超薄切片の作製

急速凍結したトウモロコシの根端部からクライオミクロトーム(Leica EM FCS、試料温度-140°C)で厚さ約200 nmの凍結超薄切片を作製し、-110°Cの

クライオチャンバー内で支持膜としてコロジオン膜を張った Ni-200 のグリッド上に載物し、もう一枚のグリッドを支持膜同士が向かい合うように重ねて軽く圧力を加えた後、これを凍結乾燥用の試料コンテナに収納した。コンテナを温度制御可能な凍結乾燥装置 (VDF300、真空デバイス社) に装填し、真空下で  $-110^{\circ}\text{C}$  から 3 時間かけて温度を  $-80^{\circ}\text{C}$  まで上げてから 1 時間保持し、さらに 6 時間かけて  $+30^{\circ}\text{C}$  まで上げるにより試料を凍結乾燥させた。凍結乾燥後の試料は元素分析時までデシケーター内に保存した。

### 凍結超薄切片の元素分析

凍結乾燥後の超薄切片を Be 製のクライオトランスファーホルダー (Gatan Model 626DH) に装填し、エネルギー分散型 X 線検出器 (JEOL EX-14033JTP) 装着の透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) 内に挿入して切片観察および元素分析を行った。元素分析時には、クライオトランスファーホルダーに液体窒素を充填して  $-130^{\circ}\text{C}$  に冷却した。一方、試料汚染防止のため、電子顕微鏡本体に装備されているコールドトラップに液体窒素を充填し、ホールピースの周りを超低温に冷却した。また、定量的 X 線マイクロアナリシスに要求される分析条

件の一定化のため、分析時の観察倍率を 15,000 倍、加速電圧を 80 keV、試料ホルダー傾斜角度を X 線検出器に向けて水平位から  $15^{\circ}$  に設定し、ビームのスポットサイズを 4 に設定して電子ビームを直径約  $0.1\ \mu\text{m}$  に収束させた。このような分析条件下で、切片内の分析対象小領域に収束した電子線を 200 秒間照射し、発生した X 線を検出器で検出した。得られた X 線スペクトルの各ピーク値に基づいて、分析領域に含まれる元素の定性を行った。また、X 線スペクトル解析ソフト (NORAN System SIX) を用いて、特性 X 線のピークスペクトルから半値幅を基準にした X 線強度 ( $P_x$ ) と、連続 X 線由来のバックグラウンドのうち  $4.5\text{--}5.5\ \text{keV}$  の X 線強度 ( $B_x$ ) をカウントし、各ピークスペクトルの特性 X 線強度と連続 X 線強度比 (所謂  $P/B$  比) を求めた。X 線スペクトルをもとに各元素の定量を行うには、 $P/B$  比の他にウェイトファクター ( $W_x$ ) が必要とされている<sup>9,10</sup>。今回、異なる分析条件下にある二つの分析電子顕微鏡システムで同一試料を元素分析し、得られた X 線スペクトルの  $P/B$  比を比較検討することにより暫定的な  $\text{K-K}\alpha$  線のウェイトファクターを求めた<sup>10,11</sup>。さらに、その他の元素のウェイトファクターを  $\text{K-K}\alpha$  線のそれを基準にして理論的に求め、トウモロコシのコルメラ細胞で得られた X 線スペ

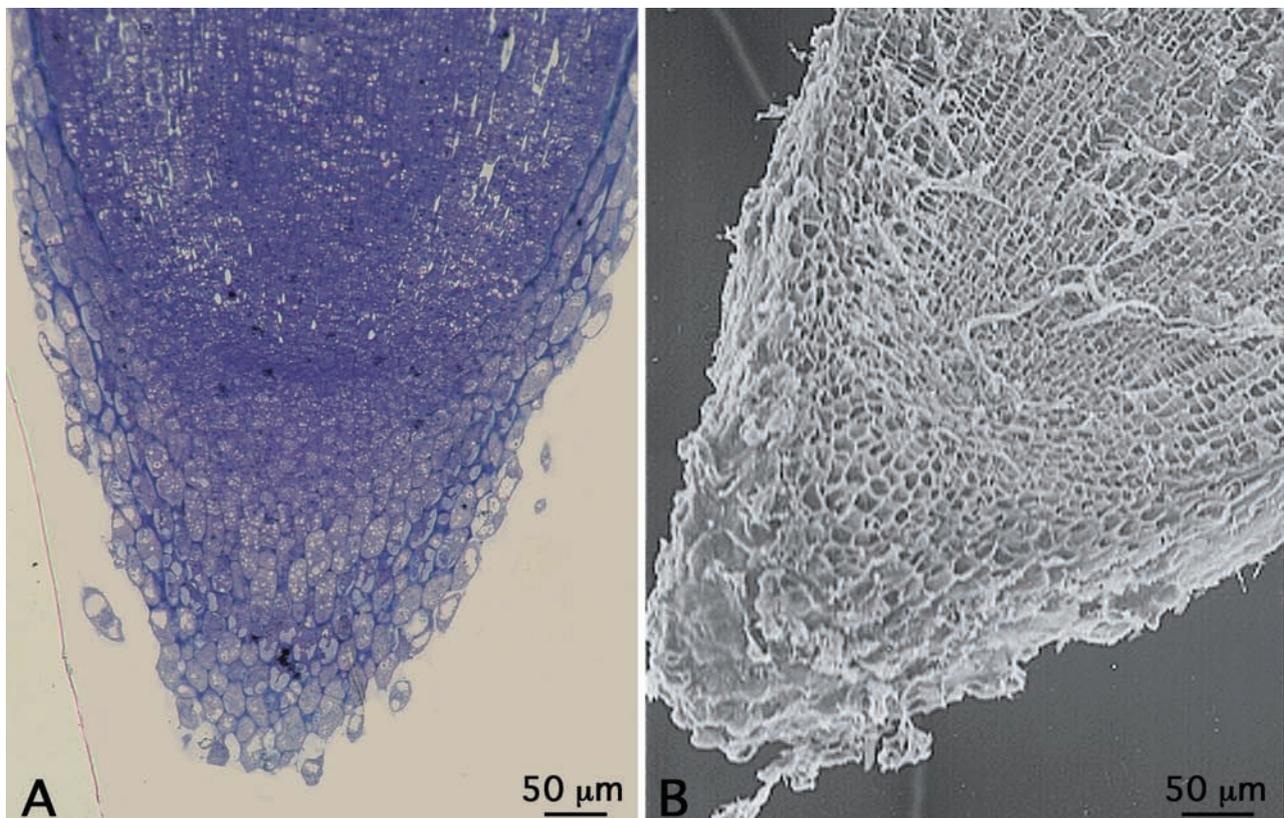


図 2. 重力下で成長したトウモロコシ根端の光学顕微鏡像 (A) と走査型電子顕微鏡像 (B)。根端の分裂組織領域と根冠部の境界は、ドーム状の境界面に沿ったそれぞれの細胞の形状とやや肥厚した細胞壁によって明瞭に区別される。

クトルに適用し、各元素の濃度 (mmol/kg dry wt.) を計算した。

## 結果

### 根端の組織観察

トウモロコシ種子は播種してから一日目で発根し、根は3日目で30 mm程度に伸長した。対照群植物

の根はいずれも重力が働く方向へほぼ真っ直ぐに伸長していた (図 1A)。一方、実験群植物の根は円を描くように湾曲しながら伸長したり、途中で屈曲していたりしており、個体ごとにそれぞれが重力とは無関係な方向に伸長していた (図 1B)。クリノスタット上で発根した根はいずれも重力方向とは無関係に伸長したことは、この装置が疑似微小重力環境

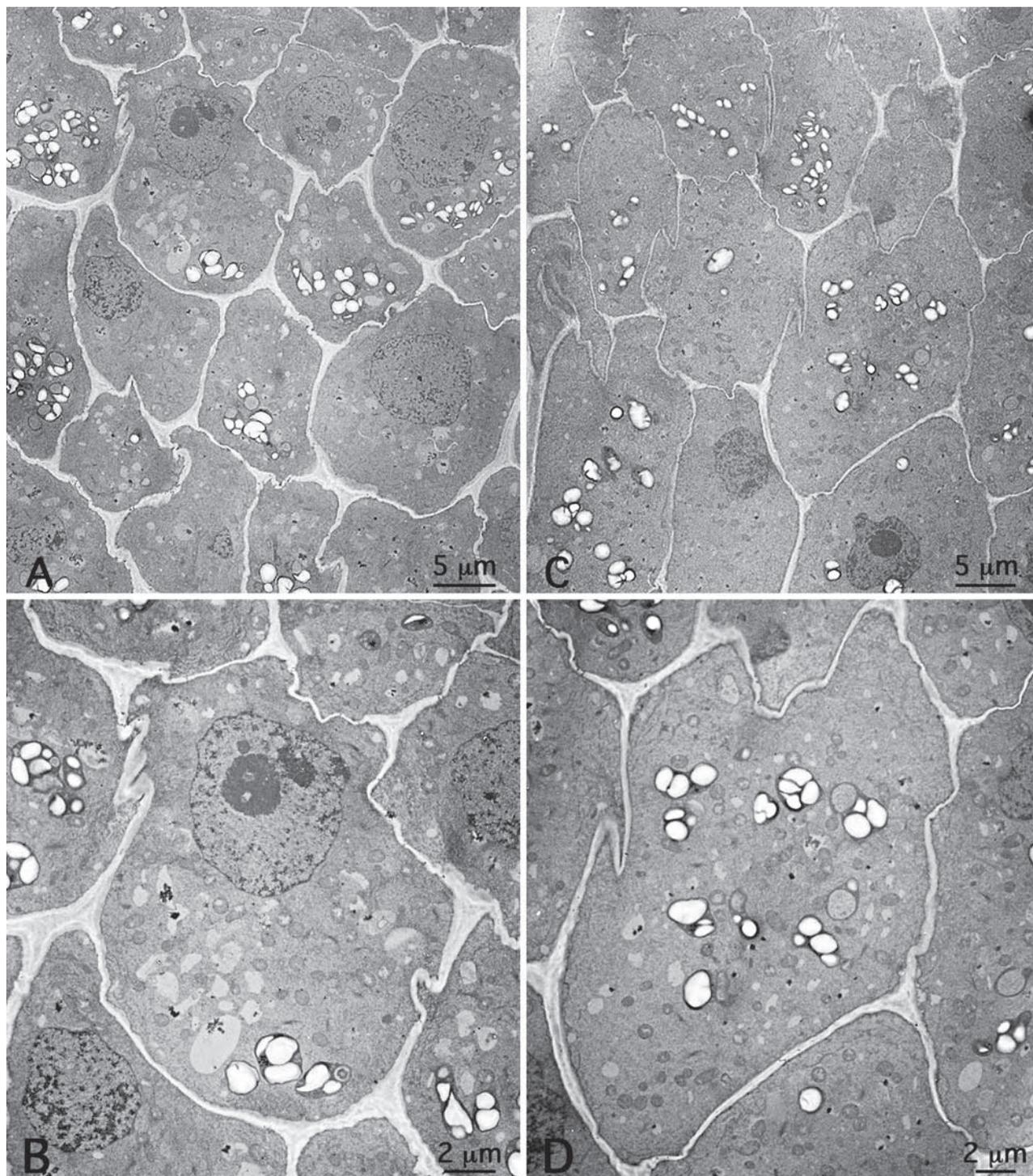


図 3. 重力下で成長したトウモロコシのコルメラ細胞領域 (A) とコルメラ細胞 (B) および疑似微小重力下で成長したトウモロコシのコルメラ細胞領域 (C) とコルメラ細胞 (D) の電子顕微鏡像。コルメラ細胞内のアミロプラストは重力下では細胞下部に局在し、疑似微小重力下では分散分布している。

を植物に与え、重力作用の攪乱に有効に機能したことを示している。これらの根のコルメラ細胞領域を光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡による観察で特定した。図 2 は重力下で成長したトウモロコシの根の中心軸面に沿って薄切された切片の光学顕微鏡像 (A) と割断されたバルク試料の走査型電子顕微鏡像 (B) を示している。根端の分裂組織領域と根冠部との境界は、ドーム状の境界面に沿ったそれぞれの細胞の形状とやや肥厚した細胞壁によって明瞭に区分される。境界面直下の根冠上部中央領域はスタテンキマであり、丸みを帯びた形状のコルメラ細胞で構成されている。光学顕微鏡による切片観察では、しばしば、コルメラ細胞内にアミロプラストが観察された。疑似微小重力環境下で成長した根の観察も同様に行ったが、後述のコルメラ細胞内アミロプラスト分布の違いの他には形態学的な相違は認められなかった。

### 根冠部の微細構造観察

図 3A は重力下で成長したトウモロコシの根端根冠部上方にあるコルメラ細胞領域の透過型電子顕微鏡像である。コルメラ細胞内にはその含有物が殆ど澱粉粒である多数の色素体が含まれており、これらのアミロプラストは切片像でおおむね楕円形で、その長径は約  $2 \mu\text{m}$  であった。また、コルメラ細胞内でアミロプラストは重力の作用方向に一致する根の先端方向、すなわち細胞下部に局在していた (図 3B)。さらに、アミロプラストは、しばしば、コル

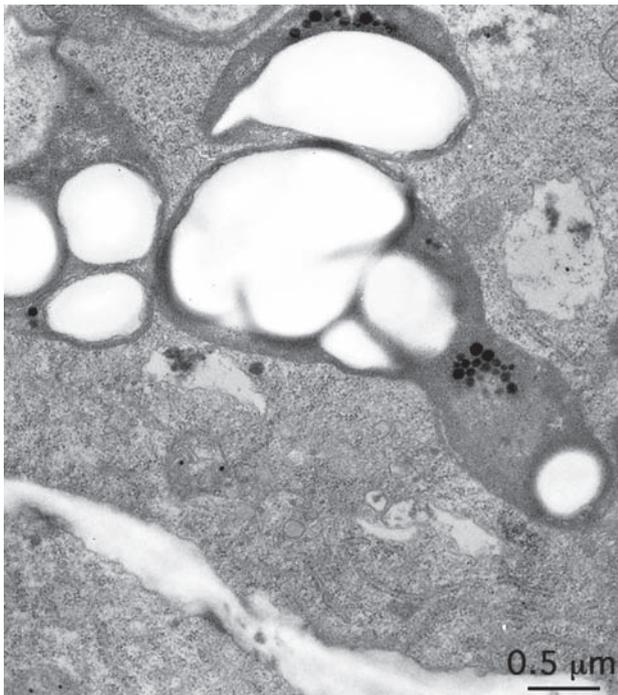


図 4. 重力下で成長したトウモロコシのコルメラ細胞内で下部に沈降したアミロプラストと底部に存在する小胞体との近接を示す電子顕微鏡像。

メラ細胞底部に集合した小胞体と接触していた (図 4)。一方、疑似微小重力下で成長したトウモロコシのコルメラ細胞内でもアミロプラストは観察され、その大きさや数において対照群との違いは認められなかったが、細胞内分布の状態は明らかに異なっていた。対照群で見られたようにアミロプラストは細胞下部に偏在せず、細胞全体に分散分布していた。また、小胞体も特定の細胞下部に密に集合している状態は見られなかった。

### 凍結切片の X 線マイクロアナリシス

凍結が良好に行われたか否かを評価のするために、凍結置換を行った。凍結装置の特性と装置内への試料の装填状況から、試料の凍結は根端の中心柱中央軸面から開始され、反対側の表皮方向へ進行すると思われる。凍結開始領域の細胞ではアミロプラスト、ミトコンドリアやゴルジ体などの細胞内小器官が明瞭に観察され、核内部の核小体や染色質の状態も極めて良好であった。また、凍結開始面からおおよそ  $300 \mu\text{m}$  深部となる表皮細胞の状態も良く、氷晶形成による試料の損傷は見られなかった。

図 5 は急速凍結したトウモロコシの根端から得られた凍結超薄切片像である。重力下 (図 5A) および疑似微小重力下 (図 5B) で成長したトウモロコシの根冠部上部のコルメラ細胞では、細胞壁、細胞質基質、核や液胞が観察された。

細胞内外の Ca 局在や重力刺激に伴う Ca イオンの移動を調べるために、これらの凍結超薄切片について X 線マイクロアナリシスを行った。それぞれの凍結超薄切片を観察し、細胞壁部分、細胞質基質部分、液胞部分 (図 5、○印) についてランダムに分析を行った。図 6 は重力下および疑似微小重力下で成長したトウモロコシ根端のコルメラ細胞の細胞質基質について行った元素分析の X 線スペクトル例を示している。細胞内外でイオンとして生体膜を通過して移動する主要な元素のうち、カリウム (K) が検出され、グラフでは顕著な K-K $\alpha$  線 (ピークエネルギー値、 $3,312 \text{ eV}$ ) のスペクトルピークを示した。その他に細胞質基質由来の元素-X線として、炭素 (C)、酸素 (O)、燐 (P) の各 K $\alpha$  線も検出された。なお、図中右側には Ni-L $\alpha$  線 (Ni) と Ni-L $\beta$  線のスペクトルピークが見られるが、この X 線は切片を載物している Ni-グリッド由来のものである。分析領域に有意な量の Ca が存在すれば、スペクトルでは K-K $\alpha$  線の右側にある小さな K-K $\beta$  線のスペクトルピークのさらに右側の  $3,690 \text{ eV}$  の位置に Ca-K $\alpha$  線のスペクトルピークが出現する。重力下で成長したトウモロコシのコルメラ細胞の細胞質基質の分析

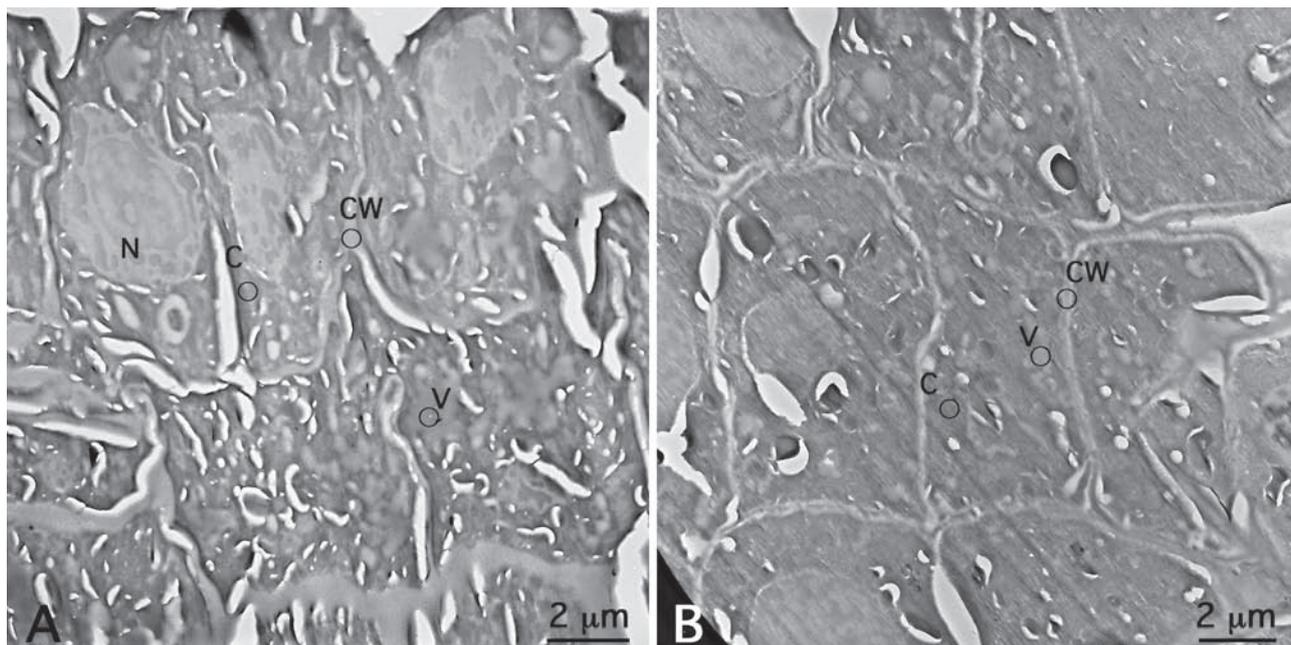


図 5. 重力下 (A) および疑似微小重力下 (B) で成長したトウモロコシのコルメラ細胞領域の凍結超薄切片像。○印は細胞壁 (CW)、細胞質基質 (C) および液胞 (V) の各分析点を示す。N: 核。

スペクトル (図 6A, B) では、 $K-K\beta$  線が小さいながらも先鋭なスペクトルピークを示しているのに対して、疑似微小重力下で成長したトウモロコシのコルメラ細胞の細胞質基質の分析スペクトル (図 6C, D) では、 $K-K\beta$  線のスペクトルピークは鈍く不明瞭である。 $K-K\beta$  線のスペクトルピークの鈍化は、しばしば  $Ca-K\alpha$  線のスペクトルピークとの重複によって引き起こされることから、図 6D のスペクトルは、 $Ca-K\alpha$  線が放射されていることを示していると考えて良い。このことから、重力下よりも疑似微小重力下のコルメラ細胞の細胞質基質内は、極めて少量ながらも  $Ca$  が増量していると思われる。

植物を疑似微小重力下に置いた時、 $K$  濃度は重力下に置いた時より液胞と細胞質基質で減少していたが、細胞壁では殆ど変化していなかった (表 1)。P は、どの分析領域でも疑似微小重力下に置かれた時に減少していた。一方、 $Ca$  は明確なスペクトルピークを示さなかったが、定量計算の結果では、試料を疑似微小重力下に置くことでコルメラ細胞の細胞質基質で量的増加が生じていることが示された。

## 討論

重力下で成長したトウモロコシの根冠コルメラ細胞内では、アミロプラストが細胞下部に集中して局在しており、一方、疑似微小重力下で成長したトウモロコシの根冠コルメラ細胞内のアミロプラストは細胞内の特定部位に局在することなく分散分布していた (図 3)。このアミロプラストの細胞内分布の違いは、アミロプラストがストロマ内に細胞質基質より

も高い比量の多量の貯蔵澱粉を含んでおり、重力に対する平衡石として反応するためであると考えられる。クリノスタットにより重力刺激が加わる方向が攪乱された植物では、アミロプラストは重力方向に移動することがないため、細胞内でランダムに分散分布することになると考えられる。アミロプラストの他に平衡石として役目を担う可能性がある細胞内小器官として核、ミトコンドリア、ゴルジ体や液胞なども候補として提案されている<sup>12)</sup>が、少なくとも、今回の観察結果ではこれらの細胞内小器官の細胞内分布の違いは認められず、トウモロコシでは唯一アミロプラストが平衡石として機能すると考えられる。

凍結切片の X 線マイクロアナリシスでは、コルメラ細胞領域の細胞壁、細胞質基質、液胞のいずれの分析からも顕著な  $Ca-K\alpha$  線のスペクトルピークは見られなかった。しかし、いずれの分析でも顕著な  $K\alpha$  線のスペクトルピークを示す  $K$  の  $K\beta$  線のスペクトルピークに注目すると、疑似微小重力下では細胞質基質のスペクトルで明らかにそのピーク形状が変化していることが認められた (図 6D)。このピーク形状変化はピークエネルギー値が近い  $Ca-K\alpha$  線により生じたものと思われる。このようなピークエネルギー値が近い放射線間の干渉によるピーク形状の変化は、他にも良く知られていることであり<sup>13,14)</sup>、検出器の特性から考えて極めて必然性のある現象である。細胞質基質からの  $Ca-K\alpha$  線の放射を反映して定量的には重力下に比べ、疑似微小重力下でおよそ 10 mmol / kg dry wt. の増加が示された (表 1)。コ

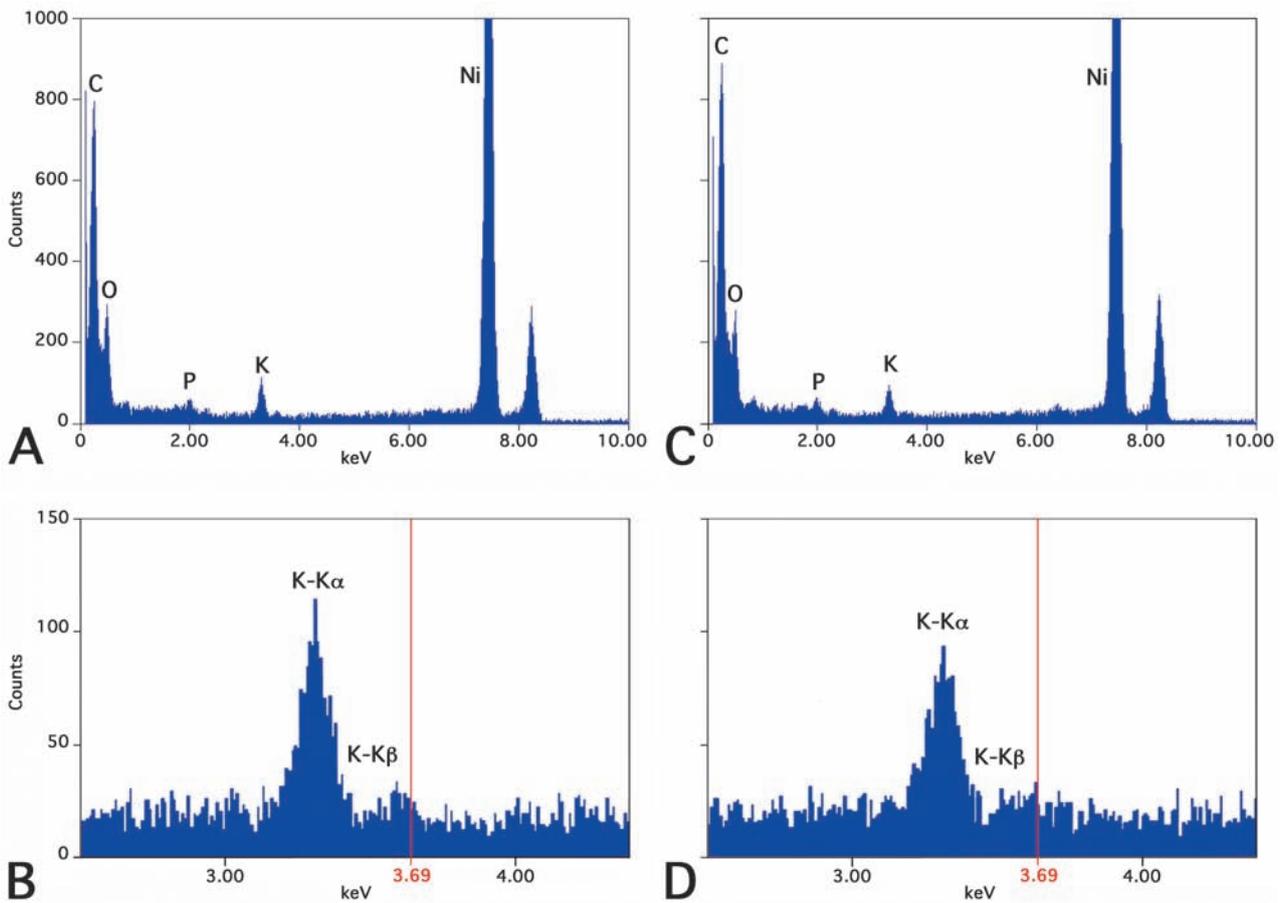


図 6. 重力下で成長したトウモロコシの根端細胞の細胞質基質の点分析で得られた X 線スペクトル (A) とその 3,600 eV 付近を拡大した X 線スペクトル (B). 疑似微小重力下で成長したトウモロコシの根端細胞の細胞質基質の点分析で得られた X 線スペクトル (C) とその 3,600 eV 付近を拡大した X 線スペクトル (D). 縦軸は X 線カウント数 (A, C: 0 ~ 1,000 counts, B, D: 0 ~ 150 counts)、横軸はエネルギー範囲 (keV). スペクトル中のラベルはピークエネルギー値により定性される元素の記号を示す (詳細は本文参照). 図 B, D 中の赤い直線は Ca-K $\alpha$  線のピークエネルギー値である 3,690 eV を示している.

表 1. トウモロコシコルメラ細胞の細胞壁、細胞質基質および液胞における元素濃度

元素	元素濃度 (mmol/kg dry wt.)					
	細胞壁		細胞質基質		液胞	
	重力	疑似微小重力	重力	疑似微小重力	重力	疑似微小重力
Ca	5.95 ± 7.74	4.08 ± 5.32	2.66 ± 5.11	13.46 ± 7.70	6.65 ± 9.28	3.46 ± 6.07
K	136.47 ± 99.19	123.93 ± 43.20	155.50 ± 75.09	110.60 ± 74.82	101.46 ± 77.74	55.95 ± 31.84
P	29.33 ± 32.99	9.81 ± 13.93	65.24 ± 38.90	34.50 ± 29.50	30.18 ± 45.07	3.48 ± 5.50

値は平均値 ± 標準偏差 (n = 7). Ca 濃度 0 の分析例も含む.

ルメラ細胞では、重力方向に沈降したアミロプラストと小胞体が接触することで小胞体から Ca イオンが放出され、この放出された Ca イオンが重力刺激の受容を伸長成長する細胞へと伝達する信号伝達因子としての役割を持つと考えられている<sup>15-17)</sup>. 疑似微小重力下で細胞質基質内の Ca 量が増加したのは、重力下では細胞外に移動する Ca イオンが重力方向の攪乱により細胞質基質内に滞留するためと考えられる. 今回、超薄切片の電子顕微鏡観察により、重

力下でアミロプラストが小胞体と接触することが認められた. しかし、それによって小胞体から Ca イオンが放出されるという過程を直接証明することはできなかった. 骨格筋のように小胞体が良く発達して内膜系を構成している場合は、X 線マイクロアナリシスで、小胞体内腔の Ca 増減を検出することにより Ca 放出を示すことができるが<sup>7, 8)</sup>、コルメラ細胞では困難であり、Ca 放出を可視化するための観察技法の開発は今後の課題である. 凍結切片の X 線マ

イクロアナリシスでは、植物を疑似微小重力下に置いた時にコルメラ細胞内の K 濃度が顕著に減少することが示された (図 6、表 1)。植物の根では K は細胞成長や細胞内圧調節に関与していると考えられている<sup>18)</sup>。オジギソウの振動傾性における運動時の葉枕細胞の浸透圧変化は K イオンの移動に伴う水の移動が主な要因となっていることが知られている<sup>19)</sup>。疑似微小重力下のコルメラ細胞内では、Ca 濃度の増加と K 濃度の減少が同時に生じていることから、オジギソウ葉枕細胞と同様の Ca イオンによる K イオン移動の調節機構が存在する可能性がある。このことと、信号伝達物質としての細胞外への Ca イオンの移動過程については、今後取り組むべき課題として残された。

## 文献

- 1) Kordyum E and Guikema J (2001) An active role of the amyloplasts and nuclei of root statocytes in graviperception. *Adv. Space Res.* **27**: 951-956.
- 2) Harberlandt G (1900) Über die Perzeption des geotropischen Reizes. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **18**: 261-272.
- 3) Nemec B (1900) Über die Art der Wahrnehmung des Schwerkraftes bei den Pflanzen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **18**: 241-245.
- 4) Cholodny N (1927) Wuchshormone und Troismen bei den Pflanzen. *Biol. Zentralbl.* **47**:604-626.
- 5) Went FW (1928) Wuchsstoff und Wachstum. *Recl. Trav. Bot. Neerl.* **25**: 1-116.
- 6) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **18**: 123-183.
- 7) Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**: 317-339.
- 8) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocation during the contraction-relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**: 1093-1099.
- 9) Suzuki S (1989) Methods of elemental analysis for biological specimens using an electron microscope. *J. Microorganism* **5**: 34-44.
- 10) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasm membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 11) Hamamoto C, Sato Y, Watanabe E, Hayatsu M, and Suzuki S (2006) Development of mini-cup type of energy dispersivespectroscopy detector for TEM and its applications to biological studies. *Proc. 16<sup>th</sup> Intern. Microsc. Cong.* **1**: 124.
- 12) Moore R (1985) Calcium monement, graviresponsiveness and the structure of collumella cells and columella tissues in roots of *Allium cepa* L. *Ann. Bot. (Lond)* **56**: 173-187.
- 13) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. II. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-478.
- 14) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological System, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 15) Sievers A, Behrens HM, Buckhout TJ and Gradmann D (1984) Can a Ca<sup>2+</sup> pump in the endoplasmic reticulum of the Lepidium root be the trigger for repid changes in membrane potential after gravistimulation? *J. Plant Physiol.* **114**: 195-200.
- 16) Sievers A and Busch MB (1992) An inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the sarcoplasmic and endoplasmic reticula inhibits transduction of the gravity stimulus in cress roots. *Planta* **188**: 619-622.
- 17) Merkys A and Darginaviciene J (1997) Plant gravitropic response. *Adv. Space Biol. Med.* **6**: 213-230.
- 18) Kochian LV and Lucas WJ (1988) Potassium transport in roots. In: *Advances in Botanical Research, Vol 15*. Callow JA,ed., Academic Press Ltd., London: 93-178.
- 19) Fleurat-Lessard P, Frangne N, Maeshima M, Ratajczak R, Bonnemain JL and Martinoia E (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H<sup>+</sup>-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **114**(3): 827-834.

■原 著■

## タツナミガイ体壁網状筋の興奮収縮連関と収縮-弛緩に伴う 細胞内 Ca 動態に関する生理学および細胞化学的研究

川村秀二<sup>1,2</sup> 田原聖一<sup>3</sup> 今井政直<sup>3</sup> 望月大影<sup>3</sup> 鈴木季直<sup>1,3,4,5</sup>

Physiological and Cytochemical Studies on the Excitation-Contraction  
Coupling and the Intracellular Calcium Movement during the  
Contraction-Relaxation Cycle in the Reticular Body wall Muscle of  
*Dolabella auricularia*

Shuji Kawamura<sup>1,2</sup>, Seiichi Tahara<sup>3</sup>, Masanao Imai<sup>3</sup>, Hiroaki Mochizuki<sup>3</sup> and  
Suechika Suzuki<sup>1,3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Present address: Tokai Electron Microscope Co. Ltd., Nagoya-city, Aichi 468-0022, Japan

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

<sup>4</sup> Institute of Integral Science of Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

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

**Abstract:** To clarify the excitation-contraction coupling and the intracellular Ca movement during the contraction-relaxation cycle in a molluscan smooth muscle, the reticular body wall muscle (RBWM) of *Dolabella auricularia*, physiological experiments on the mechanical response, ultrastructural observations and Ca cytochemistry using the pyroantimonate (PA) method were carried out. The plasma membrane of RBWM fibers frequently showed tubular invaginations, closely resembling the transverse tubules (T tubule) of skeletal muscle. Numerous dyadic structures were found just beneath the plasma membrane, suggesting the Ca release from SR during contraction. The development of K-induced contracture tension was remarkably repressed by the removal of external Ca or by the application of Mn ions (10 mM). Caffeine (1 mM) could not cause the development of isometric tension in the Ca-free solution, while rapid cooling of the fiber bundle induced a significant magnitude of tension rise. In the relaxed fibers, the PA precipitate was found in the SR and the inner surface of the plasma membrane, indicating the intracellular Ca localization. In contacting fibers, the PA precipitate was diffusely distributed in the myoplasm, with corresponding precipitate decrease at the peripheral structures. These results indicate that the RBWM fibers are activated mainly by the inward movement of extracellular Ca, although the contribution of Ca released from the intracellular storage structures can not be negligible.

**Keywords:** molluscan smooth muscle, reticular body wall muscle, excitation-contraction coupling, intracellular Ca movements, pyroantimonate method

### 序論

筋肉の収縮と弛緩は筋細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度の増減によって調節されている<sup>1)</sup>。運動神経の興奮は神経筋接合部を介して筋線維に伝達され、筋細胞が興奮し、活動電位が発生する。筋形質膜で生ずるこの興奮は細胞内へ伝達され、貯蔵部位から活性化 Ca<sup>2+</sup> が遊離され、筋形質中の Ca<sup>2+</sup> 濃度が増加して筋フィラ

メントが活性化されることにより収縮が引き起こされる。この筋形質膜の興奮から収縮が引き起こされるまでの一連の過程は興奮収縮連関 (excitation-contraction coupling; EC 連関) と呼ばれている。

骨格筋の EC 連関では、神経筋接合部付近の脱分極によって発生した活動電位が、形質膜の陥入

構造である横行小管 (transverse tubules; T 管) を伝播し、T 管とこれを挟み込む 1 対の筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) 終末槽からなるトライアドで、興奮が SR に伝えられ、SR に貯蔵されている  $\text{Ca}^{2+}$  が遊離されて収縮を引き起こされることが知られている<sup>1)</sup>。すなわち、骨格筋では収縮を引き起こす活性化  $\text{Ca}^{2+}$  は専ら SR に由来する。活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の由来についてはやや異なるが、心筋の EC 連関もほぼ骨格筋と同様の経過をたどることが知られている。

一方、平滑筋では、生物種や各種器官によってその興奮性や収縮性に大きな差があり、EC 連関における活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の由来も骨格筋のように一律ではない。一般的には細胞外液からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が相当量を占めているとされているが、その他にも多様な  $\text{Ca}^{2+}$  の供給源をもつことが知られている<sup>2)</sup>。骨格筋のような T 管構造を持たない平滑筋では、一般に、SR は形質膜直下で形質膜と接合部を形成するダイアドとして局在し、形質膜の興奮に伴いこれらの SR から活性化  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されることが知られている<sup>3,4)</sup>。一方、生理実験やピロアンチモン酸を用いた細胞化学実験により、多くの平滑筋で、形質膜内表面も Ca 貯蔵構造として機能していることが示されており<sup>2)</sup>、ムラサキガイの前足糸牽引筋 (anterior byssus retractor muscle; ABRM) では、形質膜から Ca 結合蛋白質 (MCBP-450) も単離されている<sup>5)</sup>。形質膜の陥入構造である小陥凹内腔もまた活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵部位として知られている<sup>6)</sup>。以上述べたように、平滑筋の活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の由来は様々であり、平滑筋の収縮調節機構については平滑筋ごとに EC 関連過程や収縮-弛緩サイクルに伴う細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を明らかにする必要がある。

軟体動物門腹足綱のタツナミガイ *Dolabella auricularia* は、採餌や外敵から逃避するために、体腔を覆う体壁を構成する体壁網状筋 (Reticular body wall muscle; BWRM) と頭部から体壁中央部にかけて左右の体壁内表面に沿って縦走する体壁縦走筋 (longitudinal body wall muscle; LBWM) を用いて体壁を伸縮させ、海底を移動する。1978 年に Suzuki とその共同研究者ら<sup>7,8)</sup> は LBWM の収縮調節機構について生理学実験とピロアンチモン酸を用いた細胞化学実験を行い、LBWM は、細胞内貯蔵 Ca を多く含み、SR と形質膜内表面が活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵構造として機能することを示した。また、彼らは、この筋は多くのダイアドを含むが、しばしば SR は、骨格筋の T 管構造によく似た形質膜の管状陥入構造 (T 管様構造) とトライアド様構造を形成し、それらの接合部間隙には foot によく似た粒状構造も

見られることを示した。最近、Kinami and Suzuki<sup>9)</sup> は、LBWM の接合部間隙に見られる foot 様構造について微細構造解析を行い、それが骨格筋と同等の foot であることを明らかにしている。なお、T 管様構造については、タツナミガイ近縁種のアメフラシの体壁筋でも観察されている<sup>10)</sup>。

タツナミガイ LBWM の収縮が細胞内貯蔵構造から遊離される  $\text{Ca}^{2+}$  に大きく依存していることや、筋が T 管様構造を持つことは、平滑筋と骨格筋との相関や筋細胞の分化について考察する上で重要であり、類似の構造や機能が LBWM と共にタツナミガイの体壁運動を担っている RBWM にも見られるか否か興味深い。本研究では、収縮-弛緩サイクルに伴う細胞内 Ca 動態に関する生理学実験および細胞化学実験とその結果と関連させた電子顕微鏡観察を行い、これまで全く研究されていない RBWM の微細構造と収縮調節機構を明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### 筋線維束標本の作製

神奈川県横須賀市葉山町の柴崎海岸で採集した体長約 15 ~ 25 cm のタツナミガイ *Dolabella auricularia* を循環海水、(26°C) の水槽で飼育した。木製の解剖台上にタツナミガイを載せ、頭部を釘で固定した後、弛緩している時の体長と同じ長さまで伸ばし、尾部を釘で固定した。背側正中線に沿って切開し内臓を取り除いた。体腔に面した体壁に見られる網状筋は体軸に直交して走行する輪状筋と体軸と平行に走行する縦走筋からなり、このうち、輪状筋を走行方向に沿って切り出した。底部にシリコンラバーを充填したシャーレ (解剖用シャーレ) 内に pH 7.2 の人工海水 (ASW) を満たし、顕微解剖して幅約 2 mm、長さ約 10 mm の筋束を作製した。

### 等尺性張力の測定

単離した RBWM 筋束の両端に S 字状の金属フックを解剖糸と軟組織接合接着剤で取り付けた。容量 10 ml の実験槽内に pH 7.2 に調整した ASW (NaCl, 513 mM; KCl, 10 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM;  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM) を満たし、筋束を入れ、一端のフックを固定支点となるレバーに接続し、他端のフックをトランスデューサー (UT-100, Shinnko-Tushinn) に接続した。実験槽内の液を水流ポンプの吸引で交換できるようにし、等尺性張力をペンレコーダー (Mark VII WR3101, Graphtec) で記録した。

筋束を刺激する実験溶液として、高濃度の  $\text{K}^+$  溶液、アセチルコリン ( $10^{-3}$  M) 溶液およびカフェイン ( $10^{-3}$  M) 溶液を用いた。高濃度  $\text{K}^+$  溶液は、ASW の

K 濃度を 20 ~ 400 mM に増加し、増加分に等しい Na<sup>+</sup> 濃度を減ずることで調整した。また、アセチルコリンとカフェインの溶液は、ASW にそれぞれの濃度を溶かして調整した。その他、各種イオンや薬物の影響を調べるための実験溶液の調整や溶液交換過程については、それぞれの実験結果とあわせて記述した。全ての実験は室温 (~ 26°C) 下で行った。

### 微細構造観察法

微細構造観察のため、ASW を満たした解剖用シャーレの底に、単離した RBWM の筋束を体内長になるよう伸長してピンで固定し、実体顕微鏡で観察しながら余分な結合組織や粘膜炎を取り除いた。PH 7.2 に調整した 0.1 M カコジル酸緩衝液で希釈した 6% グルタルアルデヒド (glutaraldehyde; GA) 溶液で 0.5 時間固定した後、ピンから解放し、GA の浸透を良くするために筋束を約 2 mm の長さに切り、固定用試料ビンに入れて更に室温で 1.5 時間、または 4°C で 12 時間、前固定した。0.1 M カコジル酸緩衝液で 3 分間の洗浄を 2 回、蒸留水 (DW) で 3 分間の洗浄を 1 回行った後、2% 四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>) 溶液を試料ビンに入れ 4°C で 12 時間、後固定した。固定後、試料を 50、70、90% エタノールで各 10 分間、100% エタノールで 20 分間、脱水した後、プロピレンオキサイド (propylene oxide; PO) 溶液で 20 分間ずつ 2 回、液交換を行い脱水置換した。Quetol 812 を主剤とする Epoxy 樹脂と PO を 1 : 1 で混合した液内に 12 時間、更に Epoxy 樹脂中に 4°C で 12 時間置いて脱水液を樹脂と置換し、その後、包埋板を用いて Epoxy 樹脂に包埋し、40°C で 24 時間、60°C で 24 時間熱重合した。実体顕微鏡下で試料ブロック内の試料を 1 mm 正方形の形状になるようにトリミングし、ウルトラマイクロトームで厚さ 70 nm の超薄切片を作製し、コロジオン膜を張り、さらにカーボン蒸着で補強した Cu-150 メッシュに載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色して透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX) で観察した。

### ピロアンチモン酸法による Ca 細胞化学

細胞内 Ca 局在と収縮-弛緩に伴う細胞内 Ca 動態を観察するために実験槽内でトランスデューサーに接続した筋束を、筋弛緩時と、カリウム (K) 拘縮最大張力発生時に 2% のピロアンチモン酸カリウム (K · Sb(OH)<sub>6</sub> · 1/2H<sub>2</sub>O または K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Sb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 4H<sub>2</sub>O; K-PA) を含む pH 7.2 に調整した 1% の OsO<sub>4</sub> 液 (PAOs 液) で固定した。固定後の試料の脱水、樹脂置換、樹脂重合、超薄切片の作製とメッシュへの載物は通常微細構造観察試料の作製と同じ方法で行なった。無染

色の超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。

ピロアンチモン酸 (PA) は、Ca<sup>2+</sup> 以外の陽イオンとも反応して沈澱を形成することが知られており<sup>11,12</sup>、実際に電子顕微鏡下で観察される沈澱が Ca を含むことを証明するには、X-線マイクロアナリシスが有効である<sup>13,14</sup>。PA によって生じた沈澱が Ca 局在を示すことを明確にするために、これらの超薄切片について、エネルギー分散型 X-線検出器 (JEOL EX-14033 JTP) を装着した電子顕微鏡 (JEOL 1230 TEM) で X-線マイクロアナリシスを行った。切片の汚染を防止するために、コールドトラップに液体窒素を注入してホールピースの周りを冷却した。元素分析では、倍率を 15,000 倍に設定し、試料を X-線検出器の方向に 15° 傾け、分析対象領域に 200 秒間電子線を照射した。放出された X-線を検出器で分光し、得られた X-線スペクトルを解析した。

## 結果

### カリウム (K) 拘縮

外液の K<sup>+</sup> 濃度を増加 (20、30、40、70、200、400 mM) させ、それによって引き起こされる K 拘縮張力を記録した (図 1)。外液 K<sup>+</sup> 濃度を ASW の 10 mM から 20 mM に増加しても、収縮は引き起こされなかったが (図 1B)、30 mM に増加すると張力の発生が見られた (図 1C)。張力発生の立ち上がりは、非常に緩徐で、プラトーに達するまでには 1 分以上を要した。外液 K<sup>+</sup> 濃度が 30 mM 以上では、濃度増加に伴い発生張力も増大し、プラトーに達するまでの時間も短縮された (図 1C ~ G)。多くの海産無脊椎動物の平滑筋では、外液の K<sup>+</sup> 濃度を 200 ~ 400 mM に増加させることで最大拘縮張力が得られている<sup>2,4,7,13</sup>。RBWM でも、外液の K<sup>+</sup> 濃度を 400 mM にすることで、最大拘縮張力が得られた (図 1G)。図 2 は、これらの結果をまとめた K<sup>+</sup> 濃度-張力関係を示している。縦軸は最大張力を引き起こす 400 mM K<sup>+</sup> 濃度で発生する最大張力を 1.0 とした相対張力、横軸はそれぞれの K<sup>+</sup> 濃度を対数値で示している。K<sup>+</sup> 濃度-張力関係曲線は緩やかな S 字曲線を示し、これまでに報告されている海産無脊椎動物の平滑筋での結果とよく一致した<sup>2,4,7,13</sup>。

### K 拘縮に及ぼす Ca<sup>2+</sup> と Mn<sup>2+</sup> の影響

K 拘縮に及ぼす 2 価陽イオンの影響について調べた。外液から流入する Ca<sup>2+</sup> が活性化 Ca<sup>2+</sup> になっているか否かを確かめるために、外液 Ca<sup>2+</sup> を除去した時の K 拘縮張力の発生を観察した。予め、ASW 組成から Ca<sup>2+</sup> を除き、除いた Ca<sup>2+</sup> 量と等しい Na<sup>+</sup> を増

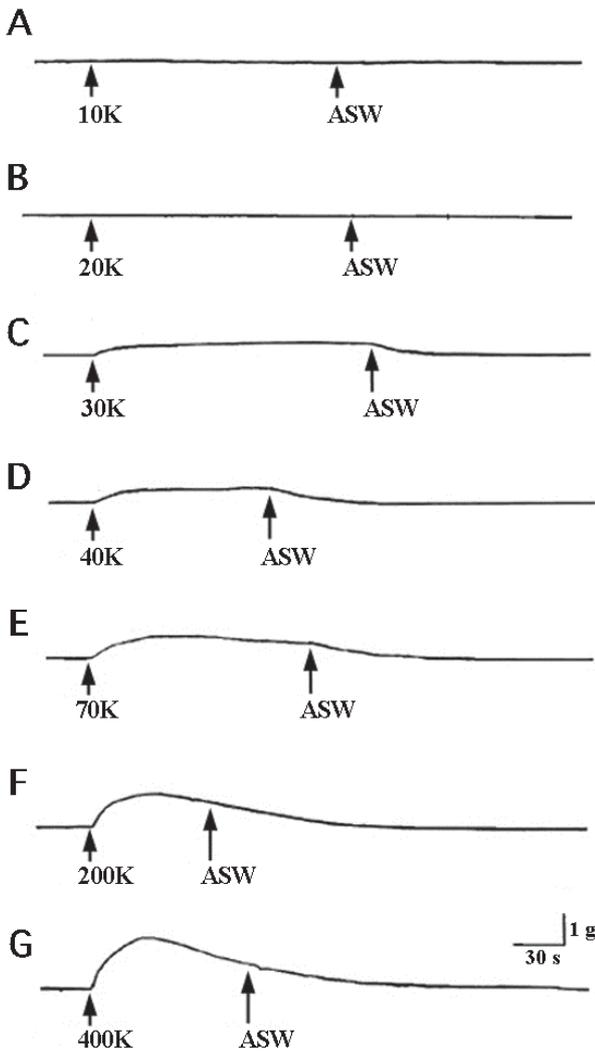


図1. K拘縮張力の記録. 外液のK<sup>+</sup>濃度の増加(A-G; 10~400 mM K<sup>+</sup>)に伴いK拘縮張力も増大.

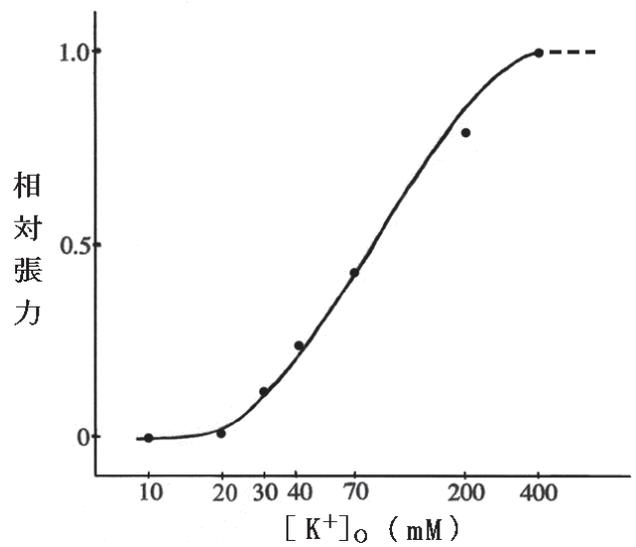


図2. タツナミガイ RBWM の K 拘縮における K<sup>+</sup> 濃度 - 張力関係曲線.

加し、Ca<sup>2+</sup>キレート剤として2 mMのEGTAを加えたASW(Ca-free ASW)のK<sup>+</sup>濃度を400 mMとしたCa-free 400 mM K<sup>+</sup>溶液を調整した。K拘縮で最大張力を発生し、その後の自発的弛緩とASWによる洗浄で、完全に弛緩したRBWMの外液をASWからCa-free ASWに置換し、10分後にCa-free 400 mM K<sup>+</sup>溶液に変えると、RBWMは張力を発生しなかった(図3A)。一方、外液のCa<sup>2+</sup>濃度を2倍の20 mMに増加(増加分のNa<sup>+</sup>を減じた)した400 mM K<sup>+</sup>溶液を、K拘縮最大張力発生時に投与したところ、張力は持続されたが、増強は認められなかった(図3B)。

Mn<sup>2+</sup>はCa<sup>2+</sup>と拮抗し、Ca<sup>2+</sup>チャネルを介した

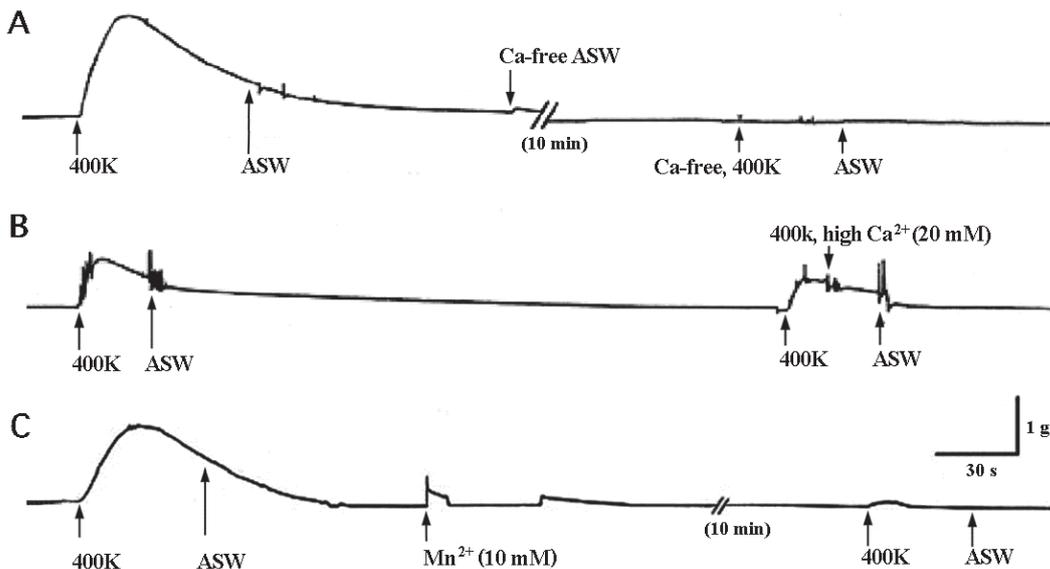


図3. K拘縮におよぼす外液Ca<sup>2+</sup>濃度の増減とMn<sup>2+</sup>の影響. A. Ca-freeの影響. 外液のCa<sup>2+</sup>を完全に除去したCa-free (2 mM EGTA) ASWによる処理で張力発生は抑制. B. K拘縮中に外液Ca<sup>2+</sup>濃度を20 mMに増加した時の影響. 自発的な張力減少は抑制. C. Mn<sup>2+</sup> (10 mM)の影響. K拘縮張力発生時の顕著な抑制が見られる.

Ca<sup>2+</sup> 流入を抑制することが知られている<sup>15)</sup>。10 mM の Mn<sup>2+</sup> を含む ASW に筋束を浸けた後、400 mM K<sup>+</sup> 溶液を投与したところ、最大張力のわずか 5% の張力しか発生しなかった (図 3C)。これらの結果は、RBWM では、収縮を引き起こす活性化 Ca<sup>2+</sup> の供給が外液からの流入に強く依存することを示唆する。

### 急速冷却

ある種の骨格筋や平滑筋では外液の温度を急速に低下させると、形質膜電位が変化して筋収縮が引き起こされることが知られている<sup>2,7,16,17)</sup>。図 4 は、RBWM の外液温度を 20°C から 4°C に急速に低下させた時の力学的応答を示している。急速冷却により RBWM は、K 拘縮最大張力のおよそ 52% の張力を発生し、その後、筋は自発的に弛緩した。

### カフェインおよびアセチルコリン拘縮

骨格筋では、カフェインが SR からの Ca<sup>2+</sup> 遊離を引き起こすことはよく知られている<sup>18-20)</sup> が、多くの平滑筋でもカフェインは SR からの Ca<sup>2+</sup> 遊離を引き起こしていることを示す生理実験結果が報告されている<sup>19)</sup>。K 拘縮後、外液を ASW から Ca-free ASW に置換して 10 分後に 1 mM のカフェインを投与したが、RBWM は張力を発生しなかった (図 5A)。脊椎動物および多くの無脊椎動物で、アセチ

ルコリンは神経伝達物質として機能し、平滑筋への直接的な投与により多くの平滑筋で拘縮が引き起こされる<sup>4,7)</sup>。1 mM のアセチルコリンを含む ASW を RBWM に投与すると自発的弛緩を伴う大きな拘縮張力が発生した (図 5B)。張力の大きさは、K 拘縮最大張力にほぼ等しく、この筋に作用する神経伝達物質はアセチルコリンと考えられる。

### RBWM 筋線維の微細構造

RBWM の筋線維束は多数の筋線維で構成されており、多くの無脊椎動物の平滑筋と同様に、細胞間隙の幅は一定ではなく、広いところで数 μm に達し、主にコラーゲン繊維によって満たされていた。タツナミガイの LBWM では、細胞間に細胞間結合 (gap junction) が形成されていることが報告されているが<sup>7)</sup>、今回の観察では、いかなる細胞間結合構造も確認できなかった。筋線維の直径は 10 - 20 μm であり、一般的な脊椎動物の平滑筋筋線維より太く、筋形質内の殆どは収縮要素の太いフィラメント (直径約 30 nm) と細いフィラメント (直径約 7 nm) で占められていた (図 6)。核は、細胞内の中心部に局在し、その周囲には直径 0.5 - 1.2 μm のミトコンドリアが多数観察された。SR は、時に、形質膜から離れた細胞中央部にも見られたが、殆どは形質膜直下であり、直径 0.1 - 0.5 μm の楕円体または



図 4. 急速冷却による張力発生。弛緩時に外液の ASW (20°C) を低温 (4°C) の ASW に置換。K 拘縮最大張力のおよそ 50% の張力が発生。

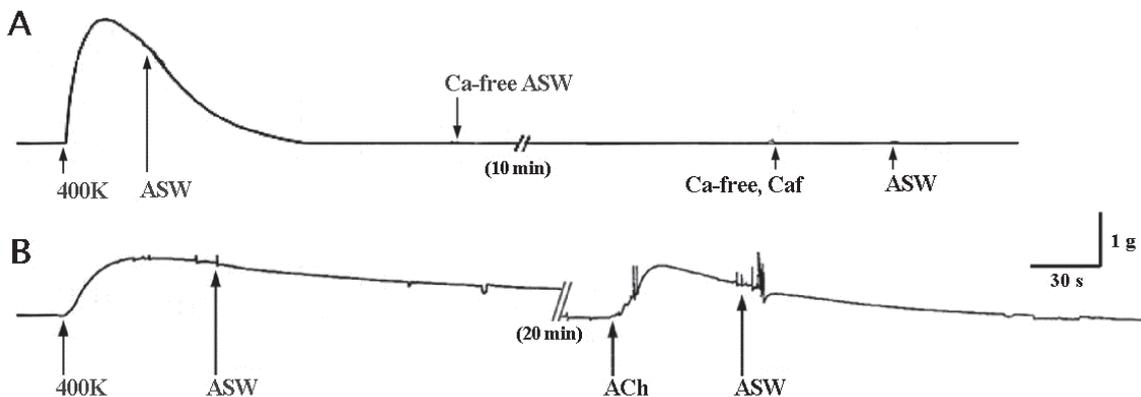


図 5. カフェイン拘縮とアセチルコリン拘縮。A. Ca-free (2 mM EGTA) ASW 中で 1 mM のカフェイン (Caf) を投与。拘縮は生じない。B. アセチルコリン (ACh, 1 mM) による拘縮。K 拘縮最大張力にほぼ等しい張力が発生。

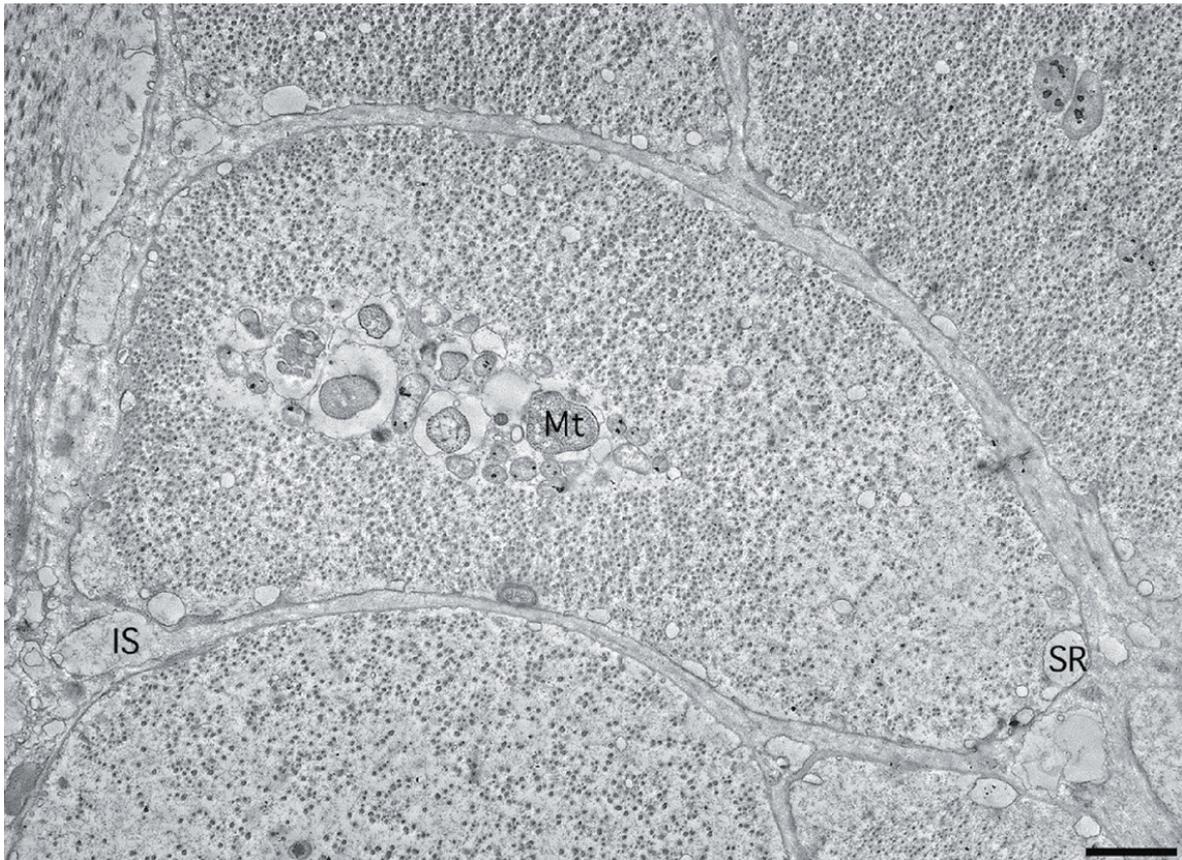


図 6. GA と OsO<sub>4</sub> で化学固定された RBWM 筋線維の横断切片像. 形質膜内表面に沿って 多数の筋小胞 (SR) が局在し, 形質膜とダイアッドを構成している. 筋線維内の空間の殆どは筋フィラメントで満たされているが, 中央部にはミトコンドリア (Mt) も局在する. IS: 細胞間隙. スケール: 2  $\mu$ m.

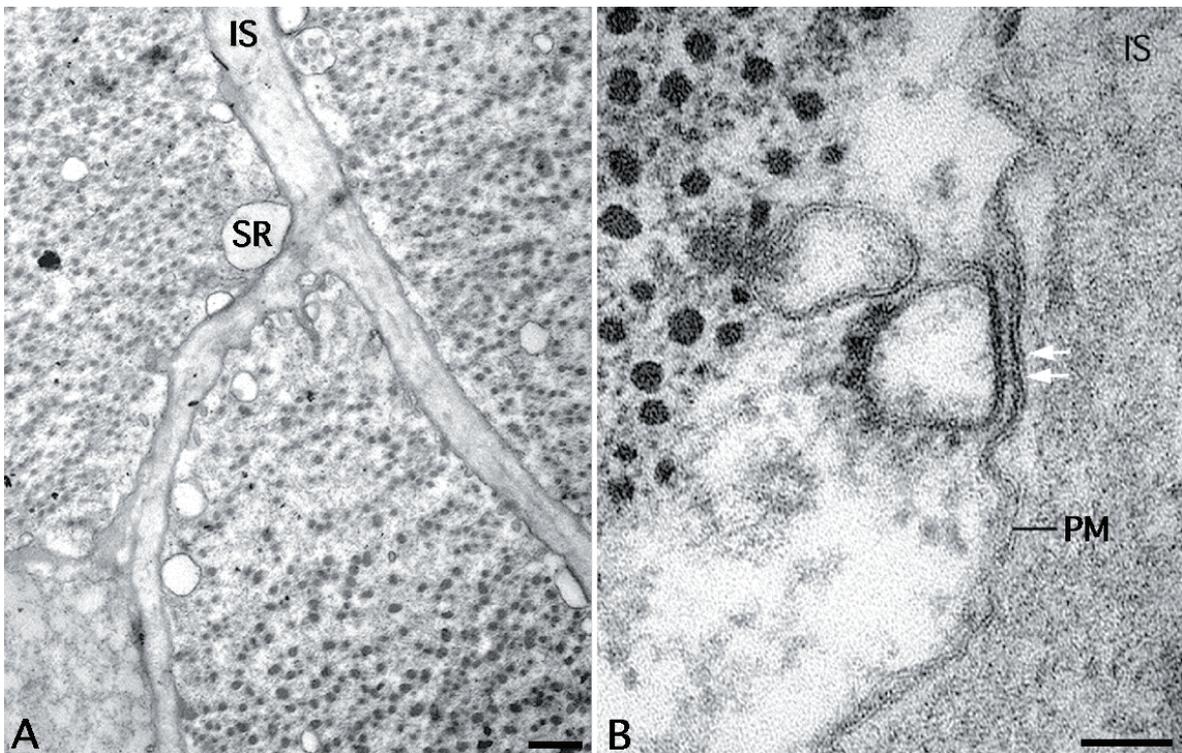


図 7. RBWM 筋線維形質膜付近の切片像. A. 形質膜直下の筋小胞体 (SR) 局在. IS: 細胞間隙. B. 形質膜直下の SR の拡大像. SR は形質膜 (PM) とダイアッド構造を構成し, 膜間の接合部間隙には foot 様構造 (白矢印) が見られる. スケール: 0.5  $\mu$ m (A), 0.1  $\mu$ m (B).

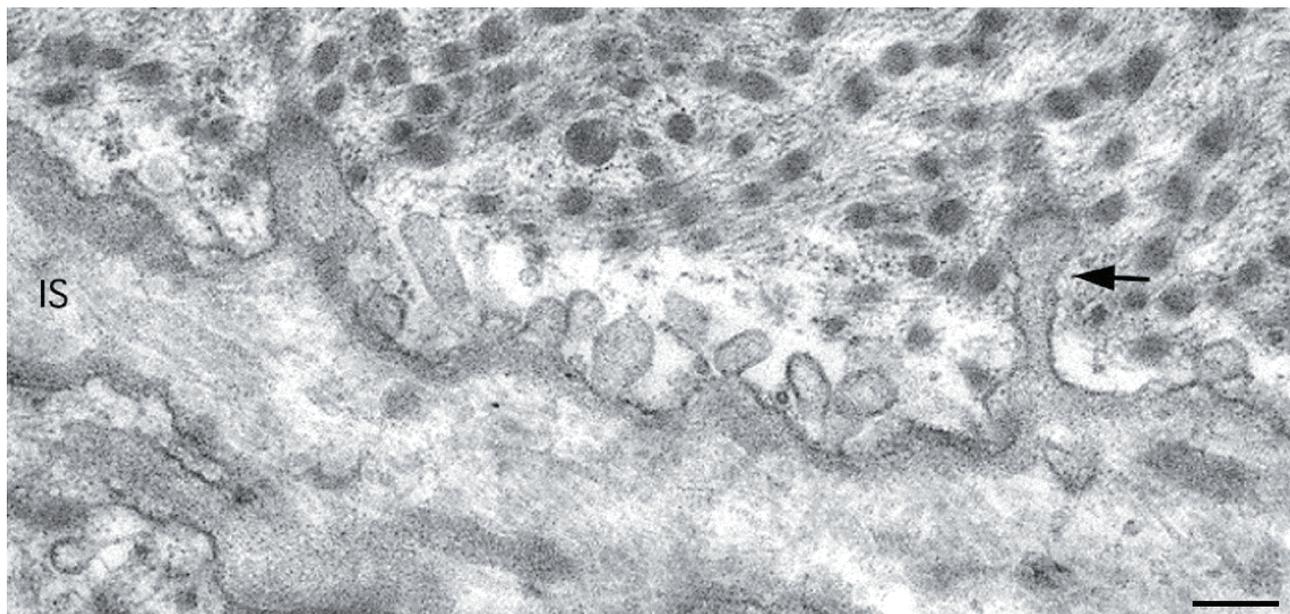


図 8. RBWM 筋線維形質膜上の小陥凹と T 管様構造. 一部では小陥凹が連結して T 管様構造を形成 (矢印). スケール: 0.2  $\mu\text{m}$ .

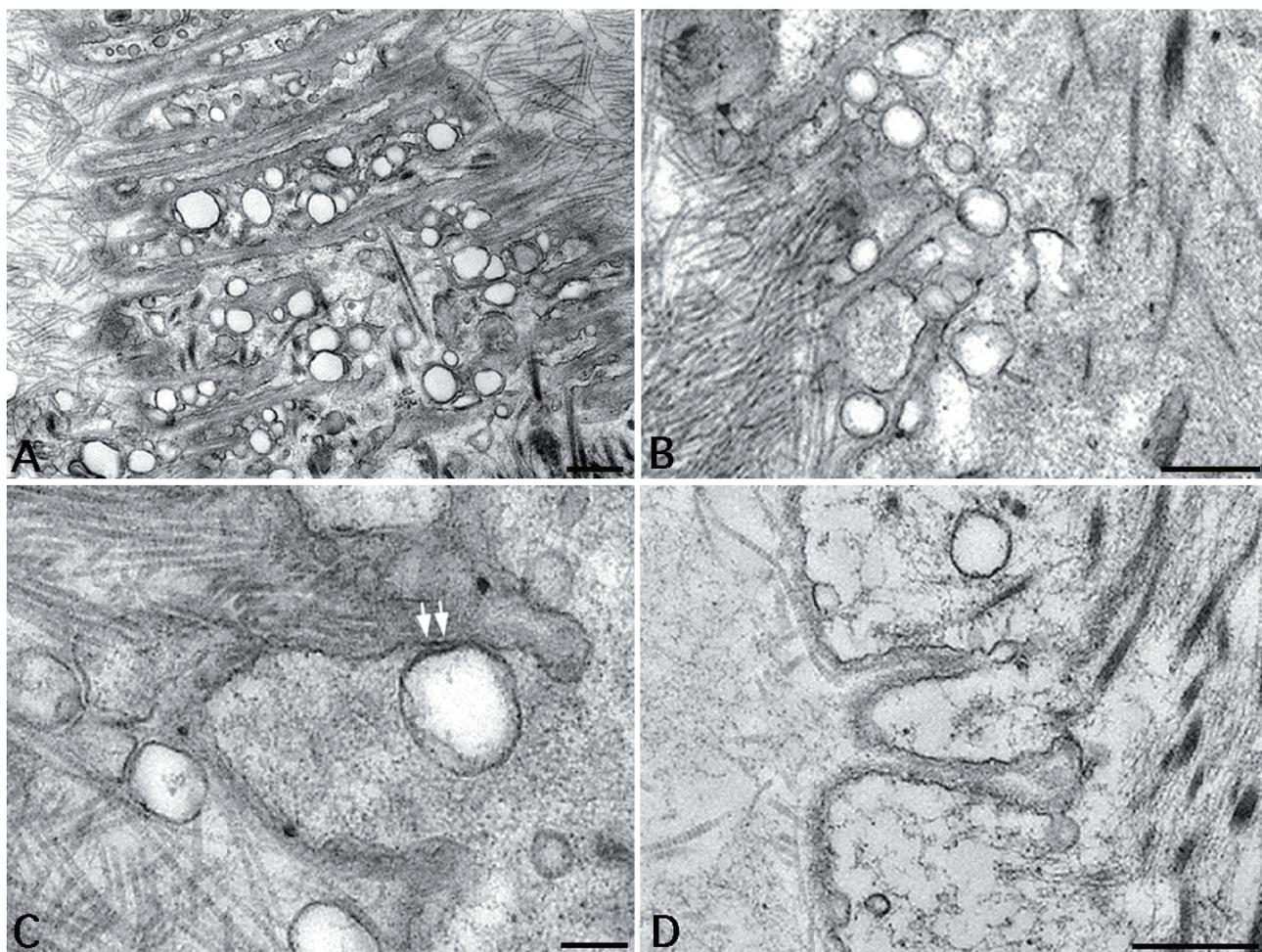


図 9. RBWM 筋線維形質膜付近の微細構造. A. T 管様構造. 細くなっている筋線維末端部に顕著で, 筋線維を貫通することがある. 周辺部には多数の SR が局在. B. T 管様構造と SR. SR は T 管様構造の膜とダイアッドを構成. C. ダイアッドの拡大像. T 管様構造膜と SR 膜が対向する接合部間隙に foot 様構造 (白矢印) が見られる. D. T 管様構造側壁面や先端 (管底部) に見られる小陥凹. スケール: 0.5  $\mu\text{m}$  (A, B, D), 0.2  $\mu\text{m}$  (C).

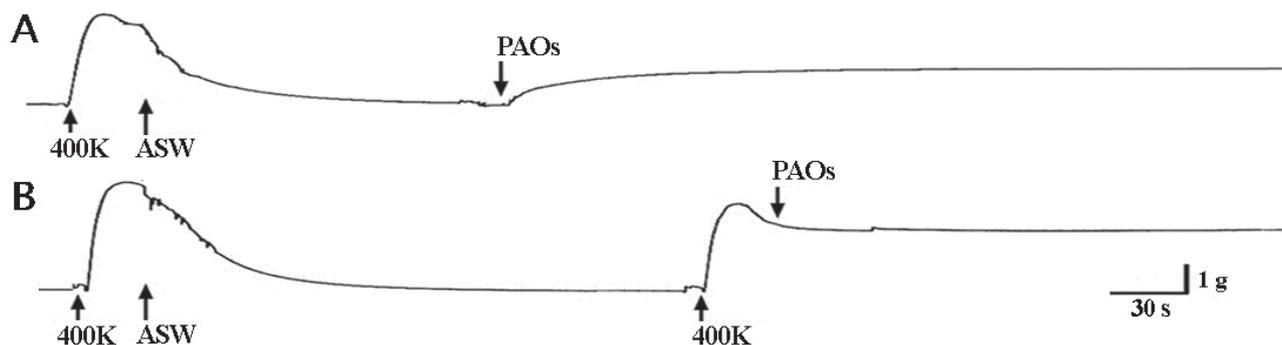


図 10. Ca 細胞化学固定時の等尺性張力記録. A. 筋弛緩時の PAOs 固定. B. K 拘縮最大張力発生時の PAOs 固定. 最初の力学的応答は対照の K 拘縮.

球状であった (図 6, 7)。それらの SR の形質膜に面した膜は、形質膜と接合部を形成しており、この接合部間隙には、しばしば、直径 16 nm の高電子密度の粒状構造が見られた (図 7)。

筋形質膜には、口径 46 ~ 92 nm、内腔の内径 84 ~ 138 nm の壺型小陥凹が多数観察された (図 8)。RBWM では、同じ形質膜陥入構造ではあるが、壺型の小陥凹とは異なる管状の陥入構造がしばしば観察された (図 9A)。この構造は、タツナミガイの LBWM で報告されている T 管様構造<sup>7,9)</sup>と同じものと考えられる。T 管様構造の口径および管の内径は、小陥凹の口径および内腔内径に等しいか、またはそれ以上に大きく、管の長さも、最も長いものでは約 2.8 mm もあり、細胞表面から細胞内に深く陥入していた。

LBWM で報告されているように、T 管様構造の管壁をなす形質膜直下にはしばしば SR が局在し、膜接合によりダイアッドを形成しており、ここでも接合部間隙には高電子密度の粒状構造が観察された (図 9B, C)。また、しばしば T 管様構造の管壁面、および、その先端の管底部には小陥凹が観察された (図 8, 9D)。

### 細胞内 Ca の局在と収縮時の移動

活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内貯蔵構造を明らかにするために  $\text{Ca}^{2+}$  の局在と筋収縮時の細胞内移動を検出できるピロアンチモン酸 (PA) を用いた細胞化学実験を行った。RBWM の筋束をトランスデューサーに接続して十分に弛緩していることを確認した後、外液を PAOs 液で置換して細胞化学固定を行った (図 10A)。筋は、PAOs の刺激で張力を発生したが、その大きさは K 拘縮最大張力の 35% 以下であり、その後、張力の大きさは時間とともに徐々に増大したが、最終的には K 拘縮最大張力の 40% 以下であった。一方、筋収縮時の Ca 動態を明らかにするために K 拘縮最大張力発生直後に外液を PAOs 液に置換して細胞化

学固定を行った (図 10B)。PAOs 液投与直後にわずかな張力減少が見られたが、固定の最終段階では K 拘縮最大張力の 75% の張力が維持されていた。

図 11 は、弛緩時に PAOs 液で細胞化学固定した筋線維束の縦断切片像である。筋線維表面の形質膜部に顕著な沈澱反応が見られた。細胞内では、ミトコンドリアや核内にも沈澱が観察された。形質膜領域を詳細に観察すると、PA 沈澱は、形質膜内表面および形質膜直下に局在する SR 膜上に局在していた (図 11B)。一方、筋収縮時に PAOs 液で固定した筋線維では、形質膜内表面と SR 膜上で PA 沈澱は著しく減少していた (図 11C)。しかし、これとは対照的に、筋形質内には多数の分散分布した沈澱が観察された。SR を含めて筋形質膜領域における PA 沈澱の著しい減少に対し、ミトコンドリアや核では沈澱の減少は認められなかった。

PA は生体内で様々な陽イオンと反応して沈澱を生じることが知られている<sup>11,12)</sup>。今回電子顕微鏡下で観察された沈澱が PA と  $\text{Ca}^{2+}$  と反応で生じた  $\text{Sb}\cdot\text{Ca}$  (アンチモン・カルシウム) の沈澱であることを明確にするために X-線マイクロアナリシスを行った。

図 12 は、筋弛緩時 RBWM の筋形質膜内表面に局在する PA 沈澱に電子線を照射して得られた X-線スペクトルである。5,000 eV までのエネルギー範囲では、C-K $\alpha$  線 (200 eV)、O-K $\alpha$  線 (440 eV)、Cu-M 線 (930 eV)、Os-M 線 (1,914 eV) のスペクトルピークと、さらに Sb-L $\alpha$  線のピークエネルギー値である 3,600 eV 付近に顕著なスペクトルピークが見られた。図 12A は、0 ~ 5,000 eV 範囲のスペクトルのうち、3,600 eV 付近の数種のピークを拡大表示したものである。この拡大範囲での最大ピークのピークエネルギー値は 3,620 eV であった。また、これより高エネルギー領域に、最大ピーク強度の 50% 以下になる顕著なピークが 2 つ認められ、それらの

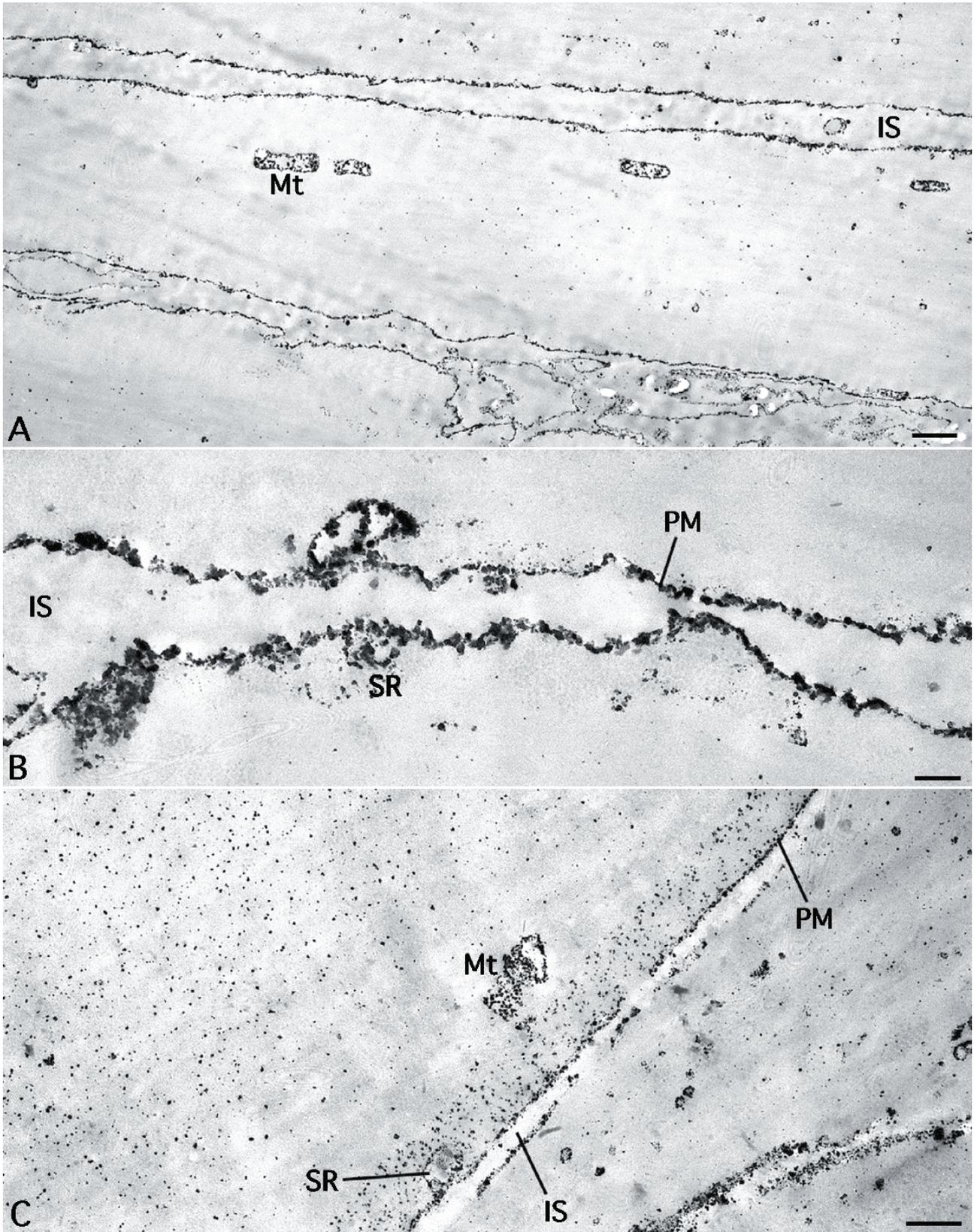


図 11. 細胞内 Ca 局在と収縮時の移動. A. 筋弛緩時に PAOs で固定した RBWM の縦断切片像. 形質膜内表面や SR 膜上, ミトコンドリア (Mt) に PA 沈澱が見られる. B. 弛緩筋の形質膜付近の拡大像. 形質膜内表面と筋小胞体 (SR) 膜上の PA 沈澱に注目. C. 筋収縮時に PAOs で固定した RBWM の縦断切片像. PA 沈澱は主に筋形質中央部に分散分布しており, 形質膜内表面や筋小胞体 (SR) では著しく少ない. ミトコンドリア (Mt) では PA 沈澱が減少していないことに注目. IS: 細胞間隙. スケール: 1  $\mu$ m (A, C), 0.2  $\mu$ m (B)

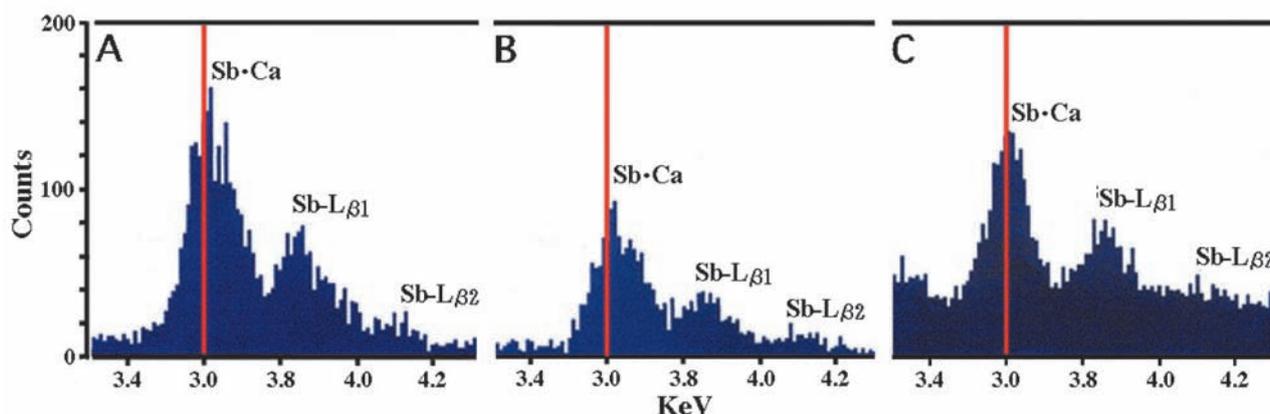


図 12. PA 沈澱分析の X-線スペクトル. A. 筋弛緩時に形質膜内表面に局在する PA 沈澱の X-線スペクトル. B. 筋弛緩時に形質膜直下の SR 膜上に局在する PA 沈澱の X-線スペクトル. C. 収縮時に筋形質中央に分散分布する PA 沈澱の X-線スペクトル. 各スペクトルは、Sb-L $\alpha$  線と Ca-K $\alpha$  線のスペクトルピークが含まれる 3,600 eV 付近を拡大. 赤の垂直線は Sb-L $\alpha$  線の理論的ピークエネルギー値である 3,600 eV を示す. スペクトルピークが 10 ~ 20 eV 右にシフトしていることに注目. Sb·Ca: Sb-L $\alpha$  線と Ca-K $\alpha$  線の重複ピーク, Sb-L $\beta_1$ : Sb-L $\beta_1$  線, Sb-L $\beta_2$ : Sb-L $\beta_2$  線, 縦軸: X-線カウント. 横軸: エネルギー値 (10 eV/CH).

ピークエネルギー値は 3,850 eV と 4,100 eV であった. ピークのエネルギー値から、それぞれのピークは、Sb-L $\beta_1$  線と Sb-L $\beta_2$  線と判定された.

PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスにおいて、最大ピークエネルギー値が 3,610 ~ 3,640 eV である場合には、スペクトルが、Sb-L $\alpha$  線 (3,600 eV) と Ca-K $\alpha$  線 (3,690 eV) の複合ピークとなり、沈澱が Ca を含むことを示すことが報告されている<sup>2,6,8)</sup>. 今回分析された PA 沈澱のスペクトルは、3,620 eV に最大ピークがあり、この沈澱は Sb·Ca の沈澱であることを示す. 同様の結果は、SR に局在する沈澱および、筋収縮時の筋形質内に分散分布する沈澱の分析でも得られた (図 12B, C).

## 討論

### 生理学実験による Ca 動態の検討

K 拘縮における K<sup>+</sup> 濃度・張力関係曲線は緩やかな S 字曲線を示した. これは K 拘縮張力が外液の K<sup>+</sup> 濃度に依存して増大し、その関係は S 字曲線をなすという Hodgkin and Horowicz<sup>21)</sup> の記述と一致した. また、外液 K<sup>+</sup> 濃度の増加は形質膜を脱分極させ、最大強縮張力より 10% も大きい収縮が引き起こされることが報告されているので、K 拘縮は、RBWM の力学的応答の性質を調べるための有効な手段である<sup>21)</sup>. なお、アセチルコリンの刺激によって、K 拘縮最大張力とほぼ等しい張力発生が見られることから、この平滑筋はコリン作働性と考えられる.

外液の Ca<sup>2+</sup> を完全に除くと、RBWM は張力を発生せず、Ca<sup>2+</sup> チャネルに拮抗的に作用する<sup>15)</sup> と考えられる Mn<sup>2+</sup> によって張力発生は殆ど抑制された (図 3). これらの結果は、この平滑筋の収縮が主に

外液から流入する Ca<sup>2+</sup> によって引き起こされていることを示す. SR から活性化 Ca<sup>2+</sup> を遊離させるカフェインでは顕著な収縮が引き起こされなかった結果 (図 5A) はこの考えを支持する.

収縮が外液からの Ca<sup>2+</sup> の流入に強く依存している平滑筋では、外液の Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加により張力が増強される可能性のあることが知られている<sup>13,14)</sup>. RBWM では、外液の Ca<sup>2+</sup> 濃度を 20 mM に増加させても張力の増強は認められなかった (図 3B) が、これは、400 mM K<sup>+</sup> 濃度による拘縮が、既にこの平滑筋の最大張力を発生してしまっていることによるものと考えて矛盾しない.

K 拘縮に及ぼす Ca<sup>2+</sup> や Mn<sup>2+</sup> の影響は、この平滑筋の収縮が、外液からの Ca<sup>2+</sup> の流入に強く依存していることを示唆する. 一方、Sakai *et al.*<sup>19)</sup> は急速冷却によって、骨格筋 SR から Ca<sup>2+</sup> が遊離されることを見出しており、Sugi and Suzuki<sup>7)</sup> はタツナミガイの LBWM で、急速冷却が、形質膜内表面に結合している Ca<sup>2+</sup> を遊離することを報告している. RBWM では、急速冷却により有意な大きさの張力発生が認められた (図 4) ことから、この筋の収縮系の活性化には SR や形質膜内表面から遊離される Ca<sup>2+</sup> も寄与している可能性もある.

### 興奮収縮連関に関与する微細構造

運動神経から興奮が伝達されると、平滑筋細胞では、最初に形質膜の電位変化が生ずる. この電位変化が細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させるまでに関与する細胞内構造としては、これまでに、主に SR と筋形質膜自体が候補としてあげられている<sup>13)</sup>. タツナミガイ RBWM の微細構造観察の結果、筋形質膜直下に、

形質膜とダイアッドを構成する多数の SR が局在することが示された。接合部間隙には高電子密度の粒状構造が観察され、その特徴は骨格筋トライアッドで見られる foot に類似していることから、恐らく、これらのダイアッドでも foot を介して、形質膜の電位変化が SR へと伝達され、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を誘導する可能性がある。この可能性は、生理学実験の結果が、活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の由来を主に外液からの流入であると示唆したことと一見相反するかのようには思わせるが、多くの平滑筋で、外液  $\text{Ca}^{2+}$  の流入と細胞内貯蔵構造からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は同時に生ずることから、必ずしも矛盾するものではない。事実、次に述べるように、PA を用いた細胞化学実験の結果は、Ca が形質膜直下の SR と形質膜内表面に局在すること、筋収縮時にそれらの構造から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されていることを示しており、この可能性を支持している。

RBWM の形質膜には、一般的な平滑筋では見られない形質膜陥入構造の T 管様構造が多数確認された。骨格筋では、筋発生時に、まず小陥凹が形成され、その小陥凹の内腔底部でさらに新たな小陥凹が連続して生ずることにより T 管が形成されることが知られている<sup>22)</sup>。T 管様構造の口径と内径の最小サイズが小陥凹のそれぞれに近いことと、管壁や管底部にしばしば小陥凹が見られることから、T 管様構造も骨格筋の T 管と同様にして形成される可能性が高い。また、T 管様構造の管壁および管底には、SR が近接し、foot 様構造を含むダイアッドを構成していることから、これらの構造も T 管と同様に細胞表面膜で生じた電気的興奮を細胞の深部へと伝達する働きをしているものと考えられる。同様の構造が、活性化  $\text{Ca}^{2+}$  が主に細胞内 Ca 貯蔵構造に由来するタツナミガイ LBWM で見出されている<sup>3,7)</sup>ことは興味深い。これらの筋は、いずれも、筋線維直径が、脊椎動物の一般的平滑筋よりも 2 倍以上太く、表面から細胞中心部への興奮伝達に骨格筋と同様の T 管様構造を発達させる必然性があったと考えられる。T 管様構造に隣接する SR が活性化  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵構造として機能していることは十分に考えられる。

#### 細胞化学法による細胞内 Ca 局在と収縮時の移動

弛緩時に PAOs 溶液で固定された RBWM では、形質膜内表面と SR 膜上に顕著な PA 沈澱が見られた。一方、収縮時に PAOs 溶液で固定された RBWM では PA 沈澱はこれらの構造で著しく減少し、筋形質内に分散分布していた。この結果は、これまで報告されている多くの平滑筋での結果とよく一致し<sup>2,4)</sup>、RBWM では、形質膜内表面と SR に局在している

Ca が収縮時にそこから遊離され、収縮要素の筋フィラメントを活性化していると考えられる。なお、弛緩時と収縮時で PA 沈澱の局在に変化が見られないミトコンドリアと核も、Ca を貯蔵するが、収縮時に放出される証拠はなく、収縮要素の活性化には直接関与しないと考えられる。

結論として、タツナミガイ RBWM の筋線維は主に細胞外液から流入する活性化  $\text{Ca}^{2+}$  に強く依存して収縮するが、細胞内の Ca 貯蔵構造として機能する SR や形質膜内表面から遊離される活性化  $\text{Ca}^{2+}$  も部分的に収縮要素の活性化に寄与していると考えられる。これは、RBWM とともに、タツナミガイの体運動を担う LBWM が同様によく発達した SR と T 管様構造を持つのに、その活性化が細胞内貯蔵構造からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離に強く依存していることと極めて対照的である。この違いが、何に由来するのかが目下不明であるが、RBWM が体壁内に分布して体壁の収縮に直接関わっているのに対し、LBWM は体壁に包み込まれることなくその表面に分布し、その収縮で頭部から体壁前半を短縮することに関与しているという違いが、力学的応答と活性化  $\text{Ca}^{2+}$  由来の違いに反映されているのかもしれない。

#### 文献

- 1) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys mol. Biol.* **18**: 123-183.
- 2) 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.
- 3) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. II. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-478.
- 4) Suzuki S (1982) Physiological and cytochemical studies on activator calcium in contraction by smooth muscle of a sea cucumber, *Isostichopus badionotus*. *Cell Tiss. Res.* **222**: 11-24.
- 5) Yamanobe T and Sugi H (1993) Purification and characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding 450-kDa protein (MCBP-450) in the plasma membrane enriched fraction from a molluscan smooth muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* **1149**: 166-174.
- 6) Suzuki S and Sugi H (1989) Evidence for extracellular localization of activator calcium in dog coronary artery smooth muscle as studied by the pyroantimonate method. *Cell Tiss. Res.* **257**: 237-246.
- 7) Sugi H and Suzuki S (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. I. Mechanical

- response and ultrastructure. *J. Cell Biol.* **79**: 454-466.
- 8) Suzuki S (1978) Qualitative and Semiquantitative X-ray microanalysis of pyroantimonate precipitates in molluscan smooth muscle, with special reference to the presence of calcium. *Teikyo Med. J.* **1**: 259-268.
  - 9) Kinami M and Suzuki S (2006) Structural analysis of dyadic contacts in the longitudinal body wall muscle of a mollusc *Dolabella auricularia*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **17**: 21-30.
  - 10) Prescott L and Brightman MW (1976) The sarcolemma of *Aplysia* smooth muscle in freeze-fracture preparations. *Tiss. Cell.* **8**: 241-258.
  - 11) Komnick H and Komnick U (1963) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur funktionellen Morphologie des Ionentransport in der Sarzdruse von *Larus argentatus*. *Z. Zellforsch. Anat.* **60**: 163-203.
  - 12) Klein RL, Yen S-S and Thureson-Klein A (1972) Critique on the K-pyroantimonate method for semiquantitative estimation of cation in conjunction with electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **20**: 65-78.
  - 13) Sugi H and Suzuki S (1982) Physiological and ultrastructural studies on the intracellular calcium translocation during contraction in invertebrate smooth muscle. In: *Basic Biology of Muscles. A Comparative Approach*. Twarog BM, Levine RJC and Dewey MM, eds., Raven Press, New York. pp. 359-370.
  - 14) Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryosections. *Histochemistry.* **92**: 95-101.
  - 15) Hagiwara E and Nakajima T (1966) Difference in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and manganese ions. *J. Gen. Physiol.* **49**: 793-806.
  - 16) Kurihara S, Kuriyama H and Magaribuchi T (1974) Effects of rapid cooling on the electrical properties of the smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol.* **238**: 413-426.
  - 17) Atumi S and Sugi H (1976) Localization of calcium-accumulating structures in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis* and their role in the regulation of active and catch contraction. *J. Physiol.* **257**: 549-560.
  - 18) Endo M (1975) Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Proc. Jpn. Acad.* **51**: 479-484.
  - 19) Sakai T, Geffner ES and Sandow A (1971) Caffeine contracture in muscle with disrupted transverse tubulus. *Am. J. Physiol.* **220**: 712-717.
  - 20) Weber A and Herz R (1968) The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol.* **52**: 750-759.
  - 21) Hodgkin AL and Horowicz P (1960) Potassium contracture in single muscle fibers. *J. Physiol.* **153**: 386-403.
  - 22) Ishikawa H (1968) Formation of elaborate network of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J. Cell Biol.* **38**: 51-66.

■ Note ■

## Movement of Ferritin Oligomers in Hepatoma Cells

Sayaka Koikawa<sup>1</sup>, Mohanmad Rubayet Hasan<sup>1</sup>, Makoto Tominaga<sup>2</sup>,  
Shigeaki Miyamoto<sup>1</sup>, Susumu Kotani<sup>3</sup> and Hiroyuki Nakagawa<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology, Iizuka-city, Fukuoka 820-8502, Japan;

<sup>2</sup> Division of Biology, Faculty of Science, Fukuoka University, Fukuoka-city, Fukuoka 814-0180, Japan

<sup>3</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan;

<sup>4</sup> To whom correspondence should the addressred. E-mai: hnakagawa@fukuoka-u.ac.jp

**Abstract:** In mammalian cells, ferritin molecules form oligomers in response to the extracellular iron ion concentration. The distribution of oligomers is closely related to microtubules. However, it is still unclear how microtubules regulate the ferritin distribution in cytoplasm. To approach this question, we observed the movement of rhodamine conjugated ferritin in HepG2 hepatoma cells using a live imaging technique. After a microinjection of rhodamine-conjugated ferritin, rhodamine fluorescence was immediately incorporated into the oligomers. The trajectory of oligomer showed two different mode of movement: a fast-directional and a slow-random movement. Both movements were almost completely absent in cells treated with nocodazole, an anti-microtubule drug. These results indicate that ferritin oligomers are transported along microtubule in the cytoplasm by motor molecule(s).

**Keywords:** ferritin, microtubule, nocodazole, transport, imaging

### Introduction

Ferritin, an iron storage molecule that is ubiquitously expressed among many species, has a spherical structure in mammalian cells constituted by 24 subunit proteins and store a large number of iron atoms in its central cavity<sup>1</sup>. In the cytoplasm, ferritin is thought to scavenge excess free iron to prevent the deleterious effects of iron-mediated free radical damage and to increase the concentration of iron when required<sup>2</sup>.

Recently, ferritin has been characterized as a microtubule-associated protein (MAP) of the bovine adrenal cortex, chicken erythrocyte and human platelet<sup>3-6</sup>. In an in vitro binding assay of purified ferritin with reconstituted microtubules, most ferritin molecules attached on microtubule were found to be oligomers under electron microscopy<sup>4</sup>. In various types of culture cells, ferritin was distributed as oligomers and co-localized with microtubules<sup>7</sup>. Interestingly, ferritin oligomers have been shown to move in the cytoplasm in a microtubule-dependent manner<sup>7</sup>. These previous results imply that ferritin oligomers are transported with an attached microtubule or along microtubules by a motor mol-

ecule. To analyze these possibilities, we observed the movement of ferritin oligomer in the cytoplasm.

### Materials and Methods

#### Materials

Fetal Clone III was purchased from Thermo Fisher Scientific K.K. (Japan). Porcine skin collagen solution (Cellmatrix Type I-C) was purchased from Nitta Gelatin Inc. (Japan). The FluoReporter<sup>®</sup> Tetramethylrhodamine Protein Labeling kit was purchased from Invitrogen Japan K.K. (Japan). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), antibiotics, nocodazole and horse spleen ferritin were purchased from Sigma-Aldrich Japan K.K. (Japan). The other reagents used in the study were of reagent grade unless otherwise stated.

#### Cell culture

Cells of human hepatoma cell line HepG2 were maintained in DMEM supplemented with 10% Fetal Clone III and penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For microinjection, the cells were cultured on cover slips coated with porcine skin collagen.

### Ferritin labeling and microinjection

Horse spleen ferritin was labeled with tetramethylrhodamine (Rho-ferritin) and microinjected into HepG2 cells attached to a collagen coated coverslip according to the methods of Hasan *et al.*<sup>7,8)</sup>.

### Fluorescence microscopy

Fluorescence images were captured at 2-seconds or 1-minute intervals over 100 frames by a cooled digital CCD camera (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics KK, Japan) equipped with an inverted fluorescence microscope (Axiovert-100, Carl Zeiss KK, Japan). All images were processed and edited by ImageJ software.

### Velocity measurement

To analyze the velocity of the movements of the fluorescence particles, at least three particles were selected in each microinjected cell. The particles were tracked separately in each image series by the ImageJ software via its Manual Tracking macro. Three cells were used for this analysis. Particles that moved less than two pixels between two sequential images were classified as "paused". Microtubules were depolymerized by nocodazole treatment according to the method of Hasan *et al.*<sup>7,8)</sup>.

### Results and Discussion

Rho-ferritin molecules were dispersed throughout the cytoplasm of HepG2 cell just after the microinjection, and the fluorescence from rhodamine was gradually incorporated into small punctated structures during the subsequent incubation (Fig. 1A). These punctated structures were gathered near to the cell nucleus (Fig. 1A; 100 min). We have previously characterized these structures as ferritin oligomers in various culture cell lines<sup>6)</sup>. Since the ferritin oligomers have been shown to be native to intact cells<sup>6)</sup>, fluorescent ferritin should not be incorporated into proteolytic membrane-organelles such as lysosomes.

Ferritin oligomers have been shown to attach directly with reconstituted microtubules by an in vitro binding assay<sup>4)</sup>. Ferritin also colocalizes with cytoplasmic microtubules in various types of culture cells in an oligomeric form<sup>7)</sup>. These previous observations suggest that the subcellular localization of ferritin molecule is regulated by microtubule. To clarify this, we observed the dynamics of ferritin oligomers in the cytoplasm of hepatoma cells in detail (Fig. 1B). We have previously reported the movement of ferritin oligomer in cytoplasm but not been able to identify individual oligomers to trace their trajectories through an image series. We overcame this issue by capturing the

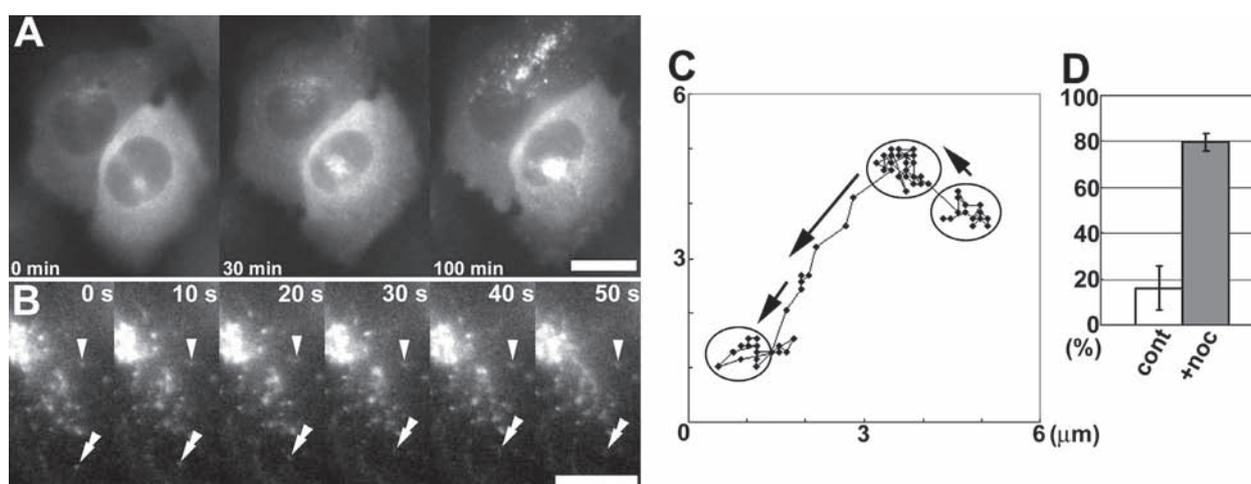


Fig. 1. Movement of ferritin oligomers in HepG2 cells. Rho-ferritin was incorporated into the endogenous ferritin oligomers in a time dependent manner (A). In a high-magnification view, we were able to trace the movement of each oligomer through an image series (B, arrowheads and double-arrow heads). The trajectory of single oligomer showed fast-directional movement (arrows in C) as well as slow-random movement (circles in C). Treatment with nocodazole increased the ratio of the paused state. As shown in D,  $16.1 \pm 9.6\%$  of control cells (open bar) were in the paused state, and this increased to  $79.8 \pm 3.8\%$  in nocodazole treated cells (shaded bar). The bars in A and B represent 20 and 10  $\mu\text{m}$ , respectively.

fluorescence images at up to 30 frames a minute. As shown in Fig. 1B, we were then able to trace the movement of several oligomers in a single cell over one minute. Their trajectories showed at least two states of ferritin oligomer movement: one was directional, and the other was random (Fig. 1C). The velocity of the directional movement was faster ( $0.35 \pm 0.23 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) than that of the random movement ( $0.12 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{sec}$ ). The treatment of HepG2 cells with nocodazole, anti-microtubule drug, considerably reduced the duration of the movement of ferritin oligomers (Fig. 1D). In the nocodazole treated cells, the velocity of oligomer movement was significantly decreased to  $0.016 \pm 0.004 \mu\text{m}/\text{sec}$ . These results indicate that both directional and random movements of ferritin oligomers depend on intact microtubules. Ferritin has the ability to bind directly with microtubules. For the following reasons, however, it is difficult to consider that such interactions promote ferritin movement in the cytoplasm. 1) Simple side binding of ferritin to a microtubule is not able to drive the oligomer. For example, when microtubule-associated protein 4 is attaching to the side of microtubule, it does not show any movement along it<sup>8)</sup>. 2) If ferritin oligomers bind primarily to the tip of microtubule, the oligomer would be able to move directionally according to the dynamic instability of the microtubule as observed for EB1 molecule<sup>9)</sup> but would not show random movement. Thus, ferritin oligomers may interact indirectly with microtubules via various motor-molecules and be transported along microtubules.

In Fig. 2, we propose a model for the movement of ferritin oligomers in the cytoplasm. The oligomer binds motor-molecules, such as kinesins and/or cytoplasmic dyneins, on its surface. During directional movement, the oligomer is driven by motor-molecule(s) along a single microtubule. When the oligomer arrives at the junction of microtubules, the motors on the oligomer interact with the junctional microtubules resulting in a “tug-of-war” between the microtubules. This state is observed as random movement of the oligomer. Finally, the winner motor(s) is carrying the oligomer in the appropriate direction along its microtubule<sup>10)</sup>. In this model, how the oligomer is linked to the motor-molecule(s) is still unclear. Further biochemical analysis of the

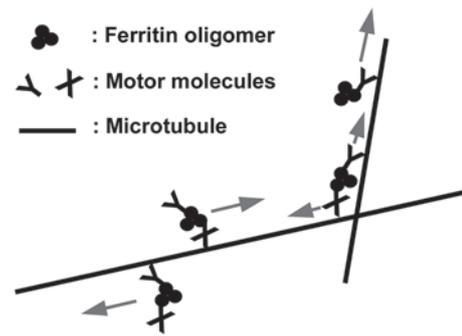


Fig. 2. Movement of ferritin oligomers on microtubules. Ferritin oligomer is linked and transported by a different type of microtubule motor. At the junction of microtubules, motors on ferritin oligomer are attaching microtubules concomitantly resulting in their “tug-of-war”.

molecules that bind to ferritin oligomers in the cytoplasm would shed light on the regulatory mechanism of ferritin oligomer dynamics.

## Acknowledgement

This work was supported in part by funds (No. 082501) from the Central Research Institute of Fukuoka University to H. N.

## References

- 1) Liu X and Theil EC (2005) Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Acc. Chem. Res.* **38**: 167-175.
- 2) Arosio P, Ingrassia R and Cavadini P (2008) Ferritins: A family of molecules for iron storage, anti-oxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**: 589-599.
- 3) Katsuki M, Tokuraku K, Nakagawa H and Kotani S (2000) Purification and characterization of a new, ubiquitously distributed class of microtubule-associated protein with molecular mass 250 kDa. *Eur. J. Biochem.* **267**: 7193-7200.
- 4) Hasan MR, Morishima D, Tomita K, Katsuki M, and Kotani S. (2005) Identification of a 250 kDa putative microtubule-associated protein as bovine ferritin. Evidence for a ferritin-microtubule interaction. *Febs. J.* **272**: 822-831.
- 5) Infante AA, Infante D, Chan MC, How PC, Kutschera W, Linhartova I, Mullner EW, Wiche G and Propst F (2007) Ferritin associates with marginal band microtubules. *Exp. Cell Res.* **313**: 1602-1614.
- 6) Hasan MR, Nakagawa H and kotani S (2009) Iron metabolism and Microtubules. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **20**: 1-9.
- 7) Hasan MR, Koikawa S, Kotani S, Miyamoto S and Nakagawa H (2006) Ferritin forms dynamic oligomers to associate with microtubules in vivo: implication for the role of microtubules in iron metabolism. *Exp. Cell. Res.* **312**: 1950-1960.

- 8) 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.
- 9) Mimori-Kiyosue Y, Shiina N and Tsukita S (2000) The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* **10**: 865-868.
- 10) Muller MJ, Klumpp S and Lipowsky R (2008) Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 4609-4614.

■短 報■ 2008 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とした 無機－有機ハイブリッド化合物の設計と合成

野宮健司<sup>1,4</sup> 力石紀子<sup>1</sup> 松永 諭<sup>1</sup> 坂井善隆<sup>1</sup> 長谷川 剛<sup>2</sup> 木村卓央<sup>3</sup>

Synthesis and Design of Inorganic-Organic Hybrid Compounds Utilizing  
Lacunary Sites of Polyoxometalates as Useful Chemical Reaction Field

Kenji Nomiya<sup>1,4</sup>, Noriko Chikaraishi Kasuga<sup>1</sup>, Satoshi Matsunaga<sup>1</sup>,  
Yoshitaka Sakai<sup>1</sup>, Takeshi Hasegawa<sup>2</sup> and Takao Kimura<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> R&D Center, KIMOTO CO., LTD, Suzuya Chuou-ku, Saitama-city, Saitama 338-0013, Japan

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

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

**Abstract:** A novel free-acid type polymerizable organosilyl-modified Dawson-type polyoxometalate (POM)  $H_6[\alpha_2-P_2W_{17}O_{61}\{CH_2=C(CH_3)COO(CH_2)_3Si\}_2O] \cdot 14H_2O$  (H-1) was prepared. H-1 was immobilized to a polymer network through free radical copolymerization with methyl methacrylate (MMA). The acidities of H-1 and hybrid copolymer (H-1-co-MMA) were evaluated using the Hammett indicator (dicinnamalacetone;  $pK_a$  of the protonated indicator is -3.0). The  $pK_a$  value of H-1 was estimated as -3.0 in  $CH_3OH$  solution. H-1 was immobilized in H-1-co-MMA with the original acidity kept. Glass transition point ( $T_g$ ) and molecular weight distribution of H-1-co-MMA were affected by the used amount of H-1 because of the cross-linking effect of H-1.

**Keywords:** Dawson-type polyoxometalate, organosilyl group, free acid form, acidity, radical polymerization, immobilization

### 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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る。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。また、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。本報告では末端にメタクリル基を含むフリーアシッド型無機－有機ハイブリッドDaw-

son 型ポリ酸塩を合成し<sup>3,4)</sup>、それをメチルメタクリレート (MMA) とラジカル共重合させ、フリーアシッド型ポリ酸塩を共有結合を介して固定化した。得られたポリマーについてキャラクタリゼーション、物性評価を行った<sup>4,5)</sup>。この方法でポリマー中に固定化されたフリーアシッド型ポリ酸塩は重合前の酸性度を保ったまま固定化されることを明らかにした。

### 材料と方法

#### 材料

メタクリル基を含むフリーアシッド型無機－有機ハイブリッド Dawson 型ポリ酸塩は既報<sup>4)</sup>に従い合成した。MMA, アゾビスイソブチロニトリル (AIBN), Hammett 指示薬 (dicinnamalacetone) は和光純薬工業 (株) より入手した。

#### 測定方法

FT-IR スペクトルは DuraScope<sup>TM</sup> を装備した Per-

kin Elmer Spectrum100 で ATR 法により測定した。 $^{31}\text{P}$  NMR は JEOL JNM-EX 400 FT-NMR で測定した。GPC 測定は SHOKO GPC-101 に KF-806 を 2 本、KF-802 を 1 本使用して THF 溶媒で測定を行った。動的粘弾性測定は合成したハイブリッドポリマーをフィルム状に加工し、UBM Rheogel E4000 で測定を行った。

## 結果と討論

フリーアシッド型無機-有機ハイブリッドとしての Dawson 型ポリ酸塩と MMA のラジカル共重合別途、合成したメタクリル基含有無機-有機ハイブリッド型ポリ酸塩のフリーアシッド<sup>4)</sup> ( $\text{H}_6[\alpha_2\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}\{\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}_2\text{O}\} \cdot 14\text{H}_2\text{O} \cdot \text{H-1}]$ ) (図 1) と MMA のラジカル共重合反応をアセトニトリル中、 $\text{N}_2$  雰囲気下で行った。反応溶液を大量のメタノール中へ加えハイブリッドポリマーを再沈殿させて回収した。同様の合成方法で H-1 の仕込み量を変化させた 5 種類のハイブリッドポリマー (A ~ E) を合成した。(表 1)

得られたハイブリッドポリマーはそれぞれ白色粉末で収量は A: 10.2 g, B: 4.9 g, C: 6.9 g, D: 6.0 g, E: 6.6 g であった。

### キャラクターゼーション

5 種類のハイブリッドポリマーの FT-IR を測定した (図 2)。H-1 の添加量が増すに従いポリ酸塩の P-O バンドに基づく矢印部分の吸収 ( $1090\text{ cm}^{-1}$  付近) が徐々に増大した。このことより H-1 はポリ酸骨格を保ったままポリマー中に固定化されていることが

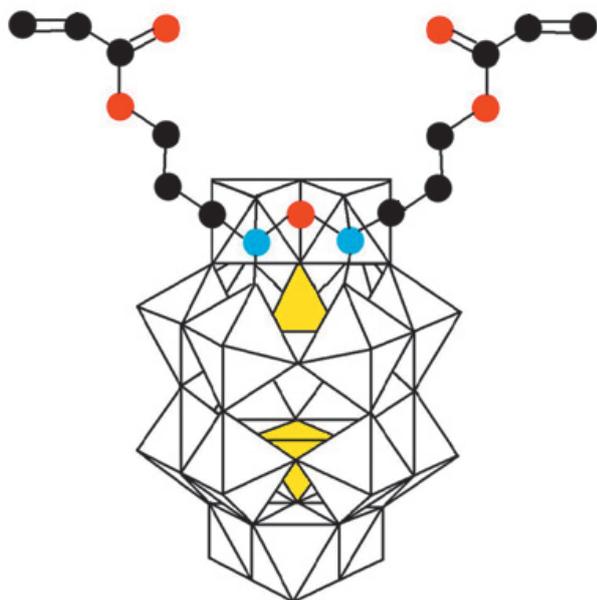


図 1. H-1 の多面体モデル.

表 1. 無機-有機ハイブリッドポリマー重合処方

(g)	A	B	C	D	E
H-1	0	1	2	3	4
MMA	18	19	18	17	16
AIBN	0.04	0.043	0.04	0.04	0.037

わかる。また、初期の H-1 の添加量に比例してポリマー中に固定化される H-1 の量も増大することがわかった。

H-1 とハイブリッドポリマー (C) の  $\text{CD}_3\text{CN}$  中で測定した  $^{31}\text{P}$  NMR の結果を図 3 に示す。それぞれ Dawson 型ポリ酸塩の非等価な  $^{31}\text{P}$  原子に基づく 2 本線スペクトルが得られており、FT-IR の結果と同様にポリマー中でも Dawson 構造を保持していることがわかった。このピーク位置は Dawson 型一次損種  $[\alpha_2\text{-P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}]^{10-}$  のピーク ( $-7.0, -14.1\text{ ppm}$ ) とは異なっており、ポリ酸塩からオルガノシリル基が外れていないことがわかる。これらのことより H-1 はポリマー中に共有結合を介して固定化されたことが確認できた。

### 無機-有機ハイブリッドポリマーの物性評価

表 2 にハイブリッドポリマーの GPC 測定結果を示す。重合開始時の H-1 の添加量が増すに従い分子量分布 ( $M_w/M_n$ ) が増加している。これは H-1 がポリ

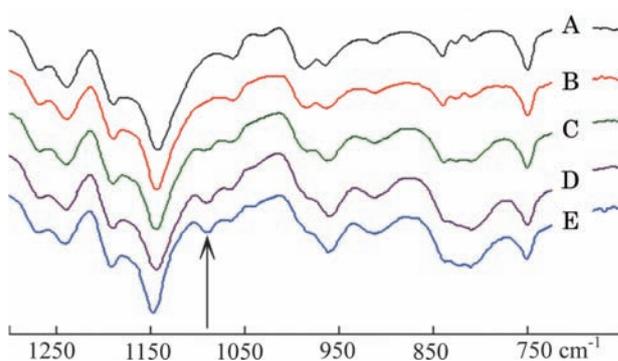


図 2. ポリ酸塩固定化ハイブリッドポリマーの FT-IR.

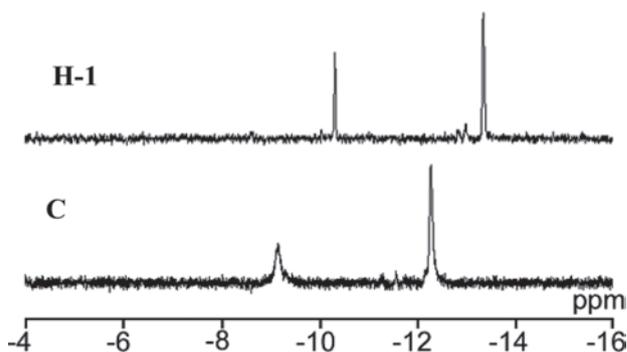


図 3. H-1 と C の  $\text{CH}_3\text{CN}$  中での  $^{31}\text{P}$  NMR スペクトル.

表 2. ハイブリッドポリマーの GPC 測定結果

	A	B	C	D
Mn	50,648	37,570	21,068	13,779
Mw	89,397	66,450	38,845	27,857
Mw/Mn	1.76	1.77	1.84	2.02

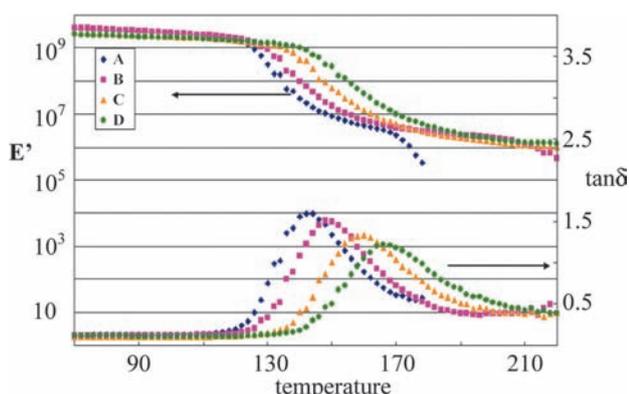


図 4. 無機-有機ハイブリッドポリマーの動的粘弾性測定結果.

マー中で架橋成分として作用しているためである。また、H-1 の添加量が多すぎると展開溶媒の THF にポリマー自体が溶解しなくなった (E)。これは H-1 が架橋成分として作用し、ポリマーの溶解性を下げているためであった。

ハイブリッドポリマー (A ~ D) の動的粘弾性測定結果を図 4 に示す。tan  $\delta$  のピークトップが H-1 の添加量が増えるに従い高温側にシフトし (A; 142, B; 148, C; 160 and D; 166 °C)、ピークの幅がブロードになっていることがわかる。さらに貯蔵弾性率 (E') についても H-1 の添加量が増えるに従い高温側へとシフトしている。これらのことより H-1 が二官能のモノマーとして、ポリマー中で架橋成分として作用していることがわかった。

Hammett 指示薬 (dicinnamalacetone) を使用した H-1 および C の酸性度評価を MeOH 中で行った (図 5)。H-1 の酸性度評価の写真 (上段) では MeOH 溶液全体が赤色に着色していた。これより H-1 は溶液中に均一に溶解し、その pKa は -3.0 以下であることがわかった。一方、C の酸性度評価の写真 (下段) ではポリマーは溶解せず溶液の下部に沈殿している。また、溶液の上澄みはプロトネーションしていない Hammett 指示薬に基づく着色 (黄色) のみが確認された。プロトネーションした Hammett 指示薬に基づく着色 (赤色) は下部に沈殿しているポリマー表面にのみ観測された。このことより MeOH 溶液中への H-1 の流出は起こって

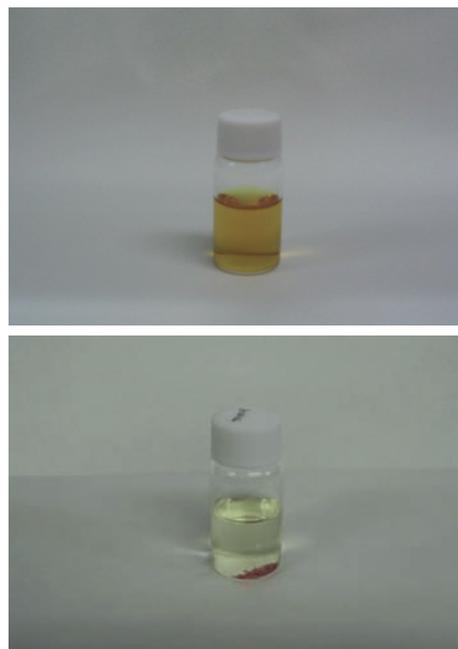


図 5. Hammett 指示薬を使用した MeOH 中の酸性度評価 (上段: H-1, 下段: C)。

ないことが明らかになった。また、ポリマー中に固定化された H-1 は固定化前と同程度の酸性度 (pKa = -3.0) を保っていることが明らかになった。

### まとめ

ラジカル重合法によりフリーアシッド型のハイブリッドポリ酸塩をポリマー中に固定化した。得られたハイブリッドポリマー中にポリ酸塩は構造を保ったまま共有結合を介して固定化されていることを確認した。また、ハイブリッドポリマー中のポリ酸塩の酸性度評価を行った。ポリマー表面に活性なプロトンが固定化されていることが明らかになり、さらに溶液中への H-1 の流出はないことが確認された。

本報告中のフリーアシッド型ポリ酸塩固定化ポリマーは、ポリ酸塩の強酸性を保持したままポリマー中にプロトン酸を固定化しており、不均一系の酸触媒としての応用が可能である。

### 文献

- Hill CL (1998) Polyoxometalates. *Chem. Rev.* **98**: 1-390.
- Kato CN, Tanabe A, Negishi S, Goto K and Nomiya K (2007) An efficient PMO<sub>11</sub> V<sup>VO</sup><sub>40</sub><sup>4+</sup>/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) Hasegawa T, Murakami H, Kasahara Y, Yoshida S, Kurashina T, Seki H and Nomiya K (2008) Formation of inorganic protonic-acid polymer via inorganic-organic hybridization: Synthesis and
- 5) 野宮健司、長谷川 剛 (2008) フリーアシッド型ポリ酸塩の有機高分子上への固定化. *触媒* **50**: 313-318.

characterization of polymerizable olefinic organosilyl derivatives of mono-lacunary Dawson polyoxometalate. *Inorg. Chim. Acta.* **361**: 1385-1394.

■短 報■

## 相模湾に生息するウミウシ類（ドーリス目）の食性

渡辺麻実<sup>1,4</sup> 大和田 正人<sup>2,3</sup> 金沢謙一<sup>1,2</sup>

### Dietary habits of doridacean sea slugs of the Sagami Bay

Mami Watanabe<sup>1,4</sup>, Masato Owada<sup>2,3</sup> and Ken'ichi Kanazawa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa, 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail:r200870195av@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Seven species of doridacean sea slugs and 14 species of sponges obtained from two habitats in Sagami Bay were used to examine whether each doridacean is monophagous on a specific sponge. Spicules of sponges contained from the guts of the sea slugs and those composed of sponge bodies were compared by SEM observation. As a result, *Discodoris lilacina* presumably feeds on *Callyspongia confoederata* and/or *Haliclona permollis*, and four species of sea slugs, *Homoiodoris japonica*, *Dendrodoris rubra*, *Chromodoris orientalis*, *Hypselodoris festiva*, probably feed on *Halichondria okadai* and/or *Halichondria panicea*, though *H. festiva* was previously thought to be monophagous on *Dysidea* sp. *Platydoris speciosa* is likely to feed exclusively on a single sponge species that was not collected in this study. Except for *P. speciosa*, the sea slugs examined here appeared to have fed on more than one sponge species.

**Keywords:** Doridacea, sea slug, diet, sponge, spicule

## 序論

ウミウシ類とは軟体動物、腹足綱、後鰓亜綱に属し、貝殻が退化、もしくは消失した巻貝の総称である。これまで、相模湾産の後鰓類については、昭和天皇が御採集になったものをまとめた「相模湾産後鰓類図譜」をはじめ、分類学的研究、個体発生学的研究が多くなされてきた<sup>1)</sup>。しかし、生態学的研究はあまりなされていないため、食性などの基礎的な知見は多くない。

一般にウミウシ類は藻類、カイメン類、コケムシ類、ヒドロ虫類、ホヤ類、サンゴ類、他のウミウシ類、甲殻類などを餌にしていると考えられている。ドーリス目のウミウシ類については一部の種を除いてカイメン類を常食としていることが知られているが<sup>2)</sup>、イロウミウシ科を除いて<sup>3)</sup>、専ら1種のカイメンを選択的に摂食する単食性 (monophagous) なのか、複数種のカイメンを摂食する多食性 (polyphagous) なのか分かっていない。

本研究では、ドーリス目のウミウシ類の消化管の

内容物に見られるカイメン類の骨片の形状に注目し、その食性を明らかにする。カイメン類の多くは珪質や石灰質から成る骨片を持ち、その形状は種によって異なることが分かっている (図1)。したがって、消化管に含まれる骨片を調べることで、ウミウシ類がどのカイメン類を摂食したのか推定できる。

## 材料と方法

### カイメン類の検索表

相模湾東岸の横須賀市荒崎海岸と西岸の真鶴町白磯海岸及び岩海岸の潮間帯で、カイメン類を採集した (図2)。岩海岸ではスキューバダイビング (水深10 m以浅) による採集も行った。採集したカイメン類の組織を切り出し、ブリーチに浸して骨片を抽出した。抽出した骨片は純水で洗浄した後、エタノールで脱水した (図3)。脱水した骨片はイオンコーター (JFC-1600) を用いて白金でコーティングし、走査型電子顕微鏡 (SEM) (T-20, JEOL) で観察した。

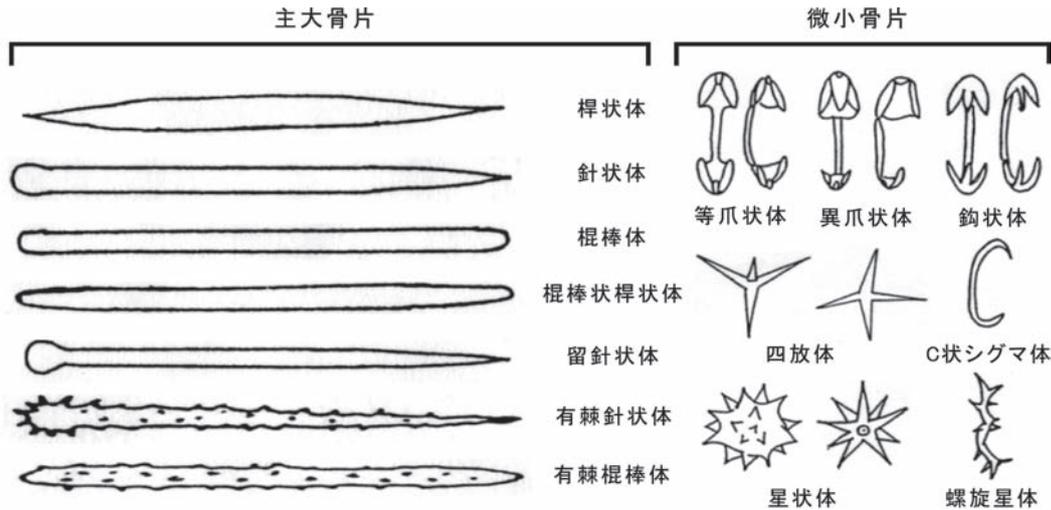


図1. カイメン類に含まれる骨片の形状. 文献4に基づく.

骨片を形状に基づいて分類し<sup>4-10)</sup>、各タイプの含有率を集計して検索表を作成した。

### ウミウシ類に摂食されたカイメン類の同定

荒崎海岸と白磯海岸においてカイメン類の採集と同時にウミウシ類を採集した。採集したウミウシ類を鈴木<sup>11)</sup>、及び中野<sup>12)</sup>にしたがって同定し、100%エタノールあるいは5%中性ホルマリンで固定した後、消化管の内容物を取り出した。取り出した内容物をブリーチに浸して、カイメン類の骨片を抽出した。抽出した骨片にカイメン類のものと同様の処理を施してSEMで観察した。骨片のタイプとその含有率を記録し、先に作成した検索表と照合して同定を行った。

### 結果

荒崎海岸ではカイメン類4種とウミウシ類6種が採集され(表1)、白磯海岸ではカイメン類14種とウミウシ類6種が採集された(表2)。

カイメン類から抽出した骨片のタイプと含有率を表3にまとめた。カイメン類は複数のタイプの骨片を持ち、その組み合わせと含有率は種ごとに異なっていた。また、2つの採集地に共通して見られるクロイソカイメン、ダイダイイソカイメン、ナミイソカイメン、ムラサキカイメンの骨片を地点ごとに比

較したところ、その組み合わせと含有率に大きな違いは見られなかった。

ウミウシ類7種15個体の消化管の内容物を観察したところ、ミヤコウミウシを除く6種9個体でカイメン類の骨片が見られた。各個体から抽出した骨片のタイプとその含有率を表4にまとめた。骨片の組み合わせは、クモガタウミウシとアオウミウシでは同じ場所で採集されたにも拘らず、個体ごとに異なっていたが、ツヅレウミウシでは共通していた。

### 討論

カイメン類の骨片の組み合わせとその含有率は採集地点が異なっても共通することから、これらは種内で安定しており、カイメン類の同定に十分用いることができる。

ツヅレウミウシはザラカイメンもしくはムラサキカイメンを餌としており、ヤマトウミウシ、マダラウミウシ、シロウミウシ、アオウミウシはクロイソカイメンもしくはナミイソカイメンを餌としている可能性が高い。アオウミウシは骨片を持たないツチイロカイメン属の1種を餌としていていると考えられているが<sup>3)</sup>、消化管の内容物に骨片が含まれていたことから、それ以外のカイメン類も摂食する多食性であることが示唆された。クモガタウミウシの消化管の内容物には、本研究で採集したどの種にも見られ



図2. 採集場所.

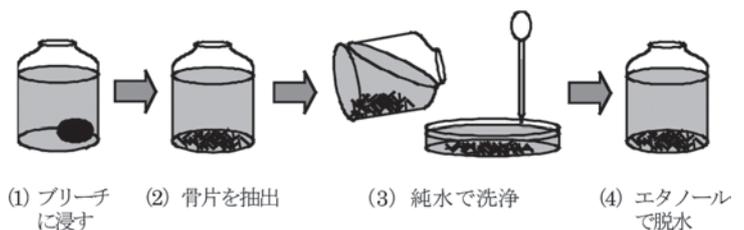


図3. カイメンから骨片を取り出す手順.

表 1. 荒崎海岸で採集したウミウシ類とカイメン類

種名	学名	科	採集地点
クモガタウミウシ	<i>Platydoris speciosa</i> (Abraham, 1877)	クモガタウミウシ科	潮間帯下部
ツツレウミウシ	<i>Discodoris lilacina</i> (Gould, 1852)	ツツレウミウシ科	潮間帯中部～下部
ヤマトウミウシ	<i>Homoiodoris japonica</i> Bergh, 1881	ヤマトウミウシ科	潮間帯下部
マダラウミウシ	<i>Dendrodoris rubra</i> (Kelaart, 1858)	クロシタナシウミウシ科	潮間帯中部～下部
シロウミウシ	<i>Chromodoris orientalis</i> Rudman, 1983	イロウミウシ科	潮間帯中部～下部
アオウミウシ	<i>Hypselodoris festiva</i> (A. Adams, 1861)	イロウミウシ科	潮間帯中部～下部
《カイメン類》			
クロイソカイメン	<i>Halichondria okadai</i> (Kadota, 1922)	イソカイメン科	潮間帯上部～下部
ダイダイイソカイメン	<i>Halichondria japonica</i> (Kadota, 1922)	イソカイメン科	潮間帯上部～下部
ナミイソカイメン	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas, 1766)	イソカイメン科	潮間帯下部
ムラサキカイメン	<i>Haliclona permollis</i> (Bowerbank, 1866)	カワナシカイメン科	潮間帯下部

表 2. 白磯海岸及び岩海岸で採集したウミウシ類とカイメン類

種名	学名	科	採集地点
ツツレウミウシ	<i>Discodoris lilacina</i> (Gould, 1852)	ツツレウミウシ科	潮間帯上部～中部
ヤマトウミウシ	<i>Homoiodoris japonica</i> Bergh, 1881	ヤマトウミウシ科	潮間帯上部～中部
シロウミウシ	<i>Chromodoris orientalis</i> Rudman, 1983	イロウミウシ科	潮間帯下部
アオウミウシ	<i>Hypselodoris festiva</i> (A. Adams, 1861)	イロウミウシ科	潮間帯下部
ミヤコウミウシ	<i>Dendrodoris denisoni</i> (Angas, 1864)	クロシタナシウミウシ科	潮間帯上部～中部
マダラウミウシ	<i>Dendrodoris rubra</i> (Kelaart, 1858)	クロシタナシウミウシ科	潮間帯上部～中部
《カイメン類》			
シグマカイメン属の1種	<i>Haliclona</i> sp.	カワナシカイメン科	～10m
ムラサキカイメン	<i>Haliclona permollis</i> (Bowerbank, 1866)	カワナシカイメン科	潮間帯中部
ランケイトゲカイメン	<i>Acanthella oviform</i> a Tanita & Hoshino, 1989	チュウジクカイメン科	～10m
アバタカイメン	<i>Spirastrella abata</i> Tanita, 1961	パンカイメン科	～10m
オオパンカイメン	<i>Spirastrella insignis</i> Thiele, 1898	パンカイメン科	～10m
ジュズエダカリナ	<i>Callyspongia truncata</i> (Lindgren, 1897)	ザラカイメン科	～10m
ザラカイメン	<i>Callyspongia confoederata</i> (Ridley, 1884)	ザラカイメン科	～10m
ザラカイメン属の1種	<i>Callyspongia</i> sp.	ザラカイメン科	～10m
ウスイタカイメン属の1種	<i>Hymedesmia</i> sp.	ウスイタカイメン科	～10m
ハリミカーレカイメン	<i>Mycale plumosa</i> (Carter, 1882)	ミカーレカイメン科	～10m
クロイソカイメン	<i>Halichondria okadai</i> (Kadota, 1922)	イソカイメン科	潮間帯上部～中部
ダイダイイソカイメン	<i>Halichondria japonica</i> (Kadota, 1922)	イソカイメン科	潮間帯中部
ナミイソカイメン	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas, 1766)	イソカイメン科	潮間帯下部
イソカイメン属の1種	<i>Halichondria</i> sp.	イソカイメン科	～10m

表 3. 骨片の形状に基づくカイメンの検索表

	桿状体	細・長	桿状体	太・短	針状体	棍棒体	棍棒状桿状体	留針状体	有棘針状体	有棘棍棒体	星状体	螺旋星状体	等爪状体	異爪状体	シグマ体	四放体	有棘螺旋体
シグマカイメン属の1種			99	●											◎		
ランケイトゲカイメン	20-30			60-70	10												
アバタカイメン								99									◎
ジュズエダカリナ						95	5										
ザラカイメン			98														
イソカイメン属の1種			99	●													
ウスイタカイメン属の1種	85			●	15			●					○		○		△
オオパンカイメン				99								◎					
ハリミカーレカイメン	2			98	●			●		●	△			◎			△
ザラカイメン属の1種	2				98												
クロイソカイメン	99																
ダイダイイソカイメン				99	●												
ムラサキカイメン			99														
ナミイソカイメン	99																

数字は%表示。 ●：含有量1%以下，◎：多量，○：少量，△：微量。

表 4. ウミウシ類の消化管内容物に見られた骨片

	桿状体	細・長	桿状体	太・短	針状体	棍棒体	有棘針状体	有棘棍棒体	星状体	螺旋星状体	等爪状体	異爪状体	鉤状体	シグマ体	四放体	有棘螺旋体
クモガタウミウシ1						○	△						○			
クモガタウミウシ2						○							○			
ツツレウミウシ1			○													
ツツレウミウシ2			○													
ヤマトウミウシ	○				△											
マダラウミウシ	○															
シロウミウシ	○															
アオウミウシ1	○															
アオウミウシ2	○				○											

○ = 主に含まれていた骨片    △ = 微量だが、含まれていた骨片

ないタイプの骨片が大量に含まれていた。クモガタウミウシは本研究で採集した 14 種以外の特定の 1 種を選択的に摂食する単食性である可能性が高い。

一般にウミウシ類の長期飼育は、餌の種類が分からないために困難であると言われている。しかし、本研究で採用した手法を用いてウミウシ類が摂食するカイメンの種を絞り込むことができれば、長期飼育が可能になると期待される。

### 謝辞

本研究を行うにあたり、岩ダイビングセンターの田端哲明氏にはスキューバダイビングによるサンプル採集に協力して頂いた。神奈川大学理学部生物科学科の鈴木季直教授には電子顕微鏡の使用を快諾して頂いた。神奈川大学理学部生物科学科金沢研究室の皆様にはサンプル採集の協力のみならず、有意義な議論をして頂いた。以上の方々に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) 濱谷巖 (1999) *動物系統分類学 5(下)*. 中山書店, 東京.
- 2) 平野義明 (2000) *ウミウシ学 海の宝石、その謎を探る*. 東海大学出版会, 神奈川.
- 3) Rudman WB and Bergquist PR (2007) A review of feeding specificity in the sponge-feeding Chromodorididae (Nudibranchia: Mollusca). *Molluscan Res.* 27: 60-88.
- 4) 渡辺洋子 (1992) *原色検索日本海岸動物図鑑 I*. 保育社, 大阪.
- 5) 谷田専治 (1961) *動物系統分類学 2*. 中山書店, 東京.
- 6) 谷田専治 (1957) *原色動物大図鑑 IV*. 北隆館, 東京.
- 7) 朴沢三二、谷田専治、内海富士夫 (1964) *新日本動物図鑑 (上)*. 北隆館, 東京.
- 8) 谷田専治 (1989) *相模湾産尋常海綿類図鑑*. 丸善, 東京.
- 9) 小川数也 (2001) 日本産カイメン類種名目録 - III. 尋常カイメン類 (1). *南紀生物* 43(1): 63-71.
- 10) 小川数也 (2002) 日本産カイメン類種名目録 - III. 尋常カイメン類 (2). *南紀生物* 44(2): 157-166.
- 11) 鈴木敬宇 (2000) *ウミウシガイドブック 2 伊豆半島の海から*. 阪急コミュニケーションズ, 東京.
- 12) 中野理枝 (2004) *本州のウミウシ 北海道から奄美大島まで*. ラトルズ, 東京.

■短 報■

## 潮間帯に生息するカサガイ類の防御行動の比較

十亀孝維<sup>1,4</sup> 大和田 正人<sup>2,3</sup> 金沢謙一<sup>1,2,3</sup>

### Comparison of Defensive Behaviors in Limpets Inhabiting an Intertidal Zone

Takayuki Sogame<sup>1,4</sup>, Masato Owada<sup>2,3</sup> and Ken'ichi Kanazawa<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>3</sup> Research Institute for Integral Science, Kanagawa University, Hiratsuka-city, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: r200870188qo@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Defensive behaviors of three intertidal limpets against two different types of predators were observed through laboratory experiments and explained from the perspective of the modes of life in their habitats. In response to an attack by the welk *Thais clavigera* and *T. bronni*, two patellid limpets, *Cellana grata* and *C. nigrolineata*, lifted the shells up off the floor to shake the predators off their shells and thereafter ran away, while the other patellid limpet *C. toreuma* immediately ran away while folding its mantle around the shell. In their natural habitats, the former two species usually rest in pits and clefts in rocks, where they can only escape toward open spaces. In contrast, the latter species usually rests on a wide and even rock surface, where it can escape in any directions. This difference between their resting places appears to cause different initial responses against welk offense. During attack by the starfish *Coscinasterias acutispina*, the two limpets *C. nigrolineata* and *C. toreuma*, which live in the same habitat as the seastar, run away in a different manner than that when the gastropod attack, while *C. grata* which do not live together with the starfish in its habitat kept still, resulting in being preyed successfully upon by the predator. These findings indicate that the limpets are able to recognize the predators they encounter in their habitats and thereby make appropriate defensive responses.

**Keywords:** patellid limpet, welk, starfish, defensive behaviors, habitat

### 序論

カサガイ類は笠形の殻を持つ巻貝の仲間である。潮間帯において種多様性が高く、岩石や海藻などに腹足で付着し、干潮時に長時間干上がる場所にも生息する。主な天敵は肉食性巻貝類やヒトデ類であり、それらに接触すると数種類の防御行動を示すことが様々な種で知られている。スカシガイ科のアラボリテンガイ *Diodora aspera* では7種のヒトデ (*Pisaster ochraceus*, *P. brevispinus*, *P. giganteus*, *Leptasterias aequalis*, *Evasterias troschelii*, *Orthasterias koehleri*, *Pycnopodia helianthoides*) に接触すると殻を外套膜で覆い<sup>1)</sup>、ミミガイ科のホ

ソスジアワビ *Haliotis assimilis* とアカネアワビ *H. rufescens* では2種のヒトデ (*Pisaster ochraceus*, *Pycnopodia helianthoides*) に接触すると殻を外套膜で覆い、殻を持ち上げ、殻を激しく振る<sup>2)</sup>。また、ヨメガカサガイ科の3種のカサガイ (ベッコウガサ *Cellana grata*、マツバガイ *C. nigrolineata*、ヨメガカサ *C. toreuma*) ではアクキガイ科の3種の巻貝 (イボニシ *Thais clavigera*、シマレイシガイ *Morulina musiva*、レイシガイ *Muricodrupa fusca*) に接触すると殻を持ち上げ、殻を外套膜で覆った後、その場所から逃走する

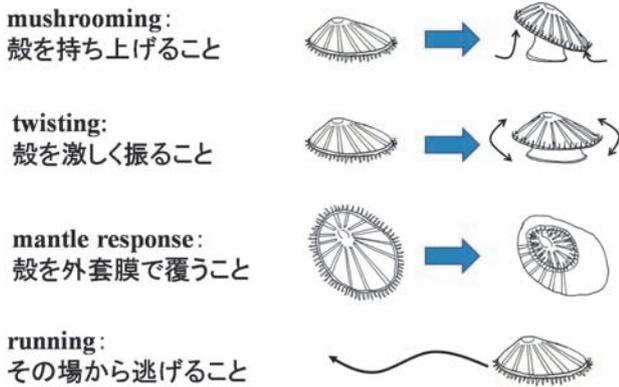


図 1. カサガイが捕食者に接触した時の防御行動. (Abe, 1983; Iwasaki, 1993 より引用)

ことが知られている<sup>3)</sup>。これらを要約すると、カサガイ類には、捕食者に接触すると、①殻を持ち上げる (mushrooming)、②殻を激しく振る (twisting)、③殻を外套膜で覆う (mantle response)、④その場から逃走する (running) の 4 つの反応があり (図 1)、これら 4 つの反応の組み合わせは捕食者の種類によって異なることが分かっている<sup>4,5)</sup>。しかし、捕食者の種類によって防御行動が異なる理由については十分な議論がなされていない。そこで本研究では、実験水槽で 3 種のカサガイと 2 種の肉食性巻貝及びヒトデを人為的に接触させ、それぞれの防御行動を比較し、その違いをカサガイ類と捕食者の生息場所の違いに着目して説明する。

### 材料と方法

神奈川県足柄下郡真鶴町白磯海岸において、カサガイ 3 種 (ベッコウガサ、マツバガイ、ヨメガカサ) と肉食性巻貝 2 種 (イボニシ、レイシガイ *Thais bronni*) 及びヒトデ 1 種 (ヤツデヒトデ *Coscinasterias acutispina*) を採集した。採集時にそれぞれの生息場所の特徴を記録した。採集したカサガイは 1 個体ずつ水槽 (11 cm × 20 cm × 12.5 cm) に入れ、約 1 時間ほど放置した後、肉食性巻貝あるいはヒトデを 1 個体ずつ入れ、防御行動を観察した。接触時に見せた反応と行動はビデオカメラ (HDR-SR12, SONY) で記録して解析した。

### 結果

#### 生息分布

ベッコウガサは潮間帯上部で見られ (図 2)、大部分の個体が岩石の隙間や裏側に留まっていた (図 3A)。マツバガイは潮間帯上部から中部で見られ、ベッコウガサと同様に多くの個体が岩石の隙間や裏側に留まっていた。ヨメガカサは潮間帯中部から潮下帯で見られ、多くの個体が岩石の平坦で広い面に

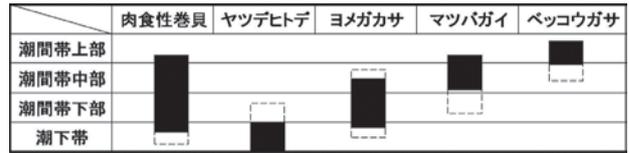


図 2. カサガイ類と捕食者の生息分布. 黒い部分はよく見られる範囲を示す. 点線部分は満潮時に活動する範囲を示す.

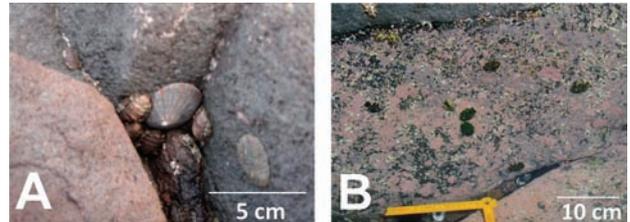


図 3. カサガイ類が留まっていた周辺の地形. A. 岩石の隙間. B. 岩石の平らな面の写真.

留まっていた (図 3B)。捕食者のイボニシとレイシガイは潮間帯上部から潮下帯に生息し、岩石の隙間や裏側に限らず様々な場所で見られた。ヤツデヒトデは主に潮下帯に生息していたが、満潮時には潮間帯下部でも見られた。

#### 肉食性巻貝に対する行動

イボニシとレイシガイは 3 種のカサガイと接触すると、腹足を伸ばしてカサガイの殻の上に乗ろうとした。3 種のカサガイは、殻の周りから伸ばしている上足触角 (epipodial tentacle) にイボニシあるいはレイシガイが触れた直後から反応を始めた。

ベッコウガサとマツバガイは共にまず、上足触角を揺らしながら mushrooming を行い、肉食性巻貝を振り落とそうとした。捕食者が殻から落ちない場合、mantle response と running を同時に行って振り落とし (図 4)、それらが落ちた後も running を続けた。ヨメガカサは肉食性巻貝に接触すると、伸ばしていた上足触角を上下に激しく揺らし、mantle response と running を同時に行って捕食者を振り落とし (図 5)。running は肉食性巻貝を落とした後も続けた。ヨメガカサの running は 3 種の中で最も速く、秒速 0.5 cm、他の 2 種のほぼ 3 倍の速度であった。

#### ヤツデヒトデに対する行動

ヤツデヒトデは 3 種のカサガイと接触すると、最初に接触した腕に最も近い腕から順に全ての腕をカサガイに向かって移動させ、カサガイを包み込もうとした。

ベッコウガサはヤツデヒトデと接触しても特別な防御行動をとらず、その場所にじっと留まり続け、

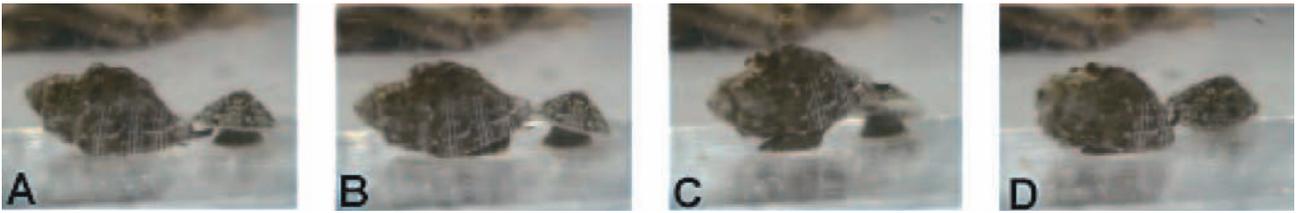


図 4. ベッコウガサが肉食性巻貝に接触した時の防御行動. A. 接触時. B. mushrooming. C. mantle response. D. running を行っている様子.

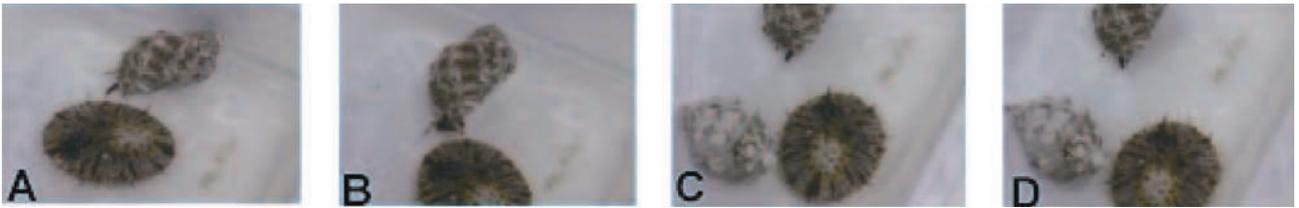


図 5. ヨメガカサが肉食性巻貝に接触した時の防御行動. A. 接触時. B. mantle response. C, D. running を行っている様子.

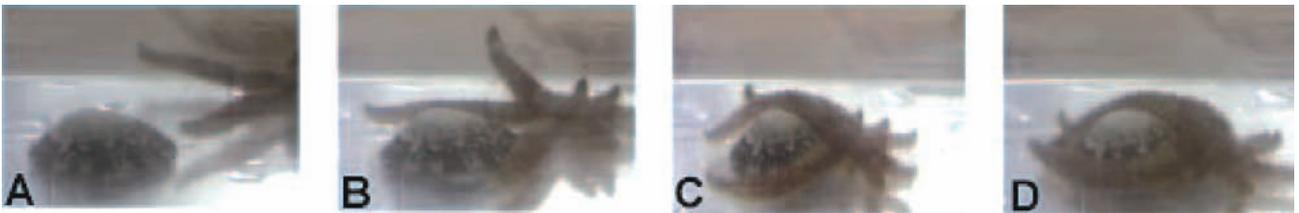


図 6. ベッコウガサがヤツデヒトデに接触した時の防御行動. A. 接触時. B-D. ヤツデヒトデに押さえ込まれている様子.

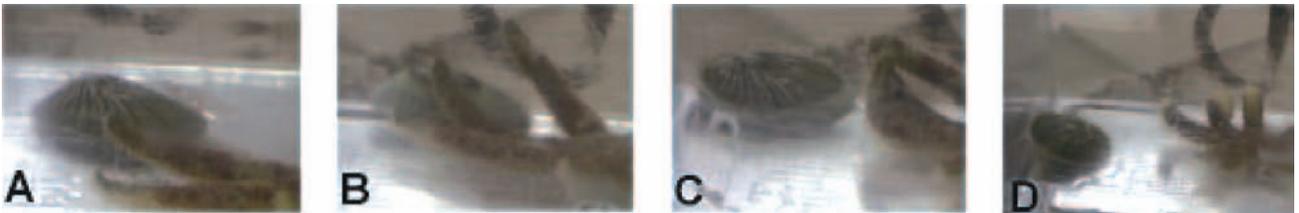


図 7. マツバガイがヤツデヒトデに接触した時の防御行動. A. 接触時. B. mantle response. C, D. running を行っている様子.

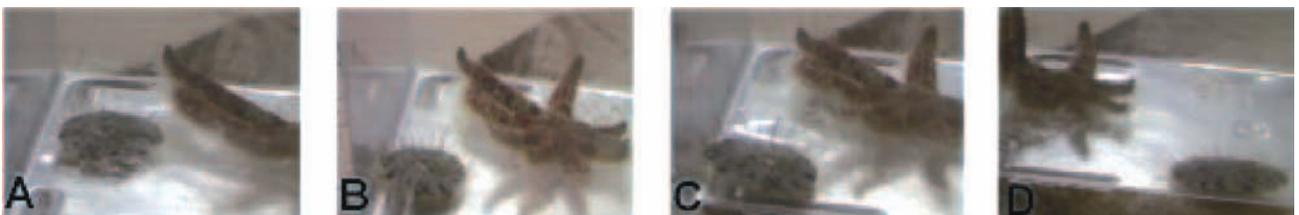


図 8. ヨメガカサがヤツデヒトデに接触した時の防御行動. A. 接触時. B-D. running を行っている様子.

ほとんどの個体が捕食された (図 6)。マツバガイはヤツデヒトデに接触すると、上足触角を揺らしてすぐに mantle response と running を同時に行った (図 7)。この時の running は秒速 0.5 cm で肉食性巻貝の場合よりほぼ 3 倍速かった。ヨメガカサはヤツデヒトデに接触すると、上足触角を揺らしながらすぐに running を行った (図 8)。マツバガイと同様に、この時の running は秒速 0.8 cm で肉食性

巻貝の場合よりほぼ 1.5 倍速かった。

### 討論

マツバガイは肉食性巻貝に接触すると始めに mushrooming を行ったが、ヤツデヒトデに接触すると mantle response と running を行った。ヨメガカサは肉食性巻貝に接触すると mantle response と running を行ったが、ヤツデヒトデに接触すると

running を行った。これらのことから、マツバガイとヨメガカサは肉食性巻貝とヤツデヒトデを認識しており、それぞれに有効な防御行動を選択しているように思われる。

ベッコウガサは肉食性巻貝に接触すると mushrooming、mantle response、running などの反応を示したが、ヤツデヒトデに対しては全く反応を示さなかった。これはベッコウガサが潮間帯上部に生息しており、潮間帯の広範囲に生息する肉食性巻貝には日常的に接触するが、潮下帯に生息するヤツデヒトデにはほとんど接触しないため、ヤツデヒトデを捕食者として認識していないためであろう。

ベッコウガサとマツバガイは肉食性巻貝に接触すると始めに mushrooming を行ったが、ヨメガカサは mushrooming を行わずに mantle response と running を行った。ヨメガカサは岩石の平らな面に生息することが多く、そのような場所では様々な方向に running することができる。一方、ベッコウガサとマツバガイは岩石の隙間や裏側に生息していることが多く、このような場所では running を行う方向が制限される。そのため、mushrooming により肉食性巻貝が殻に乗り上がることを防ぎながら running の方向を探すのだと考えられる。一方、mantle response は mushrooming のみで落ちなかった場合や running の最中に捕食者が殻に上がる

ことを防ぐために行う反応なのであろう。

カサガイ類の防御行動は捕食者と接触する頻度、カサガイ類の生息場所と深く関係していると考えられる。

## 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金沢研究室の大学院生及び卒業生にはサンプル採集のみならず、有意義な討論をして頂いた。また、奈良大学の岩崎敬二教授には有益なコメントを頂いた。以上の方々に深く感謝する。

## 文献

- 1) Margolin AS (1964) The mantle response of *Diodora aspera*. *Anim. Behav.* **12**: 187-194.
- 2) Montgomery DH (1967) Responses of two haliotid gastropods (Mollusca), *Haliotis assimilis* and *Haliotis rufescens*, to the forcipulate asteroids (Echinodermata), *Pycnopodia helianthoides* and *Pisaster ochraceus*. *Veliger* **9**: 359-368.
- 3) Abe N (1983) Escape responses of patellid limpets to carnivorous gastropods. *Nanki seibutu* **25**: 193-194 (in Japanese).
- 4) Branch GM (1979) Aggression by limpets against invertebrate predators. *Anim. Behav.* **27**: 408-410.
- 5) Iwasaki K (1993) Analyses of limpet defense and predator offense in the field. *Mar. Biol.* **116**: 277-289.

■研究交流■

## 第四回神奈川大学 – 国立台湾大学学術交流国際会議

木原 伸浩<sup>1,2</sup>

4<sup>th</sup> International Symposium of the Kanagawa University  
– National Taiwan University Exchange Program

Nobuhiro Kihara<sup>1,2</sup>

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

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

### はじめに

2008年12月25日(木)から28日(日)にかけて、今年度も国立台湾大学との学術交流行事が開かれた。その様子は教授会で報告するとともに理学部長および学長への報告書として提出してあるが、報告の対象が限られていただけでなく、学術交流行事が国立台湾大学で開かれたこともあり、その成果と詳細については必ずしも浸透していないように思われる。国立台湾大学との学術交流においては毎回新しい試みがされてきたが、今は特に多くの進展があったので、報告書以上の形で記録を残しておきたいと考えていた。しかし、そのような場が無く、あきらめていたところに、総合理学研究所長の鈴木季直先生から記事を書く機会を与えていただくことになった。せっかくの機会であるので、本学術交流の経緯も含めてきちんとした形で記録を残すとともに、今後の展望をまとめておきたい。

### 国立台湾大学との学術交流

国立台湾大学化学科と神奈川大学理学部化学科との学術交流協定は平成17年3月3日に結ばれている。これは、国立台湾大学を訪問していた竹内敬人教授(当時)と森和亮教授が締結してきたものである。この学術交流協定に基づき、平成18年1月には陳竹亭(Chen, Jwn-Ting)教授、劉緒宗(Liu, Shih-Tzung)教授、邱聖賢(Chiu, Sheng-Hsien)助教授が来日し、17日には第一回の学術交流国際会議を開催した。この国際会議では本学理学部から西本右子助教授、井上和仁教授、および、筆者も講演を行ない、あわせて6人の講演者で開催された。この時に持たれた話し合いでは、教員の交流をいずれ学生の交流に拡大し、さらには、学生の交換留学に発展させていくとの展望が確認されている。

第一回国際会議の成功を受け、平成18年12月に

は理学部化学科から杉谷嘉則教授と山口和夫教授、生物科学科から竹内重夫教授(当時)と鈴木祥弘助教授が訪台し、23日には第二回の学術交流国際会議が開かれた。この時の様子については既に報告がされている<sup>1,2)</sup>。第一回の国際会議から化学科だけでなく生物科学科も参加しているのであるが、第二回の学術交流では、派遣陣容としても化学科と生物科学科は肩を並べることになった。

第三回の学術交流国際会議は、化学系の陳昭岑(Chen, Chao-Tsen)教授、李弘文(Li, Hung-Wen)助教授、および、彭旭明(Peng, Shie-Ming)教授の3人、生物系の羅竹芳(Lo, Chu-Fang)教授、潘子明(Pan, Tzu-Ming)教授、于宏燦(Yu, Hon-Tsen)教授の3人、の計6名を迎え、平成19年12月8日に開催された。本学からは、化学科の加部義夫教授、齋藤太郎教授、平田善則教授、生物科学科の小谷享教授、豊泉龍兒助手(当時)、黒瀬奈緒子助手が講演し、全部で12の講演からなる大規模なものとなった。なお、黒瀬助手はこの国際会議を契機として国立台湾大学との共同研究を開始した。その成果は2008年に開かれた日本DNA多型学会第17回学術集会で発表され、優秀研究賞を受賞するに至っている<sup>3)</sup>。

### 第四回学術交流国際会議

第四回の学術交流国際会議は平成20年12月に開催された。これまでの学術交流の基礎となっている学術交流協定は本学化学科と国立台湾大学化学科の間で結ばれたものである。しかし、運営上は生物科学科や国立台湾大学の生物系組織を巻き込んで、規模を拡大しながら幅広い観点で進められてきた。それは、双方にとって関連する研究分野を広げるという意味で大変有意義なものであった。しかし、学術交

流をより発展させるということを考えた時、これまでの延長線上で単純に規模の拡大を図るのにはもう無理があった。国際会議を開くにしても、講演者が多過ぎれば密度は薄くなり、散漫なものになってしまう。有意義な学術交流を行なうためには、密度を高くし、充実させるための工夫が必要である。

そこで、第四回の学術交流には大きく2つの飛躍を図ることにした。1つは、学術交流に本学工学部物質生命化学科の参加を求めることである。国立台湾大学は化学科だけで35名余のスタッフを擁する巨大な大学であり、本学理学部だけで対応するには人的資源の観点から限界があった。工学部も参加することで、より幅の広い交流をするための体制を整えることが期待できる。もう1つは、学術交流に学生も参加させることである。学生の参加は第一回の学術交流の時から懸案であったが、これまでの教員の交流が順調に進んできたことから、今回いよいよ踏み切ることにしたのである。幸い、国立台湾大学側の協力も得られ、学生を含めた学術交流がはじめて実現することになった。

最初の学生派遣ということで、あまり無茶なことではできない。そこで、化学専攻の大学院生から、有機化学の研究室所属の、木戸場和志 (M2)、澤田亜希 (M2)、白取愛 (M1)、谷村昌俊 (D1)、野村架奈 (M2)、横田佳典 (M2) の6人を派遣学生として選んだ。その代わりに、訪台する教員の数は絞込むことにした。工学部物質生命化学科から小野晶教授に参加いただき、化学科から松永諭助手と筆者、生物科学科から小谷亨教授の4人が訪台することとした。なお、鈴木季直教授も参加する予定であったが、健康上の理由から直前に訪台を取りやめた。

日本を出発したのは12月25日である。現地到着が夜となったので、実際の活動は翌26日からとなった。26日は朝から故宮博物館、円山大飯店



図1. 故宮博物館の前にて。



図2. 歓迎会にて。

(Grand Hotel)、台北101と台北市内を観光した(図1)。向こうで準備に当たった陳平 (Richard Ping Cheng) 助教授が日本語のできる専門のガイドと専用のマイクロバスを用意してくださったため、非常に効率的に観光することができ、極めて充実した1日であった。文化交流は、特にこれからの日台関係を担う若者にとって重要な項目である。教員にとってももちろんのこと、学生にとっては特に印象的な1日で、今後台湾を非常に身近に感じる機会となったのではないかと思う。

宿舎に帰着してから、国立台湾大学化学科の主立った教員と、翌日のシンポジウムに参加する国立台湾大学の学生による歓迎会が開かれた(図2)。本学に非常勤講師として毎年来られている国立台湾科学技術大学の廖徳章 (Liaw, Der-Jang) 教授、小野教授が以前お世話になった大同大学の甘魯生 (Kan, Lou-Sing) 教授も参加された。歓迎会の後、本学の学生達は国立台湾大学の学生に連れられ、Night Shopと呼ばれる学生街に繰り出して行った。さっそくの国際交流の実践である。

27日には第四回神奈川大学-国立台湾大学国際交流学術会議が開かれた。本学の4人に加え、国立台湾大学からも4件の講演が行われた。国際会議には学生を中心として50名ほどの聴衆が集まり、熱心な討論がおこなわれた。午前部はポスター発表をする学生のうち4名(本学から2名、国立台湾大学から2名)によるshort speechで締めくくられた。午後のプログラムは学生のポスター発表で始まった。ポスター発表には本学からの6人に加え国立台湾大学からも19名が参加した。時間ぎりぎりまでそれぞれのポスターの前で学生同士の熱心な議論が行なわれ、大変盛況であった(図3)。

国際交流学術会議のプログラム(図5)および本学学生のポスター(図6-11)を後掲する。本学



図 3. ポスター会場にて.

からの講演のタイトルは以下に五十音順にリストアップした。なお、本学から short speech を行なったのは谷村君と木戸場君の 2 名である。

- 小野 晶 : Specific interactions between Mercury(II) and Thymine-Thymine, Silver(I) Ions and Cytosine-Cytosine Pairs in DNA Duplexes
- 木原 伸浩 : Toward Polycatenane
- 小谷 亨 : Biochemical and cell biological characterizations of microtubule-associated protein 4
- 松永 諭 : Synthesis and Characterization of a,w-Bis(porphyrinyl) Oligoacetylenes
- 谷村 昌俊 : Solvent-promoted chemiluminescent decomposition of a bicyclic dioxetane bearing a 4-(benzothiazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl moiety
- 木戸場和志 : Dynamic Covalent Chemistry of Nicholas Etherification Reaction, and its Application to the Synthesis of Crown Ether
- 澤田 亜希 : Length-Selective Acylation Catalyst
- 野村 架奈 : Synthesis of bis(1-aza-18-crown-6)s joined through a 1,4-bisalkylenebenzene sidearm
- 横田 佳典 : Fabrication of patterned polymer brushes using photodegradable SAM
- 白取 愛 : A Ser-His Couple: Fishing by the Analogue of Hydrolysis Intermediate and its Activity in Hydrolysis

国際交流学術会議の後は、発表者を中心として懇親会が開かれた。会場は大学が経営するという



図 4. 校史館にて.

四川風料理店であった。このようなレストランを大学の施設として持っているのは大変うらやましい。教員の席と学生の席とに分かれたが、学生の席では女子学生が活発に国際交流をしていたのに対し、男子学生がいずれも非常におとなしいのが印象的であった。

翌 28 日の午前中は国立台湾大学の博物館である校史館を訪問した。案内に、国立台湾大学の日本語学科の学生 2 人が立ち、館内を見学した。校史館は元々図書館であった建物を改装したものであり、古い階段や机が残っていて歴史を感じさせる (図 4)。展示は国立台湾大学の (帝国大学としての) 創設から、その発展の様子を手際よくまとめたものであり、国立台湾大学の誇りを感じて大変感銘を受けた。午後には帰国の途につき、短いながらも充実した学術交流を終えた。

### おわりに

多くの大学で様々な学術交流協定が結ばれている。しかし、本学術交流のように、毎年欠かさずことなく実質的な活動を伴い、しかも、教員も学生も参加して、多くの成果を挙げているような学術交流協定は珍しいのではないかと思う。これは、本学術交流協定を結ばれた竹内先生、森先生を始めとする本学の諸先生方と国立台湾大学の諸先生方との個人的なつながりが基本となっているからであるように思われる。時代が移って、学術交流を担う世代が変わって来た時、変わらず有意義な学術交流を続けていくためには、この学術交流を通じて新しい個人的なつながりを築いていくことが必要になる。そのためには、我々が主体的に学術交流に参加してだけでなく、それを支えるだけの研究の裏付けも要求される。それは、教員側へ本学術交流協定がもたらすもつとも大きな刺激であろう。

本学術交流協定に基づいて行なわれてきたこれまでの国際会議は、国際的な経験の乏しい本学の学生達に刺激を与える貴重な場であった。しかし、積極的に関わるのでなければ、どのような場であっても自分たちとは直接関係ないと言えたかもしれない。それに対して、今回の学術交流からは、同年代の外国の学生と国際交流し、また、英語での研究発表を行なうという、主体的に関わらなければならない場へと変貌を遂げた。このような機会を得たことは携わった学生達にとって非常に貴重なことである。しかし、それでも、関わった学生は限られた数であった。一方、この成功を受けて、次回の学術交流では国立台湾大学からの訪日団は幾人かの学生を伴うこととなろう。すなわち、次回は、本学の学生が国立台湾大学の学生を受け入れ、歓迎する番なのである。これは、積極的かどうかを問わず、否応なしに主体的に関わらなければならないイベントとなろう。今回の学術交流が訪台した学生にとって極めて刺激的であったのはもちろんのことであるが、次回の学術交流では、多くの本学の学生が同様に刺激的な場を共有することになるのである。今後の学術交流が本学学生にとって実り多い機会となるように、また、そのような場を今後も確保していけるように、諸先生方の一層のご協力をお願いしていきたい。

国立台湾大学との学術交流は、現在のところ、教員と学生とを問わず、極めて短期の相互訪問に止まっている。第一回の学術交流で合意されたように、そ

れを将来的には長期の学生の交換へと育てていくことが目標となっている。そのためには、互いの交流のパイプを太くしていき、教員相互の信頼関係を醸成し、また、学生同士の面識も広げていく必要があるだろう。将来の本学の学生が国立台湾大学で学び、また、国立台湾大学の学生が本学で学ぶということができるよう、学術交流をじっくりと深めていきたい。

最後に、今回の訪台で大いに後悔したことについて触れておきたい。台湾に着いてから気が付いたことであるが、学生は台湾の歴史や大陸との関係についてほとんど知らないのである。近代史は高校の歴史でもほとんど学ばないし、政治的なことには深入りしない。そもそも、理科系の高校生は歴史の授業を取らないのである。そのため、学生は台湾の風物を見ても、その意味するところを十分に理解できなかったように思う。今後、学生と共に深く台湾との交流を行なうためには、台湾の置かれた微妙な立場について、事前にレクチャーをしておくことが必要であると考えた次第であった。

## 文献

- 1) 杉谷嘉則 (2007) 「国立台湾大学」訪問の記. *神奈川大学理学誌* 18: 103-105.
- 2) 竹内重夫 (2007) 台湾大学における第2回化学科合同シンポジウムに参加して. *神奈川大学理学誌* 18: 107.
- 3) 黒瀬奈緒子, 林 雨徳 (2008) 氷河期の遺存種イイズナの系統地理と進化史. *DNA 多型* 17: 26-28.



## Agenda

**December, 27, 2008 08:00-17:35 at Chemistry Building, NTU**

08:00-08:50	Registration / Poster Setup
08:50-09:00	Opening Remarks: Chu-Fang Lo, Professor and Dean, College of Life Science, NTU Pi-Tai Chou, Professor and Chairman, Department of Chemistry, NTU
<b>Morning Session (Room 121)</b>	
Session Chair: Richard Ping Cheng, Associate Professor, Department of Chemistry, NTU	
09:00-09:35	Jye-Shane Yang, Professor, Department of Chemistry, NTU <i>Penttiptycene Chemistry: Overviews and Perspectives</i>
09:35-10:10	Nobuhiro Kihara, Professor, Department of Chemistry, KU <i>Toward Polycatenane</i>
10:10-10:45	Chien-Yuan Pan, Associate Professor, Institute of Zoology, NTU <i>Dynasore Inhibits Rapid Endocytosis in Bovine Chromaffin Cells</i>
10:45-11:05	Coffee & Tea
11:05-11:15	Kazuyuki Kidoba, Graduate Student, Department of Chemistry, KU <i>Dynamic Covalent Chemistry of Nicholas Etherification Reaction, And Its Application to the Synthesis of Crown Ether</i>
11:15-11:25	Hsin-Hau Huang, Graduate Student, Department of Chemistry, NTU <i>Approaches Toward Multistep Large-Scale Synthesis of Isotruxene and Isotruxenone</i>
11:25-11:35	Masatoshi Tanimura, Graduate Student, Department of Chemistry, KU <i>Solvent-promoted Chemiluminescent Decomposition of a Bicyclic Dioxetane Bearing a 4-(Benzothiazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl Moiety</i>
11:45-11:55	Hsin-Yi Chang, Graduate Student, Institute of Molecular and Cellular Biology, NTU <i>Application for Biofuel Production: Development of 1-Butanol Tolerant Escherichia Coli</i>
<b>Poster Session (2<sup>nd</sup> Floor Foyer)</b>	
11:55-14:00	Lunch and Posters (Room 218 / 2 <sup>nd</sup> Floor Foyer )
<b>Afternoon Session (Room 121)</b>	
Session Chair: Chien-Yuan Pan, Associate Professor, Institute of Zoology, NTU	
14:00-14:35	Susumu Kotani, Professor, Department of Biological Sciences, KU <i>Biochemical and Cell Biological Characterizations of Microtubule-Associated Protein 4</i>
14:35-15:10	Shyh-Jye Lee, Associate Professor, Institute of Zoology, NTU <i>Regulation of Gastrulation Cell Movements by Rho Effector, Diaphanus-Related Formin 2, in Zebrafish</i>
15:10-15:45	Akira Ono, Professor, Department of Material and Life Chemistry, KU <i>Specific Interactions Between Mercury(II) and Thymine-Thymine, Silver(I) Ions and Cytosine-Cytosine Pairs in DNA Duplexes</i>
15:45-16:15	Coffee & Tea
16:15-16:50	Ken-Tsung Wong, Professor, Department of Chemistry, NTU <i>Synthesis, Properties, and Optoelectronic Applications of Organic Ambipolar Materials</i>
16:50-17:25	Satoshi Matsunaga, Associate Professor, Department of Chemistry, KU <i>Synthesis and Characterization of <math>\alpha,\omega</math>-Bis(porphyrinyl) Oligoacetylenes</i>
17:25-17:35	Closing Remarks

図 5. 第四回神奈川大学-国立台湾大学学术交流国際会議プログラム.

# Dynamic Covalent Chemistry of Nicholas Etherification Reaction and Its Application to the Synthesis of Crown Ether

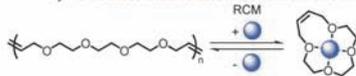
Kazuyuki Kidoba and Nobuhiro Kihara  
Department of Chemistry, Kanagawa University

## Introduction

### Dynamic Covalent Chemistry (DCC)

Reversible equilibrium reaction

Product distribution based on thermodynamic stability

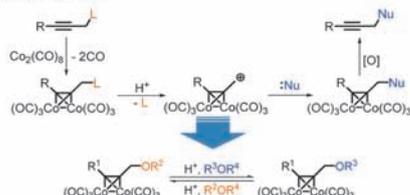


E. Thom-Csanay, et al., *Macromol. Chem. Phys.*, 1999, 200, 1662

Macrocyclization, Self-assembly, etc.

## This Work

### Nicholas Reaction

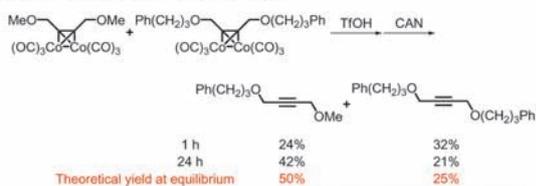


Confirmation of equilibrium nature of ether-exchange reaction

Synthesis of Crown Ether

## Results and Discussion

### Confirmation of Equilibrium



Equilibrium within 24 h

Possible to use for DCC

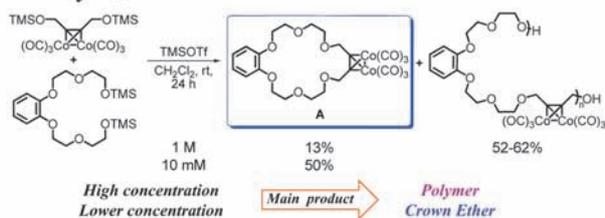
### Effect of Leaving Group

X	R	yield of 2 (%) <sup>a</sup>	yield of 3 (%) <sup>a</sup>	X	R	yield of 2 (%) <sup>a</sup>	yield of 3 (%) <sup>a</sup>
OMe	H	45	23	Cl <sup>b</sup>	H	0	33
OMe <sup>c</sup>	H	37	19	OH	H	trace	52
OAc	H	34	34	OH	TMS	ND	74
OAc <sup>c</sup>	H	ND	34	OTMS	TMS	0	69
OTs <sup>b</sup>	H	0	10	OTMS <sup>d</sup>	TMS	0	86

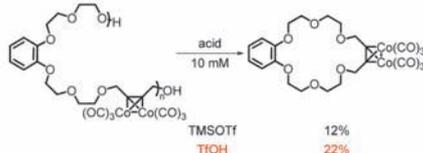
Conditions: 1) Co-alkyne complex (0.25 mmol), 1 (0.50 mmol), TIOR (20 mol%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mM), rt, 24 h. 2) CAN, MeOH, 0 °C. <sup>a</sup>Isolated yield. <sup>b</sup>Co-alkyne complex was converted in situ. <sup>c</sup>72 h. <sup>d</sup>Concentration was 1M. ND = Not determined.

Leaving Group Nucleophile ⇌ TMS-O Group

### Macrocyclization



### Re-macrocyclization



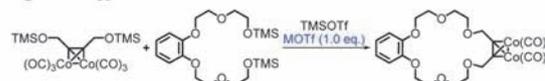
### Effect of Reaction Condition

conc. (M)	temp. (°C)	time (h)	yield of A (%) <sup>a</sup>
0.01	rt	3	56
0.01	rt	12	45
0.01	rt	24	50
0.01	-40	24	0
1	rt	24	13
1	-40	24	14

Conditions: Co-alkyne complex (0.25 mmol), Nucleophile (0.25 mmol), TMSOTf (20 mol%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>a</sup>Isolated yield.

Equilibrium within 3 h  
No temperature effect

### Template Effect



MOTT	conc. (M)	temp. (°C)	time (h)	yield (%) <sup>a</sup>	MOTT	conc. (M)	temp. (°C)	time (h)	yield (%) <sup>a</sup>
none	0.01	rt	24	50	KOTf	1	-80	48	0
KOTf	0.01	rt	24	48	KOTf	1	rt → -40	3 → 24	66
none	1	rt	24	13	KOTf (2.0)	1	rt → -40	3 → 24	58
KOTf	1	rt	24	25	NaOTf	1	rt → -40	3 → 24	35
KOTf	1	-40	24	39	RbOTf	1	rt → -40	3 → 24	36
KOTf	1	-40	48	65	CsOTf	1	rt → -40	3 → 24	30

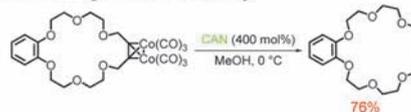
Conditions: Co-alkyne complex (1.0 eq.), Nucleophile (1.0 eq.), MOTT (1.0 eq.), TMSOTf (20 mol%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>a</sup>Isolated yield.

All alkali metal ions showed template effect

The best template

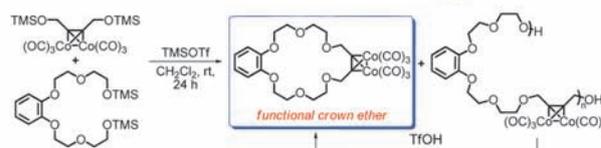
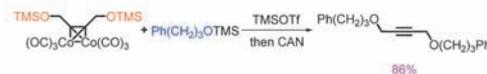
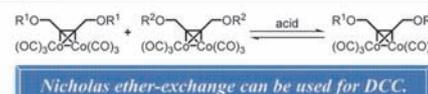


### Deprotection of Cobalt Moiety



Useful as the functional crown ether!

## Conclusion



Template effect



図 6. ポスター (発表者: 木戸場和志, 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻).

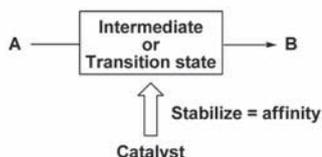


# A Ser-His Couple : Fishing by the Analogue of Hydrolysis Intermediate and Its Activity in Hydrolysis

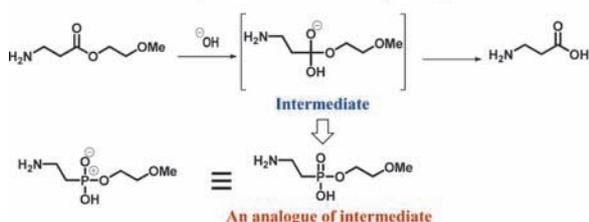
SHIRATORI Ai and KIHARA Nobuhiro

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

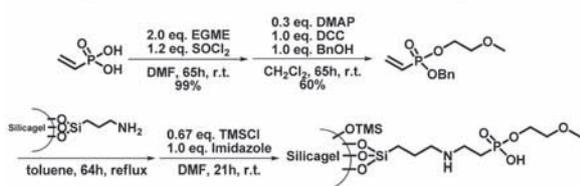
## Introduction



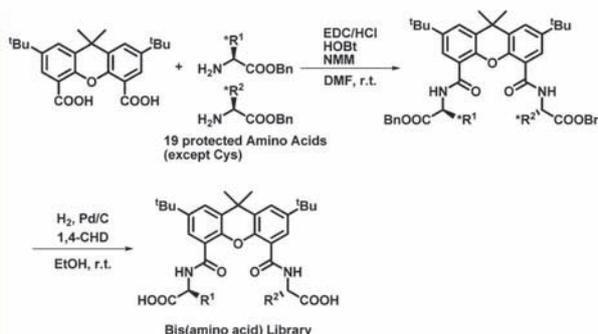
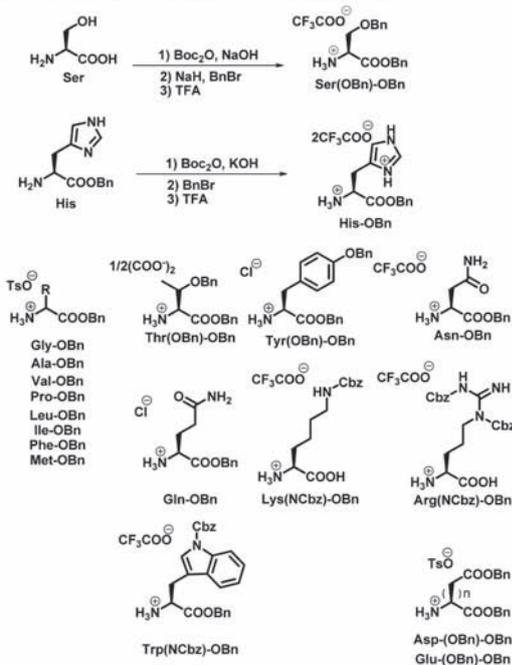
### •Intermediate of $\beta$ - alanine ester hydrolysis



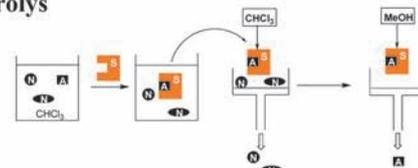
### •Silicagel modified by intermediate analogue



### •Synthesis of Bis(amino acid) Library

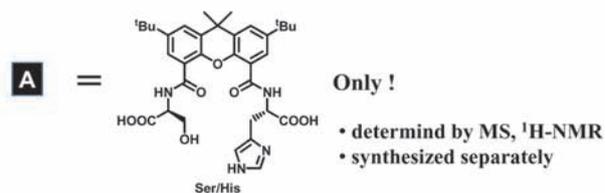


### •Selection of the candidate of the catalyst for $\beta$ -alanine ester hydrolysis

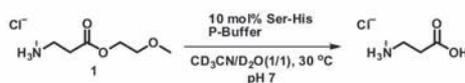


S: Silicagel gel modified by intermediate  
A: Library member with Affinity  
N: Library member without Affinity

Figure 1. Schematic representation of the selection of the candidate of the catalyst.



### • hydrolysis of $\beta$ - alanine ester in the presence of Ser/His



## Summary

Ser/His was the Negative Catalyst for the hydrolysis of  $\beta$ -alanine ester.

Ser/His recognizes (stabilizes) not only

but also

recognition of  $\beta$ -alanine ester

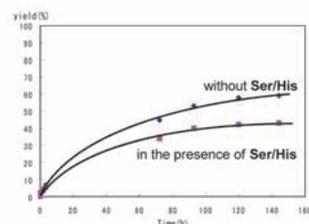


Figure 2. Self-catalyzed hydrolysis of 1 in  $\text{CD}_3\text{CN}$ -phosphate buffer at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

KU

### Solvent-promoted chemiluminescent decomposition of bicyclic dioxetanes bearing a 4-(benzothiazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl

M. Tanimura, N. Watanabe, HK. Ijuin, M. Matsumoto  
 Dept. of Chemistry, Kanagawa University, Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1293, Japan

#### Background

○ Dioxetanes bearing a hydroxyaryl group undergo base-induced decomposition (BID) to effectively give a singlet-excited carbonyl that emits light by intramolecular charge-transfer (CT) mechanism.  
 ○ Uncatalyzed thermal decomposition (TD) of dioxetanes gives mainly a triplet-excited species, so that bright light emission is hardly expected.

#### This Work

**BID**: Base-induced Decomposition  
**SPD**: Solvent-promoted Decomposition

○ In addition to TD and BID, we report here that aprotic polar solvent promoted decomposition (SPD) of dioxetane 1 to give bright light, and that this solvent-promoted decomposition (SPD) resembled the BID.

#### Base-induced Decomposition (BID) of Dioxetanes in Aprotic Polar Solvent

BID system	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^{CTCL}$	$\tau_{1/2}/s$	$k_1/s^{-1}$
NMP	496	0.29	2800	$2.5 \times 10^{-4}$
DMF	496	0.29	2200	$3.1 \times 10^{-4}$
DMSO	495	0.35	1600	$4.3 \times 10^{-4}$
CH <sub>3</sub> CN	492	0.28	1600	$4.2 \times 10^{-4}$

○ First, we examined BID of 1.  
 ○ When dioxetane 1 was treated with tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in NMP at 45 °C, chemiluminescence occurred effectively with  $\lambda_{max} = 499\text{ nm}$ ,  $\phi^{CTCL} = 0.29$ , and rate constant  $k_1 = 2.5 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ .  
 ○ The BID of 1 also proceeded to give bright light in acetonitrile, DMF and DMSO.

#### Solvent-promoted Decomposition (SPD) of Dioxetanes in Aprotic Polar Solvent

SPD system	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^{CTCL}$	$\tau_{1/2}/s$	$k_1/s^{-1}$
NMP at 100 °C	498	0.25	87	$8.0 \times 10^{-3}$
DMF at 100 °C	496	0.22	58	$1.2 \times 10^{-2}$
DMPU at 100 °C	498	0.25	270	$2.6 \times 10^{-3}$
PPC at 100 °C	493	0.24	290	$2.4 \times 10^{-3}$
DMF at 45 °C	494	(0.12)	(4100)	$(1.7 \times 10^{-4})$
CH <sub>3</sub> CN at 45 °C	494			Not estimated

○ When 1 was heated without any strong base in NMP at 100 °C, 1 decomposed to exclusively give 2 accompanied by the emission of green light.  
 ○ The SPD chemiluminescence of 1 was also observed in aprotic polar solvents, such as DMF, DMPU, and PPC.

#### SPD vs BID of Dioxetane in NMP

BID / NMP at 45 °C				SPD / NMP at 100 °C			
$\lambda_{max}/nm$	$\phi^{CTCL}$	$\tau_{1/2}/s$	$k_1/s^{-1}$	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^{CTCL}$	$\tau_{1/2}/s$	$k_1/s^{-1}$
498	0.29	2800	$2.5 \times 10^{-4}$	498	0.25	87	$8.0 \times 10^{-3}$

○ The chemiluminescence spectrum of SPD coincided with that for BID of 1, and  $\phi^{CTCL}$  was comparable to that for BID.  
 ○ These results suggested that the SPD of 1 in NMP should proceed through dioxetane bearing an oxidophenyl anion 3 to give anionic keto ester 2 in the excited state or closely related species such as a solvated anion by a mechanism similar to the case of BID.

#### Kinetics of SPD and BID in NMP

SPD / NMP				BID / NMP				
Temp / °C	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^{CTCL}$	$k_1/s^{-1}$	Temp / °C	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^{CTCL}$	$k_1/s^{-1}$	
100 °C	498	0.24	81	$8.5 \times 10^{-3}$	498	0.24	170	$4.1 \times 10^{-3}$
80 °C	498	0.24	170	$1.8 \times 10^{-2}$	498	0.25	390	$1.8 \times 10^{-3}$
60 °C	498	0.25	390	$1.8 \times 10^{-3}$	497	0.24	850	$6.1 \times 10^{-4}$
70 °C	497	0.24	850	$6.1 \times 10^{-4}$	497	0.25	2200	$3.2 \times 10^{-4}$
60 °C	497	0.25	2200	$3.2 \times 10^{-4}$	497	0.25	2200	$3.2 \times 10^{-4}$
55 °C	497	0.31	790	$8.8 \times 10^{-4}$	497	0.31	790	$8.8 \times 10^{-4}$
50 °C	498	0.33	1400	$4.8 \times 10^{-4}$	498	0.33	1400	$4.8 \times 10^{-4}$
45 °C	498	0.34	2700	$2.5 \times 10^{-4}$	498	0.34	2700	$2.5 \times 10^{-4}$
40 °C	498	0.34	4900	$1.4 \times 10^{-4}$	498	0.34	4900	$1.4 \times 10^{-4}$
35 °C	498	0.33	9000	$7.7 \times 10^{-5}$	498	0.33	9000	$7.7 \times 10^{-5}$

○ SPD is mechanistically different or not from BID?  
 ○ Thus, the kinetics of the SPD of 1 was investigated in NMP at 60 - 100 °C.  
 ○ The reaction proceeded following pseudo-first order kinetics at these temperature.  
 ○ On the other hand, both  $\lambda_{max}$  and  $\phi^{CTCL}$  changed scarcely with the reaction temperature.  
 ○ The kinetics of the BID of 1 was measured using a large excess of TBAF in NMP at 35 - 55 °C.

#### Plausible Mechanism for SPD of Dioxetane

S: Aprotic Polar Solvent

○ SPD proceeded through a transition state with considerably less disorder than that for BID.  
 ○ This is presumably attributed to the participation of hydrogen-bonding (HB) between NMP molecule(s) and a phenolic OH of 1.  
 ○ Thus, an intermediary anionic dioxetane 6 was produced through HB as a low pair with protonated NMP molecule(s) to cause SPD.  
 ○ On the other hand, the intermediary anion 3 should be slightly solvated or naked as an extreme for BID in an aprotic polar solvent such as NMP or DMSO especially with the use of TBAF.

#### Activation Parameters for SPD and BID of Dioxetane 1 in NMP

	$E_a$ / kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$\Delta H^\ddagger$ / kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$\Delta S^\ddagger$ / J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	$\Delta G^\ddagger$ / kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
BID	102.0	99.8	8.2	97.3
SPD	84.9	82.4	-56.8	99.3
SPD - BID	-17.1	-17.4	-65.0	+2.0

○ Based on the  $\ln k$ , the thermodynamic parameters for the SPD and BID in NMP were estimated from Arrhenius plots.  
 ○ The results show that the entropy term of SPD has a large negative value, which was in sharp contrast to BID.

#### Summary

○ The solvent-promoted decomposition (SPD) was found as third decomposition mode of dioxetane in addition to BID and TD.  
 ○ SPD gave light as effectively as the BID in an aprotic polar solvent.  
 ○ SPD caused intramolecular CT-induced chemiluminescence similar to BID.  
 ○ SPD proceeded through a pathway with a large negative entropy of activation in contrast to BID.

図 9. ポスター (発表者: 谷村昌俊, 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻).





## 2008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 鈴木季直  
 運 営 委 員： 情報科学科 教授 長澤倫道  
 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 加部義夫  
 生物科学科 教授 小谷 享  
 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  
 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、木村卓央、  
 岸 康人、斎藤保直、  
 増川 一、藤林俊生、鈴木 温、  
 長谷川 剛、守屋和佳、  
 Lei Wang、高梨雅彦

#### (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： 教授 鈴木季直  
 情報科学科： 教授 水野智久  
 化 学 科： 教授 松本正勝、山口和夫  
 生物科学科： 准教授 鈴木祥弘  
 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28回湘南ハイテクセミナー

—機器分析入門—  
 日時： 2008年6月19日(木)・20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」  
 西本右子 (神奈川大学理学部化学科)
- 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29回湘南ハイテクセミナー

—研究開発と分析技術—  
 日時： 2008年12月4日(木)・5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) 「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)
- 2) 「研究開発と材料分析」  
 志智雄之 (日産アーク)
- 3) 「研究開発と IR 分光」  
 古川行夫 (早稲田大学工学部化学科)
- 4) 「X 線分析と研究開発」  
 田沼繁夫 (独立行政法人物質・材料研究構)
- 5) 「X 線分析と研究開発」  
 嶋田一夫 (東京大学大学院薬学系研究科)
- 6) 「環境分析」  
 渋川雅美 (埼玉大学大学院理工学研究科)

#### (3) 第19回神奈川大学平塚シンポジウム

日時： 2009年3月13日(金)  
 13時00分～17時30分  
 会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス  
 (1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

- 演題・発表者： センター
- 1) 「海産生物に含まれる放射性核種と放射化学分析の応用」  
及川真司 (財) 海洋生物環境研究所、(財) 日本分析センター)
- 2) 「ポリ乳酸樹脂の改質と紀州漆器の作成」  
橘 熊野 (和歌山県工業技術センター)
- 3) 「環境残留性有機フッ素化合物の分解・無害化反応の開発—貴重となりつつあるフッ素資源の循環利用を目指して」  
堀 久男 (独) 産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門)
- 4) 「身近な化学物質による環境汚染と私たちの生活—紫外線吸収剤による環境汚染問題」  
亀田 豊 (埼玉県環境科学国際センター)
- 5) 「“環境” が学問のテーブルにのる日」  
武田邦彦 (中部大学大学院機械工学専攻教授、中部大学総合工学研究所副所長)
- 6) 「我が国におけるグリーン・サステイナブルケミストリー (GSC) の取り組み」  
山本 靖 (ケイ素化学協会顧問、元化学技術戦略推進機構)
- (4) 講演会  
日 時： 2008年9月5日(金)  
13時30分～15時  
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 (6号館228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・講演者：  
1) 「質量分析法の基礎と最近の進歩」  
大橋 守 (電気通信大学名誉教授)  
2) 「生体関連物質の質量分析…構造解析法として」  
大橋陽子 (理化学研究所 脳科学総合研究センター博士)
- (5) 講演会  
日 時： 2008年9月17日(水)  
16時50分～18時00分  
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス (6号館228室)  
主 催： 神奈川大学理学研究科  
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： 「New rigid and organo-soluble polymers with pyridine and triphenyl amine functional group」  
講演者： 廖 徳章 (国立台湾科技大学)
- (6) 講演会  
日 時： 2008年10月10日(金)  
14時00分～16時00分  
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス (2号館249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： 「化学発光の研究 in 信州大学…過シュウ酸エステル化学発光を中心として…」  
講演者： 本吉谷二郎 (信州大学 繊維学部 化学・材料系教授)
- (7) 講演会  
日 時： 2008年12月3日(水)  
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 (6号館209室)  
主 催： 神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター  
共 催： 神奈川大学理学研究科  
神奈川大学総合理学研究所  
演 題： 「Suzuki Coupling Reaction and the Current Topics」  
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)
- (8) 平塚祭 特別参加企画  
日 時： 2008年10月25日(土)、26日(日)  
10時00分～16時30分  
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス (6号館226室)  
主 催： 神奈川大学総合理学研究所  
共 催： 神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター  
日本電子株式会社  
演 題： 「モバイル走査電子顕微鏡で見たいものをみよう」
- (9) ハイテク・リサーチ・センター研究発表会

日 時： 2008年6月14日(土)  
9時30分～17時00分  
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャン  
パス (1号館 332室)  
主 催： 神奈川大学ハイテク・リサーチ・  
センター  
共 催： 神奈川大学総合理学研究所  
神奈川大学大学院理学研究科

演題・発表者：

- 1) 「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 (理学研究科化学専攻)
- 2) 「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 (理学研究科化学専攻)
- 3) 「海水藻類の一次生産を補助する色素系の解析」  
鈴木祥弘 (理学研究科生物科学専攻)
- 4) 「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 (理学研究科生物科学専攻)
- 5) 「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 (理学研究科化学専攻)
- 6) 「脊椎動物発生の蛍光ツールを用いた解析」  
豊泉龍児 (理学研究科生物科学専攻)
- 7) 「蛍光分子を利用した細胞骨格成分の即時観察」  
小谷 亨 (理学研究科生物科学専攻)
- 8) 「ケイ素・ゲルマニウムの特性を生かした光機能性超分子の合成」  
加部義夫 (理学研究科化学専攻)
- 9) 「微生物ポリエステルと関連化合物の代謝」  
齊藤光實 (理学研究科生物科学専攻)
- 10) 「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 (理学研究科生物科学専攻)
- 11) 「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 (理学研究科化学専攻)
- 12) 「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 (理学研究科化学専攻)
- 13) 「微視的異方性環境で働く蛍光・発光物質の開発」  
松本正勝 (理学研究科化学専攻)

- 14) 「高度の選択性を有する有機反応場の開発」  
木原伸浩 (理学研究科化学専攻)
- 15) 「Medicinal electronics bricolage: 低酸素微小環境を標的とする抗新生物薬剤の創生」  
堀 均 (徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究所ライフシステム部門)
- 16) 「フォトクロミズムを示す分子と結晶」  
入江正浩 (立教大学理学部化学科)

(10) ハイテク・リサーチ・センター研究発表会

日 時： 2008年11月15日(土)  
9時40分～17時00分  
会 場： 神奈川大学湘南ひらつかキャン  
パス (1号館 332室)  
主 催： 神奈川大学ハイテク・リサーチ・  
センター  
共 催： 神奈川大学総合理学研究所  
神奈川大学大学院理学研究科

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 (理学研究科化学専攻)
- 2) 「微生物ポリエステルと関連化合物の代謝」  
齊藤光實 (理学研究科生物科学専攻)
- 3) 「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 (理学研究科生物科学専攻)
- 4) 「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 (理学研究科化学専攻)
- 5) 「微視的異方性環境で働く蛍光・発光物質の開発」  
松本正勝 (理学研究科化学専攻)
- 6) 「脊椎動物発生の蛍光ツールを用いた解析」  
豊泉龍児 (理学研究科生物科学専攻)
- 7) 「蛍光分子を利用した細胞骨格成分の即時観察」  
小谷 亨 (理学研究科生物科学専攻)
- 8) 「ケイ素・ゲルマニウムの特性を生かした光機能性超分子の合成」  
加部義夫 (理学研究科化学専攻)
- 9) 「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 (理学研究科化学専攻)

- 10) 「高度の選択性を有する有機反応場の開発」  
木原伸浩（理学研究科化学専攻）
- 11) 「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（理学研究科化学専攻）
- 12) 「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（理学研究科化学専攻）
- 13) 「海水藻類の一次生産を補助する色素系の解析」  
鈴木祥弘（理学研究科生物科学専攻）
- 14) 「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（理学研究科生物科学専攻）
- 15) 「したたかで華麗にふるまう生体超分子」  
宝谷紘一（名古屋大学名誉教授）
- 16) 「ナノ層状環境の光化学と機能発現」  
井上晴夫（首都大学東京教授）

# Science Journal of Kanagawa University

## 投稿規定

### 1 編集方針

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

### 2 掲載論文の種類

研究論文は、総説 (Review)、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 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

#### (3) 段組み

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

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

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文献は2段組み、左右両端揃えとする。

#### (4) 使用文字 (フォントの種類)

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

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

#### (5) 論文構成

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

#### (6) 論文種の表示

第1頁、第1行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

例えば、■総説■、■原著■、■原著 (短報) ■、■報告書■ など、

英文では、■Review■、■Full-length Paper■、■Note■、■Report■ など。

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、MSゴシックで11P (ポイント) とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

#### (7) 研究課題名、著者名、所属

本文が和文の場合、研究課題名 (日本語) は太字 (Bold) で14P (ポイント)、著者名 (日本語) は太字で12Pとする。著者と著者の間

は1文字分のスペースをあける。

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

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

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

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

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

次のAbstractまでは1行あける。

#### (8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切であるが、特に制限しない。

見出し（Abstract:）からは1文字あけて要旨本文を書く。

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

#### (9) Keywords

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

文字は10Pを用い、見出し（Keywords:）はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

#### (10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞の各項目の見出しは左揃えとする。

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で12P、本文は10Pとする。

各項目の第1段落の出だしは左寄せではじめ、第2段落から出だしを1文字（英文では2文字）あける。

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で10Pとする。

項目の見出しと小見出しの間は1行スペース

をあける。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

#### (11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

番号は片括弧（閉じ括弧のみ）表示とする。

本文中では、片括弧つき番号を“上つき文字”とし、該当する部分に必ず記入する。

文字サイズは、項目の見出しは太字で12P、各文献は9Pとする。

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

以下は記入例である。

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* 10 Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retror muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. kanagawa. Univ.* 16: 9-17.
- 3) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 4) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 5) 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.
- 6) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版, 東京.
- 7) 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.
- 8) 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°Cを除き、数値と単位の間は必ず半角分スペースをあける。

(15) 作製見本

希望者には作製見本を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

## 4 原稿の体裁（報告書）

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

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

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

多人数による共同研究のうち、

- (1) 各研究者が全員原著と同等の論文（短報

の場合も含めて）を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は 3 の規定に準じて作製する。

- (2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は 3 の規定と同じである。

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

## 5 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 投稿と略題名提出

明瞭に印刷された図を含むオリジナルの印刷された原稿 1 部とそれがファイルされているデジタル記録媒体（FD、MO、CD など）を編集委員会（神奈川大学総合理学研究所）に提出する。論文の課題名が長い場合には、和文で 25 字、英文で 50 字以内の略題名（Running Title）が必要である。略題名は原稿に加え、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20巻 No.1 を皆様のお手元に無事お届けできますことは、編集委員会一同にとっても喜ばしい限りです。この巻には、総合理学研究所2008年度研究助成を受けた研究成果である論文6報を含む、総説1報、原著論文7報、短報4報、研究交流1報の、合計13の論文・記事が掲載されています。情報系、数理・物理系、化学系、生物系の総合理学研究所が担うあらゆる学術分野から、いずれも価値ある論文を投稿していただきました。研究交流についても、2007年度の第18巻に引き続き、国立台湾大学との学術交流国際会議の報告を寄せていただきました。これら、総合理学研究所を核とする共同研究、そして種々の国際交流が今後ますます発展し、ひいては本誌への投稿も盛んになることを大いに期待するところであります。

さて本誌は、神奈川大学総合理学研究所の機関紙である「年報」を、理学部および大学院理学研究科の学内紀要としての役割も果たせるような理学専門の科学誌として再出発させたものです。「神奈川大学理学誌」としては今回で5巻目となりますが、volume number が20であることからわかる通り、「年報」からの通算は節目の20巻目であります。つまりは本総合理学研究所も設立より20年目を迎えるという

ことであり、今年2009年は、本学湘南ひらつかキャンパス開設20周年に当たるわけです。総合理学研究所としてもこの記念すべき機会に際し、創設20周年記念「総説論文集」の出版を予定しています。既に原稿執筆依頼がお手元に届いていると思いますが、所員の皆様方には、当記念出版が成功するよう御協力をいただけますことを、何卒よろしくお願い申し上げます。

このように巻を重ねてまいりました本誌ではありますが、今後に向けてのさらなる飛躍のため、いくつかの課題が残されています。英文校正の導入により英語による執筆は奨励してきましたが、若手研究者からの投稿促進、加えて発行回数の増加などです。特に、以前より計画してきました研究所外の査読者による論文審査制度確立の具体化は、編集委員会も重要懸案とみなしております。また、「年報」時代より本誌の充実に意を砕いてこられた鈴木季直編集委員長も、これまでの個人の資質に頼りがちであった編集体制を、後進へと滞りなく受け継がれ得る組織的なものへ移行させることをお考えです。これからも、皆様のさらなる御支援、御助力を賜りますよう、どうかよろしくお願いいたします。

[神奈川大学総合理学研究所、  
理学部情報学科 長澤倫康]

神奈川大学理学誌編集委員会		Science Journal of Kanagawa University	
委員長		Editor-in-Chief	
鈴木季直	生物科学科	Suechika Suzuki	Department of Biological Sciences
委員		Editors	
天野 力	化学科	Chikara Amano	Department of Chemistry
長澤倫康	情報科学科	Michiyasu Nagasawa	Department of Information Sciences
井上和仁	生物科学科	Kazuhiro Inoue	Department of Biological Sciences
加部義夫	化学科	Yoshio Kabe	Department of Chemistry
張 善俊	情報科学科	Zhang Shan Jun	Department of Information Sciences

### Science Journal of Kanagawa University Vol. 20 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2009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*