

# SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

# KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

# Vol.22 2011

神奈川大学総合理学研究所

*Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University*

### 目 次

#### 原 著

Shielded Lennard-Jones Potentials and the Crossover of Structures of Rare Gas Clusters Chikara Amano, Yosuke Mikami and Shinji Mochizuki .....	1
高温イオン注入形成 Fe 微粒子からの単層 CNT 成長 —マイクロ波プラズマ CVD 条件の検討— 星野 靖、有馬広記、斎藤保直、中田穰治.....	9
理科年表にある水蒸気 (100 °C) の音速値の改訂 青木 孝.....	15
高い結晶性と純度を有する多孔性“貴金属”錯体の新合成法 松永 諭、狭田謙一、杉浦健志、森 和亮.....	23
広い抗菌活性スペクトルを示すヒスチジン銀 (I) 錯体の合成、構造と投与後のバクテリアの電子顕微鏡 観察 力石紀子、野宮健司、高木由貴、吉田拓也、吉川理絵、伊能小百合、 鈴木季直、早津 学、井上和仁、北島正治、川上洋司.....	29
カラシン目洞窟魚 <i>Astyanax mexicanus</i> の陰影反応と光受容系の観察 小林 剛、豊泉龍児、小笠原強、日野晶也、齋藤雄介、茂木和枝.....	37
成長に伴うオニテナガエビ造雄腺の組織像の変化 鶴岡慎哉、マーシーワイルダー、長谷川由利子、泉 進、大平 剛.....	43
植物の減数分裂期染色体の動態解析 —減数第一分裂中期から後期への移行期における相同染色体の分離 様式— 安積良隆、北村 巧、石垣景也、西山 歩、大塚一郎.....	49
中心体を有する植物 (イチョウ) におけるイトマキヒトデの精子中心体 DNA 相同配列の探索 河合 忍、出川洋介、日野晶也.....	57
アオキ果実の成熟に伴う果皮の色素および色素体微細構造の変化 青木 唯、小野真菜美、早津 学、鈴木季直.....	63

#### 短 報

中学数学の問題における図面の影響についての実験的検討 池田博美、桑原恒夫.....	71
自己再生型 HTML ページの Onclick 属性フィールド内スクリプトによる構成法 永松 礼夫 .....	75

相模湾平塚沖の貝類相：2010年夏の調査結果 大和田正人、金沢謙一	79
--------------------------------------	----

## テクニカルノート

コンピュータプログラムを用いたプライマーの設計と特異性予測 鈴木 温、山口栄雄、安積良隆、井上和仁	83
--	----

魚類塩濃度適応行動調査のための実験水槽の検討 市川貴美子、小笠原強	91
--------------------------------------	----

## 研究交流

第六回神奈川大学 - 国立台湾大学学術交流の記 松原世明	95
---------------------------------	----

2010年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	109
------------------------	-----

Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	113
---	-----

Auther Index	117
--------------	-----

編集後記	118
------	-----

■ Full-Length Paper ■

## Shielded Lennard-Jones Potentials and the Crossover of Structures of Rare Gas Clusters

Chikara Amano<sup>1,2</sup>, Yosuke Mikami<sup>1</sup> and Shinji Mochizuki<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** There has been a discrepancy in the number of atoms per cluster between experimental results and theoretical predictions based on molecular dynamics at which crossover takes place between the Mackay icosahedral and cubic closest-packed structures of rare gas clusters. The discrepancy was eliminated by introducing shielding effects from nearby atoms to the interatomic forces. The shielding effect is expressed in the Lennard-Jones potential by an index larger than 6 in the attractive force term. By employing the shielded Lennard-Jones potential, molecular dynamics calculations could be used to reproduce the crossover of structures observed experimentally.

**Keywords:** cluster structure, interatomic potential, crossover of structure, shielding effect, rare gas, molecular dynamics

### Introduction

The Lennard-Jones (L-J) potential has been used to express the weak interactions between rare gas atoms. Lennard-Jones has proposed an explanation for the viscosity and an equation of state for real gases<sup>1</sup>,  $V(r) = ar^{-n} - br^{-m}$ , where  $m$  in the attractive force term equals 3, 4, or 5, especially 4, and  $n$  in the repulsive force term is an integer in a range of 13–24. More recently, on the basis of quantum mechanics, London concluded that  $m = 6$  for almost all cases<sup>2</sup>. For simplicity, however, the value of  $n$  was assumed to be 12 with little theoretical basis. Since then, the L-J (12, 6) potential has been used to describe interatomic interactions.

From early studies on nucleation and crystal growth, an amorphous icosahedral structure was proposed by Mackay<sup>3</sup>. It is nearly as dense as the closest-packed structure and has become known as the Mackay icosahedral (ich) structure. The ich structure has been observed in electron diffraction experiments on argon clusters generated through free jet expansion<sup>4,7</sup>. The results were interpreted such that, when  $20 < N < 750$ , where  $N$  represents the number of atoms per cluster, Ar clusters take the ich structure and, when  $N \approx 750$ , the structure becomes cubic closest-packed (ccp) or

face-centered cubic (fcc). On the other hand, from molecular dynamics calculations using the L-J (12, 6) potential, the crossover from the ich structure to the ccp cuboctahedron takes place in the range of  $8217 < N < 10179$ <sup>8-10</sup>. Changing the external shape to the hexakis icosahedron in the regime of the ccp structure reduces  $N$  to  $\sim 2500$ <sup>11</sup>. The experimental and theoretical values of  $N$  at the crossover are different<sup>12</sup>.

The relationship between the structures of rare gas crystals or clusters and the form of the interatomic potentials has been studied. By varying the index in the L-J and the Born-Mayer potentials, Kihara and Koba have tried to calculate the experimentally observed ccp structure of rare gas crystals<sup>13</sup>. They conclude that calculations using the L-J potential with a conventional index does not yield a ccp structure but a hcp structure and that, when the Born-Mayer potential with a smaller index is used, the ccp structure is produced. Hoare and Pal have shown that using both L-J (12, 6) and Morse potentials gives the ich structure for rare gas clusters with a small  $N$ <sup>8</sup>. Stillinger and Stillinger have shown that both L-J (12, 6) and L-J potentials with a cut-off beyond a certain distance

afford the icosahedral structure for the magic number  $N = 55$ <sup>14</sup>. Braier et al. have studied the relation between the width of the Morse potential and the structure of small rare gas clusters<sup>15</sup>. By varying one of the indexes in the L-J potential, Bytheway and Kepert have studied a similar problem and have found that a new amorphous structure appears when potentials with large widths are used<sup>16</sup>. By using the Morse potential with a large width, Doye et al. have obtained an amorphous structure<sup>17</sup>. We have studied the crossover of structures for the magic numbers  $N = 13$  and  $55$  by varying L-J, Born-Mayer, and Morse potential indexes over a large range<sup>18</sup>. More recently, the form of the potential was examined in detail for small rare gas clusters. Marques et al. have searched for stable and metastable structures of  $\text{Ar}_n$  ( $n = 3-78$ ) by using the four potentials and have obtained the icosahedral as the most stable structure with each potential<sup>19</sup>. Lombardi et al. have compared the L-J, the Aziz HFD, and the generalized L-J potentials proposed recently by Pirani et al. for  $\text{Ar}_5$  and  $\text{Ar}_6$ <sup>20</sup>.

The interatomic force exerted by an atom in a cluster or a crystal may be shielded by nearby atoms. The shielding effect changes the conventional interatomic potential to a short range one. Stillinger has shown that the L-J potential beyond a certain cut-off distance gives the correct crystalline ccp structure, rather than the hcp one<sup>14,21</sup>. By using the same potential, he has studied the temperature dependence of the structure, especially the melting transition of  $\text{Ar}_{55}$ . Balletto et al. have studied the crossover from the icosahedral, the decahedral, and the ccp cuboctahedron structures for silver clusters using the Gupta potential vanishing beyond the third neighbor distance<sup>22</sup>. The shielding effect appears when an L-J potential with an index larger than 6 in the attractive force term. In this study, shielded L-J potentials were used to calculate the  $N$  value of the crossover observed experimentally. However, in order to eliminate the differences between experiments and theories, many problems on different levels must be considered, such as the adequacy of the potential, examination of the decahedral structure, observation of outer shapes, the effect of the zero-point vibrational and vibrational energies, and the kinetic effect.

## Method

The L-J potential is given in the general form:

$$V_{ij} = \frac{U_0}{R-S} \left\{ S \left( \frac{r_0}{r_{ij}} \right)^R - R \left( \frac{r_0}{r_{ij}} \right)^S \right\}. \quad (1)$$

For the conventional L-J (12, 6) potential,  $R = 12$  and  $S = 6$ . The shielding effect can be expressed as  $6 < S < R$ . To be specific, the following values were used:  $R = 12$  and  $S = 7-11$ ,  $R = 13$  and  $S = 9-12$ , and  $R = 14$  and  $S = 11-13$ . The potentials are shown in Fig. 1.

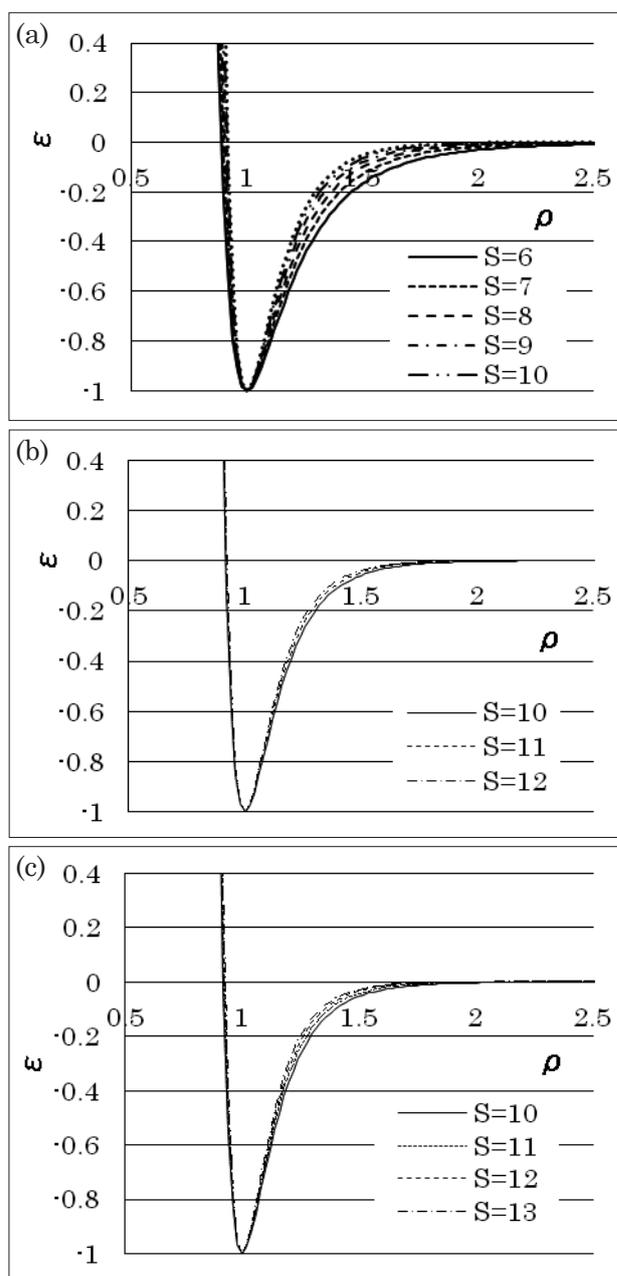


Fig. 1. (a) Shielded L-J potentials for  $R = 12$  and  $S = 6-11$ , (b)  $R = 13$  and  $S = 10-12$ , and (c)  $R = 14$  and  $S = 10-13$ .

In order to determine the potential energy minima of the clusters with interacting particles, the steepest gradient descent method proposed by Stillinger and Weber<sup>23)</sup> was used. The orbits of interacting particles were determined on the basis of the following “equation of motion”:

$$d\mathbf{r}_i/dt = -\text{grad}_i\Phi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N), \quad (2)$$

where  $\mathbf{r}_i$  is the position vector of the  $i$ th particle and  $\Phi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$  is the potential of interacting particles. Eq. (2) corresponds physically to the motion of interacting particles in a dissipative medium, such as a highly viscous medium, where the total energy of particles is not preserved. Unlike usual molecular dynamics, only the initial positions of the particles (i.e., the initial structure) are required. From the final equilibrium positions, the structure of the particles at 0 K is determined. The dimensionless reduced variables  $\rho$  (distance),  $\tau$  (time), and  $\varepsilon$  (energy) introduced by Verlet<sup>24)</sup> were used:

$$\rho = \mathbf{r}/r_0, \quad (3)$$

$$\tau = \mathbf{t}/t_0; \quad t_0 = (m r_0^2/U_0)^{1/2}, \quad (4)$$

$$\varepsilon = \mathbf{E}/U_0. \quad (5)$$

The equilibrium bond length  $\rho_0$  is equal to 1. Time intervals ( $\tau$ ) of 0.0001 were used. The values of the variables were calculated using Eqs. (3)–(5) with the aid of the parameters given in Table 1. For example,  $\rho_0 = 0.340$  nm and the real time step  $t = 0.0001t_0 = 2.15 \times 10^{-16}$  s for argon atoms. Trajectories consisted of  $10^2$ – $10^5$  time steps.

As in our previous report involving silver clusters, a cluster growth model was assumed<sup>25)</sup>. Clusters were assumed to grow by one of two sequences: ccp cuboctahedron and icosahedron sequences. Calculations were carried out on clusters with a complete shell. The calculations were started using one of the two trial configurations and were ended when the sum of the forces acting on each atom was zero and the total potential energy was a (local) minimum value. The two initial trial structures for  $N = 13$  and 55 atom clusters are shown in Fig. 2.

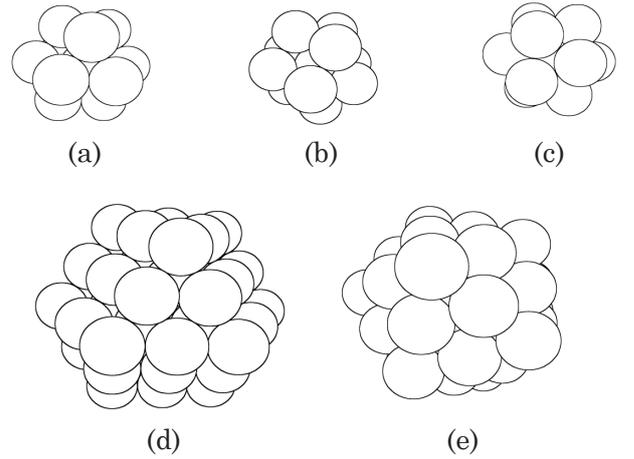


Fig. 2. (a) and (d) Trial cubic closest-packed cuboctahedral structure, (c) and (e) Mackay icosahedral structure for  $N = 13$  and 55 clusters, and (b) hexagonal closest-packed structure for  $N = 13$  cluster.

Table 1. Parameters for conversion to usual units<sup>14)</sup>

	Ar	Kr	Xe
$r_0$ (nm)	0.340	0.360	0.410
$U_0$ ( $10^{-23}$ J)	166	236	305
$m$ ( $10^{-26}$ kg)	6.6336	13.916	21.803
$t_0$ (ps)	2.15	2.76	3.47

## Results

The potential energy values for the shielded L-J potentials with  $R = 12, 13,$  and  $14$  are summarized in Tables 2–4. The values for the conventional L-J (12, 6) potential in Table 2 coincide with those reported in the literature<sup>10)</sup>.

Values in bold are the binding energy values immediately after crossover to the ccp structure. They indicate that  $N$  at the crossover is smaller when  $R$  is constant and  $S$  is increased and that  $N$  becomes smaller when  $R$  is increased.

The nearest-neighbor distance is a little smaller than the distance corresponding to the minimum of the potential energy function. It depended on the position of an atom in a cluster; it was larger at positions closer to the surface. It depended also on the size of the cluster.

Table 2. Comparison of potential energy values of the cubic closest-packed (ccp) and the Mackay icosahedral (ich) structure for the shielded L-J potentials ( $R = 12$  and  $S = 6-11$ )

$N$	$L$	ccp						ich					
		$S = 6$	$S = 7$	$S = 8$	$S = 9$	$S = 10$	$S = 11$	$S = 6$	$S = 7$	$S = 8$	$S = 9$	$S = 10$	$S = 11$
13	1	-40.8845	-39.6703	-38.8254	-38.2271	-37.7961	-37.4803	-44.3268	-43.2244	-42.4417	-41.8668	-41.4279	-41.0790
55	2	-268.276	-252.669	-242.810	-236.333	-231.931	-228.851	-279.248	-263.266	-253.052	-246.215	-241.430	-237.936
147	3	-854.376	-792.243	-754.732	-730.845	-714.962	-704.021	-876.461	-812.448	-773.436	-748.211	-731.040	-718.802
309	4	-1971.56	-1811.37	-1717.16	-1658.17	-1619.37	-1592.86	-2007.21	-1842.36	-1744.61	-1682.56	-1640.89	-1611.53
561	5	-3792.09	-3462.96	-3272.65	-3154.70	-3077.65	-3025.22	-3842.39	-3504.35	-3307.43	-3183.80	-3101.48	-3043.86
923	6	-6488.21	-5899.90	-5563.75	-5356.83	-5222.27	-5130.98	-6552.72	-5949.71	-5602.71	-5386.52	-5243.29	-5143.48
1415	7	-10232.1	-9275.10	-8733.00	-8400.97	-8185.72	-8040.01	-10308.8	-9329.69	-8771.27	-8425.21	-8196.77	-8038.08
2057	8	-15196.0	-13741.4	-12923.0	-12423.5	-12100.5	-11882.2	-15281.5	-13795.6	-12953.9	-12434.4	-12092.4	-11855.3
2869	9	-21552.2	-19451.8	-18276.9	-17560.9	-17099.1	-16787.3	-21641.3	-19498.6	-18291.4	-17548.6	-17060.6	-16722.9
3871	10	-29472.7	-26559.1	-24935.2	-23949.4	-23314.0	-22885.4	-29558.9	-26590.0	-24924.6	-23902.3	-23231.8	-22768.5
5083	11	-39129.9	-35216.2	-33042.5	-31725.6	-30877.6	-30306.1	-39204.8	-35221.0	-32944.3	-31630.1	-30736.6	-30119.8
6525	12	-50695.9	-45576.0	-42740.8	-41025.8	-39922.5	-39179.5	-50749.8	-45543.0	-42641.3	-40866.4	-39705.3	-38904.4

$N$  stands for the number of atoms per cluster and  $L$  the number of shells in a cluster. Values in bold are the binding energy values immediately after crossover to the ccp structure.

Table 3. Comparison of potential energy values between the ccp and ich structures for the shielded L-J potentials ( $R = 13$  and  $S = 10-12$ )

$N$	$L$	ccp			ich		
		$S = 10$	$S = 11$	$S = 12$	$S = 10$	$S = 11$	$S = 12$
13	1	-37.5922	-37.2904	-37.0672	-41.1798	-40.8318	-40.5417
55	2	-229.985	-227.081	-225.010	-239.106	-235.742	-233.176
147	3	-708.100	-697.831	-690.592	-723.041	-711.361	-702.674
309	4	-1602.80	-1577.96	-1560.56	-1621.86	-1593.96	-1573.45
561	5	-3044.95	-2995.91	-2961.65	-3064.30	-3009.67	-2969.78
923	6	-5165.42	-5080.08	-5020.61	-5179.08	-5084.60	-5015.91
1415	7	-8095.06	-7958.92	-7864.18	-8094.88	-7944.82	-7836.05

Table 4. Comparison of potential energy values between the ccp and ich structures for the shielded L-J potentials ( $R = 14$  and  $S = 10-13$ )

$N$	$L$	ccp				ich			
		$S = 10$	$S = 11$	$S = 12$	$S = 13$	$S = 10$	$S = 11$	$S = 12$	$S = 13$
13	1	-37.4330	-37.1434	-36.9305	-36.7720	-40.9631	-40.6141	-40.3210	-40.0700
55	2	-228.499	-225.742	-223.789	-222.375	-237.218	-233.951	-231.453	-229.460
147	3	-702.896	-683.179	-686.375	-681.492	-716.664	-705.419	-697.042	-690.532
309	4	-1590.27	-1566.81	-1550.47	-1538.80	-1606.82	-1580.07	-1560.38	-1545.28
561	5	-3020.28	-2973.99	-2941.87	-2918.97	-3035.08	-2982.80	-2944.61	-2915.53
923	6	-5122.57	-5042.08	-4986.34	-4936.68	-5128.79	-5038.49	-4972.85	-4923.11

## Discussion

### Optimal shielded L-J potentials

Optimal shielded L-J potentials were calculated from the data in Tables 2–4 which could simulate the crossover for  $N = 750$  obtained experimentally. By interpolating, the pairs  $R = 13$  and  $S = 12$ ,  $R = 14$  and  $S = 11$ , and  $R = 14$  and  $S = 12$  gave  $N$  values of approximately 640, 850, and 820, respectively, for the crossover. The value of  $N = 820$  is the closest to 750. Hence, we concluded that the L-J (14, 12) potential was the most appropriate for describing the structure of rare gas clusters, making the difference in  $N$  less than one hundredth. It should be noted, however, that the potential energy of the clusters also depends on the outer shape. In the regime of the ccp structure, there are shapes other than the cuboctahedron, namely the Wolf shape, three types of decahedron, and the hexakaicosahedron, all of which have different potential energy values<sup>11</sup>. Studies on the shapes of the clusters may be necessary.

### Change in $N$ at crossover

The crossover of the structure from ich to ccp may be interpreted qualitatively by considering the relative contributions of the bulk binding and surface binding energies. Here the binding energy means the dissociation energy of a cluster to free atoms, and its sign is positive. The bulk binding energy is the sum of the binding energies of atoms in the bulk cluster. The surface binding energy is the sum of the binding energies of atoms to the surface. The sum of the bulk and surface binding energies is twice the (total) binding energy. The ich structure has two characteristics: a small number of atoms at edge positions and a quasi-nearest neighbor distance  $\sim 5\%$  longer than the nearest neighbor one. The coordination number 12 is the same as that of the ccp structure by including atoms at the quasi-nearest neighbor distance. Such atoms make the bulk binding energy of the ich structure smaller than that of the ccp one. On the other hand, the small number of atoms at edge positions makes the surface energy of the ich structure larger than that of the ccp one. For small clusters, the contribution of the surface energy to the total binding energy is considerable, which makes the ich structure more stable. For large clusters, the bulk

energy is dominant, which makes the ccp structure stable. The crossover between the structures occurs at an intermediate size. The shielded potentials have two effects on the stability: They make both ich and ccp structures unstable, whereas they make the ich structure more unstable than the ccp one. The former effect is due to a decrease in attractive force. The latter is due to the existence of the quasi-nearest neighbor distance in the ich or can be explained by the following. Molecular dynamics simulations showed that the ich structure formed through the relaxation of multiple twin structures composed of 20 ccp tetrahedrons. Hence, it can be viewed as a strained quasi-crystalline structure. The strain makes the binding energy of the ich structure smaller than that of the ccp structure.

The data in Tables 2–4 indicate that  $N$  at crossover is smaller when  $R$  and  $S$  are larger. The smaller  $N$  can also be explained qualitatively by a dominant contribution from the bulk binding energy. From Figs. 2–4, the width of the potential became narrower as  $S$  became larger for a constant  $R$  or as  $R$  became larger for a constant  $S$ . The narrow width of the potential makes the bulk binding energy of the ich structure smaller than that of the ccp structure, which is due to the presence of the quasi-nearest neighbor distance or strain. Since all these explanations are qualitative in nature, a quantitative explanation is still required.

### Scenario for cluster growth

In the case of metal clusters, an amorphous decahedral structure has been proposed by Ino<sup>26,27</sup> and Marks<sup>28,29</sup> for small particles with five-fold symmetry observed frequently via electron microscopes. The stability of the structure has been studied by using molecular dynamics simulations with the L-J (12,6) potential<sup>11</sup>. The ich structure is stable for small clusters up to the crossover at  $N \approx 600$ , the decahedral structure is stable for intermediate clusters of  $1600 \leq N \leq 10^5$ , and the ccp structure is stable for large clusters of  $N \geq 10^5$ . These results were obtained by assuming an optimal outer shape for each structure, suggesting a scenario for cluster growth. For rare gas clusters, however, the decahedral structure has not been observed experimentally; an experimentally observed electron diffraction pattern could not

be interpreted by applying the function for the decahedral structure<sup>30</sup>. The introduction of the shielded L-J potentials may change the proposed scenario. At least, it could change the value of  $N$  at crossover.

On the other hand, van de Waal has proposed a different scenario that does not involve a structural transition<sup>30,31</sup>. He suggests that the electron diffraction function reported by Torshe et al. represents a structure composed of a multiply twinned core with five-fold symmetry surrounded by a shell with defects, which grows smoothly into the ccp crystal structure. Clusters grow smoothly from the ich or decahedral structure to the ccp crystals without structural transition. The model implies that the preference for the ccp crystal structure over the hcp is due to a kinetic effect. This is supported by electron diffraction experiments reported by Kovalenko et al.<sup>32-35</sup>. Ar, Kr, and Xe clusters with  $N > 2000$  have an fcc structure with deformation-type stacking faults, and Kr clusters with  $N = 3000$  and 10000 have fcc structures with constant numbers of intersecting stacking faults. Although some experimental results have a true kinetic origin and can be interpreted by the kinetic model, the structures of clusters or crystals are thermodynamically stable. It does not seem correct to describe the ccp crystal structure as being a metastable state and the hcp as being a stable state<sup>21, 36, 37</sup>.

For small clusters, the ich structure is the most stable, and for crystals, the ccp structure is the most stable. Since these structures have different symmetries, the crossover between structures should take place at an intermediate  $N$ . However, the difference in energy is rather small. Thus, a mixture of two structures probably forms, especially for an  $N$  value near the crossover<sup>11</sup>. In other words, by presuming that the anomalously large 111 and small 200 peaks indicate a mixture, the electron diffraction patterns can be interpreted.

### Zero-point vibrational energy

In order to obtain the quantum mechanical binding energy, the zero-point vibrational energy must be added to the potential energy calculated by using classical molecular dynamics. In early theoretical studies on the structure of rare gas crystals, it

has been reported that the inclusion of the zero-point vibrational energy does not alter the previous results, suggesting that the hcp structure has a lower energy than the ccp one does when the L-J and Buckingham potentials are applied<sup>38,39</sup>. However, in recent theoretical studies, the importance of the zero-point vibrational energy for the crystal structure has been emphasized<sup>36,37</sup>.

### Conclusion

Although using shielded L-J potentials caused both the ich and ccp structures to appear unstable, they caused the ich structure to appear more unstable than the ccp one. However,  $N$  for the theoretical crossover was closer to the experimental one. The effect appeared greater for strongly shielded potentials, such as the L-J potentials with large  $R$  and  $S$ . In this respect, the L-J (14, 12) potential was the most appropriate. We propose that the interatomic potential in a cluster or a crystal involves interatomic forces shielded by nearby atoms.

### Acknowledgment

Chikara Amano wishes to thank Prof. Nobuhiro Kihara for discussions concerning the shielding of interatomic forces.

### References

- 1) Lennard-Jones JE (1924) On the determination of molecular fields. II. From the equation of state of a gas. *Proc. Roy. Soc. A* **106**: 463-477.
- 2) London F (1930) Theory and systematic of molecular forces. *Zeitschrift fuer Physik* **63**: 245-279.
- 3) Mackay AL (1962) A dense non-crystallographic packing of equal spheres. *Acta Cryst.* **15**: 916-919.
- 4) Audit P (1969) Liaisons intermoleculaires dans les jets supersoniques etude par diffraction d'electrons. *J. Phys. (Paris)* **30**: 192-202.
- 5) Farges J, Raoult B and Torchet G (1973) Crystal-line and noncrystalline effects in electron diffraction patterns from small clusters in an argon cluster beam. *J. Chem. Phys.* **59**: 3454-3458.
- 6) Farges J, de Feraudy MF, Raoult B and Torchet G (1983) Noncrystalline structure of argon clusters I. Polyicosahedral structure of  $Ar_N$  clusters,  $20 < N < 50$ . *J. Chem. Phys.* **78**: 5067-5080.
- 7) Farges J, de Feraudy MF, Raoult B and Torchet G (1986) Noncrystalline structure of argon clusters. II. Multilayer icosahedral structure of  $Ar_N$  clusters  $50 < N < 750$ . *J. Chem. Phys.* **84**: 3491-3501.
- 8) Hoare MR and Pal P (1972) Geometry and stability of spherical f.c.c. microcrystallites. *Nature Phys. Sci.* **236**: 35-37.

- 9) Northby JA (1987) Structure and binding of Lennard-Jones clusters:  $13 \leq N \leq 147$ . *J. Chem. Phys.* **87**: 6166-6177.
- 10) Xie J, Northby JA, Freeman DL and Doll JD (1989) Theoretical studies of the energetic and structures of atomic clusters. *J. Chem. Phys.* **91**: 612-619.
- 11) Raoult B, Farges J, de Feraudy MF and Torchet G (1989) Comparison between icosahedral, decahedral and crystalline Lennard-Jones models containing 500 to 6000 atoms. *Phil. Mag.* **60**: 881-906.
- 12) Wille LT (1999) Lennard-Jones clusters and the multiple minima problem. *Annual Reviews of Computational Physics* **7**: 25-60.
- 13) Kihara T and Koba S (1952) Crystal structures and intermolecular forces of rare gases. *J. Phys. Soc. Japan* **7**: 348-354.
- 14) Stillinger FH and Stillinger DK (1990) Computational study of transition dynamics in 55-atom clusters. *J. Chem. Phys.* **93**: 6013-6024.
- 15) Braier PA, Berry RS and Wales DJ (1990) How the range of pair interactions governs features of multidimensional potentials. *J. Chem. Phys.* **93**: 8745-8756.
- 16) Bytheway I and Kepert DL (1992) The mathematical modeling of cluster geometry. *J. Math. Chem.* **9**: 161-180.
- 17) Doye JPK, Wales DJ and Berry RS (1995) The effect of the range of the potential on the structures of clusters. *J. Chem. Phys.* **103**: 4234-4249.
- 18) Amano C, Komuro M, Mochizuki S, Urushibara H and Yamabuki H (2006) Interatomic potential and the structure of rare gas clusters. *J. Mol. Structure: THEOCHEM* **75**: 841-848.
- 19) Marques JMC, Pereira FB and Leitao TJ (2008) On the use of different potential functions in rare-gas cluster optimization by genetic algorithm: application to argon clusters. *J. Phys. Chem. A* **11**: 6079-6089.
- 20) Lombardi A and Palazzetti F (2008) A comparison of interatomic potentials for rare gas nanoaggregates. *J. Mol. Structure: THEOCHEM* **852**: 22-29.
- 21) La Violette RA and Stillinger FH (1985) Multidimensional geometric aspects of the solid-liquid transition in simple substances. *J. Chem. Phys.* **83**: 4079-4085.
- 22) Baletto F, Ferrando R, Fortunell A, Montalenti F and Mottet C (2002) Crossover among structural motifs in transition and noble-metal clusters. *J. Chem. Phys.* **116**: 3856-3863.
- 23) Stillinger FH and Weber TA (1982) Hidden structure in liquids. *Phys. Rev. A* **25**: 978-989.
- 24) Verlet L (1967) Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **159**: 98-103.
- 25) Amano C, Niina H and Mikami Y (2009) Molecular dynamics on silver cluster structures along the icosahedral noncrystalline and the cuboctahedral c.c.p. growth sequence. *J. Mol. Structure: THEOCHEM* **904**: 64-68.
- 26) Ino S (1966) Epitaxial growth of metals on rocksalt faces cleaved in vacuum II. Orientation and structure of gold particles formed in ultrahigh vacuum. *J. Phys. Soc. Jpn.* **21**: 346-362.
- 27) Ino S and Ogawa S (1967) Multiply twinned particles at earlier stages of gold film formation on alkali halide crystals. *J. Phys. Soc. Jpn.* **22**: 1365-1374.
- 28) Marks LD and Smith DJ (1981) High resolution studies of small particles of gold and silver. I. Multiply twinned particles. *J. Cryst. Growth* **54**: 425-432.
- 29) Howie A and Marks LD (1984) Elastic strains and the energy balance for multiply twinned particles. *Phil. Mag. A* **49**: 95-109.
- 30) van de Waal BW (1996) No evidence for size-dependent icosahedral  $\rightarrow$  fcc structural transition in rare-gas clusters. *Phys. Rev. Lett.* **76**: 1083-1086.
- 31) van de Waal BW (1996) Cross-twinning model of fcc crystal growth. *J. Crystal Growth* **158**: 153165.
- 32) Kovalenko SI, Solnyshkin DD, Verkhovtseva ET and Eremenko VV (1996), Experimental detection of stacking faults in rare gas clusters. *Chem. Phys. Lett.* **250**: 309-312.
- 33) Kovalenko SI, Solnyshkin DD, Bondarenko EA and Verkhovtseva ET (1997) Crystal phase formation and growth in rare-gas clusters. *Low Temp. Phys.* **23**: 140-144.
- 34) Kovalenko SI, Solnyshkin DD, Bondarenko EA, Verkhovtseva ET and Eremenko VV (1998) Electron diffraction study on the rise of crystal phase in rare-gas and nitrogen clusters. *J. Crystal Growth* **191**: 553-557.
- 35) Kovalenko SI, Solnyshkin DD and Verkhovtseva ET (2000) On the mechanism of transformation of icosahedral rare-gas clusters into fcc aggregations. *Low Temp. Phys.* **26**: 207-209.
- 36) Rosciszewski K, Paulus B, Fulde P and Stoll H (2000) Ab initio coupled cluster calculations for the fcc and hcp structures of rare-gas solids. *Phys. Rev. B* **62**: 5482-5488.
- 37) Schwerdtfeger P, Gaston N, Krawczyk RP, Tonner R and Moyano R (2006) Extension of the Lennard-Jones potential: Theoretical investigations into rare-gas clusters and crystal lattices of He, Ne, Ar, and Kr using many-body interaction expansions. *Phys. Rev. B* **73**: 064112/1-064112/19.
- 38) Jansen J and Dawson LM (1954) Interatomic forces and the crystal structures of rare gases. *J. Chem. Phys.* **22**: 1619-1620.
- 39) Jansen J and Dawson LM (1955) On interatomic forces and the crystal structures of the rare gases. *J. Chem. Phys.* **23**: 482-486.



■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 高温イオン注入形成 Fe 微粒子からの単層 CNT 成長 —マイクロ波プラズマ CVD 条件の検討—

星野 靖<sup>1,2</sup> 有馬広記<sup>1</sup> 斎藤保直<sup>1</sup> 中田稔治<sup>1</sup>

Growth of Single-Walled Carbon Nanotubes From Fe Nanoparticles  
Formed by Hot-Ion Implantation

Yasushi Hoshino<sup>1, 2</sup>, Hiroki Arima<sup>1</sup>, Yasunao Saito<sup>1</sup> and Jyoji Nakata<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** We have studied a novel procedure of carbon nanotube (CNT) growth from nanoparticles formed by hot-ion implantation in a SiO<sub>2</sub>/Si structure. An advantage of this method is that size and the density of the nanoparticles are easily controlled by the conditions of ion implantation. We performed single-walled CNT (SWCNT) growth from Fe-implanted SiO<sub>2</sub>/Si samples by microwave-plasma-enhanced chemical vapor deposition (MPCVD). Micro Raman spectra observed for the sample treated by MPCVD for 1 min clearly show the presence of SWCNTs.

**Keywords:** carbon nanotube, ion implantation, micro wave-plasma-enhanced chemical vapor deposition

### 序論

グラフェンシートを円筒状に巻いた構造を持つカーボンナノチューブ (Carbon nanotube : CNT) は、極めて優れた物性を有することから、近年多くの研究が進んでいる<sup>1,2)</sup>。理論上の電気伝導度や熱伝導率は銅に比べ約 10 倍という値を持ち、素子の高集積化に加え、省エネルギーデバイスとなり得るポテンシャルを有する。また、引っ張り強度は鋼鉄の約 20 倍、密度はアルミニウムの約 1/2 であり、将来の構造材料としての利用も期待されている<sup>3)</sup>。

我々は、単層 CNT (Single-walled CNT : SWCNT) を用いた新しい電子デバイスの作製を最終目標として研究を進めている。そのためには、CNT の成長制御方法の確立が強く望まれる。特に、CNT の電子物性は、螺旋度 (カイラリティ) や直径により決まる。したがって、それらをいかに制御して作製するかが大きな課題となっている。しかしながら、期待する (1) サイズ (直径・長さ)、(2) 表面形成密度、(3) 成長方向、(4) 欠陥密度、(5) 階層 (単層・多層) および (6) カイラリティを持つ CNT の成長制御は未だ実現していない。これらを克服するためには、まず CNT の成長核となる金属微粒子の成長制御が

必要であると考えられる。

我々はまず、最初の目標として SWCNT の成長条件の検討を試みた。CNT の直径は、種触媒微粒子のサイズと大きな相関があると言われている。そこで微粒子の直径制御が高精度で可能な手法である「絶縁膜中への高温イオン注入」により SWCNT の直径 (1-2 nm) を同程度の Fe 微粒子の作製と評価を行ってきた。昨年度、基板温度 600°C での SiO<sub>2</sub> 表面近傍へのイオン注入により、平均直径 2.6 nm、標準偏差 0.6 nm の Fe クラスターを形成することができることを示した<sup>4)</sup>。そこで、これらの試料に対して、マイクロ波プラズマ CVD (MPCVD) 法により、SWCNT の成長条件の最適化を試みた。

### 材料と方法

高温イオン注入は湘南ひらつかキャンパスの 200 kV 中電流型イオン注入装置を用いた。この装置は、液体窒素温度から 1000°C までの基板温度で注入可能な特別仕様である。

一般に CNT は、Fe、Co、Ni などの金属微粒子から高効率に成長することが知られている。特に、

MPCVD 法による成長には、Fe 微粒子が適していることから、今回は触媒に Fe を用いた。注入に用いた  $\text{Fe}^+$  イオンは、Fe のリペラプレートを用いた Ar プラズマによりスパッタすることにより得た。30 kV で引き出されたイオンは、電磁石により  $^{56}\text{Fe}^+$  のみに質量分析され、さらに逆電場により 5 keV まで減速した。表面近傍に高濃度で注入する目的から、今回このような低エネルギー (5 keV) を選択した。また、試料直前に設置されたファラデーカップにより計測した電流密度は、 $\sim 50 \text{ nA/cm}^2$  であった。

注入基板としては、Si(100) 基板上に dry 酸化により約 100 nm 形成した  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  試料を用いた。酸化膜厚は、エリプソメータにより評価した。この  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  試料に対して、5 keV で  $^{56}\text{Fe}^+$  イオンを基板温度  $600^\circ\text{C}$  で注入した。注入量は  $5 \times 10^{15}$  および  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  とした。TRIM コードを用いた Fe イオン注入分布のモンテカルロ計算により、平均射影飛程は約 8 nm、 $\text{SiO}_2$  に対する Fe のピーク濃度比は、注入量  $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$  では、約 13 atoms%、 $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  では、約 50 atoms% であった。

CNT の形成には、周波数 2.45 GHz、出力 750 W のマイクロ波プラズマ CVD を用いた。まず Fe 注入試料を約  $8 \times 8 \text{ mm}^2$  のサイズに切り出し、C 製のホルダーに乗せた。ターボ分子ポンプで  $10^{-7}$  Torr まで真空引きした後、 $\text{H}_2$  と  $\text{CH}_4$  の混合ガスをそれぞれ 200 sccm および 10 sccm の流量比で全圧 25 Torr 導入した。試料温度が  $800^\circ\text{C}$  に近づいたところでマイクロ波を導入し、1, 3, 10 分間の成長を行った。CNT の評価には、主に走査電子顕微鏡 (SEM) および顕微ラマン分光を用いた。また Fe および  $\text{SiO}_2$  の絶対量評価には、ラザフォード後方散乱 (RBS) を用いた。

## 結果と考察

図 1 に、Fe を未注入の  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  基板上に MPCVD を 10 分行った試料の写真 (a) と SEM 像 (b)(c) を示す。Region A で示す試料中心付近は、プラズマにより  $\text{SiO}_2$  がエッチングされ、Si 基板が露出していると考えられる。図 1(b) に示すように、この領域にはカーボンマイクロボール (CMB) が観察された。一方、Region B で示す外側の領域には、グラフェンシートの 3 次元構造体であるカーボンナノウォール (CNW) が見られた。プラズマを用いない通常の熱 CVD 法では CNW が成長しないことから、プラズマ中に存在するメタンイオンや活性種が CNW 成長に重要な役割を果たしていることが分かる。おそらくイオンや活性種が、 $\text{SiO}_2$  上のミクロな欠陥などにトラップされ、前駆体である非晶質カーボンナノ

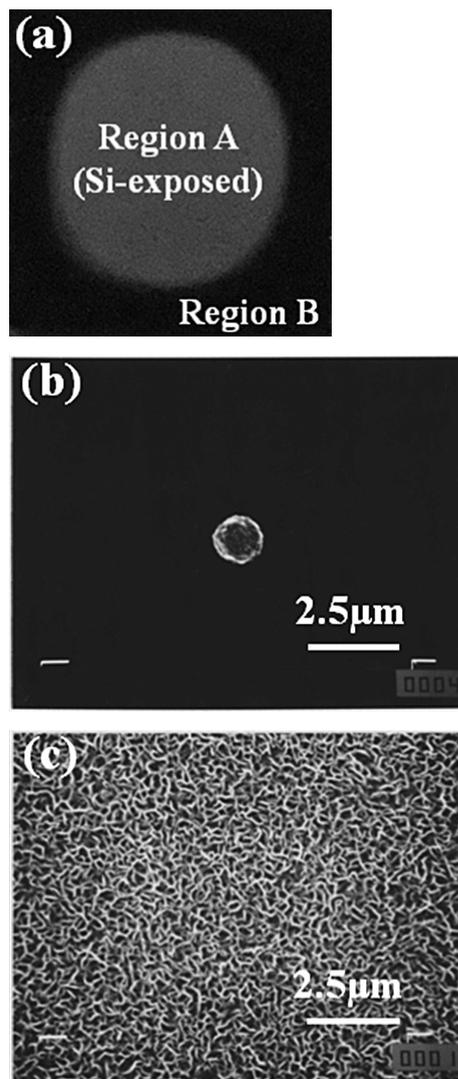


図 1. Fe を未注入の  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  基板上に MPCVD を 10 分行った試料の写真 (a) と SEM 像 (b),(c). (b) は試料中心付近 (Region A), (c) は試料外側付近 (Region B) のもの。

構造を形成し、これらを核に CNW へと成長したと考えられる。

図 2 に、基板温度  $600^\circ\text{C}$  で Fe イオンを  $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$  注入し、MPCVD を 10 分行った試料に対して撮影した写真 (a) と SEM 像 (b)(c) を示す。(b) は、Region A で示す中心付近、(c) は図 1(a) 中に白丸で示した Region A と B の境界付近を観測したものである。図 2(b) に示すように、中心付近は Si 基板がそ出しており、CMB が成長していることが分かる。これは、Fe の注入量が非常に少なかったため、未注入試料と同様に CMB の成長が促進されたと考える。また試料外側の Region B には CNW が観察された。一方、白丸で示した境界付近には、一部 CNT が観測された。

図 3 に、基板温度  $600^\circ\text{C}$  で Fe イオンを  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  注入し MPCVD を 10 分行った試料に対して撮

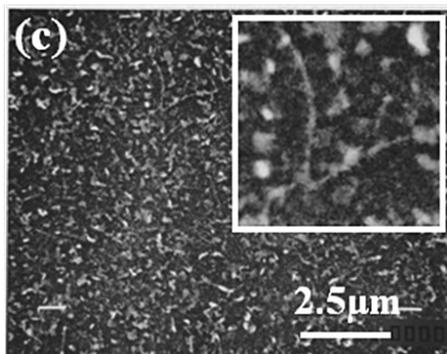
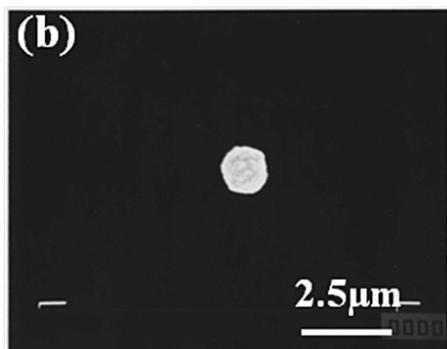
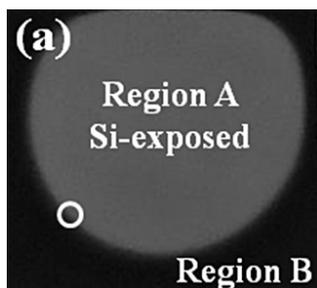


図2. 基板温度 600°C で Fe イオンを  $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$  注入し、MPCVD を 10 分実行した試料表面を撮影した写真 (a) と SEM 像 (b),(c). (b) は試料中心付近 (Region A), (c) は○で示す Region A と B の境界付近のもの。

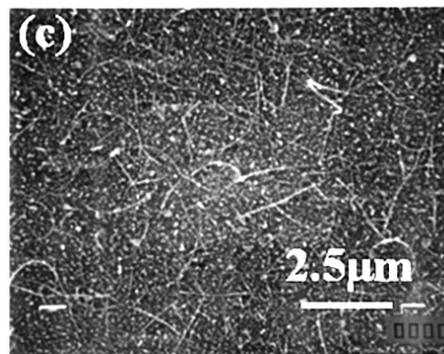
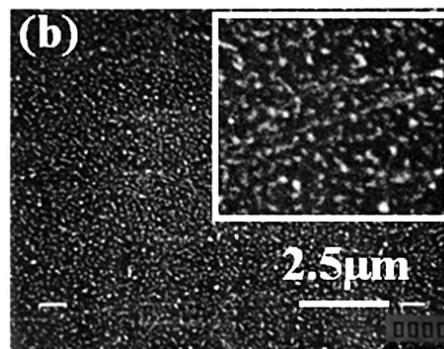
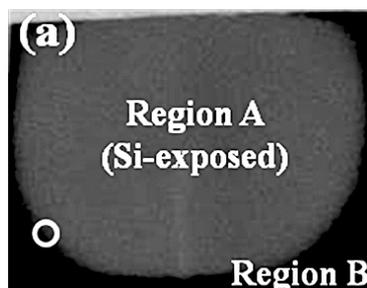


図3. 基板温度 600°C で Fe イオンを  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  注入し、MPCVD を 10 分実行した試料表面を撮影した写真 (a) と SEM 像 (b),(c). (b) は試料中心付近 (Region A), (c) は○で示す Region A と B の境界付近のもの。

影した写真 (a) と SEM 像 (b)(c) を示す。図2と同様に、(b) は Region A で示す中心付近、(c) は (a) 中に白丸で示した Region A と B の境界付近を観測したものである。試料外側の Region B には CNW が観察された。図3(b)に示すように、中心付近にはいくつかの CNT が観察されていることが分かる。一方、境界付近には、多量の CNT が成長した。CNT 形成密度の注入量依存性から、十分な CNT を形成するには  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  程度の注入量が必要であることが分かる。後に示すラザフォード後方散乱分析から、中心付近の  $\text{SiO}_2$  膜はすべてエッチングされ Si 表面が露出している。注入した Fe は、 $\text{SiO}_2$  表面付近に多く分布していることから、CVD 時間 (エッチング時間) が長すぎると判断し、MPCVD 時間の最適化を試みた。

図4に基板温度 600°C で Fe イオンを  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  注入し、MPCVD を 1 分実行した試料に対する SEM 像を示す。非常に多くの CNT が見られることが分かる。これらの CNT は、試料全面にわたって観察された。MPCVD 時間を短くしたことによって、Fe の注入深さ付近で  $\text{SiO}_2$  のエッチングが止まったためと考えられる。この試料に対して、任意に 7 点を選び測定した顕微ラマン分光スペクトルを図5に示す。(a) は Radial Breathing Mode (RBM)、(b) は G/D バンドのスペクトルである。励起光源としては、波長 532 nm のレーザを用いた。RBM は、SWCNT に特有に現れることから、SWCNT の存在を確認できる。また、ピーク波数は CNT 直径に対応している。この図から分かるように、いずれも場所も SWCNT が成長していること

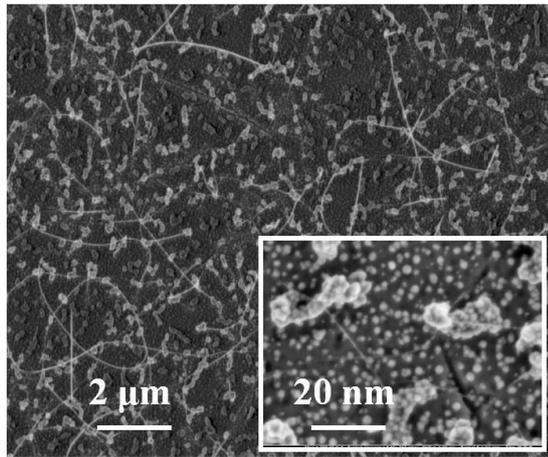


図4. 基板温度 600°C で Fe イオンを  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  注入し、MPCVD を 1 分実行した試料に対する SEM 像。

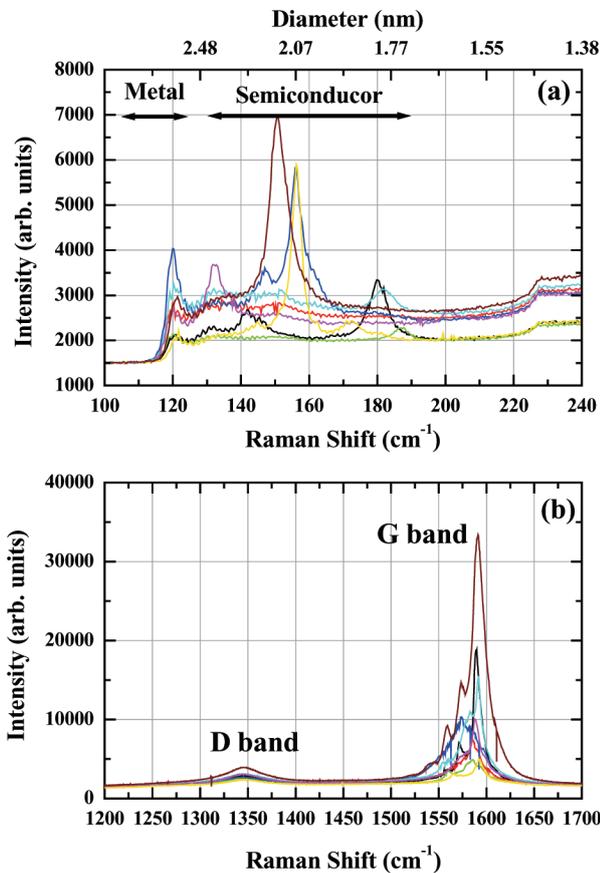


図5. 基板温度 600°C で Fe イオンを  $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$  注入し、MPCVD を 1 分実行した試料に対して、異なる 7 点の位置を測定した RBM モード (a) と G, D バンドの顕微ラマンスペクトル (b)。

が分かる。しかしながら、それらの直径は異なることからカイラリティは統一されていないと言える。Kataura プロットから見積もった半導体 CNT 領域は  $130 \sim 190 \text{ cm}^{-1}$  であることから、図 5(a) の共鳴ピークは半導体 CNT からのものであることが分かる<sup>5)</sup>。一方、図 5(b) に示す G バンドは、六員環の全対称フォノンモード励起によるラマンシフト、D

バンドは、欠陥構造を含む構造に起因したピークである。これらの比 (G/D 比) から CNT の品質を評価できる。今回観測された最大 G/D 比は約 6 となり、比較的質のよい SWCNT が形成されたことが分かる。

次に、CVD 時間を 3 分以上にすると、中心付近で観察される SWCNT の量は、減少していく傾向になった。このことから、プラズマにより一部の CNT も削られていくと思われる。

図 6 に RBS を用いて測定した、CVD 時間に依存した O および Fe の絶対量変化を示す。CVD 時間の増加に伴い  $\text{SiO}_2$  量は急激に減少し、約 5 分で消失した。一方、Fe は 10 分後でも約 65% が残存していることが分かる。このことから、プラズマにより  $\text{SiO}_2$  が優先的にエッチングされていると言える。高効率に CNT を成長させるには、Fe の飛程程度の深さで  $\text{SiO}_2$  のエッチングを止めることが望ましい。図 6(a) に示すように、1 分間の MPCVD では約 20 nm の  $\text{SiO}_2$  膜が削られることから、一番高密度に CNT が成長したと考えられる。

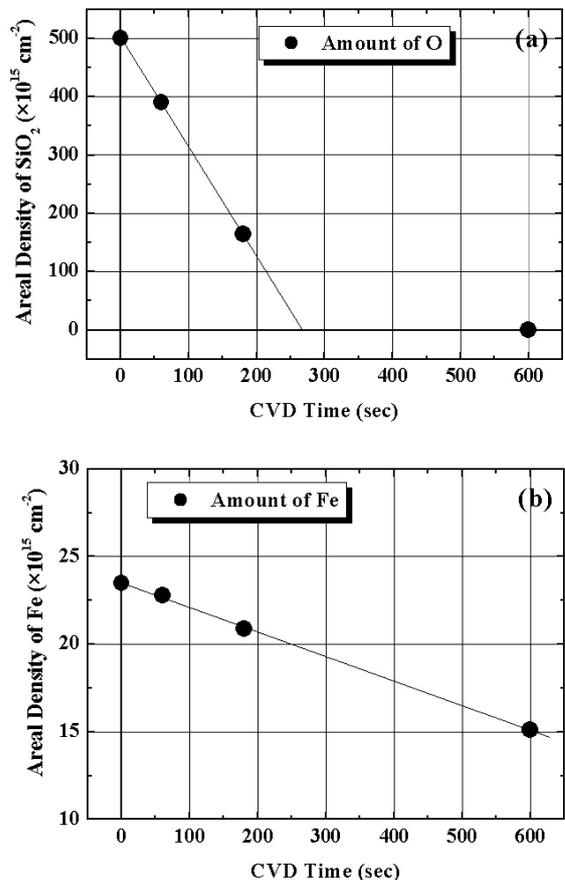


図6. CVD 時間に依存した  $\text{SiO}_2$  および Fe の絶対量変化。

## 結論

SiO<sub>2</sub>/Si 表面近傍への高温イオン注入法により形成した Fe 微粒子を種とし、MPCVD による CNT の成長制御を試みた。まず未注入の試料に対して MPCVD を行ったところ、試料内側には CMB、外側には CNW が観察された。一方、Fe 注入試料では、注入量に比例して生成される CNT 量も変化した。また CNT 生成量は、MPCVD 時間とも大きな相関があり、CVD 時間の最適化を行ったところ処理時間を 1 分とすることで SiO<sub>2</sub> のエッチングを抑え、高効率に CNT を成長させることができた。また、顕微ラマンスペクトルから、SWCNT が成長していることが分かった。

## 謝辞

本研究にあたり、情報科学科教員から多大な資金援助を受けました。この場を借りて、お礼申し上げます。

す。また本研究に携わった中田研究室の卒業生、大学院修了生に感謝いたします。

## 文献

- 1) Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**: 56-58.
- 2) Bethune DS, Klang CH, de Vries MS, Gorman G, Savoy R, Vazquez J and Beyers R (1993) Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* **363**: 605-607.
- 3) Saito R, Dresselhaus G and Dresselhaus MS (1998) *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. Imperial College Press, London.
- 4) Hoshino Y, Arima H, Saito Y and Nakata J (2010) A new growth procedure of carbon nanotubes from Fe nano-particles formed by hot-ion implantation. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **21**: 31-35.
- 5) Kataura H, Kumazawa Y, Maniwa Y, Umezumi I, Suzuki S, Ohtsuka Y and Achiba Y (1999) Optical properties of single-wall carbon nanotubes. *Synth. Met.* **103**: 2555-2558.



■原 著■

## 理科年表にある水蒸気 (100℃) の音速値の改訂

青木 孝<sup>1,2</sup>

A Revision of Vapor (100°C) Sound Velocity in Rika-Nenpyo

Takashi Aoki<sup>1,2</sup>

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

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

**Abstract:** An error on the value of the sound velocity in water vapor (100 °C) listed in Rika-Nenpyo was found by physical analysis. The revised value of the sound velocity in water vapor (100 °C) was derived to be 473 [m/s]. This new value is now accepted and listed in the latest issue of Rika-Nenpyo.

**Keywords:** sound velocity, vapor

### 序論

本論文では、報告者の指摘によって、丸善(株)が出版する「理科年表」中にある水蒸気(100℃)の音速データが、2009年度版から改訂された経緯について報告する。報告者は、物理学実験Ⅰの課題の1つ「音速の測定とリサージュ図形の観測」を担当している。この実験において、測定した音速  $v_\lambda$  と、良く知られた音速の理論式：

$$(0.1) C = 331.4 + 0.6 \cdot t \quad (\text{m/s}) \quad t: \text{温度} (\text{°C})$$

による音速値  $C$  との相対誤差を評価すると、この相対誤差は、経験上、前期(夏場)には大きく約2%となり、後期(冬場)には小さく約1%となるという傾向があり系統的な優位差が認められた。中田穰治教授(神奈川大学理学部)に相談したところ、音速の理論式(0.1)が乾燥空気で成り立つ式なので、前期(夏場)と後期(冬場)の湿度の影響で、理論式(0.1)の音速値  $C$  自体が真の音速値と違っているのではないかと指摘を受けた。その後、湿気によって音速は、乾燥空気の音速よりも速くなることが分かり、実験による音速測定値  $v_\lambda$  が理論式(0.1)の音速値  $C$  よりも、常に速いという実験事実もあった。かえって、実験による音速測定値  $v_\lambda$  が、理論値  $C$  よりも湿気を考慮した正確な音速値を与えているのではないかという認識に至り、夏場の湿度が高い時には理論値  $C$  との相対誤差が大きくなり、冬場の湿度が低い時には相対誤差が小さくなるという現象が理解できた。念のために、急に発達した低気圧が通過した前後のいわゆる「雨上がり晴れ」の一両日の湿度変

化によって、音速測定値が変わることも実験により確認し、湿度を考慮した理論式の解析から、音速への湿度の影響は通常で約0.5%程度であることも分かってきた<sup>1)</sup>(音速測定実験については付録1を参照のこと)。

報告者は、これらの物理学実験Ⅰの中で、音速と湿度の関係について論ずるため調べていくうちに、2005年頃から、丸善(株)が出版する「理科年表」物70(416)ページ表中の「気体中の音速データ」の一部について疑問を持った。同ページ表中には、Table 1のように記載があるが、報告者は、その水蒸気(100℃)の音速値：404.8(m/s)が、式(0.4)正值に対して2割程度小さいと考えた。

Table 1. Sound velocity in gas

物質	音速 $C$ / $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ (0 °C, 1atm)
空気(乾燥0 °C)	331.45 :妥当
水蒸気(100 °C)	404.8 :正值に対し2割程度小さい

From Rika-Nenpyou.

また、理科年表の同ページの項目(4)には、湿った空気中の音速  $C'$  として、

「気圧  $H$  の空気中に圧力  $P$  の水蒸気があるときの音速  $C'$  は、同温度の乾燥空気中の音速  $C$  から次の式で導かれる。

$$(0.2) C' = \frac{C}{\sqrt{1 - \frac{P}{H} \left( \frac{\gamma_v}{\gamma_d} - 0.622 \right)}} \quad (\text{理科年表})$$

$\gamma_v, \gamma_d$  は、それぞれ水蒸気および乾燥空気の定圧比熱  $C_P$  と定積比熱  $C_V$  との比。」

と書いてある。式 (0.2) で、水蒸気の圧力  $P$  は、

$$(0.3) \quad P = w \cdot P_s(T_c)$$

$w(0 \leq w \leq 1)$  : (相対)湿度,  
 $P_s(T_c)$  : 飽和水蒸気圧,  $T_c$  : 温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )

となる。

さらに、WEB版の理科年表プレミアム 2008(丸善)には、Table 2 のように書いてある。

Table 2. Rika-Nenpyou WEB data  $C_P(\text{J/K} \cdot \text{g})$ ,  $\gamma$

物質	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	$C_P$	比熱比 $\gamma$
空気 (乾燥)	20	1.006	1.403(= $\gamma_d$ )
水蒸気 (100 $^{\circ}\text{C}$ )	100	2.051	1.33(= $\gamma_v$ )

理想気体ならば  $C_P - C_V = R$  ( $R$  は気体定数) で、3 原子分子気体の水蒸気  $\text{H}_2\text{O}$  は、

$$C_V = 3R, C_P = 4R, \gamma_v \equiv \frac{C_P}{C_V} = \frac{4}{3} = 1.333$$

であるので、WEB版の理科年表の水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) の比熱比データ  $\gamma_v$ : 1.33 は、水蒸気を理想気体と考えて良いことを示す。さらに、理想気体において空気 (乾燥 20  $^{\circ}\text{C}$ ) の場合は、2 原子分子気体として、

$$C_V = \frac{5}{2}R, C_P = \frac{7}{2}R, \gamma_d \equiv \frac{C_P}{C_V} = \frac{7}{5} = 1.40$$

となるので、Table 2 の理科年表データから空気 (乾燥 20  $^{\circ}\text{C}$ ) も理想気体と考えて良いことが分かる。

理科年表の式 (0.2) において、乾燥空気中の音速  $C$  として、実は湿度 0 % で成り立つ (後節で示す) 良く知られた音速の理論近似式 (0.1) を使えば、

$T_c = 100(^{\circ}\text{C})$ 、気圧  $H = P$  の場合の水蒸気 100  $^{\circ}\text{C}$  の音速  $C'$  は、

$$(0.4) C' = \frac{391.4}{\sqrt{1 - \left(\frac{1.33}{1.403} - 0.622\right)}} = 476.7(\text{m/s})$$

ここで、 $391.4 = C = 331.4 + 0.6 \cdot 100$  (m/s) と計算できる。この理科年表の式 (0.4) で計算した湿った空気中すなわち水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) における音速が  $C' = 476.7(\text{m/s})$  という結果は、Table 1 に示す理科年表にある水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) の音速データ: 404.8(m/s) が、計算した音速  $C'$  よりも 2 割程度小さいことを示す。

このようなことより、報告者は、理科年表にある水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) の音速データが間違っているのではないかと考えるようになり、石岡俊也教授 (神奈川大学理学部) との討論およびご教授などを通じてそれを確信するに至った。そこで、報告者の指摘に同調してくださった中田穰治教授のお知り合いである小牧研一郎教授 (東京大学大学院総合文化研究科) を通して、理科年表の物理部監修である兵頭俊夫教授

(2008.8 月当時、東京大学大学院理学系研究科) に、2008 年 8 月になって問い合わせさせていただいた。

その結果、報告者の指摘が正しいことが確認され、理科年表 2009 年度版から、水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) の音速が 473(m/s) と改訂された。以降に順を追って、報告者が指摘した根拠を示していく。まず、良く知られた音速の理論式 (0.1) が、湿度 0 % として理想気体の混合ガス中の音速の一般式を近似して導出した式であることを示す。次に、理科年表の湿った空気中の音速  $C'$  の式 (0.2) もこの一般式の近似的表式であり、良い近似であることを示す。したがって、理科年表の式 (0.2) には正当性があり、乾燥空気では理科年表の音速データが良く合うにもかかわらず、水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) の理科年表の音速データは 2 割程度小さいことを問題にする。さらに、理想気体であると仮定した時に得られる諸数値と理科年表のデータを比較した場合に、乾燥空気の諸データは良く合うが、水蒸気 (100  $^{\circ}\text{C}$ ) の定圧比熱容量  $C_P$  の理科年表データは、理想気体モデル値に比べ 1 割程度も大きく、音速データに加え  $C_P$  も疑わしいことを指摘する。

## 方法

### 理想気体の音速の理論式

理科年表にある式 (0.2) の根拠は、次の理想気体解析式となっている。理想気体の混合ガス中の音速の一般式は (導出は付録 2 を参照のこと)、

$$v = \sqrt{\left(1 + \frac{1}{Q}\right) \frac{RT}{M}} = \sqrt{\left(1 + \frac{R}{C_V}\right) \frac{RT}{M}} = \sqrt{\gamma \frac{RT}{M}} \quad (1.1)$$

$T$ : 絶対温度 (=273.15+t( $^{\circ}\text{C}$ )) (K),

$R$ : 気体定数 8.3145 (J/K · mol),

$M$ : 1 モルの質量,  $Q \equiv C_V$  (定積モル比熱)/ $R$

また、 $\gamma \equiv 1 + \frac{1}{Q}$  とする。混合気体の場合、平均されるのは  $\gamma$  ではなく、 $Q$  である。

$i$  番目の気体のモル分率  $\equiv \alpha_i$  ( $\sum_i \alpha_i = 1$ ) とすると、

$$(1.2) \quad M = \sum_i \alpha_i M_i, \quad Q = \sum_i \alpha_i Q_i$$

( $M_i, Q_i$  は、 $i$  番目の気体の  $M$  と  $Q$ )

となる。理想気体の場合には混合気体であろうと、純粋気体であろうと、音速は、絶対温度  $T$ 、 $C_V$ 、モル当りの質量  $M$ 、気体定数  $R$  の 4 つによって決まり、圧力  $P$  の大きさに関係しない。通常、 $\gamma \equiv 1 + \frac{1}{Q}$  と定義し、理想気体の場合には  $C_P - C_V = R$  の関係から  $\gamma = 1 + \frac{R}{C_V} = \frac{C_P}{C_V}$  となる。

この理想気体の音速の一般式 (1.1) に基づき、理

科年表に記載のある水蒸気（100℃）の音速値および式(0.2)の検討を行なった。

**結果と討論**

**乾燥空気に対する音速の理論式**

温度 0℃で湿度 0%における乾燥空気に対しては、式(1.1)により、 $\gamma = \gamma_d = 1.403$ 、乾燥空気の分子量  $M$  として、 $M = 28.96(\text{g/mol})$  を入れ、温度  $T = T_0 = 273.15(\text{K})(0^\circ\text{C})$  とすると、このとき音速  $v_{0c}(\text{m/s})$  は、

$$v_{0c} = \sqrt{\frac{1.403 \times 8.3145 \times 273.15}{0.02896}} = 331.7 \approx 331.45 \tag{2.1}$$

となり、乾燥空気 (0℃) の理科年表データ: 331.45(m/s)(Table 1) とは 0.1% の誤差で妥当な結果となる。

さて、音速の一般式(1.1)から、

$$v_{0c} = \frac{v}{\sqrt{T_0}} = \frac{\sqrt{T}}{\sqrt{T_0}} = \frac{\sqrt{273.15 + t}}{\sqrt{273.15}} \tag{2.2}$$

となる。ここで  $t$  は温度 (°C) を表わす。これから、

$$v = v_{0c} \left(1 + \frac{t}{273.15}\right)^{\frac{1}{2}} \approx v_{0c} \left(1 + \frac{t}{546.3}\right) \tag{2.3}$$

となる。この  $v_{0c}$  に理科年表の乾燥空気 (0℃) の音速データ: 331.45(m/s) を代入すると、温度  $t(^\circ\text{C})$  における乾燥空気中 (湿度 0%) の音速は、

$$v = (331.4 + 0.6t) (\text{m/s}) \quad \left(\frac{v_{0c}}{546.3} = \frac{331.45}{546.3} = 0.6\right) \tag{2.4}$$

で与えられる。この式(2.4)は、良く知られた物理学実験 I で使っている式(0.1)と一致する。したがって、良く知られた音速の理論式(0.1)は、湿度 0% で成り立つ乾燥空気における音速の理論式であり、混合ガス中の音速の一般式(1.1)を温度  $t(^\circ\text{C})$  の一次までで近似して導出した式であることが分かる。そしてこの一般式(1.1)およびそれを近似した良く知られた理論式(0.1)は、理科年表の乾燥空気 0℃の音速データと良く一致する。

**理科年表の音速式(0.2)の導出**

理科年表にある湿った空気中の音速式(0.2)が、理想気体の混合ガス中の音速の一般式(1.1)を近似して変形した式であることを示す。

$$(2.5) \text{水蒸気} \text{のモル分率} \alpha \equiv \left(\frac{\text{水蒸気の分圧}}{\text{湿った空気の圧力}}\right) \\ \left(= \frac{P}{H} = \frac{w \cdot P_s(T_c)}{H}\right) : \text{式(0.3) 参照}$$

とすると、乾いた空気のモル分率は、 $1 - \alpha$  となる。

湿った空気の分子量  $M$  は、

$$(2.6) M = M_d(1 - \alpha) + M_v \alpha \quad (d: \text{dry}, v: \text{vapor})$$

となる。ここで、乾いた空気の分子量  $M_d = 28.96(\text{g/mol})$ 、水蒸気の分子量  $M_v = 18.015(\text{g/mol})$ 。湿った空気の比熱比  $\gamma$  を、

$$(2.7) \quad \gamma = \gamma_d(1 - \alpha) + \gamma_v \alpha$$

と仮定する。正しくは、

$$\gamma = 1 + \frac{1}{Q_d(1 - \alpha) + Q_v \alpha}, \quad Q_d = \frac{C_{Vd}}{R} = \frac{1}{\gamma_d - 1}, \tag{2.8}$$

$$Q_v = \frac{C_{Vv}}{R} = \frac{1}{\gamma_v - 1}$$

であるが、式(2.7)と式(2.8)の  $\gamma$  は、ほぼ等しい値となる。例えば  $\alpha = 0.0183(T_c = 22.5^\circ\text{C}, w = 0.68)$  の場合に、 $\gamma_d = 1.403$ ,  $\gamma_v = 1.33$  を使って、両者の違いは 0.02% である。

式(2.6)、(2.7)を使い、混合ガス中の音速の一般式(1.1)より、湿った空気中の音速  $C'$  は、

$$(2.9) \quad C' = \sqrt{(\gamma_d(1 - \alpha) + \gamma_v \alpha) \left(\frac{RT}{M_d(1 - \alpha) + M_v \alpha}\right)} \\ = \sqrt{\left(1 - \left(1 - \frac{\gamma_v}{\gamma_d}\right)\alpha\right) \cdot \left(\frac{1}{1 - \left(1 - \frac{M_v}{M_d}\right)\alpha}\right) \cdot \gamma_d \frac{RT}{M_d}} \\ = C \sqrt{\frac{1 - \left(1 - \frac{\gamma_v}{\gamma_d}\right)\alpha}{1 - \left(1 - \frac{M_v}{M_d}\right)\alpha}}, \quad C = \sqrt{\gamma_d \frac{RT}{M_d}} : \text{乾燥空気の音速} \\ \frac{\gamma_v}{\gamma_d} = 0.948, \quad \frac{M_v}{M_d} = 0.622$$

となる。式(2.9)の  $\sqrt{\cdot}$  の中の逆数を  $\alpha$  について 1 次までとり近似し、その逆数を戻すと、

$$(2.10) \quad C' \approx \frac{C}{\sqrt{1 - \alpha \left(\frac{\gamma_v}{\gamma_d} - \frac{M_v}{M_d}\right)}} \\ C' \approx \frac{C}{\sqrt{1 - \frac{P}{H} \left(\frac{\gamma_v}{\gamma_d} - 0.622\right)}}$$

となり、理科年表の式(0.2)と一致する。

さらにつきつめて言えば、理科年表の音速式(0.2)は、水蒸気のモル分率が  $\alpha (= \frac{P}{H} = \frac{w \cdot P_s(T_c)}{H})$ ;  $0 \leq \alpha \leq 1$  の時の音速値を  $C(\alpha) (= C')$  として、乾燥空気中すなわち湿度  $w = 0$  (よって  $\alpha = 0$ ) の時の音速値  $C(0) (= C)$  との、同じ温度  $T_c(^\circ\text{C})$  における比:  $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$  の簡便な近似的表式(次式)を書いたものを見ることが出来る。

$$\frac{C(\alpha)}{C(0)} = \frac{1}{\sqrt{1 - \alpha \left( \frac{\gamma_v}{\gamma_d} - 0.622 \right)}} = \frac{C'}{C}$$

そこで、近似のチェックをするために、理科年表の式(0.2)より計算した、

$\alpha = 0.1, 0.5, 1.0$  の時の  $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$  値と、  
 $\gamma = \gamma_d(1 - \alpha) + \gamma_v\alpha$  ( $\gamma_d=1.403, \gamma_v=1.33$ )、 $M = M_d(1 - \alpha) + M_v\alpha$  として、理想気体モデルでの厳密式である音速の一般式(1.1)より計算した  $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$  値を比較すれば、Table 3 となる。

Table 3. Comparison of  $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$  ratio for vapor: $\alpha$

$\alpha$	年表式(0.2): $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$	一般式(1.1): $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$	誤差
0.1	1.017	1.017	0.0%
0.5	1.093	1.096	0.3%
1.0	1.218	1.235	1.4%

Table 3 から、 $\frac{C(\alpha)}{C(0)}$  比に対して、理科年表の式(0.2)は充分良い近似的表式であることが分かる。

このように、理科年表の式(0.2)と混合ガス中の音速の一般式(1.1)は、同等であることが分かる。音速の一般式(1.1)によれば、水蒸気(100℃)の音速  $v$ (m/s) は、

$$(2.11) v = \sqrt{\frac{1.33 \times 8.3145 \times 373.15}{0.018015}} = 478.6$$

となり、この一般式(1.1)を近似して変形した理科年表の式(0.2)から求めた水蒸気(100℃)の音速値(式(0.4)):476.7(m/s)と0.4%の相対誤差で当然ながら一致する。したがって、理科年表式(0.2)を使い水蒸気(100℃)の条件で計算した音速値は信頼できると考えるが、同条件の下での理科年表のデータ:404.8(m/s)は、2割程度小さい数値になっており、疑わしい。以上を整理すればTable 4となる。

Table 4. Values of sound velocity(m/s) at 1 atm

温度(℃)	年表値	式(0.2)	誤差	式(1.1)
0(乾燥空気)	331.45	331.4	0.0%	331.7
100(水蒸気)	404.8	476.7	17.8%	478.6

乾燥空気(0℃)では、理科年表データが一般式(1.1)による計算値と良く一致するにもかかわらず、水蒸気(100℃)においては、理科年表データと理科年表の音速式(0.2)の計算値が17.8%も違う。

### 理科年表の定圧比熱容量 $C_P$

Table 2 の理科年表の定圧比熱容量  $C_P$  データ(J/K·g)に、それぞれ分子量  $M$  を掛け、モル当たりの  $C_P$  値(J/K·mol)に直すと、

$$\text{乾燥空気 (20℃) で、} 1.006 \times 28.96 =$$

$$29.13 \text{ (J/K} \cdot \text{mol)}$$

$$\text{水蒸気 (100℃) で、} 2.051 \times 18.015 = 36.95 \text{ (J/K} \cdot \text{mol)}$$

となる。

乾燥空気(20℃)の  $C_P$  の理想気体理論値は  $\frac{7}{2}R = 29.10$ (J/K·mol)で、理科年表データ:29.13と比較すると0.1%の誤差で一致し妥当である。一方、水蒸気(100℃)の  $C_P$  の理想気体理論値は  $4R = 33.26$ (J/K·mol)で、理科年表データ:36.95と比較すると、理科年表データが1割程度も大きい。

Table 5. Evaluation of  $C_P$ (J/K·mol) by 2 types

ガス(℃)	年表 $C_P$	理想気体	誤差	$C_P: \frac{\gamma R}{\gamma - 1}$
乾燥空気(20)	29.13	29.10	0.1%	28.95
水蒸気(100)	36.95	33.26	11.1%	33.51

さらに、理想気体の比熱比  $\gamma$  の定義から、気体定数  $R$ 、 $\gamma$  値(Table 2)を使い  $C_P$  を求めると、

$$(2.12) C_P = \frac{\gamma R}{\gamma - 1}, \quad (\gamma \equiv \frac{C_P}{C_P - R})$$

となる。この計算値は、

$$\text{乾燥空気 (20℃) で、} C_P = 28.95 = \frac{1.403 \cdot 8.3145}{1.403 - 1} \text{ (J/K} \cdot \text{mol)}$$

$$\text{水蒸気 (100℃) で、} C_P = 33.51 = \frac{1.33 \cdot 8.3145}{1.33 - 1} \text{ (J/K} \cdot \text{mol)}$$

となり、先の  $C_P$  理想気体理論値との比較の場合同様、乾燥空気(20℃)の理科年表データとの比較は妥当であるが、水蒸気(100℃)の理科年表データとの比較は、やはり理科年表データが1割程度大きいという同じ傾向を持つ(Table 5)。

以上、乾燥空気に関する理科年表データ:音速値(0℃)、 $C_P$  値(20℃)については妥当な値であるにもかかわらず、水蒸気(100℃)に関する理科年表データについては、音速値で約2割小さく、 $C_P$  値で約1割大きくなっておりかえって疑わしい。

### 水蒸気の数値と年表データ

水蒸気(100℃)が理想気体であると仮定した時に得られる諸数値(物理量)と理科年表データを比較して、その諸数値の真偽を検討した。

(1) 密度(100℃,1atm)

理想気体では、 $\rho = \frac{M}{V} = \frac{MP}{RT} = \frac{18.015 \cdot 1.013 \cdot 10^2}{8.3145 \cdot 373.15} = 0.5882$ (kg/m<sup>3</sup>)となる。理科年表のデータは、0.5980(kg/m<sup>3</sup>)で1.6%の誤差となり、妥当である。

(2) 比熱比( $\gamma_v$ )

理想気体では、定圧比熱  $C_P=4R$ 、定積比熱  $C_V=3R$  なので、比熱比  $\gamma_v = \frac{C_P}{C_V} = 1.333$  となり、

理科年表データ 1.33 とは一致する。

(3) 定積比熱  $C_V(3R)$

比熱比  $\gamma_v$  の定義から、 $C_V = \frac{R}{\gamma_v - 1}$  となり、 $\gamma_v = 1.33$ (理科年表) を使うと、 $C_V = \frac{8.3145}{1.33 - 1} = 25.20(\text{J/K} \cdot \text{mol}) = 3.03R$  となる。この値は理想気体値の  $3R$  と比較して、誤差が 1.0 % で妥当である。

(4) 定圧比熱  $C_P(4R)$

比熱比  $\gamma_v$  の定義から、 $C_P = \frac{\gamma_v R}{\gamma_v - 1}$  となり、 $\gamma_v = 1.33$ (理科年表) を使うと、 $C_P = 33.51(\text{J/K} \cdot \text{mol}) = 4.03R$  となる。理想気体では  $4R$  となるので、この値は 0.8 % の誤差で一致し妥当である。しかし、理科年表データは、 $C_P = 2.051 \times 18.015 = 36.95(\text{J/K} \cdot \text{mol})$  であり、先の  $C_P = 33.51(\text{J/K} \cdot \text{mol})$  に比べ理科年表データは 10.3 % (約 1 割) 大きい。理想気体値  $4R$  と比べると 11.1 % 違う。

(5) 水蒸気 (100℃) の音速値

理想気体の音速の一般式 (1.1) の近似が、理科年表の式 (0.2) および式 (0.1) となっており、両者は同等であることが分かる。例えば、水蒸気 (100℃) では、

$$\text{式 (1.1)} = 478.6(\text{m/s}) \quad \text{式 (2.11)}$$

$$\text{式 (0.2) および式 (0.1)} = 476.7(\text{m/s}) \quad \text{式 (0.4)}$$

で、0.4 % の誤差で一致する。このように理科年表の式 (0.2) で計算した音速値は信頼できると考えるが、同条件下の理科年表データは 404.8(m/s) と約 2 割も小さい。

(6) 文献<sup>2)</sup>による水蒸気 (134℃) の音速値

文献<sup>2)</sup> 日本物理学会編 (2006) 物理データ事典. 朝倉書店, 東京.  
に、水蒸気 407.15K(134℃) の音速値として、494(m/s) が載っている。この水蒸気 134℃ の音速を、理想気体の一般式 (1.1) で計算すれば、

$$v(134^\circ\text{C}) = \sqrt{1.33 \cdot \frac{8.3145 \cdot 407.15}{0.018015}} = 499.9(\text{m/s})$$

となり、物理データ事典<sup>2)</sup>の数値と 1.2 % の誤差で一致し妥当だと言える。一方、同じ水蒸気 407.15K(134℃) の音速値を、式 (1.1) の近似式である理科年表の式 (0.2) および式 (0.1) で計算すれば、

$$C = 331.4 + 0.6 \cdot 134 = 411.8 \quad (\text{m/s})$$

$$C' = \frac{411.8}{\sqrt{1 - \left(\frac{1.33}{1.403} - 0.622\right)}} = 501.6 \quad (\text{m/s})$$

となり、これも 1.5 % の誤差で妥当である。

以上まとめると、Table 6 となる。Table 6 の年表データ欄において、年表データ  $\gamma_v$  値から間接的に求めた  $C_V$  値については [ ] 付きにしてある。それ以

外は、直接的なデータ表記がある。これら比熱比  $\gamma_v$  データ等から見ても水蒸気は理想気体モデルとかなり良く一致を考えると考えられるのに、特に、水蒸気 (100℃) における理科年表データの  $C_P$  値は約 1 割大きく、同じく音速値は約 2 割小さく疑わしいという結論になる。

Table 6. Typical physical values in vapor(1 atm)

数値	年表データ	理想気体	誤差
密度 (100℃)	0.5980(kg/m <sup>3</sup> )	0.5882	1.6%
$\gamma_v(100^\circ\text{C})$	1.33	1.333	0.0%
$C_V(100^\circ\text{C})$	[25.20](J/K · mol)	24.94	[1.0%]
$C_P(100^\circ\text{C})$	36.95(J/K · mol)	33.26	11.1%
音速 $v(100^\circ\text{C})$	404.8(m/s)	478.6	18.2%
音速 $v(134^\circ\text{C})$	494(m/s) <sup>2)</sup>	499.9	1.2%

問い合わせた疑問点とその根拠

理科年表物理部監修の兵頭俊夫教授に問い合わせた疑問点とその根拠は、次の 2 点である。

1. 乾燥空気も水蒸気も、比熱比  $\gamma$  の理科年表データから理想気体と見なせる。理科年表の式 (0.2) と良く知られた湿度 0 % で成り立つ理論式 (0.1) は、理想気体の混合ガス中の音速一般式 (1.1) の近似的表式であり、良い近似になっている。また、文献<sup>2)</sup>「物理データ事典 (2006). 朝倉書店」にある水蒸気 134℃ の音速値データ : 494(m/s) と、一般式 (1.1) から計算した音速値は 1 % の誤差で一致する。  
この一般式 (1.1) から計算した乾燥空気 0℃ の音速値は、理科年表データと良く一致するが、水蒸気 100℃ の音速値については、理科年表データ : 404.8(m/s) が一般式 (1.1) の計算値より約 2 割も小さく疑わしい。
2. 乾燥空気 (20℃) における定圧比熱  $C_P$  の理科年表データは、理想気体理論値と良く一致するが、水蒸気 (100℃) における  $C_P$  の理科年表データ : 2.051(J/K · g) は、理想気体理論値と比べ約 1 割大きく疑わしい。

兵頭俊夫教授からの御回答

兵頭俊夫教授から、2008 年 8 月 26 日付けで「100℃の水蒸気の音速と定圧比熱について」と題して次に示す御回答をいただいた。

1. まず確定しているパラメータは、 $R = 8.3145(\text{J/K} \cdot \text{mol})$ 、水の分子量  $M = 18.015$ 、100℃の水蒸気の密度 = 0.5980(kg/m<sup>3</sup>)(理科年表データ) である。

2. 100℃の水蒸気の音速の実測値は、CRC ハンドブックによれば、473(m/s)。AIP のハンドブックにも、134℃の水蒸気の音速が 494(m/s) と出ており、そのデータから 100℃の水蒸気の音速を、 $(494 - 0.6 \times 34) \text{℃}$  と計算しても同じ 473(m/s) になる。この値は、下に述べるように比熱の実測値とコンシステントなので、理科年表の値 404.8(m/s) は間違いと言ってよい。

3. 次に 100℃の水蒸気の定圧比熱  $C_P$  は、M.Kaufman:Principles of Thermodynamics に引用されている、M.James, Mary P.Lord: Index of Chemical and Physical Data の内挿式により、

$$C_P = 30.45 + 0.01029 \times 373 = 34.37(\text{J/K} \cdot \text{mol}) \quad (2.13)$$

$= 1.91(\text{J/K} \cdot \text{g}) = 4.134R$   
である。よって理科年表 2002 年版まで掲載されていた実測値：

$$C_P = 2.051(\text{J/K} \cdot \text{g}) = 2.051 \times 18.015 \quad (2.14)$$

$= 36.95(\text{J/K} \cdot \text{mol}) = 4.444R$   
は間違いと言ってよい。

式 (2.13) から、理想気体に対して成り立つ、

$$(2.15) \quad C_P - C_V = R$$

を用いて、

$$C_V = C_P - R = 3.134R, \text{よって}, \gamma = \frac{C_P}{C_V} = 1.319$$

と計算できる。よって理科年表 2002 年版まで掲載されていた  $\gamma=1.33$  も微妙に違う。

4. 水蒸気が  $C_V = 3R, \gamma = 1.33$  でないのは以下の理由による。単原子分子、2 原子分子、多原子分子でそれぞれ  $C_V = \frac{3}{2}R, \frac{5}{2}R, 3R$  になるのは並進エネルギーと回転エネルギーを考えた場合である。しかし、2 原子分子、多原子分子では室温ですでに振動エネルギーも励起されはじめており、従って実際の  $C_V$  はこれより大きくなる。なお式 (2.15) は並進エネルギーだけが関与する関係式なので、その場合でも理想気体を仮定すれば成り立つ。このため、 $\gamma$  もそれぞれ 1.4, 1.33 より小さくなるのが普通。

5. この結果を使い、理想気体の混合ガス中の音速の一般式 (1.1) から、100℃の水蒸気の音速 (m/s) を計算すれば、

$$v = \sqrt{\gamma \frac{RT}{M}} = \sqrt{\frac{1.319 \times 8.315 \times 373.15}{18.015 \times 10^{-3}}} = 477 \quad (2.16)$$

となり、この値は、実測値 473(m/s) と 1% 以内で一致する。

6. 結論として、理科年表の水蒸気 100℃の音

速 404.8(m/s) と定圧比熱  $C_P=2.051(\text{J/K} \cdot \text{g})$  (現在の冊子体には不掲載) は、誤った値である。それぞれ、音速  $v=473(\text{m/s})$ 、 $C_P=34.37(\text{J/K} \cdot \text{mol})=1.91(\text{J/K} \cdot \text{g})$  が正しい。(以上)

## まとめ

結論として、報告者の指摘どおり、理科年表の水蒸気 100℃の音速と定圧比熱  $C_P$  (現在の冊子体には不掲載) は、Table 7 のように、それぞれ正しい値に、理科年表の平成 21 年版から訂正された。

報告者が高校時代に使った文献<sup>3)</sup>の物理参考書の「音波の速さ」(p342)という表で、水蒸気(100℃)の音速値に 404.8(m/s)のデータが使われている。おそらく理科年表のデータを転載したものと思われるので、少なくとも 35 年前から誤ったデータが掲載されていたと考えられる。

Table 7. Values of result in vapor(100℃,1 atm)

水蒸気(100℃)	誤	正
音速 $v$	404.8(m/s)	473(m/s)
定圧比熱 $C_P$	2.051(J/K·g)	1.91(J/K·g)

## 謝辞

以上について結論を得るのに石岡俊也名誉教授から多くの助言をいただいた。また、中田穰治教授には相談ののっていただき目的を達成することができた。神奈川大学理学部の木村敬准教授ならびに本田充彦助教にも貴重なご意見をいただいた。それによりこの論文が完成できたことに感謝したい。さらに、報告者の恩師である村田健郎教授(神奈川大学理学部)が 2009 年 7 月 27 日に逝去された。実は、その前年の 12 月に村田教授から自宅へ電話があり、理科年表の水蒸気(100℃)の音速値が報告者の指摘通りに改訂になったことを褒めていただいた。それが村田教授のお声を聞いた最後となった。この場をお借りして御冥福をお祈りする。

## 文献

- 1) 青木孝(2005) 物理学実験 I 実習書「音速と湿度の関係について」.
- 2) 日本物理学会編(2006) 物理データ事典. 朝倉書店, 東京.
- 3) 砂川重信(1975) 精講物理. 学生社, 東京. pp.342-344.
- 4) 松平升, 大槻義彦, 和田正信(1975) 理工教養 物理学 I. 培風館, 東京. pp.157-161

## 付録 1

### 音速測定実験の手順と解析

この実験において音速の測定は、直線スケール上に配置したチタン酸バリウム磁器円板のスピーカーから、指定した周波数  $f$ (kHz) の超音波を出し、スピーカーと距離  $x$ (cm) 離れた同円板のマイクロホンで受音する実験装置において次のように行なう。

1. 固定したスピーカーに対して、徐々にマイクロホンとの距離  $x$ (cm) を遠ざけながら、オシロスコープを使いちょうどスピーカーとマイクロホンの両波形の位相がそろった時の距離  $x$  を測定し、さらにマイクロホンを遠ざけながらその測定  $(n, x)$  を  $n$  周期分繰り返す。
2. 横軸に周期の繰り返し回数  $n$  を取り、縦軸には距離  $x$  を取り、測定点  $(n, x)$  をプロットし、直線の傾きが波長  $\lambda$  を表わすグラフ  $(x = \lambda n)$  を作る。最小自乗法により回帰直線の傾きを求め、音の波長  $\lambda$  の測定値とする。
3. 指定した周波数  $f$  と波長測定値  $\lambda$  の積  $(f \cdot \lambda)$  から音速を計算し、実験で得た音速測定値  $v_\lambda$ (m/s) とする。

この測定した音速値  $v_\lambda$  に対して、良く知られた湿度 0% で成り立つ理論式 (0.1) による音速値  $v_0 (= C)$  と、湿度を考慮した理想気体の一般式 (1.1) による理論音速値  $v_v$  との相対誤差をそれぞれ求め、音速への湿度の影響を見る。

式の上で、湿度の影響は、湿度を考慮した理論音速値  $v_v$  を計算する際に、式 (1.1) の分母の分子量  $M$  の中に入る。湿気を含む空気の分子量は、乾燥空気に比べて軽いので、式 (1.1) から理論的に音速は湿気によって速くなる。

相対湿度が  $s$  % の場合には、温度  $t$  °C での飽和水蒸気圧を  $P_h$ (atm) とすると、混合気体の水蒸気分圧は、 $\frac{s}{100} \cdot P_h$  (これは相対湿度の定義) となるので、空気に対する 1(atm) 下での分子量  $M$  は、

$$(A.1.1) \quad M = 28.96 \times \left(1 - \frac{s \cdot P_h}{100}\right) + 18.015 \times \left(\frac{s \cdot P_h}{100}\right)$$

と計算できる。また、式 (A.1.1) における  $P_h$ (atm) の近似式はいくつかあるが、物理学実験 I では  $t$  を温度 (°C) として、Tetens(1930) の式：

$$(A.1.2) \quad P_h = \frac{6.11 \times 10^{\left(\frac{7.54}{t+237.3}\right)}}{1013.25} \quad (\text{atm})$$

を使っており、常温ではかなり良く合う。実例として、「音速の測定」実験で、測定値  $v_\lambda$  と理論値  $v_0 (= 331.4 + 0.6t)$  との相対誤差が 2.0% と一番大きかった 7 月のデータ：温度  $(t)$  22.5(°C)、湿度  $(s)$  68% の場合には、式 (A.1.1) の分子量  $M$  は、式 (A.1.2) から  $P_h=0.02691$ (atm) なので、

$M = 28.96 \times (1 - 0.01830) + 18.015 \times (0.01830) = 28.76$  となる。この分子量  $M$  を使い、7 月のデータにおいては、次のような音速値の結果を得る。

実験測定値  $v_\lambda=352.1$ (m/s) [1.0]

式 (0.1) 湿度 0% の理論値  $v_0=344.9$ (m/s) [2.0%]

式 (1.1) 湿度入りの理論値  $v_v=346.9$ (m/s) [1.5%]

これらから、湿度 0% の理論値  $v_0$  と実験測定値  $v_\lambda$  との相対誤差 2.0% が、湿度を考慮することによって理論値  $v_v$  と実験測定値  $v_\lambda$  との相対誤差が 1.5% に縮むことが分かる。この縮んだ相対誤差の 0.5% が、音速に与える湿度の影響であるとおおまかに考えられる。

次に実験例として、この 7 月の例も含めた四季の 4 例を示す。4 例はすべて晴れの日を選び気圧 1(atm) と考え、それぞれに対し、実験測定値  $v_\lambda$  と湿度 0% の理論値  $v_0$  の相対誤差： $Er_{\lambda,0}$ 、同様に  $v_\lambda$  と湿度を考慮した理論値  $v_v$  の相対誤差： $Er_{\lambda,v}$  を見る。

(a) 7 月晴れ：気温  $(t)$  22.5 °C、湿度  $(s)$  68 %

(b) 11 月晴れ：気温  $(t)$  14.0 °C、湿度  $(s)$  44 %

(c) 3 月 14 日 午後急な低気圧が通る前の晴れ：気温  $(t)$  14.5 °C、湿度  $(s)$  53.2 %

(d) 3 月 15 日 翌日雨上がり晴れ：気温  $(t)$  16.0 °C、湿度  $(s)$  77.8 %

この 4 例の実験値を Table A.1 に示す。

Table A.1.  $v_\lambda, v_0, v_v$ (m/s) at each month

月, $t$ (°C), $s$ (%)	$v_\lambda$	$v_0$	$Er_{\lambda,0}$	$v_v$	$Er_{\lambda,v}$
3/14, 14.5, 53.2	344.0	340.1	1.1%	341.6	0.7%
7, 22.5, 68.0	352.1	344.9	2.0%	346.9	1.5%
11, 14.0, 44.0	343.4	339.8	1.0%	341.1	0.7%
3/14, 14.5, 53.2	344.0	340.1	1.1%	341.6	0.7%
3/15, 16.0, 77.8	346.2	341.0	1.5%	342.8	1.0%

Table A.1 において、(c),(a),(b) 例は、湿度が高い夏場には音速が速くなり、実験測定値  $v_\lambda$  と湿度 0% の理論値  $v_0$  の相対誤差： $Er_{\lambda,0}$  が大きく、湿度が低い冬場には、その相対誤差が小さくなるという傾向を典型的に示す代表例となっており、それは理屈にあう。この 3 例を、湿度を考慮した理論値  $v_v$  と実験測定値  $v_\lambda$  との相対誤差： $Er_{\lambda,v}$  で見直すと相対誤差は縮まり季節変動が少なくなり、安定したほぼ一定の 1% 前後になる。物理学実験 I で配布する文献<sup>1)</sup>「音速と湿度の関係について」という資料には、毎月の実験データから、年間を通じた湿度  $s$  と実験測定値  $v_\lambda$  と各理論音速値  $v_0, v_v$  の推移がグラフで示してあり、それらの音速値と湿度の相関および相対誤差の値は理屈を裏付ける。ここでは Fig.A.1 に、グラフのみを示すに留める。横軸は月 (1 ~ 12) で、

上からグラフは、実験で測定した音速値  $v_\lambda$ 、一般式 (1.1) で計算した音速値  $v_v$ 、湿度 0% で成り立つ良く知られる音速値  $v_0$ 、湿度 ( $s(\%) + 260$ ) の順である。また Table A.1 における 3月14日、翌15日の、急に低気圧が通る前と、通った後の雨上がり晴れの翌日の2実験データは、この年間の季節変動が一両日にかけて起き、それを観測した例で湿度による音速の変化が良く現れている。

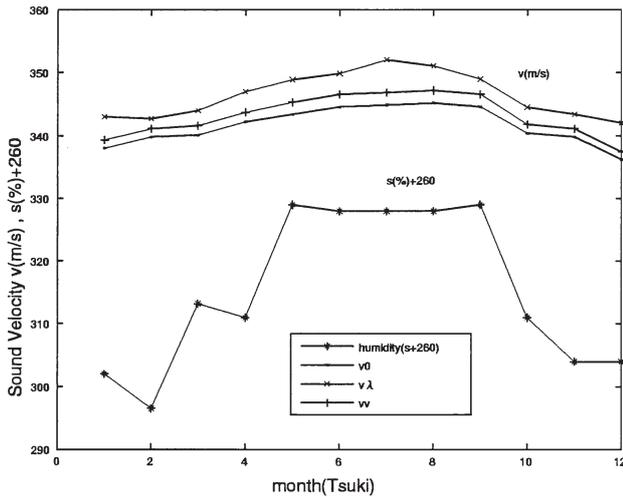


Fig.A.1.  $v_\lambda, v_0, v_v$  (m/s),  $s(\%) + 260$  at each month.

## 付録2

### 音速の一般式(1.1)の導出

理想気体の混合ガスの音速の一般式 (1.1) の導出を行なう。

(1) 断熱変化の時の  $P - V$  関係は、

熱力学第1法則 (エネルギー保存則) から、

$$(A.2.1) \quad dU = TdS - PdV$$

$U$ : 内部エネルギー,  $S$ : エントロピー

$$(A.2.2) \quad \text{理想気体から} \quad dU = C_V dT$$

また、理想気体 ( $PV = RT$ ) から、

$$(A.2.3) \quad RdT = PdV + VdP$$

$$(A.2.4) \quad \text{断熱変化から} \quad dS = 0$$

よって、式 (A.2.1)(A.2.2)(A.2.3)(A.2.4) から、

$$C_V PdV + C_V VdP - RPdV = 0$$

$$\therefore \left(1 + \frac{R}{C_V}\right) PdV = -VdP$$

$$(A.2.5) \quad V^{(1+\frac{R}{C_V})} \cdot P = \text{一定}$$

となる。

(2) 波動方程式

体積の歪みが媒質の密度変化を起こし、それが圧力変化を生み、媒質内の粒子に振動を与え、次々と遠くの粒子に振動が伝播していく。 $x$  方向に進む平面波を仮定し、ガス分子のマクロな変位を  $(l(x, t), 0, 0)$  とすると運動方程式は、

$$(A.2.6) \quad \rho \frac{\partial^2 l}{\partial t^2} = -\frac{\partial P}{\partial x}$$

となる。式 (A.2.5) を微分して、

$$V^{(1+\frac{R}{C_V})} dP + \left(1 + \frac{R}{C_V}\right) V^{\frac{R}{C_V}} PdV = 0$$

$$\therefore dP = -\left(1 + \frac{R}{C_V}\right) \frac{P}{V} dV$$

ここで、 $V(x, t) = V + V \left(\frac{\partial l(x, t)}{\partial x}\right)$  なので、

$$dV = V \left(\frac{\partial^2 l}{\partial x^2}\right) dx \text{ となり、よって、}$$

$$(A.2.7) \quad dP = -\left(1 + \frac{R}{C_V}\right) P \left(\frac{\partial^2 l}{\partial x^2}\right) dx$$

となる。式 (A.2.7) を式 (A.2.6) に代入して、

$$(A.2.8) \quad \frac{\partial^2 l}{\partial t^2} = \left(1 + \frac{R}{C_V}\right) \frac{P}{\rho} \frac{\partial^2 l}{\partial x^2}$$

この式 (A.2.8) に、 $\frac{P}{\rho} = \frac{VP}{M} = \frac{RT}{M}$  を使って、

$$(A.2.9) \quad \therefore \frac{\partial^2 l}{\partial t^2} = \left(1 + \frac{R}{C_V}\right) \frac{RT}{M} \frac{\partial^2 l}{\partial x^2}$$

式 (A.2.9) は、波動方程式であり、音速  $v$  は、理想気体で振動中の体積変化が断熱変化の時には、

$$(A.2.10) \quad \therefore v = \sqrt{\left(1 + \frac{R}{C_V}\right) \frac{RT}{M}}$$

と書け、式 (A.2.10) は、音速の一般式 (1.1) となる。

■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 高い結晶性と純度を有する多孔性“貴金属”錯体の新合成法

松永 諭<sup>1,2</sup> 狭田謙一<sup>1</sup> 杉浦健志<sup>1</sup> 森 和亮<sup>1</sup>

High Crystallinity Rh-Based Metal-Organic Frameworks:  
[Rh<sub>2</sub>M<sub>2</sub>(BDC)<sub>4</sub>] (M = Cu, Zn)

Satoshi Matsunaga<sup>1,2</sup>, Ken-ichi Hasada<sup>1</sup>, Kenji Sugiura<sup>1</sup> and Wasuke Mori<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** We successfully synthesized high crystallinity Rh-based metal-organic frameworks (MOFs), {[Rh<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>][Cu<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>]}·4DMF (RhCu-DMF), {[Rh<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>][Zn<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>]}·3.8DMF (RhZn-DMF), and {[Rh<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>][Cu<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>]}·EtOH·2H<sub>2</sub>O (RhCu-EtOH), by assembly of discrete paddlewheel rhodium terephthalate (4) and Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> ions. We report these structures and their gas adsorption properties. RhCu-DMF, RhZn-DMF were synthesized by the reaction of 4 with Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O or Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in DMF at 60°C for 2 h, and RhCu-EtOH was synthesized by solvothermal reaction of 4 with Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O in EtOH at 100 °C for 40 h. Elemental analysis data showed that rhodium and copper (or zinc) existed in a 1 : 1 mole ratio in these compounds. It is most likely that two types of paddlewheel cluster, *i.e.*, Rh<sub>2</sub> and Cu<sub>2</sub>/Zn<sub>2</sub> units, alternately form vertices of a 2D square grid. X-ray powder diffraction (XRPD) data showed RhCu-DMF and RhZn-DMF to be isotopic with the structure of [Cu<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>] before desolvation. RhCu-EtOH was isotopic with that of [Cu<sub>2</sub>(BDC)<sub>2</sub>] re-solvated with EtOH. Although the reported Rh-based MOFs showed no diffraction pattern due to its low crystallinity, these three complexes show a sharp XRPD pattern. The N<sub>2</sub> adsorption isotherms of RhCu-DMF, RhZn-DMF, and RhCu-EtOH revealed type I behavior, indicating the retention of microporous structures after removal of the solvent molecules from the channels.

**Keywords:** microporous complex, noble metal, coordination chemistry, metal-organic frameworks

### 序論

古くから様々な多孔性材料が知られ利用されてきた。これらはゼオライト、活性炭、メソポーラスシリカなど工業的にも不可欠な物質群を形成している。近年、新たな多孔性材料として、金属イオンと有機配位子から構成される多孔性金属錯体が高い注目を集めている。これは、有機配位子の「柱」が金属イオン（もしくはクラスター）からなる「節」に連結された多次元格子構造であり、その多くは配位結合を駆動力とし組み上げられている。多孔性金属錯体は、高い設計性・規則性、大きな比表面積が特徴的であり、従来の多孔性材料とは一線を画す魅力的な物質群と言え、気体吸蔵物質、不均一触媒、分子ふるい、特異な反応場など、多方面への応用が期

待されている<sup>1)</sup>。特に多孔性金属錯体は、構成金属原子の1個1個が触媒の活性点として機能すると考えられ、大きな表面積と相まって高い触媒活性が期待される。また、高い設計性に導かれた細孔サイズ・形状の制御による反応選択性など、不均一触媒としてのポテンシャルは極めて高い。

しかし、多孔性金属錯体は世界中で研究が行われているものの、その多くは天然ガスや水素ガスの貯蔵に焦点が向いており、不均一触媒を志向した研究は意外なことに多くない。これはゼオライトなど従来の多孔性物質が、産業的にも極めて重要な不均一触媒と位置づけられていることと対照的である。その一因として、Zn<sup>2+</sup>やCu<sup>2+</sup>などの構成金属を用

いていることが挙げられる。これらは配位置換活性であるため、結晶性が高く、均一で高純度の多孔性金属錯体が得られる利点を有する。一方で、触媒活性はルイス酸触媒としての報告例がほとんどである。構成金属に貴金属 (Rh, Ru, Pd, Pt 等) を用いることができれば、多様な触媒反応に応用できると考えられる。実際に、これまで我々のグループでは、paddle-wheel 型ロジウム二核錯体を節金属に用いた多孔性金属錯体の合成と各種触媒能について報告している。配位子にテレフタル酸 ( $H_2BDC$ ) や金属ポルフィリン (TCPP) を用いた  $[Rh_2(BDC)_2]$  および  $[Rh_2(MTCPP)]$  ( $M = H_2, Cu, Ni, Pd$ ) では、オレフィンの水素化反応<sup>2)</sup> や水の可視光還元による水素発生反応<sup>3)</sup> を報告している。しかし、これら多孔性ロジウム錯体は結晶性が著しく低く、粉末 X 線回折測定で有意なピークが得られないため、構造の同定が困難である。さらに、その合成は高温 ( $> 160^\circ C$ ) を必要とし、分解による金属ロジウムの生成が避けられない。そのため、触媒反応に用いた際、多孔性金属錯体の節部分であるロジウム二核錯体の活性なのか、分解生成物である金属ロジウムの活性なのか判断が難しく、詳細な触媒研究を行う上で致命的である。

従来のテレフタル酸 ( $H_2BDC$ ) を用いた多孔性ロジウム錯体  $[Rh_2(BDC)_2]$  の合成は、テレフタル酸と酢酸ロジウムとを直接配位子交換させる方法を用いていた (図 1)。しかしこの方法では、paddle-

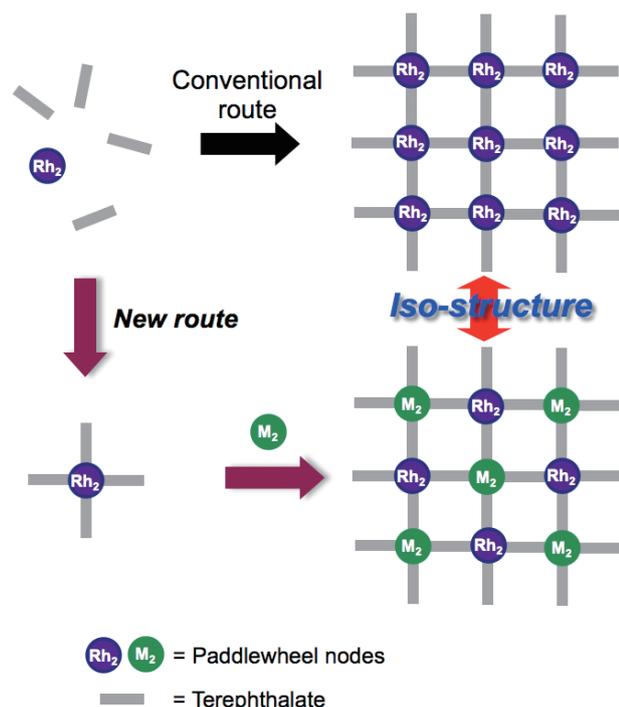


図 1. 多孔性ロジウム錯体の合成法概念図.

wheel 型  $Rh_2$  ユニットが置換不活性であるため、効率よく配位子交換が行われず、前述の問題が発生する。そこで本研究では、これらの問題を解決するため、ディスクリートな paddle-wheel 型  $Rh_2$  テレフタル酸錯体を予め合成し、それを置換活性な  $Cu^{2+}$  や  $Zn^{2+}$  イオンで集積化させるという新しい方法を開発した (図 1)。これにより、Rh と Cu (もしくは Zn) の Paddle-wheel ユニットが 1 : 1 で存在する  $\{[Rh_2(BDC)_2][M_2(BDC)_2]\}_n$  Sovent ( $M = Cu, Zn$ ) の合成に成功した。これらの錯体は、貴金属 Rh を節金属に含みながらも高い結晶性を有し、金属ロジウムの混入も抑制することができた。ここでは、それらの合成と構造と  $N_2$  吸着特性を報告する。

## 材料と方法

### 材料

合成に用いたテレフタル酸クロリド (和光純薬)、2-(trimethylsilyl)ethanol (Aldrich)、Tetrabutylammonium fluoride (TBAF; Aldrich)、酢酸ロジウム二水和物 (和光純薬)、硝酸銅三水和物 (和光純薬)、硝酸亜鉛六水和物 (和光純薬) は、購入後に精製はおこなわずそのまま使用した。

### 方法

図 2 のスキームに従い合成をおこなった。市販のテレフタル酸クロリドから出発し、4 段階の合成ステップを経てディスクリートなテレフタル酸ロジウム錯体 (4) へと導いた。4 を配位子として  $Cu^{2+}$  および  $Zn^{2+}$  と反応させることで、目的の多孔性金属錯体を得た。テトラエステルロジウム二核錯体 (3) の合成はアルゴン雰囲気下、それ以外の合成は、大気雰囲気下合成をおこなった。

$^1H$  NMR (400 MHz) は JEOL JNM-EX 400 を用いて測定した。CHN 元素分析は Perkin-Elmer 2400 CHNS Elemental Analyzer II を用いておこなった。FT-IR スペクトルは Jasco 4100 FT-IR spectrometer を用い KBr 法により測定した。TG/DTA は Rigaku 社製 Thermo Plus 2 series TG/DTA TG 8120 により測定した。 $N_2$  等温吸着曲線は島津製作所製 ASAP2010 を用いて 77 K にて測定をおこなった。比表面積は、77 K における  $N_2$  等温吸着曲線を用いて Langmuir および Brunauer-Emmett-Teller (BET) 法によって算出した。

## 結果と討論

### 合成

本方法の鍵反応となるのは、ディスクリートなテレフタル酸ロジウム二核錯体 4 の合成である。4 を合

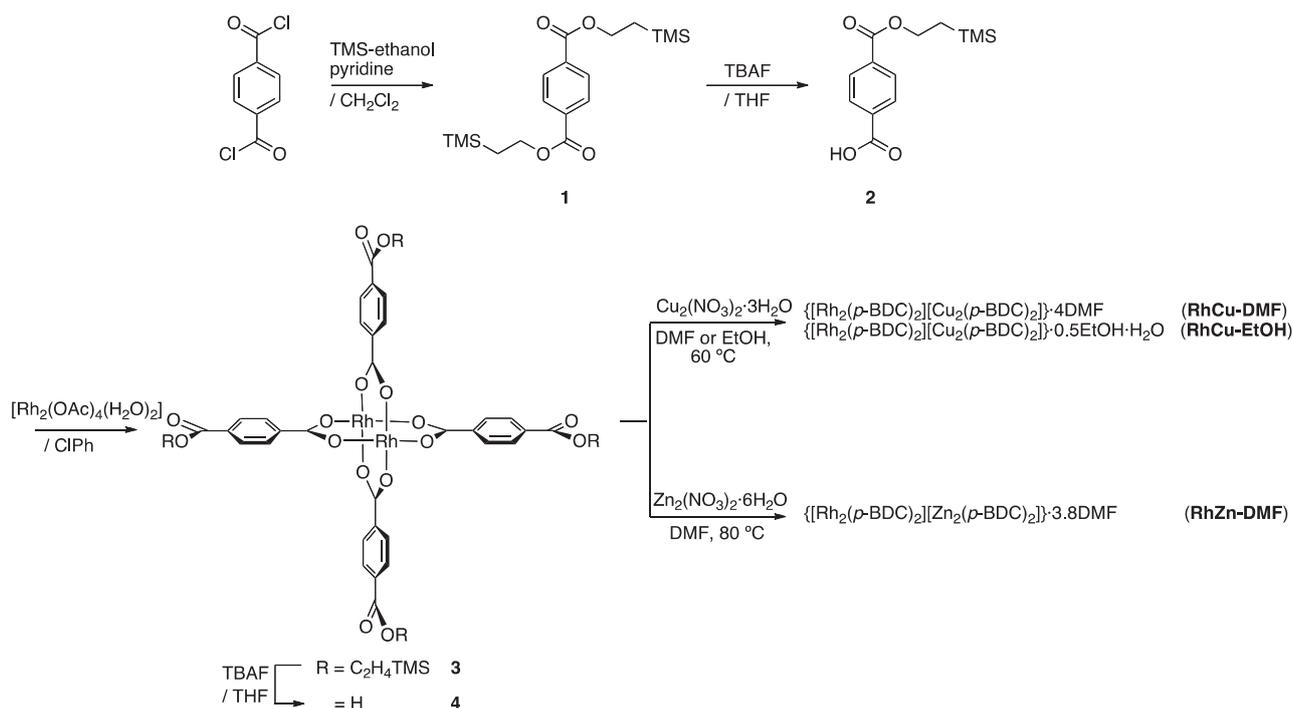


図 2. 合成スキーム.

成するためには、テレフタル酸の持つ2つのカルボン酸の一方を酢酸ロジウムと配位子交換しないようエステルで保護する必要がある (図 2)。また、脱エステル化の際に、ロジウム二核錯体を壊すことなく穏やかな条件で反応が進行するよう注意深くエステルを選択する必要がある。我々は、フッ化物イオン存在下、 $\beta$  解離反応を経てカルボン酸を与える 2-(トリメチルシリル) エチルエステルを保護基として採用した。テレフタル酸クロリドと 2-(トリメチルシリル) エタノールからジエステル体 1 を合成し、これに 1 当量の TBAF を作用させることで、片側のみ脱エステル化した 2 を導いた<sup>4)</sup>。2 と酢酸ロジウム二水和物との配位子交換により、テトラエステルロジウム二核錯体 3 を合成した。これに TBAF を作用させることで脱エステル化を行い、ディスクリートなテレフタル酸ロジウム二核錯体 4 を合成した。当初、カルボン酸の保護基としてメチルエステルを用い、酸や塩基による加水分解により 4 を合成することを試みたが、ロジウム二核錯体の分解がおり、目的とする 4 は得られなかった。次に 4 を配位子として用い、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  もしくは  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と DMF 中で  $60^\circ\text{C}$ 、2 時間反応させることで、多孔性金属錯体  $\{\text{[Rh}_2(\text{BDC})_2\text{]}\text{[Cu}_2(\text{BDC})_2\text{]}\} \cdot 4\text{DMF}$  (RhCu-DMF) と  $\{\text{[Rh}_2(\text{BDC})_2\text{]}\text{[Zn}_2(\text{BDC})_2\text{]}\} \cdot 3.8\text{DMF}$  (RhZn-DMF) を青緑色粉末としてそれぞれ得ることに成功した。また、溶媒にエタノールを用いて、4 と  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  をオートクレーブ中  $100^\circ\text{C}$ 、40

時間反応させることで  $\{\text{[Rh}_2(\text{BDC})_2\text{]}\text{[Cu}_2(\text{BDC})_2\text{]}\} \cdot \text{EtOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (RhZn-EtOH) を青緑色粉末として得た。従来の方法では、酢酸ロジウムとテレフタル酸から集積体  $[\text{Rh}_2(\text{BDC})_2]_n$  を合成するためには  $160^\circ\text{C}$  以上で反応させる必要があり<sup>3)</sup>、本方法の反応温度 ( $60 \sim 100^\circ\text{C}$ ) では酢酸ロジウム上の配位子交換反応が起こらず多孔性金属錯体の粉末試料が得られない。本方法では、置換活性な  $\text{Cu}^{2+}$  や  $\text{Zn}^{2+}$  のカルボン酸との反応を集積化に用いているため、従来に比べ低い温度での反応が可能となった。これにより、従来法では不純物として必ず混入してしまう金属ロジウムの生成が抑えられ、純度の高い多孔性ロジウム錯体を得ることに成功した。

### 構造および $\text{N}_2$ 吸着特性

従来の多孔性ロジウム錯体は、粉末 X 線回折測定 (XRPD) において極めてブロードなピークのみを与える。これは結晶性が悪く、長距離秩序が失われていることを示している。そのため、構造の同定が困難であり、既報のテレフタル酸ロジウムは推定構造のみを報告している<sup>3)</sup>。一方で、今回合成した RhCu-DMF、RhZn-DMF、RhCu-EtOH は、明確なピークを観測することが出来、高い結晶性を有していることが明らかとなった (図 3)。RhCu-DMF と RhZn-DMF は良く似た回折ピークを与え、同構造であった。その構造は単結晶構造解析が報告されている  $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$  の DMF 中にて合成した直後の

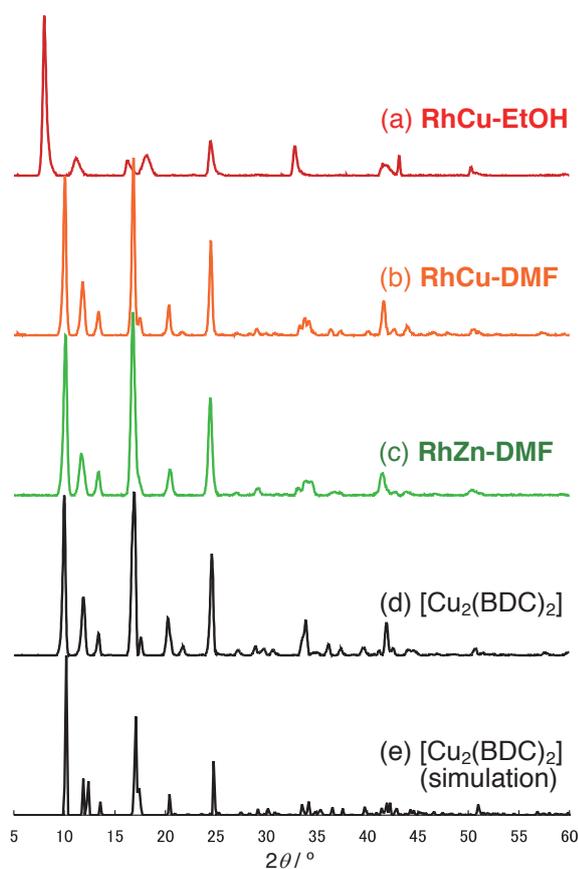


図3. 粉末X線回折パターン. (a) RhCu-EtOH (b) RhCu-DMF (c) RhZn-DMF (d)  $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$ <sup>5)</sup> (e)  $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$  の結晶構造からシミュレーション<sup>5)</sup>.

XRPD パターンおよび単結晶構造解析の結果からシミュレートされたパターンと良く一致していた<sup>5)</sup>。これにより、Rh 及び Cu 二核ユニットを節、テレフタレートを架橋配位子とした二次元シート構造を有し、それらが積み重なった一次元カラム細孔を有する構造であることが明らかとなった。一方、EtOH で合成した RhCu-EtOH は、 $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$  を EtOH に浸漬した後の XRPD パターン<sup>5)</sup> と一致しており、同構造であることが分かった。ピークがややブロードしており、ルーズな構造である点も同様であった。いずれの錯体も、従来法で合成したテレフタル酸ロジウム  $[\text{Rh}_2(\text{BDC})_2]$  などの多孔性ロジウム錯体によく見られる  $2\theta = 41^\circ, 48^\circ$  付近の金属ロジウム由来の回折ピーク<sup>6)</sup> は観測されなかった。

RhCu-DMF、RhCu-EtOH、RhZn-DMF の CHN 元素分析及び ICP 発光分析の結果はいずれも、Rh と Cu (もしくは Zn) が 1:1 で存在して

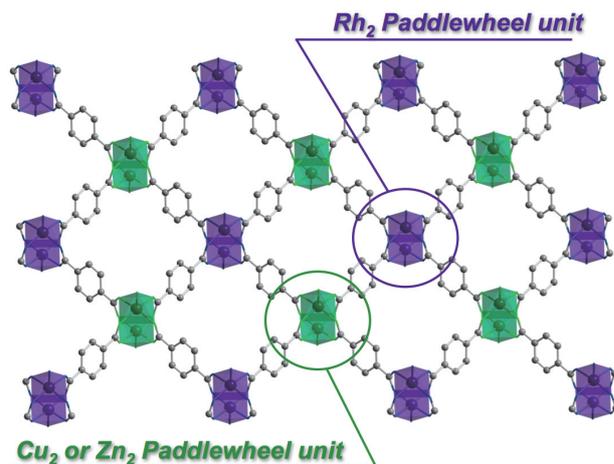


図4. 本錯体の推定構造.

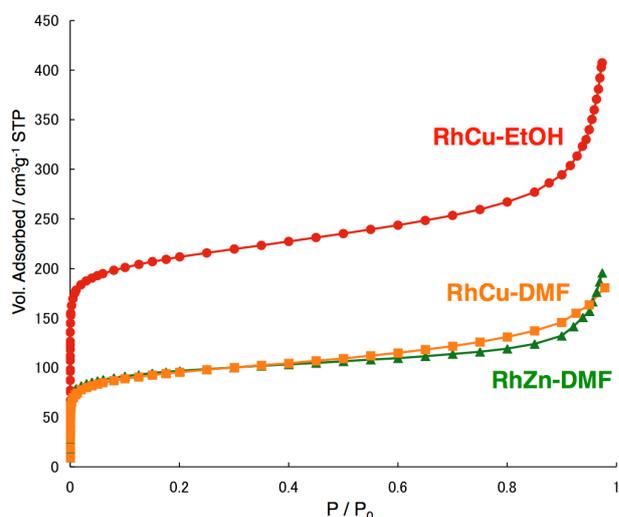


図5.  $\text{N}_2$  等温吸着測定 (77K).

いることを支持している。また、既報のテレフタル酸ロジウムは、高温 ( $> 160^\circ\text{C}$ ) でのみ合成可能であり、本方法で用いた  $60 \sim 100^\circ\text{C}$  の条件では Rh 二核錯体上の配位子交換が起こらないため、多孔性金属錯体の粉末は得られない。これらは、Rh と Cu (もしくは Zn) からなる paddle-wheel ユニットが、スクランブリングすることなく、二次元グリッド構造の頂点上に規則正しく交互に存在していることを示唆している (図4)。

#### 77 K における $\text{N}_2$ 等温吸着測定

RhCu-DMF、RhCu-EtOH、RhZn-DMF の 77K における  $\text{N}_2$  吸着測定を行った (図5)。測定前処理として、RhCu-DMF は THF に数日浸した後室温で5時間真空乾燥を行った。RhCu-EtOH は室温で5時間真空乾燥を行った。RhCu-DMF、RhCu-EtOH、RhZn-DMF の BET 表面積は、それぞれ 297,

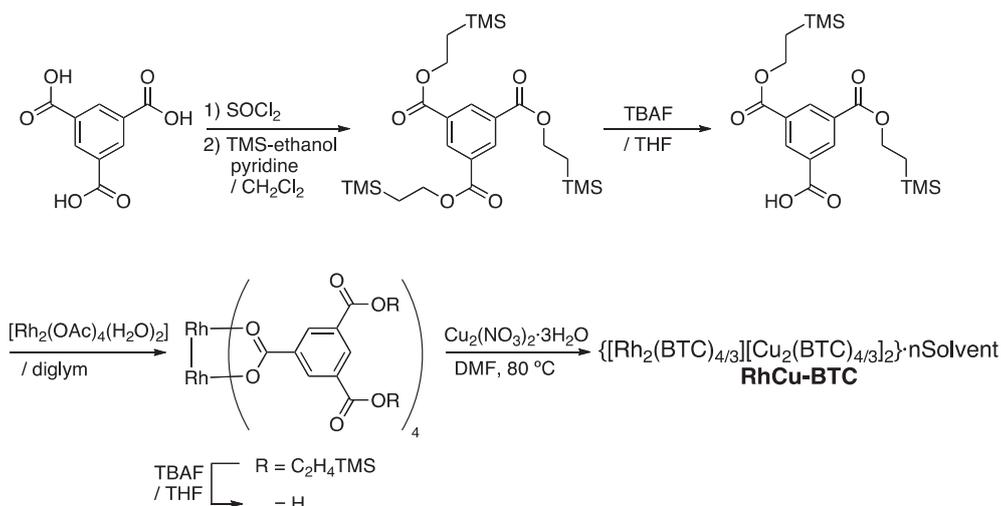


図 6. BTC を配位子とする RhCu-BTC の合成.

649, 297  $\text{m}^2/\text{g}$  であり、EtOH で合成をおこなった RhCu-EtOH が最も高い表面積を示した。DMF で合成した RhCu-DMF と RhZn-DMF は、RhCu-EtOH よりも低い比表面積を示したが、これは細孔内に充填された DMF を効率よく除去できなかつたためと考えられる。既報の  $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$  は、メタノールで合成した時が 545  $\text{m}^2/\text{g}$ <sup>7)</sup>、DMF で合成した時が 625  $\text{m}^2/\text{g}$ <sup>5)</sup> と報告されている。今回 DMF で合成した 2 つの多孔性金属錯体はこれらの約半分であるが、ゲスト溶媒を除去しても細孔が安定に存在していることが明らかとなった。これは、本方法では  $\text{Cu}^{2+}$  のみからなる安定な多孔性金属錯体  $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$  の部分構造を切り出した様なロジウム錯体 4 をビルディングブロックに用いているため、安定な細孔を持つことで知られる  $[\text{Cu}_2(\text{BDC})_2]$  と同構造の集積体を構築出来るためである。安定な細孔の存在は、気体吸蔵のみならず気相系での触媒には必要不可欠な条件であるため、本方法による貴金属導入は極めて有用であるといえる。

#### その他の multi-カルボン酸配位子への適用

本方法はロジウムを含む多孔性金属錯体を合成する新手法として有望であると考えられるが、本手法の一般性を評価するためにテレフタル酸以外の配位子にも適用を試みた。トリメシン酸 ( $\text{H}_3\text{BTC}$ ) は、ベンゼン環の 1, 3, 5 位に 3 つのカルボン酸を有した multi-カルボン酸配位子 (図 6) で、様々な金属と多孔性金属錯体を形成することで知られている。特に HKUST-1 と呼ばれる錯体  $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2]$  は、高い比表面積と大きな細孔径、また高い安定性から極めて重要な多孔性金属錯体の一つとして

知られている<sup>8)</sup>。HKUST-1 は、BTC のカルボン酸と  $\text{Cu}^{2+}$  イオンが、paddle-wheel 型ユニットを形成して連結した三次元構造体であり、Paddle-wheel 型 Cu ユニットの axial 位が細孔内に露出した open metal sites (OMSs) を形成している。本手法により paddle-wheel 型  $\text{Cu}_2$  ユニットの Rh<sub>2</sub> ユニットの置き換えることで、触媒活性を有する Rh<sub>2</sub> ユニットの OMSs として利用することが可能となる。 $\text{H}_3\text{BTC}$  の 3 つのカルボン酸のうち、一つだけフリーのカルボン酸、もう二つは TMS エチルエステルとした配位子を合成し、これを酢酸ロジウムとの配位子交換、続いて TBAF による脱エステル化をおこない、ディスクリートなトリメシン酸ロジウム錯体  $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{BTC})_4]$  を導いた。これを配位子として酢酸銅と 80 °C で反応させることで、青緑色粉末  $\{[\text{Rh}_2(\text{BTC})_{4/3}][\text{Cu}_2(\text{BTC})_{4/3}]_2\} \cdot n\text{Solvent}$  (RhCu-BTC) を得ることができた。トリメシン酸を配位子とした場合、 $\text{Rh}_2 : \text{Cu}_2 = 1 : 2$  となることが推定され、ICP 発光分析の結果はこれを支持していた。粉末 X 線回折の結果 (図 7)、Rh のみで構成される  $[\text{Rh}_2(\text{BTC})_{4/3}]$  とは異なり明確なピークを与えた。また、 $\text{Cu}^{2+}$  のみで構成される既報の HKUST-1 の XRPD パターンや単結晶構造解析の結果からシュミレートされたパターンと良く一致していることから、HKUST-1 と同構造であることが明らかとなった。現時点では分解物である酸化銅由来の回折ピーク ( $2\theta = 36^\circ$ ) も観測されていることから、合成条件の最適化が必要であるが、HKUST-1 と同様に高い表面積と大きな細孔径を有しているロジウム含有多孔性金属錯体の合成に成功した。

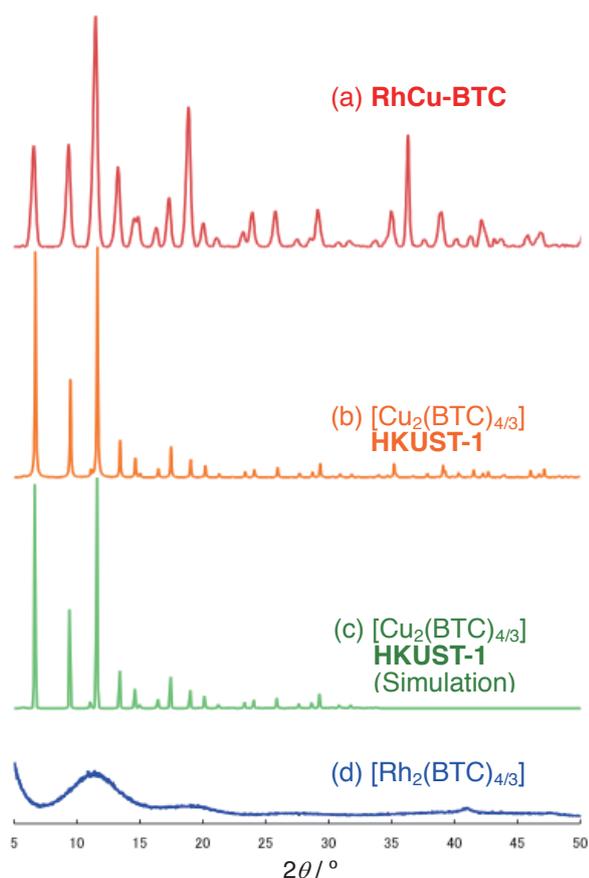


図7. 粉末X線回折パターン。(a) RhCu-BTC (b)  $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2]$  HKUST-1 (c)  $[\text{Cu}_3(\text{BTC})_2]$  HKUST-1 の結晶構造からのシミュレーション<sup>8)</sup> (d)  $[\text{Rh}_3(\text{BTC})_2]$ 。

### まとめ

我々はディスクリートなカルボン酸ロジウム錯体4をビルディングブロックに用いて、結晶性と純度の高い貴金属多孔性ロジウム錯体の合成に成功した。この方法により、従来困難であった構造の同定と不純物である金属ロジウムの混入抑制に成功した。また、多孔性金属錯体の配位子として汎用される様々な multi-カルボン酸配位子に適用可能であることも明らかとなった。これは本方法を用いることで、高い比表面積を有することが既に報告されているカルボン酸多孔性金属錯体の構造を変えることなく貴金属化することが可能であり、触媒機能を付加することが出来ることを示唆している。また、本方法は、比較的置換不活性な金属に応用可能であり、貴金属

として Ru、Mo、W 等、卑金属として Cr、Co、Ni 等様々な組み合わせも可能と考えられ、今後更なる展開が期待される。

### 謝辞

ICP 発光分析を測定いただきました神奈川大学理学部化学科西本右子教授にこの場をお借りして感謝いたします。また本研究は、2010年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「均一な細孔を持つ多孔性ロジウム錯体を用いた高活性水素化触媒の探索」のもとにおこなわれました。

### 文献

- 1) Mori W, Sato T, Ohmura T, Kato CN and Takei T (2005) Functional microporous materials of metal carboxylate: Gas-occlusion properties and catalytic activities. *J. Solid State Chem.* **178**: 2555–2573.
- 2) Sato T, Mori W, Kato CN, Yanaoka E, Kuribayashi T, Ohtera R and Shiraishi Y (2005) Novel microporous rhodium(II) carboxylate polymer complexes containing metalloporphyrin: syntheses and catalytic performances in hydrogenation of olefins. *J. Catal.* **232**: 186-198.
- 3) Kataoka Y, Sato K, Miyazaki Y, Suzuki Y, Tanaka H, Kitagawa Y, Kawakami T, Okumura M and Mori W (2010) Photocatalytic hydrogen production from water using heterogeneous two-dimensional rhodium coordination polymer  $[\text{Rh}_2(p\text{-BDC})_2]_n$ . *Chem. Lett.* **39**: 358-359.
- 4) Barrett AGM, Hamprecht D, James RA, Ohkubo M, Procopiou PA, Toledo MA, White AJP and Williams DJ (2001) Synthesis and characterization of coronanes: multicyclopropane-fused macrocyclic arrays. *J. Org. Chem.* **66**: 2187-2196.
- 5) Carson CG, Hardcastle K, Schwartz J, Liu X, Hoffmann C, Gerhardt RA and Tannenbaum R (2009) Synthesis and structure characterization of copper terephthalate metal-organic frameworks. *Eur. J. Inorg. Chem.*: 2338-2343.
- 6) JCPDS Card No. 5-0685
- 7) Seki K, Takamizawa S and Mori W (2001) Characterization of microporous copper(II) dicarboxylates (fumarate, terephthalate, and *trans*-1,4-cyclohexanedicarboxylate) by gas adsorption. *Chem. Lett.* **30**: 122-123.
- 8) Chui SS-Y, Lo SM-F, Charmant JPH, Orpen AG and Williams ID (1999) A chemically functionalizable nanoporous material  $[\text{Cu}_3(\text{TMA})_2(\text{H}_2\text{O})_3]_n$ . *Science* **283**: 1148-1150.

■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 広い抗菌活性スペクトルを示すヒスチジン銀 (I) 錯体の合成、 構造と投与後のバクテリアの電子顕微鏡観察

力石紀子<sup>1</sup> 野宮健司<sup>1,4</sup> 高木由貴<sup>1</sup> 吉田拓也<sup>1</sup> 吉川理絵<sup>1</sup> 伊能小百合<sup>1</sup>  
鈴木季直<sup>2</sup> 早津 学<sup>2</sup> 井上和仁<sup>2</sup> 北島正治<sup>2</sup> 川上洋司<sup>3</sup>

Synthesis and Structure of Silver (I) Histidates Showing a Wide Spectrum  
of Antimicrobial Activities Against Bacteria. TEM Observation of Bacteria  
Before and After Administration of the Silver (I) Complex

Noriko Chikaraishi Kasuga<sup>1</sup>, Kenji Nomiya<sup>1,4</sup>, Yoshitaka Takagi<sup>1</sup>, Takuya Yosida<sup>1</sup>,  
Rie Yoshikawa<sup>1</sup>, Sayuri Iyoku<sup>1</sup>, Suechika Suzuki<sup>2</sup>, Manabu Hayatsu<sup>2</sup>,  
Kazuhito Inoue<sup>2</sup>, Masaharu Kitashima<sup>2</sup> and Hiroshi Kawakami<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Faculty 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> Graduate School of Engineering, Osaka City University, Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan

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

**Abstract:** Silver (I) histidates are very unique silver (I) complexes obtained by the reaction of silver oxide and histidines (H<sub>2</sub>his) in water. Reactions of silver oxide and amino acids gave several silver (I) histidates, *i.e.*, water-soluble {[Ag(L-Hhis)]<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (L-1) and water-insoluble [Ag(L-Hhis)]<sub>n</sub> (L-2) and [Ag<sub>2</sub>(L-Hhis)(D-Hhis)]<sub>n</sub> (DL-1) depending on reaction conditions such as the reaction time, selecting ligand (L-H<sub>2</sub>his or L- and D-H<sub>2</sub>his) and pH. The donor atom of the three complexes was nitrogen and they exhibited a wide spectrum of effective antimicrobial activities against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*) as well as yeasts (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*) and molds (*Aspergillus niger* and *Penicillium citrinum*). Observation of four bacteria before and after administration of L-1 was carried out using TEM to investigate whether L-1, interacts outside or inside of bacteria.

**Keywords:** silver (I) complexes, histidine, antimicrobial activity, TEM, X-ray microanalysis

### 序論

金、銀は周期表第 11 族元素であり、貨幣金属や貴金属元素としてよく知られている。金属イオンに種々の配位子が配位した金属錯体は、水和された金属イオンとは異なった性質を示す。金 (I) 錯体は抗リウマチなどの生理薬理活性を持つことが知られ、経口投与剤オーラノフィン (C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>AuO<sub>9</sub>PS) が有名である<sup>1)</sup>。金 (I) 錯体の研究は抗腫瘍、抗菌、抗 HIV 作用についても行われているが、銀 (I) 錯体に関する研究は、切り花の花鮮度保持作用、抗菌作用に関するものに限られてきた。

古くから銀や硝酸銀が抗菌作用を持つことは知ら

れており、食器ややけど等の消毒に用いられてきた<sup>2)</sup>。銀 (I) 錯体の抗菌活性スペクトルは金 (I) 錯体に比べ広い。これまで野宮研究室では、種々の有機配位子を用いて銀 (I) まわりの環境が異なる錯体を多数合成し、単結晶 X 線構造解析から分子構造を決定し、最小発育阻止濃度との関係について研究してきた<sup>3)</sup>。アミノ酸アニオンを配位子とした銀 (I) 錯体は、特にタンパク質と銀 (I) イオンの相互作用を研究する上でも重要であるが、光で変色等が起こる不安定な錯体が多く、構造解析までされた例は多くない。その中でヒスチジンを配位子とした銀 (I) 錯

体はバクテリア、酵母、カビに対し優れた広いスペクトルの抗菌活性を示すことが報告された<sup>4)</sup>。最近、反応時間、用いる配位子をキラルな *L*- または *D*- ヒスチジンとするか、混合条件、反応溶液の pH などの反応条件をかえることにより数種類の構造の異なる銀 (I) 錯体 (水溶性でキラルなヒスチジン銀錯体  $\{[Ag(L-Hhis)]_n\}$  (L-1) or  $\{[Ag(D-Hhis)]_n\}$  (D-1), 不溶性のポリマー性かつキラルな錯体  $[Ag(L-Hhis)]_n$  (L-2) 及び  $[Ag(D-Hhis)]_n$  (D-2)、不溶性のポリマー性メソ錯体  $[Ag_2(L-Hhis)(D-Hhis)]_n$  (DL-1)) 等が得られることがわかってきた<sup>5)</sup>。得られたヒスチジン銀 (I) 錯体を単結晶 X 線回折、粉末 X 線回折、赤外吸収スペクトル、元素分析から同定し、最少発育阻止濃度 (MIC; mg/mL) により抗菌活性を評価した。

硝酸銀水溶液に含まれる水和銀 (I) イオンが抗菌活性を発現するための細胞との相互作用について以下の説が提唱されている i) 電子伝達系に作用する ii) DNA と結合し、成長を阻害する iii) 細胞膜に作用する。本研究では Ag-O とは異なる Ag-N 結合を持つヒスチジン銀錯体とバクテリアの相互作用について透過型電子顕微鏡による観察を行い、硝酸銀を投与した結果と比較した<sup>6,7)</sup>。

## 材料と方法

### 材料

水溶性のヒスチジン銀 (I) 錯体は既報<sup>4)</sup>に従い合成した。酸化銀、*L*- または *D*- ヒスチジン、グルタルアルデヒド (電顕用) は和光純薬工業 (株) より入手した。4 種類のバクテリアは独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部、生物遺伝資源部門、NBRC より入手した。

### 測定方法

単結晶 X 線構造解析は Bruker SMART APEX CCD 回折計を使用した。粉末 X 線回折パターンは Rigaku UltimaIV を用いて得た。

最少発育阻止濃度 (MIC, mg/mL) は秦野食品安全センターおよび日本曹達小田原研究所で測定した。

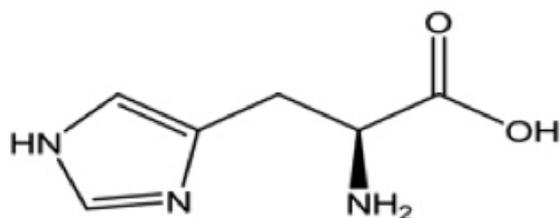


図 1. *L*-ヒスチジン (*L*-H<sub>2</sub>his).

## 電子顕微鏡による微細構造観察用サンプル調製

通常の超薄切片法による微細構造観察のため、遠心分離し、培養液を取り除いた菌液にリン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した 2.5% グルタルアルデヒド (以下 GA) 液を入れ、室温下で 2 時間前固定した。リン酸緩衝液で 3 回洗浄した後、固定した菌液に 3% 寒天液を入れ、混合した後、寒天を固めた。固めた寒天は 1 mm 角の小片にし、蒸留水で希釈した 2% 四酸化オスmium (以下 OsO<sub>4</sub>) 液が入っている試料瓶に入れ、室温下で 2 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。微細構造観察のために包埋試料からウルトラマイクローム (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した後に透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) で観察した。また、元素分析のため、同様の包埋試料から厚さ約 200 nm の超薄切片を作製し、コロジオン膜を張った Ni-200 メッシュに載せ、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) で観察、元素分析を行った。

## 超薄切片の元素分析

超薄切片を Be 製チップのトランスファーホルダーに装填し、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。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、検出器は予め、液体窒素を充填、冷却し、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° 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 1.0 μm に収束させた。このような分析条件下で、

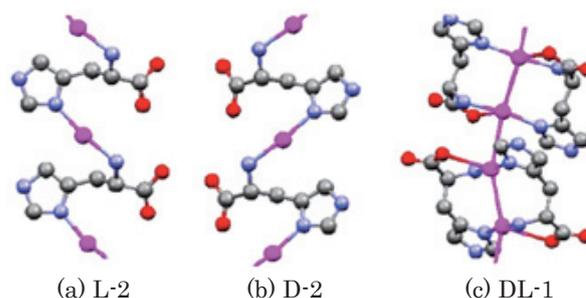


図 2. ポリマー性ヒスチジン銀錯体の結晶中の構造。

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。

## 結果と討論

### ポリマー性ヒスチジン銀錯体（キラルまたはメソ体）の合成、構造解析

Ag<sub>2</sub>O と L-H<sub>2</sub>his または D-H<sub>2</sub>his を水中、室温で反応させると、攪拌時間が短い場合はアモルファル性の強い水溶性のキラルなヒスチジン銀 (I) 錯体 (L-1 or D-1) が得られた。攪拌時間を長くし、有機溶媒を用いた結晶化を行うとキラルならせん状ポリマー性のヒスチジン銀 (I) 錯体 (L-2 or D-2) が得られた。さらに L-1 と D-1 を等濃度で等量混合することで DL-1 の無色透明結晶を得た。L-H<sub>2</sub>his と D-H<sub>2</sub>his を混合し酸化銀を混合しても溶解性が低いため DL-1 を単離できなかった。水溶性の L-1 と D-1 は粉末 X 線回折ピークがブロードであり、アモルファルに近いことがわかった。それに対し L-2, D-2, DL-1 は結晶性のポリマー錯体であった。図 2 に単結晶 X 線解析により決定された L-2, D-2, DL-1 の構造を示す。L-2 と D-2 はヒスチジンのアミノ基とイミダゾールの窒素が銀に配位し、鏡像関係にあるらせん状のポリマーであった。メソ体の DL-1 で

は D-Hhis<sup>+</sup> と L-Hhis<sup>+</sup> が対になって 2 つの銀イオンに配位しており、[Ag<sub>2</sub>(D-Hhis)(L-Hhis)] ユニットが Ag-Ag 相互作用により連結されていた。

### 最少発育阻止濃度による抗菌活性の評価

水溶性のヒスチジン銀錯体は水溶液として、水に不溶の銀錯体は水に分散させた状態で 4 種類のバクテリアに投与し、細菌が増殖しない最少発育阻止濃度 (MIC) より抗菌活性を評価した。表 1 に結果を示す。値が小さい錯体ほど抗菌活性は強い。

Ag-N 結合を持つヒスチジン銀錯体は硝酸銀水溶液 (水和銀イオンを意味する) より、グラム陽性、陰性菌どちらにも高い抗菌活性を示すことが示された。

表 1. 最少発育阻止濃度 (MIC μg/mL)

	L-1	L-2	DL-1	AgNO <sub>3</sub>
<i>Escherichia coli</i> (大腸菌 グラム陰性菌)	15.7	125	125	6
<i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌 グラム陽性菌)	62.6	250	125	>1600
<i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ球菌 グラム陽性菌)	62.6	250	31.3	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌 グラム陰性菌)	15.7	250	125	6

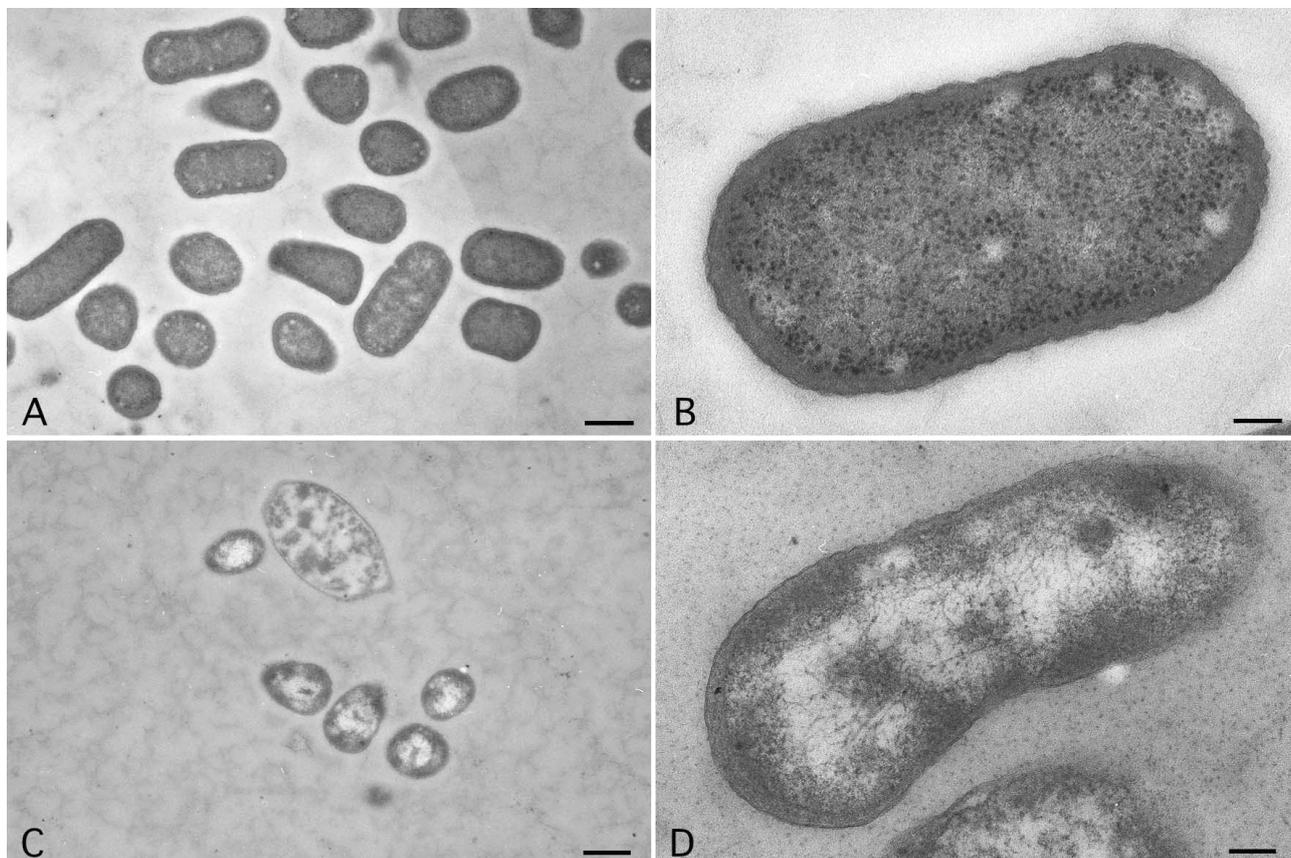


図 3. GA-Os 固定した大腸菌の電子顕微鏡写真。ヒスチジン銀錯体なしで培養した大腸菌の低倍像 (A) とその拡大像 (B)。ヒスチジン銀錯体を加えて培養した大腸菌の低倍像 (C) とその拡大像 (D)。Scale: 0.5 μm (A, C), 0.1 μm (B, D)。

### 電子顕微鏡による微細構造観察

ヒスチジン銀錯体なしで培養した大腸菌は切片中に観察された細胞の数が多く、細胞分裂する細胞も多く観察された (図 3A)。細胞は長径およそ  $1.3 \mu\text{m}$ 、短径およそ  $0.7 \mu\text{m}$  の楕円形であり、厚さおよそ  $36.0 \text{ nm}$  の一層の細胞壁と細胞内に均質な細胞質基質、リボソームが観察された (図 3B)。ヒスチジン銀錯体を加えて培養した大腸菌は非常に細胞の数が少なく (図 3C)、観察できた殆どの細胞はしっかりと細胞壁が観察されず、細胞質基質も均質ではなかった (図 3D)。

枯草菌は切片中に観察された細胞の数が非常に多く、細胞分裂する細胞も多く観察された (図 4A)。細胞は長径およそ  $2.5 \mu\text{m}$ 、短径およそ  $1.0 \mu\text{m}$  の楕円形の細胞であり、厚さおよそ  $22.0 \text{ nm}$  の一層の細胞壁が観察された (図 4B)。また、電子密度が高い細胞質基質を持つ細胞と低い細胞質基質を持つ芽胞と呼ばれる細胞の 2 つが観察された。ヒスチジン銀錯体を加えて培養した枯草菌は、観察できた細胞の数が少なく (図 4C)、殆どの細胞で比較的しっかりと細胞壁が観察できたが、細胞質基質が電子密度の低い芽胞のような細胞ばかりであった (図 4D)。

黄色ブドウ球菌は切片中で観察された細胞の数は

非常に多く、細胞分裂をする細胞も多く観察された (図 5A)。細胞は直径およそ  $1.0 \mu\text{m}$  のほぼ球形の細胞であり、厚さおよそ  $23.0 \text{ nm}$  の一層の細胞壁と、細胞内に均質な細胞質基質と高電子密度顆粒が集合した核質部 (染色体) を持つことが観察された (図 5B)。ヒスチジン銀錯体を加えて培養した黄色ブドウ球菌は、切片中に観察される細胞の数が非常に少なかった (図 5C)。観察できた殆どの細胞はしっかりと細胞壁が観察されず、細胞質基質には局所的に電子密度の低い部分や空隙が観察された (図 5D)。

緑膿菌は非常に多くの細胞が観察された (図 6A)。細胞は長径およそ  $2.0 \mu\text{m}$ 、短径およそ  $0.5 \mu\text{m}$  の楕円形の細胞であり、厚さおよそ  $34.0 \text{ nm}$  の細胞壁と細胞内に比較的電子密度の低い細胞質基質が観察された (図 6B)。前処理の緑膿菌は他の 3 種の前処理試料よりもさらに菌数が少なかったためか、電子顕微鏡での観察はできなかった。

### 超薄切片の元素分析

細胞内外の Ag 局在や Ag イオンの移動を調べるため、大腸菌、枯草菌および黄色ブドウ球菌の超薄切片について X 線マイクロアナリシスを行った。そ

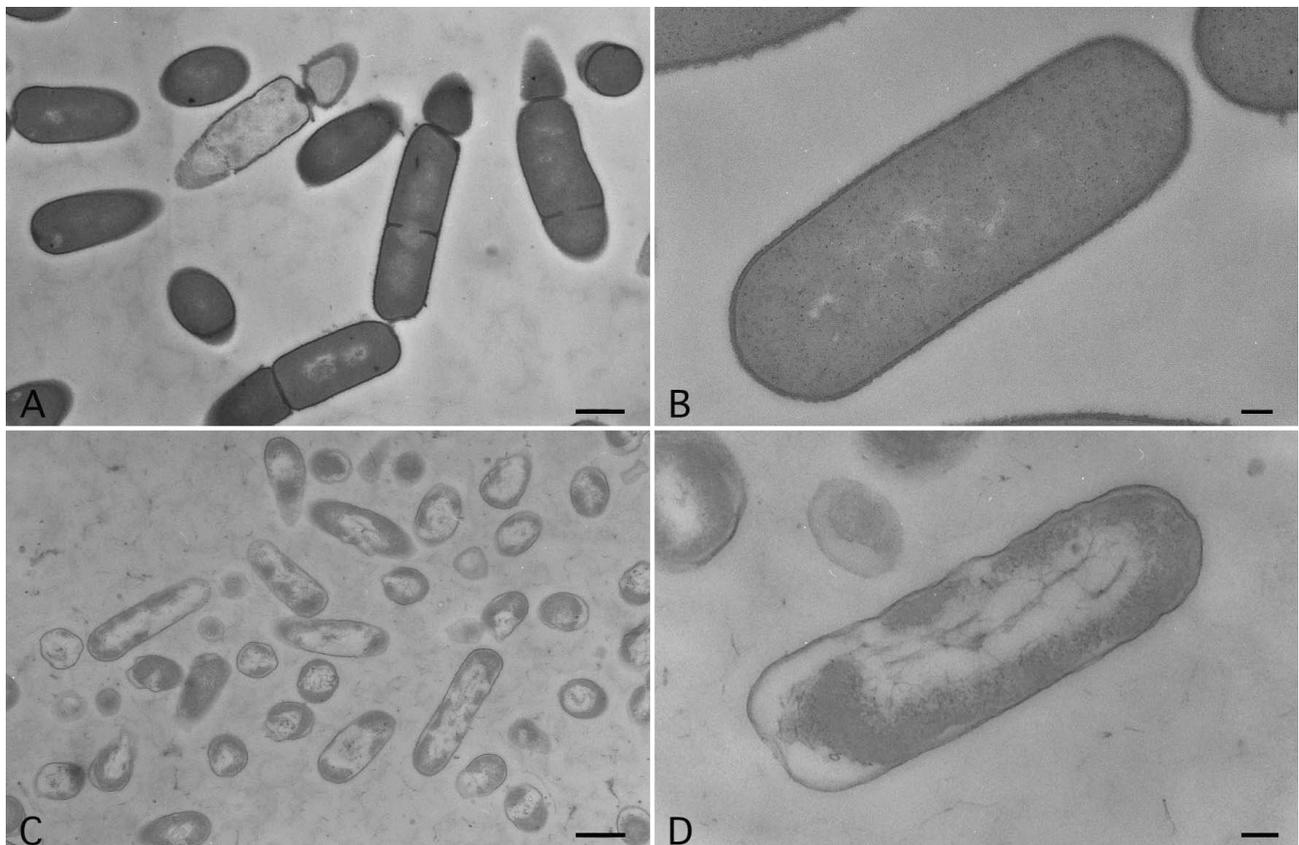


図 4. GA-Os 固定した枯草菌の電子顕微鏡写真。ヒスチジン銀錯体なしで培養した枯草菌の低倍像 (A) とその拡大像 (B)。ヒスチジン銀錯体を加えて培養した枯草菌の低倍像 (C) とその拡大像 (D)。Scale:  $0.5 \mu\text{m}$  (A, C),  $0.1 \mu\text{m}$  (B, D)。

それぞれの超薄切片を観察し、細胞壁部分、細胞質基質部分についてランダムに分析を行った。

ヒスチジン銀錯体を加えて培養した枯草菌の切片中では細胞外に高電子密度顆粒がいくつか観察された(図7)。これらの元素分析を行ったところ、Ni-グリッド由来の炭素(C)、酸素(O)、Ni-K $\alpha$ 線、Ni-K $\beta$ 線のスペクトルピークに加え、銀(Ag)のL $\alpha_1$ 線およびL $\beta_2$ 線のスペクトルピークが検出された(図8)。これらの顆粒が細胞内または細胞表面に付着している像は得られなかった。図9にヒスチ

ジン銀を加えて培養した大腸菌、枯草菌および黄色ブドウ球菌の細胞質基質部分で行った元素分析のX線スペクトル例を示す。細胞質基質由来の元素-X線として、オスミウム(Os)、塩素(Cl)、カルシウム(Ca)が検出された。なお、図中の左側には炭素(C)、酸素(O)の各Ka線とNi-L $\alpha$ 線、右側にはNi-K $\alpha$ 線(Ni)、Ni-K $\beta$ 線およびNi-K $\gamma$ 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。この他、ヒスチジン銀錯体を培養前に加えた黄色ブ

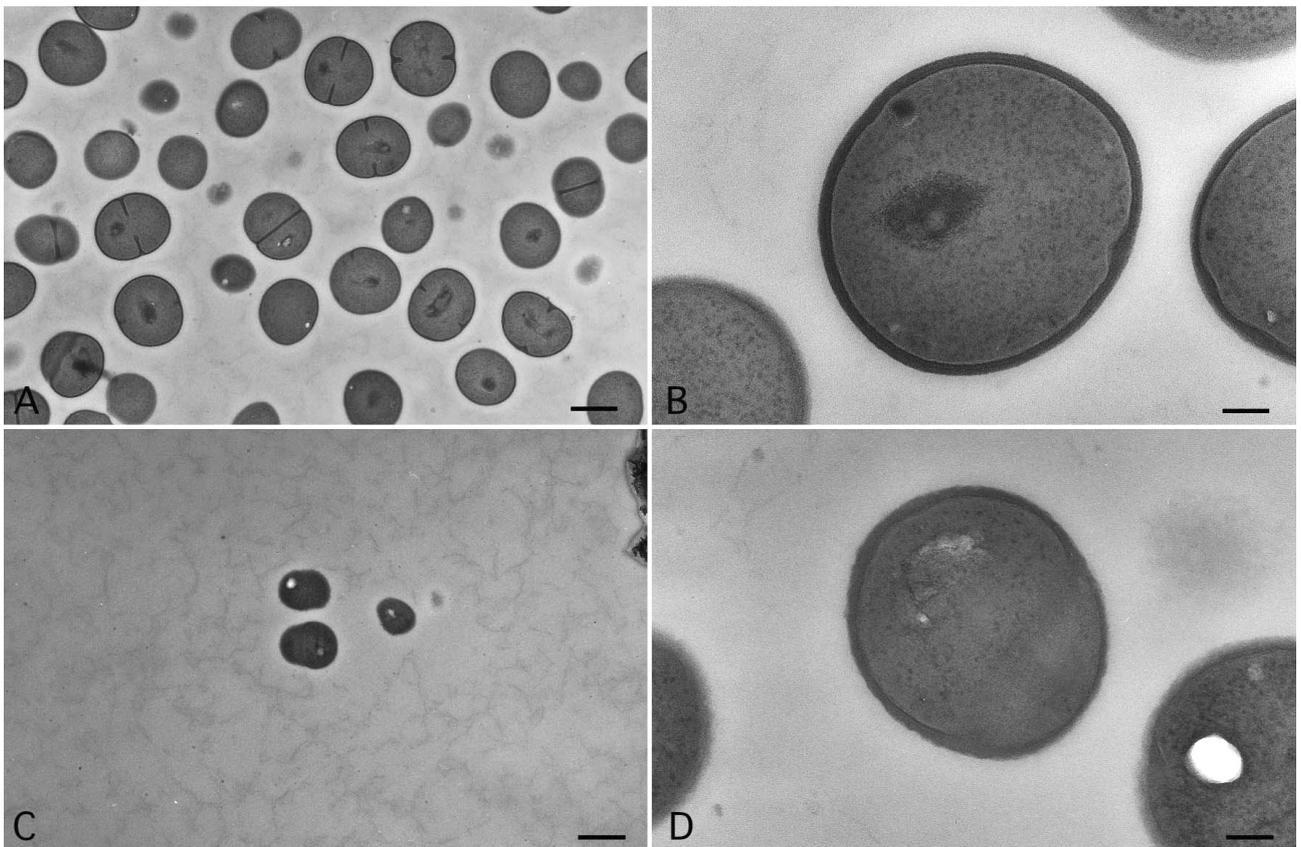


図5. GA-Os固定した黄色ブドウ球菌の電子顕微鏡写真。ヒスチジン銀錯体なしで培養した黄色ブドウ球菌の低倍像(A)とその拡大像(B)。ヒスチジン銀錯体を加えて培養した黄色ブドウ球菌の低倍像(C)とその拡大像(D)。Scale: 0.5  $\mu$ m (A, C), 0.1  $\mu$ m (B, D)。

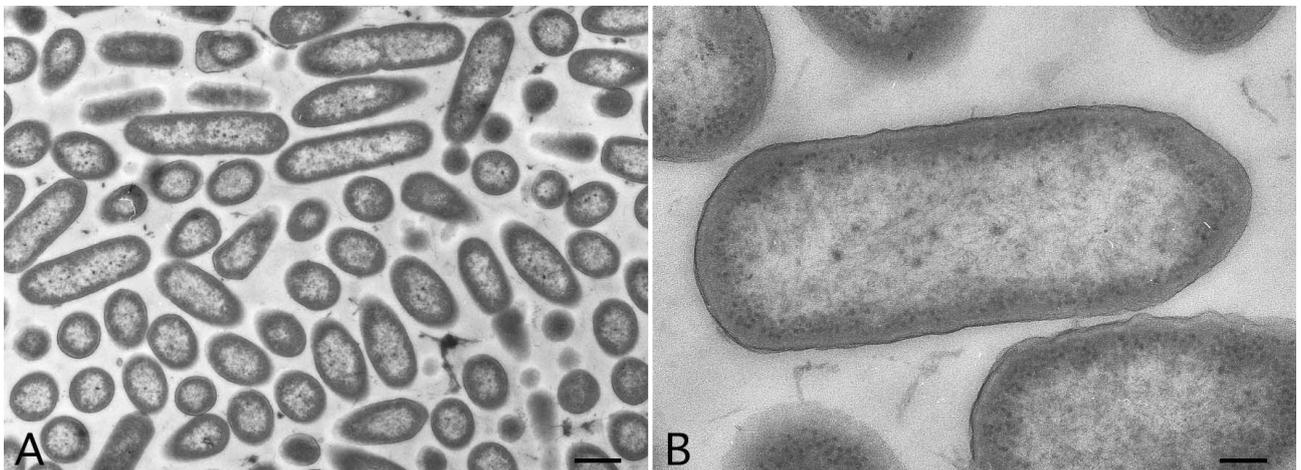


図6. GA-Os固定した黄色ブドウ球菌の電子顕微鏡写真。ヒスチジン銀錯体なしで培養した緑膿菌の低倍像(A)とその拡大像(B)。Scale: 0.5  $\mu$ m (A), 0.1  $\mu$ m (B)。

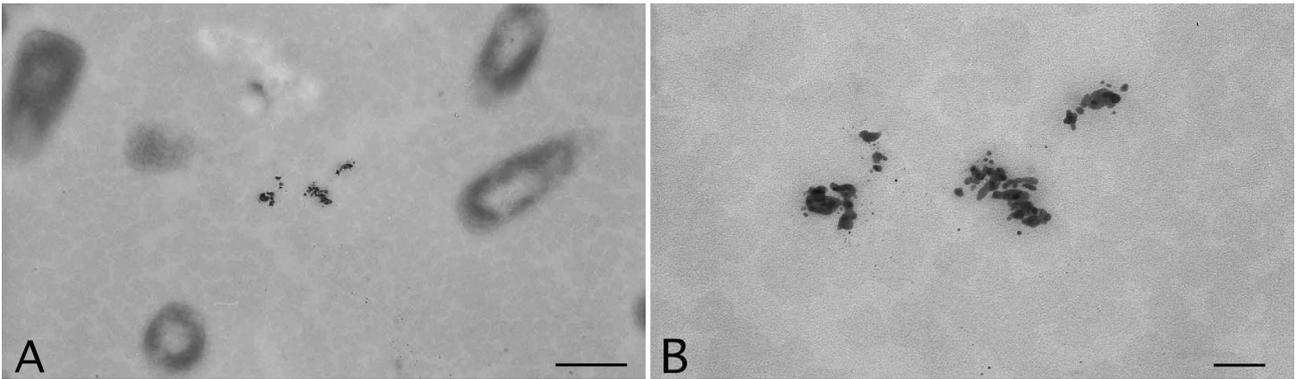


図 7. ヒスチジン銀錯体を加えて培養した枯草菌から得られた切片中に観察された高電子密度顆粒の電子顕微鏡像 (A) とその拡大像 (B). Scale: 0.5 μm (A), 0.1 μm (B).

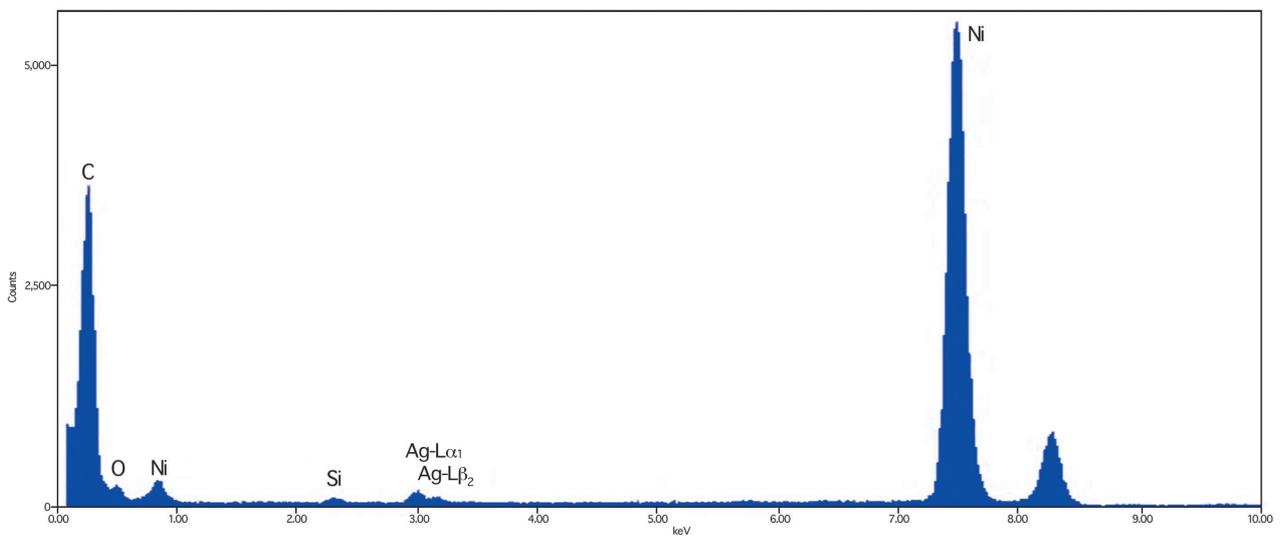


図 8. ヒスチジン銀を加えて培養した枯草菌の切片像で観察された高電子密度顆粒の点分析 X 線スペクトル. 縦軸は X 線カウント (0 ~ 5,600 counts), 横軸はエネルギー値 (keV). スペクトル中のラベルはピークエネルギー値により定性される元素の記号と Ag ではその特性 X 線を示す.

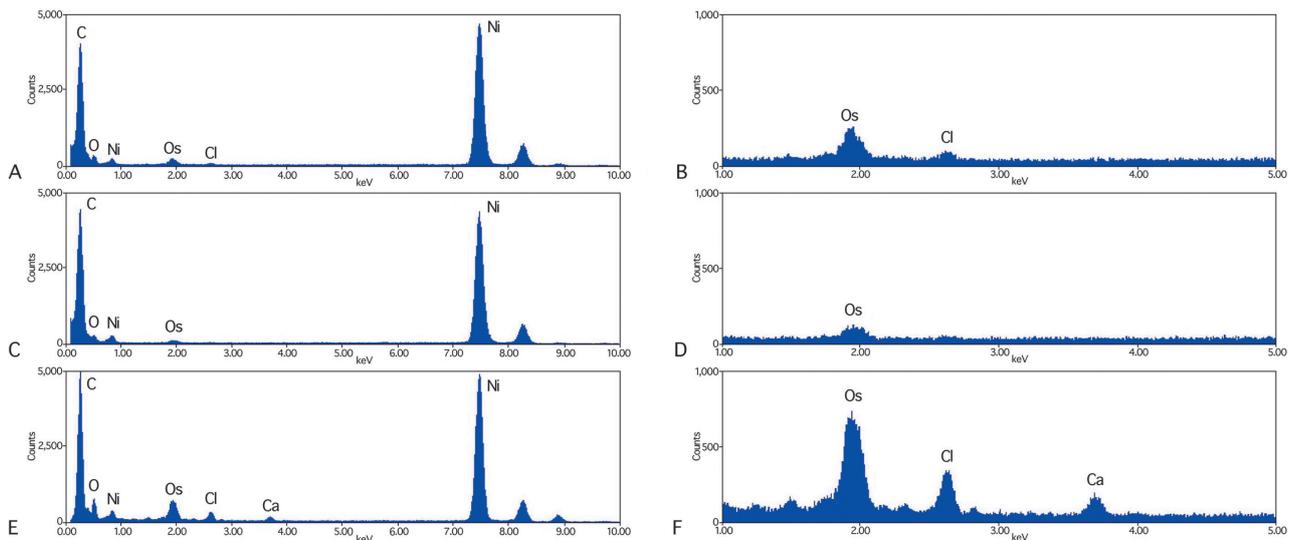


図 9. ヒスチジン銀錯体を加えて培養した大腸菌の細胞質基質の点分析 X 線スペクトル (A) とその 3,000 eV 付近を拡大表示した X 線スペクトル (B). ヒスチジン銀錯体を加えて培養した枯草菌の細胞質基質から得られた X 線スペクトル (C) とその 3,000 eV 付近を拡大表示した X 線スペクトル (D). ヒスチジン銀錯体を加えて培養した黄色ブドウ球菌の細胞質基質から得られた X 線スペクトル (E) と E 図の 3,000 eV 付近を拡大した X 線スペクトル (F). 縦軸は X 線カウント (A, C, E: 0 ~ 5,000 counts, B, D, F: 0 ~ 1,000 counts), 横軸はエネルギー値 (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.

ドウ球菌、枯草菌および大腸菌の細胞の細胞壁、ヒスチジン銀錯体を培養後に加えた4種の細胞の細胞壁部分、細胞質基質部分の検出も行い、図9とほぼ同様の結果が得られた。いずれの分析結果からも銀(Ag)の $L\alpha_1$ 線は検出されなかった。

### まとめ

Ag-N結合を有するヒスチジン銀錯体は反応条件により構造、性質の異なる錯体得られることが明らかになった。またいずれも優れた抗菌活性を持つ錯体であることもわかった。そのような銀錯体の抗菌活性について少しでも直接的な情報を得るため、電子顕微鏡観察を行ったところ、ヒスチジン銀錯体はグラム陽性、陰性菌の細胞の外側に作用していることが示唆された。この結果は硝酸銀を加えて細胞内に銀を含む顆粒が観察されていることと異なっており興味深い。今後ヒスチジン銀錯体を投与してから培養する時間、濃度等を変えて観察を続け、錯体の抗菌機構に対する情報をさらに得ることを目指している。

### 謝辞

この研究は神奈川県総合科学研究所共同研究助成「バクテリア、酵母、カビに対し異なる抗菌活性スペクトルを示す新規貴金属錯体の合成、構造解析と抗菌機構の解明」の援助を受けて行いました。ここに謝意を表します。またバクテリアの実験に関して議論していただきました日本曹達(株)小田原研究所の新井重文氏、渡辺慎也氏に深く感謝致します。

### 文献

- 1) Shaw CF, III (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* **99**: 2589-2600.
- 2) Gimeno MC and Laguna A (2004) Silver and gold. *Comprehensive coordination chemistry II*, Elsevier, Oxford **6**: 911-1091.
- 3) Nomiya K, Azumaya I, Kasuga NC and Kato K (2008). Molecular design and water-soluble silver(I) complexes exhibiting a wide spectrum of effective antimicrobial activities. *Curr. Top. Biochem. Res.* **10**: 1-11.
- 4) Nomiya K, Takahashi S, Noguchi R, Nemoto S, Takayama T and Oda M (2000) Synthesis and characterization of water-soluble silver(I) complexes with *L*-histidine ( $H_2his$ ) and (*S*)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid ( $H_2pyrrld$ ) showing a wide spectrum of effective antibacterial and antifungal activities. Crystal structures of chiral helical polymers  $[Ag(Hhis)]_n$  and  $\{[Ag(Hpyrrld)]_2\}_n$  in the solid state. *Inorg. Chem.* **39**: 3301-3311.
- 5) Kasuga CN, Takagi Y, Tsuruta S, Kuwana W, Yoshikawa R and Nomiya K (2011) Synthesis, structure and antimicrobial activities of meso silver(I) histidinate  $[Ag_2(D-his)(L-his)]_n$  showing different self-assembly from those of chiral silver(I) histidinates. *Inorg. Chim. Acta* **368**: 44-48.
- 6) 川上洋司、高岡誠人、佐藤嘉洋、菊池靖志 (2010) 銀イオンによる黄色ブドウ球菌の損傷の透過型電子顕微鏡観察. 日本防菌防黴学会第36回年次大会要旨集. p.12.
- 7) Yamanaka M, Hara K and Kudo J (2005) Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol* **71**: 7589-7593.



■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## カラシン目洞窟魚 *Astyanax mexicanus* の陰影反応と光受容系の観察

小林 剛<sup>1,2</sup> 豊泉龍児<sup>1,3,4</sup> 小笠原強<sup>1,3,4</sup> 日野晶也<sup>1,3,4</sup> 齋藤雄介<sup>1</sup> 茂木和枝<sup>3,4,5</sup>

### Observations of Shadow Response, Photoreception Systems of the Blind Cavefish *Astyanax mexicanus*

Tsuyoshi Kobayashi<sup>1, 2</sup>, Ryuji Toyoizumi<sup>1,3,4</sup>, Tsuyoshi Ogasawara<sup>1,3,4</sup>,  
Akiya Hino<sup>1,3,4</sup>, Yusuke Saito<sup>1</sup> and Kazue Mogi<sup>3,4,5</sup>

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

<sup>2</sup> Present address: Department of Genome System Science, Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan

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

<sup>4</sup> High-Tech Research Center, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyoik02@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Blind cavefish *Astyanax mexicanus* (order Characiformes) is a cavern river dweller in the central and eastern parts of Mexico and Texas and, in the mature fish, its retarded eyes are embedded in the deep portion of the cranium. In contrast, its larva and juvenile temporarily have small but seemingly normal eyes. A previous investigator revealed that the cavefish juveniles show “shadow response”, that is, quickly start of the swimming movement toward the surface of the water just after turning off a circumferential light (Yoshizawa *et al.*, 2008). In the present study, using colored light, we examined the intensity and stage-dependent differences of the cavefish juveniles’ “shadow response” to light of a specific wavelength by regarding the evoked behavior as functional visual perception. Most of the tested cavefish juveniles at 3-4 days after fertilization strongly responded to blue and green lights. In contrast, red light could induce a significant but weak shadow response in only a small population. By histological observations, we found that ocular structures and optic nerves are still formed in the juveniles, but in adults, even though the mesencephalic structures are not malformed or retarded, the bundles of optic nerves are thin and conglutinated to the soft basal shell of the ventral cranial structure. We also attempted to reveal the auditory properties of blind cavefish, but significant differences were not detected with acoustic stimulation.

**Keywords:** *Astyanax mexicanus*, visual perception, shadow response, colored light.

## 序論

洞窟的環境に棲息する動物は外界と隔離されるために種や亜種の分化が起こりやすく、生理的、形態的に特異な形質を有する亜種/種が生じやすいとされる。一方、洞窟内に棲息する種には、原始的な形質を保持したままの種も多く存在している。このような動物は、発生学や進化生物学分野での有意義なモデル動物となりうると考えられる。

カラシン目に属する洞窟魚であるブラインドケーブ・カラシン *Astyanax mexicanus* (以下 BC カラ

シン) はメキシコや米国テキサス州の洞窟内河川に棲息しており、成魚の体表面には眼が認められない。しかしながら、仔魚期までは明瞭な構造を有する眼が体表面上に存在することより、BC カラシンは眼を有する祖先種に由来すると考えられている<sup>1)</sup>。BC カラシンが棲息する河川は洞窟の内外を走行しており、洞窟外流域(日照のある流域)には、同種の眼を持つ成魚の個体群が棲息しており、これらと洞窟型との種内分岐は 100 ~ 1 万年前に生じたと

されている<sup>2)</sup>。Yoshizawaらは、BCカラシン仔魚が、孵化後の一定期間に、上方から照射していた白色光を遮ると急激に水面に向かって泳ぎ出すという陰影反応を示すことを報告している<sup>3)</sup>。下等脊椎動物には眼に加えて松果体でも光受容する種が多く存在するが、この陰影反応はBCカラシンの仔魚が成魚とは異なり、眼球に頼った視覚情報処理を行っている可能性を示唆する。今日まで、BCカラシンの具体的な視覚特性に関しては明かになっていない。以上の背景により、本研究は、青、緑、赤の各波長の単色光と白色光を照射できる発光ダイオード(LED)光源を備えた陰影反応観察装置を自作し、照射光の波長の違いが陰影反応の差異を引き起こすか否かを検討した。更に、解剖学的、組織学的手法を用いてBCカラシン仔魚および亜成体の眼球、視神経、視蓋の構造を観察することで、視覚に関連した網膜および神経組織がどの程度まで正常に形成されているか、言い換えれば、どの程度退化しているかについて検討した。

魚類をはじめとする水棲動物には、発音を個体間での威嚇や誘因行動に利用したり、反響定位により周囲の環境変化を感知したりする種が存在する。一般的に、このような種では、これらの目的に沿うように特異的な分化を遂げた器官が発達している。従って、BCカラシンが退化した視覚を補償する為に、内耳や魚類特異的な機械刺激受容器である側線系による感覚を発達させている可能性が十分に考えられる。以上より本研究では水槽内でのBCカラシンの遊泳行動を観察することで、視覚情報以外から周囲の環境を認識している兆候があるかを調べた。次いで、BCカラシンに特定の波長の音波を聴かせる観察装置をセットアップし、特定波長の音波がBCカラシンの遊泳行動の変化を誘起するか否かについても検討した。

## 材料と方法

本邦で観賞用に流通しているブラインドケープ・カラシン *Astyanax mexicanus* を用いた。尚、仔魚は飼育室内での自然交配により得たものを使用した。

### 視神経交叉及び脳の形態観察

BCカラシン亜成体(全長3.7 cm程度)を人工淡水中で解剖した。解剖鉗を用いて頭部を切断し、腹側より口蓋、結合組織等を除去して視神経交叉や脳を露出させて観察した。尚、視神経交叉の観察では対照群として、同属の魚種である *Astyanax bimaculatus* の成体を用いた。

### 組織切片標本

BCカラシン亜成体から摘出した脳ならびに仔魚の全載標本を Bouin's fixative (Polysciences Inc.) 中に投入し、90 rpm で振盪しながら室温で12時間固定した。固定後、エタノールで脱水し、Lemosol (和光純薬) で透徹した試料を Histoparaffin (和光純薬) に包埋し、7 μm 厚の横断切片とした。これを Mayer's Hematoxylin (和光純薬)・1% Eosin Y Sol. (和光純薬) にて二重染色を施したプレパラートとし、正立顕微鏡下で観察した。

### 陰影反応の観察

陰影反応の観察用にLED光源装置を作製した。使用したLED素子(Optosupply LLC, OSHR5161P, OSPG5161P, OSUB5161P, OSPW5161P)からは各々、625, 525, 470 nm にピークをもつ単色光および白色光が発せられる。これらを8 cm × 5 cmの基板の上に各LED7素子を交互に2列ずつ密に並べた。この光源装置を周囲からの余分な光を遮断する箱(サイズ; 40 cm(H) × 30 cm(W) × 30 cm(D))の天井に設置した(図1)。箱内にて光源の直下に観察容器を設置し、飼育水を満たした。陰影反応の測定にあたっては、観察容器内に同じ発生段階の仔魚10個体を1グループとして投入した後に、箱の内部で60秒間暗順応させ、続いてLEDの光を60秒間照射して消灯した。この直後に上昇や回転といった急激な遊泳行動の変化を示した個体を、陰影反応を示した個体とみなし、その個体数を集計した。先ず、予備実験として、観察容器に腰高シャーレ(直径; 9 cm × 6 cm(D))を用い、各色の光に対する反応の有無と、反応を示す期間を調査した。その後、観察容器をプラスチック製の観察容器(内径; 7 cm(H) × 10 cm(W) × 2 cm(D))に変更して陰影反応の有無を詳細に観察した。尚、後者の容器を用いた操作では、異なる日に産卵された計220個体(120個体と100個体)の仔魚を用い、その1グループ10個体に対して光の点灯と消灯を白/赤/緑/青色光の順で繰り返し、孵化直後から孵化後5日目まで計6回、点灯-消灯実験を実施した。

### 遊泳行動の観察及び聴覚反応の調査

飼育水槽(サイズ; 36 cm(H) × 60 cm(W) × 30 cm(D))内でのBCカラシンの遊泳行動をハイスピードデジタルカメラEX-FC100(CASIO co.)を用いて210fpsで撮影した。特に、遊泳する個体が水槽のガラス面や他個体との接触を回避するかについて観察した。尚、水槽内では成体20個体が飼育されている。

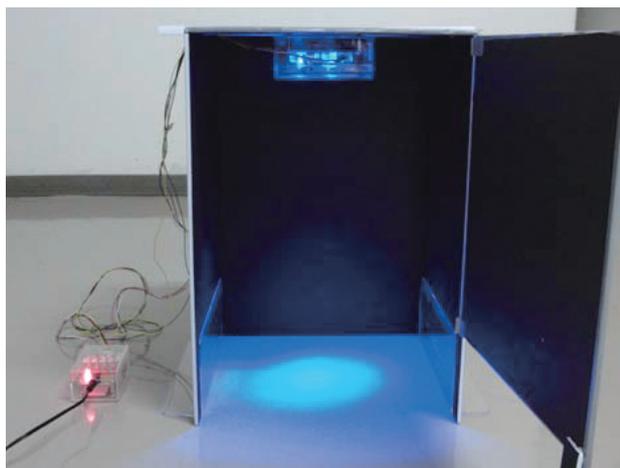


図 1. 自作した陰影反応観察装置.

また、BC カラシンが特定の周波数の音波に特異的な反応を示すか否かを調査する為に、パソコンにセットアップした音響測定分析システム DSSF3 (Yoshimasa Electronic Inc.) のシグナルジェネレーター機能を使用し、その音を BC カラシン成魚に聴かせた。パソコンから USB インターフェース UA-1G (Roland co.) を介して接続したイヤークリップ ATH-C1000 (Audio-technica co.) を、プラスチック水槽内に設置した (図 2)。水槽内には BC カラシン成魚 1 個体を投入し、20 Hz から 2,000 Hz まで 20 Hz 毎、2,100 Hz から 10,000 Hz まで 100 Hz 毎の各周波数の水中音を 10 秒間ずつ照射した。音波の照射後に調査個体が著しく異なる挙動を示した場合、再度、同一周波数の音波を照射し、改めて同様の行動が観察されれば、その周波数を記録することにした。尚、水槽中にはピン型マイクロフォン AT9903 (Audio-technica co.) を設置し、ヘッドホンから確かに音が発せられていることをリアルタイムで確認した。

## 結果

### BC カラシン仔魚の形態

人工交配にて得た胚は 24°C で飼養したところ受精後約 1 日で孵化し、胚は色素を殆ど持たず透明であった。また、仔魚には明瞭な眼が存在し、組織切片標本からは一見すると正常な内部形態を持つことが観察された (図 3)。

### 脳及び視神経交叉の形態

解剖した全ての BC カラシン亜成体の頭蓋内部には透明な脂肪粒を多く含んだ結合組織が密に詰まっており、これに埋れるように、半透明のゼリー状の嚢胞に包まれた眼球が存在していた (n=16)。左右の

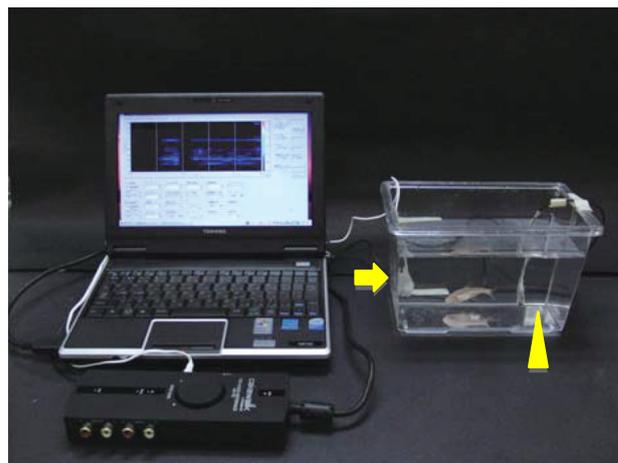


図 2. 聴覚反応観察装置. 矢頭はマイクロフォン, 矢印は音波出力のためのイヤークリップを示す。双方とも防水のために Parafilm が巻き付けてある。

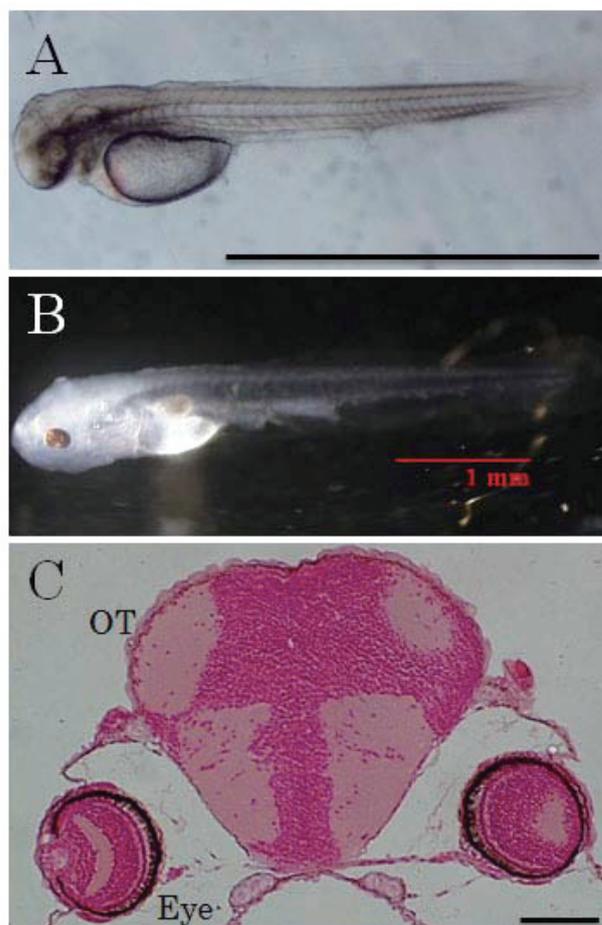


図 3. BC カラシン仔魚の形態. A. 孵化後 1 日目. B. 孵化後 7 日目. C. 孵化後 6 日目仔魚の中脳領域の組織切片. OT: 視蓋. スケールバーは A, B では 1 mm, C では 0.1 mm.

眼球からは直径約 40  $\mu\text{m}$  の非常に細い視神経の伸長が確認できた。両眼球の視神経は間脳底部の前方に位置する薄い結合組織性の膜構造上にて集合していた。一方、*A. bimaculatus* では、眼球から太く

明瞭な視神経が伸長していた (n=5, 図 4)。BC カラシン亜成体の脳は他の脳領域と比較して中脳が占める領域が大きかった。また、組織切片標本からは、中脳視蓋領域の脳室周囲帯にヘマトキシリンで染色された神経細胞と考えられる層構造が観察された (n=9, 図 5)。BC カラシン成魚の体表面に眼球はないが、視覚情報処理のための脳中枢の層構造が完全に失われている訳ではないことが判った。

### 仔魚の陰影反応の観察

予備実験において、白/緑/青色光の消灯時に陰影反応を示す個体数と比較して、赤色光の消灯時に陰影反応を示す個体数が少ないことが観察された。また、採卵後の胚を4つのグループに分け、各々のグループ (n=40) に対して単一の色の光のみを用いて陰影反応の有無を連日観察した際にも同様の傾向が観察された (図 6A)。対照的に、60秒の暗順応後に光を照射した直後には、どの色の光に対しても前述の陰影反応のような遊泳行動を示した個体は観察されなかった。

孵化後0-2日目の稚魚では、白/緑/青色光の消灯時に約半数の個体が陰影反応を示した。一方、赤色光に対して陰影反応を示した個体の比率は、12-26%に止まった。この赤色光に対する反応の低さは全観察日を通して維持されていた。また、全ての単色光ならびに白色光において、孵化後3日目に陰影反応を示す個体数の比率が急減した (図 6B)。観察された陰影反応は、孵化後0-2日目では多くの個体が水面に対して力強く上昇する運動を示したが、孵化後3日目以降は陰影反応における上昇運動が日を迫るにつれて次第に弱く短くなっていった。この傾向は、消灯刺激に対する馴れや学習の影響を排する目的で孵化後3日目から初めて装置内での光照射と観察を開始した実験群からも示された (n=37, 図 6C)。孵化後5日目以降、陰影反応を示した個体数の比率は更に減少し、孵化後11日目においても高い比率の陰影反応は復活しなかった (データ不掲載)。

### BC カラシンの遊泳行動と音波に対する反応

高速度撮影した BC カラシンの遊泳行動からは、進行方向に存在する水槽のガラス面や同じ水槽内の同種他個体との接触や衝突を未然に回避しているかのような挙動を示すケースが高頻度で観察された (図 7)。

一方、聴覚反応に関する測定では、照射した周波数である 20-10,000 Hz の範囲内の特定の波長の音波に反応したことに起因すると考えられる、著しい行動変化は観察されなかった (n=5)。

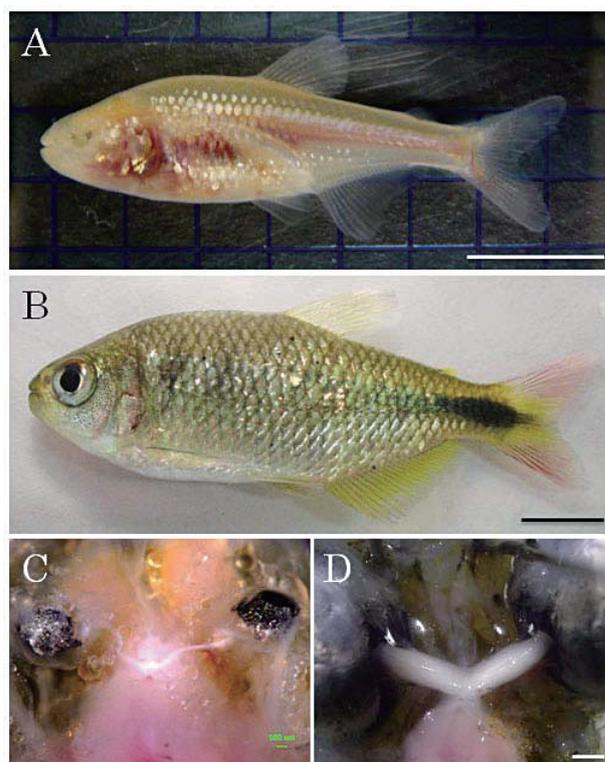


図 4. BC カラシンの視神経交叉. A. BC カラシン. B. *A. bimaculatus*. C. BC カラシンの視交叉. 観察のため眼球周囲のゼリー状の結合組織は除去した. D. *bimaculatus* 成魚の視神経交叉. スケールバーは A, B では 1 cm, C, D では 0.1 mm.

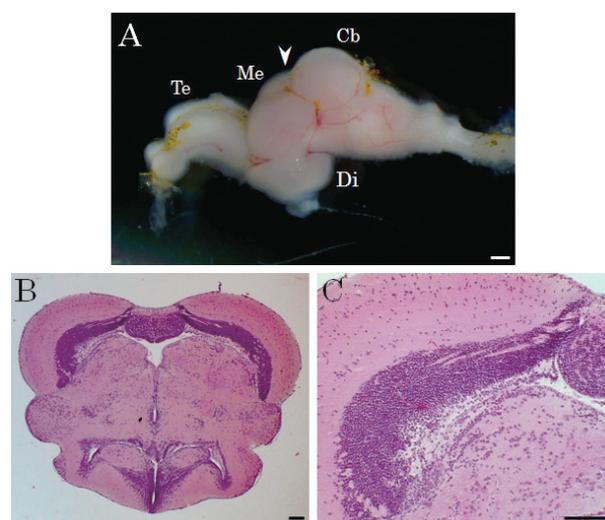


図 5. BC カラシン亜成体の脳 A. 外部形態. B. 図 A の矢頭で示す領域の横断切片. C. 図 B の視蓋領域の拡大図. Te, 終脳; Me, 中脳; Cb, 小脳; Di, 間脳. スケールバーは 0.1 mm.

### 討論

本研究室で BC カラシンを自然交配させ孵化した個体を観察したところ、孵化数日後の仔魚は明瞭な眼を有しており、その内部形態はゼブラフィッシュ胚/

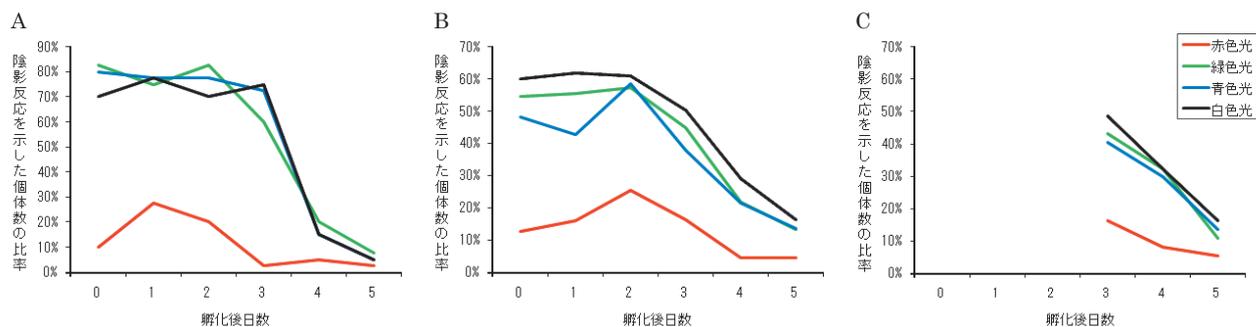


図 6. 陰影反応を示した個体数の比率の変化. A. 孵化後、一つのグループに同じ色の単色光または白色光のみを照射し続けた結果. B. 同一のグループに対して4色の光を順に照射した結果. C. 孵化後3日目から4色の光を照射した結果.

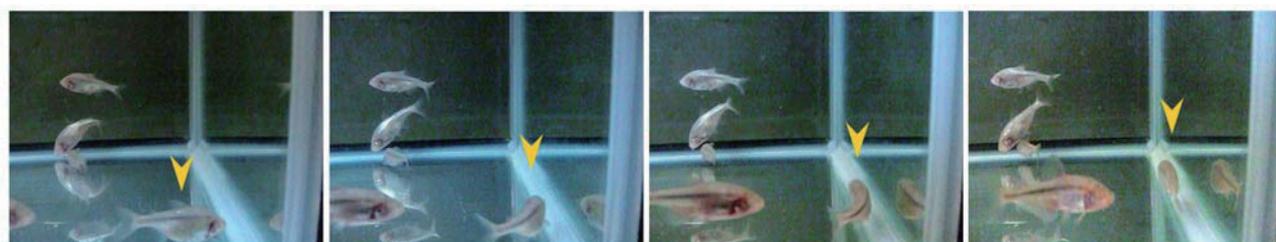


図 7. 障害物を回避する BC カラシン成体. 矢頭で示す個体が、進行方向にあるガラス面に接触することなく進路を変えている. 各フレームは、撮影した動画から約1秒おきにキャプチャした画像である.

幼魚のそれと同様の形態<sup>4)</sup>を有していたことから、BC カラシンが眼のある祖先種から退行的進化を遂げたことを改めて示唆する結果が得られたといえる。また、成体の中脳視蓋領域に層構造が観察されたことは、BC カラシンは眼が退行的進化を遂げてからの年数が短いために、神経細胞やグリア細胞を秩序立った配置に並べる層形成機構が完全には消失していないことを示唆している。しかしながら、この構造も視覚を有する真骨類であるゼブラフィッシュの視蓋の構造<sup>5)</sup>に酷似していたものの、網膜由来の視神経投射によって形成されたものか否かについては、今回の観察からは判断できなかった。これを明らかにするためには、脂溶性蛍光色素 DiI 等を用いた、軸索標識実験等を行う必要がある。

視覚を有する高等動物の多くは、明暗を識別するロドプシン様蛋白質とは別に、波長の吸収特性が異なる数種類の視物質を持つことで色の識別を可能としているが、この視物質の種類や数は動物種によって異なる。例えば、キンギョでは明暗を感受する蛋白質とは別に4種類の視物質を有している<sup>6)</sup>。今回の陰影反応の観察においては、赤色光の消灯時に反応を示す個体数の比率が低かったが、その理由として、主に二つの可能性が考えられる。ひとつは、陰影反応誘起の鍵刺激が短波長光のみであるため、赤色光の消灯に反応し難かった可能性である。もうひとつの可能性としては、BC カラシンの洞窟内個体群が永年に渡り外界と隔離されていたことより遺伝

的浮動が生じ、赤色光受容に關与する蛋白質關連の遺伝子頻度に特に大きな変化が生じた可能性も考えられる。或いは、BC カラシンが棲息する洞窟内では、赤色光の受容能が不要となる何らかの環境要因が働き、赤色光受容關連蛋白質が失われていた可能性も考えられる。

今回の陰影反応の観察に關連して、今後は光刺激の受容器官を明快に同定するために、胚発生期（特に器官形成期）に眼胞あるいは松果体の一方を除去した個体で本稿と同様の陰影反応の観察を行う必要があると考えている。また、仔魚の眼からの光入力、意味のある前処理がなされ高次脳機能との連携が維持されているか否かに関しては、行動学的アッセイを行う必要がある。分子生物学的解析については、degenerate primer を用いた RT-PCR 法と RACE 法による遺伝子全長のクローニングならびに塩基配列決定と *in situ* ハイブリダイゼーション法を組み合わせ、仔魚及び成魚における視物質をコードする遺伝子の発現動態解析や機能解析を行う意義があると考えられる。

今回観察された BC カラシンの障害物に対する回避行動は偶発的なものではなく、随意的な遊泳行動のように見受けられた。そうであるならば、この行動は、視覚情報を補償するために発達したのものであろう高度な機械的刺激受容能によるものであると同時に、飼育された水槽内環境の空間学習に基づいていた可能性も考えられる。この点に関しては、今後、

急に障害物を設置した水槽を用いた直後の BC カラシンの行動解析等、飼育空間に連続的な変化を与えた上で定量的な記録観察を実施することが有意義なブレイクスルーを与えると期待される。また、今回の音波に対する反応観察に用いた装置については、精度や感度において、更に改良や検討を重ねる予定であり、BC カラシンが音波に反応するかについては再検証の必要性を感じている。

また、今回照射した音波は人間の聴覚範囲内の周波数であったことから、更に低い、あるいは高い周波数の音波刺激を与えた際の BC カラシンの行動を観察をする必要があると考えている。

### 謝辞

本研究は、2010 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の御支援に深謝いたします。

### 文献

- 1) William RJ (2009) Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Annu. Rev. Genet.*, **43**: 25-47
- 2) William RJ (2001) Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev. Biol.* **231**: 1-12.
- 3) Yoshizawa M and Jeffery MR (2008) Shadow response in the blind cavefish *Astyanax* reveals conservation of a functional pineal eye. *J. Exp. Biol.* **211**: 292-299
- 4) Thomas M and Mario FW (2005) *Atlas of Early Zebrafish Brain Development*, Elsevier, Amsterdam. pp. 37-49.
- 5) Mario FW, Barbara R and Heinrich Reichert (1996) *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain*, Birkhauser, Boston. pp. 126-131.
- 6) 七田芳則, 深田吉孝 (2007) *動物の感覚とリズム*. 培風館, 東京. pp. 19-21.

■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 成長に伴うオニテナガエビ造雄腺の組織像の変化

鶴岡慎哉<sup>1</sup> マーシーワイルダー<sup>2</sup> 長谷川由利子<sup>3</sup> 泉 進<sup>1</sup> 大平 剛<sup>1,4</sup>

Histochemical Studies on the Androgenic Glands in Immature and Mature Males of the Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*

Shinya Tsuruoka<sup>1</sup>, Marcy N. Wilder<sup>2</sup>, Yuriko Hasegawa<sup>3</sup>, Susumu Izumi<sup>1</sup>  
and Tsuyoshi Ohira<sup>1,4</sup>

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

<sup>2</sup> Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba City, Ibaraki 305-8686, Japan

<sup>3</sup> Department of Biology, Keio University, Yokohama City, Kanagawa 223-8521, Japan

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

**Abstract:** Male sexual characteristics in crustaceans are induced by androgenic gland hormone (AGH), which is produced in a male-specific organ, the androgenic gland (AG). In this study, we conducted histochemical studies on the AGs in immature and mature males of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. In order to confirm the position of the AG, gene expression of an insulin-like AG factor (IAG), which is expressed specifically in the AG, was examined by *in situ* hybridization. Specific hybridization signals were detected only in the AG cells attached to the external wall of the terminal ampoule. This localization of IAG mRNA is the same as that of the AG in *M. rosenbergii* reported previously. By histological staining, apparent AG cells were observed in immature *M. rosenbergii* as well as mature prawns. This result indicates that AGH regulates not only male morphotypic differentiation at the immature stage, but spermatogenesis at the mature stage.

**Keywords:** androgenic gland hormone, androgenic gland, decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*, *in situ* hybridization, histochemistry

### 序論

甲殻類においては、造雄腺と呼ばれる内分泌腺が雄にのみ発達し、ここから雄性化ホルモンが分泌され、これが雄への分化を促すとともに、その後の雄の性特徴を発達させる。等脚目甲殻類のオカダンゴムシ *Armadillidium vulgare* では、発生段階の初期に造雄腺を移植することで、遺伝的雌の生殖腺が精巢へ分化し、二次雄性性徴を誘導することが報告された<sup>1)</sup>。この実験とは反対に、雄からの造雄腺の除去は、卵黄蛋白質前駆物質であるピテロジェニンの合成を生じさせることも知られている<sup>2)</sup>。十脚目甲殻類に属する淡水性のオニテナガエビ *Macrobrachium rosenbergii* では、若い雌に造雄腺を移植することにより、遺伝的雌が機能的雄へと性転換した<sup>3)</sup>。また、遺伝的雄から機能的雌への性転換についても、発生段階の初期に造雄腺を除去することによって引

き起こせることが報告された<sup>4)</sup>。ミナミザリガニ科の *Cherax quadricarinatus* では、未成熟な雌への造雄腺の移植が雄特異的な形態を発達させ、二次雌性性徴を抑制した<sup>5)</sup>。

これまでに述べた造雄腺移植による雌から雄への性転換の誘導や雄性性徴の発達は、造雄腺で合成され、そこから分泌される造雄腺ホルモン (Androgenic gland hormone, AGH) の作用によるものである。1999年、オカダンゴムシの AGH が造雄腺から精製・単離され、一次構造が決定された<sup>6)</sup>。オカダンゴムシの AGH は B 鎖と A 鎖が 2 対のジスルフィド結合で架橋され、さらに B 鎖および A 鎖内にそれぞれ 1 対ずつジスルフィド結合が存在し、A 鎖にはアスパラギン結合型糖鎖が付加していた。興味深いことに、オカダンゴムシの

AGH はインスリン族ペプチドのメンバーに属すると考えられた。また、ほぼ同時期にオカダンゴムシの AGH 前駆体をコードする cDNA がクローニングされ、AGH 前駆体はシグナルペプチド、B 鎖、C ペプチド、A 鎖から構成されていることが明らかとなった<sup>7)</sup>。これら一連の結果より、オカダンゴムシの AGH はプレプロ体として翻訳された後、シグナルペプチドの除去、ジスルフィド結合の形成、そして最後に C ペプチドの除去と A 鎖にアスパラギン結合型糖鎖が付加することで成熟型になると考えられた。

十脚目甲殻類においても、造雄腺に含まれる性分化因子の研究が進められてきた。*C. quadricarinatus* とオニテナガエビから造雄腺 cDNA ライブラリーがサプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法を用いてそれぞれ構築された。そして、これらのライブラリーを用いた EST 解析が行われ、造雄腺で特異的に発現する遺伝子が単離された<sup>8,9)</sup>。それらの遺伝子は、シグナルペプチド、B 鎖、C ペプチド、A 鎖からなるポリペプチドをコードしていた。また、インスリン族ペプチドで保存された 6 つのシステイン残基を持つことから、インスリン様造雄腺因子 (Insulin-like androgenic gland factor, IAG) と名付けられた。これら十脚目の IAG は、構造的な特徴および造雄腺で特異的に発現していることから、十脚目の AGH の有力候補であると考えられている。しかし、十脚目の IAG は等脚目 AGH と相同性をほとんど示さず、生物活性は未だに調べられていない。そのため、IAG が十脚目 AGH であるかは不確定なままである。

十脚目甲殻類の造雄腺の組織学的な解析は古くから行われてきた。1947 年、Cronin は雄のアオガニ *Callinectes sapidus* において、輸精管に付着している内分泌器官として造雄腺を発見した<sup>10)</sup>。その後、オニテナガエビにおいては、造雄腺は輸精管末端膨大部の管壁に付着する組織であることが報告された<sup>4)</sup>。さらに、組織学的な解析が行われ、オニテナガエビの造雄腺はヘマトキシリンで濃染される楕円形の大型の核を有し、タイプ I とタイプ II という二種類の細胞から構成されていることが明らかとなった<sup>11)</sup>。しかし、これらの結果だけでは、十脚目甲殻類の造雄腺に関する組織学的な知見は十分と言える状況にはない。そこで本研究では、十脚目の中では造雄腺に関する研究が比較的進んでいるオニテナガエビを用いて、成長に伴う造雄腺の変化を組織学的な解析で明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 実験動物

実験で使用した体長約 15 cm のオニテナガエビ *Macrobrachium rosenbergii* は茨城県つくば市の(独)国際農林水産業研究センターで飼育されていた個体を用いた。体長約 4 cm の稚エビは徳島県徳島市の熱帯魚通販/卸販売業者の勝鮎(株)から購入した。

### ホールマウント *in situ* hybridization

センスプローブおよびアンチセンスプローブを作製するために、オニテナガエビ IAG に特異的で 5' 側に T7 プロモーター配列を付加したフォワードプライマー (5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGG GATACTGGAATGCCGA-3') と 5' 側に T3 プロモーター配列を付加したリバープライマー (5'-AAT TAACCCTCACTAAAGGGCTACCTGGAAGTGCAG GTGT-3') を設計した。これらのプライマーを用いた PCR 反応によりオニテナガエビ IAG の 234-755 bp の cDNA 断片を増幅した。この cDNA 断片を鋳型に使用し、ATP、CTP、GTP、UTP を Dig RNA Labeling Mix (Roche Applied Science, Germany) に変更した点を除き、Riboprobe® Combination System-T3/T7 RNA Polymerase (Promega, USA) を用いて、添付のプロトコールに従ってオニテナガエビ IAG のセンスプローブとアンチセンスプローブを合成した。

オニテナガエビの雄性生殖器官の全体を摘出し、4°C で一晩、4% パラホルムアルデヒドを含む pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で固定した。次に、固定した雄性生殖器官を 50% エタノール/50% PBS (v/v) に 20 分間、25% エタノール/75% PBS (v/v) に 20 分間、PBS に 20 分間ずつ 2 回浸して水和反応を行った。それを、60°C に保温しておいた Hybridization buffer (50% ホルムアルデヒド、2 x SSC (1 x SSC; 15 mM クエン酸三ナトリウム、150 mM NaCl)、1 mg/ml サケ精子 DNA) と PBS を 1 : 1 で混合した溶液と Hybridization buffer にそれぞれ 20 分間ずつ浸漬し、プレハイブリダイゼーションを行った。そこに 100 ng/ml になるようにセンスプローブまたはアンチセンスプローブを添加して、60°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、組織を 60°C に保温しておいた 4 x SSC に 5 分間ずつ 3 回、2 x SSC/50% ホルムアミドに 20 分間浸漬して RNA プローブを洗浄した。組織を 37°C に保温しておいた NTE buffer (0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に 30 分間浸し、次いで RNase (10 µg/ml) を含む NTE buffer に 30 分間反応させ、一本鎖 RNA を分解した。組織を 37°C の NTE buffer で 10

分間ずつ4回、60°Cの2 x SSCで15分間ずつ4回、60°Cの0.2 x SSCで20分間ずつ2回洗浄した。DIG Wash and Block Buffer Set(Roche Applied Science)を用いて、添付のプロトコールに従って1 x Maleic acid buffer、1 x Blocking solution、1 x Washing buffer、1 x Detection bufferを調製し、Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments(Roche Applied Science)を1 x Blocking bufferで2,000倍に希釈して抗体溶液を作製した。組織を1 x Maleic acid bufferに20分間ずつ2回浸した後、1 x Blocking bufferで2時間ブロッキング反応を行い、次いで抗体溶液へ交換して6時間抗原抗体反応させた。組織を1 x Maleic acid bufferで15分間ずつ4回、1 x Washing bufferで10分間ずつ4回洗浄した後、1 x Detection bufferに3分浸した。NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets (Roche Applied Science)を用いて、添付のプロトコールに従ってシグナルを検出した。

#### ヘマトキシリン・エオシン染色

オニテナガエビの雄性生殖器官の全体を摘出し、4°Cで一晩、Davidson固定液(33%エタノール、8%ホルムアルデヒド、11.5%氷酢酸)で固定した後、

末端膨大部と輸精管の一部を含む領域を切り取った。それを90%エタノールに45分間ずつ、99.5%エタノールに30分間ずつ、無水エタノールに30分間ずつ2回浸すことで脱水し、トルエンと無水エタノールを1:1で混合した溶液に15分間、トルエンに15分間浸すことで透徹した。その後、組織を50°Cの低融点パラフィン(Merck、USA)に30分間以上、60°Cの高融点パラフィンに5分間浸し、最後に高融点パラフィン(和光、日本)中に包埋した。パラフィンブロックから5 μmの連続切片を作製し、MASコートスライドグラス(松浪硝子、日本)へ載せ、45°Cで一晩伸展させた。次に、組織切片をキシレンに5分間ずつ2回浸すことで脱パラフィンし、無水エタノールに3分間、99.5%エタノールに3分間、90%エタノールに3分間、70%エタノールに3分間浸すことで水和させた。そして、組織切片をマイヤーのヘマトキシリン液<sup>12)</sup>に1分間浸して染色した後、30分間水洗し、次いでエオシン液<sup>12)</sup>に30秒間浸して染色した。組織切片を軽く水洗した後、70%エタノール、90%エタノール、99.5%エタノール、無水エタノール中でゆすぎ、キシレンに5分間ずつ2回浸して、MOUNT-QUICK

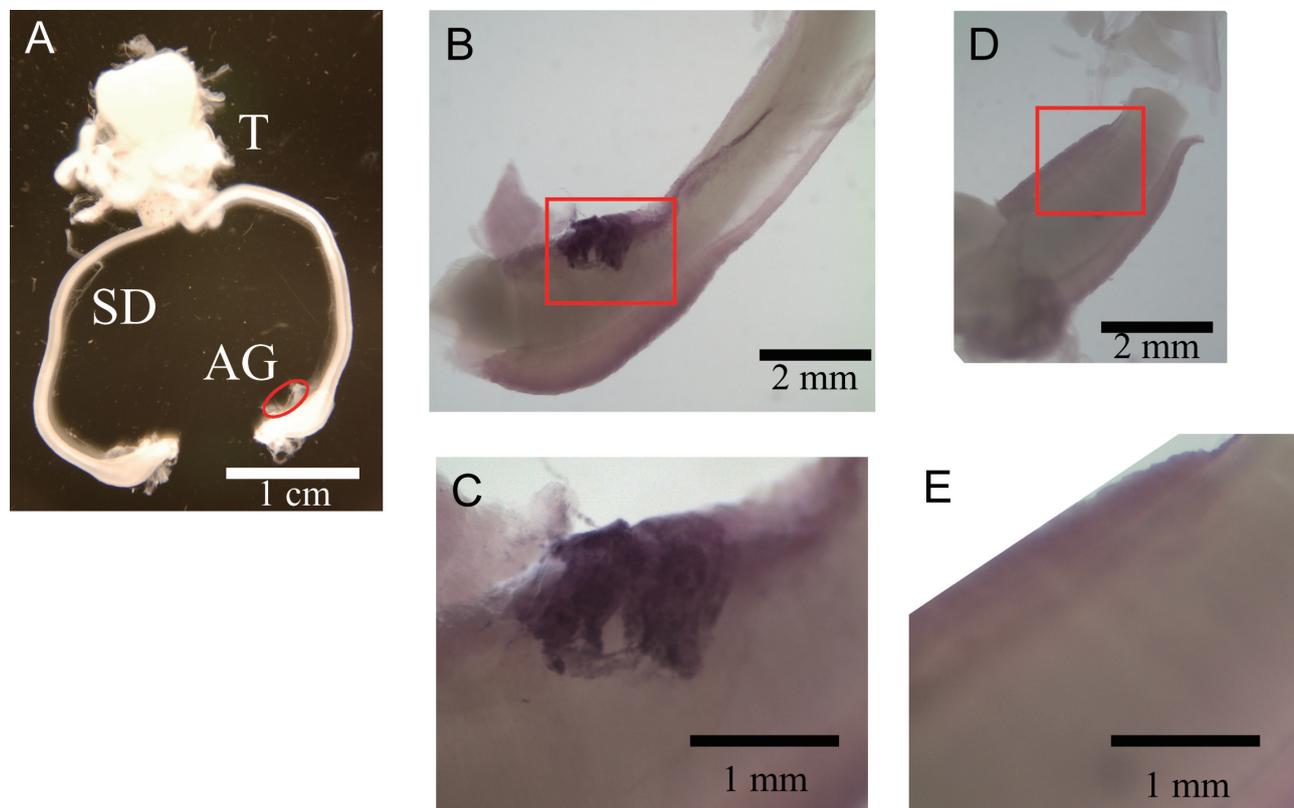


図1. オニテナガエビ IAG の cRNA をプローブに用いたホルマウント *in situ* hybridization. (A) オニテナガエビの雄性生殖器官, (B) アンチセンスプローブを用いた *in situ* hybridization, (C) B の四角で囲まれた領域の拡大図, (D) センスプローブを用いた *in situ* hybridization, (E) D の四角で囲まれた領域の拡大図である. 図中の T, SD, AG はそれぞれ精巣, 輸精管, 造雄腺を示す.

(大道産業、日本) を用いて封入した。

## 結果

### オニテナガエビ IAG の遺伝子発現を指標とした造雄腺細胞の局在解析

オニテナガエビでは輸精管末端膨大部の側面に造雄腺が付着していることが古くから知られている<sup>4)</sup>(図 1A)。本研究では造雄腺に特異的な IAG の遺伝子発現を指標として、造雄腺細胞の局在を改めて調べた。オニテナガエビ IAG の cRNA プローブを作製し、それを用いたホルマウント *in situ* hybridization を行った。その結果、オニテナガエビ IAG のアンチセンスプローブは輸精管末端膨大部の管壁に存在する細胞と特異的に反応した(図 1B、C)。一方、オニテナガエビ IAG のセンスプローブはどの細胞とも全く反応しなかった(図 1D、E)。これらの結果は、オニテナガエビ IAG のアンチセンスプローブは造雄腺細胞内に存在するオニテナガエビ IAG mRNA と特異的にハイブリダイズしていることを示しており、ゆえにオニテナガエビの造雄腺は従来の結果が示してきたとおり<sup>4,11)</sup>、輸精管末端膨大部の側面に付着していると考えられた。

### 成長に伴うオニテナガエビ造雄腺の組織像の変化

生殖能力を有する大型のオニテナガエビ(図 2)と、未熟な小型のオニテナガエビ(図 2)の輸精管末端膨大部の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。これまでの報告と同様に<sup>11)</sup>、オニテナガエビの造雄腺細胞はヘマトキシリンで濃染される楕円形の大型の核を有していた(図 3A～D)。大型のオニテナガエビと、小型のオニテナガエビの造雄腺を比較したところ、小型の個体でもはっきりとした造雄腺が観察されたが、大型の個体と比べると細胞数が少なく、大きさは小さかった(図 3A～D)。

## 討論

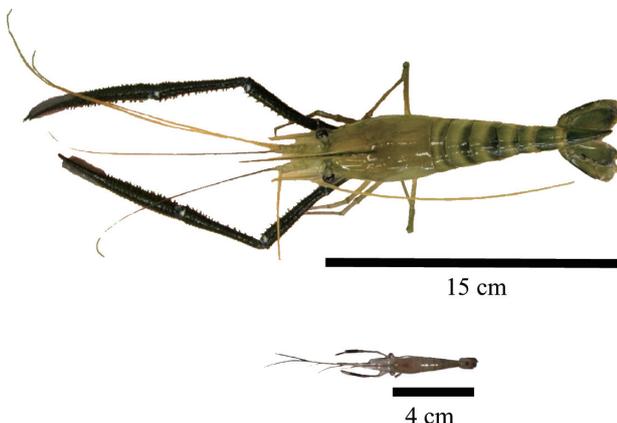


図 2. 実験に用いた大型のオニテナガエビ(上)と小型のオニテナガエビ(下)。

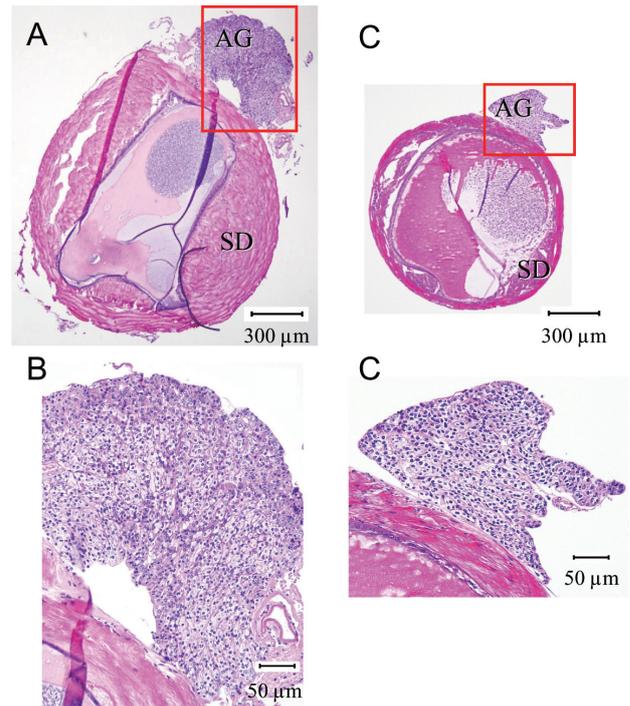


図 3. 生殖能力を有する大型のオニテナガエビ(A)と、未熟な小型のオニテナガエビ(C)の輸精管末端膨大部の横断切片に対するヘマトキシリン・エオシン染色像。BとDはそれぞれAとCの四角で囲まれた領域の拡大図である。図中のSD、AGはそれぞれ輸精管、造雄腺を示す。

オニテナガエビの IAG cDNA は造雄腺のサブトラクション cDNA ライブラリーから単離された<sup>9)</sup>。そして、オニテナガエビの IAG は造雄腺で特異的に遺伝子発現していることが組織別の RT-PCR と造雄腺の組織切片に対する *in situ* hybridization により明らかにされている<sup>9)</sup>。本研究では、オニテナガエビ IAG の cRNA を独自に作製してホルマウントの *in situ* hybridization を行った。その結果、オニテナガエビ IAG のアンチセンスプローブは造雄腺と特異的に反応したことから、オニテナガエビ IAG は造雄腺で特異的に発現していると考えられた。この結果は Ventura らの報告と一致しており矛盾するものではないが、今回の得られた結果自体には新規性は乏しい。しかし、Ventura らが行った組織切片に対する *in situ* hybridization よりも本研究で試みたホルマウントの *in situ* hybridization の方が技術的に簡便であり、短時間でシグナルを検出できることから、今後のオニテナガエビ IAG の遺伝子発現解析にとって有用な手法となると考えている。

オニテナガエビ IAG の cRNA プローブを用いたホルマウントの *in situ* hybridization により、オニテナガエビの造雄腺は輸精管末端膨大部に付着する組織であることを再確認することができた。次に、成

長段階の異なるオニテナガエビの造雄腺を比較してみた。その結果、未熟な小型の個体でもはっきりとした造雄腺が観察された。奥村と原は小型のオニテナガエビでも造雄腺が観察されることを既に報告しているが、この時の研究で用いた小型のオニテナガエビのサイズは頭胸甲長 32.0 mm の個体である<sup>13)</sup>。本研究ではそれよりも遙かに小さい個体（体長 40 mm、頭胸甲長 12.5 mm）を用いたものの、明らかに造雄腺と判別できる細胞群が観察された。しかし、生殖能力を有する大型の個体と比べると細胞数が少なく、造雄腺自体の大きさは小さかった。これらのことから、オニテナガエビの造雄腺は個体成長に伴い発達を続けながら雄の性分化を制御するとともに、性分化後の雄の性成熟に関しても何らかの役割を果たすと考えられた。

等脚目甲殻類のオカダンゴムシでは、AGH 遺伝子は 2 齢幼生から発現していることが明らかとなっている<sup>13)</sup>。この結果を考慮すると、オニテナガエビでも孵化直後のノープリウス幼生期や、その後のゾエア幼生期、ミス幼生期などの早い成長段階から造雄腺が形成されて IAG が発現している可能性がある。しかし、それら幼生は個体サイズが小さいために組織切片の作製が難しく、通常のヘマトキシリン・エオシン染色による造雄腺の観察が難しい。そこで、今後は本研究で確立したオニテナガエビ IAG の cRNA プローブを用いたホルマウントの *in situ* hybridization により、幼生期のオニテナガエビの造雄腺の発達過程を明らかにしていきたいと考えている。

## 謝辞

本研究は 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「電子顕微鏡ならびに免疫組織化学的手法によるオニテナガエビ造雄腺ホルモン様分子の局在解析」で行われたものです。ここに謝意を表します。

## 文献

- 1) Katakura Y (1961) Hormonal control of development of sexual characters in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. *Annot. Zool.* **34**: 197-199.
- 2) Suzuki S, Yamasaki K and Katakura Y (1990) Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* (malacostracan Crustacea). *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**: 283-291.
- 3) Nagamine C, Knight AW, Maggenti A and Paxman G (1980) Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**: 442-457.
- 4) Nagamine C, Knight AW, Maggenti A and Paxman G (1980) Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) with first evidence of induced feminization in a non-hermaphroditic decapod. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**: 423-441.
- 5) Khalaila I, Katz T, Abdu U, Yehezkel G and Sagi A (2001) Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **121**: 242-249.
- 6) Martin G, Sorokine O, Moniatte M, Bulet P, Hetru C and Van DA (1999) The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. *Eur. J. Biochem.* **262**: 727-736.
- 7) Okuno A, Hasegawa Y, Ohira T, Katakura Y and Nagasawa H (1999) Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**: 419-423.
- 8) Manor R, Weil S, Oren S, Glazer L, Aflalo ED, Ventura T, Chalifa-Caspi V, Lapidot M and Sagi A (2007) Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**: 326-336.
- 9) Ventura T, Manor R, Aflalo ED, Weil S, Raviv S, Glazer L and Sagi A (2009) Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Endocrinol.* **150**: 1278-1286.
- 10) Cronin LE (1947) Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Morphol.* **81**: 209-239.
- 11) Okumura T and Hara M (2004) Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zool. Sci.* **21**: 621-628.
- 12) 高田邦明, 斎藤尚亮, 川上速人 (2006) 染色・バイオイメージング実験ハンドブック 細胞や組織の形態・遺伝子・タンパク質を観るための染色法と顕微鏡観察のすべて. 羊土社, 東京.
- 13) 泉 進, 齊藤 裕, 長澤寛道, 長谷川由利子, 大平剛 (2010) 発生に伴うオカダンゴムシ造雄腺ホルモン (AGH) の発現動態の解析. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **19**: 57-60.



■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 植物の減数分裂期染色体の動態解析 —減数第一分裂中期から後期への移行期における相同染色体の分離様式—

安積良隆<sup>1,3</sup> 北村 巧<sup>1</sup> 石垣景也<sup>1</sup> 西山 歩<sup>1</sup> 大塚一郎<sup>2</sup>

Analysis of Chromosome Dynamics during Plant Meiosis.

Yoshitaka Azumi<sup>1,3</sup>, Ko Kitamura<sup>1</sup>, Hiroya Ishigaki<sup>1</sup>, Ayumi Nishiyama<sup>1</sup>  
and Ichiro Ohtsuka<sup>2</sup>

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

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

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E. mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Meiosis produces four daughter cells containing one set of chromosomes from a single mother cell containing two sets of chromosomes. This reduction of chromosome number occurs during meiosis I. In order to be distributed correctly, homologous chromosomes must pair with each other, be connected until the end of metaphase I, and separate from each other to opposite poles at the start of anaphase I. Regulation of the connection between homologous chromosomes is of great importance for genome stability through generations. We examined the final connecting structure between homologues and found that homologues were connected with each other through chromosome termini, including telomeres, instead of chiasmata.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, meiosis, chromosome, transmission electron microscope, atomic force microscope

### 序論

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) はゲノムサイズが小さい、世代時間が短い、栽培が容易などの理由から、実用的な価値はないがモデル植物として採用され、高等生物で初めてゲノムの全塩基配列が決定された<sup>1)</sup>。染色体が小さいため染色体の観察は容易ではなかったが、現在では Ross らが開発した、細胞壁を酵素処理によって消化しスライドガラス上に染色体を展開させる消化展開法によって減数分裂期の各ステージの染色体を光学顕微鏡レベルでは比較的簡便に観察することが可能となっている<sup>2)</sup>。テロメア<sup>3)</sup>やセントロメア<sup>4)</sup>の繰り返し配列が知られており、またゲノム中のどの領域でもその領域を含む BAC クローンを国際的なリソースセンター (TAIR; The Arabidopsis Information Resource) から入手することができる。1990 年代後半から減数分裂に関する変異体がシロイヌナズナで数多く単離・解析され、植物における減数分裂の分子遺伝学的研究の牽引役となっている<sup>5-7)</sup>。

コムギは人類にとって重要な穀物であり、古くから多くの研究がなされている単子葉植物のモデル生物である。2 倍体のもの ( $2n = 14$ )、4 倍体のもの ( $2n = 28$ )、6 倍体のもの ( $2n = 42$ ) があり、現存の多くの植物が倍数化によって進化を遂げたことが知られているが、その倍数化のしくみの研究材料でもある。パンコムギとして知られる通常のコムギは 6 倍体で、紀元前 5500 年ごろに生まれたとされている。1 セット (7 本) のゲノムあたり 170 億塩基対を有し、非常に大きなゲノムであるためゲノムプロジェクトは完了していないが、染色体の観察には長い歴史がある。最近ではテロメアやセントロメアの繰り返し配列が明らかになっており、また BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンなども入手可能である。本研究では 2 倍体と考えられる 1 粒小麦の *Triticum boeoticum* を使用した<sup>8)</sup>。

植物を含め、多くの高等生物は雌性配偶子と雄性配偶子が合体 (受精) する有性生殖によって次世代

を生み出す。受精をすると染色体数の倍加が起こるが、世代を通じて染色体数を一定にするために、減数分裂によって、予め配偶子の染色体数を半減させておく。減数分裂は二組ある染色体を一組に減らす分裂であり、染色体数を維持するのに不可欠なものではあるが、異常な減数分裂の結果、染色体が一本でも多かったり、あるいは少なかったりしても致命的な影響が現れる大変な危険を伴う分裂である。

減数分裂は一度の染色体複製の後、二度の核分裂が起こる。それぞれ第一分裂、第二分裂と呼ばれ、前期、中期、後期、終期からなる。減数第一分裂の前期は、染色体が細い糸状に見える細糸期（レプトテン期）、相同染色体がペアリングし始める合糸期（ザイゴテン期）、完成したシナプトネマ複合体を介して相同染色体同士が互いに接着する太糸期（パキテン期）、シナプトネマ構造が崩壊し染色体がさらに凝縮する複糸期（ディプロテン期）、凝縮がほぼ完成する移動期（ディアキネシス期）の5つの時期に分けられる。太糸期の相同染色体同士はシナプトネマ複合体と呼ばれる構造によって一方の端からもう一方の端まで密着する（対合）。複糸期には減数分裂期相同組み換えの結果生じる交差（キアズマ）が観察されるようになる。減数第一分裂中期には二価染色体が赤道面に整列し、後期には相同染色体同士が分かれて別々の極へと移動する。減数第一分裂終期には核が形成され、その中で染色体は脱凝縮する。減数第二分裂前期には染色体は再び凝縮を始め、第二分裂中期には観察されるようになった染色体が各々の赤道面に整列する。後期には今度は姉妹染色分体間の分離が起こり、それぞれ違う極へと移動する。終期には1つの母細胞から4つの核が形成され、最終的に4つの細胞がつくられる。

減数分裂と体細胞分裂の最も重要な違いは第一分裂前期に Spo11<sup>9)</sup>（シロイヌナズナでは AtSPO11<sup>10)</sup>）による染色体 DNA の二本鎖切断に始まる減数分裂期相同組換え反応を利用して相同染色体同士が対合することで、このことが相同染色体の正常な均等分配の前提条件となる。相同染色体同士が対合しない変異体や連結を減数第一分裂中期が終わるまで維持できない変異体では相同染色体の分配は不均等になり（不分離）、異常な配偶子が形成される。つまり太糸期以後も相同染色体は連結された二価染色体の状態を減数第一分裂後期が始まるまで維持していなければならない。一般に相同染色体同士は複糸期以降、減数第一分裂中期の終わりまでキアズマによってつながれているものと考えられているが、はっきりとした証拠があるわけではない。我々は相同染色体同士を最終的に連結しているのはテロメアを含む

染色体の末端構造である可能性を考えている。このまだ解明されていない相同染色体同士を最後まで連結し、またその連結を協調的に解消するしくみを明らかにするため、シロイヌナズナとコムギの相同染色体を連結している構造（最終連結構造）を FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) 法と電子顕微鏡観察によって調べることにした。

## 材料と方法

### 実験植物

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、神奈川県・湘南ひらつかキャンパス内の植物育成棟内で栽培した。60  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  の白色光、14 時間 10 時間の明暗周期、気温 24°C、湿度 60% の条件下で、培養土にハイポネックスを週に一度与えながら栽培した。播種後、5～7 週間目の植物の花序を採取し、ファーナー液 (Ethanol: Acetic Acid, 3:1) 中、室温で 20 時間程度置くことによって固定した。その後は -20°C で保存した。

1 粒コムギである *Triticum boeoticum* は神奈川県湘南ひらつかキャンパス内にある温室で促成栽培した。10 月にシャーレの中で催芽した後、植木鉢の土壌に移植した。自然光下で栽培しながら 3 月上旬に減数分裂を行うように光環境と気温を調節した。穂の発育状況を観察し、一部の小花から雄しべを採取し、花粉母細胞の染色体を酢酸カーミンで染色して、減数分裂期にある小花を推定した。その雄しべをファーナー液で固定した。室温に 1 晩静置した後、4°C で保存した。

### 花粉母細胞の消化とスライド標本の作製

花粉母細胞の染色体試料作製は Azumi らの方法<sup>11)</sup>に従った。固定した試料を Milli-Q 水、さらに 10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) 中で洗った後、cytohelicase (Sigma)、cellulase “ONOZUKA” R-10 (Yakult)、pectolyase (Kikkoman) (各 0.4%(w/v)) を含む同緩衝液中、適宜脱気をしながら、37°C 3 時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4°C で保存した。60% 酢酸中に細胞壁消化済の花序を浸した。スライドガラス上に 60% 酢酸を滴下し、その中に適当な蕾を移し、柄付き針を使用して蕾から葯を取り出して破碎して花粉母細胞を拡散させた。45°C のヒートブロックにスライドガラスを 1 分間置き、細胞をスライドガラスに貼り付かせた。ファーナー液で洗浄し、風乾した。

### プローブの作成

テロメアプローブはコムギにもシロイヌナズナにも

存在するテロメア領域の繰り返し配列 TTTAGGG をターゲットとした。TTTAGGG を 6 回繰り返すオリゴヌクレオチドと CCCTAAA を 6 回繰り返すオリゴヌクレオチドを鋳型兼プライマーとして使用し、Cy3-dCTP (GE ヘルスケア) を含む反応液で PCR を行い、作成した。

シロイヌナズナ用 BAC クローン F7F13 は第一染色体の 28245 kbp ~ 28309 kbp の領域を、F22G18 は第一染色体の 270 kbp ~ 378 kbp の領域を、F12G19 は第一染色体の 1512 kbp ~ 1593 kbp の領域を、F15A17 は第五染色体の 697 kbp ~ 796 kbp の領域を組み込んでいる。Purelink™ Hipure Plasmid Midiprepkit (invitrogen) を用いて BAC クローンから DNA を精製した。HinfI, BmgT120I, EcoT14I, BanII, EcoRI (Takara) で消化した。Amersham™ Megaprime labelling system (GE Healthcare) を用いて DNA を合成する際に鋳型として用い、Cy3-dCTP (GE Healthcare) また Alexafluor488-5-dUTP (invitrogen) を合成された DNA に取り込ませた。エタノール沈殿後、遠心分離によってプローブ DNA を回収した後、50% ホルムアミド / 2 × SSC に溶かしてハイブリダイゼーション溶液を作製した。

### FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization)

風乾したスライド標本をファーマー液 (酢酸:エタノール=1:3) に 30 分間浸した後、再度風乾した。各スライド標本を TE バッファーに溶かした 100 µg / ml RNaseA を 50 µl ずつ滴下し、パラフィルムを被せた後、37°C に 30 分間、保湿した。パラフィルムを取り除いた各スライド標本を 2 × SSC に浸けて (5 分間 × 2 回) 洗浄した後、10 mM 塩酸 / 35 units / ml ペプシン (Wako) に 2 分間浸した。2 × SSC に浸して (5 分間 × 2 回) 洗浄後、4% パラホルムアルデヒドに各スライド標本を 10 分間浸した。各スライド標本を 2 × SSC に浸して (5 分間 × 3 回) 洗浄し、エタノール系列 (70%, 90%, 100%) に 3 分間ずつ浸して脱水を行った。脱水後のプレパラートは室温で風乾した。

前処理が終わった各スライド標本に作製したハイブリダイゼーション溶液を 20 µl ずつ滴下し、パラフィルムを被せた。各スライド標本を 72°C に 2 分間置いた後、37°C に保湿条件で一晩置いて DNA プローブと染色体をハイブリダイズさせた。その後、各スライド標本を 50% ホルムアミド / 2 × SSC、2 × SSC、1 × SSC に 30 分間ずつ浸して洗浄して、各プレパラートに DAPI を滴下してカバーガラスで封入した。

染色体は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX60, BX61) を使用して観察した。染色体像は、デジタルカメラ DFC300FX (LEICA) と ORCA C4742-95 (浜松ホトニクス) を用いて撮影した。画像の処理には Photoshop CS3 (Adobe) と Image-Pro plus (日本ローパー) を用いた。

### 透過型電子顕微鏡観察

Albani の方法<sup>12)</sup>に従い、プラスチックシャーレ (IWAKI) をクロロホルムに溶かし、0.9% (w/v) コーティング溶液を作製した。コーティング溶液にスライドガラス (松浪) を 1 分間浸し、すばやく引き上げ、乾燥させることによってスライドガラス上にプラスチックの薄膜を作製した。

消化した花序をシャーレ上の 60% 酢酸中に移した後、適当な大きさの蕾を選抜し、同じシャーレ上の 60% 酢酸中で解剖した。葯をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、プラスチックの薄膜の上に移し、45°C のホットプレート上に 30 秒間保温した。氷冷したファーマー液を周囲に滴下し、緩やかに混和させた後、ファーマー液を捨て、スライドを乾燥させた。4% パラホルムアルデヒド、0.05% TritonX-100, PBS 溶液を細胞のある位置に滴下し、20 分間室温で保存した。超純水で洗浄後、乾燥させた。20% 硝酸銀、1% ゲラチン、0.5% 蟻酸溶液を細胞に滴下し、55°C のホットプレート上で 150 秒間保温することで染色した。超純水で洗浄し、乾燥させた後、細胞のある部分の周りをカッターで切り、水中で細胞のある部分だけを浮遊させた。電子顕微鏡観察用のグリッドで薄膜をすくい、乾燥させた。

透過型電子顕微鏡 JEM2000EX (JEOL) を用いて観察を行い、撮影したフィルムをスキャナーで取り込み、デジタル画像を取得した。画像は Photoshop (アドビ) を用いて加工した。

## 結果

### シロイヌナズナを用いた解析

シロイヌナズナは植物体として小さく、世代時間が短いため、容易に減数分裂を行っている実験材料を手に入れることができる。またモデル植物に採用されたためゲノムの全塩基配列が決定されており、ゲノム上のほとんどの領域に対応する BAC クローンが入手可能である。シロイヌナズナの減数第一分裂中期の染色体を DAPI で染色して観察すると、両末端で相同染色体同士が連結しているように見える。そこでテロメアの繰り返し配列やテロメア付近の領域に対するプローブを作成し、FISH を行うことによって、テロメアと最終連結構造との関係を調べる

ことにした。

シロイヌナズナの細胞は第一から第五の 5 本の染色体を 2 本ずつ持ったため 10 本の染色体を有する。それぞれの染色体の両末端にテロメアがあり、第一染色体のセントロメア付近にはテロメアの繰り返し配列が存在するため、全てのテロメア繰り返し配列を検出することができれば 22 のシグナルが観察される。しかし減数第一分裂中期では染色体はもっとも凝縮しているため、全ての染色体を検出することは困難であった。多くの場合 10 から 20 のシグナ

ルを観察することができた。シロイヌナズナの場合相同染色体同士は通常二か所で連結されていることが示されており、その時の二価染色体はひし形に見える。二か所の連結部分の解消の時期がずれると、ひし形だったものが開いたくの字型に見える。テロメアのシグナルは連結部分か、あるいはくの字の両末端に観察された (図 1B、1F、2D)。いくつかのテロメアは検出することはできなくても全体的なテロメアの配置は推測することができ、着目した染色体のテロメアと最終連結構造との関係を調べること

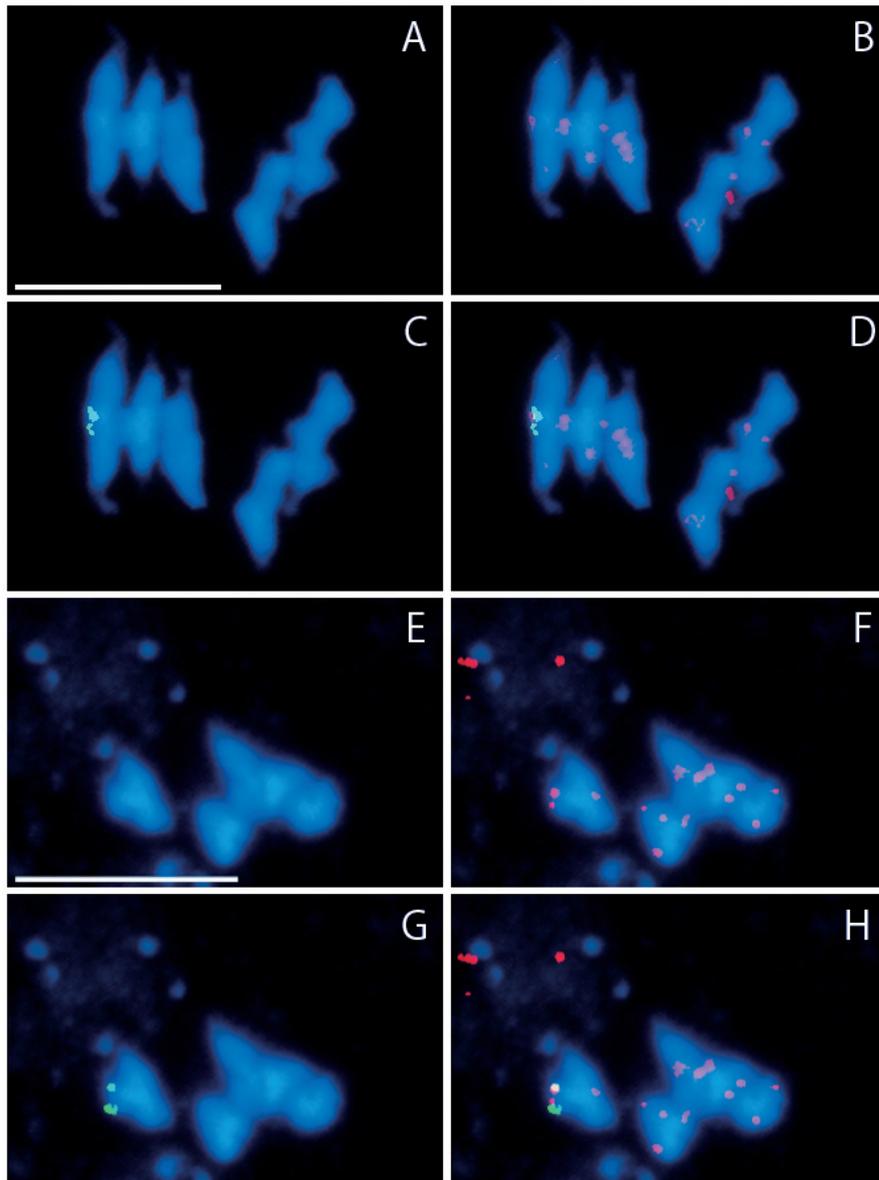


図 1. シロイヌナズナ第一染色体の F7F13 BAC クローン領域に対するプローブを用いた FISH. 消化したシロイヌナズナの花粉母細胞をスライドガラスに展開し、テロメアプローブと F7F13 BAC クローンプローブをハイブリダイズさせた。A, B, C, D と E, F, G, H はそれぞれ同じ細胞の画像で、いずれも減数第一分裂中期の細胞である。A, E; DAPI 染色。B, F; テロメアプローブシグナル (赤)。C, G; F7F13 BAC クローン領域に対するプローブのシグナル (緑)。D, H; DAPI 染色画像にシグナルを重ね合わせたもの。スケールバー; 10  $\mu$ m.

ができた。減数第一分裂中期の最終段階では染色体の末端付近で連結していると結論することができる。

テロメアと最終連結構造の関係をより明確にするために、テロメアよりやや内側の領域に対するプローブを BAC クローンから作成し、テロメアプローブと同時に使用して多重 FISH を行った。第一染色体の 270 kbp ~ 378 kbp の領域をコードする F22G18 クローンや、第一染色体の 1512 kbp ~ 1593 kbp の領域をコードする F12G19 クローン、第五染色体の 697 kbp ~ 796 kbp の領域をコードする F15A17 クローンをを用いた場合など、いずれの場合もこれらの領域よりもテロメア側で相同染色体同士は連結していることが判明した。

蛍光顕微鏡による観察は染色体の構造自体を観察していないので、連結構造をより高解像度で解析するために電子顕微鏡を用いることにした。昨年度の報告と同様に、細胞壁をサイトヘリカーゼで消化した花粉母細胞をプラスチックの薄膜上に展開し、硝酸銀で染色したものを透過型電子顕微鏡で観察した。この方法で観察される染色体はこれまでの光学顕微鏡で観察されたものよりも明瞭な形態を示した。減数第一分裂中期の最終段階の相同染色体対は紡錘体からの張力によって引き離されてかかっており、多くの染色体は末端部分のみで連結しており、どの染色体もかなり大きな領域で互いに結合している様子が明らかになった (図 3A)。

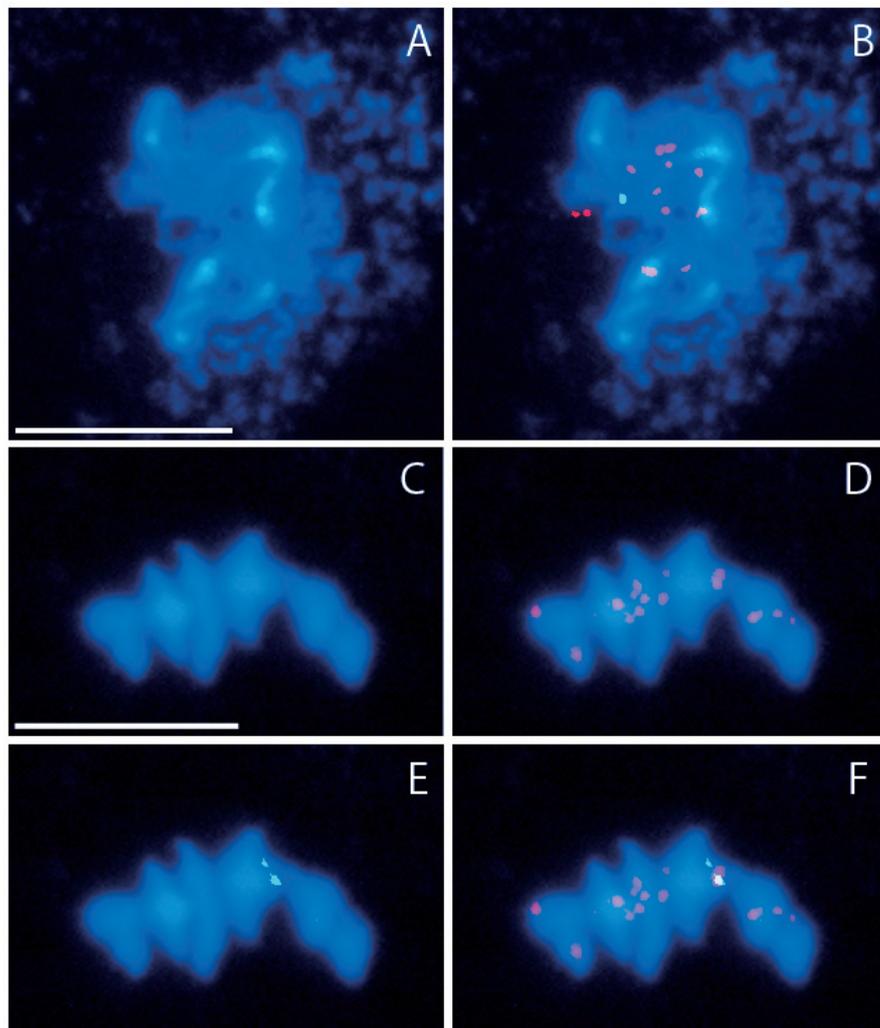


図 2. シロイヌナズナの第一染色体の F12G22 BAC クローン領域に対するプローブを用いた FISH. 消化したシロイヌナズナの花粉母細胞をスライドガラスに展開し、テロメアプローブと F12G22 BAC クローンプローブをハイブリダイズさせた。A, B と C, D, E, F は同じ細胞。A, B は太糸期、C, D, E, F は減数第一分裂中期。A, C; DAPI 染色。B, F; DAPI 染色画像にテロメアプローブのシグナルと F12G22 BAC クローンシグナルを重ね合わせたもの。D; テロメアシグナル (赤)。E; F12G22 BAC クローンシグナル F12G22 BAC クローンシグナル。スケールバー ; 10  $\mu$ m。

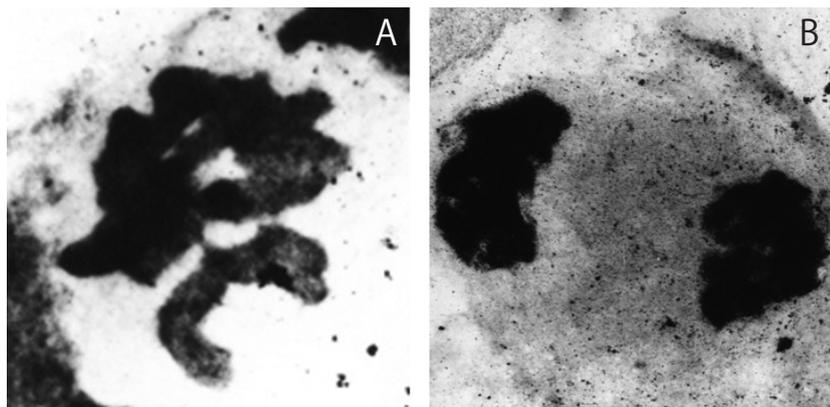


図3. シロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期染色体の電子顕微鏡像. 消化した花粉母細胞をプラスチックの薄膜上に展開し, 硝酸銀で染色した後, 透過型電子顕微鏡で観察した. A; 減数第一分裂中期, B; 減数第一分裂後期.

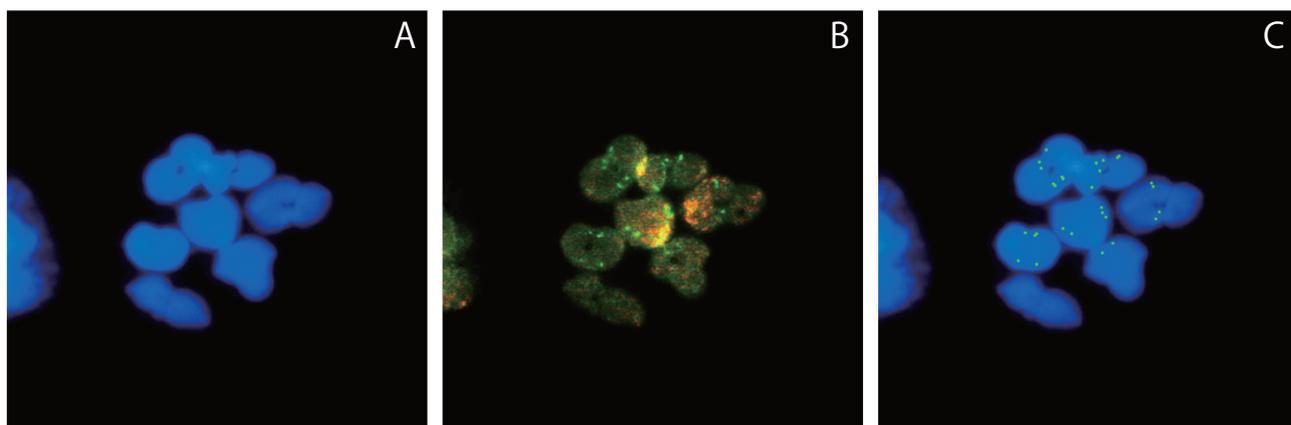


図4. コムギの減数第一分裂中期染色体に対するFISH. 2倍体コムギ ( $2n = 14$ ) の花粉母細胞の減数第一分裂中期の染色体に対してテロメアのプローブを使用してFISHを行った. A; DAPI染色, B; テロメアプローブ(緑), C; DAPI染色像にテロメアシグナルを重ねたもの.

## 2倍体コムギを用いた解析

通常のコムギは小麦粉などの原料となるものでパンコムギで、6倍体で42本の染色体を持っている。染色体数が多いと重なり合って個々の染色体の解析が困難になるので、本研究では14本の染色体を持つ2倍体コムギを使用した。コムギのテロメアもシロイヌナズナのテロメアと同じ繰り返し配列を持っていることが報告されている。シロイヌナズナの場合と同様に、テロメアの蛍光プローブを調製してFISHを行った。

減数第一分裂中期では7対の2価染色体が観察された(図4)。コムギの染色体はシロイヌナズナよりもかなり大きい。この時期は非常に高度に凝縮するため、やはり縦軸方向にあまり長さが感じられない。それでも湾曲した相同染色体同士が末端部分と思われる領域で結合している様子が観察される。テロメアプローブのシグナルはいずれの染色体でも相同染色体同士の連結部分で検出された(図4C)。

## 討論

減数第一分裂前期の相同染色体の対合とその後の第一分裂中期の最後まででの連結の維持は、相同染色体

を均等に分配し、正常な配偶子を形成するのに必須の過程である。減数第一分裂前期の細糸期から合糸期にかけて、相同染色体間で減数分裂期相同組み換えと呼ばれる特殊な組み換え反応が進行し、相同染色体同士の対合が始まる。相同組み換え反応が進行した結果、交差が形成される。太糸期には相同染色体同士がシナプトネマ複合体によって片方の末端からもう片方の末端まで接着するが、複糸期になるとシナプトネマ複合体は分解し、染色体間の連結部位が観察されるようになる。この複糸期に見られる連結構造が交差であるため、相同染色体の連結を維持する構造は相同染色体間の交差であるとこれまで信じられてきた(キアズマ連結説とここでは呼ぶことにする)。しかし、多くの減数第一分裂中期の染色体像では相同染色体同士は末端部分で連結している様子を映し出している。また我々自身の予備的なFISH解析も相同染色体同士は末端部分で連結していることを支持する結果を示した(テロメア連結モデル)。キアズマ連結説に対し疑問を抱き、我々はシロイヌナズナとコムギを実験材料とし解析を行った結果、テロメアが連結構造に深く関係していることを示すデータを得た。

シロイヌナズナではテロメアとその近辺の領域に対するプローブを用いた多重 FISH 解析により、連結部位が染色体の非常に末端に近い部分で、テロメアを含む領域にほぼ間違いないことを示した(図 1、2)。電子顕微鏡を用いた解析も相同染色体同士は最終的には末端領域で連結していることを示した(図 3)。最近ではヘリカーゼと考えられる *AtRECQ4A* の遺伝子産物が我々の言う最終連結構造に解消に関与している可能性を示す報告もある<sup>13)</sup>。染色体がシロイヌナズナより大きく、詳細な観察が可能と考えられるコムギを用いた FISH 解析も行った。テロメア配列をプローブとして利用したが、コムギの減数第一分裂中期の最終段階では相同染色体同士はテロメアを含む末端領域で連結しているのが示された。

これらのデータは、複糸期では相同染色体を連結している構造は交差であることは正しいと考えられるが、第一分裂中期の相同染色体を連結しているものは、染色体の末端付近に形成されるテロメアを含む構造であること示唆している。テロメアは染色体の DNA 上領域の名称として使われたり、DNA や蛋白質などを含む染色体の末端構造を示すのに使われるが、この相同染色体を最後まで連結している最終連結構造は相同染色体の片方の染色体の DNA ともう片方の染色体の DNA が直接、連結しているものではなく、テロメアを含む染色体の末端構造間での連結であると考えられる。移動期から第一分裂中期は初期にかけて、相同染色体同士は凝縮した段階で再度接着が起こるのが観察されているが、これには何らかの接着因子が関連していることが予想される。この接着因子が本当に存在するのか、存在するならば何であるかなどは不明であるが、存在すると仮定すると、その染色体全体を接着させる接着因子の染色体が分離する際の最終的な名残として染色体の末端部分が連結するのか、あるいは全体的な接着を補強する構造が末端部分に形成されて、それが最終連結構造として機能している可能性が考えられる。このモデルの証明にはこの最終連結構造に関与する蛋白質などの構成因子の解明が必要である。

## 謝辞

本研究は神奈川大学 総合理学研究所 共同研究助成の補助金を得て実施された。

## 文献

- 1) Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.
- 2) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
- 3) Richards EJ and Ausubel FM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127-36.
- 4) Murata M, Ogura Y and Motoyoshi F (1994) Centromeric repetitive sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Jpn. J. Genet.* **69**: 361-70.
- 5) Azumi Y, Dehua Liu, Dazhong Zhao, Wuxing Li, Guanfang Wang, Yi Hu and Hong Ma (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* **21**: 3081-3095.
- 6) Wijeratne AJ, Chen C, Zhang W, Timofejeva L and Ma H (2006) The *Arabidopsis thaliana* PARTING DANCERS gene encoding novel protein is required for normal meiotic homologous recombination. *Mol. Biol. Cell* **17**: 1331-1343.
- 7) Mercier R and Grelon M (2008) Meiosis in plants: ten years of gene discovery. *Cytogenet Genome Res* **120**: 281-290.
- 8) Ohtsuka I (1991) Genetic differentiation in wheat nuclear genomes in relation to compatibility with *Aegilops squarrosa* cytoplasm and application to phylogeny of polyploid wheat. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **65**: 127-198.
- 9) Klapholz S, Waddell CS and Esposito RE (1985) The role of the SPO11 gene in meiotic recombination in yeast. *Genetics* **110**: 187-216.
- 10) Hartung F and Puchta H (2000) Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1548-54.
- 11) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence *in situ* hybridization procedure applicable to whole stages of male meiosis of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Sci.* **5**: 1-6.
- 12) Albani SM (1994) A karyotype of the *Arabidopsis thaliana* genome derived from synpatonemal complex analysis at prophase I of meiosis. *Plant J.* **5**: 665-672.
- 13) Higgins JD, Ferdous M, Osman K and Franklin FC. (2011) The RecQ helicase AtRECQ4A is required to remove inter-chromosomal telomeric connections that arise during meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Plant J.* **65**: 492-502.



■原 著■ 2010 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## 中心体を有する植物（イチョウ）における イトマキヒトデの精子中心体 DNA 相同配列の探索

河合 忍<sup>1,4</sup> 出川洋介<sup>2</sup> 日野晶也<sup>1,3</sup>

Comparison of Homologous Sequences Obtained from *Ginkgo biloba*  
with the Sperm Centrosomal DNA of Starfish

Shinobu Kawai<sup>1,4</sup>, Yousuke Degawa<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> Sugadaira Montane Research Center, University of Tsukuba, Sugadaira Kogen Ueda, Nagano 386-2204, 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:** Ginkgo and Cycads are unique seed plants since they produce spermatozoids. Similar to animal sperm, the sperm of plants belonging to the genus *Ginkgo* (Gymnospermae) have many centrosomes because of the presence of centrioles/centrosomes in their spermatozoids. Recently, we found a novel DNA sequence in the sperm centrosome of the starfish *Asterina pectinifera*. Similar DNA sequences were also found in the sperm of several animals and bryophytes. In the present study, we performed PCR analysis of the total DNA of *Ginkgo biloba* using a centriolar-specific DNA primer. This pair of primers was designed to specifically amplify centrosomal DNA of starfish. We found that the size of amplified PCR products was similar to those of starfish, i.e., approximately 500 bps. We determined nucleotide sequence similarities in the DNA of these PCR-amplified products of Ginkgo plants. The nucleotide sequences of *G. biloba* showed high homology (95% identity) with those obtained from the centrosomal DNA of starfish. Our results show that plants of the genus *Ginkgo* have a conserved sequence that is similar to the starfish sperm centrosomal DNA sequence and this unique DNA may exist in gymnosperms. We discussed whether this unique DNA sequence could also exist in other eukaryotic cells.

**Keywords:** seed plant, *Ginkgo*, sperm, centrosome, Gymnospermae

### 序論

イチョウは植物の進化を研究する上で重要な生物と考えられている。種子植物であるイチョウとソテツ類はシダ植物やコケ植物と同様に、配偶子に精子を持ち卵細胞と精子による接合（受精）による生殖機構を有しているためである<sup>1)</sup>。イチョウの精子は1896年、平瀬作五郎により世界で初めて、種子植物において発見され、続いて池野成一郎により発見されたソテツの精子とともに、広く知られている。イチョウやソテツの精子はシダ植物の精子と同様に多数の鞭毛をもつ<sup>2)</sup>。一方、コケ植物の精子は2本の鞭毛を有している。コケ植物では1900年代

の初めに池野成一郎によりゼニゴケの精子を用いた観察が報告されている<sup>3)</sup>。コケ植物や藻類では鞭毛を生じる基部の構造は、基底小体または鞭毛基部体と呼ばれることが多いが、これらは動物細胞の中心粒もしくは中心小体とよばれる基部構造と相同である<sup>4)</sup>。動物や菌類など1本の鞭毛を持ち、鞭毛とは反対方向に泳ぐ特徴でまとめられるグループであるopisthokontaの精子や遊走子の場合、鞭毛は1対の中心小体の片方（母中心粒）からのみ形成される。しかし、藻類やコケ植物の精子の鞭毛は2本形成されており、1対の中心粒それぞれから形成される。

即ち、植物の鞭毛の基本単位数は2本である。

鞭毛形成における動物と植物の違いは、近年、真核生物全体の進化と関連づけて考えられている。Cavalier-Smith ら<sup>5)</sup>は、ミオシンのドメイン領域の比較解析に基づき、真核生物では、まず最初に動物の祖先型原始真核生物 unikonta から植物の祖先型真核生物 bikonta が分岐したことを示している。真核生物の鞭毛は中心小体（中心粒）から形成され、特に中心体と呼ばれる構造は、2つの中心小体（中心粒）が互いに直角に位置する構造とそれをとりまく周辺物質を合わせた領域を指す。中心小体や中心体がない細胞からは鞭毛や繊毛は形成されないことから、真核生物におけるオルガネラとしての中心体の役割は鞭毛形成であると考えられている。共生説においても中心体の役割は鞭毛形成と捉えられ、Margulis (1970) は、真核生物の運動器官として鞭毛の起源をスピロヘータ様の原核生物の共生によると考えた<sup>6)</sup>。真核生物の鞭毛がミトコンドリアや葉緑体のように共生起源であるならばミトコンドリアや葉緑体が核ゲノム DNA とは別に独自の DNA を保持しているように、鞭毛基部、即ち中心小体にも中心体独自の DNA が存在する可能性が考えられる。

我々はイトマキヒトデの精子中心体分画より新奇の DNA を抽出・精製した<sup>7)</sup>。この新奇 DNA の塩基配列の一部を決定し、配列をもとに CS プライマーを設計した。設計したプライマーは新奇 DNA の塩基配列の約 500 bp を PCR により増幅できる<sup>8)</sup>。CS プライマーによる PCR 解析によりイトマキヒトデ以外にも同じ棘皮動物のバフンウニの精子について解析したところ、相同な塩基配列が検出された<sup>9)</sup>。この CS プライマーにより増幅されたバフンウニの PCR 産物の塩基配列はイトマキヒトデの精子中心体に局在する新奇 DNA の塩基配列と 98% 以上の相同性を示した。その他、マウス、ショウジョウバエなど多くの動物細胞から同様に PCR 産物が増幅され 95% 以上の相同性を示す塩基配列が検出された。さらに、動物と同様にコケ植物のヒメツリガネゴケ（蘚類）やゼニゴケ（苔類）の精子からも相同配列が検出された。いずれもイトマキヒトデの新奇 DNA の塩基配列と 95% 以上の相同性があった<sup>10)</sup>。

イトマキヒトデの精子中心体分画より発見した新奇 DNA は、これまでにゲノム解析が完了している種を含め、動物のみならずコケ植物においてもゲノム以外の中心体に局在する DNA であることが示唆されている<sup>7-9)</sup>。そこで本研究は動物やコケ植物と同様に精子を形成する裸子植物のイチョウを用いて、種子植物においてもイトマキヒトデの中心体 DNA

と相同な DNA 配列が検出されるか否かを明らかにすることを目的とした。まず CS プライマーを用いた PCR による増幅の有無を確認し、塩基配列の比較を行った。また、裸子植物のイチョウとコケ植物の配列の比較の為に、蘚類のヒメツリガネゴケから CS プライマーにより増幅された相同配列とイチョウの配列についても比較解析を行った。

## 材料と方法

### イチョウの採集

イチョウ (*Ginkgo biloba* L.) の雄花は平塚市市街地に街路樹として植栽されたものより 2010 年 4 月に採集した。採集した雄花は $-30^{\circ}\text{C}$ で保存し DNA 抽出に用いた。イチョウの葉は同所及び、神奈川大学湘南ひらつかキャンパス内のイチョウより採集したものをを用いた。

### イチョウの DNA 抽出と精製

イチョウの雄花及び雄株の葉の total DNA は、QIAGEN DNeasy plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出及び精製を行った。それぞれの精製した DNA 溶液は $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存し、その後 PCR の鋳型 DNA として用いた。

### PCR の条件

イチョウの雄花の total DNA 及び雄株の葉の total DNA を鋳型 DNA として、HotSar Taq Master Mix (QIAGEN) を用いて、 $95^{\circ}\text{C}$  15 min、( $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $53^{\circ}\text{C}$  30 sec,  $72^{\circ}\text{C}$  1min) を 35 cycles その後、 $72^{\circ}\text{C}$  10 min、 $4^{\circ}\text{C}$  10 min で増幅反応を行った。イトマキヒトデの精子中心体 DNA の増幅及び、相同配列の増幅及び塩基配列決定における DNA の増幅には CS プライマーを用いて増幅させた<sup>10)</sup>。

植物細胞の指標として葉緑体遺伝子の RuBisCo の Large subunit の DNA 塩基配列の約 350 bp の検出には forward primer: 5' -AGTAACTTTAGGTTTCGTAG-3' と reverse primer: 5' -TTTCCAAATTTACAAGCAG-3' を用いた。

### 塩基配列の解析

シーケンス反応には BigDye Terminator v.3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた。シーケンスは 310 Genetic Analyzer で解析し、GENETYX-MAC, version 9.0 (software Development Co.,Ltd., Tokyo, Japan) によりアライメントを行なった。

## 結果

### イチョウの PCR による解析

イチョウの雄花及びイチョウ雄株の葉の組織よりそれぞれ total DNA の抽出と精製を行い、各 DNA を得た。CS プライマーを用いた PCR の結果を図 1 のレーン 1 から 4 に示す。図 1 のレーン 1、及びレーン 2 からイチョウの DNA を鋳型とした PCR の結果、およそ 500 bp の PCR 産物が確認された。イチョウの雄花と雄株の葉の組織の total DNA については、葉緑体 DNA の遺伝子産物である RuBisCo の DNA の Large subunit の塩基配列の約 350 bp を増幅可能なプライマー (RuBisCo primer) を用いた PCR を試みた。イチョウの雄花の total DNA を鋳型にした PCR の結果を R1 に示し、イチョウの雄株の葉の組織の total DNA を鋳型とした PCR の結果を R2 に示した。どちらも約 350 bp の PCR 産物の増幅が確認された (図 1、R1、R2)。

ヒメツリガネゴケも比較の為にイチョウの場合と同様に total DNA の抽出及び精製を行い PCR による解析を行った結果を図 1 に示した。CS プライマーを用いた PCR の結果、イトマキヒトデと同様に、ヒメツリガネゴケからも 500 bp の PCR 産物の増幅が確認された (図 1、レーン 3)。

### ヒメツリガネゴケとイチョウの CS プライマーによる PCR 産物の塩基配列の比較

イチョウの雄花の total DNA を鋳型にした CS プライマーによる PCR 産物はイチョウの雄株の葉の組織の total DNA を鋳型にした PCR 産物と同様に、どちらも 500 bp の増幅産物が得られた。そこで、イチョウの雄株の PCR 産物の塩基配列を決定した。また、ヒメツリガネゴケの total DNA から CS プライマーにより増幅された 500 bp の PCR 産物については既に塩基配列を決定している。決定したそれぞれの塩基配列について比較したところ、CS プライマーを用いた PCR によりイチョウから検出された DNA の配列 489 塩基対とヒメツリガネゴケから同様に検出された DNA の配列 485 塩基対は 98% 以上の相同性があることが示された。

CS プライマーを用いた PCR の結果、得られたイチョウの PCR 産物の塩基配列とヒメツリガネゴケから得られた塩基配列の比較の結果を図 2 に示した。上段にはヒメツリガネゴケ、下段にイチョウの塩基配列として、ヒメツリガネゴケとイチョウの塩基配列が一致した塩基は塗り潰し赤色で示した模式図を作成した (図 2)。比較した両者の塩基が一致しなかったものはそれぞれの塩基を表した。イトマ

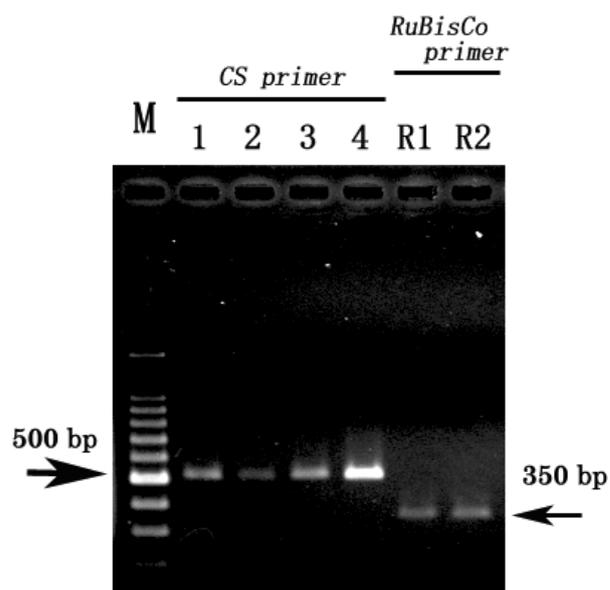


図 1. イチョウ及びヒメツリガネゴケの PCR による電気泳動像. レーン 1 はイチョウの雄花, レーン 2 はイチョウの葉, レーン 3 はヒメツリガネゴケ, レーン 4 はイトマキヒトデの CS プライマーによる PCR の結果を示す. R1 はイチョウの雄花, R2 はイチョウ葉の RuBisCo のプライマーによる PCR の結果. M は 100 bp ラダーマーカー.

キヒトデとイチョウでは一致した塩基を示したがヒメツリガネゴケに特有の塩基置換部位は 3 塩基が確認された (図 2、紫の置換部位)。また、ヒメツリガネゴケとイトマキヒトデでは一致しているがイチョウ特有の塩基置換部位を黄色の塩基置換部位で示した (図 2)。

### イチョウの増幅配列とイトマキヒトデの中心体 DNA の塩基配列との比較

イトマキヒトデの精子中心体 DNA をもとに CS プライマーにより増幅される塩基配列とイチョウから同様に得られた塩基配列とを比較した結果は、図 3 に示した。イトマキヒトデの塩基配列とイチョウの塩基配列が一致した箇所は黄緑色で塗り潰し模式図を作成した。イチョウとイトマキヒトデの配列比較から、イチョウの 5' 末端の GATTT はイトマキヒトデの配列と一致しており、イトマキヒトデでは更に 3 塩基だけ (5'-TTC-) 長いことが示された (図 3)。

塩基配列の相同性の解析の結果、イチョウとイトマキヒトデは 95% 以上の相同性があることが明らかとなった。イチョウの配列のうち 23 塩基が置換もしくは欠損していた。しかし、その中で 19 塩基は、ヒメツリガネゴケの塩基配列とイチョウの塩基配列は一致していた。イチョウとヒメツリガネゴケの共通塩基部位を緑で示した (図 3、イチョウ及びヒメ



図 2. CS プライマーを用いた PCR により増幅されたイチョウとヒメツリガネゴケの塩基配列の相同性. ヒメツリガネゴケ 485 塩基とイチョウ 489 塩基について 98% の相同性が確認される. 紫色で示した 3 つの塩基は、ヒメツリガネゴケの特有の塩基置換部位であり、同箇所の塩基はイチョウとイトマキヒトデは一致している.

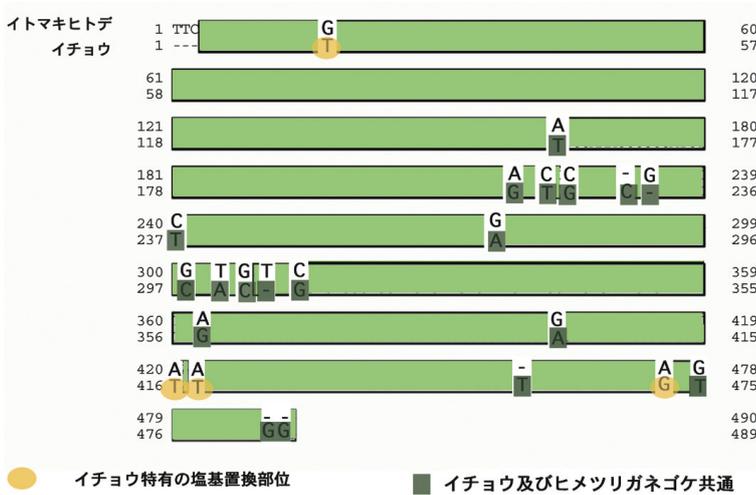


図 3. イトマキヒトデ精子中心体 DNA の塩基配列と CS プライマーにより増幅されたイチョウの塩基配列の比較. イトマキヒトデの 490 塩基とイチョウの 489 塩基の相同性は 95% である. イチョウとヒメツリガネゴケの相同塩基部位は 23 塩基中 19 塩基確認される (緑で示す塩基), イチョウ特有の塩基置換部位は黄色で示す 4 塩基確認される.

ツリガネゴケ共通部位)。本実験において、イチョウとヒメツリガネゴケの 2 種の植物について比較した結果 (図 2) から、イチョウ特有の塩基置換部位が 4 つ存在することが判明した (図 3、イチョウ特有の塩基置換部位; 図の黄色で示された塩基)。

## 討論

### イチョウにおける精子の意義

真核生物において、現存する動物細胞は 1 鞭毛性だが、2 鞭毛性の真核生物は 1 鞭毛性の原始真核生物から生じたと考えられている<sup>5)</sup>。一方、藻類やコケ植物の精子は 2 鞭毛性である。鞭毛の数の違いは鞭毛基部の中心小体のあり方と深く関わっている。即ち、1 対の中心小体の片方のみが鞭毛を形成する動物細胞では鞭毛が 1 本であるのに対して、植物では両方の中心小体から鞭毛が形成されるため 2 本の鞭毛が形成される。種子植物のイチョウの精子には、多数の鞭毛が存在するが、これらは 1 対の中心小体からそれぞれ形成される 2 本の鞭毛が多数存在するからである<sup>2)</sup>。このように、裸子植物のイチョウや

ソテツは精子を形成し中心小体を有している。しかし、その他の裸子植物や被子植物は中心小体を失っており精子を形成することは無い。被子植物は、精子を失った代わりに、花粉管を獲得し、花粉管が伸長して胚珠の卵細胞の両側に位置する助細胞が放出する誘引物質 (Lure) により卵細胞まで導かれるメカニズムを獲得したと考えられている。これにより、精子による遊泳なしに雌雄の配偶子の接合が可能となった<sup>11)</sup>。しかし、少なくともイチョウにおいては動物と同様に精子の遊泳が受精には不可欠であり、遊泳に必要な運動器官として鞭毛の形成を司る中心小体、即ち動物の中心体と相同な細胞小器官が受け継がれている。

### イトマキヒトデの保存される新奇 DNA 配列

我々はイトマキヒトデの精子中心体より新奇の DNA を発見し、CS プライマーを用いた PCR による相同配列の探索を行ってきた。これまでに、ゲノム解析の完了したマウスやショウジョウバエなども含む、複数の動物種の細胞より 98% から 95% 以上

の相同性を示す DNA が検出されており、これらはそれぞれのゲノム DNA とは明らかに異なる塩基配列であった。また、原生生物の繊毛虫に含まれるゾウリムシからも 95% 以上の相同性を示す同様の配列が検出されたことから<sup>12)</sup>、イトマキヒトデの精子中心体に局在する DNA は真核生物の進化の過程で保存されてきた可能性が高い。植物についてもコケ植物の蘚類のヒメツリガネゴケや苔類のゼニゴケにおいて、95% 以上の相同配列が検出されており、残るツノゴケ類にも相同配列が検出される可能性は高い。

### イチョウから検出された中心体 DNA 相同配列

陸上植物の進化を考える上で、精子を有するイチョウはソテツと並んで進化的に興味深い種子植物である。本研究では新たに種子植物においても、イトマキヒトデの新奇 DNA と相同な塩基配列が検出された。この配列は、多くの動物やコケ植物にも保存されているが、保存される配列の相同性は全て 95% 以上の高い保存性を示したことから、この塩基配列は、中心体を有する真核生物に広く普遍的に保存されている DNA である可能性がある。

イチョウの塩基配列とイトマキヒトデの中心体 DNA の塩基配列の比較から、イチョウにおける塩基置換部位は約 500 bp 中わずかに 23 塩基であった。このうち 19 塩基はイチョウとヒメツリガネゴケで一致していた。つまり、動物と植物の違いは、現段階でこの 19 塩基の塩基置換が少なくとも存在すると考えられる。図 3 には、イチョウとヒメツリガネゴケが共通するイトマキヒトデと異なる塩基置換部位を緑で示した。イチョウの 5' 末端から GATT の 4 塩基はヒメツリガネゴケより突出していた。ヒメツリガネゴケの 5' 末端は PCR によるプライマーの配列を除く末端の配列であることから、ヒメツリガネゴケは、この 4 つの塩基が欠損している可能性が考えられる。

イチョウでは、さらにヒメツリガネゴケ、イトマキヒトデいずれとも異なる独自の 4 塩基の変異が認められた。この 4 つの塩基置換部位は 1 塩基もヒメツリガネゴケとイトマキヒトデとの塩基置換部位と重なる塩基はなかった。つまり、わずか 500 塩基の中で、進化の過程で生じた塩基置換が保存されつつも、そこに新たに生じた異なる塩基置換を読み取れたといえる。即ち、この塩基配列は、真核生物の系統関係を探るための新たな分子指標として大いに有効なものである可能性を示唆している。

イチョウの配列とヒメツリガネゴケの塩基配列は 98% と極めて高い相同性を示しており、この配

列は植物の進化の過程において高く保存されてきたものと考えられる。動物と同様に、少なくとも精子を有するコケ植物とイチョウにおいて高い保存性が認められたという事実は、この DNA が何らかの重要な機能をもつことを意味すると考える。ソテツなどイチョウと同様に中心体を有し精子を形成する植物についても保存性の高い配列が認められることが期待され、今後検討を進めたい。

### イチョウと蘚苔類に保存される塩基置換部位

蘚苔類は初期に陸上に進出した比較的古い植物であると考えられている。ここでは示さなかったが、既に解析済みの苔類のゼニゴケについても、ヒメツリガネゴケと同様に、先に示した 19 塩基の置換部位は保存されていた。従って、本研究により解析した種子植物のイチョウの相同配列は 4 つのイチョウ特有の塩基置換部位以外は、蘚苔類とほぼ一致することが明らかとなった。5S rRNA による植物の分子系統の結果からは蘚苔類のツノゴケからイチョウは分岐したと考えられており、今後、蘚類、苔類と並ぶツノゴケ類を解析する必要がある<sup>13)</sup>。ツノゴケは、蘚類、苔類に比べて、葉緑体が細胞あたり 1 個しか無い点から最も原始的な蘚苔類ではないかと考えられるが、最終結論には至っていない<sup>14)</sup>。

今回解析したイトマキヒトデの精子中心体の DNA 配列の相同配列がイチョウからも検出され、また、イチョウの相同配列とヒメツリガネゴケから得られた相同配列の間で極めて共通配列が多く、イチョウの配列とイトマキヒトデの配列との塩基置換部位全 23 塩基の中で 4 塩基（イチョウ特有の置換部位）を除く 19 塩基がヒメツリガネゴケとゼニゴケにおいても一致した。この事実は、コケ植物から種子植物まで植物共通の塩基置換の保存性を示している。このように、コケ植物から種子植物のイチョウまで中心体を有する植物にも、イトマキヒトデ精子中心体 DNA の相同配列が保存されていたという事実は、中心体の DNA が極めて広範囲にわたる多くの真核生物に保存されている特殊な、そして極めて重要な DNA であることを強く示唆する。

### 中心体を有する植物に保存される DNA の意義

中心体は多くの動物細胞において必須のオルガネラであり、細胞分裂時の分裂極の形成や鞭毛などの運動器官には欠かせない。本研究でと取り上げたコケ植物やイチョウは、動物と同様に精子による受精を行っており、植物においても精子の中心体は動物の中心体と同じ起源をもつと考えられる。イトマキヒトデの精子中心体に局在する中心体 DNA の塩基

配列がこれらの植物細胞にも保存されているという事実は、その配列が中心体に不可欠な機能を担う未知の情報を含むということを暗示している。今後は鞭毛を欠失し、中心小体とは異なる中心体構造を有する細胞性粘菌 (nucleus associated body)、酵母 (spindle pole body) などの真核生物についても同様な DNA が保存されているか否かを探索していきたい。また、動物、植物に高く保存されるこの DNA をより広範な真核生物全体において網羅的に探索、比較すれば、系統を解析するための新たな分子指標となることも期待される。さらに、この DNA は中心体の複製や構造の保存に関わる未知の細胞学的メカニズムを有する可能性があり、その機能や中心体内部での存在形態などに関して、今後詳しく検討していく必要がある。

## 謝辞

本研究は、研究課題「中心体を有する植物 (イチョウ) におけるイトマキヒトデ中心体 DNA 相同配列の探索」として 2010 年度神奈川大学総合理学研究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

- Hirase S (1896) Spermatozoid of *Ginkgo biloba*. *Bot. Mag. Tokyo* **10**: 171.
- Norstog K (1986) The blepharoplast of *Zamia pumila* L. *Bot. Gaz.* **147**: 40-46.
- Ikeno S (1903) Beitrage zur Kenntniss der pflanzlichen Spermatogenese die Spermatogenese von *Marchantia polymorpha*. *Botan. Centr.* **15**: 65.
- Moser JW and Kreitner GL (1970) Centrosome structure in *Anthoceros laevis* and *Marchantia polymorpha*. *J. Cell Biol.* **44**: 454-458.
- Richards TA and Cavalier-Smith T (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **436**: 1113-1118.
- Margulis L (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale Univ. Press, New Haven.
- 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**: 138.
- Kawai S, Nemoto S and Hino A (2002) Detection of unique DNA localized in the starfish sperm centrosomes from parthenogenetically activated embryos. *Zool. Sci.* **19**: 1440.
- Kawai S, Nemoto S and Hino A (2009) Real-time polymerase chain reaction (PCR) quantitative analysis of centrosomal DNA in the sperm and oocytes of *Asterina pectinifera*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **20**: 45-50.
- 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.
- Okuda S *et al.*, (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* **458**: 357-361.
- Kawai S and Hino A (2004) Detection of unique DNA localized on the basal bodies from isolated cilia of *Paramecium caudatum*. *Zool. Sci.* **21**: 1286.
- Hori H, Lim BL and Osawa S (1985) Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 820-823.
- Wu CS, Wang YN, Liu SM and Chaw SM (2007) Chloroplast genome (cpDNA) of *Cycas taitungensis* and 56 cp protein-coding genes of *Gnetum parvifolium*: insights into cpDNA evolution and phylogeny of extant seed plants. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1366-1379.

■原 著■

## アオキ果実の成熟に伴う果皮の色素および色素体微細構造の変化

青木 唯<sup>1</sup> 小野真菜美<sup>3</sup> 早津 学<sup>2,3</sup> 鈴木季直<sup>1,2,3,4</sup>

Changes of Pigments and Plastid Ultrastructures in the Pericarp during Fruit Ripening of *Aucuba japonica* Thunb.

Yui Aoki<sup>1</sup>, Manami Ono<sup>3</sup>, Manabu Hayatsu<sup>2,3</sup> and Suechika Suzuki<sup>1,2,3,4</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 Integrated Science of Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

**Abstract:** The correlative change of pigments with chromoplast morphogenesis in the pericarp of *Aucuba* fruits was examined by a pigment spectrophotometry and an electron microscopy. As ripening proceeded, chlorophyll contents were decreased gradually, with an exception of a little increase at the red-ripe stage. On the other hand, newly synthesized carotenoids, probably chloroxanthin and/or its homologues were detected from the pericarp of orange-colored and red-ripe fruits. The histological observation of pericarps with naked eyes and a light microscope demonstrated that the red color of whole fruits was reflected by the color of epidermis and two or three cell layers located beneath the epidermis. Since the red color was observed even in the central vacuole of those cells, it seemed that the color might be due to some anthocyan pigments, such as an aucubin. Plastid metamorphosis was observed in relationship to the alternation of pigments in pericarps. In the pericarp of green fruits, the plastids had well developed grana and intergrana thylakoids, as found in the chloroplasts of green leaves. As ripening proceeded, in plastids, plastoglobuli increased in both number and size, in contrast with the degradation of grana-stack and the fragmentation of stromal thylakoids. The plastids of red-ripe fruit pericarps contained exclusively plastoglobuli in various sizes at the center of stroma. These results indicated that the plastids contained in the pericarps of the red-ripe fruit were the G (globular)-type and Y (yellow)-type chromoplasts, and stored newly synthesized carotenoids in the plastoglobuli.

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

### 序論

成熟に伴う果色変化は果皮細胞内の色素成分変化によるもので、多くの場合、その変化は色素体の微細構造変化と相関して生じ、色素体は有色体となる<sup>1-3)</sup>。この相関は、トマト *Lycopersicon esculentum* Mill.<sup>4,5)</sup> やトウガラシ *Capsicum annuum* L. var. *annuum*<sup>6-9)</sup> などによく研究されており、クロロフィルの分解に伴う量的減少と黄色または赤色系のカロチノイドの合成により、色素体内ではチラコイドからなる内膜系が崩壊し、ストロマ内に顆粒状または繊

維状の結晶様体、針状または平板状の結晶などが形成されることが知られている<sup>1-3, 8-10)</sup>。

アオキ *Aucuba japonica* Thunb. は、日本の山地に自生し、庭木としても広く植えられている常緑の低木であり、楕円体の緑色核果は黄色系果色の段階を経て冬期に赤熟する。その過程で、果皮細胞中の色素と色素体の微細構造がどのように変化するかについての研究は殆ど行われておらず、トマトやトウガラシなどで明らかにされているような相関が見ら

れるか否かは興味深い。色素と色素体の微細構造変化との相関を明らかにするために、本研究では、アオキ果実の成熟に伴う果皮色変化を、濃緑色、淡緑色、淡黄色、橙色、赤色の5段階に定め、各段階の果皮からクロロフィルとカロチノイドを抽出し、クロロフィル濃度の定量とカロチノイドの定性を行った。また、各段階の果皮細胞内の色素体の微細構造を電子顕微鏡で観察した。

## 材料と方法

### 成熟各段階の果実の採集と果皮の抽出

神奈川県湘南ひらつかキャンパスに自生するアオキ(図1A)から、秋期に、様々な果皮色を呈する果実を採集した。前述したように、果実の成熟への段階を変化する果皮色にもとづいて、濃緑色(DG; dark green)、淡緑色(PG; pale green)、淡黄色(PY; pale yellow)、橙色(OR; orange)、赤色(RD; red)の5段階とし(図1B)、それぞれの段階の果実から剃刀を用いて果皮のみを抽出した。なお、濃緑色果皮の対照として緑葉(図1A)も採集した。

### クロロフィルの抽出と定量

クロロフィルと次に述べるカロチノイドの抽出はSuzuki(1974)<sup>8)</sup>によって報告され、最近では、Yoshidaら(2006)<sup>9)</sup>によって部分的に改良された方法が試みられている。以下に簡潔に述べる。各成熟段階の果皮と緑葉から抽出した試料を、湿重量(0.1~0.5 g)測定後に乳鉢内に入れ、摩砕液酸性化防止のための炭酸カルシウム(0.1 g)と石英砂を加え、さらに、適時90%アセトンを0.5 mlずつ加えながら摩砕した。摩砕液を遠心管(IWAKI 2325-015/15 ml)に移し、4℃で冷却しながら、遠心機(SAKUMA SS-1500)により~3000 gで10分間遠心した。遠心管から上清をメスフラスコに回収し、遠心管に残った沈殿にはさらに90%アセトンを加えて懸濁し、再度遠心した。この操作を二度繰り返す、回収した上清(抽出液)の全量をメスフラスコで定量した。

分光光度計(JASCO-V630)により、波長400~700 nm(0.5 nm step)の範囲を設定して抽出液の吸光度を測定した。測定範囲内の吸光度のうち、663、645、630 nmの各値をSCOR-UNESCO(1966)<sup>11)</sup>の公式に代入し、湿重量1 gあたりのクロロフィル量(mg)を計算した。

### カロチノイドの抽出と定性

クロロフィル抽出と同様に、各成熟段階の果皮から抽出した湿重量0.1~0.5 gの試料を乳鉢に入れ、0.1 gの炭酸カルシウムと少量の石英砂を加え、適

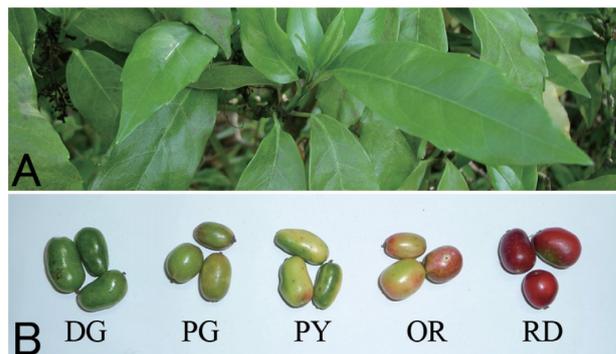


図1. アオキとその果実. A. アオキと緑葉. B. アオキの果実. 成熟に伴い、果皮色は、濃緑色(DG)、淡緑色(PG)、淡黄色(PY)、橙色(OR)、赤色(RD)と変化する。

時イソプロパノールを0.5 mlずつ加えながら摩砕した。クロロフィル抽出と同条件で摩砕液を遠心したが、沈殿の再摩砕ではイソプロパノールの代わりにヘキサン(~3 ml)を用いた。ヘキサンによる摩砕と遠心を二度繰り返し、イソプロパノールとヘキサンによる遠心の上清を同一遠心管内に集め、蒸留水を加えて二層に分離させたものを4℃に冷却した前述の遠心機を用いて~3000 gで3分間遠心した。遠心後、上層のヘキサン液を別の遠心管に移し、再度蒸留水を加える操作でイソプロパノールを完全に除去した。その後、ヘキサン抽出液に硫酸ナトリウムを加え、4℃、~3000 gで3分間遠心して抽出液から水を除去した。

分光光度計(JASCO-V630)を用い、ヘキサンのブランク測定後、波長250~700 nmの範囲で0.5 nmごとに抽出液の吸光度を測定し、吸光スペクトルのピーク波長に基づいて定性<sup>12)</sup>した。

### 微細構造観察法

各成熟段階にある果実の果皮および緑葉から抽出した組織片を小試験管内の蒸留水中に浸漬し、水流ポンプで軽く脱気してから蒸留水をpH 7.2のリン酸緩衝液で希釈した6%グルタルアルデヒド(GA)溶液に置換して前固定した。緩衝液で洗浄した後、2%四酸化オスミウム(OsO<sub>4</sub>)水溶液で後固定し、アセトン系列で脱水し、Quetol 812樹脂に包埋した。その後、樹脂を40℃で24時間、60℃で24時間加熱して重合させ、重合樹脂包埋試料からウルトラミクローム(Reichert Ultracut-N)で厚さ70 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM2000EX)で観察した。

## 結果

### 果実の成熟に伴う果皮色変化の組織学的観察

アオキの若い果実は成熟葉の色に匹敵するほどの濃

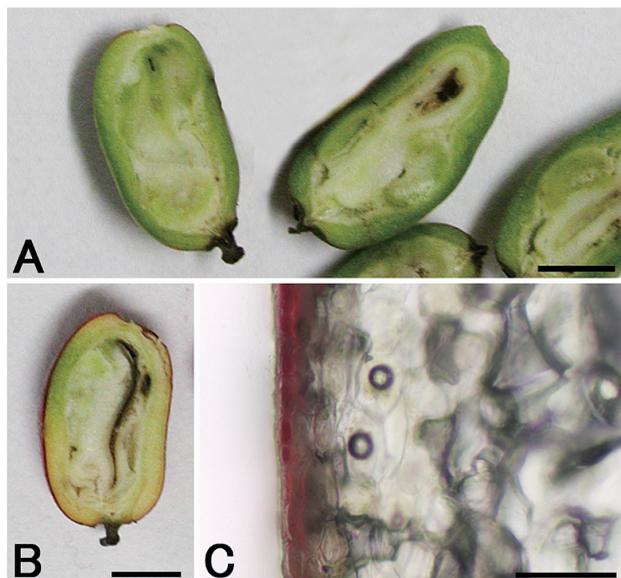


図2. アオキ果実の組織観察. A. 若い果実の縦断像. 果皮全体が濃緑色を呈し, 果実中央の胚を取り囲んでいる. B. 赤熟果実縦断像. 果皮のうち表面付近は赤色を呈するが, 下層は淡黄色または淡緑色. C. 赤熟果実果皮の光学顕微鏡切片像. 表皮細胞と直下の数層の細胞は赤色を呈するが, それより下層の細胞は無色, 淡黄色, または淡緑色. スケール: 5 mm (A, B), 100  $\mu$ m (C).

緑色を呈し, 肉眼および光学顕微鏡による果実縦断面の観察により, この果色は果実中央部の胚を取り囲む数 mm の果皮の色を反映していることが示された (図2A)。果実の成熟に伴い, 果色の緑は徐々に薄くなり, さらに淡黄色に変化するが, これらの色も基本的には果皮の色を反映していた。しかし, その後の成熟で果実が呈する橙色と, 完熟時の鮮やかな赤色は表皮細胞群とその直下の細胞層の色を反映したもので, それより深奥部の果皮は, 淡黄色果実

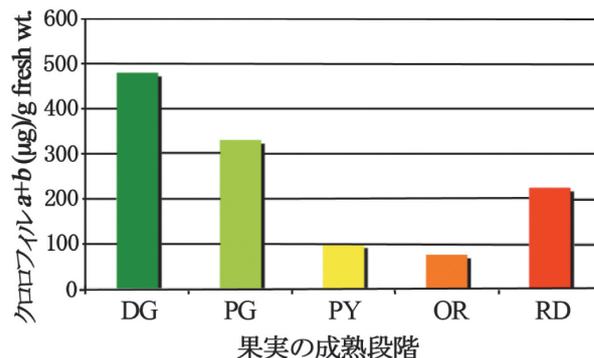


図3. アオキ果皮のクロロフィル量. 成熟に伴いクロロフィル量は減少するが, 赤熟期にはやや増加する. DG: 濃緑色果実, PG: 淡緑色果実, PY: 淡黄色果実, OR: 橙色果実, RD: 赤熟果実.

の果皮で見られた色よりもさらに濃い黄色を呈していた (図2B)。また, 果皮深奥部では, しばしば, その一部が淡緑色を示すことがあった。光学顕微鏡による果実縦断切片像の観察は, 果色を表す赤色に彩色された細胞の局在が, 主として表皮細胞層とその直下にある2~3層目までの細胞層に限定されており, それらの細胞では, 細胞中央部の液胞も赤色に彩色されていることを示した (図2C)。果皮深奥部のうち, 部分的に淡緑色を呈する細胞では, しばしば葉緑体が観察された。

### 果実の成熟に伴う果皮の色素変化

成熟に伴い変化する果色で分けられた5段階のそれぞれの果皮に含まれるクロロフィル量が測定された。それらは, 濃緑色 (DG) 期では480.0  $\mu$ g/g fresh wt., 淡緑色 (PG) 期では330.4  $\mu$ g/g fresh wt., 淡黄色 (PY) 期では98.1  $\mu$ g/g fresh wt., 橙色 (OR) 期で

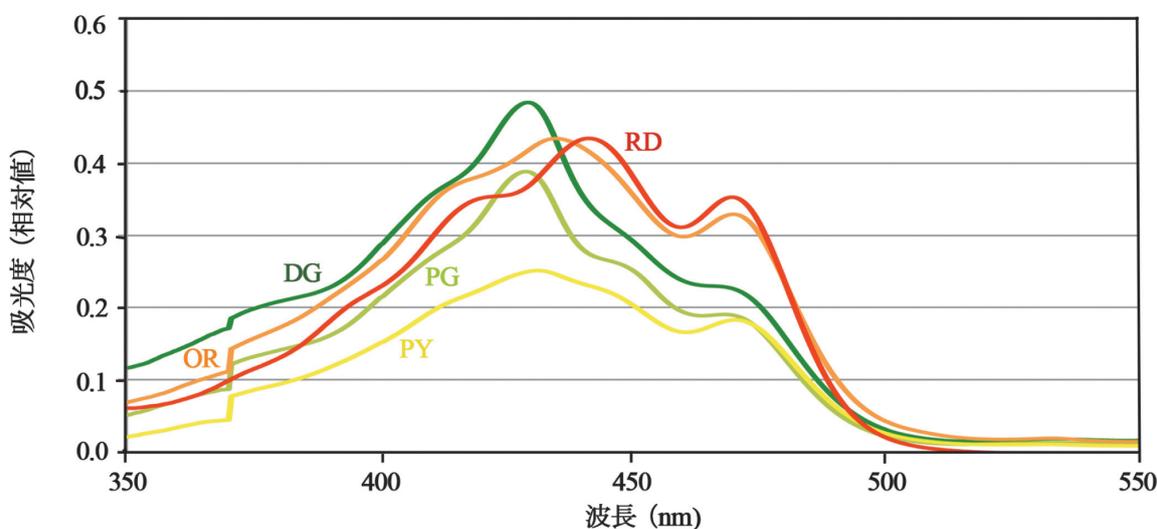


図4. アオキ果皮カロチノイドの吸光スペクトル. 各段階のアオキ果実の果皮領域から, ヘキサンでカロチノイドを抽出し, 抽出液の吸光度を測定した. DG: 濃緑色果実, YG: 淡緑色果実, PY: 淡黄色果実, OR: 橙色果実, RD: 赤色果実.

は 75.2  $\mu\text{g/g}$  fresh wt.、赤色 (RD) 期では 224.1  $\mu\text{g/g}$  fresh wt. であった (図 3)。淡緑色期から淡黄色期にかけて果皮のクロロフィル量は激減した。一方、クロロフィル量は、次の橙色期まで続いて減少したが、赤色期では橙色より増加していた。この増加は、後述するように、果実の組織観察で、赤熟期果実の果皮組織の一部に淡緑色部分があることが認められたこと (図 2B) と関係していると思われる。

濃緑色果実の果皮と比較するために測定された緑葉のクロロフィル量は、1512.9  $\mu\text{g/g}$  fresh wt. であり、濃緑色果皮のおよそ 3 倍量が含まれていた。

図 4 は、果実成熟各段階の果皮に含まれているカロチノイドの吸光スペクトル ( $\lambda$  350-550 nm) を示している。濃緑色と淡緑色の果皮のスペクトルはほぼ同じパターンを示し、ショルダーを含めたスペクトルピークは 412、430、449、470 nm であり、最大吸収ピークは 430 nm であった。一方、赤熟した果皮のスペクトルでは、ピークは 416、442、470 nm で、最大吸収ピークは 442 nm であった。さらに、このスペクトルでは、470 nm のピークは緑色系の前二者とは異なり、吸光度が大きい顕著なピークであった。淡黄色と橙色の果皮のスペクトルピークは、それぞれ、414、431、449、470 nm と 414、435、470 nm であり、最大吸収ピークはそれぞれ 431 nm と 435 nm であった。これらのスペクトルは、緑色系のものよりやや長波長側にシフトしている傾向が見られ、470 nm では共に顕著なピークを示し、その吸光度は橙色の果皮で特に増大しており、赤熟果皮のそれにほぼ等しい値を示した。これらの果皮のスペクトルの特徴は、果実成熟のこれらの段階で新たなカロチノイド色素が合成され、増加することを示唆した。

### 果実の成熟に伴う果皮色素体の微細構造変化

濃緑色果実の果皮色素体と比較するために、成長緑葉に含まれる葉肉細胞内葉緑体の微細構造を観察した (図 5A)。レンズ状または長楕円体の葉緑体は、長径で  $\sim 8 \mu\text{m}$  で、著しく多数のチラコイドの重なりからなる多くのグラナとグラナ間を連結するインターグラナチラコイドかならなる良く発達した内膜系を含んでいた。ストロマ内には直径 50  $\sim$  150 nm の好オスミウム性プラスト顆粒が多数含まれていたが、デンプン粒は殆ど見られなかった。

果皮の組織観察から、赤熟果実の赤色彩色は果皮の表層に限定されている (図 2C) ことが明確であり、以下、果皮の色素体の微細構造観察では表皮細胞層直下で、表面から第 2 層目にある細胞に含まれる色素体を主たる対象とした。濃緑色果実の果皮細胞内に見られる色素体は、長径が 5  $\sim$  6  $\mu\text{m}$  と大きさに

おいてやや小さかったが、グラナとインターグラナチラコイドからなる内膜系の発達程度は緑葉に見られる葉緑体に匹敵していた (図 5B)。ストロマ内の好オスミウム性プラスト顆粒の大きさも緑葉の葉緑体とほぼ等しかったが、数は少なかった。また、緑葉の葉緑体と同様に内膜系が顕著に発達しているにも拘らずデンプン粒は殆ど見られなかった。表面から第 3 層目の細胞内にも同様の葉緑体が見られたが、表皮細胞内の色素体は未発達で、長径 2 $\sim$ 4  $\mu\text{m}$  と小さく、数層のチラコイドからなるグラナしか含んでいなかった (図 5C, D)。

淡緑色果実の果皮細胞内に見られる色素体もグラナを含んだ葉緑体であったが、緑葉や濃緑色果実の葉緑体と比べるとグラナを構成するチラコイドの数は減少しており、グラナ間のインターグラナチラコイドの密度もやや減少しているように思われた。一方、ストロマ内の特に限界膜内側辺縁部ではチラコイドの断片と思われるような小胞が多数観察された (図 5E)。好オスミウム性プラスト顆粒の大きさと数、およびデンプン粒が殆ど見られない特徴は前二者の葉緑体と同じであった。

淡黄色果実の果皮細胞に含まれる色素体の形状は楕円体で、長径 3  $\sim$  4  $\mu\text{m}$  と小さく、内膜系は緑葉や緑色系果実の果皮で見られた葉緑体とは著しく異なっていた (図 6A, B)。グラナを構成するチラコイドの数は少なく、チラコイドはインターグラナチラコイドではなく、並行配列や同心円配列を示した。好オスミウム性プラスト顆粒の大きさと数は緑色系果実の果皮細胞で見られた葉緑体と同じであったが、ストロマ内に複数の小デンプン粒がしばしば観察された。

橙色果実の果皮細胞に見られる色素体の内膜系は前段階の果実果皮細胞内色素体とほぼ等しく、グラナを構成するチラコイドの重なりは極端に少なく、共に、クロロフィル量の著しい減少を反映していた (図 6C)。チラコイドは一部で並行配列していたがその多くは断片化しており、限界膜内側辺縁部のストロマには多数の小胞が観察された。この段階で見られる顕著な変化は球または楕円体形状の好オスミウム性プラスト顆粒の大きさと数の増大であり、大きなものでは直径約 0.4  $\mu\text{m}$  もあり、葉緑体内でみられるもののおよそ 10 倍の大きさであった。前成熟段階までに色素体内に見られた顆粒の電子密度は常に高くて一定であったが、この段階の果皮細胞内色素体には顆粒形成過程にあると思われる低電子密度の顆粒も含まれていた。ストロマ内にはしばしば小デンプン粒が観察された。

赤熟果実果皮細胞内に見られる色素体の形状は全

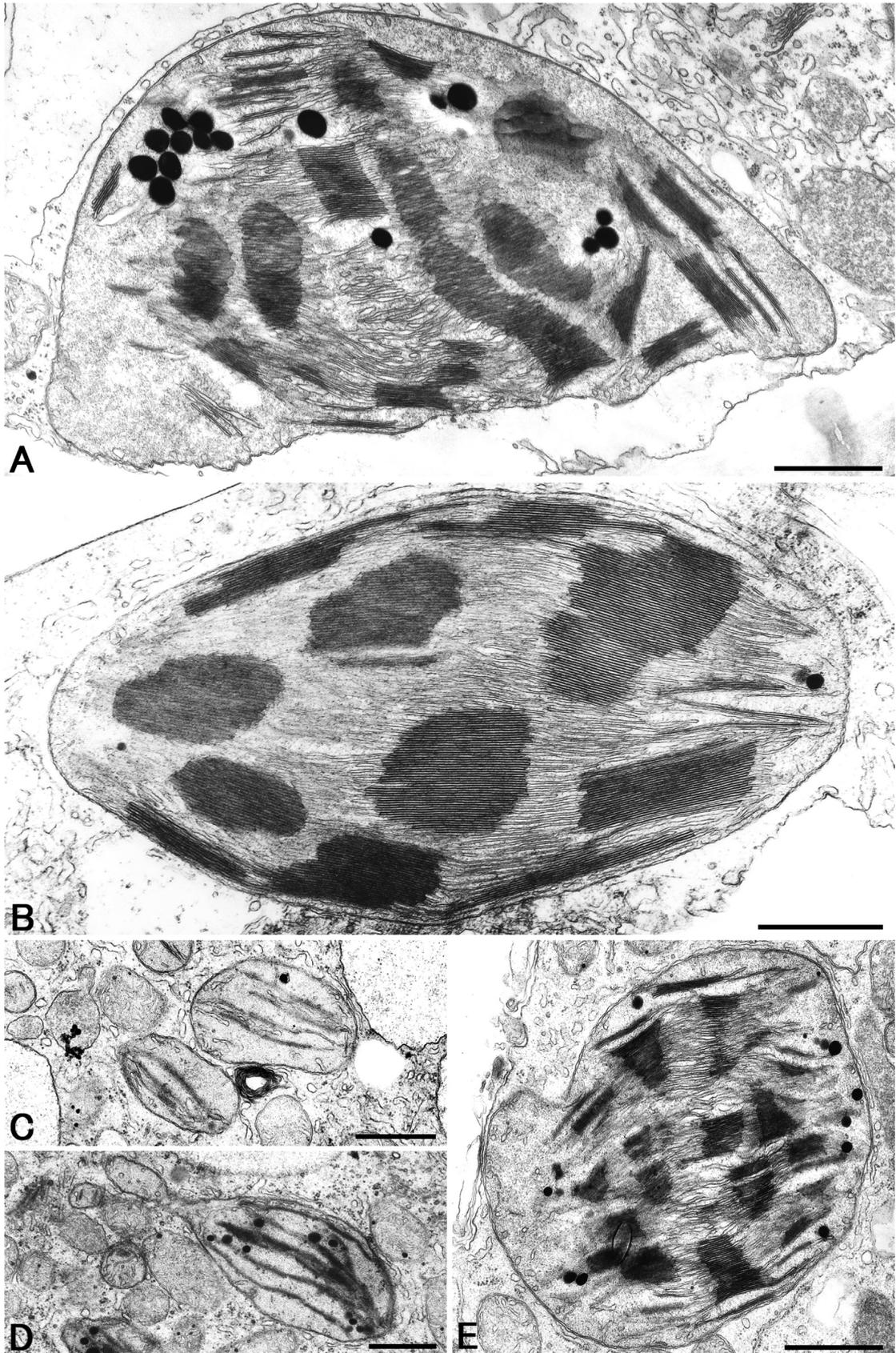


図5. アオキ緑葉の色素体および緑色系果実の果皮色素体. A. 緑葉の色素体. 多数の良く発達したグラナ, インターグラナチラコイド, プラスト顆粒を含む成熟葉緑体. B. 濃緑色果実の果皮色素体. 発達したグラナとインターグラナチラコイドを含む葉緑体. プラスト顆粒は少ない. C-D. 濃緑色果実果皮表皮細胞内に見られる未発達色素体. グラナを構成するチラコイドの重なりは少ない. E. 淡緑色果実の果皮色素体. チラコイドの数は多いが, グラナ構成チラコイドの数は減少している. プラスト顆粒の増加傾向が認められる. スケール: 1  $\mu\text{m}$  (A-E).

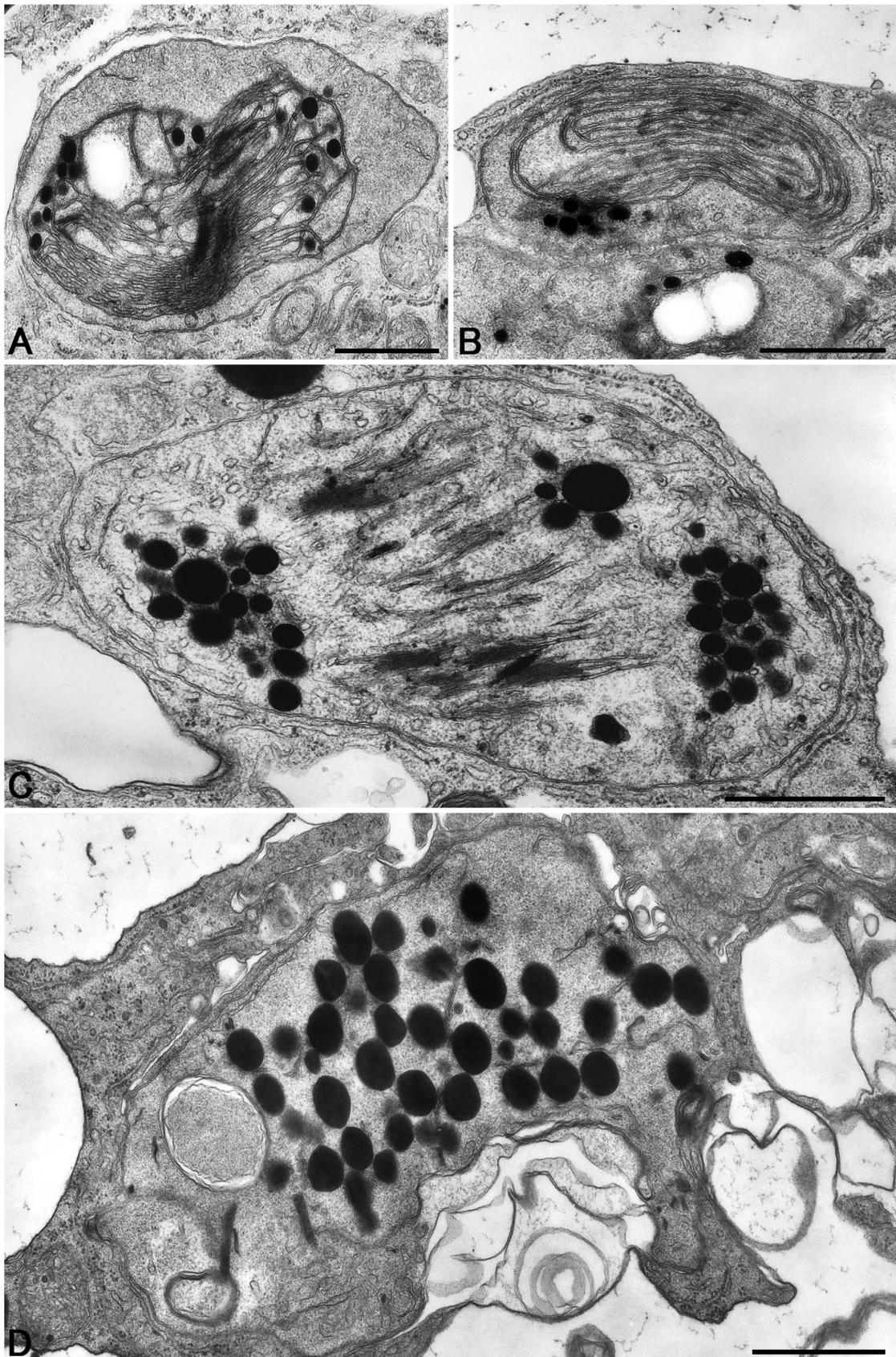


図 6. アオキの黄色系および赤色系果実果皮色素体. A-B. 淡黄色果実の果皮色素体. グラナとインターグラナチラコイドの規則的構築は失われ, チラコイドは同心円配列や並行配列を示す. プラスト顆粒数に注目. C. 橙色果実の果皮色素体. チラコイドは断片化して数も減少. 対照的にプラスト顆粒は数と大きさを増加. D. 赤熟果実の果皮色素体. チラコイドは断片化し, 数も著しく減少. サイズと数を増したプラスト顆粒がストロマ中央部を占めている. 色素体は不定形化し, 限界膜の陥入も認められる. スケール: 1  $\mu$ m (A-D).

くの不整形であった。そのため、大きさを表わすためのディメンション測定は容易ではなかったが、切片像で一端から他端までの最も長い部分の長さを測定したところ、およそ  $5 \mu\text{m}$  であり、表皮細胞を除く果皮細胞内の色素体に見られる一般的な大きさであることが明確にされた。また、色素体の形状が不定形であることから、限界膜は随所で大小の凹凸を生じており、全体的には褶曲状態を呈していると考えられる (図 6D)。色素体は、しばしば、ストロマ内に二重膜で囲まれた直径  $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$  の袋状構造を含んでいるように見られたが、これらは限界膜の凹凸の極端な例を示すもので、恐らく限界膜がストロマ内に大きく壺状に陥入したものの断面像と考えられる。グラナは完全に消失し、チラコイドも極端に細裂化された小胞状断片としてわずかな数がストロマ内に無秩序に分散して観察された。また、図 6D が示すように、色素体のストロマ中央部は、著しく増大した多数の好オスミウム性プラスト顆粒で占められており、それらの多くは高電子密度であったが、一部には形成途上にあることを示唆する低電子密度の顆粒も含まれていた。停電子密度の顆粒では隣接したものが融合しつつあるような状態を示しているものも見られた。以上のような色素体微細構造の特徴は、後に討論で論じられるように、トウガラシとその類縁種の黄色系成熟果実の果皮に含まれる G タイプの有色体<sup>1)</sup>、すなわち、Y タイプの有色体<sup>8)</sup> と極めて良く一致することを示した。

## 討論

アオキ果実の色は成熟に伴い濃緑色、淡緑色、淡黄色、橙色、赤色などに変化するので、成熟度の指標としてこれらの色による 5 段階を設定し、各段階の果皮に含まれるクロロフィルの定量、カロチノイドの定性、色素体の微細構造観察を行った。始めに行った果皮の組織観察により、果実表面で認識される色と果皮の色とでは、特に成熟期にはいつてから大きく異なることが明らかになった。すなわち、橙色や赤色の果実では、それらの色は果皮の表面付近数細胞層のみに限定されて出現し、それより深奥部にある大部分の果皮細胞では淡黄色果実の色あいよりやや濃い黄色に留まっていることが示された (図 2)。さらに、光学顕微鏡による切片観察では、果実表面から数層の細胞層を赤く色付ける色素は、そこに局在する細胞全体に分布しており、大きな液胞が占めると思われる細胞中央部も顕著に彩色されていた。このことから、赤熟期の赤色果実はアントシアン系の色素に由来しており、主たるアントシアンはアウキュビン (aucubin) と考えられる<sup>13)</sup>。成熟に伴う果実

の色変化にクロロフィルやカロチノイドとともにアントシアンが関与することがあることはトウガラシなどでも報告されている<sup>8)</sup>。

果実の成熟に伴い、果皮に含まれるクロロフィルは減少し (図 3)、それは、淡緑色から淡黄色へと変化する段階で特に顕著であり、その変化は色素体内のグラナの大きさや数の変化とよく対応していた。すなわち、果色の黄色化は、著しいクロロフィルの減少が大きな要因となり、その結果、グラナを構成するチラコイドの重なりも著しく減じられ、重なり合う面積も小さくなったと考えられる。さらに、このグラナ崩壊が三次元構造を支えていたインターグラナチラコイドの崩壊も誘導し、チラコイドの小胞化を引き起こしたと考えられる。内膜系三次元構築はクロロフィルのチラコイド膜内局在によって補償されており<sup>14)</sup>、内膜系の崩壊は有色体形成開始に伴うクロロフィル分解の結果と考えられる。

赤熟果実の果皮の分析で前段階の橙色果皮より多くのクロロフィルが検出された。果実の成熟に伴い減少するクロロフィルが最終的な成熟段階で何故再び増加するのかについては現在不明である。しかし、果実の組織観察で、淡黄色や橙色の果皮では見られない緑色部位が赤熟果実の果皮では観察されることは事実であり、定量値がその事実を反映したものであることは明らかである。

濃緑色および淡緑色果実の果皮に含まれるカロチノイドの吸光スペクトルは一致しており、4 つのスペクトルピークが確認された。既知のヘキサソル媒中における各種カロチノイドの吸光スペクトルピーク<sup>12)</sup> との比較検討では既知のカロチノイドとピークの波長が全て一致するものはなかった。しかし、これらのピーク波長は、ピーマン緑色果実の果皮から抽出した色素のそれとよく一致しており<sup>9)</sup>、このカロチノイドが緑色果実に共通のものであることを示唆した。

赤熟果実の果皮から抽出された色素の 3 つの吸光スペクトルピークの波長はクロロキサンチン (*chloroxanthin*; 417, 440, 470 nm) とほぼ一致<sup>12)</sup> しており、果皮では、成熟の最終段階でこのカロチノイドが合成され、色素体内に蓄積されることを示唆した。イソルテイン (*isolutein*) の既知のピーク波長は 442 nm と 471 nm であり、果皮から抽出した色素のピーク波長の長波長側の 2 つとほぼ一致するので、色素がイソルテインを含む可能性は無視できないかも知れない。

淡黄色および橙色果実の果皮から抽出された色素の吸光スペクトルでは、それらのピーク波長が一致する既知のカロチノイドはなかった。しかし、淡黄

色から橙色へと果皮色素の吸光スペクトルのピークが次第に長波長側にシフトしていくような傾向が見られ、これらの成熟段階では果皮内でクロロキサンチンなどの新たなカロチノイド合成が進行し始めていることが示唆された。

カロチノイドがストロマ中で生ずる顆粒、繊維状結晶様体、針状または平板状の結晶を根拠に有色体はそれぞれ G タイプ (globular type)、F タイプ (filament type)、C タイプ (crystalline type) と区別される<sup>1)</sup>。さらに、トウガラシでは、黄色成熟果実には G タイプの有色体、赤色成熟果実には F タイプの有色体が含まれ、両者の微細構造が明確に異なることから<sup>6,9)</sup>、前者を Y タイプ (yellow type)、後者を R タイプ (red type) として特徴づけることがある<sup>8,9)</sup>。アオキ赤熟果実の果皮は、表層のアントシアンと思われる色素を除外するとその色合いの基本は黄色であり、果皮細胞に含まれる色素体のストロマ中には大きな好オスミウム性プラスト顆粒を多数含み、チラコイドは断片化したもののみが分散分布していた (図 6D)。これらの結果から、アオキ赤熟果実果皮細胞内の色素体は G タイプで、かつ、Y タイプの有色体と判定される。ストロマ内のプラスト顆粒には果皮の黄色化に伴い合成されはじめたクロロキサンチンなどの黄色系カロチノイドが蓄積されていると考えられる。

## 文献

- 1) Frey-Wyssling A and Kreutzer E (1958) The sub microscopic development of chromoplasts in the fruit of *Capsicum annuum* L. *J. Ultrastruct. Res.* **1**: 397-411.
- 2) Kirk JTO and Tilney-Bassett RAE (1967) *The Plastids*. Freeman WH and Co., London.
- 3) 鈴木季直 (1977) 葉緑体の退化と有色体. 光合成器官の細胞生物学. 石田政弘, 植田勝巳 遠山 益編, 共立出版, 東京. pp. 116-137.
- 4) Harris WM and Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. I. Ultrastructure of low-pigment and high-beta mutants. *Am. J. Bot.* **56**:369-379.
- 5) Harris WM and Spurr AR (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am. J. Bot.* **56**: 380-389.
- 6) Spurr AR and Harris WM (1968) Ultrastructure of chloroplasts and chromoplasts in *Capsicum annuum*. I. Thylakoid membrane changes during fruit ripening. *Am. J. Bot.* **55**: 1210-1224.
- 7) Spurr AR (1971) Morphological changes in ripening fruit. *Hortiscience* **5**: 33-35.
- 8) Suzuki S (1974) Ultrastructural development of plastid in cherry pepper during fruit ripening. *Bot. Mag, Tokyo* **87**:165-178.
- 9) Yoshida M, Hayatsu M and Suzuki S (2008) Pigment changes and ultrastructural morphogenesis of chromoplasts during fruit ripening of pimentos. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **19**: 51-56.
- 10) Bovier F and Camara B (2006) The role of plastids in ripening fruits. In: *The Structure and Function of Plastids*. Wise RR and Hooper JK, eds., Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 419-432.
- 11) SCOR-UNESCO WG (1966) Determination of photosynthetic pigment in sea water. *Monogr. Oceanogr. Methol.* **1**: 9-18.
- 12) Davies BH (1965) Analysis of carotenoid pigments. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin TW, ed., Academic Press, London. pp.489-532.
- 13) Kerble F (1913) **The formation of the anthocyan pigments of plants.** Part IV. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **B87**: 113-131.
- 14) Weier TE and Benson AA (1967) The molecular organization of chloroplast membrane. *Amer. J. Bot.* **54**: 389-402.

■短 報■

## 中学数学の問題における図面の影響についての実験的検討

池田博美<sup>1</sup> 桑原恒夫<sup>1,2</sup>

### Experimental Research into the Diagram Effects on Mathematics Problems in Junior High School

Hiromi Ikeda<sup>1</sup> and Tsuneo Kuwabara<sup>1,2</sup>

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

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

**Abstract:** Diagram effects on mathematics problems in junior high school were researched experimentally using 173 subjects. Common problems, including diagram-drawing problems, were given to all classes. Four problems were given to some classes with diagrams and to other classes with no diagram. The scores of all 4 problems were higher in the classes with diagrams than in the classes with no diagram. Almost no subjects without diagrams could answer 2 problems correctly without drawing diagrams themselves. The scores of the 2 problems were highly correlated to the scores of diagram-drawing problem. This suggests the existence of common abilities to many problems related to diagrams.

**Keywords:** mathematics, diagram, junior high school, experiment with subjects

### 序論

教育において図面の利用が重要な役割を果たすことは論を待たない<sup>1)</sup>。一方、市川らは生徒の数学の学力を、固有領域の知識ではなく個別の問題に依存しない汎用的な基礎学力で評価する方法を提唱している<sup>2)</sup>。そして図表作成による表象形成や図面を用いた解法探索の学力もその中の評価項目として取り上げている。

同じ数学でも、図面の影響が学習内容によって変化するのには当然である。しかし様々な問題における図の影響について、まだ十分なデータの蓄積がされているわけではない。そこで本研究では中学の数学を対象とし、影響が異なると想定した4つの問題について図面の影響を被験者実験により調査した。その結果、幾何学的な問題では極めて単純な問題でも図面の影響があること、複雑な問題では決定的な影響を持つ事が解った。また個々の被験者の図面作成能力が問題を解く際には大きな影響があり、その能力は市川らの提唱するように問題に依存しないものであることを示唆する結果が得られた。

### 方法

#### 被験者

2つの中学校の合計5クラス、173人の中学3年生とした。

#### 使用した問題

中学の数学を題材に、表1に示すような問題を作成した。このうち問1、問2は図に関係しない計算問題、問3は作図問題、問4から問7は図の利用によって問題の理解や解法の探索が促進されると考えられる問題である。問4から問7までは問題中に図を提示したものと提示しないものの2種類を作成した。本研究で調べたいのは主に問4以降の問題における図の提示の有無の影響である。問1から問3までの問題は、問4以降の問題と関連が深いものがあればそれを発見し抽出するために設置した。なお、付録に使用した全ての問題を示す。

ここで問4は図を描くことも容易であるし、図がなくても問題を解くことが可能である。したがって図の有無による影響は小さいと予想される。問5は図があれば底辺や高さをどう求めるのかを考えることができるが、図がなければそれは困難であると予

表 1. 利用した問題の概要

全クラスで共通	問 1	式の計算
	問 2	方程式
	問 3	作図
クラス毎に図の提示の有無を区別	問 4	文字による面積計算
	問 5	関数のグラフ上の面積
	問 6	円を含む図形中の角度
	問 7	回転体の体積

想される。問 6 は多数の線や点が存在し、これを外在化せずに頭の中だけでイメージして問題を解くことはかなり困難であると予想される。問 7 は回転してできる立体のイメージを作る事が問題を解く上で必要となる。しかし図形が単純なので、頭の中だけでもそれが可能であると考えられる。

### 問題の割り振り

問 1 から問 3 までは全てのクラスに同じものを与えた。問 4 から問 7 までは、問題ごとに問題中に図のあるものを割り当てるクラスと図のないものを割り当てるクラスを変更した。その割り当てを表 2 に示す。

### 実験手順

学校の数学担当の教員の指揮のもと、50 分間の試験時間で行い、答案用紙を回収した。なお試験は記名式とした。

### 結果と討論

#### 図有り問題と図無し問題の正解率の差

表 3 に問 4 から問 7 の図有り問題、図無し問題の正解率およびその差を示す。このように全ての問題で図有り問題の正解率が高かったが、その差は問題ごとに大きく異なった。この差は、定性的には前述した事前予想の通りの結果である。

#### 図無し問題における作図の有無と正解率

回収した解答用紙を調査し、問 4 から問 7 の図無し問題において被験者が正しい作図をした上で問題に回答したかどうかを調査した。

正しい作図を行った被験者の割合（作図成功率）と正しい作図を行った被験者の正解率を表 4 に示す。このように作図が成功した被験者の正解率は、全ての問題において表 3 に示した図有り問題における正解率より高かった。この原因は今のところ不明であるが、可能性としては以下の 2 つが考えられる。

1) 作図が成功した被験者は全体的に数学の能力が

表 2. 各クラスへの問題の割り振り

	問 4	問 5	問 6	問 7
図有り	A	B	A	B
図無し	B	A	B	A

A: X 中学の a クラス, Y 中学の b, c クラス: 計 104 名

B: X 中学の d クラス, Y 中学の e クラス…計 69 名

表 3. 図の提示の有無による正解率の変化 (%)

	問 4	問 5	問 6	問 7
図有り	42.6	39.1	34.9	56.6
図なし	34.6	21.0	12.8	42.8
差	8.0	18.1	22.2	13.8

表 4. 図無し問題の作図成功率と作図成功者の正解率 (%)

	問 4	問 5	問 6	問 7
作図成功率	36.2	34.6	30.4	45.8
作図成功者の正解率	44.0	55.6	42.9	61.1

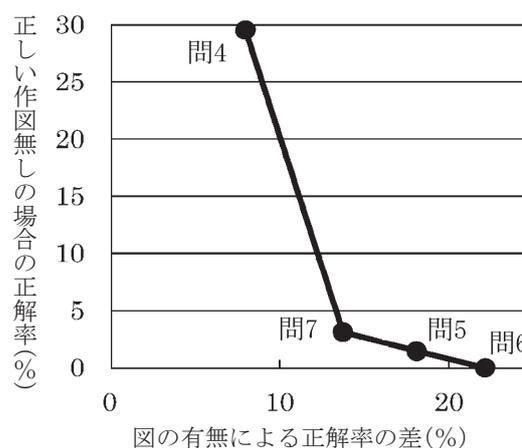


図 1. 図の有無による正解率の差と図無し問題で正しい作図をしなかった被験者の正解率の関係。

表 5. 作図問題の正解数と問 5、問 6 の図無しの場合の正解率の関係

問 3 の正解数	問 5 の正解率	問 6 の正解率
2 題	34.9%	26.7%
1 題	22.2%	3.6%
0 題	2.9%	0%

表 6. 文字式の計算問題と問 4 の正解者数の関係

		問 4		
		正解	不正解	合計
問 1 (8)	正解	43 名	27 名	70 名
	不正解	25 名	78 名	103 名
	合計	68 名	105 名	173 名

高い。

## 2) 作図の過程で問題の理解が進む。

なお、表 3 からは問 4 の作図成功率が低いように見える。これは後述する図 1 で示すように、図を作成せずに正解に到達した被験者が多いためであると考えられる。

次に作図しなかったか、作図をしたものの誤った図を作成した被験者の正解率を、表 3 で示した図有り問題と図無し問題の正解率の差を横軸に図 1 に示す。図 1 に示すように、図有り問題と図無し問題の正解率の差が大きいほど、正しい作図をしなかった被験者の正解率は低下した。問 4 では正しい作図をしなくても 30% 弱の被験者が正解している反面、問 5 では正解者 1 名、問 6 では正解者 0 名であった。これは解くためには正しい図がほぼ必須である問題が存在することを示している。

### 作図問題と図無し問題の正解率の関係

問 5、問 6（正解するのに正しい作図をほぼ必須とする問題）の図無し問題での正解率と問 3 の作図問題の正解数との関係を調べた。問 3 は 2 問構成で、最初の問題が正解しないと 2 番目の問題も正解できない。

そこで問 3 の被験者を、2 題とも正解した者、最初の 1 問だけ正解した者、1 問も正解しなかった者の 3 グループに分け、各グループの問 5、問 6 の正解率調べた。その結果を表 5 に示す。問 5、問 6 ともに、問 3 で 2 題とも正解したグループ、1 問のみ正解したグループ、1 問も正解しなかったグループの順に正解率が高い。特にこの傾向は問 6 において著しい。これは問 3 と問 6 が、長方形と円の違いはあるものの共に純粋な図形の問題であるためより関連が深かったのに対し、問 5 は座標上のグラフの問題であるため相対的に問 3 との関連が浅かったためと考えられる。しかしながら問 5 においても問 3 との相関ははっきりと認められる。これは被験者ごとに固有の作図能力が存在し、図を必要とする問題を解く際にその能力が大きな影響を与えていることを示唆している。

### 作図能力以外の汎用能力についての知見

問 4 は図 1 に示したように図の有無の影響が最も小さい。しかし表 3 に示したように、図の提示が有の場合も無しの場合も問 7 より正解率が低い。そこで問 4 には作図能力とは別の汎用的な能力がある可能性があると考え、分析を進めた。

問 4 を解くには、 $(x+1)(x+8)-(x-5)x$  という括弧付きの文字式の計算を行う必要がある。これと同様の問題を問 1(8) で実行している。そこでこの問 1(8) と問 4 の正解者の関係を求めた。この結果を表 6 に示す。このように両者には強い相関があり、問 4 を解くには文字式の計算能力も大きな影響があった事が解った。

### まとめ

中学校の数学の問題を対象に、中学生を被験者として問題を解く際の図の影響について実験的に検討し、以下の結果を得た。

- (1) 問題中の図の提示の有無を変化させた 4 つの問題とも、図を提示した場合ほうが正解率が高かった。
- (2) 図を提示しない問題では、被験者自らが正しい図を書いた場合には図を提示した場合と同等以上の正解率を示した。
- (3) 図を提示しない問題では、被験者自らが正しい図を書かなかった場合には書いた場合に比べ正解率が大きく低下した。特に図の提示の有無による正解率の差の大きな 2 つの問題では正しい図を書かなかった被験者はほとんど正解できなかった。
- (4) 正しい図を書かなかった被験者がほとんど正解できなかった図を提示しない上記 2 つの問題の正解率は、別の作図問題との相関が非常に大きかった。このことは問題に依存しない作図能力の存在と、図を必要とする問題を解く際のその作図能力の影響の大きさを示唆している。

今後の課題としては、さらにデータを蓄積し、図の影響の大きさをなんらかの方法で定量的に予測することである。例えば本研究でその存在が示された正しい図を書かないとほとんど正解できない問題を被験者実験によらず見分けるための判定基準の作成が課題として考えられる。さらには図無し問題における作図成功率の予測なども課題として考えられる。

### 文献

- 1) Embree R (1999) Experimental and rational studies in problem-solving – a meta analysis. *Journal of Research in Mathematics Education* 23 : 242-273.
- 2) 市川伸一, 南風原朝和, 杉澤武俊, 瀬尾美紀子, 清河幸子, 犬塚美和, 村山航, 植阪友理, 小林寛子, 篠ヶ谷圭太 (2009) 数学の学力診断テスト COMPASS の開発. *認知科学* 16: 333-347

**付録**  
**実験に使用した問題**

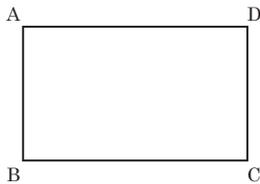
問1 次の計算をしなさい。

- (1)  $5 - 7 + (-2)$
- (2)  $(5 - 2)^2 + 8 \div 4$
- (3)  $\frac{9}{5} \times \frac{2}{3} \div \frac{6}{7}$
- (4)  $0.5 - 0.7 \times 3$
- (5)  $5(a - 3b) - 2(3a - 2b)$
- (6)  $35a^3b^2 \div (-5ab^2)$
- (7)  $\frac{1}{3}(a - 2b) + \frac{2}{5}(a + b)$
- (8)  $(x + 4)^2 - (x + 2)(x - 5)$

問2 次の方程式を解きなさい。

- (1)  $2(x - 5) + 3 = 7$
- (2)  $\frac{x-4}{2} + \frac{x+5}{3} = 3$
- (3)  $\begin{cases} 2x + 3y = 7 \\ 5x - 2y = 8 \end{cases}$
- (4)  $\begin{cases} 0.3x + y = 0.5 \\ 2(x - y) - 3 = 9 \end{cases}$
- (5)  $x^2 - 5x - 10 = 26$
- (6)  $\frac{1}{3}x^2 - x = 0$

問3 下の図のような長方形 ABCD がある。



- (1) AB の中点 M と C を結んだ線分と対角線 BD の交点 P を示せ。
- (2) 辺 MD 上に  $MD \perp PQ$  となるような点 Q を示せ。  
この問題は上の長方形に直接、書き込んでください。コンパスや定規を使う必要はありませんが、中点や垂直が分かるように記号を書き入れてください。

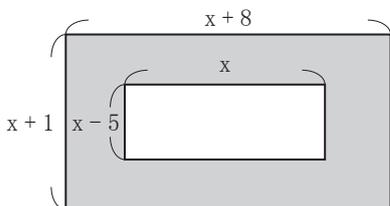
問4

A (図無し)

縦が  $m$ 、横が  $x+8m$  の長方形の土地がある。その土地の中に縦が  $x-5m$ 、横が  $xm$  の花壇を作る。花壇以外の土地を芝生にすると、芝生の面積はどれだけになるか。  $x$  を用いて表せ。

B (図有り)

下の図で斜線部の面積を  $x$  を用いて表せ。



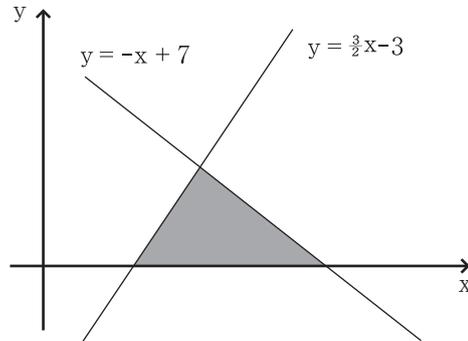
問5

A (図無し)

二つの直線、 $y = \frac{3}{2}x - 3$  と  $y = -x + 7$  がある。この二直線と  $x$  軸に囲まれた三角形の面積を求めよ。

B (図有り)

下の図で斜線部の面積を求めよ。



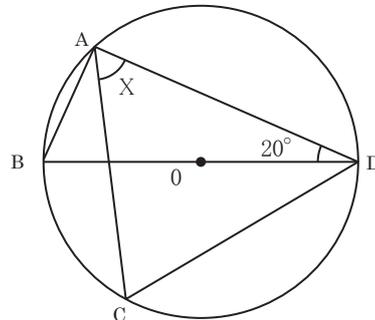
問6

A (図無し)

点  $O$  を中心とする円  $O$  がある。この円周上に点  $A, B, C, D$  がこの順にある。  $BD$  は直径で、  $AC = CD$  とする。  $\angle ADB = 20^\circ$  のとき  $\angle CAD$  の大きさを求めよ。

B (図有り)

下のような円  $O$  がある。この図で  $AC = CD$  のとき、  $\angle x$  の大きさを求めよ。



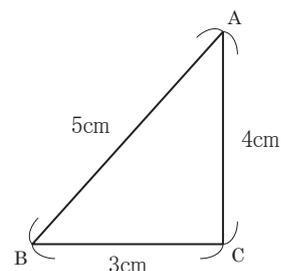
問7

A (図無し)

$AB=5\text{cm}$ 、  $BC=3\text{cm}$ 、  $AC=4\text{cm}$ 、  $\angle C=90^\circ$  の三角形  $ABC$  がある。辺  $AC$  を軸にして一回転させてできる立体の体積を求めよ。

B (図有り)

下のような三角形  $ABC$  がある。



辺  $AC$  を軸にして一回転させてできる立体の体積を求めよ。

■短 報■

## 自己再生型 HTML ページの Onclick 属性フィールド内 スクリプトによる構成法

永松礼夫<sup>1,2</sup>

### A Construction Method for Self-Reproductive HTML Pages by Scripts in Onclick Property Field

Leo Nagamatsu<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** The construction of self-reproductive programs is a well-known problem in computer science. To implement such programs in JavaScript, there are several points to discuss. First, considering the close relation between language and HTML page text, several definitions of the region of "source program" and "result" could exist. Second, the JavaScript language has many features to convert character strings into executable objects, and many possibilities can be selected. In this paper, we propose a method with scripts placed in the onclick property field of input tag elements. This enables the behavior of scripting programs to be less dependent on HTML browser characteristics. We also introduced a "launcher structure," which dynamically constructs the final form of the "self-reproductive script" from parts of functional script segments, and enables clear understanding of source code descriptions. We also discuss the merits and limitations of this method.

**Keywords:** HTML pages, script programming language, JavaScript, Self-reproductive programs, dynamic program construction, *onclick* property

## 序論

自己再生型プログラムは、「『ソースプログラム』と『実行結果』が同一であるプログラム」と定義できる。元来はプログラミング・パズルから発展したが、自己再生オートマトンとの関連でも着目され、様々なプログラミング言語での記述<sup>1)</sup>が報告されている。いっぽうスクリプト型のプログラミング言語である JavaScript<sup>2)</sup>は、HTML ページとの親和性が高く、ページ移動による画面更新をせずに HTML ページに動的な機能追加をする際に有用である。この特徴を生かして、Ajax やいわゆる web デスクトップや webOS<sup>3-5)</sup> (ブラウザ内にデスクトップや文書編集のアプリケーションを実現するもの) など、HTML ページが持つ機能が動的に大きく変更される応用との関連で興味深い。我々は JavaScript による自己再生型プログラム (自己再生型 HTML ページとも呼ぶ) の作成を通じ、このような状況でのプログラム構成方法について考察してきた。

JavaScript による自己再生型プログラムについての先行事例としては、金田による報告<sup>6)</sup>がある。これは document.write により HTML ページを丸ごと入替える方法を用いている。

自己再生の定義における「ソースプログラム」と「実行結果」をどの範囲に取るかについて、HTML ページと JavaScript を組み合わせた環境ではいくつか選択肢がある。我々は HTML ページ全体ではなく、ページを構成する階層構造 (DOM) の一つの要素に注目し、その要素を単位とする自己再生型 HTML ページの研究<sup>7)</sup>を行ってきた。

本報ではこれまで課題であった、(1) ブラウザに依存して動作が異なること、(2) プログラムの記述に繰り返しが多く複雑で理解しづらく編集が煩雑なこと、の二点を解消する構成方法を提案する。そのために、

(1) input タグ内の onclick プロパティ部に長めの

スクリプトを記述する、  
 (2) 第一世代では記述性のよい機能部品に分けた表現を用い、そこから第二世代を生成し、第二世代以降は複雑で可読性に劣る記述であるが同一の記述を生成できる形にする、  
 という手法を導入し、それに基づくプログラムの動作を確認した。

## 方法

### 動的コード追加の方法

JavaScript における動的なコード追加（動的に生成した文字列をスクリプトとして有効にする方法）には以下のように種々のものがある。

- 1) eval : 文字列を式として評価する言語機能であり最も汎用的である。
  - 2) document.write : HTML ページを丸ごと入替えられる。生成されたページにスクリプトが含まれていればそれも実行される。
  - 3) ページ階層 (DOM) の一部への追加 : 要素オブジェクトを createElement() で作成し、DOM 階層に appendChild() により追加することで、処理系がそこに含まれるスクリプトを有効にする。(但しブラウザによる動作の差がある)
- さらに、(3) は、「スクリプト構成する文字列を書く場所」に着目し以下のように細分できる。

- a) div 要素を作成しその innerHTML 部に
  - a1) script タグで囲んで書く
  - a2) onclick プロパティ部を持つタグ (例えば input) を置き、その onclick 部に書く
- b) script 要素を作成し
  - b1) その src プロパティ部に
    - b1a) 文字列としてスクリプトを書く
    - b1b) スクリプトを格納した外部ファイルの名前を書く (スクリプトで動的に生成した文字列を実行する方法ではないが、別に置かれた .js ファイルを実行する一般的な方法であり、比較のため挙げる)
  - b2) その text プロパティ部に書く
- c) input 要素 (などの onclick 部を持つ要素) を作成し、その onclick 部に書く

### 制限

これらの一部には、ブラウザによって動作が異なる / 動作しない / 付加的な記述が必要などの制限がある。昨年までの研究で用いていた (3a1) は、Google Chrome で動作せず、Microsoft Internet Explorer ではタグに `&nbsp;<script defer=defer>` の枠部分の追加が必要であった。ブラウザ依存が少ないのは

(1),(2),(3a2),(3b2),(3c) である。本稿では (3c) について可読性の高い記述を得る方法について述べる。

### 自己再生スクリプトの動作

我々が扱うスクリプトでは、それぞれの世代が単一の div 要素であって、その中に一つのボタン (input タグで type が button であるもの) があり (図 1a)、その onclick 部にその世代のスクリプトがある。初期状態で表示されるボタンをクリックすると新たなボタンが生成され (図 1b)、そのボタンも同じ機能を持つ、という動作をする。

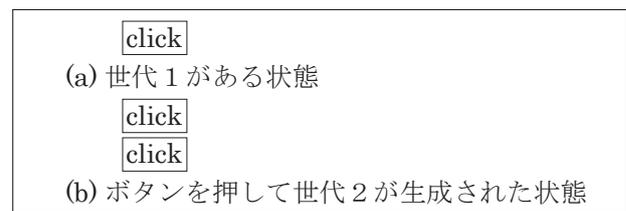


図 1. 実行画面の様子。

### 自己再生スクリプトの基本構成

対象とする自己再生型 HTML ページの基本構成について述べる。HTML ページには、クリックできるボタンと、その動作を規定するスクリプトが含まれている。

ボタンの onclick 部にはクリックによって起動される関数のみを記述し、実際の動作の詳細記述は script タグに囲まれた部分のなかのスクリプトで行う方式が一般的であり、我々も当初はこの方式で行っていた。しかし自己再生の為には、次世代として出力する一つの要素の中がスクリプト部と HTML 部に分かれており、それぞれを出力するための手順が煩雑であった (図 2)。

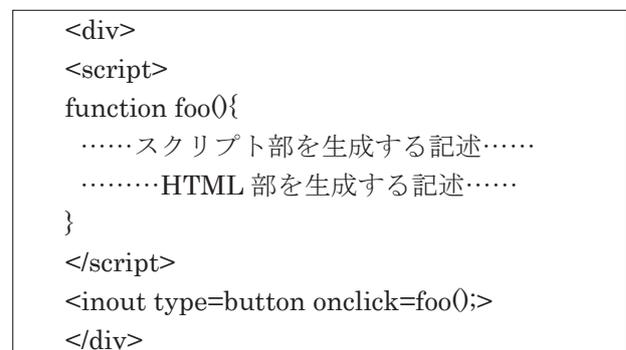


図 2. 従来の構成。

また、ボタンを生成する箇所についてほぼ同じ記述が繰り返されるため、複数の箇所に整合性をもって同じ修正をする作業が煩雑で、開発が難しいという問題があった。また、文字列中で特殊文字を処理するエスケープについてアドホックに対応していた

ためその処理も煩雑であった。

### 提案する改良点

大きく三つの変更を行った。

- 1) エスケープのための関数を定義して系統的に処理する。
- 2) 同じ記述の繰り返しを避けるため、第一世代は部品に分けた記述とし、第二世代をその場で埋め込み処理などにより作成しながら出力することで、それ以降の世代は単独で自己再生可能なものにする。
- 3) スクリプト部と HTML 部に分けず、ボタン内の onclick 部に複数行に渡るような複雑なスクリプトも書けることを利用する。それにより、全体が HTML 部のみで構成され、その内側の onclick 部に自己再生の処理スクリプトをすべて記述する方式<sup>8)</sup>とする (図 3)。

```

<div>
<input type=button onclick="
.....
.....次世代を生成する記述
.....
.....
">
</div>
    
```

図 3. Onclick 部に記述する構成。

### 自己再生スクリプトの手順

我々が対象とするスクリプトでは、自己再生の動作は次の三つの段階による方式を用いている。

- 1) 文字列を定義する
- 2) その文字列内の特定の場所 (「埋め込みマーク」と呼ぶ) をその文字列自身で置換する。つまり自身の一部に自身を埋め込む。
- 3) 置換された文字列を出力する。

図 4 に示すように、# を埋め込みマークとすると、文字列はその「左側」と「右側」に分けられている。ここでマーク「#」を「左側」「#」「右側」で置換する。



図 4. 自分自身を埋込む手順。

変数 a を宣言し、その値にある文字列を設定する操作は JavaScript では `var a=".....";` と表せる。その文字列に第二段階のような置換を行うには関数 `repVa` が適切に定義されていれば `repVa(a)` と表せ、その内容を出力する関数が `appDiv()` であるとする。

第一段階の結果が `var a="#"`; であるとき、全体は `var a="#" ; appDiv(repVa(a));` と表せる。ここで、先頭から # の直前の二重引用符"までを左側文字列、# の直後から末尾までを右側文字列 (枠で囲ってある) とし、# に埋込むように置換すると、`var a="var a=¥" #¥" ; appDiv(repVa(a)); ;appDiv(repVa(a));` となり、枠で囲った部分が繰り返す構造になる。なお、スクリプト中の " (二重引用符) で開始した文字列は " で終端するので、文字列内に " を記述する箇所は ¥ に変えるエスケープ処理 (詳細後述) をしてあるため、マーク # の前後 " は ¥ になっている。

これが実行されると、文字列 a は「`var a="#" ; appDiv(repVa(a));`」になって、それが置換された「`var a="var a=¥" #¥" ; appDiv(repVa(a)); ; appDiv(repVa(a));`」が出力され、同じものが得られて自己再生が達成できる。

### エスケープ処理

ここで用いる onclick 部の中のスクリプトで文字列を扱う場合は、図 5 のようにエスケープ (そのままでは扱えない文字を別の表現で記述すること) の範囲を二重にする必要がある。

JavaScript での文字列は " (二重引用符) で開始した場合に " で終端するので、この文字列内で " を記述するには " を ¥ に変える必要がある。これを「文字列エスケープ」と呼ぶ。

また、onclick 部分の文字列も " (二重引用符) で開始した場合に " で終端するので、この文字列内で " を記述するには " を &quot; に変える必要がある。これを「HTML エスケープ」と呼ぶ。

```

HTML エスケープの範囲
<input ... onclick=".....var x="....." .....>
文字列エスケープの範囲
<input ... onclick=".....var x="....." .....>
    
```

図 5. 二種類のエスケープ範囲。

### 実装詳細

#### ライブラリを構成する関数

これまで議論を簡略にするため、いくつかの関数は定義済みとしてきた。純粋な自己再生を行うにはこれらの関数の定義もスクリプトの一部に明示的に書き込み、それを含んで同じ内容を次の世代に出力する必要がある。以下では、それらの関数について述べる。(詳細は付録参照)

- 1) 元の HTML ページに要素を追加: 関数名 `appDiv`: 新たな div 要素を作成し、その内容は

引数で与えられた文字列としたものを、DOM 階層に追加する。

- 2) スクリプト中の文字列のためのエスケープ処理：関数名 `escStr`：ダブルクォート"で囲った JavaScript 文字列の中で特殊文字を表現するための処理である。¥は¥¥に、"は¥を前置、改行文字は¥r や ¥n に変換する。
- 3) HTML 文字列のためのエスケープ処理：関数名 `escHtml`：いくつかの文字をアンド記号による表現に書き換える。&は&amp;に、"は&quot;に、<は&lt;に、>は&gt;に変換する。なお、この二つの関数は置換を補助する関数 `repREg` を使用する。
- 4) 変数 `a` にある文字列へ自身の埋め込む処理：関数名 `repVa`：引数で渡された文字列の中の「#」を、「文字列エスケープした引数文字列自身」を「」で囲んだものに置換する。

### 発射台による構成

以下に各段階を示しながら、「発射台」法によって、次の世代を段階的に構成する手順を示す。

```
var core="var a=#:@;appDiv(repVa(a));";
```

ライブラリを含む定義に忠実な自己再生スクリプトを表現したものを `core` として作成する。なお、`#` は埋め込みマークであり `repVa` 関数で自分自身を埋め込む際に使用し、また `@` はライブラリ（前述の `appDiv`, `repVa`, `escStr`, `escHtml` と補助関数 `repREg`）を埋め込む為のマークである。

```
core =core.replace("@",lib);
```

そこにライブラリ部分を埋め込む。

```
var head=
'<input type=button value="click" onclick="';
var tail=">";
```

ボタン（input タグ）を記述した HTML のうち `onclick` より前と後の文字列を分割して `head`, `tail` として用意する。

```
var strA=head+escHtml(core)+tail;
```

スクリプトが記述された `core` をボタンを構成する `input` タグの部品で挟む。全体は HTML での記述になるで HTML エスケープ処理することが必要である。これが次世代以降の文字列 `a` になる。

```
appDiv(repVa(strA));
```

文字列 `a` について、その埋め込みマークに自身を埋め込んだものを `div` 要素としてページに追加する処理を行う。これにより第二世代が作成される。

### 討論

実装したスクリプトはブラウザに依存せず、

`onclick` 部のみでのスクリプトで自己再生動作を達成した。ただし、現在の実装ではライブラリ部分を文字列に変換したものを別に変数 `lib` に用意している。そのため厳密には「同じことを一度だけしか書かないこと」が達成できていない。これについては JavaScript の持つ `toString()` メソッドによって定義済みの関数オブジェクトからソースコードの記述を得られるので、それを利用すれば解決できる。ただし、改行文字の扱いなどがブラウザにより異なるのでさらなる検討が必要である。

### 文献

- 1) 有澤 誠 (1978) プログラミング・レクリエーション—ソフトウェア実習のガイド—. 近代科学社.
- 2) European Computer Manufacturers Association (2009) *Standard ECMA-262 ECMAScript Language Specification 3rd Edition*. <http://www.ecma-international.org/publications/standards/Ecma-262.htm>
- 3) Taivalsaari A, Mikkonen T, Ingalls D and Palacz K (2008) Web browser as an application platform: the lively kernel experience. *Sun Microsystems, SMLI TR: 2008-175*.
- 4) eyeOS . <http://eyeos.org/>
- 5) Gendai G and Xindong L (2010) Simple web OS system based on EXT framework and cloud computing. *Intl. Forum on Internet Tech. and App.* 2010: 448-450.
- 6) 金田 泰 (1997) Web ページを自己再生産する JavaScript プログラム. 夏のプログラミング・シンポジウム. 情報処理学会編 . pp.105-112.
- 7) 後藤正 (2010) スクリプトによる HTML ページの世代交代—自己再生プログラムの応用—. 神奈川大学理学部情報科学科 2009 年度卒業論文 .
- 8) 東方雄亮 (2011) JavaScript による自己再生プログラム—onclick 内記述のみで作成する方式—. 神奈川大学理学部情報科学科 2010 年度卒業論文.

### 付録

関数 `appDiv`：要素を DOM 階層に追加

```
function appDiv(s){
  var top=document.getElementById("rootId");
  var elm=document.createElement("div");
  elm.innerHTML=s; top.appendChild(elm);}
```

関数 `escStr`：文字列エスケープ

```
function escStr(ss){
  ss=replREg(ss,"¥¥¥¥","¥¥¥¥");
  ss=replREg(ss,"¥","¥¥¥");
  ss=replREg(ss,"¥r","¥¥r");
  return replREg(ss,"¥n","¥¥n");}
```

関数 `escHtml`：HTML エスケープ

```
function escHtml(ss){
  ss=replREg(ss,"&", "&amp;");
  ss=replREg(ss,"¥", "&quot;");
  ss=replREg(ss,"<", "&lt;");
  return replREg(ss,">", "&gt;");}
```

補助関数：文字列 `ss` 中の正規表現 `p1` にマッチするものを全て `p2` に置換する。前二つの関数で使用

```
function replREg(ss,p1,p2){
  return ss.replace(RegExp(p1,"g"),p2);}
```

関数 `repVa`：文字列中の `#` に自身を埋め込む

```
function repVa(a){
  return a.replace("#", escHtml(""+escStr(a)+""));
```

■短 報■

## 相模湾平塚沖の貝類相：2010年夏の調査結果

大和田正人<sup>1,2,3</sup> 金沢謙一<sup>1,2</sup>

Molluscan Fauna in Sagami Bay off Hiratsuka

Masato Owada<sup>1,2,3</sup>, Ken'ichi Kanazawa<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt125365@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Mollusks and bottom sediment were simultaneously collected by dredging Sagami Bay off Hiratsuka at depths of 3 to 43 m. One hundred thirty five specimens belonging to 30 species were obtained: 12 species of gastropods, 2 species of scaphopods, 15 species of bivalves and 1 species of cephalopods. All were warm-water species, 23 of which are known only from Japan and 6 of which are distributed from Japan to equatorial regions. The seafloor with fine-grained sand around 3 m deep was exclusively occupied by *Umbonium giganteum*. The bottom sediment around 10 m deep was fine-grained sand in which *Veremolpa micra* and *Nitidorelina minuta* were dominant. The substrate from 22 to 23 m deep was composed of very fine- to fine-grained sand with pebbles, from which a variety of bivalves, not only burrowing but also sessile ones, were found. From 30 m deep the substrate gradually includes mud and in muddy very fine-grained sand *Glycymeris imperialis* and *Episiphon suberctum* are dominant accompanied by different kinds of gastropods.

**Keywords:** molluscan fauna, bottom sediment, dredge, Hiratsuka, Sagami Bay

### 序論

相模湾に生息する貝類については多くの調査研究があるが、調査された場所は東部の三浦半島周辺、西部の伊豆半島周辺に集中している<sup>1-5)</sup>。対照的に、相模湾中央北部の水深の浅い海域での調査は少なく、近年、大和田ほか<sup>6)</sup>による平塚沖の貝類相の調査、佐藤ほか<sup>7)</sup>による藤沢市地先のダンベイキサゴの調査があるが、未だ十分ではない。また、貝類の分布域が底質に強く影響されることはよく知られているが、実際に貝類と海底堆積物を同時に採集して解析した例は少なく、それらの関係が十分に調査されているとは言い難い。

そこで、本研究では相模湾中央部の平塚沖において貝類の分布状況と底質との関係を調べ、その結果を大和田ほか<sup>6)</sup>および佐藤ほか<sup>7)</sup>と比較検討し、当海域における貝類相の現況について考察する。

### 材料と方法

平塚沖の貝類相の現況を調べるため、漁船をチャ

ーターし、2010年8月30日に平塚新港から南西方向約100～1500mの海域でドレッジを7回曳き、底生生物と海底堆積物を採集した(図1、表1)。底生生物の採集に用いたドレッジは間口50×15cm、袋部のメッシュサイズ20mmの簡易ドレッジ(離合社、5121-B)、海底堆積物の採集に用いたドレッジは直径17cm、長さ42cmの小型円筒形ドレッジ(離合社、5113)である。簡易ドレッジの後部に小型円筒形ドレッジを連結し、底生生物と海底堆積物を同時に採集した。採集した底生生物は100%エタノールで固定し、軟体動物については奥谷<sup>8,9)</sup>とOyama<sup>10)</sup>に基づき、種を同定して地理的分布を調べた。海底堆積物については目視で種類と粒度を調べた。

### 結果 貝類

今回の調査では、腹足綱12種、堀足綱2種、二枚

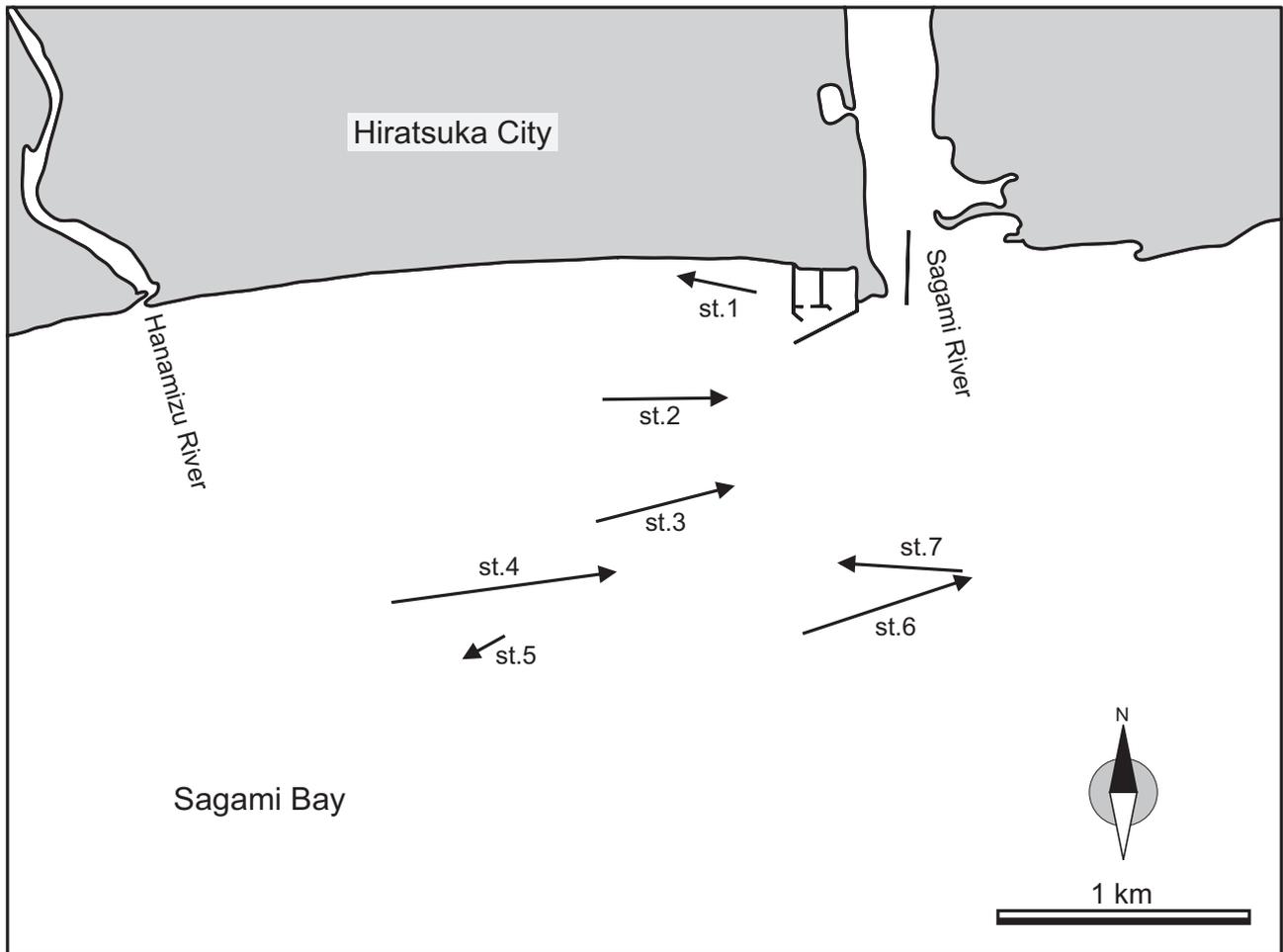


図 1. ドレッジを投入した位置と回収した位置. 矢印の元がドレッジを投入した位置. 矢印の先がドレッジを回収した位置を示す.

表 1. ドレッジを投入した位置と回収した位置の緯度経度, 水深および海底堆積物の種類と粒度

station	位置	水深(m)	海底堆積物
st.1	35°18'50.9"N 139°21'31.6"E	3	細粒砂
	35°18'48.8"N 139°21'43.7"E	3	
st.2	35°18'34.4"N 139°21'40.2"E	10	細粒砂
	35°18'34.4"N 139°21'19.5"E	10	
st.3	35°18'16.3"N 139°21'18.2"E	23	泥を含む細粒砂
	35°18'12.9"N 139°21'41.5"E	22	
st.4	35°18'07.9"N 139°21'21.2"E	30	細粒砂
	35°18'08.9"N 139°20'58.8"E	30	
st.5	35°18'01.0"N 139°21'04.1"E	40	泥を含む細粒砂
	35°17'58.5"N 139°20'58.1"E	43	
st.6	35°18'02.8"N 139°21'52.0"E	40	極細粒砂
	35°18'07.7"N 139°22'20.0"E	35	
st.7	35°18'08.9"N 139°22'19.0"E	33	泥を含む極細粒砂
	35°18'12.0"N 139°21'55.5"E	23	

貝綱 15 種、頭足綱 1 種の合計 30 種 135 個体の生貝が採集された (表 2)。表 3 にそれらの地理的分布域をまとめた。

**海底堆積物**

st.1 は水深 3 m、底質は細粒砂であった。st.2 は

水深 10 m、底質は細粒砂であった。st.3 は水深 22 ~ 23 m、底質は泥を含む細粒砂であった。st.4 は水深 30 m、底質は細粒砂であった。st.5 は水深 40 ~ 43 m、底質は泥を含む細粒砂であった。st.6 は水深 35 ~ 40 m、底質は極細粒砂であった。st.7 は水深 23 ~ 33 m、底質は泥を含む極細粒砂であった (表 1)。

**討論**

今回採集された貝類は、分布域が不明のコゲマキノシャジクと紀伊半島が北限のハブタエエガイの 2 種を除き、全て暖流系の種であった。これらのうち、北海道南部が北限の種は 44.8 %、房総半島周辺が北限の種は 51.7 % であった (表 3)。ハブタエエガイは大和田ほか<sup>6)</sup>の平塚沖同海域の 2007 年の調査でも採集されたが、性成熟サイズに達した個体が見られなかったため、無効分散とされた。今回の調査でも性成熟サイズに達した個体が見られず、無効分散と考えられる。ハブタエエガイは黒潮によって毎年平塚沖に運ばれるが、越冬できずに死滅するのであろう。

表 2. 本調査で採集された貝類

	学名	和名	st.1	st.2	st.3	st.4	st.5	st.6	st.7	
腹足綱	<i>Calliostoma aculeatum</i> Sowerby III, 1912	トゲエビス					1		1	
	<i>Umbonium giganteum</i> (Lesson, 1833)	ダンベイキサゴ	32							
	<i>Glossaulax didyma</i> (Röding, 1798)	ツメタガイ	1	1	1	1			4	
	<i>Reticunassa cf. multigranosa</i> (Dunker, 1847)	cf. ヒメムシロ							1	
	<i>Olivella fulgurata</i> (Adams & Reeve, 1850)	ムシボタル		2						
	<i>Tomopleura nivea</i> (Philippi, 1851)	マキモノシャジク			1				1	
	<i>Tomopleura cf. pouloensis</i> (Jousseaume, 1883)	cf. コゲマキモノシャジク							1	
	<i>Lophiotoma (Lophioturris) leucotropis</i> (Adams & Reeve, 1850)	クダマキガイ				2			1	
	<i>Paradrillia consimilis</i> (E.A.Smith, 1879)	ヒメシャジク							1	
	<i>Pseudoetrema cf. fortirata</i> (E.A.Smith, 1879)	cf. ホソシャジク							1	
	<i>Brevimyrella japonica</i> (E.A.Smith, 1873)	ヒメトクサ							1	
	<i>Triplostephanus triseriata</i> (Gray, 1843)	キリガイ							1	
	掘足綱	<i>Dentalium octangulatum</i> Donovan, 1804	ヤカドツノガイ							1
		<i>Episiphon subrectum</i> (Jeffreys, 1883)	ロウソクツノガイ			1				10
	二枚貝綱	<i>Jupiteria (Saccella) confusa</i> (Hanley, 1860)	ゲンロクソデガイ			1	1			1
<i>Barbarca tenella</i> (Reeve, 1844)		ハブタエエガイ				5				
<i>Glycymeris imperialis</i> Kuroda, 1934		ミタマキガイ		1	3	1		1	14	
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819		ムラサキガイ			1					
<i>Modiolus flavidus</i> (Dunker, 1857)		サザナミマクラ							1	
<i>Musculista perfragilis</i> (Dunker, 1857)		ノジホトトギス							1	
<i>Nitidotellina minuta</i> (Lischke, 1872)		ウズザクラ		4						
<i>Veremolpa micra</i> (Pilsbry, 1904)		ヒメカノコアサリ		9						
<i>Placamen tiara</i> (Dillwyn, 1817)		ハナガイ				2	2		7	
<i>Callista chinensis</i> (Holtén, 1803)		マツヤマウスレ			2				2	
<i>Solidicorbula erythrodon</i> (Lamarck, 1818)		クチベニガイ					1			
<i>Lyonsia ventricosa</i> Gould, 1861		サザナミガイ			2				2	
<i>Pandorella pseudobilirata</i> (Nomura & Hatai, 1940)		ウスネリガイ							1	
<i>Laternula anatina</i> (Linnaeus, 1758)		オキナガイ			1					
<i>Cuspidaria nobilis nobilis</i> (A.Adams, 1864)		オオシャクシ							1	
頭足綱		<i>Octopus ocellatus</i> Gray, 1849	イイダコ			1				
合計		30種		33	17	21	7	2	1	54

学名と和名は奥谷<sup>9)</sup>にしたがった。

表 3. 採集された貝類の主な分布域

分布域	種数	割合(%)	個体数	割合(%)
北海道以南	2	6.7	2	1.5
房総半島以南	2	6.7	2	1.5
東京湾以南	1	3.3	2	1.5
相模湾以南	1	3.3	1	0.7
北海道南部～沖縄	3	10.0	20	14.8
北海道南部～九州	6	20.0	31	23.0
本州～九州	2	6.7	2	1.5
房総半島～沖縄	5	16.7	18	13.3
房総半島～九州	6	20.0	51	37.8
紀伊半島～沖縄	1	3.3	5	3.7
不明	1	3.3	1	0.7
合計	30種	100	135個体	100

分布域が不明のコゲマキモノシャジクは集計から除外されている。

今回の調査では、水深 3 m の細粒砂底からダンベイキサゴが排他的に多数採集されたが、2007 年の調査ではダンベイキサゴは 1 個体も採集されていない<sup>6)</sup>。これは、2007 年の調査では、ドレッジを行った最も浅い場所が水深 6～8 m であり<sup>6)</sup>、ダンベイキサゴが生息するとされる水深 5 m 以浅では調査を行わなかったためと考えられる。佐藤ほか<sup>7)</sup>による藤沢地先の調査では、ダンベイキサゴは水深 1～5 m の砂底にダンベイキサゴ・バカガイ帯を形成して生息する優占種であり、これら 2 種は all-or-nothing 型の分布を示すと言う。今回の調査で

もバカガイ 0 個体に対し、ダンベイキサゴ 32 個体と、佐藤ほか<sup>7)</sup>の結果と同様であった。今回は水深 3 m の深さをほぼ維持してドレッジしたことを考えると、水深の僅かな違いによる微妙な海底環境の違いがこれら 2 種の分布を分けている可能性がある。相模湾のダンベイキサゴは昭和 30 年代までは多数生息していたが、その後激減し、最近になって回復傾向にある<sup>7)</sup>。今回採集されたダンベイキサゴは十分に性成熟サイズに達しており、平塚沖で繁殖している可能性が高い。平塚沖でもダンベイキサゴは確実に回復していると考えられる。

水深 10 m 付近の細粒砂底からはヒメカノコアサリ、ウズザクラなどが採集されており、この水深ではこれら 2 種が優占種である。水深 22～23 m 付近からはハブタエエガイ、ミタマキガイなどの二枚貝類が採集された。2007 年の調査では、ほぼ同じ水深からハブタエエガイ、サザナミガイ、サクラガイなどの二枚貝類が採集されている<sup>6)</sup>。これらはそれぞれ異なる海底環境に生息する。例えば、ハブタエエガイは礫に付着し、サザナミガイやサクラガイは砂底、ミタマキガイは砂泥底に潜行する。この水深の底質は細粒砂から極細粒砂であるが、淘汰が悪く、礫や泥を含む。したがって、狭い範囲に多様な海底環境があり、そこに様々な二枚貝類が生息すると見られる。このため、優占種が不明瞭となっているのであろう。水深 30 m 以深ではロウソクツノガ

イヤマタマキガイが優占するが、腹足類の多様性も高い。底質は極細粒砂であり、深さに比例して泥が多くなる。貝類は泥の多い場所で比較的多く採集されているが、泥を多く含む場所は散在しており、海底環境は必ずしも均質ではない。

今回採集された種数は2007年の調査に比べると少ないが<sup>6)</sup>、これは使用したドレッジのメッシュサイズが大きく、特に泥を含む海底堆積物では、体サイズが小さい種を十分に採集できなかったためであろう。また、2007年の調査において水深8～13 mで採集されたキサゴが今回は全く採集されなかったが<sup>6)</sup>、その理由については現時点では明らかではない。

## 謝辞

ドレッジによる底生生物と海底堆積物の採集については、平塚漁業組合の小久保誠氏にご協力を頂いた。底生生物の仕分け、リストの作成については、2010年度博物館実習Ⅰ（自然史・文化史資料実習）を履修した学生にご協力頂いた。これらの方々より感謝を申し上げる。

## 文献

1) 黒田徳米 (1934) 御採集にかゝる相模湾産稀貝類.

*グキナス* 4: 204-208.

- 2) 黒田徳米, 波部忠重, 大山桂 (1971) *相模湾産貝類*. 生物学御研究所編, 丸善, 東京.
- 3) Horikoshi M (1957) Note on the molluscan fauna of Sagami Bay and its adjacent waters. *Sci. Rep. Yokohama National Univ., Section II*. 6: 37-64.
- 4) 奥谷喬司 (2006) 2002～2004年に相模湾の陸棚・斜面および漸深海帯から採集された原鰓類および異韌帯類 (二枚貝綱). *国立科学博物館専報* 40: 295-306.
- 5) 長谷川和範 (2006) 2001年から2004年に主に東京大学臨海丸によって採集された三浦半島周辺の潮下帯および漸深海帯苛性有殻腹足類. *国立科学博物館専報* 40: 225-281.
- 6) 大和田正人, 吉田奈央, 佐藤武宏, 金沢謙一 (2007) 海産無脊椎動物の相互作用と形態・適応の進化、および、人間活動がこれらに与える影響—相模湾平塚沖浅海の貝類と海底環境—. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 18: 77-80.
- 7) 佐藤武宏, 利波之徳, 山本章太郎 (2009) 藤沢市地先の相模湾におけるダンベイキサゴの分布と成長について. *Bull. Kanagawa prefect. Mus. (Nat. Sci.)*. 38: 95-106.
- 8) 奥谷喬司 (1986) *決定版生物大図鑑貝類*. 世界文化社, 東京.
- 9) 奥谷喬司 (2000) *日本近海産貝類図鑑*. 東海大学出版, 東京.
- 10) Oyama K (1973) Revision of Matajiro Yokoyama's type Mollusca from the Tertiary and Quaternary of Kanto Area. *Palaeontological Society of Japan, Special Papers* 17: 1-148.

■テクニカルノート■

## コンピュータプログラムを用いたプライマーの設計と特異性予測

鈴木 温<sup>1,4</sup> 山口栄雄<sup>2</sup> 安積良隆<sup>1,3</sup> 井上和仁<sup>1,3</sup>

### Primer Design and Specificity Assessment Using Computer Programs

Tadzun Suzuki<sup>1,4</sup>, Shigeo Yamaguchi<sup>2</sup>, Yoshitaka Azumi<sup>1,3</sup> and Kazuhito Inoue<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup> Faculty of Engineering, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, 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: pt125505cl@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Computer programs are regularly used to design primers for polymerase chain reaction (PCR) and to evaluate the qualities of the primers. Primer3 is a well-known program that suggests PCR primers, and Electronic-PCR (e-PCR) maps sequence-tagged sites on genome sequences. This report introduces the application of e-PCR to predict the specificity of the primers selected by Primer3 for *Arabidopsis thaliana* genes. Using various experimental examples, we discuss the usage of these programs, and the factors to consider for primer design and PCR optimization.

**Keywords:** annealing temperature, electronic-PCR (e-PCR), melting temperature, Primer3, sequence-tagged site (STS) mapping

## 序論

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による DNA 増幅の成否を左右する最大の要因はプライマーの特異性であり、その設計は最も重要なステップの一つと言える。プライマー設計はプログラムを使用するのが主流となっており、代表的なものとして Primer3<sup>1)</sup> や Oligo<sup>2)</sup> (<http://oligo.net/>) がある。ゲノムサイズの大きな生物を対象とする場合にはプログラムの使用が推奨されている。また、設計段階で配列特異性を評価できるならば、より効率的に研究を進められると期待される。配列特異性を予測する方法のひとつは BLAST や FASTA などのペアワイズアラインメントを利用することである。また、STS (sequence tagged site) マッピングのプログラム Electronic-PCR (e-PCR) はプライマー配列から PCR における増幅産物を予測することに利用できる。何れも一長一短はあるが、ゲノム配列が決定した生物種においてはプライマーの特異性を評価する一助となるはずである。

PCR の条件検討は反応の至適化でしかないが、一般にプライマーの融解温度 (Tm) はアニーリング温度 (Ta) と大まかに相関しているだけであり、最適 Ta を実験的に確かめておく必要がある。また、

特異性や収量を改善する為に反応液組成に変更を加えた時、最適 Ta が変化することもある<sup>3)</sup>。故に、至適化に際して反応液組成が Ta に与える影響も考慮しておかねばならない。

PCR の原理の単純さや実験操作の簡便さに比べ、プライマーの設計と評価、そして条件の至適化は手間のかかる作業である。しかしながら、クローニング、配列決定あるいは定量的解析を目的とした PCR には、これらの知識は問題解決の助けとなるであろう。本稿では Primer3 を用いたプライマーの設計と e-PCR による特異性の評価方法について紹介する。更に、PCR 条件を検討する際の注意点について考察する。

## 材料と方法

### 標的配列

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の遺伝子 AT2G23970 の開始コドンから第 2 エクソン終端まで、AT4G01985 のコーディング領域 (CDS. 終止コドンを含む) とその内部領域、及び AT4G19770 の全 CDS (終止コドンを含む) を標的配列とした。染色体上の位置と標的配列長はそれぞれ、第 2 染色

体 10,199,698 番塩基からの 1,264 bp、第 4 染色体 866,387 番塩基から 1,740 bp、867,001 番塩基から 1,000 bp、及び 10,753,310 番塩基から 872 bp である。何れも TAIR9 のゲノム配列 (GenBank refseq: NC\_003071.7 及び NC\_003075.7) を使用した。

### プライマーの設計

プライマーの設計には Primer3 (<http://sourceforge.net/projects/primer3/>) を用いた。図 1 に AT4G01985 の CDS を目的配列とする Primer3 の入力ファイルの内容を示す。入力鋳型配列には、標的配列の上流下流それぞれに 2 kb を加えた配列を用いた。標的配列のみを増幅するように SEQUENCE\_INCLUDED\_REGION に標的配列の位置と長さを指定し、PRIMER\_TASK に pick\_cloning\_primers を選択した。更にプライマーの 3'-末端が G または C となるようにした (PRIMER\_GC\_CLAMP=1)。左右プライマーの Tm の差は 4°C に収まる設定とし、二価陽イオン及び dNTP の濃度は *Ex Taq* DNA polymerase (タカラバイオ) の推奨濃度、2.0 mM Mg<sup>2+</sup> 及び 0.8 mM dNTP とした。dNTP 濃度は各 dNTP の濃度の和 (dATP 0.2 mM + dTTP 0.2 mM + dGTP 0.2 mM + dCTP 0.2 mM) である。Tm 計算の為にパラメータテーブルと塩濃度依存温度補正は何れも SantaLucia 1998 を選択した。3'-末端 5 塩基対の最大ギブズエネルギー (-ΔG) は 4.5 kcal/mol (1 cal = 4.184 J) とした (PRIMER\_MAX\_END\_STABILITY タグの値の単位は kcal/mol である)。

AT4G01985 の内部配列については、CDS に対

```
SEQUENCE_ID=1:NC_003075.7:AT4G01985(866387,1740)
SEQUENCE_TEMPLATE=gggtatatataaaactgcttcgacattaataat...
SEQUENCE_INCLUDED_REGION=866387,1740
PRIMER_TASK=pick_cloning_primers
PRIMER_MAX_TEMPLATE_MISPRIMING=12.0
PRIMER_PAIR_MAX_TEMPLATE_MISPRIMING=24.0
PRIMER_PRODUCT_SIZE_RANGE=1501-2000
PRIMER_GC_CLAMP=1
PRIMER_MAX_END_GC=5
PRIMER_PAIR_MAX_DIFF_TM=4.0
PRIMER_TM_FORMULA=1
PRIMER_SALT_DIVALENT=2.0
PRIMER_DNTP_CONC=0.8
PRIMER_SALT_CORRECTIONS=1
PRIMER_MAX_END_STABILITY=4.5
PRIMER_PICK_ANYWAY=0
PRIMER_EXPLAIN_FLAG=1
PRIMER_FIRST_BASE_INDEX=864387
=
```

図 1. primer3\_core の入力ファイルの記述形式。各レコードは一論理行に TAG=VALUE の形式で記述し、空白行を含めない。最後の「=」は、ひとつの問合せの終端を示す。ここには Primer3 の初期設定から値を変更した項目のみを示している。

するのと同様の設定ではプライマー候補配列が検出できなかった。PRIMER\_GC\_CLAMP を 0 に、PRIMER\_MIN\_TM、PRIMER\_OPT\_TM 及び PRIMER\_MAX\_TM をそれぞれ 60.0、63.0 及び 66.0 に、PRIMER\_MAX\_END\_STABILITY を 5.0 にと順次変更した場合にもプライマー候補は得られなかった為、PRIMER\_PICK\_ANYWAY を 1 にして強制的に候補を挙げさせた。

AT4G19770 遺伝子については、標的配列の外側にプライマーを設計した。SEQUENCE\_TARGET に標的配列の位置と長さを設定することで、この外側にプライマーが設計される。SEQUENCE\_INCLUDED\_REGION には標的配列の上流 50 bp の位置と標的配列よりも 100 bp 長い値を入れ、標的配列の両端から外側 50 bp 以内でプライマーを検索するようにした。PRIMER\_GC\_CLAMP を 0、PRIMER\_OPT\_SIZE を 24、PRIMER\_MAX\_SIZE を 30 に変更し、他は AT4G01985 と同様とした。AT2G23970 はプライマー長の設定をプログラム初期値に戻した以外は、AT4G19770 同様の方針と設定で設計した。

コマンドは

```
$ primer3_core input_file
```

結果を視覚的に捉えやすい形式で出力させるならば -format\_output オプションを使用する。

### Tm の計算

Tm の計算には、補正式とパラメータ/条件の組み合わせを変えた 4 通りの最近隣塩基対法を用いた。ひとつは Primer3 の設定に合わせ、SantaLucia のパラメータと計算式<sup>4)</sup>に Ahsen-Wittwer-Schütz の陽イオン濃度変換<sup>5)</sup>を組み合わせた方法である (NN-1)。プライマー設計時と同様、一価イオン濃度 50 mM、二価陽イオン濃度 2.0 mM、dNTPs 濃度 0.8 mM、二本鎖オリゴ濃度 50 nM として計算した。第二は、Owrczarzy 等の計算式<sup>6)</sup>を用い、パラメータ他の条件は NN-1 と同じとした (NN-2)。第三は、Rychlik-Spencer-Rhoads の計算式<sup>7)</sup>と Breslauer 等のパラメータ<sup>8)</sup>を使用し、塩濃度変換は行なわずに一価陽イオン濃度 50 mM とし、また、二本鎖オリゴ濃度は 50 nM とした (NN-3)。あとひとつは NN-3 と同じ手法であるが、Sigma-Aldorich 社での算出方法に倣い二本鎖オリゴ濃度を 500 nM とした (NN-4)。

NN 法との比較の為に、Wallace 法 (W) と %GC 法による Tm も求めた。%GC 法の計算式には多数の変法が存在するが、広く使用されている以下の式を用いた (GC-1)。

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log[Na^+] + 0.41 (\%GC) - b/L$$

ここで、 $[Na^+]$  は反応液中の陽イオンモル濃度、 $\%GC$  はプライマー配列中の GC 含量パーセント、そして  $L$  はプライマーの長さである。 $[Na^+]$  は 50 mM、鎖長依存項の定数  $b$  は 500 とした。また、GC-1 に Ahsen-Wittwer-Schütz 変換を適用した (GC-2)。一価及び二価陽イオンと dNTP の濃度は NN 法の場合と同じとし、定数  $b$  は 631 で計算した。

### プライマー 3'-末端 5 塩基対の $\Delta G$ の計算

プライマー 3'-末端 5 塩基対の  $\Delta G$  を最近隣塩基対法により計算した。計算方法は Primer3 と同様、SantaLucia のパラメータを使用した場合は helix initiation を考慮した SantaLucia の計算式を用い (dG-1)、Breslauer 等のパラメータには helix initiation を考慮しない方法<sup>9)</sup>を用いた (dG-2)。

### STS マッピング

非特異的増幅の可能性を推定する為に e-PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/>) により STS マッピングを行った。入力データの STS データベース形式ファイルには左右プライマーのペアの他、一方のプライマーのみのセルフペアも記述し、それらについても調査した (図 2A)。ターゲットはシロイヌナズナのゲノム配列の FASTA 形式ファイルを用いた。マッピングの条件は、各プライマー配列内で最大 4 個のミスマッチを許容し、期待される増幅産物長  $\pm 2,000$  bp の範囲の多型を検索することとした。セルフペアの期待産物長は左右プライマーペアの期待産物長を使用した。コマンドは `$ e-PCR -m 2000 -n4 -t3 sts_file fasta_file` また、プライマーと標的配列のアラインメントを得る為に、`-t` の引数を 4 に変更して実行した。

### ゲノム DNA の抽出

25°C、14 時間明期の短日条件下で栽培したシロイヌナズナ (エコタイプ Columbia) の葉からゲノム DNA (gDNA) を簡易 CTAB 法により抽出した。50-100 mg の葉を 100  $\mu$ l の CTAB 緩衝液 [100 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 3% (w/v) hexadecyltrimethylammonium bromide, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (MW 40,000)] 中で破碎した。400  $\mu$ l の CTAB 緩衝液を追加して 65°C にて 30 分間処理した後、500  $\mu$ l のクロロホルムを添加し、室温にて 30 分間緩やかに振盪混和した。17,000  $\mu$ g で室温にて 10 分遠心し、上部水層を新しいサンプルチューブに移した。この水溶液を 0.7 倍量の 2-プロパノールと混和して室温に 10 分静置した後、再度遠心した。沈殿を 70% エタノールで濯ぎ、37°C で 5 分間風乾した後、20  $\mu$ g/ml の RNase A を含む T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) 20  $\mu$ l に溶解した。

### ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

PCR は次の条件で行なった。反応液組成は 0.5 ng/ $\mu$ l gDNA, 1x 緩衝液, 1.6~2.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1~0.4 mM each dNTP, 0.2  $\mu$ M each primer, 0.025 unit/ $\mu$ l DNA polymerase とした。DNA ポリメラーゼは *Ex Taq* またはホットスタート用 *Ex Taq* (タカラバイオ) を、緩衝液は *Ex Taq* buffer または *LA Taq* buffer (タカラバイオ) を使用した。温度サイクラーは iCycler (BioRad) を使用した。3 ステップ PCR の反応サイクルは 94°C, 2~4 分; 25x[94°C, 30 秒; Ta, 20 秒; 72°C, 1 分/kb]; 72°C, 3 分とし、Ta は 48~68°C の間で 2°C 間隔にて行なった。グラジエント PCR では 48~58°C と 58~68°C の二回に分けた。2 ステップ PCR の反応サイクルは 98°C, 2 分; 25x[98°C, 5 秒; Tx, 1 分/kb]; Tx, 3 分とした。伸長反応温度 Tx は 68, 70 または 72°C で行なった。

表 1. 7 種類の方法によって計算した  $T_m$

Set	Primer sequence	Length	GC%	$T_m$ (°C)							
				NN-1	NN-2	NN-3	NN-4	GC-1	GC-2	W	
1	LEFT TTAGCGTCGTCGGTTTCCC	19	57.9	60.6	63.1	63.4	67.1	57.3	59.7	60	
	RIGHT ATGGGAAAATTCGTGAGAAGGG	22	45.5	59.2	61.1	63.5	66.9	55.8	59.2	64	
2	LEFT CGCCTCCACCTCCGCCAA	18	72.2	65.3	69.0	70.3	74.2	61.7	63.8	62	
	RIGHT GGAAGAGGAAGTGTGGTGTGG	23	52.2	62.1	64.4	64.2	67.7	59.6	63.2	70	
3	LEFT TCGGATGATAAATCTTAGTATATTTCCA	28	28.6	57.0	57.8	59.6	62.4	53.8	58.4	72	
	RIGHT CTAACAAAGACGCGTTTGCATC	22	45.5	59.6	61.0	62.0	65.5	55.8	59.2	64	
4	LEFT AACACAACAACAACAACAACA	23	30.4	57.5	58.1	58.1	61.7	50.6	54.2	60	
	RIGHT TCCAACAAGTAACACTAAAGACGA	24	37.5	58.6	59.9	58.1	61.4	54.4	58.3	66	

A

#- sts	left_primer	right_primer	size	note
Set1	TTAGCGTCGTCGGTTTCCC	ATGGGAAAATTCGTGAGAAGGG	1740	Set1
Set1_L	TTAGCGTCGTCGGTTTCCC	TTAGCGTCGTCGGTTTCCC	1740	Set1:Left/Left
Set1_R	ATGGGAAAATTCGTGAGAAGGG	ATGGGAAAATTCGTGAGAAGGG	1740	Set1:Right/Right
#- sts	left_primer	right_primer	size	note
Set2	CGCCTCCACCTCCGCCAA	GGAAGAGGAAGTGTGGTGTGG	1000	Set2
Set2_L	CGCCTCCACCTCCGCCAA	CGCCTCCACCTCCGCCAA	1000	Set2:Left/Left
Set2_R	GGAAGAGGAAGTGTGGTGTGG	GGAAGAGGAAGTGTGGTGTGG	1000	Set2:Right/Right
#- sts	left_primer	right_primer	size	note
Set3	TCGGATGATAAATCTTAGTATATTTCCA	CTAACAAAGACGCGTTTGCATC	932	Set3
Set3_L	TCGGATGATAAATCTTAGTATATTTCCA	TCGGATGATAAATCTTAGTATATTTCCA	932	Set3:Left/Left
Set3_R	CTAACAAAGACGCGTTTGCATC	CTAACAAAGACGCGTTTGCATC	932	Set3:Right/Right
#- sts	left_primer	right_primer	size	note
Set4	AACAACAACAACAACAACAACA	TCCAACAAGTAACACTAAAGACGA	1264	Set4
Set4_L	AACAACAACAACAACAACAACA	AACAACAACAACAACAACAACA	1264	Set4:Left/Left
Set4_R	TCCAACAAGTAACACTAAAGACGA	TCCAACAAGTAACACTAAAGACGA	1264	Set4:Right/Right

B

#- seq	sts	strand	start	end	act/exp	mism	gap	info
Chr4	Set1	+	866387	868126	1740/1740-1740	0	0	Set1
#- seq	sts	strand	start	end	act/exp	mism	gap	info
Chr4	Set2	+	867001	868000	1000/1000-1000	0	0	Set2
Chr4	Set2	+	866551	868000	1450/1000-1000	3	0	Set2
Chr4	Set2	+	867001	867403	403/1000-1000	4	0	Set2
Chr1	Set2	+	8550251	8550308	58/1000-1000	5	0	Set2
Chr4	Set2	+	866551	867403	853/1000-1000	7	0	Set2
Chr1	Set2	+	1478185	1478398	214/1000-1000	8	0	Set2
Chr5	Set2_L	+	832747	833692	946/1000-1000	6	0	Set2:Left/Left
Chr5	Set2_L	-	832747	833692	946/1000-1000	6	0	Set2:Left/Left
Chr4	Set2_L	+	18123114	18123700	587/1000-1000	8	0	Set2:Left/Left
Chr4	Set2_L	-	18123114	18123700	587/1000-1000	8	0	Set2:Left/Left
#- seq	sts	strand	start	end	act/exp	mism	gap	info
Chr4	Set3	+	10753273	10754204	932/932-932	0	0	Set3
Chr4	Set3	+	10760943	10761866	924/932-932	3	0	Set3
Chr4	Set3	+	10759941	10761866	1926/932-932	4	0	Set3
#- seq	sts	strand	start	end	act/exp	mism	gap	info
Chr2	Set4	+	10199673	10200936	1264/1264-1264	0	0	Set4
Chr2	Set4_L	+	12821078	12823025	1948/1264-1264	2	0	Set4:Left/Left
Chr2	Set4_L	-	12821078	12823025	1948/1264-1264	2	0	Set4:Left/Left
Chr1	Set4_L	+	28131853	28132959	1107/1264-1264	3	0	Set4:Left/Left
Chr1	Set4_L	-	28131853	28132959	1107/1264-1264	3	0	Set4:Left/Left

C

#- seq	sts	strand	start	end	act/exp	mism	gap	info
Chr4	Set2	+	867001	868000	1000/1000-1000	0	0	Set2
#-	CGCCTCCACCTCCGCCAA...959...CCAACACCAACTTCCTCTTCC							
#-	959							
#-	gcCGCCTCCACCTCCGCCAA...959...CCAACACCAACTTCCTCTTCCat							
Chr4	Set2	+	866551	868000	1450/1000-1000	3	0	Set2
#-	CGCCTCCACCTCCGCCAA...1409...CCAACACCAACTTCCTCTTCC							
#-	1409							
#-	tcCACCACCAACTCCGCCAA...1409...CCAACACCAACTTCCTCTTCCat							
...								
Chr1	Set2	+	8550251	8550308	58/1000-1000	5	0	Set2
#-	CGCCTCCACCTCCGCCAA...17...CCAACACCAACTTCCTCTTCC							
#-	17							
#-	acCGCCTCCACCACTCCGCCAA...17...GCAACACCACCTTCCTCTTCCc							

図2. STS データベース形式と e-PCR の結果. 何れもタブ区切り値の標準テキストである. A. プライマーセットを記載した STS データベース. # で始まる行はコメントと見なされデータとして扱われない. B. e-PCR の出力結果, Set4 に関する結果は一部のみ示した. C. -t の引数を 4 として e-PCR を実行するとプライマーと標的配列のアラインメントも得られる. 3' 末端が一致しなくとも, ミスマッチ数が設定値に収まればヒットしてしまう点に注意. B と C は ruby により結果を並べ替えて整形してある.

## 結果

### Tm 計算法の比較

Primer3 を用いて 4 個の標的配列それぞれについてプライマーセットを設計した (表 1). Tm は使用する手法により異なる. NN-1 によって得られる Tm は設計時に Primer3 で計算された値と同じである. ここで用いた計算方法では, 予測 Tm は凡

そ, GC-1 < NN-1 < NN-2 ≈ NN-3 < NN-4 となった. Wallace 温度は鎖長と GC 含量で大きく変化し比較できない。

GC-1 の式に Ahsen-Wittwer-Schütz の変換式を適用した GC-2 は, 経験的には定数 b を 600 から 650 程度にすると NN-1 と近い値になる. GC 含量が 40~60% で長さ 20~30mer の配列をコンピュー

タでランダムに生成して  $T_m$  を計算した場合、 $b$  を 630 前後にすると NN-1 とよく近似した。表 1 には 631 を用いた結果を示した。

### 至適 $T_a$ 範囲と予測 $T_m$ の比較

$T_m$  から実際の  $T_a$  が予測可能かどうか確かめるために温度条件を変えた PCR を行った。その結果、*Ex Taq* DNA polymerase で推奨される反応液組成では、Set1 の至適  $T_a$  範囲は凡そ 58~66°C であり (図 3A)、NN-4 と GC-1 以外はこの範囲に収まった。しかし、dNTP 濃度を下げると  $T_a$  は上昇し、dNTP 濃度を上げると  $T_a$  は低下する。dNTP 濃度の変更に合わせて  $Mg^{2+}$  を変更すると標準時の  $T_a$  に戻る。

Set2 の場合、通常の方法ではプライマーダイマーが増幅し、標的の増幅効率を低下させた (図 3B)。緩衝液を *LA Taq* buffer または *KLA buffer*<sup>10)</sup> に変更してクールスタート法 (島津製作所 特許 2576741) を使用すると、プライマーダイマーが減少し、増幅率が改善する。ホットスタート-2 ステップ PCR ではプライマーダイマーはアガロースゲル電気泳動では検出できないレベルに低下した。至適  $T_a$  は予測  $T_m$  よりもかなり高く、3 ステップ PCR では副産物が増幅した。副産物の無い至適範囲は 68~70°C であり、2 つのプライマーの  $T_m$  の低い方がこの範囲に近いのは NN-4 のみであった。

Set3 では 62°C 以下で目的産物が得られ (図 3C)、Wallace 温度はこれよりも高い見積であった。Set4 は多数の非特異的産物も出たが、期待サイズの産物も増幅した (図 3D)。NN-4 と Wallace 温度は、最適な増幅効率  $T_a$  よりも高く見積もった。

### 3'-末端安定性の予測

算出方法で 3'-末端 5 塩基対の  $\Delta G$  は異なるが、どちらの場合も、Set1 の左右プライマーと Set2 の左プライマーで低く、Set4 の左プライマーが最も高い値であった (表 2)。dG-2 の方法では -37.7 kJ/mol よりも低いとプライマーの機能に影響するとされる<sup>9)</sup> が、Set1 には当てはまらなかった (図 3A)。一方、Set2 ではプライマーダイマーや副産物が出やすく、反応条件の変更が必要であった (図 3B)。 $T_a$  との関係では、3'-末端 5 塩基の  $\Delta G$  が低いプライマーを含むセットで、予測  $T_m$  (NN-1) よりも  $T_a$  が高くなる傾向が見られた。

### STS マッピングで予測された増幅産物と実際の PCR における増幅産物

Primer3 の統計情報では、Set2 においてミスプラ

表 2. プライマーの 3'-末端 5 塩基の  $\Delta G$

Set	Sequence of 3'-terminal pentamer	$\Delta G$ (kJ/mol)	
		dG-1	dG-2
1	LEFT AAGGG	-16.6	-40.6
	RIGHT TTCCC	-16.5	-40.6
2	LEFT GCCAA	-18.9	-41.8
	RIGHT GTTGG	-15.8	-34.3
3	LEFT TTCCA	-14.8	-35.6
	RIGHT GCATC	-16.4	-33.9
4	LEFT AACAA	-11.8	-29.3
	RIGHT GACGA	-17.6	-33.9

dG-1は37°C、dG-2は25°Cにおける値である。

イミングの可能性が示唆された他に問題点は認められなかった。しかし、これらは狭い範囲に限定した設計であるから、得られたプライマーが機能的でない可能性は残る。

許容ミスマッチ数 4 で実行した e-PCR による STS マッピングにおいて、Set1 では期待産物長 ± 2,000 bp 以内に標的以外の産物は予測されなかった (図 2B)。条件検討実験においても  $T_a$  を極端に下げない限り副産物は確認されなかった (図 3A)。

Set2 で予想された副産物のうち、1,450 bp の産物では、左プライマー内に含まれるミスマッチは 5'-末端に偏っており、3'-末端側は非特異的アニーリングの可能性が考えられた (図 2C)。実際に、これに起因すると考えられる副産物が 3 ステップ PCR で認められた (図 3B)。他の副産物は予測と実験結果で必ずしも一致しなかった。許容ミスマッチ数を増やす、もしくはギャップを許容する (-g オプションを使用) など e-PCR の設定を緩める必要があるかもしれない。あるいは、特異的もしくは非特異的伸長産物がプライマーとして機能してしまった可能性が考えられる。

Set3 では二つの非特異的増幅が予想された (図 2B)。左プライマー内のミスマッチは 1 または 2 塩基、右プライマーに 2 塩基しか無く、これらが増幅することは充分にあり得た。実際の PCR では 1,926 bp は殆ど増幅しなかったが、924 bp は標的配列とほぼ同じ  $T_a$  範囲で増幅した (図 3C)。

Set4 は左プライマーのセルフペアで多数の非特異的増幅が予想された (図 2B)。実際の PCR においても左プライマーのみで非特異的増幅が見られた (図 3D)。

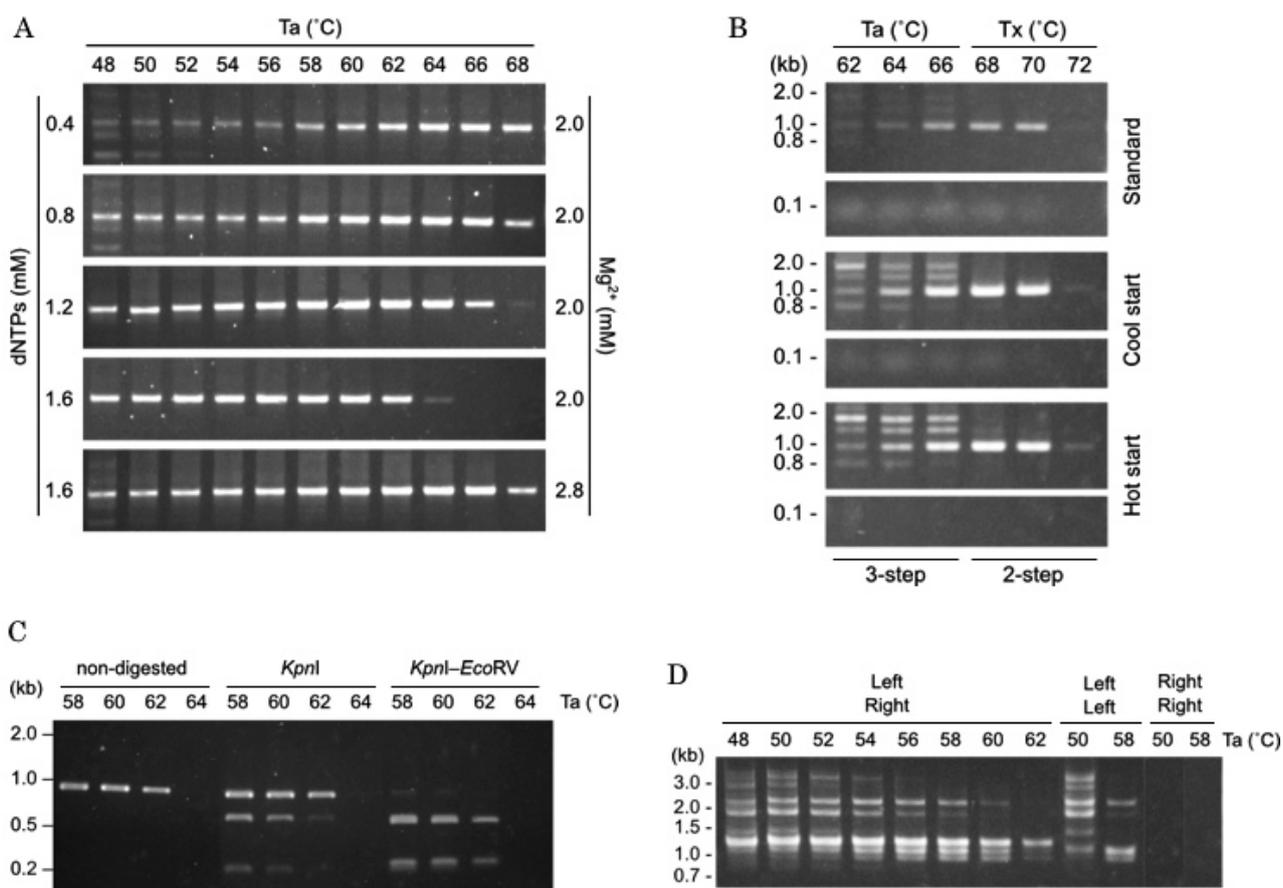


図3. 4組のプライマー対の特異性/非特異性. A. Set1を用いたPCR. dNTP濃度が高くなるとTa値は低下する. dNTP増加分Mg<sup>2+</sup>を追加するとともに戻る(2段目と最下段). B. Set2を用いたPCR. 通常の方法(上)から緩衝液を変更し, クールスタートを行なう(中)と, プライマーダイマーが減少して増幅率が向上した. (下)ホットスタートではプライマーダイマーは検出されなかった. 他の非特異的増幅は2ステップPCRにすると抑えられた. C. Set3の増幅産物を制限酵素処理した. 目的産物(932 bp)にはEcoRVサイトがありKpnIサイトは無いが, 予測された副産物(924 bp)では逆である. 目的産物を得られる最高Ta値62°Cでも非特異的増幅が確認された. D. Set4を用いたPCR. e-PCRで予測されたとおり, 左プライマー対に由来する副産物が多数増幅した.

## 討論

4セットのプライマーについてT<sub>m</sub>計算、ΔG計算及び特異性予測を行い、実際のPCRにおけるTa範囲と非特異的増幅の具体例を示した。これらの比較から、予測には注意すべき点はあるものの、PCRプライマーの設計と条件検討実験の計画に有用と考えられる。

### Primer3のT<sub>m</sub>計算に関する設定

T<sub>m</sub>とTaの比較結果およびPrimer3の採用するT<sub>m</sub>計算方法から、Primer3使用時には以下の点に留意すべきであろう。SantaLuciaのパラメータを選択する時は、SantaLuciaまたはOwczarzy等の補正式を使用する。また、予定している反応液の塩とdNTPの濃度を設定してAhsen-Wittwer-Schützの変換を有効にした方がTa推定には良好な結果を得られる。

一方、Breslauer等のパラメータならば

Schildkraut-Lifson補正式<sup>1)</sup>を用いる。この組み合わせでは塩濃度変換を行うと計算結果が高くなりすぎる可能性があり、二価陽イオンとdNTPの濃度は初期値0.0が良いと思われる。二本鎖オリゴヌクレオチド濃度は、通常は初期値の50 nMで構わない。

Set2のTaは高かったが、標的配列は比較的GC含量が高く、これが影響していたと考えられる。T<sub>m</sub>の設定を3°C高くして設計したが、このような鋳型配列では始めから2ステップPCRを想定したT<sub>m</sub>に設定しておくとも良いかもしれない。

### Primer3における3'-末端安定性設定

プライマーの3'-末端5塩基対のΔGが低いほど安定な二本鎖を形成し、非特異的プライミングを引き起こしやすくなる。Breslauer等のパラメータを用いて計算されたΔGが-37.7 kJ/molよりも低いと特異的プライマーとして機能しない可能性がある<sup>9)</sup>。もちろんΔGも目安であり、低い値であっても必ず

しもプライマーが機能しないわけではなく(表2、図3A)、反応条件の変更で解決する場合もある(図3B)。しかし、予めミスプライミングの可能性を減らすという点で、3'末端の安定性が極端に高い配列を除外することは意味がある。PRIMER\_MAX\_END\_GC タグを使い、3'末端5塩基に含まれるG/Cの数を制限する方法もある。

他のパラメータを用いた場合には値が異なる。SantaLucia法では $\Delta G$ を $-19$  kJ/mol程度以上にするのが望ましいと思われる。Primer3は入出力とも $-\Delta G$ であって、値は正数である。また、単位は kcal/mol であることに注意されたい。

### STS マッピングを利用した特異性予測

ゲノムDNAを鋳型とする場合、一般的には20mer以上、クローニング用途では25mer以上が推奨されている。短すぎるプライマーは特異性が低く、非特異的プライミングに繋がる可能性が高いからである。しかしながら、Set1の一方のプライマーは19merしかないが副産物は予測されず(図2B)、実際に特異的増幅を得られた(表1と図3A)。

一方、Set3とSet4では予測された副産物が増幅した(図2B、図3C、D)。副産物の数が少なければ制限酵素処理によって分離できることもあるが、通常は再設計するほうが良い。Set4左プライマーにおける(CAA) $n$ のような低配列複雑度の繰り返し配列は特異性の低いことが多く、避けるべきである。

これらの結果は、特異性が保証されるならば長さに拘る必要はないことを示している。e-PCRを使用したSTSマッピングはPCRの特異性予測に有用であると考えられる。ただし、Set2で見られたように、予測されない副産物の増加も起こりうることは念頭においておくべきであろう。標的・鋳型配列に合わせた設定も必要かもしれない。

e-PCRの使用に際して他の注意すべき点は、ミスマッチ数が設定値に収まっていれば、プライマーの3'末端にミスマッチのある、本来は増幅しない産物が含まれる可能性である。-tオプションの引数を4にすれば、速度は低下するがプライマーと標的配列のアラインメントを確認できる(図2C)。

### Tm 算出方法と初期 Ta の決定

Ta 範囲決定実験の結果は、予測 Tm が必ずしも至適 Ta 範囲に収まるわけではないことを示している。しかしながら、基準とする Ta を決定するにあたり凡そ次の規則は成り立つ。(1) Wallace 温度は塩基組成に偏りの少ない 20mer 以下のオリゴヌクレオチドの初期 Ta として使用できる。(2) NN-1 ある

いは GC-2 を使用する時は Tm から 2~3°C 高い温度を基準とする。(3) NN-2 と NN-3 では Tm を基準とする。(4) NN-4 で計算された Tm から最大で 5°C 程度低い温度、あるいは (5) GC-1 より 5°C 程度高い温度を基準とする。これらを中心として $\pm 5^\circ\text{C}$ で検討し、上限または下限で良好な結果ならば更に 5°C 広げて検討すれば、殆どの場合に至適 Ta を決められるだろう。

GC-1 に Ahsen-Wittwer-Schütz の塩濃度変換を適用した GC-2 は、普段 SantaLucia 法を用いている研究者が、手元で簡単な計算を必要とした時に用いると凡その目安を得られる。ここには示さなかったが、Ahsen-Wittwer-Schütz の改変 %GC 法<sup>5)</sup>は NN-2 あるいは NN-3 に近い値を出す。

### 反応条件の至適化と Ta に影響する要素

特異的増幅は基本的にプライマーに依っているが、反応液組成やサイクル条件が原因となっていることもあり得る。プライマー、dNTP、鋳型 DNA あるいはポリメラーゼの濃度バランスが適切でないと特異性、忠実度あるいは増幅率を低下させる。また、酵素の種類、添加物の有無等も大きな影響を与える場合がある。限定された条件で設計したプライマーでは至適条件の探索は必ずしも容易ではないが、良好な結果を得るためには重要である。

収量や特異性を改善する為に塩濃度を変更したり、添加物を使用した時は Ta が変化し、再検討を必要とすることがある。添加物として良く利用される dimethyl sulfoxide (DMSO) による Tm の低下は  $0.75^\circ\text{C}/(\% \text{DMSO})$  とされる<sup>6)</sup>。

Mg<sup>2+</sup> は K<sup>+</sup> よりも Tm および Ta に与える影響が大きく、1 mM Mg<sup>2+</sup> は一価陽イオン 120 mM 相当である<sup>5)</sup>。従って、Mg<sup>2+</sup> 濃度が極端に変わる場合には注意を要する。dNTP は Mg<sup>2+</sup> と可溶性複合体を形成して遊離 Mg<sup>2+</sup> 濃度を低下させる<sup>3)</sup>から、dNTP 濃度を変更すると Ta は変化する(図3A)。EDTA も同様の変化を引き起こす可能性があり、大量の持ち込みがある場合は注意すべきであろう。

### まとめ

現バージョンの Primer3 では SantaLucia の式とパラメータが推奨されており、本稿でもこれを用いた。しかしながら、他の手法によるノウハウの蓄積があるならば、それで構わないだろう。検索と評価に際して、式やパラメータを揃えるようにしておくことが肝要である。また、どのようなプログラムも予測するのみであるから、その特性を理解して利用すること、必ず実験的に確認することが重要である。

その上で設計及び実験のデータを蓄積、共有すれば、研究室におけるプログラムの使用方法や実験条件検討手順の確立に役立つと期待される。

## 謝辞

原稿に対し御助言下さった北島正治氏に感謝します。本研究の一部は山口栄雄が受けた2010年度神奈川県大学共同研究奨励助成「高速高精度熱サイクラーの作製とDNA増幅の実証」により行いました。

## 文献

- 1) Rozen S and Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **132**: 365-386.
- 2) Rychlik W and Rhoads RE (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8543-8551.
- 3) Rolfs A, Schuller I, Finckh U and Weber-Rolfs I (1992) *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- 4) SantaLucia J Jr (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 1460-1465.
- 5) Ahsen von N, Wittwer CT and Schütz E (2001) Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for  $Mg^{2+}$ , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.* **47**: 1956-1961.
- 6) Owczarzy R, You Y, Moreira BG, Manthey JA, Huang L, Behlke MA and Walder JA (2004) Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry* **43**: 3537-3554.
- 7) Rychlik W, Spencer WJ and Rhoads RE (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6409-6412.
- 8) Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H and Marky, LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 3746-3750.
- 9) Rychlik W (1993) Selection of primers for polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* **15**: 31-40.
- 10) Barnes WM (2003) Tips for long and accurate PCR. In: *PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd Ed.* Dieffenback CW and Dveksler GS, eds., CSHL Press, Cold Spring Harbpr, New York. pp. 53-60.
- 11) Schildkraut C and Lifson S (1965) Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers* **3**: 195-208.

■テクニカルノート■

## 魚類塩濃度適応行動調査のための実験水槽の検討

市川貴美子<sup>1,2,3</sup> 小笠原強<sup>1,2</sup>

### Test Aquaria to Assess the Salinity Adaptability of Teleost Fish

Kimiko Ichikawa<sup>1,2,3</sup> and Tsuyoshi Ogasawara<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: ichikk-01@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** We developed novel aquaria to examine the salinity preference of fish. These aquaria are called preference boxes. The aquarium was half-filled with fresh water (FW) first, and then salt water (SW) was infused through a tube set downward along the wall of the aquarium. The horizontal interface of the waters was observed, and the mass of FW was pushed upward as the amount of SW increased, which indicated the significant separation of FW and SW. In the improved model, stairs were made at the bottom of the aquarium so that the aquarium had lower and upper levels. The aquarium was filled with FW, and SW was introduced from the lower level through a tube until the interface reached the upper level. FW and SW were clearly layered, as seen by the difference in relative density, and did not become contaminated for two days. In the aquarium, the fish are able to migrate between FW and SW. Using these devices, it is possible to clarify how the behavior on salinity controls the osmoregulatory ability of fish.

**Keywords:** teleost fish, salinity adaptation, behavior, preference box, natural environment

## 序論

真骨魚類 teleost fish の体液浸透濃度は、生息水界にかかわらず 1/3 海水程度に保たれている。サケやウナギなどは海洋と河川とを回遊する魚類であり、調節機構を巧みに変換して海水でも淡水でも体液浸透を一定に保つ<sup>1)</sup>。このような魚類を広塩性回遊魚という。ニホンメダカ *Oryzias latipes* やモザンビークティラピア *Oreochromis mossambicus* などは、淡水に生息するが海水にも適応するので広塩性淡水魚という。ヒメダカはメダカの養成個体であり、時期を選ばず観賞魚業者より入手できる。本種は浸透濃度調節の研究に好適なので、われわれは長年にわたって使用している。

本魚種は淡水から海水への直接移行には耐えないが、1/2 海水といった希釈海水に短期間浸漬してから海水に移行するとよく適応する<sup>2)</sup>。これを予備適応 preadaptation という。プリフェレンスボックス preference box (PB) は淡水と海水とが混合しないように工夫した実験用水槽であり、魚類は塩分濃度の異なる二つの水域を自由に移動することができる。

この装置はサケ科養成稚魚の塩分嗜好性の変化にともなう降海回遊時期を査定するために用いられることがある。一般には水産試験場などで使用される大掛かりな装置である<sup>3,6)</sup>。メダカに塩分嗜好行動がみられるかどうかは不明であるが、PB を用いて海水適応能の発現機構と塩分嗜好行動との関わりをしらべるとは意義がある。本テクニカルノートでは、実験室用に試作したさまざまな小型 PB の実際と、その性能をテストした結果を報告する。

## 材料と方法

まず市販の観賞魚用ガラス水槽を流用した。次にアクリル板 (3mm 厚) を切断し、接着して水槽を作製した。構造がやや複雑になり、アクリル板が厚手になる場合には、製作を依頼した (株式会社 サンプラテック)。アクリルはガラスと同等の透明性を持ちながら重量 (比重) は半分以下である。素材を溶解して容易に接着することも可能であり、ある程度の柔軟性も備えるので、水槽の素材としては好適であ

る。10 mm 厚の亚克力板は工作にやや難点があるが、3 mm 厚であれば比較的容易に工作ができ、小型の水槽に加工する分には耐久性にも優れる<sup>7)</sup>。

## 水槽の試作

### 上下分離型水槽

水槽 A (図 1a) ; 市販のガラス水槽 (35 L; w43 × d27 × h30cm) に海水 (約 14 L; 水深 12cm まで) を入れた。水槽の壁を伝わせながら、海水の上から同量の淡水を注いだ。

水槽 B (図 1b) ; 市販のガラス水槽に淡水 (約 14 L; 水深 12 cm まで) を入れた。水槽底部に導入したビニールチューブ (内径 4 mm) を介して淡水の下方から水槽の底部に同量の海水を注入した。

水槽 C (図 1c) ; 予備槽を備えた亚克力樹脂製水槽 (40 L; w40 cm × d25 cm × h40 cm.) を作製した。実験水域と予備槽との仕切り板には、スリット (2 cm 幅) を設けた。スリットを介して予備槽と実験水域は連絡している。予備槽と実験水域にあらかじめ淡水をいれ、海水を底から穏やかに注水した。

### 左右分離型水槽

水槽 D (図 1d) ; 水槽 C の中央に仕切り板を設け、実験水域を左右二つの区画に分けた。仕切り板の上端は予備槽のスリットよりも 2 cm 高くした。

各区画にあらかじめ淡水をいれ、予備槽に隣接する海水用区画の底部に海水を静かに注入した。

### 上下分離型段差底水槽

水槽 E (図 1e) ; この亚克力水槽 E (43 L; w 50 cm × d 25 cm × h 35 cm) については亚克力板厚を 10 mm にし、構造がやや複雑なので專業業者に作製を依頼した。図 1e に示すように、これは水槽 C の改良版である。つまり、水槽の中に脱着可能な亚克力製の箱 (w 20 cm × d 25 cm × h 20 cm) を内寸一杯に設置して底部に段差をつけた。淡水と海水の注水孔を設け、予備槽にはオーバーフローのための細い排水管を取り付けた。

あらかじめ淡水をいれておき、次に底部の注水孔より海水を加えた。水面が上昇すると予備槽の排水チューブからあふれて排出された。

## 目視観察

海水に青色色素 (メチレンブルー、2 mg/L) を添加して淡海水の分離および境界面の状態を目視観察し、写真撮影した (COOLPIX 990, NIKON)。

## Cl 濃度測定

水槽内の環境水の Cl イオン濃度を測定し (DIGITAL CHLORIDOMETER, LABCONCO)、淡水と海水の分離状態をしらべた。

## 結果と討論

用いた水道水の Cl 濃度は 0.280 mmol/L、密度は 0.98 g/mL であった。海水はそれぞれ 550 ~ 566 mmol/L および 1.02 g/mL であった。

### 上下分離型水槽

淡水と海水では光屈折率が異なるので、比較的容易に境界を目視観察することが出来た。市販のガラス水槽を流用した水槽 A (図 1a) では、あらかじめ入れておいた海水 (約 14 L) の上から淡水 (約 14 L) を注いだ。淡水は海水下に潜り込み、再び上方に移動して、最終的には境目が判別できなくなった。メチレンブルーで着色しても同様の傾向をみせた (図 2a)。色素が混ざり合い水底に向かって青色が徐々に濃くなった。Cl 濃度はいずれの採水位置 (水槽上部より 6, 12, および 18 cm) でもそれぞれ 176, 275 および 399 mmol/L であり、淡水 (0.280 mmol/L) と海水 (550 ~ 566 mmol/L) は混合して底部ほど濃くなっていた。水槽 A のような単純な様式では淡水と海水を上手く分けることは不可能である。

一方、水槽 B (市販ガラス水槽) (図 1b)、および自作した水槽 C (図 1c) では、チューブをとおして水槽底部に海水を注入した。海水が淡水の下に入り込み、淡水塊を徐々に押し上げた。水槽 C には予備槽を設けた。海水面が底部から次第に上昇して仕切り板のスリットの位置まで達すると、海水はスリットを通り予備槽の淡水の底部へ移動した。つまり、淡・海水の境界面はスリット位置より上昇しなかった。スリットと同じ高さにて極めて明瞭な境界面が目視された。24 時間後には水槽 B では境界面が曖昧になり消失したが、水槽 C では 2 日後でも境界面が確認された。着色した海水を注入しても同様の結果を得た。水槽 C の予備槽ではスリットの下部はメチレンブルーで薄く色づいた (図 2b ~ e)。Cl 濃度を指標とすると、水槽 B、C とも当初は淡水と海水がほぼ分離し積層した。2 日目には水槽 B では淡水域が 5.6 mM (水面下 6 cm) まで上昇したが、水槽 C では 3.0 mM (水面下 9 cm) であった。

あらかじめ淡水を注入し、淡水塊の底部から海水を導入すると淡海水を積層にすることが出来る。光屈折による境界面の有無が、着色した海水の目視観察や Cl 濃度の実測結果と一致した。これは目視による観察が、水槽内での淡水と海水の分離の目安となり

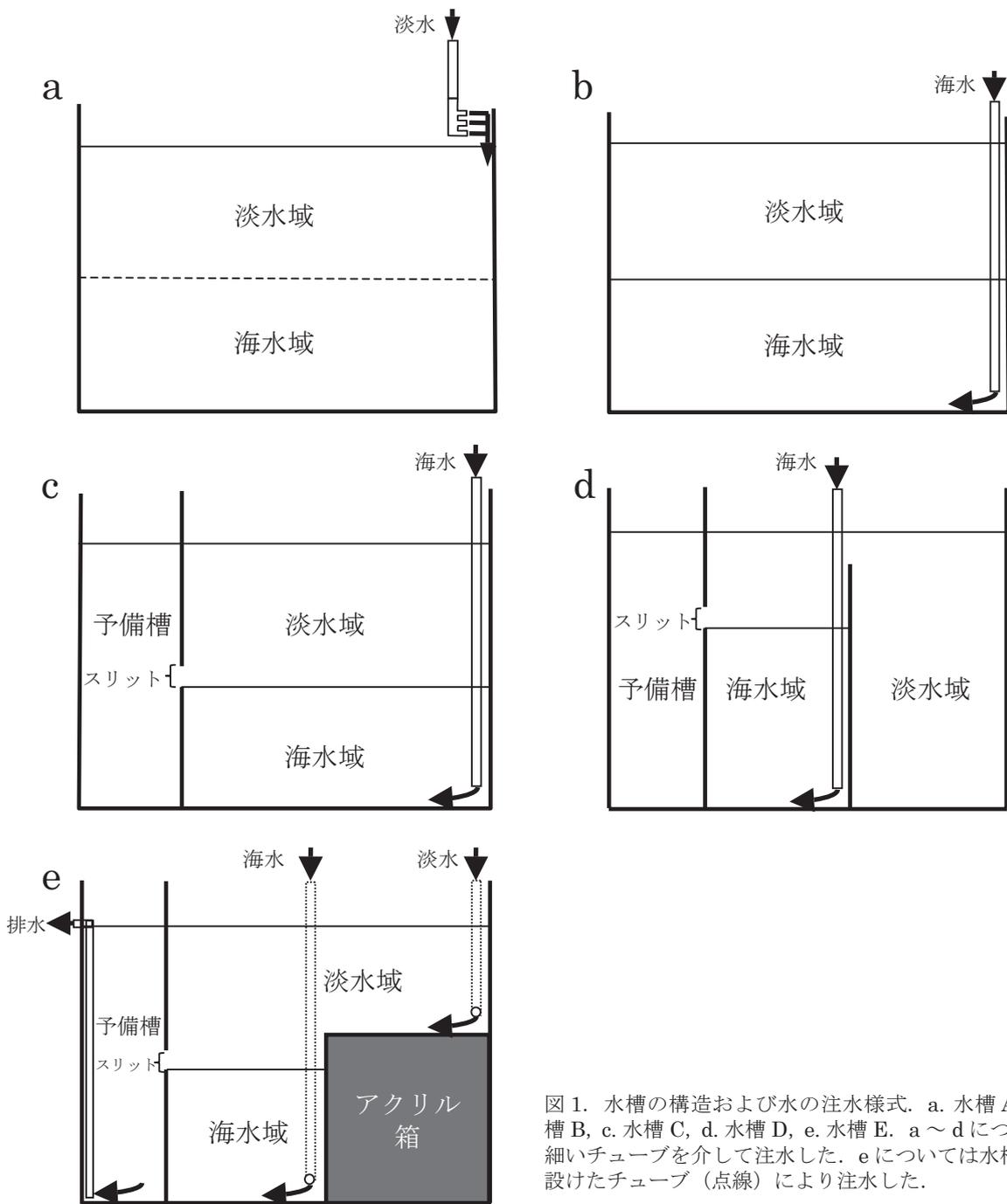


図1. 水槽の構造および水の注水様式. a. 水槽A, b. 水槽B, c. 水槽C, d. 水槽D, e. 水槽E. a~dについては, 細いチューブを介して注水した. eについては水槽外壁に設けたチューブ(点線)により注水した.

得ることを示す。予備槽を設けた上下分離型水槽（水槽C）では、淡水と海水とを長時間にわたり積層分離する。淡水と海水の境界面で生じる攪乱混合帯が、スリットを経て予備槽へ吸収されるためと思われる。

### 左右分離型水槽

海水用区画にチューブを介して底面から海水を注いだ（図1d）。淡水塊を押し上げて海水が入り、淡・海水の境界が明瞭にあらわれた。水槽Cと同様に境界面がスリットの高さを超える事はなかった。実験期間を通して海水が淡水用区画に移動する様子

は見られなかった。メチレンブルー海水を用いても同様の結果が得られた。すなわち、明瞭な境界面が維持され、淡水層が着色される事はなかった（図2f,g）。Cl濃度を指標とすると、設置2日後の淡水用区画（水面下18cm）は1.3 mmol/Lであり淡水域への海水の混入は極少量だと示唆される。予備槽と淡・海水用区画を左右に仕切る隔壁により、淡水と海水を明確に分離した。

### 上下分離型段差底水槽

あらかじめ各区画を満たす程度に淡水を入れてお

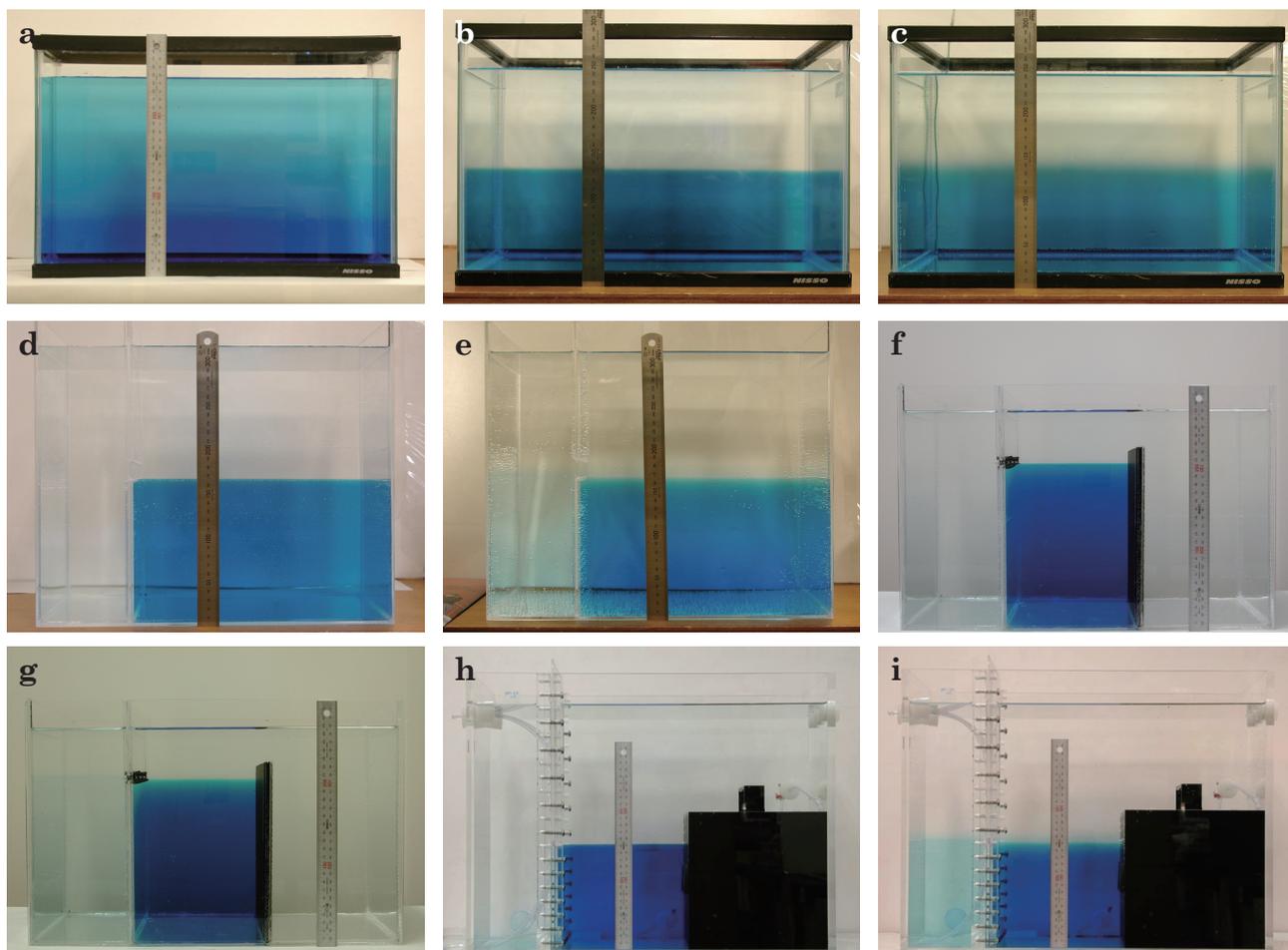


図2. 淡・海水の分離具合およびCl濃度の経時変化。淡水およびメチレンブルー着色海水を注いだ。a. 水槽A設置直後。b. 水槽B設置直後。c. 水槽B二日後。d. 水槽C設置直後。e. 水槽C二日後。f. 水槽D設置直後。g. 水槽D二日後。h. 水槽E設置直後。i. 水槽E二日後。

き、海水を海水注入孔から注いだ（図1e）。淡海水の明瞭な境界面が維持された。境界面はスリットの高さを超える事はなく、上段底部よりも低い位置に保たれた。メチレンブルー添加海水でも明瞭な境界面が維持され、淡水槽は実験期間を通じて無色であった（図2h～i）。2日目の淡水区画のCl濃度（水面下15cm）は0.8 mmol/Lであり、海水の混入はほとんどなかった。底部に段差を設けることにより淡海水を上下に効率よく分離した。

本テクニカルノートでは、さまざまな形状のPBを検討した。実験魚種および目的にあわせて、左右分離型水槽と上下分離型段差底水槽を用いれば浸透濃度調節生理機構の発現と塩分嗜好行動にかかわる研究に進展が期待される。

## 文献

- 1) 小笠原強 (1987) ホルモンと浸透圧調節, 2. *回遊魚の生物学*. 森沢正昭. 会田勝美. 平野哲也編, 学会出版センター, 東京. pp. 12-25.
- 2) 市川貴美子 (2000) Adaptive change of branchial

cells of teleost fishes –rapid and slow response to salinity. *神奈川大学大学院理学研究科学位論文要旨集*. pp. 57-60.

- 3) 岩田宗彦 (1987) 降海行動と海水適応, 10. *回遊魚の生物学*. 森沢正昭. 会田勝美. 平野哲也編, 学会出版センター, 東京. pp. 140-155.
- 4) Korstrom JS and Birtwell IK (2002) A description and operations manual for a water column simulator which is used to study the behavior of organisms in vertically stratified waters. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 2406.
- 5) Webster SJ, Dill LM and Korstrom JS (2007) The effects of depth and salinity on juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Wallbaum) habitat choice in an artificial estuary. *J. Fish Biol.* 71 Suppl: 842-851.
- 6) Webster SJ and Dill LM (2006) The energetic equivalence of changing salinity and temperature to juvenile salmon. *Functional Ecology* 20 Suppl: 621-629.
- 7) Walter HA and Karen L (2007) In: *Dynamic Aquaria. Building and Restoring Living Ecosystems*. Academic Press, London.

■ 研究交流 ■

## 第六回神奈川大学 — 国立台湾大学学術交流の記

松原世明<sup>1,2</sup>

Report of the 6<sup>th</sup> International Exchange Program  
between Kanagawa University and National Taiwan University

Toshiaki Matsubara<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: matsubara@kanagawa-u.ac.jp

第六回神奈川大学-国立台湾大学国際学術交流シンポジウムが、昨年（2010年）12月23日から26日に開催された。毎年、本学と国立台湾大学で交互に開催されており、今回は国立台湾大学で開催された。本学からは、教員4名と大学院生12名（図4）が参加した。

23日の8:10 amに羽田空港を出発し、台北の松山空港に11:15 amに到着した。空港で李弘文副教授の出迎えを受け、バスでそのまま宿泊ホテルに移

動しチェックインした。ホテルは、国立台湾大学の施設でキャンパスに隣接しており、行動拠点として非常に便利だった。その後、大学施設のレストランで昼食会の歓迎を受けた。キャンパスはとても広く、建物や施設など学生生活にとっても良い環境である印象を受けた。台北市内の交通アクセスも便利な場所にある。気候も、訪問時の冬の季節でも温暖でとても過ごし易かった。初日の午後は、市内で開催中だった台北花博を見学した。

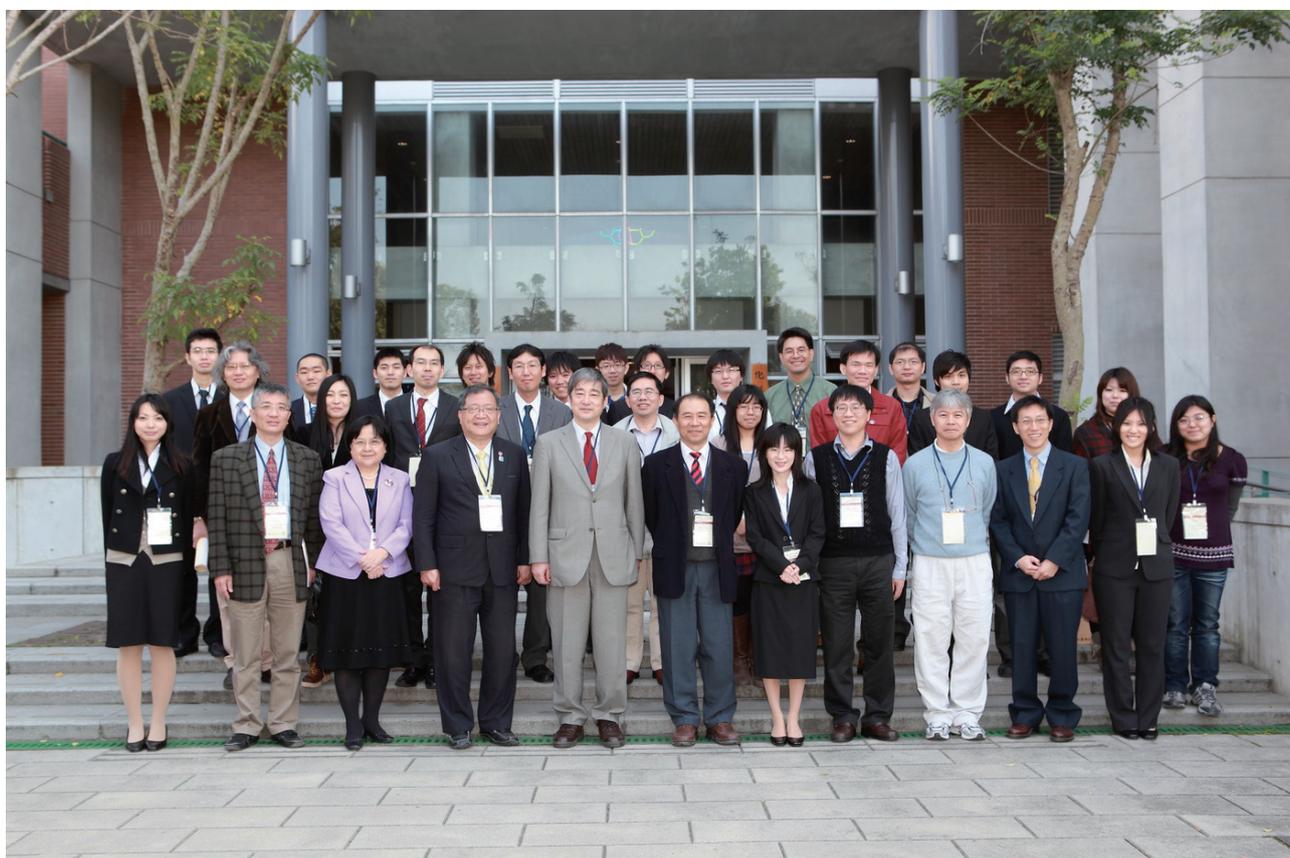


図1. 国立台湾大学化学科玄関前での集合写真.



図 2. 国立台湾大学構内。

二日目の 24 日にシンポジウムが開催された。本学から参加した教員 4 名と国立台湾大学の教員 4 名、合わせて 8 名が講演プログラム (図 5) にしたがって講演を行った。講演内容は、化学と生物の広範囲の分野に渡った。大学院生の発表は、午前と午後の講演の間の時間帯に、口頭とポスター形式で行われた。口頭発表は、本学から 3 名、国立台湾大学から 2 名の合わせて 5 名が 10 分ずつ行った。

三日目の 25 日は、午前には 蘭陽博物館、午後には伝統工芸の傳藝中心を見学した。翌日、四日目の 26 日は、午前には故宮博物館を見学し、さよなら昼食会のもてなしを受け、松山空港 3:15 pm 発、羽田空港 7:00 pm 着の便で帰路についた。滞在期間中は、国立台湾大学化学学科教員スタッフの和気藹藹としたファミリー的な雰囲気の中、終始手厚いもてなしを受けた。

私自身は 1 年ぶりの海外講演であり、また台湾訪問は初めてだったので、ある意味新鮮な気持ちで参加した。海外での滞在は色々な意味で刺激を受け、研究を進める上での糧になる、というのが私の持論であるが、今回もよい刺激を受けて帰国することができた。これまで台湾のポストドクを国内外で見てきたが、東南アジアの中でも研究に対する吸収力が旺盛だった。その台湾の中でトップの大学を直に見ることができ、その原動力が少し分かった気がした。今回の訪問で、本学から参加した学生も同様に刺激を受けたと思う。今回で 6 回目となる本学術交流シンポジウムの中で過去のシンポジウムに参加した経験のある学生や、直前に環太平洋国際化学会議が恒例のホノルルで開催されたため両方に参加した学生もいた。このような学術交流への学生の積極的な参加はとても良いことだと思う。

我々の学生時代と比べると、学生が海外に出て学術交流する機会は増えたと思う。しかし、他国の研

究者と交流するには、日本の地理的ハンデは大きい。私が留学していたアメリカはもとより、フランスでも研究室は多国籍の人間で構成されていた。セミナーは、毎週のように他国の研究者が出入りして行われ、日常生活でも研究でも言語は英語が使用されていた。地理的ハンデの一方で、学生の海外への意識も低下していると耳にする。実際、今回の学術交流シンポジウムへの本学の学生の参加希望者が、当初少なかったと聞いた。今回は、国立台湾大学の学生と会話する機会は少なかったので、訪問中に直に感じることはできなかったが、同じ東南アジアのシンガポールやマレーシア、そしてタイ、ベトナムなどの学生の海外に出て吸収しようとする意識はとても高い。昨今の学術の国際情勢を考えれば、日本人は、これまでアジアをリードしてきた実績に胡座をかいて国内に閉じこもって研究してられないことを強く認識すべきだと思う。

そういった意味で、コミュニケーションに不可欠な英語に対する意識も同じである。いつまでも英語が話せない日本人のままでは、世界で取り残されるだろう。よい成果を示すことは当然のこととして、議論に積極的に参加して世界をリードしていかなければいけない。ネイティブでないスピーカーが多い学術の世界では、ネイティブに近づかなくともしっかりした英語が話せればよい。

我々の学生時代もそうだったが、英語でプレゼンする機会は少ない。今回の学術交流シンポジウムに参加した学生は、10 分のみプレゼンだけで質疑応答の時間もなかったとはいえ、貴重な経験をしたと思う。日本の学生は英語でプレゼンをする機会になかなか恵まれないが、このような経験を通して慣れて欲しい。少なくとも今回のプレゼンのために、英語で話す意識を持って練習したはずである。このような経験を繰り返し、慣れることが大切である。



図 3. 国立台湾大学化学科。

また、海外の研究者の訪問があれば、講演を聞くことはもちろんであるが、質問をすること、そして積極的に自分の研究について議論する場を作って欲しい。我々教員もそのような場を提供してあげたいと思う。今回のシンポジウム中、国立台湾大学の学生が講演毎に質問していたのに対し、本学の学生の質問はゼロであった。もっと積極性を出して欲しい。

本学から参加した学生から、どうしたら英語が話せるようになるか、という質問を受けた。私の答えは、日本語を介すな、である。まず、英語を読む際、

日本語に訳す習慣をやめることである。私の化学英語の授業では、常に、英語を訳すのではなく「読む」ことを意識して行っている。読めるようになれば、話せるようになり、そして聞けるようになる。そうすれば、プレゼンの後の受け答えもできるようになるだろう。

本学術交流の将来像の一つとして、教員同士の共同研究、そして学生の短期滞在学術交流が念頭にあると聞いている。本学と国立台湾大学間の交流が、今後、更に発展し深まることを切に希望する。

## 本学からの参加者と講演タイトル

### 教 員<sup>1)</sup>

山口 和夫 理学部 化学科  
松原 世明 理学部 化学科  
大平 剛 理学部 生物科学科  
片岡 利介 工学部 物質生命化学科

### 大学院生

白取 愛 木原研究室 (口頭発表)  
「A Serine-Histidine conjugate revealing high affinity to  $\beta$ -aminophosphonate as the analogue of the hydrolysis intermediate of  $\beta$ -alanine ester」

濱野 光孝 松本研究室 (口頭発表)  
「Diphenylparabanate as a versatile precursor for synthesis of  $\alpha$ -diketones and  $\alpha$ -ketocarboxylic acids」

阿部 誠子 松本研究室 (ポスター発表)  
「Synthesis of azaheterocyclic compounds bearing two long chains substituted with anthracen-9-yl group at the  $\omega$ -position」

細田 舞 山口研究室 (ポスター発表)  
「Synthesis of triblock copolymer using photodegradable heterobifunctional crosslinking reagent by double click chemistry」

加藤 甫規 木原研究室 (ポスター発表)  
「Development of molecularly imprinted polymers crosslinked by non-covalent bonding between functional groups」

川島 英久 松本研究室 (ポスター発表)  
「Synthesis and chemiluminescence of dioxetane bearing a sterically crowded bisnaphthol moiety」

飯嶋 康太 木原研究室 (ポスター発表)  
「Synthesis of Macrocyclic Sulfoximine for the Recognition of Cyclic Amides」

都築 倫明 木原研究室 (ポスター発表)  
「Development of length selective acylation catalyst using hydrogen bonding of amide」

稲葉 真由美 西本研究室 (ポスター発表)  
「Influence of salt on interaction water-soluble polymer and water」

坂西 綱太 大平研究室 (口頭発表)  
「Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression」

橋 友理香 小谷研究室 (ポスター口頭発表)  
「Structural analysis of MAP4 microtubule-binding domain fragment using NMR. Sequential assignment and secondary structure prediction」

川村 雄一 泉研究室 (ポスター発表)  
「Analysis of the Cell-Adhesive Activity of BMCP30, a Larval Cuticle Protein of the Silkworm *Bombyx mori*」

<sup>1)</sup> 教員の講演タイトルは図 5 を参照.

KU 世界へ、そして未来へ  
神奈川大学



## 神奈川大学-国立台湾大学

# Kanagawa University- 学术交流研討會 National Taiwan University Symposium

2010年12月24日(五) 化学系 潘貫講堂

■ 9:30~9:40 開幕式



■ 9:40~10:10

**大平剛**(神奈川大学 生命科学所)  
Crustacean molt-inhibiting hormone: structure and function



■ 14:30~15:00

**片岡利介**(神奈川大学 物質生命化学科)  
Structure and phase transition of polyrotaxanes and their hydrogels



■ 10:10~10:40

**李士傑**(台湾大学 動物学研究所)  
The autotaxin-LPA3 axis mediates kuppfer vesicle formation and left-right asymmetry in zebrafish



■ 15:00~15:30

**陸駿逸**(台湾大学 化学系)  
Shape dynamics of the multi-lamellar vesicles in solution

■ 10:40~11:00 Coffee break

■ 15:30~16:00 Coffee break



■ 11:00~11:30

**松原世明**(神奈川大学 化学所)  
ONIOM and ONIOM-molecular dynamics methods: principles and applications



■ 16:00~16:30

**邱静雯**(台湾大学 化学系)  
Nucleophilic boron heterocycle



■ 11:30~12:00

**温進徳**  
(国立台湾大学 分子与细胞生物学所)  
Single-molecule study of ribosomal frameshif



■ 16:30~17:00

**山口和夫**(神奈川大学 化学所)  
Self-assembled monolayers based on surface modifying agents containing activated Ester linked with photocleavable 2-nitrobenzyl group

■ 12:10~13:30 Lunch and Poster Sessions

■ 17:00~17:10

閉幕式 山口和夫(神奈川大学 化学所)

■ 13:30~14:30

Short Talk by 5 Graduate Students

坂西 綱太(神奈川大学 生物系)  
陳 顥 同 (台湾大学 動物学研究所)  
白取 愛 (神奈川大学 化学系)  
濱野光孝 (神奈川大学 化学系)  
陳 俊 晏 (台湾大学 化学系)

聯絡方式

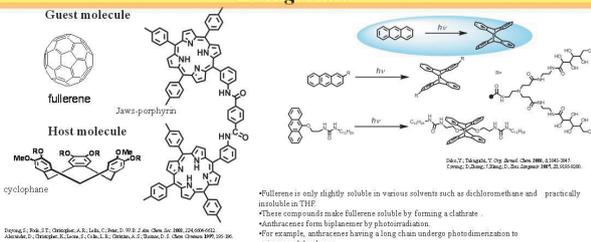
台湾大学 化学系  
李弘文教授(02)3366-4089  
E-mail:hwli@ntu.edu.tw

図 5. 講演プログラム.

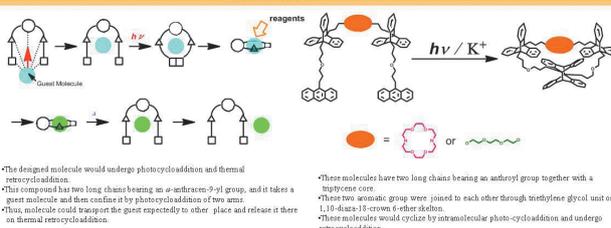
## Synthesis of azaheterocyclic compounds bearing two long chains substituted with anthracen-9-yl group at the $\omega$ -position

Seiko Abe (阿部 誠子) Department of Chemistry, Kanagawa University

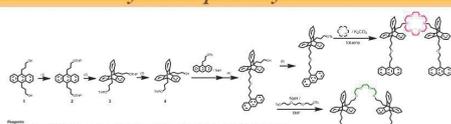
### Background



### This work

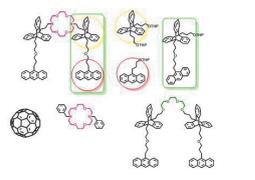


### Synthetic pathway



- We show here synthetic pathway of these azaheterocyclic compounds.
- The first step in the synthetic sequence leading to crown ether derivative and triethylene glycol derivative was introduction of two tetrahydropranyl to 9,10-bisanthracenylporphyrin/anthracene 1.
- The THF derivative 2 was reacted with benzene to give biphenylene 3.
- Reproduction of THF in biphenylene 3 was carried out by HCl to give biphenylene 4.
- Side chain was synthesized by Williamson synthesis of this biphenylene 4.
- This side chain underwent deprotection and was introduced into diaza crown ether to give crown ether derivative.
- The thus-synthesized side chain was similarly joined to triethylene glycol unit.

### Measurement of electronic absorption spectra of fullerene in the presence of a host molecule



round bottom flask

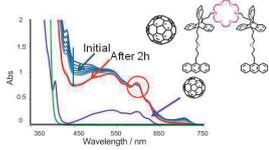
substance ( $1.0 \times 10^{-3}$  M or  $2.0 \times 10^{-3}$  M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 4 mL  
 $\text{C}_{60}$  ( $1.0 \times 10^{-3}$  M in toluene): 4 mL

concentration  
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL)  
 filtration (membrane filter)  
 measurement of UV / VR spectra

Solubility of $\text{C}_{60}$	[C <sub>60</sub> ], mg/mL	[C <sub>60</sub> ], mol/L
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.26	$0.36 \times 10^{-3}$
toluene	2.8	$3.89 \times 10^{-3}$
THF	0.00 (0.000)	0

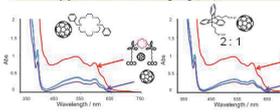
- We attempted to investigate whether or not these open chained compounds could transport fullerene into  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  as a representative.

### Fullerene solubilized with the aid of bisanthryl compound



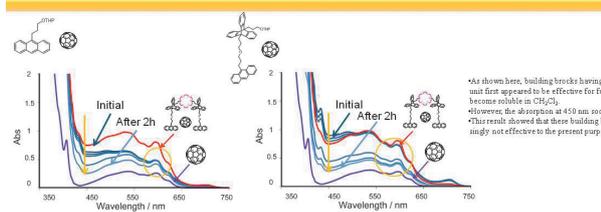
- Blue lines show absorption spectra in the presence of this crown ether.
- Orange line is reference spectrum of fullerene.
- Absorbance of the crown ether derivative and fullerene initially showed absorption at 410 nm, and then, the absorbance gradually decreased and reached to a stationary state after 2h.

### Effect of building blocks on solubility of fullerene in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (I)



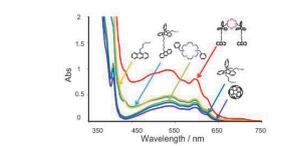
- As a control experiment, solubility of fullerene was examined in the presence of building blocks of crown ether derivative in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
- As shown here neither crown ether unit nor biphenylene unit was effective for fullerene to become soluble in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

### Effect of building blocks on solubility of fullerene in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (II)



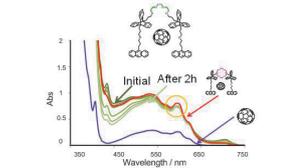
- As shown here, building blocks bearing an anthracene unit first appeared to be effective for fullerene to become soluble in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
- However, the absorbance at 410 nm soon decreased.
- This result showed that these building blocks were singly not effective to the present purpose.

### Electronic absorption spectra of fullerene in the presence of various building blocks in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$



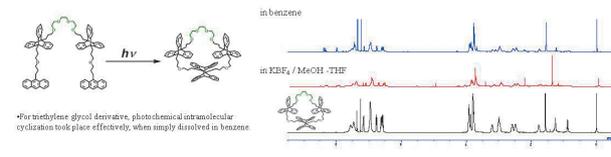
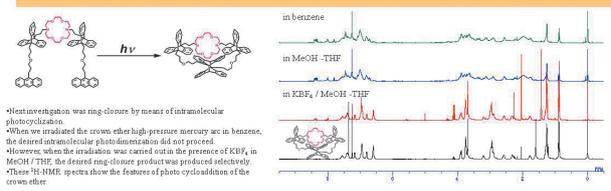
- We examined here electronic absorption spectra of fullerene in the presence of various building blocks as well as combinations of fullerene with bisanthryl crown ether.
- We can see that this crown ether derivative is effective to dissolve fullerene in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .
- Furthermore, we thought that joining two anthryl building blocks through a spacer should be effective to solubilize fullerene.
- The thus-designed compound is shown here.

### Electronic absorption spectra of fullerene in the presence of triethylene glycol derivative in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

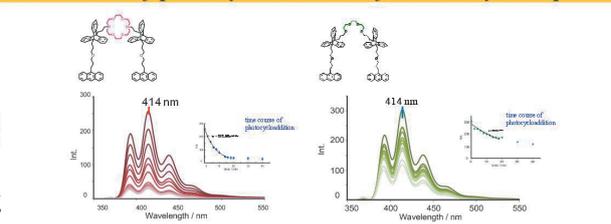


- This figure shows that this compound was as effective as the crown ether derivatives to solubilize fullerene.

### Photocycloaddition

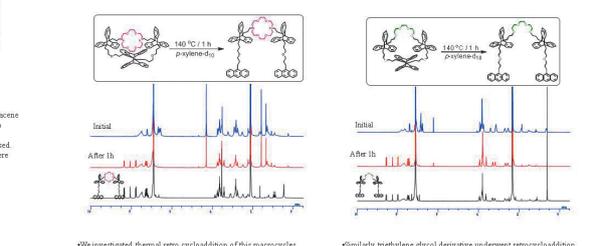


### Time course of photocycloaddition of bisanthryl compound



- We show here the time course of photo-dimerization of these two anthracene derivatives.

### Thermal retrocycloaddition



### Summary

- Joining two  $\omega$ -anthryl building blocks through a spacer was found to be effective to solubilize fullerene in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  or THF.
- Photochemical ring closure of 1 is appeared to require the coordination of  $\text{K}^+$  to diaza-18-crown-6 ether analog presumably because of steric demand.

図 6. ポスター (発表者: 阿部誠子, 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻).

# Synthesis of triblock copolymer using photodegradable heterobifunctional crosslinking reagent by double click chemistry

Department of Chemistry University of Kanagawa (Yamaguchi Lab.) HOSODA Mai

### Introduction

Photodegradable heterobifunctional crosslinking reagent, PHBR

1,3-Hitsgen dipolar cycloaddition Reaction

Michael addition Reaction

Patterning of cell-adhesive and non adhesive regions is achieved by photoirradiation hydrophobic substrate modified with photosensitive triblock copolymer.

A polymeric micell from photosensitive triblock copolymer is also applicable to a drug delivery system.

### This study

PEO-SH → PHBR → HC≡C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH → PHBR → HS-PEO

double click chemistry

PEO<sub>2000</sub>, PDL, PPO<sub>2000</sub>, PEO<sub>2000</sub>

Characterization: NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMOC, HMBC), UV-vis spectroscopy, CHN elemental analysis

### Results

<sup>1</sup>H-NMR spectrum of 1

CHN Elemental analysis of 1

	C	H	N
Calcd	61.62%	6.63%	11.25%
Found	60.99%	6.70%	10.69%

UV-vis spectrum of 1

λ<sub>max</sub> = 341 nm, ε = 4000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>

Photoirradiation of 1

λ > 320 nm 100 mW / cm<sup>2</sup>

Before photoirradiation, After photoirradiation

ε<sub>1</sub> was obtained by absorbance, ε<sub>2</sub> was obtained by absorbance

Photoirradiation time (s)

ln(C<sub>1</sub>/C<sub>0</sub>) = -k × t, k = 0.0476 s<sup>-1</sup>

ln(C<sub>2</sub>/C<sub>0</sub>) = -k × t, k = 0.0476 s<sup>-1</sup>

GPC charts of 2 upon before and after photoirradiation

Peak No.	Mn	Mw	Area ratio (%)
1	13300	13400	48
2	9600	9700	39
3	6100	6300	13

UV-vis spectra of 2 upon photoirradiation

λ > 320 nm 100 mW / cm<sup>2</sup> in THF (10.0 mg / 10 ml)

When no increase of absorption near 370 nm derived from the produced nitroso compound was observed after photoirradiation for 90 seconds.

Decrease of the peaks was observed by further photoirradiation.

### Experimental section

#### Synthesis of PHBR

#### Synthesis of model compound 1

Christophe Pardin et al., Chem Biol Drug Des 2008; 72: 189-196

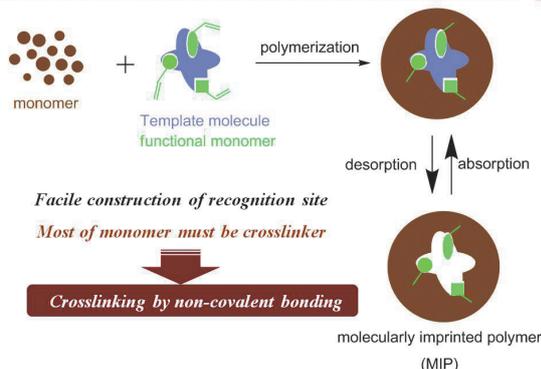
#### Synthesis of triblock copolymer 2

図 7. ポスター (発表者: 細田 舞, 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻).

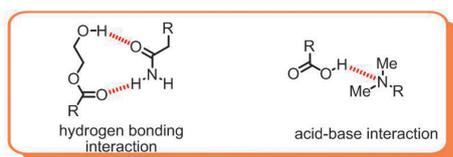
## Development of Molecularly Imprinted Polymers Crosslinked by Non-covalent Bonding Between Functional Groups

Masaki Katoh, Nobuhiro Kihara  
Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University

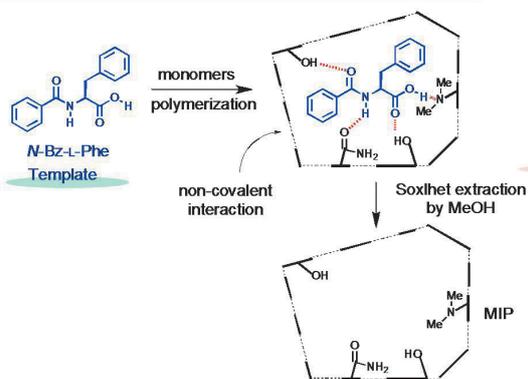
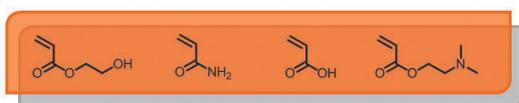
### Molecularly imprinting method



### Crosslinking by non-covalent bonding

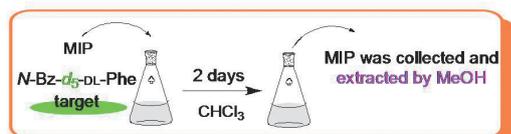


### Use of monomer mixture



### Results and Discussion

#### Measurement of recognition ability



### Effect of initiator for the preparation of MIP

Composition of MeOH extract				
Initiator	Target	L (μg / 1 g MIP)	D (μg / 1 g MIP)	L/D
$\text{CN}-\text{N}=\text{N}-\text{CN}$ 2.5 mol % for monomers		576	448	1.29
		429	385	1.11
		158	130	1.22
$\text{COOMe}-\text{N}=\text{N}-\text{COOMe}$ 5.0 mol % for monomers		322	489	1.52
		4294	3055	1.41
		2827	1587	1.78

MIP can be constructed without crosslinker

Highest selectivity was observed for (template molecule)

Recognition ability was improved by using  $\text{COOMe}-\text{N}=\text{N}-\text{COOMe}$  as the initiator

### Effect of the template and solvent used for the adsorption

Composition of MeOH extract					
Template	Solvent	L (μg/1g MIP)	D (μg/1g MIP)	L/D	Appearance
MIP-L	CH <sub>3</sub> Cl	3893	3140	1.24	Powder
MIP-L	MeOH	213	182	1.17	Rubber
MIP-L <sup>a)</sup>	CH <sub>3</sub> Cl	640	676	0.95	Powder
MIP-D	CH <sub>3</sub> Cl	735	630	0.86	Powder
MIP-DL	CH <sub>3</sub> Cl	1104	1151	0.96	Powder

<sup>a)</sup> MIP recoverd

Recognition ability was lost during recovery.

High reproducibility was observed.

Interaction between MIP and target molecules was suppressed by MeOH

### Summary

1. Molecular recognition by MIP without covalent crosslinking
2. MIP recognizes target molecule used as the template

# Synthesis and chemiluminescence of dioxetane bearing a sterically crowded bisnaphthol moiety

Hidehisa Kawashima (川島 英久)  
Department of Chemistry, Kanagawa University

## Background

**Change of stereochemistry**  
↓  
**Change of chemiluminescence properties**

**molecular recognition!**

- One magical phenomenon in nature is luminescence of organisms such as fireflies and jelly fishes.
- How such a bioluminescence occurs is one of quite interesting problems for us.
- Now, we believe that the bioluminescence of the firefly occurs by the mechanism shown here.
- Participation of final dioxetane intermediate is the most important point in this mechanism.
- After the proposal of the dioxetane intermediate, many chemists have been studying the four-membered ring generated as a high-energy molecule.
- We also have been studying mainly from the viewpoints of design of high-performance chemiluminescence substrates.
- A dioxetane substituted with a phenol undergoes base-induced decomposition to give bright light by intramolecular charge-transfer-induced decomposition mechanism.

**CTID: Charge-Transfer-Induced Decomposition** Matsuda, M.; Yasuda, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 1059-1063.

**McCarte, F. G.** *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 321-327.  
**Wang, Y.** *Chem. Commun.* **1998**, 62-63.  
**Wang, Y.** *Photochem. Photobiol.* **1998**, 62-67.  
**Wang, Y.** *Photochem. Photobiol.* **2001**, 62-62.

**Makino, M.; Iwata, K.; Yokoyama, M.; Hatanaka, S.; Ito, K.** *Chem. Commun.* **2005**, 600-601.

**[K(Ci,Ra,Ra)]<sup>+</sup>t-BuO<sup>-</sup> / PHH-THF**  
**[K(Cs,Sa)]<sup>+</sup>t-BuO<sup>-</sup> / PHH-THF**

For example, when we treated individually these four optical isomers with optically active crown ethers, we observed characteristic chemiluminescences.  
These chemiluminescence spectra were different from that of each other as shown here.  
That is to say, these optically active dioxetanes underwent chiral-induced-chemiluminescent decomposition.

## This work

**Sterically crowded dioxetane**

Base = TBAOMe, MeONa, t-BuOK, Mg(OMe)<sub>2</sub>

CTID: Charge-Transfer-Induced Decomposition

### Change of chemiluminescence properties?

- As a further investigation of such a chiral-induced chemiluminescence, we first synthesized diastereomers of this dioxetane.
- This dioxetane bears a sterically congested bisnaphthol moiety.
- Next, we examined base-induced chemiluminescent decomposition of these diastereomers using various metal alkoxides to understand the influence of metal ion on the chemiluminescence properties.

## Chemiluminescence properties of dioxetane

**Fig. 1 Chemiluminescence spectra of dioxetane 1A in MeOH**

**Fig. 2 Chemiluminescence spectra of dioxetane 1B in MeOH**

Base	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^a$	$\phi_b$	$k^{CTID}/s^{-1}$	$t_{1/2}/s$
TBAOMe	581	$6.3 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^{-2}$	$2.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^{-3}$
MeONa	583	$4.8 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^4$	$1.9 \times 10^{-3}$
t-BuOK	583	$5.0 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^4$	$1.9 \times 10^{-3}$
Mg(OMe) <sub>2</sub>	566	$9.0 \times 10^{-2}$	$(6.3 \times 10^{-2})$	$(1.8 \times 10^4)$	$2.6 \times 10^{-4}$

Base	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^a$	$\phi_b$	$k^{CTID}/s^{-1}$	$t_{1/2}/s$
TBAOMe	581	$6.5 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^{-2}$	$2.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^{-3}$
MeONa	583	$5.0 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^4$	$2.6 \times 10^{-3}$
t-BuOK	583	$5.0 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^4$	$2.7 \times 10^{-3}$
Mg(OMe) <sub>2</sub>	554	$9.0 \times 10^{-2}$	$(6.3 \times 10^{-2})$	$(1.8 \times 10^4)$	$4.4 \times 10^{-4}$

- Thus, we carried out chemiluminescent decomposition of these diastereomeric dioxetanes by the use of TBAOMe, MeONa, t-BuOK, or Mg(OMe)<sub>2</sub> in MeOH.
- When we treated this dioxetane with an alkaline metal alkoxide, we observed chemiluminescence.
- These chemiluminescence spectra quite resembled that of TBAOMe.
- On the other hand, when we treated this dioxetane with Mg(OMe)<sub>2</sub>, we observed somewhat different features.
- Thus, for the Mg<sup>2+</sup> system, chemiluminescence spectra shifted to blue from the case of TBAOMe system and chemiluminescence efficiency increased.

## Chemiluminescence properties of dioxetanes

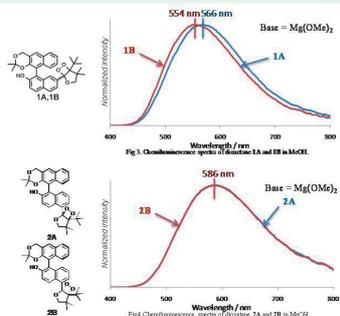


Table 3 Chemiluminescence properties of dioxetanes in MeOH<sup>b)</sup>

HO-Ar-O	Base	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^a$	$\phi_b$	$k^{CTID}/s^{-1}$	$t_{1/2}/s$
HO-C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> -O	TBAOMe	586	$6.5 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-2}$	13000	
	Mg(OMe) <sub>2</sub>	527	Not estimated			
1A (diastereomer 1)	TBAOMe	581	$6.3 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^{-3}$	380	
	Mg(OMe) <sub>2</sub>	566	$1.0 \times 10^{-2}$	$2.6 \times 10^{-4}$	2700	
1B (diastereomer 2)	TBAOMe	581	$6.5 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^{-3}$	270	
	Mg(OMe) <sub>2</sub>	554	$1.1 \times 10^{-2}$	$4.4 \times 10^{-4}$	1600	

Table 4 Chemiluminescence properties of dioxetanes in MeOH<sup>b)</sup>

HO-Ar-O	Base	$\lambda_{max}/nm$	$\phi^a$	$\phi_b$	$k^{CTID}/s^{-1}$	$t_{1/2}/s$
HO-C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> -O	TBAOMe	583	$4.3 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-3}$	600	
	Mg(OMe) <sub>2</sub>	552	$1.2 \times 10^{-2}$	$5.3 \times 10^{-4}$	1300	
2A	TBAOMe	607	$2.5 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-2}$	33	
	Mg(OMe) <sub>2</sub>	586	$4.3 \times 10^{-4}$	$4.4 \times 10^{-3}$	155	
2B	TBAOMe	607	$2.6 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-2}$	29	
	Mg(OMe) <sub>2</sub>	586	$4.5 \times 10^{-4}$	$4.7 \times 10^{-3}$	150	

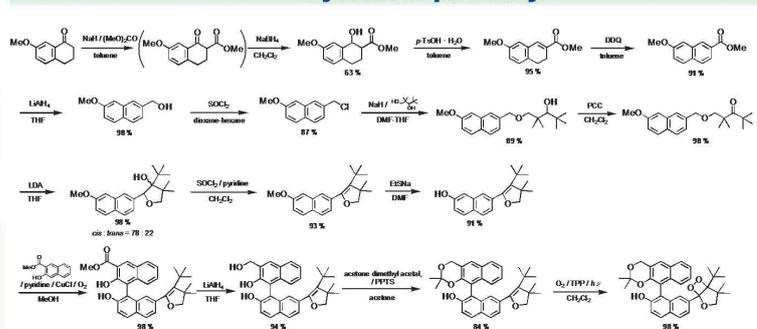
- In addition, for the Mg(OMe)<sub>2</sub> system, chemiluminescence spectra of the diastereomers were different from each other.
- On the other hand, chemiluminescence spectra were not different between diastereomers for this dioxetane 2.
- A sterically congested moiety of dioxetane 1 presumably affected the chemiluminescence property.

- This table shows the results of chemiluminescent decomposition of parent naphthol-substituted dioxetane and related binaphthyl dioxetane 2.
- Based on here were TBAOMe and Mg(OMe)<sub>2</sub>.
- Thus, we found that Mg<sup>2+</sup> tended to cause shorter wavelength emission and to increase chemiluminescence efficiency.

## Summary

- When the dioxetane 1 was treated with Mg(OMe)<sub>2</sub>, chemiluminescence spectra shifted to blue from the case of TBAOMe system and chemiluminescence efficiency increased.
- In addition, for the Mg(OMe)<sub>2</sub> system, chemiluminescence spectra of the diastereomers were different from each other.
- The color modulation of chemiluminescence for dioxetane 1 is due to the coordination of phenoxide with Mg ion, which should cause change of stereochemistry of dioxetane 1.
- The difference in chemiluminescence spectra between diastereomers is presumably caused by steric congestion in dioxetane 1.

## Synthetic pathway

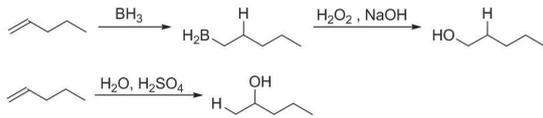




## Development of length-selective acylation catalyst using hydrogen-bonding between amide

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University  
Noriaki TSUZUKI, Nobuhiro KIHARA

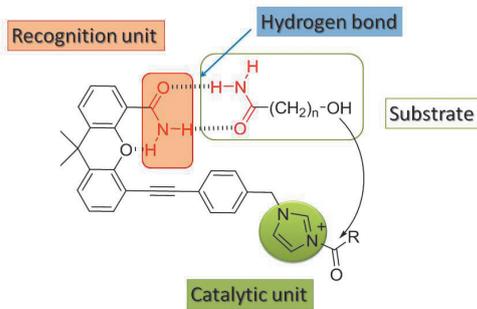
### Introduction



Regioselective reaction??  $\rightarrow$  The selectivity occurs based on the chemical properties, but not on the position of the substrate

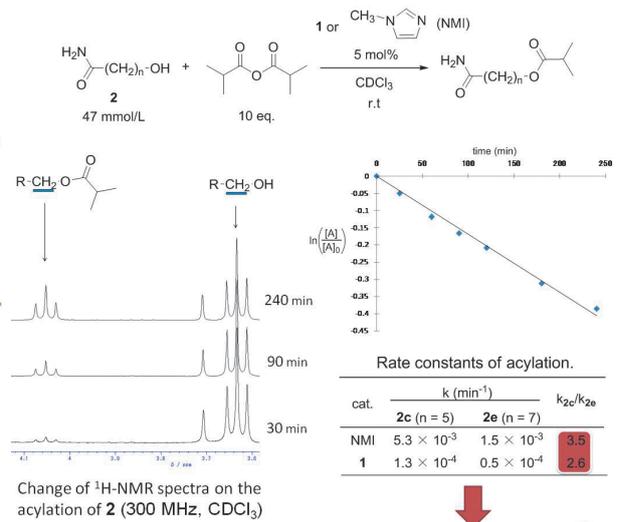
Differentiation of functional group with similar reactivity is very difficult although enzyme realizes the high position-selectivity

### This Work

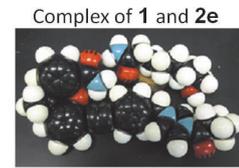


The rate of acylation depends on the length of methylene chain of  $\omega$ -hydroxyamide??

### Rate of acylation of substrate



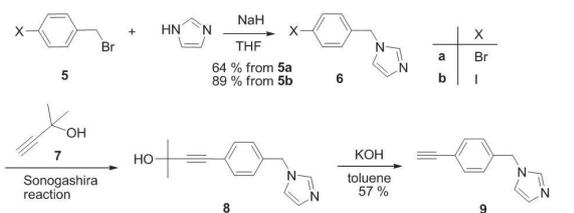
**1** acylated **2e** 1.3 times selectively than **2c**



The hydroxy group of **2e** is located near the activated acyl group

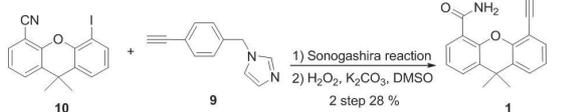
### Results and Discussion

#### Synthesis of reaction field 1

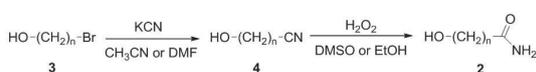


#### Sonogashira reaction

run	reactant	catalyst	yield (%)
1	<b>6a</b>	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	0
2	<b>6a</b>	$\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$	10
3	<b>6b</b>	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	99



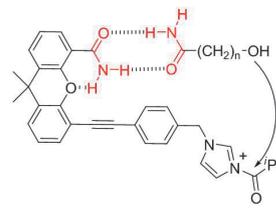
#### Synthesis of substrate



#### Solubility of substrate

solvent	2	a	b	c	d	e	f	g	h
	n	3	4	5	6	7	8	9	10
$\text{CHCl}_3$		○	x	○	○	○	x	x	x
$\text{CH}_3\text{CN}$		○	○	○	○	○	x	x	x
THF		○	x	○	x	x	x	x	x
diethyl carbonate		○	x	x	x	x	x	x	x
ethyl acetate		○	x	○	○	○	x	x	x
1,2-dimethoxyethane		○	x	○	x	x	x	x	x
benzonitrile		x	x	○	x	x	x	x	x
nitrobenzene		x	x	x	x	x	x	x	x
sulfolane		○	○	○	x	x	x	x	x
propylene carbonate		x	x	○	x	x	x	x	x
DMPU		○	○	○	○	○	○	○	○
DMAc		○	○	○	○	○	○	○	○
DMF		○	○	○	○	○	○	○	○

#### Conclusion



Reaction field **1** acylated **2e** selectively compared to **2c**

Reaction field **1** can recognize the length of methylene chain of substrate

図 11. ポスター (発表者: 都築 倫明, 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻).

# Influence of salt on interaction water-soluble polymer and water

★Mayumi INABA<sup>1)</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, <sup>1</sup>Kanagawa Univ., Tsuchiya Hiratsuka Kanagawa 259-1293

## Introduction

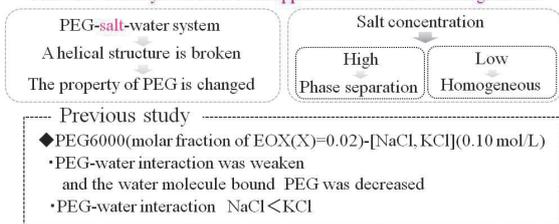
**Polyethylene glycol (PEG)**  
HO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H

← addition Salt

NaCl, KCl  
MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>  
etc.

- Environmentally and biologically friendly materials
- Highly hydrophilic and viscous polymer
- An ether oxygen forms complexes rolling around metallic ions and PEG is used for the ion extraction to organic metals
- The two layer system (PEG-water / salt-water or PEG-salt-A-water / PEG-salt-B-water) is noticed to good environmental analysis method

PEG-salt-water system have been applied to industrial or biological use



★The behavior of water molecules in PEG-salt-water system

- DSC**: Intension of interaction of PEG-water and quantity of water bound PEG by melting of PEG-water eutectic
- NIR**: Water with hydrogen bond by Abs at 1200 nm
- <sup>17</sup>O NMR**: Mobility of water molecules by relaxation time(T<sub>2</sub>)

## Purpose

We investigate the behavior of water molecules in PEG-salt-water system and the interaction of containing salt

## Summary

- ◆ Melting temperature of PEG-water eutectics was fallen by addition to salt  
⇒ Interaction of PEG-water was weakened
  - ◆ Melting enthalpy of PEG-water eutectics was decreased by addition to salt  
⇒ The water molecules bound PEG were decreased
  - ◆ Abs at 1200 nm was decreased by addition to salt  
⇒ The water molecules of water bond were decreased
- PEG6000(X=0.02-0.14)-[NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>](0.05 mol/L) and water
- ◆ Melting temperature of PEG-water eutectics was risen at around 0.02-0.06 molar fraction of EOX, and reached at steady state at around the 0.06 molar fraction of EOX
  - ◆ Abs at 1200 nm was risen at around 0.02-0.06 molar fraction of EOX, it was reached steady state at around 0.06-0.10 molar fraction of EOX, and risen
- PEG6000(X=0.02)-[NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>](0.01-0.10 mol/L) and water
- ◆ PEG-water eutectics could not observed  
⇒ The water molecules bound PEG become minimum  
Interaction is stronger salt-water than PEG-water  
Hydration water of PEG was used for hydration of salt
  - ◆ Melting temperature of water-PEG eutectics was minimum at 0.07 salt concentration
  - ◆ Relaxation time(<sup>17</sup>O) of PEG-NaCl, KCl-water system were showed the constant value, PEG-CaCl<sub>2</sub>-water system was showed the rising tendency

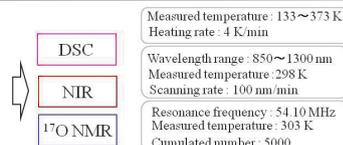
## Experimental

### ◇Reagents

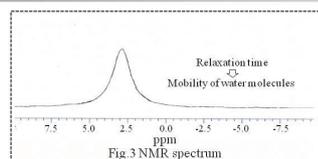
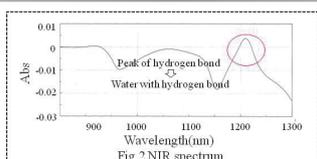
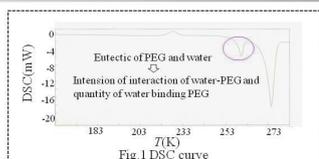
- Polyethylene glycol 6000
- Sodium Chloride
- Potassium Chloride
- Magnesium Chloride
- Calcium Chloride

### ◇Procedure

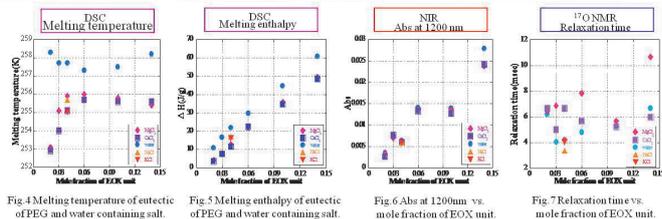
- PEG6000(X=0.02)-[NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>] (M=0.01-0.10) and water  
⇒ Influence of molar fraction of EOX
- PEG6000(X=0.02-0.14)-[NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>] (M=0.05) and water  
⇒ Influence of salt concentration



## Results

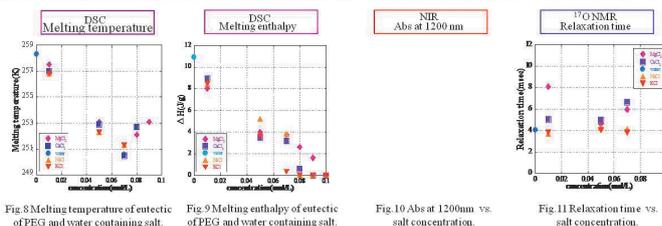


### PEG6000(X=0.02-0.14)-[NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>](0.05 mol/L) and water



- ◆ Melting temperature of PEG-water eutectics was fallen by addition to salt
- ◆ Melting enthalpy of PEG-water eutectics was decreased by addition to salt
- ◆ Abs at 1200 nm was decreased by addition to salt
- ◆ Melting temperature of PEG-water eutectics was risen at around 0.02-0.06 molar fraction of EOX, and reached at steady state at around the 0.06 molar fraction of EOX
- ◆ Abs at 1200 nm was risen at around 0.02-0.06 molar fraction of EOX, it was reached steady state at around 0.06-0.10 molar fraction of EOX, and risen

### PEG6000(X=0.02)-[NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>](0.01-0.10 mol/L) and water



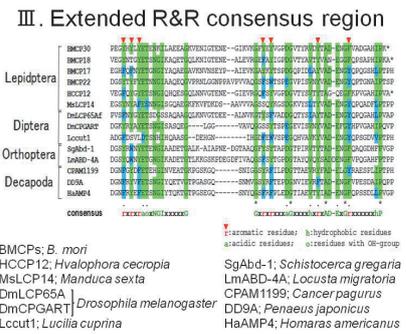
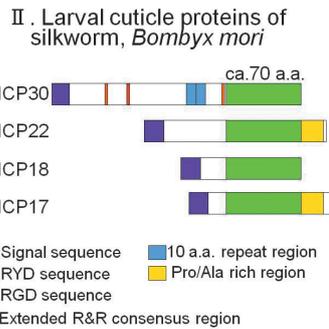
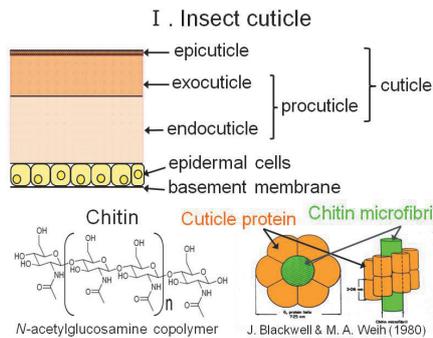
- ◆ Melting temperature of PEG-water eutectics was minimum at 0.06 salt concentration
- ◆ PEG-water eutectics could not observed
- ◆ Relaxation time of PEG-NaCl, KCl-water system were steady state, PEG-CaCl<sub>2</sub>-water system results tendency of rise

図 12. ポスター (発表者: 稲葉真由美, 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻).

# Analysis of the Cell-adhesive Activity of BMCP30, a Larval Cuticle Protein of the Silkworm *Bombyx mori*

Yuichi Kawamura<sup>1</sup>, Michiko Ito<sup>2</sup>, Kazuo Yamaguchi<sup>2</sup>, Tsuyoshi Ohira<sup>1</sup>, and Susumu Izumi<sup>1</sup>

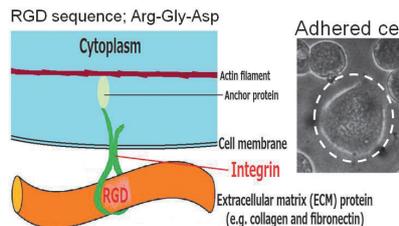
<sup>1</sup>Department of Biological sciences, <sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University



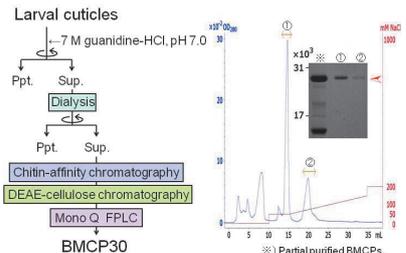
**IV. Amino acid sequence of BMCP30**

1 MRVFLAICLS LVVALAAETG KYTPQYNRV 30  
Signal peptide  
31 YSTVSPFVYK PGRVVDVDFGR YDPSRDNSGR 60  
RGD sequence  
61 YIPDNSGAYN GDRGDRGAAG GFYTGSGTAG 90  
RGD sequence  
91 GGGAYVGTK EDLSKYLGDA YKSSIVLPL 120  
121 VVKPTIPVVP TPTYVASKV TPTYVASKV 150  
10 amino acid repeat  
151 PPSGAGDYK YGIIRYDNDV APEGYHYLYE 180  
RGD sequence  
181 TENKILAEAA GKVENIGTEN EGIKVGFYE 210  
Extended R&R consensus region  
211 YVGGDGVYR VDYTDENGV VADGAH IPK 239

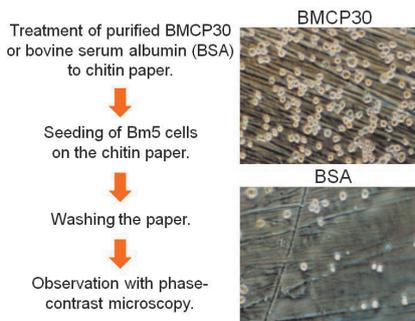
**V. Cell-adhesion and RGD sequence of extracellular matrix (ECM) proteins**



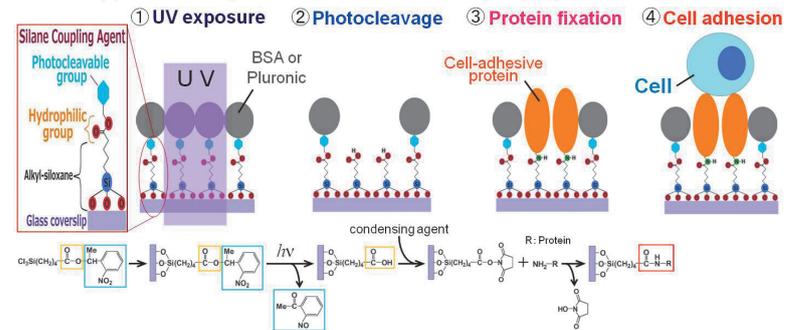
**VI. Purification of BMCP30**



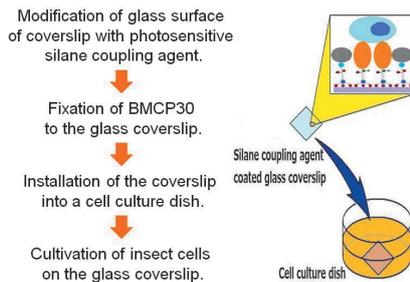
**VII. Cell-adhesive activity test using BMCP30**



**VIII. Application of photosensitive silane coupling agent for cell culture**



**IX. Experimental strategy (in progress)**



**X. Summary**

- Primary structure of BMCP30 bear an RGD sequence that is important for the cell-binding domain of a number of ECM proteins and the region around this sequence exhibits striking similarity with the sequence found in vertebrate collagens.
- BMCP30 possesses the extended R&R consensus region, about 70 amino acids region conserved widely among cuticle proteins mainly from the soft cuticle of many insect and arthropod species.
- To analyze details of cell-adhesion activity of BMCP30, we purified BMCP30 by use of both chitin-affinity and anion exchange chromatography from cuticle proteins, which were solubilized from the cuticle of the 5<sup>th</sup> instar larvae of the silkworm.
- Insect cells of the established cell line clearly adhere to the chitin paper coated with purified BMCP30.
- By using the photoactivable substrate for cell culture, quantitative analyses of the adhesion activity of BMCP30 are in progress.

図 13. ポスター (発表者: 川村 雄一, 神奈川大学大学院理学研究科生物科学専攻).



## 2010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 准教授 張 善俊  
 情報科学科 准教授 長澤倫康  
 情報科学科 教授 水野智久  
 化学科 教授 木原伸浩  
 化学科 教授 野宮健司  
 生物科学科 教授 小笠原強  
 生物科学科 教授 小谷 享

#### (2) 編集委員

委員長：生物科学科 教授 鈴木季直  
 編集委員：情報科学科 准教授 張 善俊  
 情報科学科 准教授 長澤倫康  
 化学科 教授 天野 力  
 化学科 教授 加部義夫  
 生物科学科 教授 井上和仁

#### (3) 産官学委員

委員長：情報科学科 教授 水野智久  
 運営委員：化学科 教授 堀 久男  
 化学科 教授 山口和夫  
 生物科学科 教授 鈴木季直

#### (4) 教育研究委員

委員長：生物科学科 教授 小笠原強  
 運営委員：化学科 教授 山口和夫  
 客員研究員 中野陽子

#### (5) 顧問・特別所員・客員研究員

顧問：  
 門屋 卓、武内義尚、藤原鎮男  
 特別所員：  
 大石不二夫、杉谷嘉則、竹内重夫  
 客員教授：  
 藤森 憲、廖 徳章  
 客員研究員：  
 青木正太郎、伊集院久子、市川貴美子、  
 伊藤倫子、内野圭一、大和田正人、  
 小野真菜美、河合 忍、川上義輝、  
 岸 康人、北島正治、木村卓央、  
 桑名 渉、斎藤保直、佐藤 真、

竹田満洲雄、辻本和雄、豊泉和枝、  
 中川清子、中野陽子、長谷川 剛、  
 濱元千絵子、松島一幸、森 春樹、  
 山口寿之、渡部徳子

### 2 セミナー・シンポジウム・講演会

#### (1) 第32回湘南ハイテクセミナー

－機器分析入門－

種々の機器分析法の基礎を幅広く講義します。企業や公立機関の新人クラスの分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

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) 「赤外分光」  
高柳正夫(東京農工大学大学院農学研究  
院環境資源物質科学部門)
- 4) 「質量分析」  
明石知子(横浜市立大学大学院生命ナノ  
システム科学研究科)
- 5) 「環境分析」  
西本右子(神奈川大学理学部化学科)
- 6) 「有機材料分析」  
宇野佳孝(株式会社日東分析センター)

日 時：2010年6月3日(木)・4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

#### (2) 第33回湘南ハイテクセミナー

－研究開発と分析技術－

種々の機器分析法の基礎と応用を幅広く講義します。特に、優れた分析技術が研究・開発にいかに関与するかという視点を重視します。企業や公立機関の分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれている

ような方を対象にします。

演題・講師：

- 1) 「研究・開発とNMR」  
嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 2) 「研究・開発と材料分析」  
志智雄之(株式会社 日産アーク)
- 3) 「環境分析」  
渋川雅美(埼玉大学大学院理工学研究科)
- 4) 「研究・開発とX線分析」  
田沼繁夫(独立行政法人物質・材料研究機構)
- 5) 「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)
- 6) 「研究・開発と赤外・ラマン分光」  
古川行夫(早稲田大学理工学部化学科)

日 時： 2010年12月2日(木)・3日(金)  
10時～16時40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

### (3) 講演会

講演者： 廖 徳章  
(国立台湾科学技術大学教授)  
演 題： 「Synthesis of High Performance:  
Electrochromic, Electro-optical  
and Theoretical Investigation」

日 時： 2010年6月1日(火)  
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： 神奈川大学大学院・理学研究科  
神奈川大学総合理学研究所

### (4) 講演会

講演者： 大場信義(大場蛍研究所所長、  
横須賀市自然・人文博物館研究員)  
演 題： 「ホテルの多様性とその生息環境の保  
全・再生」

日 時： 2010年6月30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  
(11号館サーカムホール)

主 催： 神奈川大学理学部・生物科学科  
共 催： 神奈川大学大学院 理学研究科  
神奈川大学総合理学研究所

### (5) 講演会

講演者： 養老孟司(東京大学名誉教授・解剖  
学者)

演 題： 「脳と心とインターネット」

日 時： 2010年7月21日(水)  
16時20分～17時50分

会 場： 神奈川大学  
横浜キャンパス  
(16号館セレストホール)

主 催： 神奈川大学  
共 催： 神奈川大学工学研究所  
神奈川大学総合理学研究所  
後 援： 神奈川県教育委員会  
横浜市教育委員会  
川崎市教育委員会

### (6) 講演会

講演者： 小野教夫(理化学研究所  
基幹研究所 専任研究員  
平野染色体ダイナミクス研究室)

演 題： 「染色体の複製と凝縮の連携に  
おけるコンデンシンの役割」

日 時： 2010年8月4日(水)  
13時30分～14時30分

会 場： 神奈川大学  
湘南ひらつかキャンパス  
(11号館サーカムホール)

主 催： 神奈川大学理学部・生物科学科  
共 催： 神奈川大学総合理学研究所

### (7) 講演会

講演者： 渡部終五(東京大学大学院農学生命  
科学研究科 水圏生物科学研究室)

演 題： 「魚類の筋発生と筋成長～ミオシン  
重鎖遺伝子の発現変動が関係する」

日 時： 2010年10月20日(水)  
13時30分～15時00分

会 場： 神奈川大学  
湘南ひらつかキャンパス  
(6号館205室)

主 催： 神奈川大学総合理学研究所  
報 告：

2010年10月20日(水曜日)に生物科学科の鈴木季直、小谷 享、大平 剛の3研究室が中心と

なり、日本における魚介類筋研究の第一人者である渡部終五教授(東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学研究室)にご来訪頂き、6号館205講義室(13:30~15:00)に於いて「魚類の筋発生と筋成長-ミオシン重鎖遺伝子の発現変動が関係する-」という演題で講演して頂いた。終生、筋細胞数と筋細胞容積の増大で肥大する魚類では、速筋線維と遅筋線維は明確局在が異なり、その筋発生と成長に筋主要タンパク質ミオシンの重鎖遺伝子が強く関わっていることを明らかにした最近の研究成果が紹介された。生物科学科卒研究生、大学院生、教員など100名近い聴講者が集まり活発な質問もあり、有意義な講演会となった。

(報告者:鈴木季直、2010.10.21)

#### (8) 講演会

講演者: 西田篤司(千葉大学大学院薬学研究院教授)

演題: 「全合成に向けた新反応開発」

日時: 2010年10月28日(木)  
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: 神奈川大学理学部化学科  
共催: 神奈川大学総合理学研究所

報告:

2010年10月28日(木)午後3時10分から、化学科の中川昌子先生、松本正勝先生のご推薦のもと、化学科の加部義夫研究室が世話人となり上記講演会を6号館209講堂で開催した。講師の千葉大学大学院薬学研究院教授の西田篤司教授には「全合成に向けた新反応開発」という演題のもとに約90分講演していただきました。西田先生はかつて中川昌子と共同でマンザミン、ナカドマリンなどの複雑な天然物アルカロイドの全合成で著名な業績をあげられており、現在種々の天然物合成において鍵となる新たな反応の開発を行っておられます。今回は新たに開発されたフラン-イミニウムカチオン環化反応を用いるマンザミンアルカロイド合成とDanishefsky ジエンを用いる不斉Diels-Alder反応を鍵段階とするプラチフィリド合成について講演いただきました。

(報告者:加部義夫、2010.10.29)

#### (9) 講演会

講演者: 田辺秀之

(総合研究大学院大学・先端科学研究科・生命共生体進化学専攻)

演題: 「染色体テリトリー・遺伝子空間配置に関する分子基盤について」

日時: 2010年12月22日(水)  
14時00分~15時00分

会場: 神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス  
(11号館サーカムホール)

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・  
生物科学専攻

報告:

平成22年12月22日(水)午後4時から5時の約1時間、神奈川大学湘南ひらつかキャンパス11号館サーカムホールにて、総合大学院大学・先端科学研究科・生命共生体進化学専攻の田辺秀之准教授に講演をして頂いた。「染色体テリトリー・遺伝子空間配置に関する分子基盤について」と題して、動物細胞内の染色体や遺伝子の細胞内配置の変化について、田辺先生が行われている3次元的に配置を解析できる3D-FISHと生細胞蛍光観察法を組み合わせた手法で得られた最新の知見を解説して頂いた。相同染色体が核内で対照的な位置に配置されることや、細胞が由来する組織の違いで染色体の配置が変わることなどが紹介され、非常に興味深いものであった。神奈川大学総合理学研究所所員、神奈川大学理学部教員、理学部学生・大学院生、約40名が参加した。

(報告者:安積良隆 2011.1.11)

#### (10) 平塚祭 特別参加企画

テーマ: 「モバイル走査電子顕微鏡で  
見たいものをみよう」

日時: 2010年10月23日(土)、24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

### 3 産官学 活動実績

#### (1) 展示会

「第1回 教育ITソリューション EXPO 2010」

日 時：2010年7月8日～10日

会 場：東京ビッグサイト

出展者：張 善俊

テーマ：「低コストで導入できる全員参加型  
インタラクティブ電子黒板」

主 催：リードエグジビションジャパン(株)

#### (2) 展示会

「湘南ひらつかテクノフェア 2010」

日 時：2010年10月21日～23日

会 場：ひらつかアリーナ

出展者・テーマ：

1)「光応答性表面修飾剤の開発と応用」

山口和夫

2)「フィルタリングルール最適化問題の解法」

田中 賢

3)「湘南ひらつかキャンパス生きもの歳時記」

故・浜口哲一

主 催：平塚商工会議所

#### (3) 展示会

「第31回工業技術見本市」

テクニカルショウ ヨコハマ 2010

日 時：2011年2月3日～5日

会 場：パシフィコ横浜

出展者：山口和夫

テーマ：「感光性シランカップリング剤を  
用いたケイジド細胞培養基盤」

主 催：(財)神奈川産業振興センター

(社)横浜市工業会連合会

神奈川県

横浜市

#### (4) 展示会

「第7回 国際水素・燃料電池展 FC EXPO  
2010」

日 時：2011年3月2日～4日

会 場：東京ビッグサイト

出展者：櫻井英博

テーマ：「シアノバクテリアの光合成水素  
生産性向上とバイオリクターの  
低廉化」

主 催：リードエグジビションジャパン(株)

#### (5) 発表

「新技術説明会」

日 時：2011年1月14日

会 場：JSTホール

出展者：水野智久

テーマ：「ひずみ制御ソースヘテロ構造  
による超高速CMOS技術」

主 催：(財)科学技術振興機構

#### (6) 発表

「バイオ関連研究シーズ事業化促進事業」

日 時：2011年2月24日

会 場：中小企業センタービル

出展者：山口和夫

テーマ：「ケイジド細胞培養基板のための  
感光性表面修飾剤の開発」

主 催：神奈川県

#### (7) 特 許(日本出願)

化学科 教授 木原伸浩

「エポキシ硬化剤及びエポキシ樹脂組成物、  
並びに半導体装置及びリペア方法」

#### (8) 特 許(日本出願)

情報科学科 准教授 張 善俊

「電子黒板」

#### (9) 特 許(日本出願)

化学科 教授 山口和夫

「光分解性ヘテロ二価性架橋剤」

#### (10) 特 許(海外出願)

情報科学科 教授 水野智久

「半導体素子構造の形成方法、及び半導体素子」

# 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℃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。

## Auther Index

### A

天野 力                   Amano, Chikara ..... 1  
 青木 孝                   Aoki, Takashi ..... 15  
 青木 唯                   Aoki, Yui ..... 63  
 有馬広記                 Arima, Hiroki ..... 9  
 安積良隆                 Azumi, Yoshitaka ..... 49, 83

### C

力石紀子                 Chikaraishi, Kasuga Noriko ... 29

### D

出川洋介                 Degawa, Yousuke ..... 57

### H

狭田謙一                 Hasada, Ken-ichi ..... 23  
 長谷川由利子             Hasegawa, Yuriko ..... 43  
 早津 学                   Hayatsu, Manabu ..... 29, 63  
 日野晶也                 Hino, Akiya ..... 37, 57  
 星野 靖                   Hoshino, Yasushi ..... 9

### I

市川貴美子               Ichikawa, Kimiko ..... 91  
 池田博美                 Ikeda, Hiromi ..... 71  
 井上和仁                 Inoue, Kazuhito ..... 29, 83  
 石垣景也                 Ishigaki, Hiroya ..... 49  
 伊能小百合               Iyoku, Sayuri ..... 29  
 泉 進                     Izumi, Susumu ..... 43

### K

金沢謙一                 Kanazawa, Ken'ichi ..... 79  
 河合 忍                   Kawai, Shinobu ..... 57  
 川上洋司                 Kawakami, Hiroshi ..... 29  
 北村 巧                   Kitamura, Ko ..... 49  
 北島正治                 Kitashima, Masaharu ... 29  
 小林 剛                   Kobayashi, Tsuyoshi ..... 37  
 桑原恒夫                 Kuwabara, Tsuneo ..... 71

### M

松原世明                 Matsubara, Toshiaki ..... 95

松永 諭

三上洋右

望月真志

茂木和枝

森 和亮

### N

永松礼夫

中田穰治

西山 歩

野宮健司

### O

小笠原強

大平 剛

大塚一郎

小野真菜美

大和田正人

### S

斎藤保直

齋藤雄介

杉浦健志

鈴木季直

鈴木 温

### T

高木由貴

豊泉龍児

鶴岡慎哉

### W

マーシーワイルダー

### Y

山口栄雄

吉川理絵

吉田拓也

Matsunaga, Satoshi ..... 23

Mikami, Yosuke ..... 1

Mochizuki, Shinji ..... 1

Mogi, Kazue ..... 37

Mori, Wasuke ..... 23

Nagamatsu, Leo ..... 75

Nakata, Jyoji ..... 9

Nishiyama, Ayumi ..... 49

Nomiya, Kenji ..... 29

Ogasawara, Tsuyoshi ... 37, 91

Ohira, Tsuyoshi ..... 43

Ohtsuka, Ichiro ..... 49

Ono, Manami ..... 63

Owada, Masato ..... 79

Saito, Yasunao ..... 9

Saito, Yusuke ..... 37

Sugiura, Kenji ..... 23

Suzuki, Suechika ..... 29, 63

Suzuki, Tadzunu ..... 83

Takagi, Yoshitaka ..... 29

Toyoizumi, Ryuji ..... 37

Tsuruoka, Shinya ..... 43

Wilder, Marcy N. ..... 43

Yamaguchi, Shigeo ..... 83

Yoshikawa, Rie ..... 29

Yosida, Takuya ..... 29



## 編集後記

Science Journal of Kanagawa University 第 22 巻を皆様のお手元に無事お届けできますことは、編集委員一同にとって誠に喜ばしいことです。この巻には、総合理学研究所の研究助成を受けた研究成果からまとめられた論文 7 報を含む、原著論文 10 報、短報 3 報、テクニカルノート 2 報と研究交流 1 報の、合計 16 の論文・記事が掲載されています。情報系、物理系、化学系、生物系にわたって学術的価値の高い研究成果を投稿いただきました。研究交流については、第 6 回神奈川大学と国立台湾大学との国際会議の報告を寄せていただきました。今後も総合理学研究所の国際交流の歩みと研究成果を満載する投稿を大いに期待するところであります。

近年、様々な学術論文誌が学問分野の細分化と共に出てきております中、21 世紀の科学の基礎である情報、数学、物理、化学と生物など横断的な学際領域の研究を一同に掲載する本誌は読者に違う視点を提供し、新しい展望につながり得る刺激を与えるようにしております。元々一学部の紀要から進化し

た総合科学誌は早や 7 年の歳月を経ております。その間皆様のご支援をいただき、多くの原著論文を継続して掲載してきました。身近にありながら、専門分野の異なる先生方には互いの研究を知らないことも案外あります。本誌を手にとっていただいで新しいひらめきの種を見つけることがありましたら、編集委員一同、この上ない喜びとなります。

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、ローカルの良さを生かしながら、グローバルの認知を高めるため、いくつかの課題が残されています。研究所外の査読者による論文審査制度の早期実現は要務となっております。また、研究所外の投稿を促すため、総合理学研究所が学会の大会を主催し、学会発表の中から優秀なものを本誌に推薦して掲載することも考えられます。これからも、本誌の良さを生かして、「小さくてもピカッと光る」雑誌にするために、皆様のさらなるご支援、ご協力を賜りますようよろしくお願い申し上げます。

張 善俊

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
井上和仁	生物科学科	Kazuhito 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	Shanjun Zhang	Department of Information Sciences
長澤倫康	情報科学科	Michiyasu Nagasawa	Department of Information Sciences

### Science Journal of Kanagawa University Vol. 22 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2011 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*