ISSN 1880-0483

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL OF KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.31 2020

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

Science Journal of Kanagawa University

Vol. 31

目　　次

原　著

Physiological and Ultrastructural Studies on the Origin of Activator Calcium in Body Wall Muscles of Spoon Worms
Suechika Suzuki, Risa Hatakeyama, Chieko Hamamoto, Kento Nomura, Naonori Ishii, Yuriko Ono, Yukio Yamanaka, Akiji Itoh, Mizuho Hachisuka, Norihiro Murayama, Yumi Tanno, Madoka Hanyuu, Narumi Murofushi, Takenori Yamamoto and Akiho Kajino …… 1

Cytochemical Study on the Intracellular Calcium Translocation during the Contraction-Relaxation Cycle in Scorpionfish Swimbladder Muscles
Suechika Suzuki and Chieko Hamamoto …… 11

Epigenetics of Vascular Formation during Zebrafish Hindbrain Development
Misato Fujita and Susumu Izumi …… 15

Microplastic Beads Incorporated into a Single Cell: Analyses Using the Green Paramecium, *Paramecium bursaria*
Hiroshi Hosoya, Kyosuke Suzuki, Misato Fujita, Natsumi Hosoya, Susumu Kotani and Akiya Hino …… 21

電極式底置き炊飯とイースト発酵食パンの性能評価実験
青木　孝 …… 25

低次元シリコンカーバイドの Si 結晶構造依存性
水野智久、鮫島俊之、青木　孝 …… 33

IIa 型 CVD ダイヤモンド基板に *n* 型ドーパント元素をイオン注入しポストアニールによって形成した電気伝導層の電気特性
中田穣治、稲垣俊哉、関　裕平、星野　靖 …… 41

連分割トライに基づく決定木の枝刈り法
原田崇司、田中　賢、三河賢治 …… 53

アルキル置換オリゴシランの励起状態に関する研究
辻　勇人、金澤悠紀、江原正博 …… 61

芳香族置換基を導入した N,C,S- ピンサー鉄錯体の合成と分光学的性質
川原井一成、中島　洋、伊藤亮孝、磯田脩斗、廣津昌和 …… 65

ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構の分子基盤の解明
関　友信、松田　乾、馬久地みゆき、鈴木道生、鈴木信雄、大平　剛 …… 75

ウニ類の各クレードに適した分子系統解析法の開発
若山典央、齋藤礼弥、金沢謙一 …… 79

相模川河口域における長期環境変動のモニタリング（冬期相模川河口域の特徴的水塊中に認められた植物プランクトンの群集構造）
酒井駿輔、川延京子、多田雅章、金沢謙一、西本右子、鈴木祥弘 …… 83

短　報

相模湾平塚沖の貝類相：2018 年と 2019 年の調査結果
大和田正人、齋藤礼弥、加瀬友喜、金沢謙一 …… 89

教育論文

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (7)
加部義夫 …… 93

2019 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告 …… 103

Science Journal of Kanagawa University 投稿規定 …… 107

Author Index …… 111

編集後記 …… 112

Science Journal of Kanagawa University **31** : 1-10 (2020)

■ Full-Length Paper ■

Physiological and Ultrastructural Studies on the Origin of Activator Calcium in Body Wall Muscles of Spoon Worms

Suechika Suzuki[1, 2, 3, 5], Risa Hatakeyama[1], Chieko Hamamoto[1, 3, 4], Kento Nomura[1], Naonori Ishii[2], Yuriko Ono[2], Yukio Yamanaka[2], Akiji Itoh[2], Mizuho Hachisuka[2], Norihiro Murayama[2], Yumi Tanno[2], Madoka Hanyuu[2], Narumi Murofushi[2], Takenori Yamamoto[2] and Akiho Kajino[2]

[1] Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[3] Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[4] Present Address: Application and Research Group, Optic Division, JEOL Ltd.,, Akishima City, Tokyo 196-8558, Japan
[5] To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To examine the origin of activator Ca and its translocation during contraction in body wall muscles (BWM) of spoon worms, *Urechis unicinctus*, physiological and ultrastructural studies, including cytochemistry, were performed. The potassium (K-) contracture tension was significantly reduced by the removal of external Ca, and by the application of Mn, La and verapamil. On the other hand, caffeine induced a prolonged contraction. The removal of Ca and Mg from the external solution, and the rapid cooling caused an irregular or oscillatory contraction. These results suggested that, in BWM fibers, the activator Ca is supplied partially from both external solution and intracellular Ca-accumulating structures. Ultrastructural observations revealed that the muscle fibers contain a relatively large amount of sarcoplasmic reticulum (SR). The fractional volume of the SR relative to the fiber volume was 2~5% in all fibers of three muscle layers. To demonstrate the Ca localization, the muscle fibers were fixed by pyroantimonate (PA) methods at resting and contracting states. In the resting fibers, the PA precipitates were exclusively localized in the SR and the inner surface of plasma membrane. On the other hand, in the contracting fibers, they were diffusely distributed in the central regions of myoplasm, and had disappeared from the SR and plasma membrane. X-ray microanalysis revealed that the PA precipitates contain Ca. With the results of physiological experiments, these results indicate that the activator Ca originates not only from the external solution, but also from the intracellular Ca-accumulating structures, the SR and the inner surface of plasma membrane.
Keywords: regulatory mechanism of smooth muscle, intracellular Ca localization, Ca translocation during contraction, body wall muscles of spoon worms, pyroantimonate method

Introduction

It has been generally accepted that the mechanical activity in muscles is regulated by the change of free Ca concentration in the myoplasm[1)]. However, the sources of Ca ions that activate the contractile mechanism in smooth muscles remain to be determined because both vertebrate and invertebrate smooth muscles exhibit considerable functional and structural variations. The peristaltic movement traveling along the entire body of spoon worms is effectively performed by contraction of body wall muscles (BWM). Although pharmacological investigations have provided information about the

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

neurotransmitters regulating muscle contraction[2], little information is available about the fine structures and their role in excitation- contraction coupling in the BWM of spoon worms. Furthermore, it has been reported that the body wall (BW) is constructed by three muscle layers; the inner circular, middle longitudinal, and outer circular layers[3]. However, the physiological properties and structural features have not been compared among these muscles.

Numerous cytochemical methods have been established to detect the intracellular Ca localization in various types of muscles. The pyroantimonate (PA) method is now considered the best because it can demonstrate both intracellular Ca localization and Ca translocation during muscle contraction[4-10]. Using the PA method with physiological experiments, the present study was performed to clarify the intracellular Ca localization and translocation during mechanical activity in the BWM fibers of spoon worms.

When the body of spoon worms shrinks in response to injurious stimulation, the contraction of BWM is sometimes prolonged. This mechanical response of BWM closely resembles the catch found in molluscan smooth muscles, e.g. the anterior byssus retractor muscle (ABRM) of *Mytilus edulis*[11]. In ABRM fibers, the thick filament protein twitchin was reported to regulate the catch[12-14]. A preliminary immuno-electron microscopic study was also performed to examine the existence of twitchin in the BWM fibers of spoon worms.

Materials and Methods

Preparation

Spoon worms (relaxed body length, ~20 cm), *Urechis unicinctus*, were obtained from a commercial source and kept in circulating seawater at 18℃ (Fig. 1A). The preparations of muscle fiber bundles were obtained from three layers of the BW (Fig. 1B), containing inner circular body wall muscle (ICBWM), longitudinal body wall muscle (LBWM) and outer circular body wall muscle (OCBWM). To prepare the ICBWM and OCBWM, animal bodies were cut transversely to give ring strips of approximately 2 mm in width. These ring strips were cut along the middle longitudinal layer to separate the inner and outer circular layers, and then muscle fiber bundles of 10-20 mm in length were prepared. In the preparation of LBWM, the animal body was dissected longitudinally along the median line, and muscle fiber bundles of 2 mm in width and 10-20 mm in length were isolated.

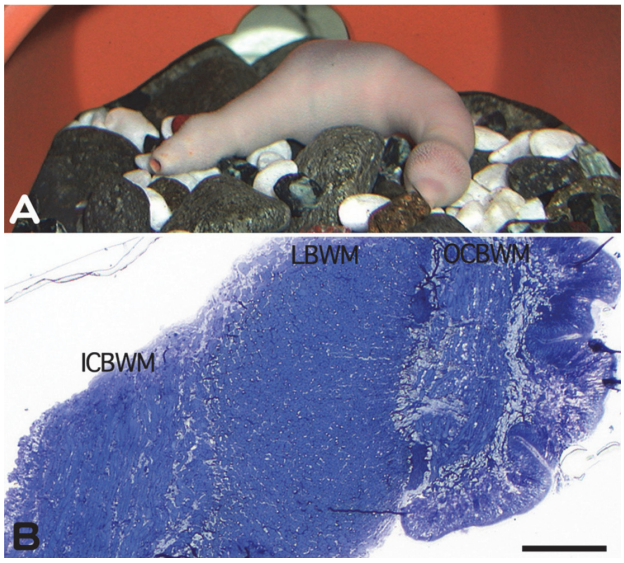


Fig. 1. Spoon worm and its body wall construction. A. Spoon worm living in a water tank filled with circulating ASW. B. Light micrograph of the section cut transversely to the body, showing three types of body wall muscles (BWM); inner circular BWM (ICBWM), longitudinal BWM (LBWM) and outer circular BWM (OCBWM). Scale bar, 0.1 mm.

Physiological experiments

A pair of stainless-steel wire connectors was tied to both ends of the preparation with a cotton thread. Then, the preparation was mounted horizontally at its slack length in a chamber filled with experimental solution; one end of the preparation was attached to the mechanical support and the other end was connected to a strain gauge (U-gauge, Shinko Tushin Co.) to record the isometric tension on an ink-writing oscillograph. The standard experimental solution was artificial seawater (ASW) having the following composition (mM): NaCl, 513; KCl, 10; $CaCL_2$, 10; $MgCl_2$, 50 (pH adjusted to 7.2 by $NaHCO_3$). The preparation was mainly stimulated to contract by high K solution, prepared by substituting K ions (20-400 mM) for an equal amount of Na ions in ASW. Ca-free and Ca- and Mg-free (Ca・Mg-free) solutions were prepared by removing these ions and adding an osmotically equivalent amount of Na ions in ASW.

Furthermore, to remove Ca ions completely, 2 mM ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N, N', N' -tetraacetic acid (EGTA) was added to ASW. Other

experimental solutions used to assess the effects of drugs and ions on the mechanical response were made by addition of the drugs at appropriate concentrations to the standard solution and/or by substitution for Na. The physiological experiments were performed at room temperature.

Electron microscopy

For conventional electron microscopy, relaxed preparations were prefixed with a 2-6% glutaraldehyde solution containing 2 mM $CaCl_2$ (pH 7.2 by 0.1 M cacodylate buffer). Then, they were postfixed in a 2% OsO4 solution (unbuffered), dehydrated with a graded series of ethanol, substituted by propylene oxide, and embedded in Quetol 812. Ultrathin sections of fixed specimens were cut on an Ultracut N ultramicrotome (Reichert, Vienna, Austria), and stained with uranyl acetate and/or lead citrate. Both stained and unstained sections were examined by using a transmission electron microscope (JEM2000EX: JEOL, Akishima, Tokyo, Japan).

To estimate the volume of sarcoplasmic reticulum (SR), digital electron micrograph images of BWM fibers were analyzed by the montage method[15-19] using image analysis software (Image J). Cross-sectional areas of a specified fiber on an electron micrograph and total cross-sectional area of all SR included in the specified fiber were measured in μm^2, and the fractional volume of SR, i.e. the total SR volume relative to the fiber volume was calculated based on the assumption that the value of the area is equivalent to the value of volume.

For cytochemistry to demonstrate the intracellular Ca localization and translocation during muscle contraction, the PA method[5-10] was applied. Preparations of BWM fiber bundles were fixed with 2% OsO_4 solution containing 2% potassium pyroantimonate (K-PA: $K[Sb(OH)_6]$), dehydrated with ethanol, and embedded in Quetol 812. Calcium in PA precipitates was identified in the sections without staining by using an energy dispersive X-ray microanalyzer (JEM1230 TEM with EX-14033JTP detector; JEOL, Akishima, Tokyo, Japan).

For immuno-electron microscopy to examine the existence of twitchin, relaxed preparations were fixed with 4% paraformaldehyde (pH 7.2 by 0.1 M phosphate buffer) and treated with 50 mM glycine solution (pH 7.2 by 0.1 M phosphate buffer) to neutralize the aldehyde groups. After dehydration with an ethanol series on ice or at -20℃ , they were embedded in Lowicryl K4M resin, and polymerized by illumination with ultraviolet light at -20 ℃ . Ultrathin sections treated previously with 20 mM glycine and 1% bovine serum albumin (BSA) were immunostained with anti-twitchin antibody (anti D2 antibody)[13,14], and further stained with 10 nm colloidal gold conjugated antibody. Immuno-stained sections stained further with or without uranyl acetate and lead citrate were examined by using an electron microscope (JEM2000EX; JEOL, Akishima, Tokyo, Japan).

Results

Mechanical properties

The muscle fiber bundles of the BW were caused contraction by increasing the external potassium concentration ([K]o). The mechanical response was tonic in character, as shown in typical examples of isometric tension records in Fig. 2. The mechanical threshold for isometric tension rise was approximately 20 mM K. The isometric contracture tension was related to the log of [K]o by an S shaped curve in the three types of BWM (Fig. 3). The peak tension reached its half-maximum at approximately 40-50 mM K, and full maximum at 200 mM K. Thus, the contracture induced by 200 mM of [K]o (abbreviation, 200K) was used as a control to examine the effects of drugs and ions on the potassium (K-) contracture. The response to [K]o was slightly different among the three types of BWM. The fiber bundle of

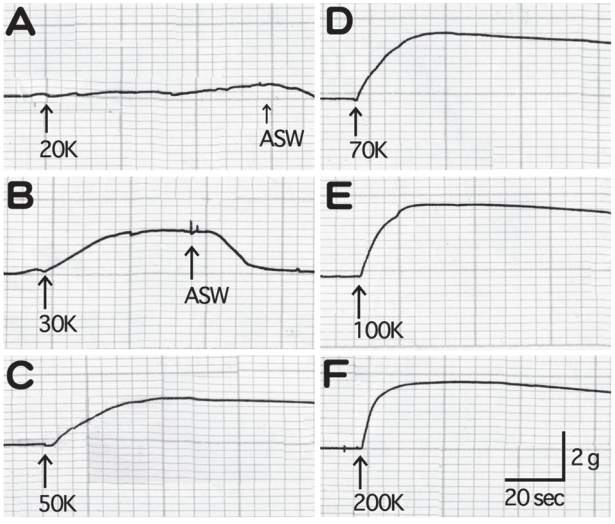


Fig. 2. Examples of the mechanical response to different values of high [K]o in ICBWM. A-F. Labels (20K, 30K, 50K, 70K, 100K, and 200K) indicate [K]o in mM.

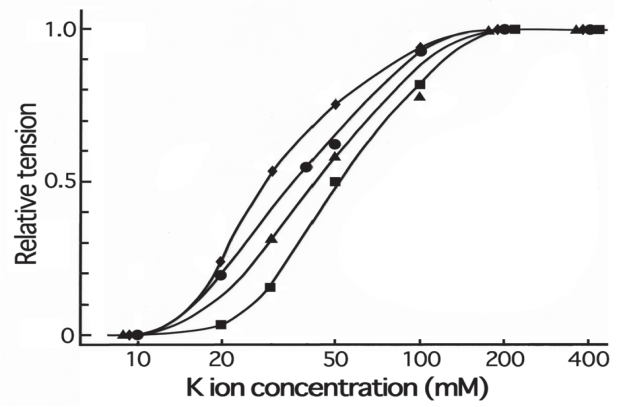


Fig. 3. Relationships between the peak tension of K-contracture and the external potassium concentration, showing S-shaped curves. Solid circles and diamonds for ICBWM, solid squares for LBWM, solid triangles for OCBWM. Solid diamonds indicate the curve in 20 mM Ca. Tension is expressed relative to the maximal tension. Abscissa indicates the logarithmic potassium concentration.

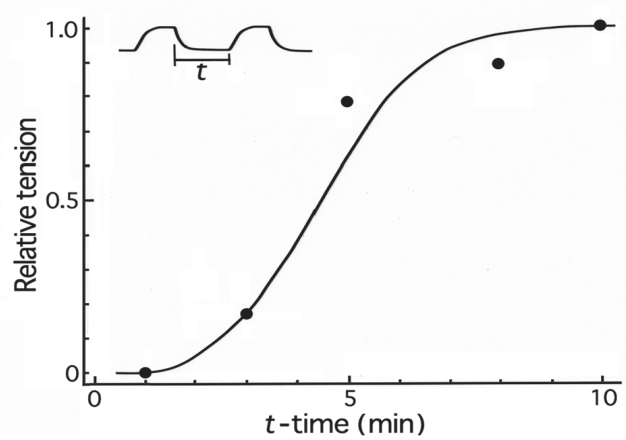


Fig. 4. Recovery of contractile ability in the K-contracture of ICBWM. The extent of recovery is expressed as the magnitude of the second (test) contracture, and t-time indicates the resting time in ASW between first (control) and second (test) contractures (see inset).

ICBWM was the most sensitive, whereas the fiber bundle of LBWM was the most insensitive to [K]o. When the external concentration of Ca ([Ca]o) was increased from 10 to 20 mM, the S-shaped curve for ICBWM was slightly shifted to a lower potassium concentration, with a decrease in the mechanical threshold.

The mechanical response induced by ACh (10^{-7} to 10^{-1} M) was also examined in ICBWN and LBWM, and a similar S-shaped curve demonstrated the relationship between isometric tension and ACh concentration, with a tension rise at 10^{-6} to 10^{-5} M and maximum tension at 10^{-3} to 10^{-1} M.

Prior to the experiments on factors influencing K-contracture, the recovery time of contractile ability in ASW following the first contracture (control contracture) with 200K was measured. As shown in Fig. 4, 10 min was sufficient for recovery. Thus, in this study, a resting time of 10 min was aaplied before the test contracture.

Factors influencing K-contracture

When Ca ions were removed from the external solution by preloading of Ca-free ASW for 10~20 min, the contracture tension in response to 200K was reduced by ~25% in ICBWM, and by 70~80% in LBWM and OCBWM (Fig. 5). As shown in Fig. 3, the K-contracture in ICBWM was slightly enhanced by increasing [Ca]o from 10 to 20 mM, with a decrease in the mechanical threshold.

In ICBWM, Mn and La ions reduced the tension to

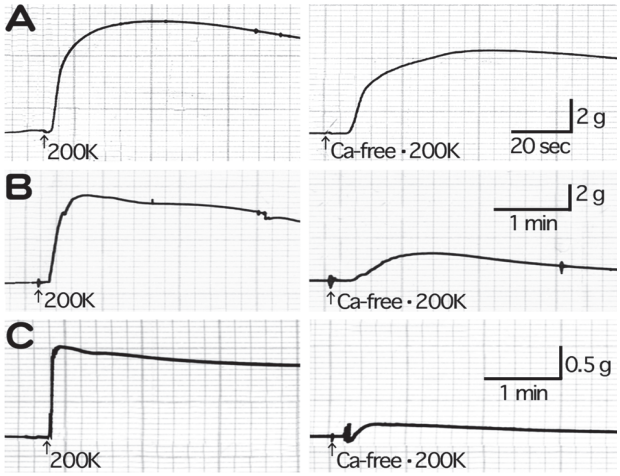


Fig. 5. Effects of Ca removal from external solution on the K-contracture. Contracture tension in ICBWM (A), in LBWM (B), and in OCBWM (C). Left records indicate control contractures and right records indicate test contractures.

approximately 75% of the maximum tension induced by the control contracture (Fig. 6A, B). Verapamil, a Ca-channel blocker, reduced the tension to 35~40% of the maximum contracture tension (Fig. 6C).

Mechanical responses induced by the release of intracellular Ca

After preloading of Ca-free solution containing 2 mM EGTA for 10-20 min, BWM fiber bundles developed a prolonged contracture tension when 1 mM caffeine was applied. The caffeine contracture tension was approximately 43% of the maximum K-contracture tension in ICBWM (Fig. 7A), although it was small, being approximately 1% of the maximum

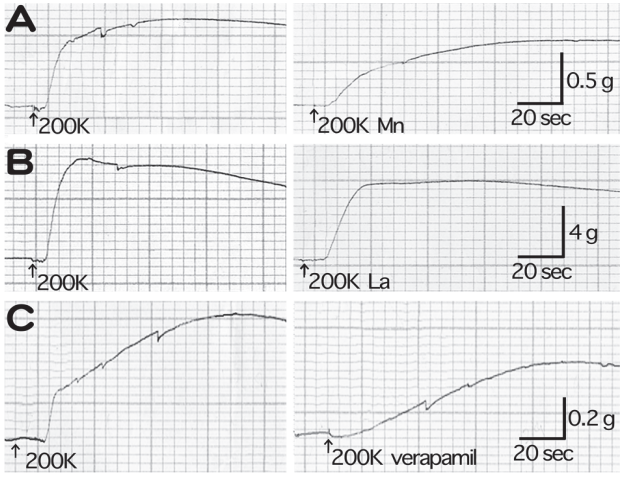


Fig. 6. Effects of Ca-influx interruption on the K-contracture in ICBWM. Development of contracture tension is repressed by the application of 10 mM Mn (A), 1 mM La (B), and 1 mM verapamil (C). Left records indicate control contractures and right records indicate test contractures.

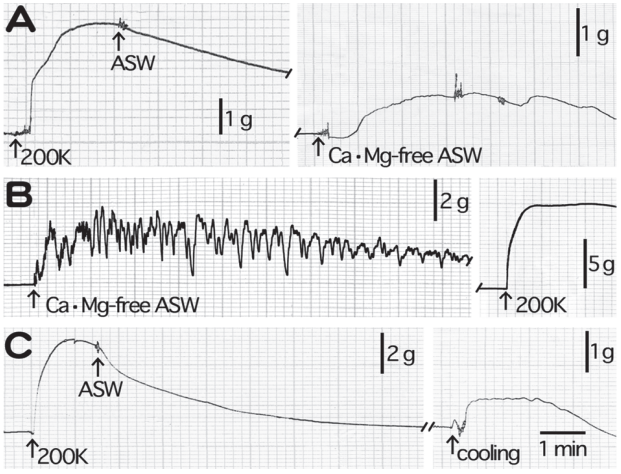


Fig. 8. Mechanical responses of BWM fiber bundles to factors causing intracellular Ca release. Mechanical responses to the application of Ca- and Mg-free solution (Ca・Mg-free ASW) in ICBWM (A) and LBWM (B), and to rapid cooling of ICBWM (C).

K-contracture tension in LBWM (Fig. 7B).

After recovery from the control K-contracture by soaking in ASW, Ca・Mg-free solution was applied (Fig. 8A, B). The BWM fiber bundles exhibited irregular or oscillatory development of tension, amounting to approximately 18% and 28% of the maximum K-contracture tension in ICBWM (Fig. 8A) and LBWM (Fig. 8B), respectively. On the other hand, when the fully restored ICBWM fiber bundles were rapidly cooled by changing the temperature of ASW from ~20 ℃ to 5-3 ℃ within 5-10 sec, a small contracture was induced (Fig. 8C). The rapid cooling contracture tension was approximately 20% of the maximum tension of control K-contracture observed at room temperature.

Fine structures of BWM fibers

Prior to electron microscopy, transverse thick sections of the body wall, stained with toluidine blue, were observed by a light microscope. As shown in Fig. 1B, the BW was constructed by three muscle layers, with a thickness of approximately 0.2, 0.35, and 0.08 mm for ICBWM, LBWM, and OCBWM, respectively. In these muscle layers, homogeneous muscle fibers were packed compactly.

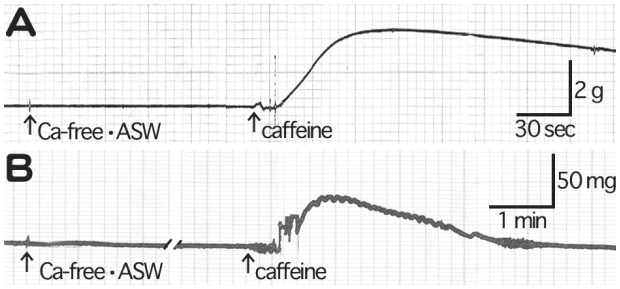


Fig. 7. Mechanical responses of BWM fiber bundles to caffeine (1 mM). After preloading of Ca-free ASW, contractures were induced by caffeine in ICBWM (A) and LBWM (B).

Transverse ultrathin sections revealed that the BWM fibers were uninucleated and unstriated muscle fibers of 5-15 μm in diameter, and contained thick (diameter, ~30 nm) and thin (diameter, ~7 nm) myofilaments (Fig. 9). The central region of myoplasm was occupied by these contractile elements. The sarcoplasmic reticulum (SR) consisted of vesicular elements in variable size and shape, and was localized exclusively near or beneath the plasma membrane. They frequently exhibited characteristic features of diads by forming junctions with the plasma membrane. As shown in Table 1, average values of fractional SR volumes relative to the fiber volume were 3.9% in ICBWM, 5.2% in LBWM, and 2.1% in OCBWM. Mitochondria were frequently found in the peripheral region of fibers and/or near the SR. Caveolae, plasma membrane invaginations, were not found in these muscle fibers. These structural features were common among muscle fibers of all three BWM layers.

Table 1. Fractional volumes of the SR relative to the fiber volume in body wall muscles of spoon worms

ICBWM	LBWM	OCBWM
3.9 ± 4.1	5.2 ± 3.0	2.1 ± 1.7
(n=14)	(n=11)	(n=12)

Values (%) are the mean±SD.

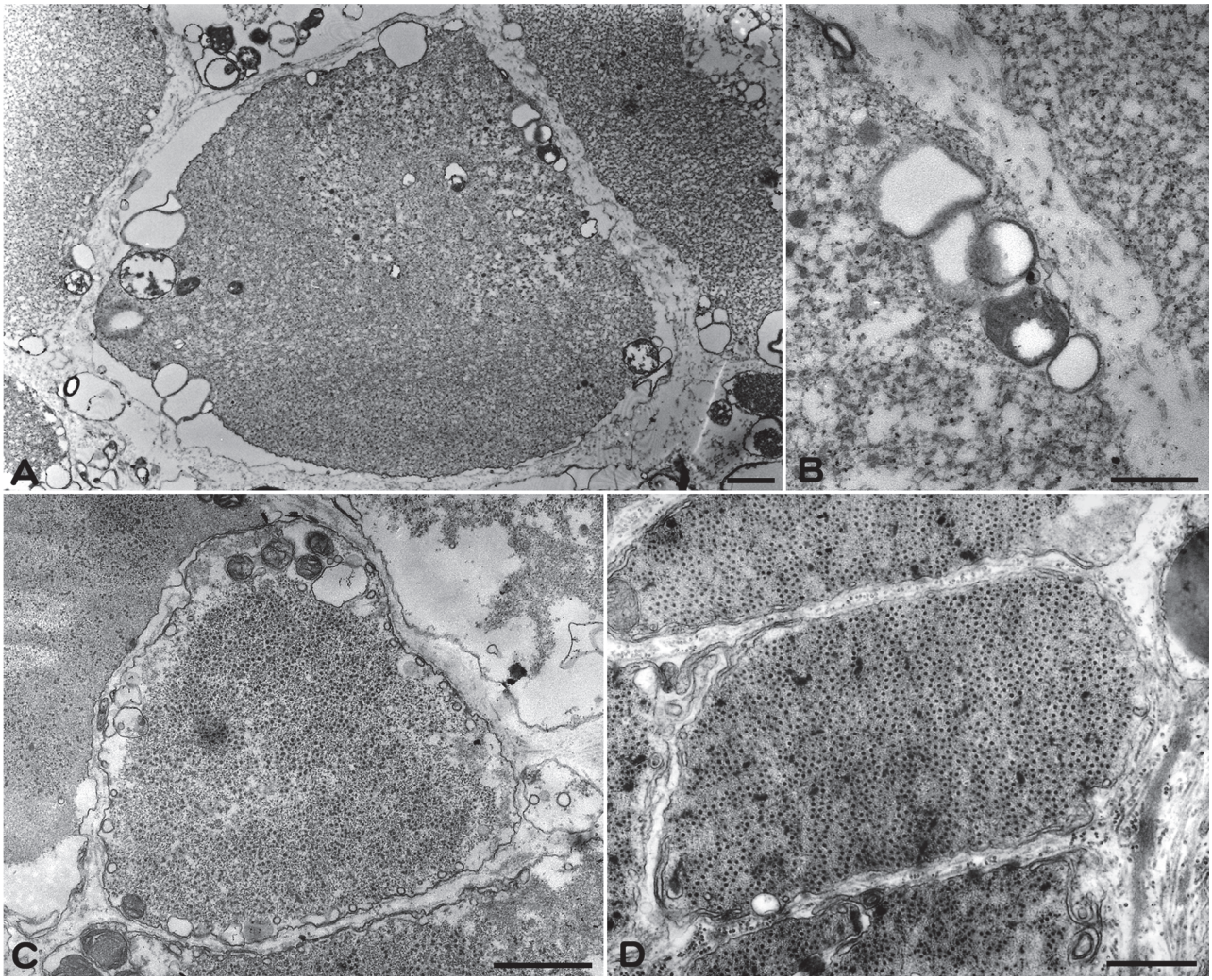


Fig. 9. Fine structures of BWM fibers. A. Transverse section image of ICBWM fibers, showing the localization of SR beneath the plasma membrane. B. Enlarged view of SR localization in Fig. 9A. C. Transverse section of LBWM fibers. D. Transverse section of OCBWM fibers. Scale bars, 1 μm (A, C, D) and 0.5 μm (B).

Intracellular Ca localization and translocation during contraction

Fiber bundles of BWM were chemically fixed with 2% OsO_4 solution containing 2% potassium pyroantimonate (PAOs) to demonstrate the intracellular Ca localization and translocation during muscle contraction. Isometric tension records during the course of cytochemical fixation are shown in Fig. 10. When the relaxed fiber bundles were fixed after the complete recovery in ASW, no significant increase in tension was observed in ICBWM (Fig. 10A), demonstrating successful fixation at the resting state. Similar tension records were obtained in LBWM and OCBWM. On the other hand, in fiber bundles of BWM contracted with 200K, the PAOs solution was applied near the peak of contracture tension (Fig. 10B-D). After the application of PAOs, the tension in the three types of BWM gradually decreased. How-

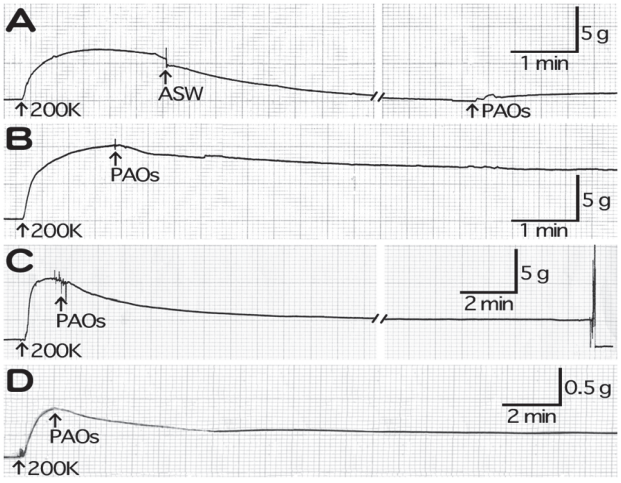


Fig. 10. Tension changes in BWM fibers during fixation with pyroantimonate-OsO4 (PAOs) solution. For the resting state, fibers were fixed after relaxation of a control K-contracture (A). For the contracting state, fibers were fixed at the tension peak of the control K-contracture (B, C, D). Typical records of ICBWM (A, B), LBWM (C), and OCBWM (D).

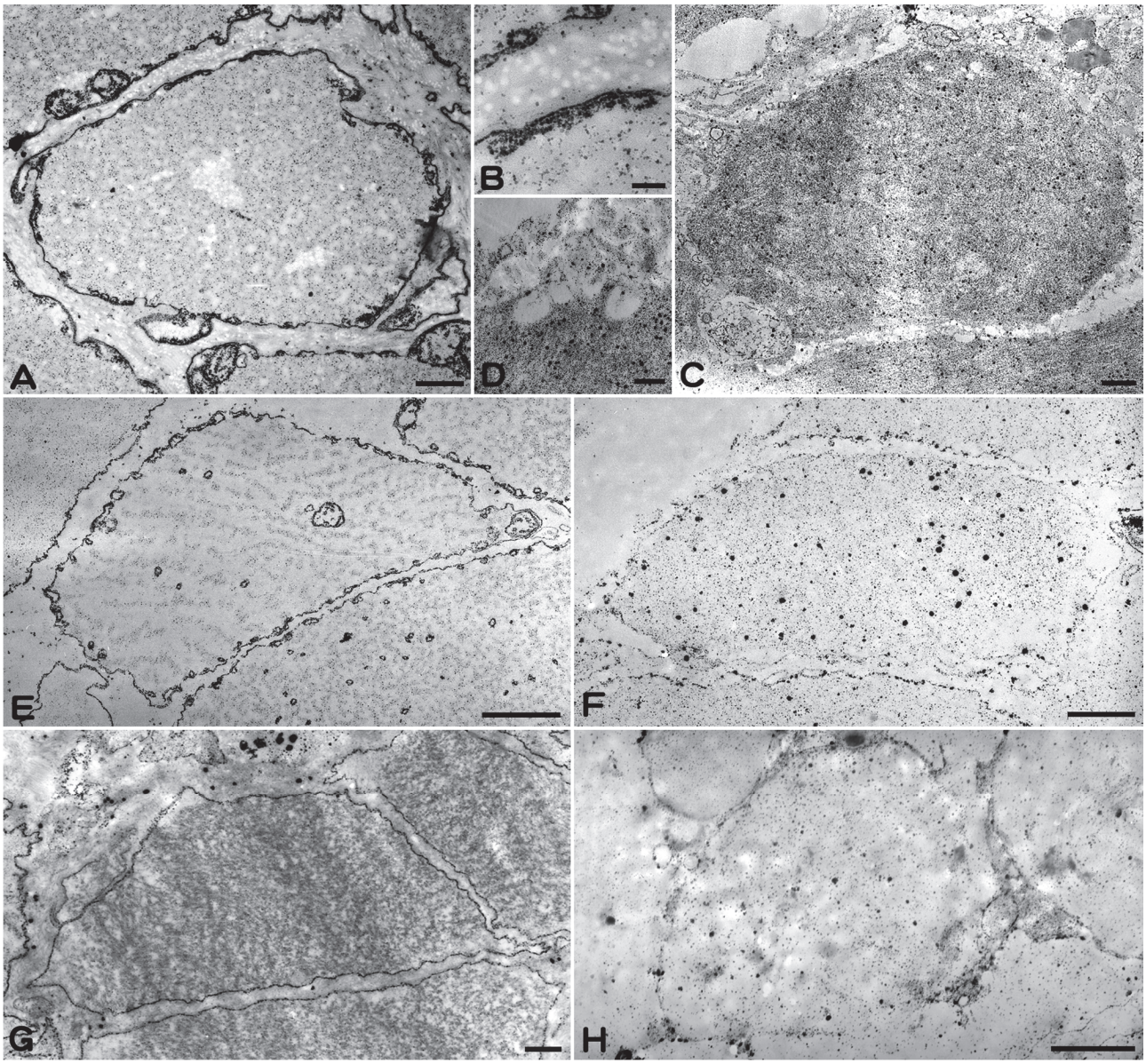


Fig. 11. Intracellular localization of electron-opaque PA precipitates in BWM fibers. A-D. Cross-sections of ICBWM fibers. E, F. Cross-sections of LBWM fibers. G, H. Cross-sections of OCBWM fibers. Precipitates are found exclusively at the peripheral region of resting fibers (A, E, G), whereas they are diffusely distributed in the myoplasm of contracting fibers (C, F, H). High-magnification view of ICBWM fibers reveals the localization of precipitates in the SR and along the inner surface of plasma membrane in the resting state (B), and the conspicuous decrease in precipitates in the peripheral region in the contracted state (D). Scale bars; 1 μm (A, C, E-H), 0.2 μm (B) and 0.5 μm (D).

ever, the tension was well maintained at a relatively higher level, demonstrating successful fixation in the contracted state.

In the resting state of all BWM fibers, electron-opaque PA precipitates were mainly found at the peripheral region of fibers (Fig. 11 A, E, G). Closer examination of the fiber periphery revealed that PA precipitates were located along the inner surface of the plasma membrane and SR limiting membrane (Fig. 11B). However, few or no precipitates were found in the central region of the myoplasm and extracellular space. On the other hand, in all BWM fibers fixed during K-contracture, PA precipitates were diffusely distributed in the central region of the myoplasm where myofilaments were packed closely (Fig. 11C, F, H). In contrast, PA precipitates conspicuously decreased at the inner surface of the plasma membrane and in the SR lumen, suggesting the intracellular movement of Ca to the central region of the myoplasm (Fig. 11D).

The electron-probe X-ray microanalysis was performed to confirm the existence of Ca in the PA precipitates. The X-ray spectra from the precipitates localized at the plasma membrane and the SR in the

resting fibers, and at the myoplasm in the contracting fibers always exhibited the most distinct peak at 3,620 eV (Fig. 12), considered to be a combination peak of antimonite and calcium (Sb-Ca)[4-7]. Relative concentration ratios of elements were calculated for the X-ray spectra obtained from the PA precipitates found in ICBWM fibers (Table 2), and indicated the existence of Ca in the PA precipitates.

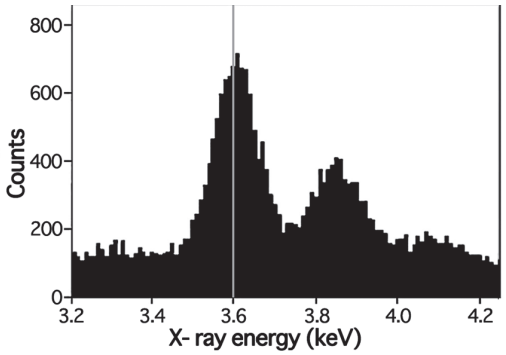


Fig. 12. A typical example of X-ray spectra obtained from the PA precipitates found in the SR of resting ICBWM fibers. The vertical gray line indicates the position of Sb-Lα emission at 3,600 eV. Note the distinct peak at 3,620 eV (Sb-Ca combination peak). Peaks of Sb-L$_{\beta 1}$ (3,840 eV) and SB-L$_{\beta 2}$ (4,100 eV) are also shown. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV (range 3.2 ~ 4.2 keV).

Immuno-electron microscopy on the existence of twitchin

As a preliminary examination to demonstrate the existence of twitchin in BWM of spoon worms, immuno-electron microscopy was performed. When transverse sections from fiber bundles of ICBWM were immuno-stained with anti-twitchin antibody, gold particles as markers of twitchin localization were noted on thick filaments (Fig. 13A). However, in the sections without immuno-staining of the primary anti-twitchin antibody, gold particles were not observed (Fig.13B). These results indicated a possibility that twitchin molecules exist on the thick filaments, as reported in *Mytilus* ABRM[14].

Discussion

The present physiological experiments demonstrated the similarity in the nature of potassium contracture between the BWM of spoon worms and different muscle types, i.e. vertebrate and invertebrate smooth muscles and frog skeletal muscles[20-22]. In these cases, the peak contracture tension was related to the log [K]o by an S-shaped curve (Fig. 3). In the BWM, however, the difference among the three types of muscles was reflected as a shift of the S-shaped curve in Fig. 3. This suggests that their response to [K]o is slightly different.

The development of K-contracture tension in all BWM fibers was repressed to a certain extent by the removal of external Ca (Fig.5), and in ICBWM fibers it was enhanced by the increase in [Ca]o (Fig. 3). Furthermore, in ICBWM fibers, K-contracture was repressed by Mn ions, La ions, and verapamil, which block Ca influx in excitable membranes[23], and vertebrate and invertebrate smooth muscles[6, 9, 22, 25]. These results indicate that activator Ca of BWM is partially supplied from the external solution.

On the other hand, in Ca-free ASW, caffeine induced contraction in BWM (Fig. 7). It is well known that caffeine causes contraction in various skeletal and smooth muscles as a result of Ca release from the SR[22, 25, 26]. In addition, ultrastructural observations and image analyses revealed that the BWM fibers contained a large number of vesicular SR forming diads with the plasma membrane (Fig. 9),

Table 2. Relative concentration ratios of elements in the pyroantimonate precipitate in the ICBWM fibers of spoon worms

Element-line	Relative concentration ratios		
	Resting fibers		Contracting fibers
	Plasma membrane (n=15)	Sarcoplasmic reticulum (n=15)	Myoplasm (n=30)
Sb-Lα	1.000	1.000	1.000
Ca-Kα	0.063 ± 0.025	0.061 ± 0.016	0.030 ± 0.015
K-Kα	0.016 ± 0.011	0.023 ± 0.013	0.040 ± 0.016
Mg-Kα	0.008 ± 0.006	0.012 ± 0.009	0.011 ± 0.004
Na-Kα	0.000	0.000	0.001 ± 0.004

Values are the mean±SD (n=12).

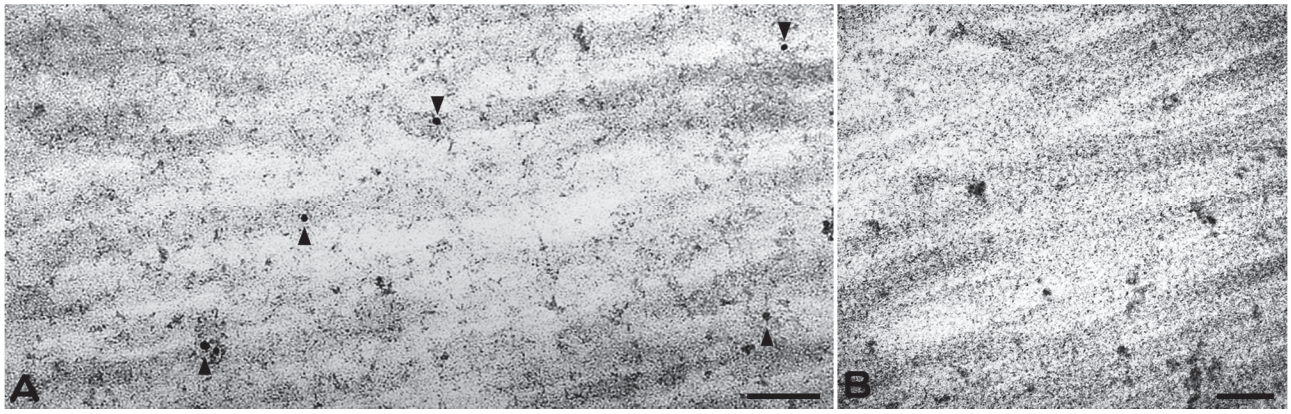


Fig. 13. Immuno-electron microscopy. A. Electron micrograph of a section immuno-stained with anti-twitchin antibody, showing antibody-conjugated gold particles (arrow heads) located on the surface of thick filaments. B. Electron micrograph of a section without the primary anti-twitchin antibody. Scale bars, 200 nm (A) and 100 nm (B).

and its fractional volume was relatively high (Table 1). Thus, the present results suggest that activator Ca is partially supplied from the SR.

When Ca and Mg ions were removed from the external solution, the BWM exhibited irregular or oscillatory contraction (Fig. 8). Such mechanical responses closely resemble those observed in invertebrate smooth muscles[4, 6, 17, 25], and may be caused by activator Ca released from the inner surface of the plasma membrane when it becomes unstable due to the lack of divalent cations. Thus, there may be the second intracellular Ca-accumulating structure in BWM, i.e. the inner surface of the plasma membrane.

Cytochemical experiments demonstrated that, in the BWM fibers, the PA precipitates were mostly localized in the SR and along the inner surface of the plasma membrane at the resting state, whereas, concomitantly with the disappearance of precipitates from these structures, they were diffusely distributed in the central region of the myoplasm at the contracting state. In cytochemical observations, no difference was found among the three types of BWM fibers. In addition, the X-ray microanalysis of PA precipitates observed in resting and contracting fibers revealed that they contain Ca. These results are consistent with those of previous studies on Ca localization and translocation during mechanical activity in vertebrate and invertebrate smooth muscles by the PA method[4-10]. Therefore, in BWM fibers, Ca accumulated in the SR and inner surface of the plasma membrane may be released into the myoplasm to cause contraction during mechanical activity. As demonstrated by the physiological experiments, activator Ca may also be supplied from the external solution via Ca influx.

Acknowledgments

The authors express their hearty thanks to Dr. Eigoro Tazawa and Professor Akiya Hino (Kanagawa University) for suggesting the use of body wall muscles of spoon worms for studies on the regulatory mechanism of Ca in smooth muscles.

References

1) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. Prog. Biophys. mol. Biol. 18: 123-183.
2) Muneoka Y and Kamura M(1982) Actions of noradrenaline and some other biogenic amines on the body-wall muscles of an echiuroid, Urechis unicinctus. Comp. Biochem. Physiol. 72C: 281-287.
3) Muneoka Y, Ichimura Y and Kanno Y(1981) Mechanical responses of the body wall strips of an echiuroid worm, Urechis unicinctus, to electrical stimulation, cholinergic agents and amino acids. Comp. Biochem. Physiol. 69C: 171-177.
4) Atsumi S and Sugi H (1976) Localization of calcium-accumulating structures in the anterior byssal retractor muscle of Mytilus edulis and their role in the regulation of active and catch contraction. J. Physiol. 257: 549-560.
5) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of Dolabella auricularia. Ⅱ. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-478.
6) Suzuki S (1982) Physiological and cytochemical studies on activator calcium in contraction by smooth muscle of a sea cucumber, *Isostichopus badionotus. Cell Tiss. Res.* **222**: 11-24.
7) 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.

8) Iwamoto H, Suzuki S and Mizobe H (1988) Regulatory mechanism of contraction in the proboscis retractor muscle of a sipunclid worm, *Phascolosoma scolops*. *Cell Tiss. Res*. **253**: 15-21.
9) Suzuki S and Sugi H (1989) Evidence for extracellular localization of activator calcium in dog coronary artery smooth muscle as studied by the pyroantimonate method. *Cell Tiss. Res*. **257**: 237-246.
10) Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryosections. *Histochemistry* **92**: 95-101.
11) Twarog BM (1976) Aspects of smooth muscle function in molluscan catch muscle. *Physiol. Rev*. **56**: 829-838.
12) Siegman MJ, Funabara D, Kinoshita S, Watabe S, Hartshorne DJ and Butler TM (1998) Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5383-5388.
13) Funabara D, Kinoshita S, Wastabe S, Siegman MJ, Butler TM and Hartshorne DJ (2001) Phosphorylation of molluscan twitchin by the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **40**: 2087-2095.
14) Funabara D, Hamamoto C, Yamamoto K, Inoue A, Ueda M, Osawa R, Kanoh S, Hartshorne DJ, Suzuki S and Watabe S (2007) Unphosphrylated twitchin forms a complex with actin and myosin that may contribute to tension maintenance in catch. *J. Exp. Biol*. **210**: 4399-4410.
15) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol*. **25**: 209-231.
16) Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol*. **52**: 690-718.
17) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc*. **52**: 337-347.
18) Aoki Y, Marumo S, Nishikata H, Kozuka M, Fukada M, Koura N, Hayatsu M and Suzuki S (2015) Ultrastructural changes and intracellular ion movements in tertiary pulvinous cells during the seismonastic response of *Mimosa pudica L. Sci. J. Kanagawa Univ*. **26**: 53-69.
19) Ito S, Ono M, Hirose Y, Watanabe N, Maeda N, Utagawa C, Marumo S, Shimozono N, Shiozawa T, Ito S, Hayatsu M and Suzuki S (2018) Stuructural changes and intra- and extracellular ion movements in motor cells during the insectivorous leaf closure of Venus flytrap. *Sci. J. Kanagawa Univ*. **29**: 55-63.
20) Hodgkin AL and Horowicz P (1960) Potassium contractures in single muscle fibers. *J. Physiol. Lond*. **153**: 386-403.
21) Sugi H and Suzuki S (1978) The nature of potassium- and acetylcholine-induced contractures in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol*. **61C**: 275-279.
22) Sugi H, Suzuki S, Tsuchiya T, Gomi S and Fujieda N (1982) Physiological and ultrtastructural studies on the longitudinal retractor muscle of a sea cucumber *Stichopus japonicus*. I. Factors influencing the mechanical response. *J. exp. Biol*. **97**: 101-111.
23) Hagiwara E and Nakajima T (1966) Difference in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and manganese ions. *J. Gen. Physiol*. **49**: 793-806.
24) Van Breeman C, Farinas BR, Casteels R, Gerba P, Wuytack F and Deth R (1973) Factors controlling cytoplasmic Ca^{2+} concentration. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **265**: 57-71.
25) Sugi H and Suzuki S (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. I. Mechanical response and ultrastructure. *J. Cell Biol*. **79**: 454-466.
26) Weber A and Herz R (1968) The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol*. **52**: 750-759.

Science Journal of Kanagawa University **31** : 11-14 (2020)

■ Full-Length Paper ■

Cytochemical Study on the Intracellular Calcium Translocation during the Contraction-Relaxation Cycle in Scorpionfish Swimbladder Muscles

Suechika Suzuki[1, 3] and Chieko Hamamoto[1,2]

[1] Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Present Address : Application and Research Group, Optic Division, JEOL Ltd., Akishima City, Tokyo 196-8558, Japan
[3] To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To establish the intracellular Ca translocation during the contraction-relaxation cycle in the swimbladder muscle (SBM) of a scorpionfish *(Sebastiscus marmoratus)*, a cytochemical study using a pyroantimonate (PA) method was performed. In the resting state, PA precipitates cytochemically indicating the presence of Ca were found only in the terminal cisternae (TC) of the sarcoplasmic reticulum (SR). On the other hand, during caffeine-induced contractures, the number of PA precipitates remarkably decreased in the TC, and they appeared newly in the myoplasm, distributed diffusely around myofibrils. During the recovery period, after the onset of relaxation from the caffeine-induced contracture, PA precipitates disappeared in the myoplasm, and were newly found in fenestrated collars (FC) and longitudinal tubules (LT) of the SR. Later, in the fully relaxed fibers after tetanus, PA precipitates were again found mainly at the TC. These results supported our previous view that Ca^{2+} released from the TC during contraction is first taken up mainly by the FC and the LT during the relaxation, and then gradually returns to the TC by passing through the SR lumen.
Keywords: intracellular Ca translocation, contraction-relaxation cycle, sarcoplasmic reticulum, scorpionfish swimbladder muscle, pyroantimonate method

Introduction

It is well known that the contraction-relaxation cycle of muscles is regulated by the change in the myoplasmic Ca concentration[1)]. In vertebrate skeletal muscles, the Ca concentration change is caused by its release and uptake by the sarcoplasmic reticulum (SR)[1)]. However, the process of intracellular Ca translocation during the contraction-relaxation cycle has not been investigated in detail.

Using ^{45}Ca autoradiography, Winegrad[2)] first demonstrated the change of intracellular Ca distribution during the contraction-relaxation cycle in frog skeletal muscles, and proposed that Ca ions are released at the terminal cisternae (TC) of the SR during the contraction, taken up at the longitudinal tubules (LT) of the SR during relaxation, and transported slowly to the TC during the recovery period. However, based on electron probe X-ray microanalysis of cryosections in frog muscle fibers frozen at rest, during and after tetanus, Somlyo and colleagues[3)] claimed that, during relaxation, released Ca ions are again taken up directly into the TC, but not into the LT. To clarify the above discrepancy, the authors examined the process of intracellular Ca translocation during the contraction-relaxation cycle by electron probe X-ray microanalysis of cryosections of scorpionfish swimbladder muscles (SBM), and revealed that the Ca ions released from the TC are taken up at the LT and fenestrated collars (FC) of the SR, and transported to the TC by passing through the SR lumen during the recovery period from muscle contraction[4)]. To further confirm and support the previous studies, in the present study, the authors examined

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

intracellular Ca translocation during the contraction-relaxation cycle of SBM fibers by using the potassium pyroantimonate (PA) method, an excellent cytochemical method to evaluate intracellular Ca translocation[5, 6].

Materials and Methods

The procedure to prepare the SBM of adult scorpionfishes, *Sebastiscus marmoratus*, was previously described in detail[7]. Briefly, the muscle bundle of 3 - 5 fibers with tendons was dissected from the posterior part of the SBM in Ringer's solution. Muscle bundles were mounted horizontally in an acrylic chamber filled with Ringer's solution; one end of the muscle bundle was clamped, and the other was connected to a strain gauge to monitor the isometric force before and during fixation. For conventional electron microscopy, the muscle bundles were fixed with a 2.5% glutaraldehyde solution and postfixed with a 2% osmium tetroxide (OsO_4) solution. For cytochemical electron microscopy, they were fixed with a 1% osmium tetroxide solution containing 2% potassium pyroantimonate (PAOs solution; pH adjusted to 7.2 by 0.01 N CH_3COOH/0.1 N KOH) at the resting state, during the caffeine contracture induced by application of Ringer's solution containing 2 mM caffeine, during relaxation, and at the fully relaxed state after the contracture. Several fiber bundles were fixed with PAOs solution just after tetanus caused by electrical stimulation using a supramaximal AC current (100 Hz).

Small pieces were cut from the middle region of SBM fibers fixed by conventional or cytochemical methods. They were then dehydrated with a graded series of ethanol, substituted with propylene oxide, and embedded in Quetol 812 epoxy resin. Ultrathin sections were cut longitudinally on ultramicrotomes (Porter- Blum MT-2 or Reichert Ultracut-N), stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a transmission electron microscope (JEM2000 or JEM1230: JEOL). For elemental identification of PA precipitates, unstained sections were analyzed with an energy dispersive X-ray microanalyzer (Tracor Northern TN5450 or JEOL EX-14033JTP). X-ray emission was collected over a detection time of 200 sec.

Results and Discussion

Ultrathin sections cut longitudinally from the middle region of SBM fibers fixed with glutaraldehyde and OsO_4 were observed by electron microscope. A single SBM fiber was previously reported to contain two types of triadic contacts, the AI-type triad in the fiber middle and the Z-type triad in both fiber ends[7, 8]. Therefore, in the present study, the fibers treated with conventional fixatives exhibited only AI-type triads (Fig. 1). Triadic contacts composed of TC and a transverse tubule (T tubule) were located around the level of the boundary between the A- and I-bands of sarcomeres. Between triadic contacts, FC of the SR were observed around the level of the M-band and Z-band. Furthermore, the LT of the SR were clearly observed around the level of the overlap zone of A-bands, although it was difficult to confirm the LT around the I-band due to the short length between two TC in that SR unit.

Structural features of T-SR systems constructed with T tubules and the SR were naturally held in the SBM fibers fixed cytochemically with PAOs solution, although membranes and myofilaments were unclear because glutaraldehyde as a protein fixative was not used and conventional electron staining was not performed. In the fibers fixed at the resting state, electron-opaque PA precipitates were found in the SR, especially at the TC (arrows in Fig. 2A), and at the N-line of the sarcomeres (Fig. 2A). Similar localization of PA precipitates at the N-line was reported previously in the resting fibers of frog skeletal muscle[9-11]. In contrast to the resting state, in the SBM fibers fixed cytochemically during the caffeine-infduced contracture, the number of PA precipitates conspicuously decreased in the TC, but were diffusely distributed in the A-band region (Fig. 2B). These results suggest that Ca ions stored in the TC are released into the myoplasm to activate the contractile elements of sarcomeres during mechanical activity of SBM fibers. On the other hand, at the N-line of sarcomeres, there was no change in the distribution of PA precipitates, suggesting no correlation with the contraction-relaxation cycles. In the SBM fibers fixed during relaxation after the caffeine-induced contracture, PA precipitates were found not only in the TC, but also in the FC (arrow in Fig. 2C) and LT (Fig. 2C), reflecting Ca re-uptake into the SR. In the SBM fibers fixed at the fully relaxed state after

Fig. 1. Conventional electron micrograph of a longitudinal section obtained from the middle region of a SBM fiber, showing sarcomeres and T-SR system including AI-type triads. Arrows indicate T-tubules. Scale bar, 1 μm.

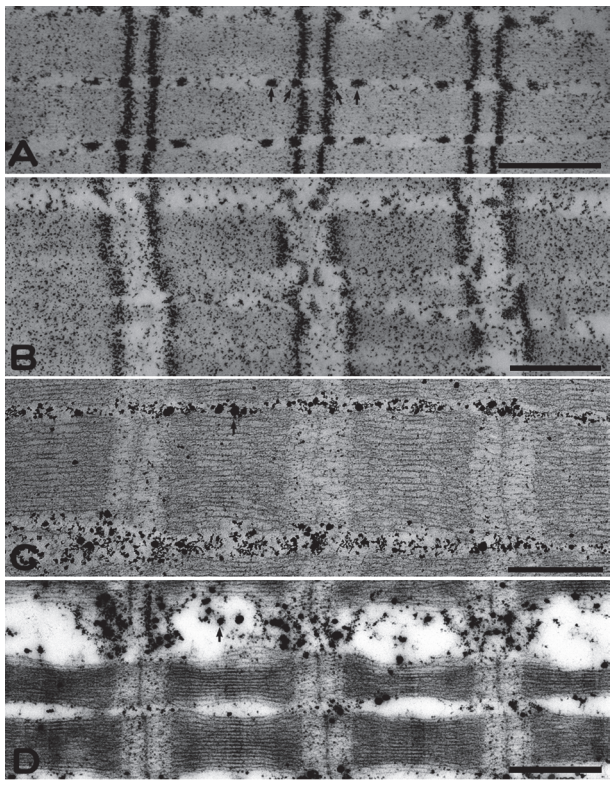


Fig. 2. Intracellular Ca translocation during the contraction-relaxation cycle of scorpionfish SBM fibers, demonstrated by the cytochemical PA method. A. Resting fibers, showing the localization of PA precipitates mainly in the TC of the SR (arrows). B. Fibers fixed during caffeine-induced contracture, showing that PA precipitates disappeared from the TC, and appeared around the sarcomeres. C. Fibers fixed during relaxation from caffeine-induced contracture, showing that PA precipitates disappeared around the sarcomeres, and appeared in the FC (arrow), LT, and TC of the SR. D. Fibers fixed at the fully relaxed state after the contraction induced by electrical stimulation, showing the localization of PA precipitates mainly in the TC. Scale bars, 1 μm.

isometric tetanus induced by electrical stimulation, PA precipitates were found exclusively around the TC, but not around the FC or LT (Fig. 2D). This

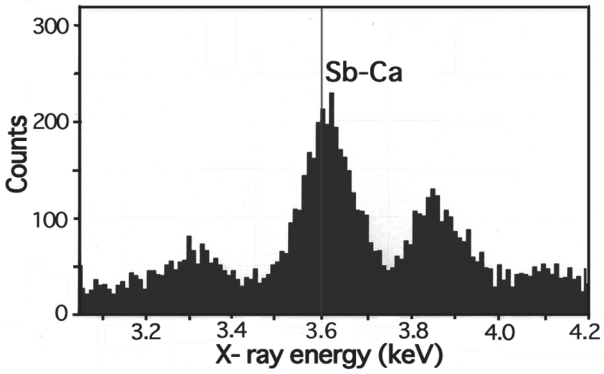


Fig. 3. A typical example of X-ray spectra from PA precipitates found in the SR of resting SBM fibers. The vertical gray line indicates the position of Sb-Lα emission at 3,600 eV. Note the distinct peak at 3,620 eV (Sb-Ca combination peak). Peaks of Sb-Lβ1 (3,840 eV) and SB-Lβ2 (4,100 eV) are also shown. The ordinate indicates the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV (range 3.05 ~ 4.20 keV).

suggest that, during the course of relaxation, Ca ions pumped up to the regions of the FC and LT are transferred to the TC through the SR lumen. During and after relaxation, no PA precipitates were distributed around the N-line (Fig. 2C and D).

X-ray microanalysis was performed to demonstrate that PA precipitates are composed of PA and Ca, and closely reflect the Ca distribution. The X-ray spectra obtained from PA precipitates in the SBM fibers fixed at different states of the contraction-relaxation cycle exhibited a distinct spectral peak at 3,620 eV (Fig. 3), a combination peak of antimonite and calcium (Sb-Ca)[5-7]. Based on the X-ray spectra, relative concentration ratios of elements were calculated (Table 1), confirming the presence of Ca in PA precipitates.

It is difficult to explain the PA precipitate distribution around the N-line. Although PA precipitates were reported to disappear during contraction of frog skeletal muscles in previous studies[9, 10], such a distribution change of PA precipitates was not observed in the present study. Furthermore, the localization of PA precipitates around the N-line was not noted during muscle relaxation. It is therefore unlikely that PA precipitates observed around the N-line are correlated with intracellular Ca translocation during the contraction-relaxation cycle in SBM muscles.

In conclusion, the present study supports the previous view[4] that Ca ions released into the myoplasm from the TC during contraction are taken up mainly by the FC and the LT, and then transported to the TC during and after relaxation, passing through the SR lumen.

Table 1. Elemental concentration ratios of pyoroantimonate precipitates found in the fibers at different physiological states during the contraction-relaxation cycle of scorpionfish swimbladder muscles

Physiological state	Structure**	Elemental concentration ratio*				
		Sb-Lα	Ca-Kα	K-Kα	Mg-Kα	Na-Kα
Resting	SR-TC	1.00	0.27 ± 0.04	0.34 ± 0.08	0.05 ± 0.03	0.08 ± 0.05
	A-band	1.00	0.25 ± 0.10	0.33 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.57 ± 0.27
Caffeine contracture	SR-TC	1.00	0.18 ± 0.11	0.42 ± 0.08	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.05
	A-band	1.00	0.11 ± 0.07	0.45 ± 0.10	0.10 ± 0.09	0.13 ± 0.12
Post caffeine contracture	SR-TC	1.00	0.39 ± 0.10	0.20 ± 0.06	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.02
	SR-FC	1.00	0.24 ± 0.09	0.25 ± 0.05	0.07 ± 0.06	0.06 ± 0.03
Post tetanus	SR-FC	1.00	0.18 ± 0.13	0.27 ± 0.10	0.01 ± 0.02	0.21 ± 0.04

* mean ± S.D., n=10.

**TC-SR: terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum (SR), SR-FC: fenestrated collars of the SR.

References

1) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. mol. Biol.* **18**: 123-183.
2) Winegrad S (1968) Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus. *J. Gen. Physiol.* **51**: 65-83.
3) Somlyo AV, Gonzaletz-Serratos H, Shuman H, McClellan G and Somlyo AP (1981) Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticumum of tetanized muscle: an electron-probe study. *J. Cell Biol.* **90**: 577-594.
4) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocation during the contractionrelaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**: 1093-1099.
5) 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.
6) Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryosections. *Histochemistry* **92**: 95-101.
7) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
8) Suzuki S (2009) Electron microscope techniques for the research in muscle physiology. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **20**: 305-309.
9) Yarom R and Meiri U (1971) N lines in striated muscle: a site of intracellular Cs^{2+}. *Nature New Biol.* **234**: 254256.
10) Yarom R and Meiri U (1972) Ultrastructural cation precipitation in frog skeletal muscle. *J. Ultrtastruct. Res.* **39**: 430-442.
11) McCallister LP and Hadek R (1973) The localization of calcium in skeletal muscle: Its distribution in muscle in which the caffeine-induced contracture was arrested. *J. Ultrtastruct. Res.* **45**: 59-81.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：15-20 (2020)

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

Epigenetics of Vascular Formation during Zebrafish Hindbrain Development

Misato Fujita[1,2] and Susumu Izumi[1]

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

[2] To whom correspondence should be addressed. E-mail: fujita-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The brain circulatory system is essential for the survival and development of the central nervous system in all vertebrates. Brain vessels form in a reproducible and evolutionarily conserved manner. In zebrafish, hindbrain vessels develop independently of the shear stress of blood flow but are regulated genetically. Epigenetics is another regulatory system regulating gene activation, but the epigenetic contribution to angiogenesis remains unclear. Here, we examine expression patterns of genes involved in SET1/mixed lineage leukemia (MLL) histone methyltransferase complexes. All mRNAs we tested as orthologs of molecules in the MLL complex were expressed throughout the central nervous system, including the hindbrain. We also show immunofluorescent staining of retinoblastoma-binding protein 5 (RBBP5) protein in the dorsal hindbrain, suggesting the possibility of differences in epigenetic state along the dorsal-ventral axis. Finally, we demonstrate histone methylation with non-methylated, dimethylated, and trimethylated types.

Keywords: zebrafish, hindbrain, angiogenesis, histone methylation

Introduction

Brain vascular development is a topic of intensive study. A thorough knowledge of the developmental biology of brain vessel formation is important for understanding both development of the central nervous system and cerebrovascular pathologies. Examination of the vascular anatomy of the developing zebrafish embryo reveals an initial vascular plan that is well conserved among other developing vertebrates, including humans[1)]. This conservation extends to the brain vasculature. A previous report found that in zebrafish embryos, angiogenic sprouting and invasion into the hindbrain parenchyma as hindbrain central arteries (CtA) occurs between 30 and 60 hours post fertilization (hpf)[2)]. During this stage, the dorsal hindbrain has no blood vessel. However, regional differences of the dorsal-ventral axis during vascularization have not yet been examined in detail in zebrafish or any other vertebrate model organism.

Epigenetics refers to a gene regulatory system based on DNA modifications that do not depend on the nucleotide sequence. Epigenetic regulation affects gene activity via chemical modification of histones, such as acetylation, methylation, and phosphorylation, as well as DNA methylation[3-7)]. It has been reported that epigenetic abnormalities are involved in various diseases, and that epigenetic regulation contributes significantly to ontogeny and cell differentiation[8-12)].

The retinoblastoma-binding protein 5 (RBBP5) protein is a nuclear protein 66 kD in size that binds to underphosphorylated retinoblastoma proteins[13)]. RBBP5 is also known as a component of the mammalian SET1A/SET1B histone H3-Lys methyltransferase complex[14)]. The SET1A/SET1B complex, also known as the mixed lineage leukemia (MLL) complex, is a methyltransferase that catalyzes the methylation of lysine 4 (H3K4) of histone 3. MLL proteins do not show catalytic activity by themselves, but when its catalytically active domain (SET, Su(var.)3-9, enhancer of zeste and trithorax), present at the C-terminal end, binds to WD repeat-containing protein 5 (WDR5), RBBP5, ASH2 like (ASH2L), and DPY30, the complex then exhibits

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

methylation activity[15, 16].

Mutations in the MLL gene are present in 5% to 10% of all cases of acute leukemia, and in an even larger proportion of infant cases. Similarly, in zebrafish, MLL genes have been reported to be important in hematopoiesis[17-19]. Zebrafish MLL1 is also involved in neurogenesis and brain tumor pathways, including neural progenitor cell proliferation, neural cell differentiation, and glial cell differentiation[20].

In this study, we examined the expression pattern of serial genes and proteins related to histone H3 methylation, and observed the methylated condition of histones during hindbrain angiogenesis.

Materials and Methods

Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos were obtained from the natural spawning of laboratory lines. Embryos were raised and fish were maintained as described[21, 22]. Zebrafish used were from the EK wildtype line and the *Tg(fli1a:EGFP)*^{y1} transgenic line [23]. For imaging, embryos were treated with 1-phenyl-2-thiourea (PTU) to inhibit pigment formation[22].

Whole-mount in situ hybridization

DIG-labeled anti-sense riboprobes were synthesized using the DIG labeling kit (Roche, Indianapolis, IN). Antisense mRNA probes used were: *kmt2a (mll)*[17, 24], *kmt2d (mll2)*[24], *kmt2ba (mll4a)*[24], *kmt2bb (mll4b)*[24], *kmt2ca (mll3a)*[24], *kmt2cb (mll3b)*[24], *kmt2e (mll5)*[24], *ash2l*[19], *dpy30*[25], *wdr5*[19], *rbbp5*[26], and *kdrl*[27]. Embryos were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4 ℃ . Signals were detected with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibody and BM Purple substrate (Roche).

Immunostaining

Embryos were fixed with 100% methanol for at least two days at -20℃ and were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. Blocking was performed with Blocking Reagent (Roche). Primary antibodies (dilution 1:200) used were: mouse anti-human Histone H3 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #304-34781), mouse anti-human dimethyl Histone H3K4 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #304-34801), rabbit anti-human trimethyl Histone H3K4 (Cell Signaling Technology, #9751), and rabbit anti-RBBP5 (Cell Signaling Technology, #13171). Mouse anti-chicken myosin heavy chain (Developmental Studies Hybridoma Bank, MF20) was used as a positive control at a dilution of 1:200. Secondary antibodies (dilution 1:2000) used were: 555 anti-mouse IgG (Invitrogen, #A28180) and 555 anti-rabbit IgG (Invitrogen, #A27039).

Microscopy

RNA in situ hybridization images were captured with a DFC450C camera mounted on a Leica MZ10F stereomicroscope (LEICA). Confocal microscopy of immunostained embryos was performed using a LSM700 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss).

Results

MLL genes are expressed in the hindbrain

To explore the molecular profile of hindbrain development, we examined the distribution of *MLL* gene mRNAs by whole-mount RNA in situ hybridization. At around 36 hpf, CtA elongates and increases within each rhombomere[2] and histone methylation could affect this vascularization. During this CtA formation, seven *mll* genes, including *kmt2a/mll*, *kmt2d/mll2*, *kmt2ba/mll4a*, *kmt2bb/mll4b*, *kmt2ca/mll3a*, *kmt2cb/mll3b*, and *kmt2e/mll5* are expressed in the forebrain, midbrain, midbrain-hindbrain boundary, and hindbrain (Fig. 1A-G). In the hindbrain, these genes showed stronger expression in the dorsal area (indicated by arrowheads in Fig. 1A). In addition, other genes involved in the MLL complex, including *ash2l*, *dpy30*, *wdr5*, and *rbbp5*, were expressed in the central nervous system (Fig. 1H-K). The vascular endothelial cell marker kdrl was expressed in blood vessels and elongating CtA was detected in the ventral half at 36 hpf (Fig. 1L).

RBBP5 protein is localized in the dorsal hindbrain

Since the dorsal-most area of the hindbrain is avascular by 60 hpf[2], we focused on *rbbp5*, which showed obvious differences between dorsal and ventral areas. In order to see the expression patterns of the RBBP5 protein, we carried out whole-mount immunofluorescent staining. First, we investigated the cross-reactivity of anti-RBBP5 antibody on zebrafish embryos. The antibody from Cell Signaling Technol-

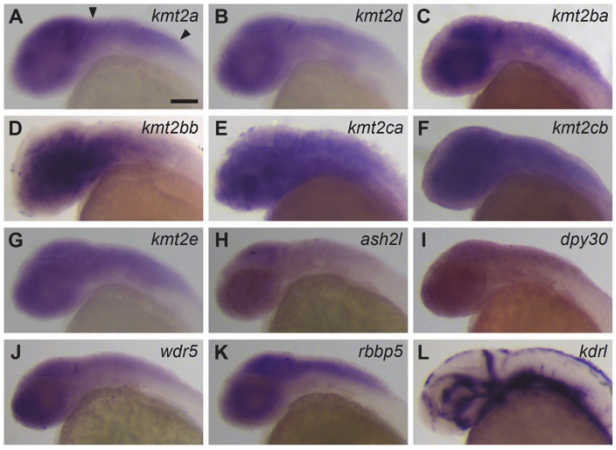


Fig. 1. Expression patterns of MLL genes. Whole-mount in situ hybridization of 36 hpf wild-type zebrafish embryos, probed for *kmt2a* (A), *kmt2d* (B), *kmt2ba* (C), *kmt2bb* (D), *kmt2ca* (E), *kmt2cb* (F), *kmt2e* (G), *ash2l* (H), *dpy30* (I), *wdr5* (J), *rbbp5* (K), or *kdrl* (L). Lateral views of head are shown, with rostral to the left. Arrowheads in A indicate anterior and posterior ends of the hindbrain. Scale bar, 100 μm.

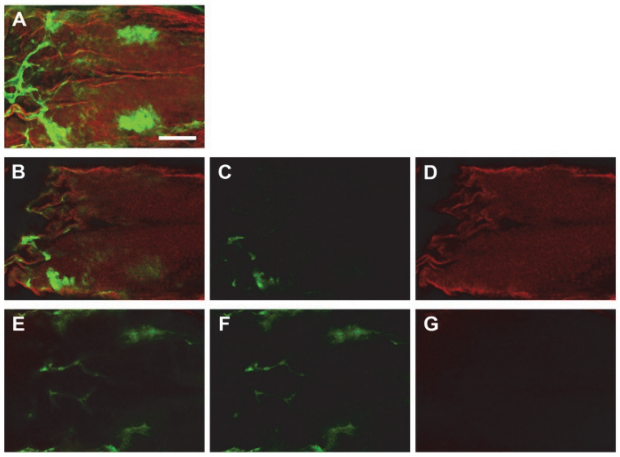


Fig. 2. Expression pattern of RBBP5 protein. Whole-mount immunofluorescent staining of hindbrain parenchymal cells with anti-RBBP5 (red), compared with blood vessels of EGFP from transgenic origin (green). 2D reconstruction of confocal image (A), single horizontal section through the dorsal hindbrain (B-D), and single horizontal section through the ventral hindbrain (E-G) of 54 hpf *Tg(fli1a:EGFP)*^{y1} embryos. Merge (B, E), EGFP (C,F), and RBBP5 (D, G). Dorsal views of head are shown, with rostral to the left. Scale bar, 50 μm.

ogy (#13171) worked well, and showed that RBBP5 was expressed broadly in the central nervous system (Fig 2A).

Next, we compared the expression levels in single planes of the dorsal and ventral areas. RBBP5 was more strongly expressed in the 13th slice from the dorsal surface (Fig. 2B-D) than in the 29th slice (Fig. 2E-G). We confirmed that the expression pattern of the RBBP5 protein was same as that of its mRNA. Altogether, we found that one component of the MLL complex was more strongly expressed in the dorsal hindbrain, which is avascular, suggesting that histone methylation by the MLL complex may be involved in maintaining avascular area and/or activating angiogenic factors in hypoxic regions.

Three types of anti-histone antibodies worked for zebrafish embryo

In order to visualize the activity of histone methylation during CtA angiogenesis in the hindbrain, we conducted whole-mount immunofluorescent staining using four types of anti-histone antibodies: (1) #304-34781 for non-methyl histone, (2) #301-34791 and #9723 for monomethyl histone, (3) #304-34801 and #9725 for dimethyl histone, and (4) #ab1012 and #9751 for trimethyl histone (#30~ were from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, #97~ were from Cell Signaling Technology, and #ab~ was from Abcam). When embryos were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, no staining signal was observed with any anti-histone antibodies. However, when 100% methanol was tested as an alternative fixative, #304-34781, #304-34801, #9725, and #9751 were revealed as cross-reacting. Although we were not able to obtain a working antibody for the monomethyl histone, we were able to obtain three types of anti-histone antibodies.

At 54 hpf, non-methyl type histones were ubiquitously expressed in a dot pattern, representing its subcellular localization within the nucleus (Fig. 3A). Dimethyl histone was also detected ubiquitously and concentrated in nuclei (Fig. 3B). Two different antibodies, #304-34801 and #9725, showed identical expression patterns, and we selected the stronger one for further use. Trimethyl histone was expressed ubiquitously and broadly (Fig. 3C). Negative control embryos treated only with the secondary antibody showed very low background expression (Fig. 3D). Localization in the nucleus was observed in some areas, including the epidermis.

Histone methylation is different in epidermis and the central nervous system

In order to visualize more detailed expression patterns in the hindbrain, we examined single horizontal sections using confocal microscopy. The expression of non-methyl histones was suppressed at low

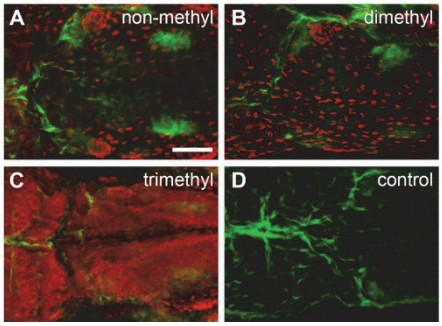


Fig. 3. Cross-reactivity of antibodies for histone methylation. Whole-mount immunofluorescent staining with anti-histone H3 antibody (red, A), anti-dimethyl histone H3 (Lys4) (red, B), anti-trimethyl histone H3 (Lys4) (red, C), and negative control (D), compared with blood vessels of EGFP from transgenic origin (green). 2D reconstructions of confocal images. 54 hpf *Tg(fli1a:EGFP)*^{y1} embryos. Dorsal views of head are shown, with rostral to the left. Scale bar, 50 μm.

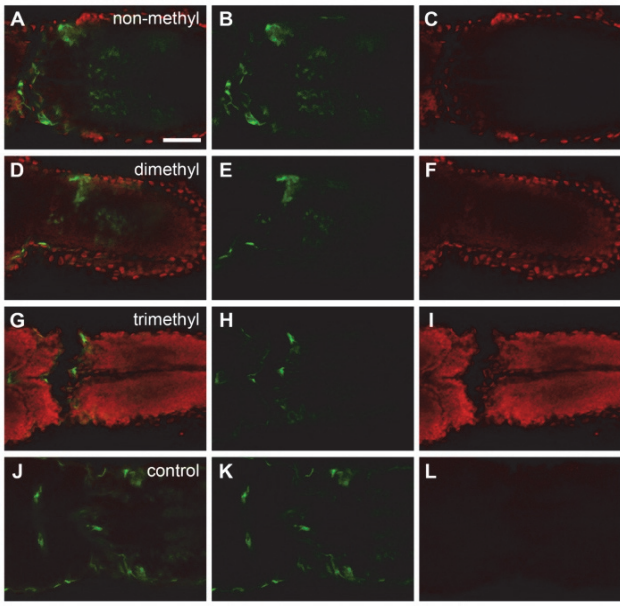


Fig. 4. Expression pattern of histone protein. Single horizontal section of confocal images of whole-mount immunofluorescent staining with anti-histone H3 antibody (red, A-C), anti-dimethyl histone H3 (Lys4) (red, D-F), anti-trimethyl histone H3 (Lys4) (red, G-I), and negative control (J-L), compared with blood vessels of EGFP from transgenic origin (green). 54 hpf *Tg(fli1a:EGFP)*^{y1} embryos. Merge (A, D, G, J), EGFP (B, E, H, K), and each histone (C, F, I). Dorsal views of head are shown, with rostral to the left. Scale bar, 50 μm.

levels in the central nervous system (Fig. 4A-C). On the other hand, boundary cells at the anterior end of the hindbrain and surface epidermal cells showed a dotted pattern, representing nuclear localized expression (Fig. 4C). Dimethyl histones also showed a similar expression pattern (Fig. 4D-F). Although the subcellular localization was different, the expression levels in the CNS were not particularly low relative to those in the epidermis (Fig. 4F). In the case of trimethyl histones, overall expression was ubiquitously strong and partially limited to nuclei (Fig. 4G-I). Negative control embryos treated only with secondary antibodies exhibited very low background expression (Fig 4J-L).

Discussion

We found that mRNA expression of genes related to histone methylation is not uniform but is strong in the cranial nervous system and especially so in the dorsal hindbrain. Since expression outside the hindbrain is not restricted to avascular tissue, it is possible that the different expression levels in dorsal and ventral portions of the hindbrain may be involved in angiogenic induction rather than the maintenance of the avascular region. Since there are multiple reports that epigenetic regulation is associated with cardiovascular disease[8, 9], this finding is consistent with the angiogenic guidance hypothesis. There is also a report that methylation status is involved in osteoarthritis in cartilage tissue, which is avascular and hypoxic[28], and thus further analysis is required.

The RBBP5 protein was expressed in the hindbrain itself but was restricted to the dorsal region. During vascular assembly in the zebrafish hindbrain, CtA sprouts from the ventral side and elongation is limited to the ventral half[2]. There may be some guidance cues for CtA formation in the dorsal and ventral regions, respectively, but the association of RBBP5 with angiogenesis has not yet been reported.

Contrary to expectations[13], the RBBP5 protein did not show nuclear localization. Because the expression region is consistent with that of the mRNA, we are confident that the antibody staining did not reveal any technical problem. RBBP5 showed high expression levels generally, and it may be the case that it is widely distributed in the cytoplasm, making nuclear localization difficult to observe. To resolve this question, it is necessary to observe at higher magnification or develop a clearer staining method.

Although there are relatively few antibodies that can be used in zebrafish, we used the methanol fixed staining method to identify five antibodies that were cross-reactive. The general staining method with 4% paraformaldehyde fixation did not yield any staining signal even when permeability was increased. Organic solvents, such as methanol, ethanol, and ac-

etone are known to reduce the solubility of proteins and flatten cells, resulting in reduced penetration in the nucleus and mitochondria. Due to this effect, the localization of the nucleus may not be visible. Fixation with trichloroacetic acid might improve the ability to visualize nuclear expression. Although technically difficult, one possible method to improve immunospecificity would be to produce an antibody using zebrafish protein as an antigen.

We did not observe any significant methylation signal in nuclei in the CNS. If these results demonstrate true characteristics of the nuclear methylation status during CtA formation, it may mean that histone methylation regulation is not involved in hindbrain angiogenesis. Knockdown and/or mutant analysis is needed to further understand what is happening here.

Finally, since monomethyl histones were not detected in this study, it is still possible that monomethyl histones are dominant in the zebrafish brain at this stage of development. Moreover, there may also be an effect of the developmental stage itself. Multiple validation is required, which could be achieved by incorporating additional antibodies, other developmental stages, and other staining methods.

Acknowledgements

The authors would like to thank Enago (www.enago.jp) for the English language review. This research has been partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS201909).

References

1) Isogai S, Horiguchi M and Weinstein BM (2001) The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* **230**: 278-301.
2) Fujita M, Cha YR, Pham VN, Sakurai A, Roman BL, Gutkind JS and Weinstein BM (2011) Assembly and patterning of the vascular network of the vertebrate hindbrain. *Development*. **138**: 1705-1715.
3) Waddington CH (1942) The Epigenotype. Endeavour **1**: 18–20.
4) Nanney DL (1958) Epigenetic control systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **44**: 712–717.
5) Holliday R and Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226–232.
6) Holliday R (1994) Epigenetics: an overview. *Dev. Genet.* **15**: 453–457.
7) Harvey ZH, Chen Y and Jarosz DF (2018) Protein-based inheritance: epigenetics beyond the chromosome. *Mol. Cell* **69**: 195-202.
8) van der Harst P, de Windt LJ and Chambers JC (2017) Translational perspective on epigenetics in cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**: 590-606.
9) Moore-Morris T, van Vliet PP, Andelfinger G and Puceat M (2018) Role of epigenetics in cardiac development and congenital diseases. *Physiol. Rev.* **98**: 2453-2475.
10) Xie JL and Jarosz DF (2018) Mutations, protein homeostasis, and epigenetic control of genome integrity. *DNA Repair (Amst).* **71**: 23-32.
11) Cavalli G and Heard E (2019) Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* **571**(7766): 489-499.
12) Sarkies P (2020) Molecular mechanisms of epigenetic inheritance: Possible evolutionary implications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **97**: 106-115.
13) Saijo M, Sakai Y, Kishino T, Niikawa N, Matsuura Y, Morino K, Tamai K and Taya Y (1995) Molecular cloning of a human protein that binds to the retinoblastoma protein and chromosomal mapping. *Genomics* **27**: 511-519.
14) Lee JH, Tate CM, You JS and Skalnik DG (2007) Identification and characterization of the human Set1B histone H3-Lys4 methyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **282**: 13419-13428.
15) Li Y, Han J, Zhang Y, Cao F, Liu Z, Li S, Wu J, Hu C, Wang Y, Shuai J, Chen J, Cao L, Li D, Shi P, Tian C, Zhang J, Dou Y, Li G, Chen Y and Lei M (2016) Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases. *Nature* **530**(7591):447-452.
16) Xue H, Yao T, Cao M, Zhu G, Li Y, Yuan G, Chen Y, Lei M and Huang J (2019) Structural basis of nucleosome recognition and modification by MLL methyltransferases. *Nature* **573**(7774): 445-449.
17) Wan X, Hu B, Liu JX, Feng X and Xiao W (2011) Zebrafish mll gene is essential for hematopoiesis. *J. Biol. Chem.* **286**: 33345-33357.
18) Robinson BW, Germano G, Song Y, Abrams J, Scott M, Guariento I, Tiso N, Argenton F, Basso G, Rhodes J, Kanki JP, Look AT, Balice-Gordon RJ and Felix CA (2011) mll ortholog containing functional domains of human MLL is expressed throughout the zebrafish lifespan and in haematopoietic tissues. *Br. J. Haematol.* **152**: 307-321.
19) Huang HT, Kathrein KL, Barton A, Gitlin Z, Huang YH, Ward TP, Hofmann O, Dibiase A, Song A, Tyekucheva S, Hide W, Zhou Y and Zon LI (2013) A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* **15**: 1516-1525.
20) Huang YC, Shih HY, Lin SJ, Chiu CC, Ma TL, Yeh TH and Cheng YC (2015) The epigenetic factor Kmt2a/Mll1 regulates neural progenitor proliferation and neuronal and glial differentiation. *Dev. Neurobiol.* **75**:452-462.
21) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
22) Westerfield M (2000) *The Zebrafish Book: A Guide for*

Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio). University of Oregon Press, Eugene, Oregon.
23) Lawson ND and Weinstein BM (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**: 307-18.
24) Sun XJ, Xu PF, Zhou T, Hu M, Fu CT, Zhang Y, Jin Y, Chen Y, Chen SJ, Huang QH, Liu TX and Chen Z (2008) Genome-wide survey and developmental expression mapping of zebrafish SET domain-containing genes. *PLoS One*. **3**: e1499.
25) Yang Z, Augustin J, Chang C, Hu J, Shah K, Chang CW, Townes T and Jiang H (2014) The DPY30 subunit in SET1/MLL complexes regulates the proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood* **124**: 2025-33.
26) Wang Y, Han Y, Xu P, Ding S, Li G, Jin H, Meng Y, Meng A and Jia S (2018) prpf4 is essential for cell survival and posterior lateral line primordium migration in zebrafish. *J. Genet. Genomics* **45**: 443-453.
27) Liao W, Bisgrove BW, Sawyer H, Hug B, Bell B, Peters K, Grunwald DJ and Stainier DY (1997) The zebrafish gene cloche acts upstream of a flk-1 homologue to regulate endothelial cell differentiation. *Development* **124**: 381-389.
28) Alvarez K, de Andrés MC, Takahashi A and Oreffo RO (2014) Effects of hypoxia on anabolic and catabolic gene expression and DNA methylation in OA chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord*. **15**: 431.

Science Journal of Kanagawa University **31** : 21-24 (2020)

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

Microplastic Beads Incorporated into a Single Cell: Analyses Using the Green Paramecium, *Paramecium bursaria*

Hiroshi Hosoya[1, 3], Kyosuke Suzuki[1], Misato Fujita[1], Natsumi Hosoya[2], Susumu Kotani[1] and Akiya Hino[1]

[1] Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Department of Social Information Studies, Otsuma Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8357, Japan
[3] To whom correspondence should be addressed. E-mail: ft160257sv@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The unicellular protist *Paramecium bursaria* harbors hundreds of symbiotic algae resembling *Chlorella* species in the cell. It is thought that the host *P. bursaria* uses some of photosynthetic products from these algae when sunlight is available. When photosynthesis cannot be performed, *P. bursaria* preys on bacteria, molds, algae, etc. in the surroundings for an energy source. Interestingly, some of the algae were observed to move from the food vacuole to the cytoplasm, becoming symbionts, within several days after incorporation into the cell. Since *P. bursaria* is benthic, it should be possible for various kinds of precipitated tiny particles to be taken up into the cell body during predation. In this study, microplastic (MP) beads with a diameter of 1 μm, which is about the same size as the algae, were mixed in the suspension medium of *P. bursaria*. It was observed that uptake of the beads into the cell body of *P. bursaria* started within 5 min after mixing, and the beads were observed inside *P. bursaria* even several days after the addition to the *P. bursaria* culture suspension. It is highly probable that the MP beads observed in the cell body somehow escaped from the food vacuole and moved into the cytoplasm.
Keywords: protist, micro plastic bead, cell division, benthic, ciliate

Introduction

In recent years, an environmental problem has often been reported where "tiny particles" such as plastic beads flow into the ocean and are ingested by living organisms. Plastic particles are classified as microplastics (MP) or nanoplastics (NP) according to their size. They constitute the "MP problem" and the "NP problem", respectively.

In the sea, MP have been found in the calanoid copepod (*Neocalanus cristatus*) and the euphausiid (*Euphausia pacifica*) collected in the northeast Pacific Ocean[1)]. In the case of mussels (*Mytilus edulis*), cultured in a suspension of MP beads for 3 days, MP beads could be detected in the hemolymph[2)]. Furthermore, it has been confirmed that when European green crabs (*Carcinus maenas*) prey on mussels that have ingested MP beads, the beads move from the intestinal tract of the crab into the ovary and gill[3)].

MP problems also exist in a freshwater environment. For example, in China, red belly tilapia and carp have been found to have MP beads in the gastrointestinal tract[4)]. In addition, MP beads have been found in major European rivers such as the Rhine and Danube, and it is conceivable that, MP beads may be found in freshwater fish from the Rhine and Danube in the future[5)].

These observations indicate the transfer of MP beads to the digestive tract of multicellular organisms such as fish and shellfish. Analysis of the process and subsequent effects of MP uptake will reveal extracellular effects of the incorporated MP beads. On the other hand, there have been few reports on the intracellular uptake of MP beads.

In this study, *Paramecium bursaria*, a benthic unicellular organism that feeds on submerged bacteria and algae at the bottom of freshwater sources, was

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

used to investigate whether *P. bursaria* incorporates MP beads that sink into the water. The localization of MP beads was investigated using a confocal laser microscope in *P. bursaria* inclividuals several days after exposure to MP beads.

Materials and Methods

P. bursaria

A cloned strain of *P. bursaria* collected from a pond on the Shonan Hiratsuka campus of Kanagawa University has already been established[6]. More specifically, a single *P. bursaria* was isolated from a pond water culture, washed, and grown in a lettuce culture medium prepared as follows to establish a cloned *P. bursaria* strain. Dried and sterilized lettuce leaves were extracted with distilled water (100 ℃ , 5 min). The extract (a lettuce culture medium) was autoclaved and stored until use.

MP beads

MP beads (Fluoresbrite®, 1.0 μm in diameter, yellow green polystyrene microspheres, Polysciences) were placed in an Eppendorf tube, and 70% (v/v) EtOH was added to 1 ml. The suspension was centrifuged in a small centrifuge for 5 min (2,000 g), and the supernatant was discarded. One ml of lettuce culture medium was added and the suspension was centrifuged again for 12 min. The supernatant was discarded. This 12 min centrifugation was performed three times in total. Lettuce culture medium was added to the resultant pellet of MP beads to obtain a lettuce culture medium containing MP beads.

P. bursaria culture in the presence of MP beads

Lettuce culture medium containing MP beads was prepared and *P. bursaria* was added. Three hundred μl aliquots of these suspensions (1.2×10^5 particles/cell) were separately put into individual wells of a 48-well plate (IWAKI microplate), and culture was performed in a BioTron incubator at 23℃ with alternating 12 hrs light / 12 hrs dark performed.

Tomography of *P. bursaria* using confocal laser scanning microscope (LSM)

P. bursaria were cultured in the incubator for several days in the presence of MP beads (3.1×10^7 particles in 300 μl) at a density of 860 cells/ml. In this case, the number of MP beads per single *P. bursaria* was 1.2×10^5. After the culture, the *P. bursaria* suspension was placed in an Eppendorf tube, and $NiCl_2$ was added at a final concentration of 0.1 mM as an anesthetic. The culture suspension, 16.2 μl, was removed from the Eppendorf tube and mounted on a slide glass. A cover glass (18 mm × 18 mm) was placed on the slide and sealed, and then tomography was performed on *P. bursaria* at every 1 μm using a confocal laser scanning microscope (LSM, Zeiss) to determine if MP beads had been incorporated into the cell body.

Results and Discussion

A previous report revealed phagocytic uptake of fluorescent nanospheres (0.6 μm) by marine heterotrophic flagellates and ciliates[7]. However, in these experiments using conventional microscopy, it seemed difficult to distinguish whether particles were inside the cell or just on cell surface.

P. bursaria cultured with MP beads for several days was imaged using LSM tomography. The tomography was performed from the dorsal (upper) side (panel A) to the ventral (bottom) side (panel O) of *P. bursaria* at a thickness of 1 μm to obtain 15 images (Fig.1). The green bead observed in Fig. 1 (indicated by the arrow) was confirmed only in the images shown in panels F and G. This indicates that MP beads seen were not present on the cell surface or in the culture suspension but were incorporated into the *P. bursaria* cell body. Within 5 min after mixing, 30% or more of *P. bursaria* were found to have incorporated MP beads (data not shown). This result indicates that *P. bursaria* is capable of incorporating the MP beads into the cell body immediately after contact with the beads.

It has already been shown that *P. bursaria* take up green algae having a diameter of about 1 to 8 μm [8] into the food vacuole, and that, within a few days, the incorporated green algae start symbiosis in *P. bursaria* after moving from the food vacuole to the cytoplasm, thus becoming symbiotic algae[9]. The diameter of MP beads used in this study was 1 μm, an appropriate size for *P. bursaria* to incorporate into the cell. In this study, MP beads were observed inside *P. bursaria* even several days after the addition to the *P. bursaria* culture suspension. Therefore, it is highly probable that the MP beads observed in the

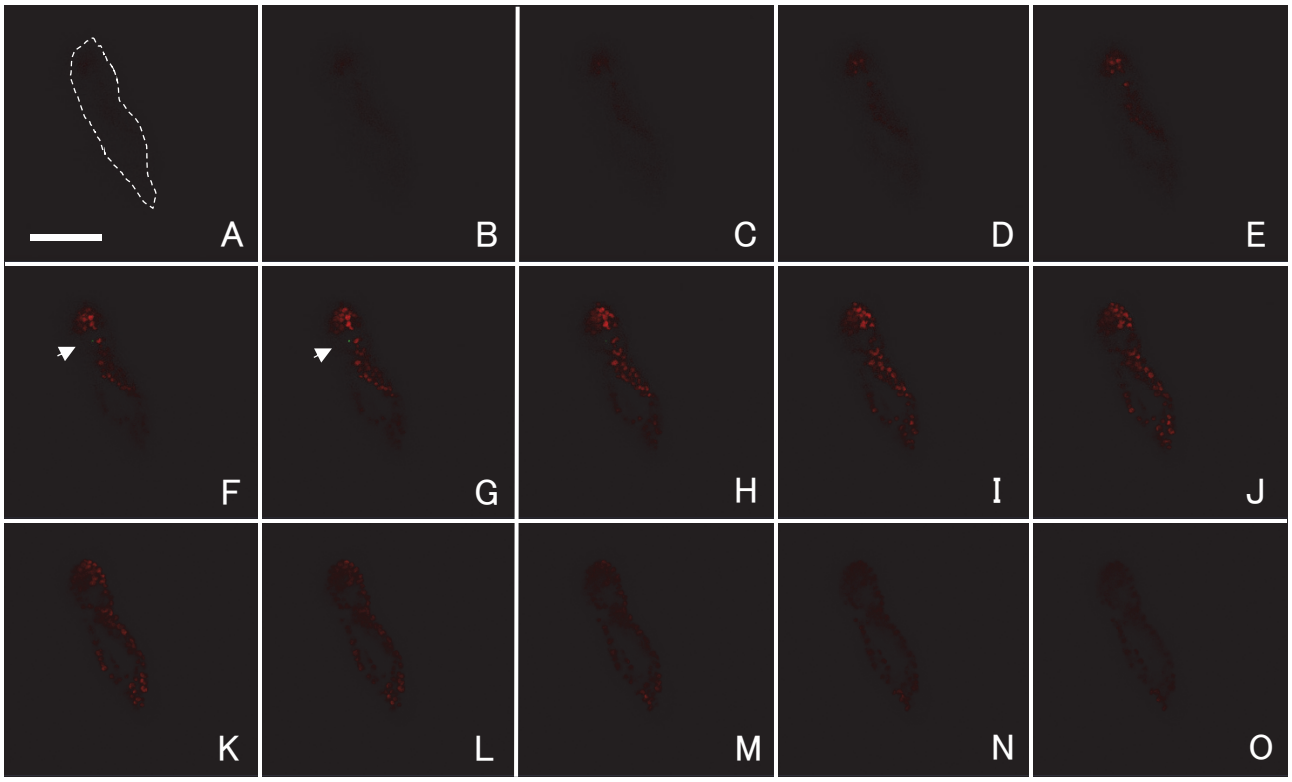


Fig. 1. Serial fluorescence images of *P. bursaria* with MP beads (1.0 μm in diameter) taken every 1 μm obtained by LSM (panels A-O). An MP bead (green dot) is observed in the panels F and G (indicated by arrows), showing that the bead was incorporated into the paramecium. The area surrounded by the white dotted line in panel A shows the original cell shape of *P.bursaria*. Scale bar, 50 um.

cell body somehow escaped from the food vacuole and moved into the cytoplasm. However, it remains unknown whether MP beads were first incorporated into the food vacuole or whether they were incorporated into *P. bursaria* by another mechanism not involving the food vacuole.

In the natural environment, chemicals are adsorbed on MP beads, and there are reports of the accumulation of such chemical substances in the body of multicellular organisms that eat MP beads by mistake. In the future, in addition to the effects of the uptake itself, it is necessary to study the effects of the chemical substances adsorbed onto MP beads when MP beads are taken up by unicellular organisms.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr. Hiroyuki Kaneko (Keio University) for his kind gift of MP beads in this study. This research was supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS201910).

References

1) Desforges JP, Galbraith M and Ross PS (2015) Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch Environ Contam Toxicol*. **69**: 320-330.
2) Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, Lowe DM and Thompson RC (2008) Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis (L.)*. *Environ. Sci. Technol*. **42**: 5026-5031.
3) Farrell P and Nelson K (2013) Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas (L.)*. *Environ. Pollution* **177**: 1-3.
4) Zheng K, Fan Y, Zhu Z, Chen G, Tang C and Peng X (2019) Occurrence and species-specific distribution of plastic debris in wild freshwater fish from the Pearl River Catchment, China. *Environ. Toxicol. Chem*. **38**: 1504-1513.
5) Lechnera A, Keckeisa H, Lumesberger-Loisla F, Zensa B, Kruscha R, Tritthartb M, Glasb M and Schludermann E (2014) The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ. Pollution* **188**: 177-181.
6) Hosoya H, Hamao K, Kato K, Dohra H and Kotani S (2017) Studies of green paramecium, *Paramecium bursaria*, isolated in Kanagawa Prefecture. *Sci. J. Kanagawa Univ*. **28**: 79-83.
7) Pace ML and Bailiff MD (1987) Evaluation of a fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. *Mar. Ecol.*

Prog. Ser. **40**: 185-193.

8) de Grooth BG, Geerken TH and Greve J. (1985) The cytodisk: a cytometer based upon a new principle of cell alignment. *Cytometry* **6**:226-233.

9) Siegel R and Karakashian S (1959) Dissociation and restoration of endocellular symbiosis in *Paramecium bursaria. Anat. Rec.* **134**: 639.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：25-32 (2020)

■原　著■

電極式底置き炊飯とイースト発酵食パンの性能評価実験

青木　孝[1, 2]

Reproduction Experiments Using Electrode Rice Cooker/Bread Machine

Takashi Aoki[1, 2]

[1] Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] To whom correspondence should be addressed. Email:u17aok@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We improved "Denki-Pan" (bread baked using electrode bread machine) as plain bread fermented with yeast. We also experimentally reproduced "Denki-Rice" (rice cooking using electrodes) with several historical types of electrodes placed at the bottom of a cooker. We investigated historical factors by reproduction experiments.
Keywords: Denki-Pan, Denki-Rice, panko, titanium, gelatinization, starch, granule Yeast

序論

昭和 9 年 1 月に日高周蔵が、お櫃の底に短冊形や同心円形の極板を配置し、直に米を入れて炊く飯炊法の特許 116015 を出願する。同年（昭和 9 年）6 月に旧日本陸軍が立てた対向極板で直に米を入れ炊飯する実用新案 235674（発明者：阿久津正蔵）を出願する。昭和 10 年に陸軍において、阿久津正蔵は立てた対向極板による電極式パン焼き装置を発明する。その後、炊飯用の極板をパン焼きにも転用できるように改良し、「金はいくらかかってもよい。パンも焼け、炊飯もできる給養車を作れ」という陸軍の命令に対して、昭和 12 年に電源設備も含めたシスシステムとしての 97 式炊事自動車を実用化し、電極式技術を結実させる。実際には昭和 14 年版 4 月期の給養器具取扱説明書綴りの中の 97 式炊事自動車の取説には、炊飯手順の記載しかなく、パン焼きは兼用できたがその使用は限定的だったと考えられる。同じ給養器具取扱説明書綴りの中に、カマドによるパン焼き手順の記載があることから、この方法が通常だったことになる。この給養器具取扱説明書綴りは、2019 年 4 月に、軍装研究家の高橋昇氏の所蔵を見せていただいたものである。

第 2 次世界大戦後、昭和 21 年には電気パン焼き器が紹介され、木枠に立てた対向極板間に 100 V の交流電源をかけるだけの電気パン焼き器は家庭で自作されかなり広く用いられた。簡単のため、ふくらし粉を入れた蒸しパンが作られた。業務用には、旧陸軍仕様のイースト発酵させた食パンが作られ、小麦粉が自由に売買できるようになると、パン粉販売へ転向するメーカーもでて、現在でも市販のパン粉の半分は、電極式パン粉として残る。工場では、200 V 電源で、ポリプロピレンケースに 50 cm × 50 cm 程度の極板を極板間隔 12 cm 程度で対向させて焼く。パン粉は、日本で発展した食材であり、電極式製パン法は日本独特のものであり、米国等へパン粉および生産方式も輸出され、「PANKO」は英語になった。電極式では、極板の電蝕が問題となるが、昭和 63 年全国パン粉工業協同組合連合会の清水康夫らの努力によって、純チタンを極板に使うことを国に認可させ、これを解決した。電極式では、焼くわけではなく、沸点 100℃にしかならないので、白いパン粉となり、冷凍食品の衣に使われ広まった。電極式は、ジュール熱による水の沸騰熱が熱源で、100℃までしか上がらないので、電極式のイースト発酵生地に通電した白いパンは、かえってイーストの香りがきわだち、おいしい。同じイースト発酵生地を、外から加熱するオーブンで焼く場合には、オーブンを 190℃まで 10 分間で予熱して、さらにその 190℃のオーブンで 19 分間焼き、合計 29 分かかる。焼き色がつく。しかし、電極式はジュール熱により生地自体が発熱するので、熱効率が約 65％と良い。同じイースト発酵生地を予熱なしにそのまま 11 分通電するだけである。熱効率の良さが 11 分と 29 分の差に表れる。さらに、電流を担うイオン源が 100℃の水の蒸発と共に析出し、勝手に電気が切れるという優れものである。

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

また、おはちの底に櫛の歯形のチタン極板を配置して、極板間隔を1 cm程度にせばめて水道水でも炊飯できるようにした、自作「たからおはち」（1合）は、熱源が底にしかないので、均等に炊飯できずムラがあり、さらに、底に水蒸気の泡がつき、電流を阻害するので、50%ほど電流がふらつき不安定になる。旧陸軍より先に昭和9年に特許をとった、おはち型炊飯器は、第2次世界大戦後、昭和21年に厚生式炊飯器（同心円形極板）として製品化され、極板を櫛の歯形に実用新案した「たからおはち」等が追従するわけであるが、炊飯はムラがあり、電流も不安定だったはずである。戦後のSONYの電極式炊飯器は、極板をアルミにしたため失敗した。通電後、アルミ酸化膜が電流を低下させてしまう。電極式は電流制御がむずかしいので、万人向けではない。それに比べ、旧陸軍の立てた極板では、横から均等に炊飯でき、おいしい。さらに、電流が不安定になることもなく立て型の方が性能がよい。水道水だけの調理では、極板間隔が広いと電流が流れにくい。極板間隔を狭める工夫が、底に極板間隔を狭めて1 cm程度に配置する方法である。その対向距離を長くする極板形状の工夫も必要となる。立てた対向極板では、塩等のイオン源が必須である。大学のパン焼きケースは極板間隔が6 cmあるので、水道水では電流が流れないので、0.4 gほど塩を入れる。昭和30年に東芝から、2重釜の外釜に20分で蒸発する水を入れ、なくなったらサーモスタットで電気が切れる外熱式の炊飯器が市販され、電極式にとって代わる。厚生式電気炊飯器は一つ現存（個人所有）する。「たからおはち」は、大阪市立科学館と東京薬科大学の内田隆講師の調べによれば、宇和島市吉田ふれあい国安の郷、坂戸歴史民俗資料館、調布市郷土博物館（同心円型）に4つ現存する。厚生式電気炊飯器（5合用）の取説には、陸軍から、電極式技術を家庭用に転用した昭和9年の日高周蔵特許を国民栄養協会が譲り受け製品化したと記述してあるが、日高周蔵特許に陸軍との関係はなく、その確認は取れない。日高周蔵と陸軍と阿久津正蔵の関係は全く不明である。

神奈川大学理学部では、29年前から物理学学生実験の1つとして、木型に極板間隔6 cmの対向極板を立て、ふくらし粉の液状生地を入れた電極式パン焼き器における性能評価をさせている。その結果、加えた電気エネルギーに対する水の蒸発熱（調理に使われたと考える）の比すなわち熱効率が約70%であることが分かった。火力発電所の熱効率が約35%なので高効率である。これが、電極式が外から加熱する焙焼式（オーブン）に比べ、釜の予熱も必要なく経済的なうえ、設備も小さくでき新規参入し易かったので、関西で広まった理由である。時系列の電流変化は、でんぷんの糊化の進行に伴い、2つのピークを持つことを明らかにした。糊化開始温度で、でんぷんが吸水を始め、電流が下がる（第1ピーク）。糊化終了温度で、でんぷん粒の吸水による膨張が最大になり破裂する（最底の電流）と、再び電流は上昇し、水温が100℃近くになると蒸発によりイオン源が析出するので、電流は下がる（第2のピーク）。小麦、米等で、でんぷん種が違えば、糊化の開始と終了の温度帯が異なるが、2つのピークができるメカニズムは同じである。炊飯では、水道水のみの調理において、第2ピークしかわからず1山に見える。米は粒食であるが、小麦は粉食なので、ふくらし粉やイースト発酵等が必要になる。

電極式では、極板の電蝕が問題になるが、昭和63年、全国パン粉工業協同組合連合会の清水康夫らの努力により、純チタンを極板に使うことを国に認可させ、これを解決した。その後、神奈川大学では、立てた対向および底置きの配置で、ステンレス極板と、チタン極板の比較を行い、液状パン生地（蒸しパン）および練り状パン生地、、イースト発酵パン生地（パン粉用）、炊飯の再現実験を行った。電極式調理における、液状パンの出来上がり時間は8分、イースト発酵パンは11分、炊飯は23分である。この結果等と歴史的過程や背景については、すでに報告した[1-2]。これまでの研究は、およそ20年前に、昭和のくらし博物館に大学のパン焼きケースを寄贈した縁で、2016年8月の昭和のくらし博物館の企画展「パンと昭和」における電極式パン焼き再現実験を突然に依頼されたことに始まり、その実験解説のために電極式関連を調べたところ、大阪市立科学館の2013年の長谷川能三学芸員の電極式「たからおはち」の再現実験で[3]、対向極板では炊飯できないという指摘に挑戦したことがきっかけである。この時、立てた対向極板による、蒸しパンと炊飯実験により、電極式の特性を理解した。その論文で昭和9年におひつの底に極板を置く炊飯器の特許が日高周蔵から出願され、その極板の変更の実用新案が昭和21年に出て、取説中の「蒲田区」から製造は昭和22年頃であろうと長谷川氏とつめた。その後すぐ、電極式パン粉を知り、三重大学の松岡守教授からパン粉メーカの調査を提案され論文につながった。その結果、現在でも電極式が残っていることに加え、全国パン粉工業協同組合連合会のご協力により、電極式パン焼き装置の発明が、昭和10年の陸軍の阿久津正蔵によることが分かり、それ以前の電極式炊飯器（立てた対向）の極板を兼用に改良しパン焼きも組み込んだ97式炊事車の実用化も確認した。チタン板に至る、

極板についての安全性確保の歴史も教えていただいた。昭和 18 年の阿久津氏の「パン科学」の著書により紹介された陸軍のパン焼き器が、戦後昭和 21 年 5 月には、主婦の友に紹介され、同年 10 月には、少年工作の雑誌にも紹介され広まり、厚生式電気炊飯器を市販した国民栄養協会が「厚生型電極式製パン器」も市販した（渡辺由美子氏と東京薬科大学の内田隆講師の調査による）。この同昭和 21 年には「手製のパン焼き器でパンを焼くこども」として毎日新聞社の写真が残っている。2018 年 10 月には、三好日出一氏に、おひつの底置きの唯一現存する「厚生式電気炊飯器」を見せていただき、戦後、国民栄養協会により昭和 9 年の日高特許が製品化されたことが判明した。2019 年 4 月には、昭和 14 年版 4 月期の給養器具取扱説明綴り [4] を軍装研究家の高橋昇氏に見せていただいた。

方法

イースト食パンとおはち型炊飯の実験手順

本論文では、極板にすべてチタン 1 種を使い、まず、前に報告した、イースト発酵させた実際のパン粉用パンのレシピから、おいしいイースト発酵させた食パンに配合を変えた場合の特性変化を調べた。また、水道水でも電流が流れるように極板間隔を 1 cm 程度に狭めた、おはちの底に極板を置く「たからおはち」のような炊飯器において、極板の形状を、「たからおはち（櫛の歯形）」や「厚生式（同心円形）」に変えた時に特性がどう変わるかを調べた。立てた平行対向のケースで、極板を底で 90 度に折り曲げ、短冊形のように 1 cm 程度に極板間隔を狭め、水道水で炊飯すると 58 分かかる [1]。極板の対向距離の長さが、電流量を決めるが、この大学のケースで短冊形は、ケースの横長 18 cm である。今回はこの短冊形を、櫛の歯形に変えた場合も調べた。平行極板のままで塩 0.4 g 入れると、23 分で炊飯できる [1]。大阪市立科学館の櫛の歯形極板の再現実験「たからおはち（2 合）」では、水道水で 25 分で炊飯できる。

結果と討論

イースト発酵食パンの電流特性の比較検討

前報告 [2] で、清水康夫氏の文献 [5] を参考に、電極式パン粉用パンの再現実験を次のように行った。パン生地は、日清カメリヤ小麦粉（強力粉）150 g、SAF ドライイースト 4.5 g、塩 1.5 g、無塩バター 5.0 g、砂糖 2.5 g を水 100 g で練り、20 分間 60℃で 1 次発酵させた。本報告では、同じカメリヤ（強力粉）で、味を重視した食パンとするために配合を、日清カメリヤ小麦粉 150 g、SAF ドライイースト 4.5 g、塩 2.0 g、無塩バター 15.0 g、砂糖 10.0 g に変えて、パン粉用パン同様に 1 次発酵生地を作った。正確のために手順を示す。すでに、昭和 22 年に阿久津正蔵氏が、電極式イースト発酵パンのための手順を書いている [6]。

図 1.（上）1 次発酵後，3 等分して丸め「の」の字側を極板に付けケースに入れる .（下）ケースごと 2 次発酵して極板に触れた生地 .

配合する材料を、33℃ 100 g の水で、発酵が始まりなめらかになるまで捏ねる。 1 かたまりにして、発酵器で 42℃で 25 分間 1 次発酵させる。1 次発酵後、ガス抜きし 3 等分して、それぞれを小判型に伸ばし、長い方の縁を折った後で、海苔巻き状に丸め成型し、極板をセットしたパン焼きケースに、巻き終わりを下に「の」の字が極板に触れるように 3 つを並べて入れる。ケースごと、発酵器に入れ 42℃で 25 分間 2 次発酵させる。イースト発酵により膨らみ、パン生地がチタン極板に 9 割程度接触する。11 分通電後、電力は 0.3 A に落ち出来上がる（図 1-3）。通電途中、パン生地がケース上外に盛り上がるので、熱が伝わるように別の底板でフタをする。

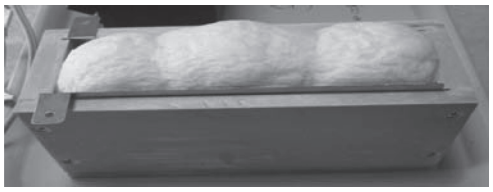


図 2.　通電し膨張した生地.

この食パン用配合（青〇印）とパン粉用配合（赤 ×印）の電力変化を見ると図 4 となる。100 V 通電後、図 4 の上図に電力の時間変化を、下図に横軸を同じ時間経過とした温度の時間変化を示す。パン粉用パンでは、塩 1.5 g、砂糖 2.5 g、無塩バター 5 g であったところを、食パン用では、塩 2.0 g、さらに砂糖 10 g、無塩バター 15 g に増量しているので、電流がピークで 10%増えているだけで、ほぼ同じ電力推移をする。また、強力粉では、薄力粉に比べ、電力ピーク等を見ると、デンプンの糊化の温度帯が、5℃低くずれていることが分かる

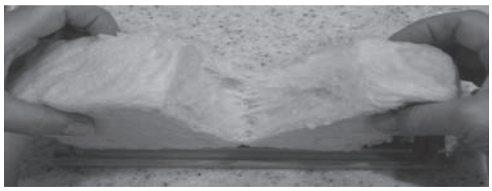
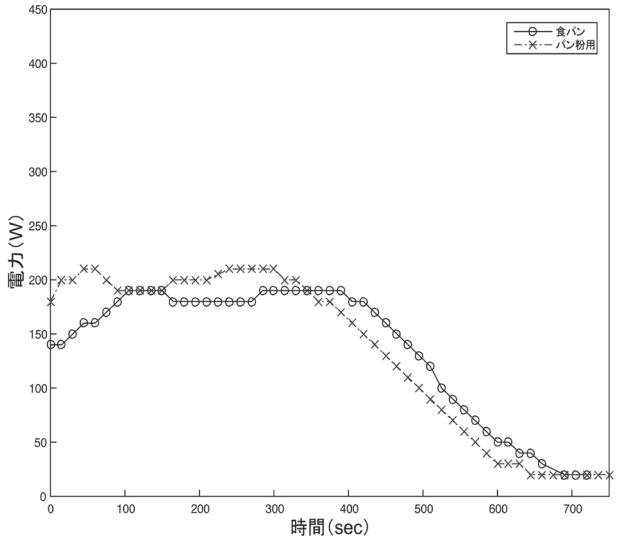


図 3. ちぎった食パン.



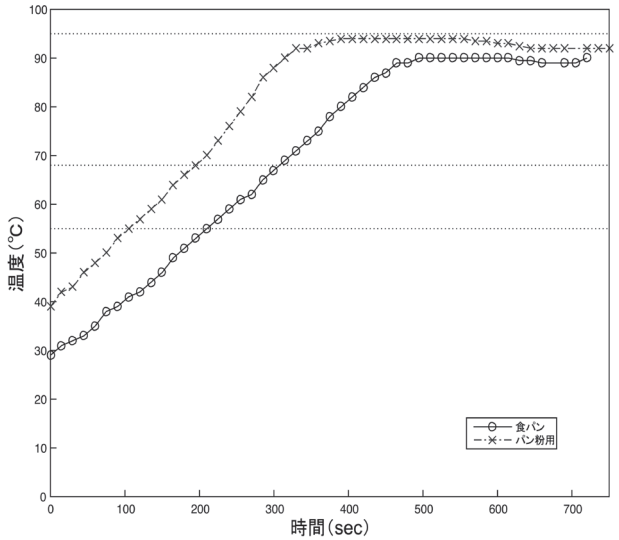


図 4.（上）カメリヤ発酵食パン（○印：塩 2.0 g）とカメリヤ発酵パン粉用パン（×印：塩 1.5 g）の電力値 .（下）水温の時間変化 .

（表 1）。

図 4 で両者のピークがずれるのは、それぞれの第 2 発酵後の温度が違うためである。

次に、食パン用の強力粉をカメリヤ（タンパク質 12%）から、日清パン専用特選強力粉タンパク質 13%）に変えた場合と、食パン用の無塩バター 15 g を同量の有塩バターに変えた場合を比較した。有塩バターに変えると、10.5%の塩相当量：0.21 g が加わり、食塩 2.21 g となる計算である。強力粉を変えたことは、電流特性にはほぼ影響しないが、出来上がりの食パンの食味はかなり違う。有塩バターは塩量が増えるので、ピーク電流が 3 割増えるが、焼き上がり時間は変わらない。10 数種類の強力粉を試したところ、電極式イースト発酵パンでは、日清特選強力粉が一番おいしい。以上まとめると、表 2 となる。それぞれ食味は違うが、電流特性としてはほぼ同様であり、熱効率も 60%程度となる。焼き時間はすべて 11 分である。

ここで、タンパク質を重量比で 13%含む強力粉を使ったイースト発酵パンに対して、これまでの基本のタンパク質を 8.9%しか含まない薄力粉による液状（蒸し）パンと、同じ薄力粉を捏ねてタンパク質をグルテンに変え、イースト発酵パンの参考にした模擬練りパンについて、水量に対する小麦粉量や塩量に関して電流特性をまとめておくと、表 3 となる。小麦量に対して水が多いと、塩に対して電流値は敏感に反応する。捏ねてグルテンを出すと、電流値は上がる。蒸発して減った水の量が、調理に使われた熱量と考え熱効率を計算しているが、全体の水の量が少ないと、熱効率は 10%程度下がる傾向にある。電流値も小さくなる。小麦量は、蒸しパンと発酵パンは 150 g、模擬練りパンは 225 g である。水の量は、蒸しパンが 190 g、模擬練りパンが 170 g、発酵パンが 100 g である。

表 1. 小麦粉デンプンと米デンプンの糊化温度帯と析出開始温度

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

表 2. イースト発酵パンの電流特性

	塩	熱効率	ピーク	蒸発水
カメリヤ	1. 5 g	63 %	210 W	16 %
カメリヤ	2. 0 g	59 %	190 W	13 %
カメリヤ	2. 21 g	55 %	230 W	20 %
特選	2. 0 g	53 %	180 W	15 %

表 3. 小麦粉による各種パンの電流特性

	水 / 小麦	塩 / 水	熱効率	ピーク	蒸発水
蒸し	1. 27	0. 21	69 %	480 W	16 %
練り	0. 76	1. 06	62 %	780 W	21 %
発酵	0. 67	2. 0	59 %	190 W	13 %

お櫃型の極板底置き炊飯の特性比較

水道水でも炊飯できるように、極板をお櫃の底に極板間隔を 1 cm 程度に狭めて配置し、第 2 次世界大戦後の昭和 21 年に市販された「厚生式（同心円形極板）」と「たからおはち（櫛の歯形極板）」が現存する。本論文では、両者の極板をチタン 1 種で自作し

て、志水木材産業㈱の約１合サイズの「のせ蓋おひつ」のミニおひつ（木曽さわら材でタガが銅）の内径直径 11.6 cm、高さ 6.2 cm（外径直径 14.5 cm、外径高さ 9.5 cm、フタ除く）をお櫃ケースとして、再現実験し特性評価を行った。

その前に、大学ケースの立てた対向極板（陸軍のものと同形）の極板間隔 6 cm で、米 150 g、水 230 g、塩 0.4 g 入れた基本炊飯（図５青○印：23 分で完成）と、対向極板を底で折り曲げ、短冊形にして底で極板間隔が 1 cm に向き合うようにして（図６（上））、水道水だけでも炊飯できるようにしたもの（図５赤×印：58 分で完成）を比較すると、図５となる。水道水のみでは、糊化開始温度に起こる電流の第１ピークが現れない。お櫃の底に極板を置くと、図５の短冊形（赤×印）のように、沸騰時に極板に蒸気の泡が付き、電流が 50%程度ふらつき不安定になる。立

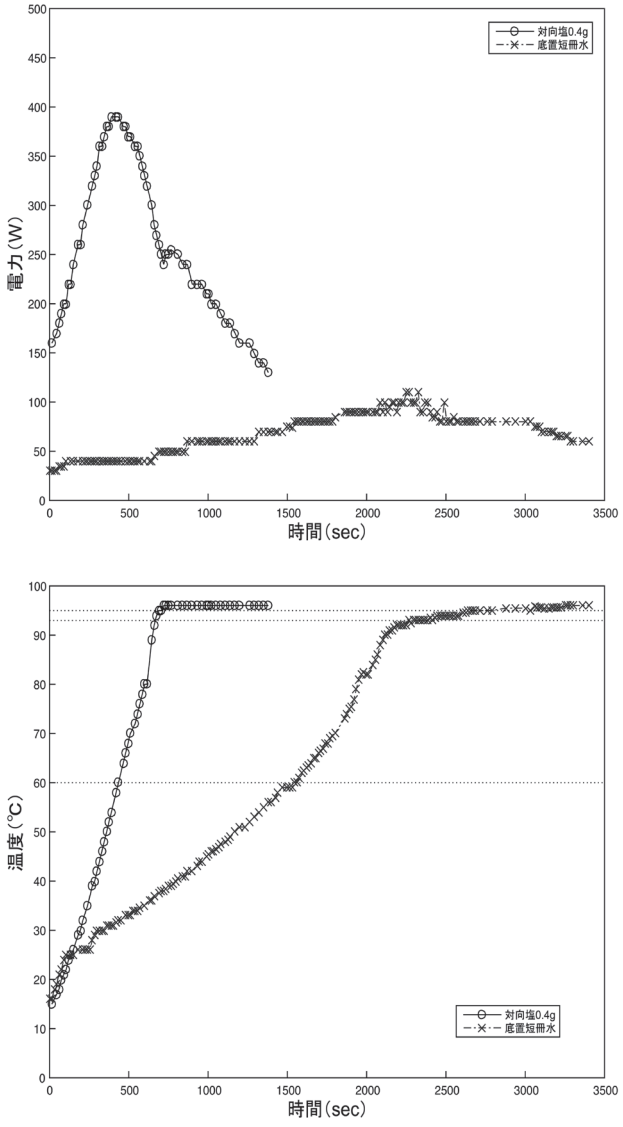


図 5.（上）対向基本炊飯（○印：塩 0.4 g）と立て型底置き短冊形水道水炊飯（×印）の電力値 .（下）水温の時間変化 .

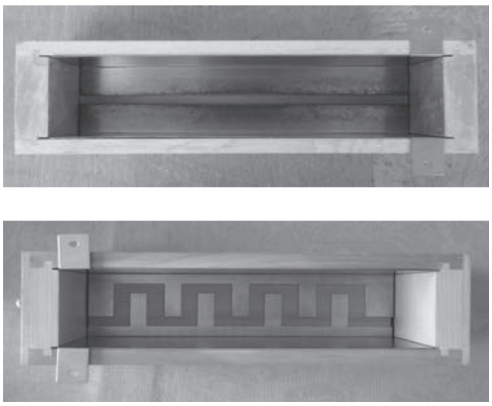


図 6.（上）対向型の底置き短冊形極板 .（下）対向型の底置き櫛の歯形極板（29 分）.

てた対向極板は安定し、左右から均等に加熱できる。

この短冊形極板を、櫛の歯形にすると、極板間隔の対向距離が 18 cm から 26 cm に増え、水道水での炊飯時間（図５の赤×印）が、58 分から 29 分に短縮できる。自作した、「たからおはち」に似せた立て型ケースの、底置き櫛の歯極板は、図６（下）となる。この立て型ケースの櫛の歯形極板で、水道水炊飯した場合の電力と温度特性を見ると、図７の青○印となる。ピークは、150 W 程度で、１つ目の糊化開始温度に伴うピークは現れない。底の極板上の沸騰による泡のために、電流は 50%程度ふらつく。この、唯一現れる第２の蒸発に伴う電流ピークの時刻位置は、「たからおはち」[3] の再現実験のデータと同じである。しかし、その電流ピーク後の電流値の下がり方がゆるやかなのは、お櫃型ではなく、より狭い立て型ケースの底に配置していることが関係する。

この櫛の歯形の「たからおはち」タイプの極板形で、志水木材産業㈱の１合サイズのお櫃に合うように自作し（図８（左））、水道水で炊飯した場合の電流と温度特性を見ると図７の赤×印となる。立て型ケースと同じ分量の、米 150 g、水 230 g（約１合）である。お櫃型底置き櫛の歯形の極板対向距離は、28 cm となる。大学の立て型ケースの底面積は、6 × 18.3 = 110 cm^2 であるが、お櫃の底面積は、123 cm^2 となり、より 1.1 倍広い。同じ米 150 g、水 230 g では、お櫃の方がコメ水の高さは 5 mm 程低くなる。底面積が、お櫃型は大学のケースに比べ、1.1 倍あるので、温度上昇が少し遅くなり、炊飯時間に時間がかかる。お櫃型櫛の歯形は、立て型櫛の歯形に比べ底面積比と同じ 1.1 倍の 33 分の炊飯時間で炊ける。初期の電力は、立て型櫛の歯形が 50 W、お櫃櫛の歯形が 40 W でほぼ変わらない。第２ピークの電流は、極板間隔の対向距離が長いお櫃櫛の歯形の方が大きい。立て型櫛の歯形が 160 W、お櫃櫛の歯形が 200 W である。熱効率は、立て型櫛の歯形が約 70%、お櫃櫛の

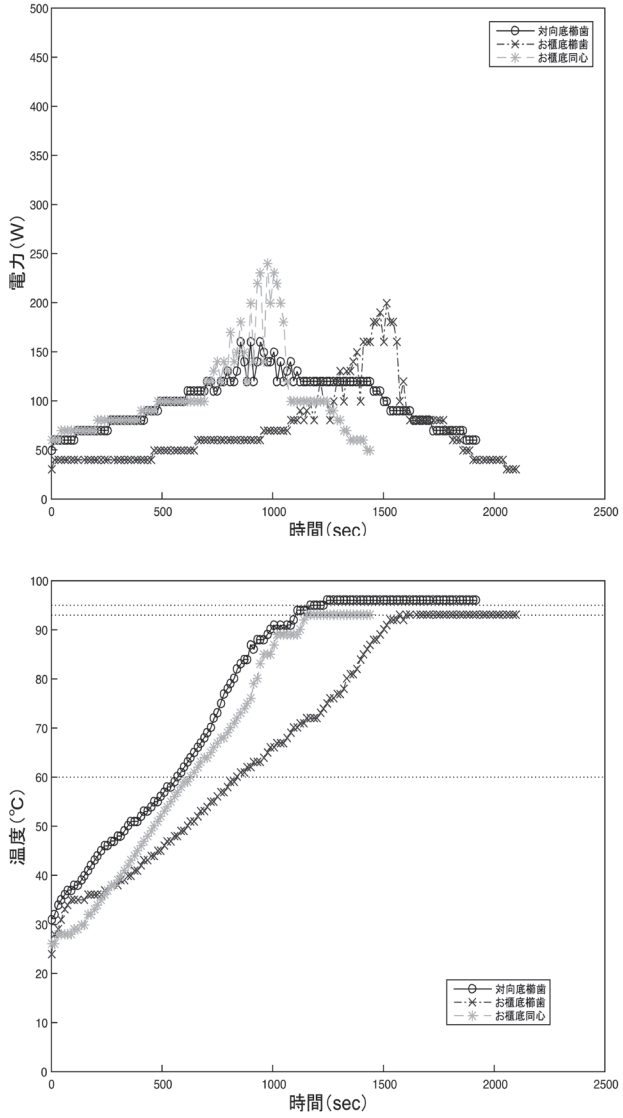


図 7.（上）水道水の立て型底置き櫛の歯形炊飯（○印）とお櫃型底置き櫛の歯形炊飯（×印）とお櫃型底置き同心円形炊飯（＊印）の電力値 .（下）水温の時間変化 .

歯形が約 80%である。お櫃櫛の歯形の方が、立て型櫛の歯形よりも温度上昇がゆるやかになる。これは、お櫃型の内容積が、123 × 6.2 = 762 cm^2、一方、立て型の内容積が、110 × 8 = 880 cm^2 で、立て型の方が広いために、熱効率が下がっている。また、お櫃型の左右の２枚の櫛の歯形の極板は、左右対称で同じ極板であるのに対し、立て型の櫛の歯形の左右の２枚は、同形でないので、量産的には、お櫃型の櫛の歯形は利点がある。「厚生式」の同心円形極板も、左右が対称の同形にならない。各ケースの仕様を整理すると、表４となる。

一方、図９（左）のように自作した「厚生式」タイプ（お櫃型底置き同心円形極板）においても電流特性評価を行った。主に「たからおはち」のお櫃型櫛の歯形との比較を行った。水道水でのお櫃型底置き同心円形炊飯に対する電流特性は、図７の緑＊印

表 4. 水道水炊飯用ケースの仕様（極板間隔 1cm）

	極板対抗距離	床面積	内容積
立て短冊	18 cm	110 cm^2	990 cm^3
立て櫛歯	26 cm	110 cm^2	990 cm^3
お櫃櫛歯	28 cm	123 cm^2	738 cm^3
お櫃同心	29 cm	123 cm^2	738 cm^3

図 8.（左）お櫃型底置き櫛の歯形炊飯器（自作）.（右）炊き上がり（33 分）.

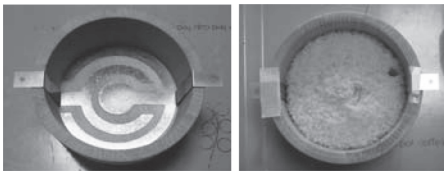
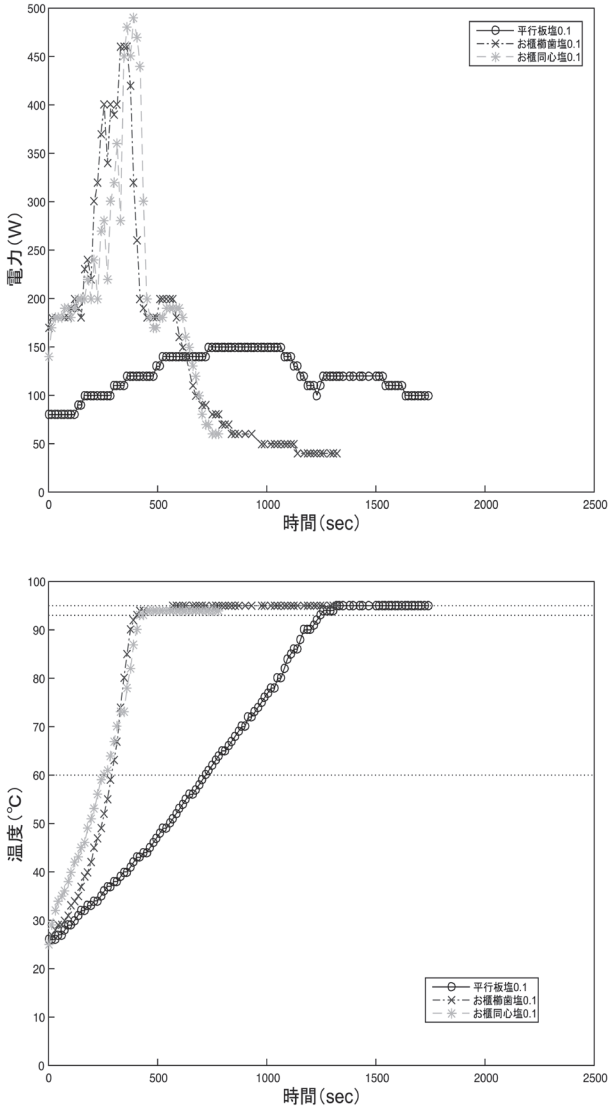


図 9.（左）お櫃型底置き同心円形炊飯器（自作）.（右）炊き上がり（23 分）.

に示す。図７における、立て型櫛の歯形、お櫃型櫛の歯形、お櫃型同心円形の第２ピーク（糊化の開始に伴う第１ピークはでない）の電流値の大きさは、表４に見るように極板間隔の対向距離の差による。主に、対向極板間隔内に電流は流れる。使用後の同心円形極板の中心部分の丸い極板を見ると、その円の周辺に放電の劣化が見られる（図９（左））。お櫃型同心円形の左右の２枚の極板は、左右同形ではない。このお櫃型同心円形の電流特性は、2013 年に行った「たからおはち」の再現実験 [3] と電流ピーク値、ピーク時刻位置も含め、ほぼ同じである。立て型櫛の歯形と、ピーク時刻位置は同じであるが、お櫃型では蒸発その後の電流が急激に下がる。お櫃型同心円形は、極板間隔の対向距離が長く 23 分で炊き上がるが、中央に丸い円形の極板が必要なので、この部分には熱源はできず、お櫃型櫛の歯形に比べても底全体で熱源が均等ではなく、均等に炊飯できない。お櫃型同心円形も、極板が底に配置されるので、沸騰の泡で電流が阻害され、50%程度ふらつく。熱効率もお櫃型櫛の歯形と同様の 82%である。図５の青○印の、立て型対向極板は電流は安定する。お櫃型は水道水でも実用になることを確認した。

さらに、炊飯時間の短縮のために、お櫃型底置きの櫛の歯形と同心円形で塩 0.1 g を入れた場合の電流特性を調べた。立て型の極板間隔 6 cm の対向極板（図 10 青○印）では、底置きにしなくても、0.1 g の塩を入れると 0.8 A 流れるので、これとお櫃型２



櫃型底置き櫛の歯形炊飯（×印）とお櫃型底置き同心円形炊飯（＊印）の電力値．（下）水温の時間変化．

つを比べた（図 10）。３つとも塩を入れると、水道水では第２ピークのみの１山だったものが、２山の電流特性になり、糊化開始に伴う第１ピークも現れ、最大となる。櫛の歯形（図 10 赤×印）も同心円形（図 10 緑＊印）も電流特性はほぼ同じとなり、ピーク電流は２倍になるが、熱効率は水道水と変わらず 80% 程度である。両形とも 19 分で炊ける。火力が強いので、10 分で沸騰しすぐ電流は下がる。0.1 g 塩を入れた立て型の対向極板（図 10 青○印）は、水道水の立て型の底置き櫛の歯形（図７青○印）とほぼ同じ電流形を示す。違いは、立て型対向極板の 0.1 g 塩は２山となり、その糊化開始に伴う最大第１ピークが、同じ立て型の水道水の底置き櫛の歯形の１山しかでない蒸発に伴う第２ピークに対応する事である（第１ピークはでない）。対向極板では、底置きのような、電流の不安定さはない。以上をまとめると、表５となる。初期電力は初期水温にもよるが、1 cm

表 5. 炊飯の各特性比較

	塩	完成	熱効率	ピーク	減水
立て対向	0. 4 g	23 min	71 %	390 W	30 %
立て短冊	0. 0 g	58 min	64 %	110 W	13 %
立て櫛歯	0. 0 g	29 min	72 %	160 W	13 %
立て対向	0. 1 g	28 min	70 %	150 W	14 %
お櫃櫛歯	0. 0 g	33 min	84 %	200 W	10 %
お櫃同心	0. 0g	23 min	82 %	240 W	10 %
お櫃櫛歯	0. 1 g	19 min	83 %	460 W	18 %
お櫃同心	0. 1 g	19 min	81 %	490 W	13 %

の極板間隔によって、10 W 強増える。お櫃型の方が立て型に比べ、内容積が狭いので熱効率が 15%上がる。電流ピーク値が上がれば、蒸発し減る水の量は多くなるが、熱効率はピーク値によっては決まらない。お櫃型については、底置き同心円形は、電流が早く立ち上がるので、水道水でも実用的であるが、底面積に対する 1 cm の極板間隔面積の比が、同心円形では 28%、櫛の歯形では 38%と小さくなる上、さらに、底面に対し均等に配置できないので、炊飯にはムラができやすい欠点がある。

水道水中の塩が及ぼす糊化と２山電流特性

電極式炊飯では、水道水のみでは糊化開始温度での第１ピークが現れず、蒸発による第２ピークの１山電流特性となり、塩を入れると、糊化の進行と塩が関係し２山の電流ピークが現れることが分かった。

この現象は同じく、小麦デンプンによる小麦粉（薄力粉）150 g、水 190 g だけの蒸しパンでも現れる。図 11 のように、立て型対向極板間隔 6 cm の場合（青○印）でも、立て型底置き短冊極板間隔 1 cm の場合（赤×印）でも蒸発に伴う第２ピークの１山電流ピークしか現れない。念のため、同じ小麦粉（強力粉）でさらに確認するために、立て型底置き櫛の歯形を使い、塩だけを 0 g にして水道水のみで作ったイースト発酵パン（残りの強力粉、ドライイースト、砂糖、無塩バター、水は同量）の実験を行った結果も、やはり、蒸発に伴う第２ピークの１山ピーク特性になった。このとき、58 分かかり食パンは出来上がり。18 g（18%）の水が減り、ピーク電流は 0.3 A、熱効率は 74 %となった。これらの事から、塩がなくても糊化は起こるが、塩が糊化の進行と関係し、２山のピークを作ることが分かった。電流が小さく火力が弱いので、１山電流特性になるのではない。

まとめ

すべてチタン１種極板を使った上で、電極式イースト発酵食パンは、熱効率がオーブン焙焼式に比べ改めて良いことを明らかにした。配合をおいしい食パン用に変えても、電流特性はほぼ変わらない。強力

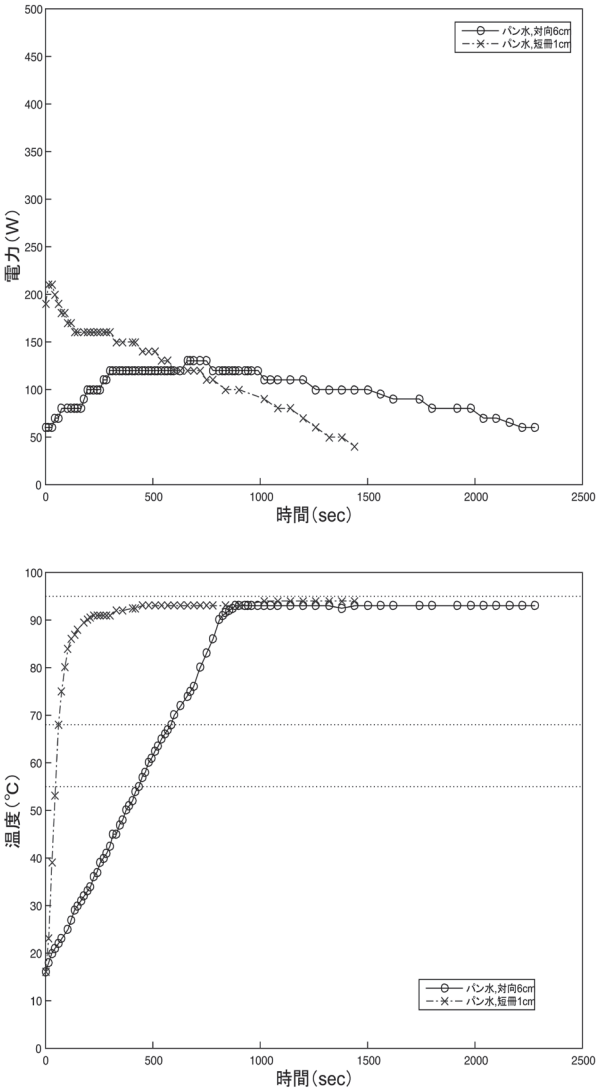


図 11.（上）水道水の立て型対向小麦水パン（○印）と立て型底置き短冊形小麦水パン（×印）の電力値 .（下）水温の時間変化 .

粉の糊化進行の温度帯は薄力粉に比べ 5℃下がる。

お櫃の底に、あるいは立て型の底に、極板を間隔が 1 cm 程度で、対向距離が長い形で配置すれば、水道水でも実用的に炊飯できることを確認した。立て型対向の塩 0.4 g 入れた基本炊飯同様に、23 分程度で炊飯できる。特に、お櫃型は、熱効率が 80%程度と良い。しかし、底置きは、沸騰時に気泡が極板に付き、電流が 50%程度ふらつき不安定になる上、熱源が底にしかなく、均等に炊飯できにくい。立て型対向は、電流の不安定もなく、横側面から均等に炊飯でき性能が良い。お櫃の底置きの櫛の歯形の左右 2 枚の極板は、左右対称に製作でき、製造面で利点もある上、同心円形より、底面に均等に配置でき、より均等に炊飯できる。

水道水による電極式の調理では、炊飯（米）でもパン（小麦）でも電流特性は、糊化開始が電流に影響せずに第 1 ピークは現れず、水の蒸発による第 2 ピークのみ現れ 1 山の推移を示す。水道水のみでも糊化は起こっているが、塩水にすると、糊化の進行と塩が関係し合い 2 山ピークが現れる電流特性となることを明らかにした。これは次のようになる。

1．糊化＋塩水＋析出＝ 2 山ピーク

2．糊化＋水道水＋蒸発＝ 1 山ピーク（第 2 のみ）

底置き型は電流上昇が急で下がるのも急である。立て型対向はゆっくり電流上昇しゆっくり下がる上、側面からの均等熱源であるので、ふくらし粉、発酵、卵のホイップによる泡などの手段により膨らませて食べる小麦粉食には向く。「電極式ケーキ」(図 12) も、立て型対向ならば完成することを確認した。この時、ケーキでは第 1 ピークのみ現れる 1 山となる。

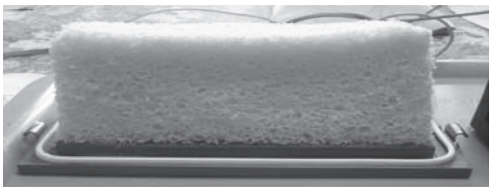


図 12. 全卵のホイップ生地に通電した「電極式ケーキ」.

謝辞

ケースの補充、極板の作成は、㈱三矢製作所の小原美千代氏にお願いした。イースト発酵パンおよびお櫃型炊飯については、熊谷家住宅の尾村七恵氏、昭和のくらし博物館の小泉和子館長、小林こずえ学芸員や愛媛県西予市宇和民具館の仙波香菜子氏にご意見をいただいた。愛媛新聞 2019 年 8 月 30 日付の宇和民具館実演記事において、森田康裕記者には「魔法の木の箱」という素敵な名前を付けていただいた。調布市郷土博物館の芝崎由利子氏と西予市教育委員会の高木邦宏氏には、お世話になった。軍装研究家の高橋昇氏には、貴重な資料を見せていただいた。三重大学教育学部の松岡守教授には、貴重なご指導とご指摘を頂き、東京薬科大学生命科学部の内田隆講師には、貴重な研究成果をお教えいただいた。また、再現実験の測定には、いつも青木浩美氏に付き合ってもらった。ここに感謝いたします。

文献

1) 青木　孝 (2018) 電極式パン焼き器を使った炊飯実験の特性理解. *神奈川大学理学誌* **29**: 5-12.
2) 青木　孝 (2019) 電極式調理の発明からパン粉へ続く歴史および再現実験. *神奈川大学理学誌* **30**: 9-16.
3) 長谷川能三 (2013) 電極式炊飯器とその再現. *大阪市立科学館研究報告* **23**: 25-30.
4) 陸軍糧秣本廠 (1939) *給養器具取扱説明書*.
5) 清水康夫 (1988) 通電式製パン法とチタン通電極板について. *食品と科学* **1988**(5): 114-117.
6) 阿久津正蔵 (1947) *パンの上手な作り方と食べ方*. 主婦之友社 , 東京.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：33-39 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

低次元シリコンカーバイドの Si 結晶構造依存性

水野智久 [1,3]　鮫島俊之 [2]　青木　孝 [1]

SiC Nano-Dots in Insulator and Semiconductor

Tomohisa Mizuno[1, 3], Toshiyuki Sameshima[2] and Takashi Aoki[1]

[1] Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan.
[2] Department of Electrical and Electronic Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture/Technology, Tokyo 184-8588, Japan.
[3] To whom correspondence should be addressed. E-mail: mizuno@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We experimentally studied the material structure and photoluminescence (PL) properties of SiC quantum-dots (QD) in a SiO_2 layer (Si^+/C^+-OX) fabricated by double hot-Si^+/C^+ ion implantation into SiO_2 and post N_2 annealing, comparing with those of SiC-dots by single hot-C^+ ion implanted oxide (C^+-OX) and crystal-Si layers (C^+-Si). X-ray photoemission spectroscopy for Si^+/C^+-OX confirmed Si-C bonds even in SiO_2, which is the direct verification of SiC formation in SiO_2. Moreover, transmission electron microscope analyses showed that 2-nm-diameter SiC-dots with clear lattice spots were successfully formed in Si^+/C^+-OX. After N_2 annealing, we demonstrated strong PL emission from Si^+/C^+-OX, and the PL intensity (I_{PL}) of Si^+/C^+-OX is approximately 2.6 and 12 times greater than those of C^+-Si and C^+-OX, respectively. The greater I_{PL} of Si^+/C^+-OX may be attributable to QD-induced PL-efficiency enhancement in Si^+/C^+-OX. Moreover, PL photon energy at the peak I_{PL} of Si^+/C^+-OX rapidly increases to approximately 2.4 eV after N2 annealing.

Keywords: SiC, quantum-dot, 3C-SiC, hexagonal-SiC, photoluminescence, Si-based photonics, quantum confinement, hot-ion implantation, oxide

序論

2 次元 Si（2D-Si）構造は、極微細 SOI (silicon-on-insulator)、FinFET[1] などの CMOS (complementary metal–oxide–semiconductor) 素子、及び Si 光素子 [2] に広く応用されている。SOI 素子においては、Si 膜厚 $d_S=L_{EFF}/3$（L_{EFF} は素子のチャネル長）に従って薄膜化するだけで短チャネル効果を抑制でき、その結果、SOI 素子は将来素子としても非常に有望と言われている [1]。しかし、d_S の薄膜化を続けると Si 格子定数程度まで薄膜化が進み、SOI は 2D-Si 構造となり、現在の 3D-Si とは物性が異なってくる [3-10]。従って、将来素子の特性を予測するには、2D-Si 構造の物性を解明する必要がある。また、高速 CMOS 素子実現には、(110) 面 CMOS や歪み Si 構造などの研究も進められている [1]。

2D-Si 層においては、電子の量子力学的閉じ込め効果により、電子移動度劣化の議論がされている [3]。更に、2D-Si を含めた低次元 Si においては、電子の量子力学的閉じ込め効果によりバンド構造が変調され、バンドギャップ E_G の増大も報告されている [4]。一方、低次元 Si 構造（Si ナノワイヤー、Si ドットなど）においては、量子的な閉じ込め効果による第一次近似以外のフォノンも活性化される [5]。これがフォノン閉じ込め効果である。その結果、半導体素子におけるキャリアのフォノン散乱確率が増えキャリア速度の劣化も予想されている [5]。

以上のように、2D-Si を含めた低次元 Si 研究は、微細素子実現のための実用的な目的のみならず、種々の量子的閉じ込め効果の実証という物性研究にとっても非常に重要である。我々は 2D-Si における量子閉じ込め効果を Raman 分光及び PL 法により、大きなフォノン閉じ込め効果及び E_G 増大効果を実験的に実証してきた [6-14]。

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

しかし、可視域から近紫外までの PL 発光を目指すには、更なる半導体の E_G の増大が必須である。そこで、単結晶 Si（c-Si）からアモルファス Si（a-Si）までの基板に C ホットイオン注入法を用いて SiC ドットを作製し、その大きな PL 発光を実証してきた [15-21]。しかし、E_G の小さい Si 層（$E_G \approx 1.1$ eV）中の大きな E_G を持つ SiC ドット（$E_G \approx 2.4$ eV）は量子ドットではないため、励起電子寿命が小さく PL 発光効率低下の原因となる。従って、SiC 量子ドット（QD）を実現し，その励起電子の閉じ込め効果による PL 発光効率の増大化が望まれる。

本報告においては、E_G の大きい Si 酸化膜（$E_G \approx 9$ eV）へのダブルホット Si^+/C^+ イオン注入を行い、SiC-QD 作成に成功したので報告する [22]。

材料と方法

SiC-QD 形成法

図 1 に示すように、Si 基板中の SiC ドット（図 1A）は量子ドットではないため、今回は、SiC の E_G より大きい Si 酸化膜中での SiC-QD 形成（図 1B）を目指した。SiC-QD では、励起電子の大きな量子閉じ込め効果により、励起電子寿命の増大化が起こり、PL 発光効率の改善が期待できる。

図 2 に示すように、Si 基板に形成した熱酸化膜層（SOX）（約 150 nm）（図 2A）へのダブルホット Si^+/C^+ イオン注入法（Si^+/C^+-OX と表示）（図 2B, C）

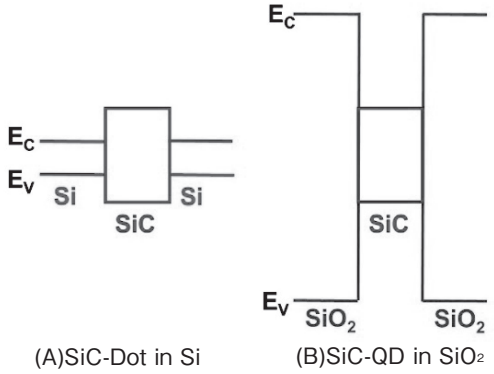


図 1. Si 中 (A)，及び Si 酸化膜中 (B) の SiC ドットのバンド構造比較．E_C 及び E_V は，それぞれ，伝導帯及び価電子帯レベルである．

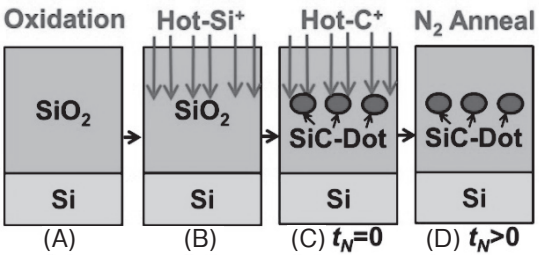


図 2. ダブルホット Si^+/C^+ イオン注入法を用いた SiC-QD の製造方法.

により、SiC-QD の形成を行った [22]。その後、図 2D に示すように、SiC-QD 形成促進のため、N_2 アニールを行った（アニール温度 T_N=1000℃）。ホットイオン注入温度 T は $400 \le T \le 900$℃の条件で、Si ドーズ量 $D_S = 6 \times 10^{16}$ cm^{-2}、C ドーズ量 $D_C = 4 \times 10^{16}$ cm^{-2} で行った。また、このダブルホット Si^+/C^+ イオン注入試料との比較として、酸化膜へのシングルホット Si^+ を行った試料（Si^+-OX と表示）及びシングルホット C^+ を行った試料（C^+-OX と表示）も作製した。更に、通常の c-Si へのシングルホット C^+ を行った試料（C^+-Si と表示）の SiC ドットとの比較も行った。

フォノン評価用 UV-Raman 分光、及び PL 特性は波長 325 nm レーザー光を用いた。レーザビーム径は 1 μm、レーザパワーは約 0.6 mW である。更に、広帯域 PL 発光強度は、標準光により補正を行った。

結果と討論

SiC-QD の構造解析

最初に、XPS（X 線光電子分光）の C1s スペクトル解析による酸化膜中の Si-C 及び C-C 結合の C 濃度深さ分布を図 3 に示す。予想通り、Si-C 及び C-C 結合の C 濃度は酸化膜中央付近にピークを持ち、それぞれ約 4.3 及び 1.5 原子％であった。従って、C 原子の約 80％は Si 原子と結合し、SiC 形成を確認できた。C 原子の残りの 20％は酸化膜中で析出していることが判明した。

また、図 4A 及び図 4B は、酸化膜中の断面 SiC-QD の、それぞれ HAADF-STEM（高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡）及び CSTEM（球面収差補正走査透過型電子顕微鏡）観察結果である。図 4A 中の多数ある白色のドットが SiC-QD である。SiC-QD の密度 N は約 5×10^{11}cm^{-2} である。また、図

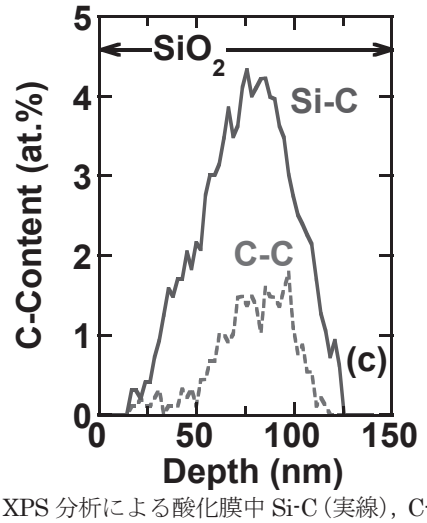


図 3. XPS 分析による酸化膜中 Si-C（実線），C-C 結合（破線）の C 濃度の深さ分布．なお T = 600℃，T_N = 1000℃，$D_S = 6 \times 10^{16}$ cm^{-2}，$D_C = 4 \times 10^{16}$ cm^{-2}，t_N = 30 分.

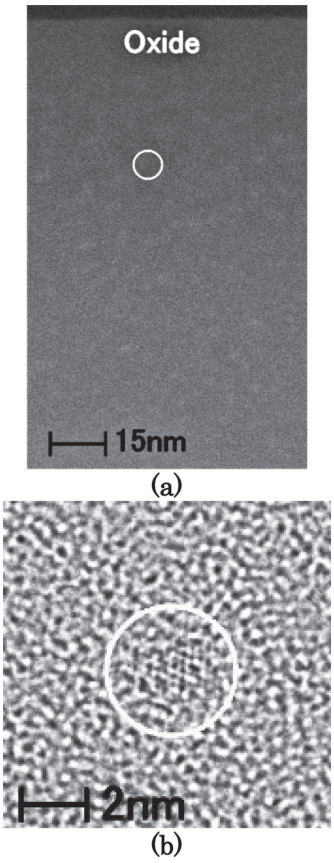


図 4. HAADF-STEM(A) 及び CSTEM(B) による酸化膜中 SiC-QD（丸内）断面図．なお，t_N= 30 分，T = 400℃，T_N = 1000℃，D_S= 6 × 10^{16} cm^{-2}，D_C= 4 × 10^{16} cm^{-2}.

4B から、酸化膜中に格子パターンが確認でき、SiC-QD 径 R は約 1.6 nm である。従って、電子顕微鏡観察からも酸化膜中に SiC-QD がダブルホット Si^+/C^+イオン注入法により形成できたことが実証された。Si 基板へホット C^+イオン注入法による SiC ドット同様に [19]、酸化膜に注入された Si 及び C 原子のナノレベルでは自己整合的にクラスター化し、局所的に原子の高濃度化に起因して SiC-QD 形成が促進されると思われる。

図 5 に、STEM（走査型透過電子顕微鏡）による SiC-QD の径 R と、密度 N の T 依存性を示す。両者とも大きく T に依存し、T とともに R は微細化し、その結果 N は増大することが判明した。

Raman 特性

図 6 に、Si^+/C^+-OX 中の SiC-QD の UV-Raman 特性と、C^+-Si 中の通常 SiC ドットとの比較を示す。図中の矢印は、それぞれ波数の低い方から TO モード（Si-C 振動）、T（a-C の C-C 振動）、D（欠陥グラファイトの C-C 振動）、及び G バンド（グラファイトの C-C 振動）を示す。TO モードから両者とも SiC 形成が確認できた。両者の大きな違いは、T 及び G バンド

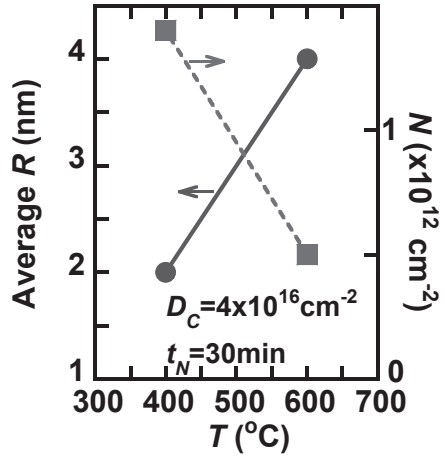


図 5. SiC-QD の平均 R（丸印）及び N（四角印）の T 依存性．t_N= 30 分，T_N= 1000℃，D_S= 6 × 10^{16} cm^{-2}，D_C= 4 × 10^{16} cm^{-2}.

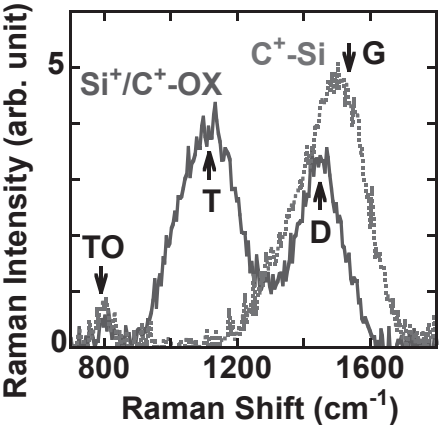


図 6. UV-Raman スペクトル比較．Si^+/C^+-OX（実線：D_S = 6 × 10^{16} cm^{-2}），及び C^+-Si（破線）．D_C= 4 × 10^{16} cm^{-2}，t_N=0.

特性にあり、Si^+/C^+-OX でのアモルファス酸化膜中で析出した C 原子は a-C 及び欠陥グラファイトを形成しているが、C^+-Si での結晶 Si で析出した C 原子は D バンド以外に G バンドのグラファイトを形成し、結晶性が良いことが判明した。

SiC-QD からの PL 発光

図 7 に、の Si^+/C^+-OX、C^+-OX、及び Si^+-OX での UV 可視域での PL スペクトル特性比較を示す。ダブルホットイオン条件の SiC-QD のみ大きな PL 発光を示し、Si^+-OX では UV 可視域での PL 発光しないことがわかった。従って、ダブルホットイオンによって酸化膜中に形成された SiC-QD からの大きな PL 発光が実証された。

PL 発光モデル [22]

ここで、SiC-QD と Si 中 SiC ドットからの PL 強度 I_{PL} のモデルを述べる。

ある材料の深さ x でのレーザ入射励起光強度 I_{EX}(x)

は、

$$I_{EX}(x) = I_0 \exp(-x/\lambda_{EX}) \quad (1)$$

ここで、I_0 は材料表面での光量、λ_{EX} はその侵入長である。

最初に、一般的な SiC ドットに関する議論をする。材料の深さ x_1 から x_2 までの間で SiC ドットの N が均一に形成されているとすると、I_{PL} は SiC ドットの励起光視野中の総合面積 A_T に比例する。SiC-QD の場合、$E_G \approx 9$ eV の酸化膜中では、325 nm の励起光では $\lambda_{EX} \approx \infty$。よって、(1) 式の $I_{EX}(x) = I_0$。従って、

$$I_{PL} = \eta_{OX} A_T \int_{x_1}^{x_2} I_{EX}(x)dx = \eta_{OX}\pi\left(\frac{R}{2}\right)^2 N_s \; I_0(x_2 - x_1) = \eta_{OX} I_0 A_{TO} \quad (2)$$

ここで、η_{OX} は SiC-QD の発光効率、SiC-QD の総合面積 A_{TO} は式 (3) の通りである。図 4A の結果より、$x_1 = 20$ nm、$x_2 = 120$ nm。

$$A_{TO} = \pi\left(\frac{R}{2}\right)^2 N_s \; (x_2 - x_1) \quad (3)$$

$$x_2 - x_1 \approx 100 \text{ nm} \quad (4)$$

一方、Si 中の SiC ドットの場合、TEM 観察より、$x_1 = 0$、及び $x_2 = 50$ nm であることがわかっている[21]。更に、325 nm の励起光の Si 中では $\lambda_{EX} \approx 8$ nm。従って、Si 中の SiC ドットの I_{PL} は次式のようになる。

$$I_{PL} = \eta_{Si} A_T \int_{x_1}^{x_2} I_0 \exp\left(-\frac{x}{\lambda_{EX}}\right)dx = \eta_{Si}\pi\left(\frac{R}{2}\right)^2 N_s \; I_0\lambda_{EX}\left(1 - \exp\left(-\frac{x_2}{\lambda_{EX}}\right)\right) \approx \eta_{Si}\pi\left(\frac{R}{2}\right)^2 N_s \; I_0\lambda_{EX} = \eta_{Si} I_0 A_{TS} \quad (5)$$

ここで、η_{Si} は Si 中の SiC ドットの発光効率、$\exp(-x_2/\lambda_{EX}) \approx 0$ より、SiC ドットの総合面積 A_{TS} は式 (6) の通りである。

$$A_{TS} = \pi\left(\frac{R}{2}\right)^2 N_s \; \lambda_{EX} \quad (6)$$

$$\lambda_{EX} \approx 8 \text{ nm} \quad (7).$$

SiC-QD の PL 特性の特徴

次に、SiC-QD からの PL 発光の N_2 アニール効果について議論する。SiC-QD からのピーク PL 強度 I_{MAX} の t_N 依存性を図 7 に示す。$t_N = 5$ 分の短時間 N_2 アニールにより I_{MAX} が十数倍もの飛躍的に増大しているのがわかる。一方、I_{MAX} は T にも大きく依存し、T の低温化とともに増大している。なお、$T = 900$℃での大きな I_{MAX} の低下は、Raman 特性（T = 900℃での T 及び D バンド強度の劣化）により、高温 T プロセス中での注入 C 原子の酸化膜からの抜けが原因と思われる。

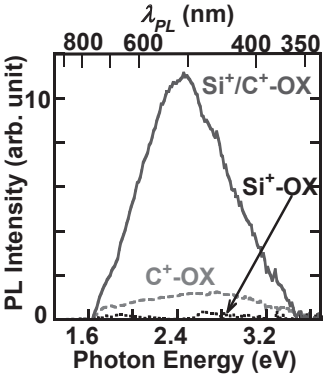


図 7. PL スペクトル比較. Si^+/C^+-OX（実線：$D_S = 6 \times 10^{16}$cm^{-2}, $D_C = 4 \times 10^{16}$ cm^{-2}）、C^+-OX（破線：$D_C = 4 \times 10^{16}$ cm^{-2}）, Si^+-OX（点線：D_S=6 × 10^{16} cm^{-2}）. $T = 600$℃、$T_N = 1000$℃, $t_N = 30$ 分.

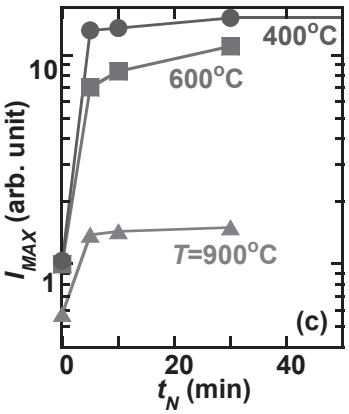


図 8. Si^+/C^+-OX における I_{MAX} の t_N 依存性. $T = 400$℃（丸印）, 600℃（四角印）, 900℃（三角印）. $D_S = 6 \times 10^{16}$ cm^{-2}, $D_C = 4 \times 10^{16}$ cm^{-2}, $T_N = 1000$℃ .

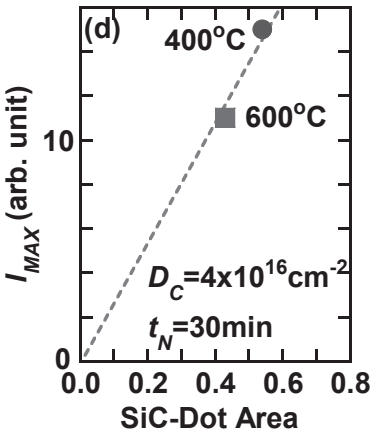


図 9. 図 8 の I_{MAX} の SiC ドット面積 A_{TO} (式 (3)) 依存性 .T = 400℃（丸印）, 600℃（四角印）. ここで、破線はデータの近似直線.

ここで、前節の PL モデルに従って I_{MAX} の T 依存の機構について議論する。図 5 の R と N の T 依存性から、式 (3) での A_{TO} を求めることが出来る。その結果、T = 400℃及び 600℃での A_{TO} は、それぞれ 0.54 及び 0.43 と求められた。その結果、I_{MAX} の A_{TO} 依存

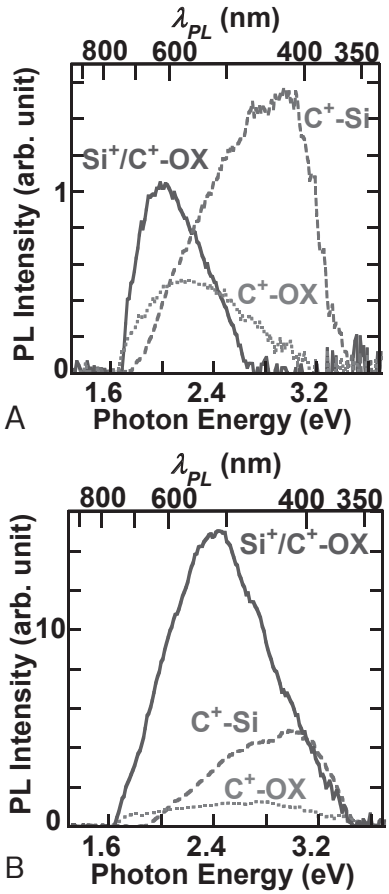


図 10. PL スペクトルの構造依存性（各最適プロセス条件下）．$D_C = 4 \times 10^{16}$ cm^{-2}．(A) アニール前、(B) アニール後。実線，破線、点線はそれぞれ Si$^+$/C$^+$-OX（T = 400℃，D_S = 6×10^{16} cm^{-2}，t_N = 30 分），C$^+$-Si（T = 600℃，t_N = 5 分），C$^+$-OX（T = 600℃、t_N = 30 分）のデータである．

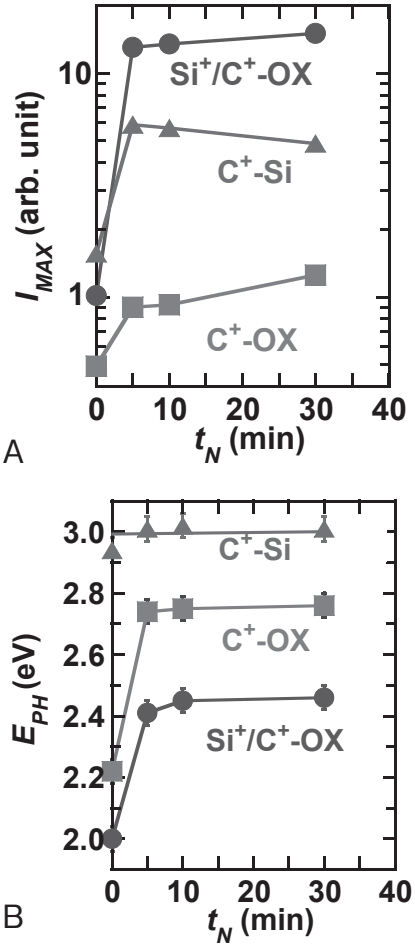


図 11. 3 つの基板構造における (A)I_{MAX} 及び (B)E_{PH} の t_N 依存性．$D_C = 4 \times 10^{16}$cm^{-2}．丸印，四角印，三角印は，それぞれ Si$^+$/C$^+$-OX（T = 400℃，$D_S = 6 \times 10^{16}$ cm^{-2}、t_N = 30 分），C$^+$-Si（T = 600℃，t_N = 5 分），C$^+$-OX（T = 600℃，t_N = 30 分）のデータである．

性を図 9 に示す。実験的にも、式（2）の $I_{MAX} \propto A_{T0}$ が確認でき、PL モデルが実証された。従って、図 8 の T の低温化とともに I_{MAX} が増大するのは、A_{T0} の増加に起因することが判明した。

次に、PL 特性のイオン注入基板構造依存性の議論する。図 10 は Si$^+$/C$^+$-OX(実線)、C$^+$-OX(点線)、及び C$^+$-Si（破線）における PL スペクトル比較である。PL スペクトルは大きく基板構造に依存し、N_2 アニール後では Si$^+$/C$^+$-OX の SiC-QD の PL 強度は C$^+$-Si 中の SiC ドットの数倍に達することが実証された。

更に、図 11A 及び B に I_{MAX} 及び I_{MAX} での発光エネルギー位置 E_{PH} の t_N 依存性を示す。N_2 アニール後では、SiC-QD の I_{MAX} は Si 中 SiC ドットの 2 倍以上であり、t_N とともに徐々に増大している。一方、N_2 アニール前では、SiC-QD の I_{MAX} は Si 中 SiC ドットより約 30%低い。また、図 11B より、SiC-QD の E_{PH} は、t_N = 5 分で 2 eV から急激に増大して約 2.4 eV になる。この値は、3C-SiC の E_G に相当し、その結果、N_2 アニールによって酸化膜に注入された Si 原子と C 原子が混晶状態から結合して 3C-SiC を形成したものと考えられる。一方、Si 中 SiC ドットの E_{PH} は、ほぼ 3 eV で一定であり、ホットイオン注入直後から Si 中で主に六方晶の SiC が形成されたと思われる。

SiC-QD での PL 発光効率増大効果

最後に、SiC ドットの QD 化による PL 発光効率増大効果の有無について議論する。

PL 発光モデル式 (2) 及び (5) によれば、SiC-QD と SiC ドットの I_{MAX} はそれぞれの総合面積に比例する。そこで、図 9 のように SiC-QD と SiC ドットの総合面積を TEM 像から求める。前述のように SiC-QD の $A_{T0} \approx 0.54$、SiC ドットの $A_{TS} \approx 0.5$[22] であったので、両者でほぼ同等であった。図 12 に I_{MAX} の SiC ドット面積依存性を示す。明らかに、同じ SiC ドット面積においても SiC-QD の I_{MAX} は SiC ドットの約 2.5 倍であることが判明した。従って、式 (2) と (5) の PL 発光効率は SiC-QD のほうが約 2.5 倍だけ SiC ドットより大きいと言える。これは、図 1 に示すよ

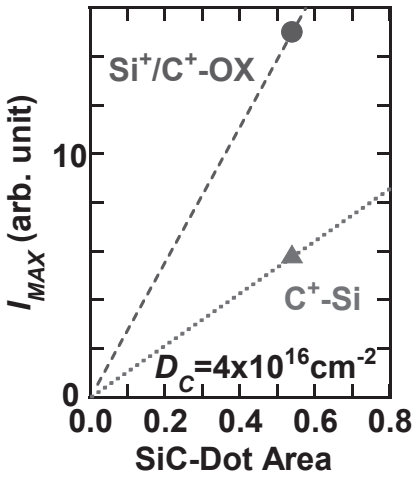


図 12. Si^+/C^+-OX（丸印）及び C^+-Si（三角印）における I_{MAX}（図 9B）の SiC ドット面積依存性．Si^+/C^+-OX では T = 400℃、$D_S = 6 \times 10^{16}$ cm^{-2}、t_N = 30 分．C^+-Si では T = 600℃、t_N = 5 分．

うに、SiC-QD における励起電子の閉じ込め効果による寿命が長いことに起因すると思われ、当初の目的である SiC-QD の PL 発光効率増大効果が達成できた。

結論

Si 酸化膜中の SiC ドットの量子ドット化による PL 発光強度の増大を目的とした研究を行った。

Si 酸化膜中の SiC-QD の形成法は非常に簡易で、E_G の大きな酸化膜へのダブルホット Si^+/C^+ イオン注入法とその後の N_2 アニールを用いた。TEM 観察により酸化膜中に 2 nm 程度の粒径の SiC 量子ドットを 10^{12} cm^{-2} 程度の密度で実証できた。更に、立方晶及び六方晶の SiC ポリタイプを確認できた。

UV-Raman 観測により、Si-C 振動モードの TO バンド、C-C 振動モードの T, 及び D バンドを確認できた。

Si 中 SiC ドットより数倍大きな PL 発光を観測し、これは SiC-QD における励起電子の閉じ込め効果による発光効率の増大に起因すると思われる。このように、SiC-QD は発光素子構造として有望な構造と思われる。

謝辞

本研究の一部は、科研費（17K06359）及び神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金（RIIS201911）の援助を受けた。

文献

1) Nazarov A, Colinge JP, Balestra F, Raskin JP, Gamiz F and Lysenko VS (2011) *Semiconductor-On-Insulator Materials for Nanoelectronics Applications.* Springer, Berlin.
2) Saito S, Sakuma N, Suwa Y, Arimoto H, Hisamoto D, Uchiyama H, Yamamoto J, Sakamizu T, Mine T, Kimura S, Sugawara T, Aoki M and Onai T (2008) Observation of optical gain in ultra-thin silicon resonant cavity light-emitting diode. IEDM Tech. Dig. Paper **19.5**: pp.1-4.
3) Uchida K, Koga J and Takagi S (2007) Experimental study on electron mobility in ultrathin-body silicon-on-insulator metal-oxide-semiconductor field-effect transistors. *J. Appl. Phys.* **102** (074510): 1-8.
4) Agrawal BK and Agrawal S (2000) First-principles study of one-dimensional quantum-confined H-passivated ultrathin Si films. *Appl. Phys. Lett.* **77**: 3039-3041.
5) Kumar V (2008) *Nanosilicon*. Elsevier, Amsterdam.
6) Mizuno T, Tobe K, Maruyama Y and Sameshima T (2012) Experimental study of silicon monolayers for future extremely thin silicon-on-insulator devices: phonon/band structures modulation due to quantum confinement effects. *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**(02BC03): 1-8.
7) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on surface-orientation/strain dependence of phonon confinement effects and band structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **52**(04CC13): 1-8.
8) 水野智久，青木　孝，鮫島俊之 (2013) 低次元シリコン半導体構造の研究．*神奈川大学理学誌* **24**: 17-24.
9) 水野智久、青木　孝、鮫島俊之　(2014)　二次元シリコン半導体基板の物性研究．神奈川大学理学誌 pp. 23-30.
10) 水野智久，前田辰郎，多田哲也，青木　孝 (2015) 二次元半導体デバイスの研究．*神奈川大学理学誌* **25**: 33-39.
11) Mizuno T, Nagata Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Crystal direction dependence of quantum confinement effects of two-dimensional Si layers fabricated on silicon-on-quartz substrates: modulation of phonon spectra and energy-band structures. *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**(04EC08): 1-6.
12) Mizuno T, Nakahara Y, Nagata Y, Suzuki Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Quantum confinement effects in doped two-dimensional Si layers: novel device design for two-dimensional pn-junction structures. *Jpn, J. Appl. Phys.* **53**(04EC09): 1-7.
13) Mizuno T, Nagamine Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Sameshima T (2015) Impurity doping effects on impurity band structure modulation in two dimensional n^+ and p^+ Si layers for future CMOS, *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**(04DC05): 1-6.
14) Mizuno T, Suzuki Y, Nagamine Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Maeda T (2015) Surface-oxide stress induced band-structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**(04DC02): 1-6.
15) Mizuno T, Nagamine Y, Omata Y, Suzuki Y, Urayama W, Aoki T and Sameshima T (2016) C-atom-induced bandgap modulation in two-dimensional (100) silicon carbon alloys, *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**(04EB02): 1-8.
16) 水野智久，前田辰郎，青木　孝，鮫島俊之 (2016) 可視域シリコン発光素子の開発，*神奈川大学理学誌*. **27**: 15-21.

17) Mizuno T, Omata Y, Nagamine Y, Aoki T and Sameshima T (2017) Material structure of two-/three-dimensional Si-C layers fabricated by hot-C+-ion implantation into Si-on-insulator substrate. *Jpn. J. Appl. Phys*. **56**(04CB03): 1-8.
18) Mizuno T, Nakada S, Yamamoto M, Irie S, Omata Y, Aoki T and Sameshima T (2017) SiC nano-dots in bulk-Si substrate fabricated by Hot-C+-Ion implantation technique. *Ext. Abstr. Solid State Devices and Materials*. pp.597-598.
19) Mizuno T, Omata Y, Kanazawa R, Iguchi Y, Nakada S, Aoki T and Sasaki T (2018) Nano-SiC region formation in (100)Si-on-insulator substrate: Optimization of hot-C+-ion implantation process to improve photoluminescence intensity. *Jpn. J. Appl. Phys*. **57**(04FB03): 1-9.
20) Mizuno T, Kanazawa R, Aoki T and Sameshima T (2019) SiC nano-dot formation in amorphous-Si and poly-Si substrates using hot-C+-ion implantation technique. *Jpn. J. Appl. Phys*. **58**(SBBJ01): 1-10.
21) Mizuno T, Yamamoto M, Nakata S, Irie S, Aoki T and Sameshima T (2019) SiC nano-dot formation in bulk-Si substrate using hot-C+-ion implantation process. *Jpn. J. Appl. Phys*. **58**(081004): 1-12.
22) Mizuno T, Kanazawa R, Aoki T and Sameshima T (2020) SiC quantum dot formation in SiO_2 layer using double hot-Si^+/C^+-Ion implantation technique. *Jpn. J. Appl. Phys*. **59**(SGGH-02): 1-12.
23) Fan J and Chu PK (2014) *Silicon Carbide Nanostructure*. Springer, Cham.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：41-51 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

IIa 型 CVD ダイヤモンド基板に *n* 型ドーパント元素をイオン注入しポストアニールによって形成した電気伝導層の電気特性

中田穣治 [1, 2]　稲垣俊哉 [1]　関　裕平 [1]　星野　靖 [1]

Electrical Properties of IIa-Type Diamond Substrates Implanted with *n*-Type Dopant Elements and Those After Annealing

Jyoji Nakata[1, 2], Toshiya Inagaki[1], Yuhei Seki[1] and Yasushi Hoshino[1]

[1] Department of Mathematics and Physics, Fuculty of Science , Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] To whom correspondence should be addressed, E-mail: nakatj01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We measured sheet resistances of IIa-type diamond substrates implanted with P ions at a 900℃ substrate temperature and room temperature (RT). Also, O ions were implanted at RT only. P and O elements have been considered possible donor candidates in diamond substrates. However, there has been no report on successfully achieving *n*-type conductivity using ion implantation methods in reproducible and reliable ways. Electrical measurements were performed just after implantation and after subsequent annealing at 1150℃ and 1300℃. Concerning P-implanted samples at 900℃ , we recorded activation energy of 0.6 eV for samples after implantation and after 1150℃ post-annealing with flat and average concentrations of 5.0×10^{19}/cm^3 and 5.0×10^{20}/cm^3. This 0.6 eV value was obtained within a 300~600℃ temperature range and corresponded to marked P activation energy. Concerning O-implanted samples at RT, sheet resistances show higher values with increasing but not decreasing temperatures. This hysteresis phenomenon also appeared in RT P-implantation cases. It can be concluded that in both P and O RT-implanted cases, defects introduced during implantation would be annealed during sheet resistance measurements in the increasing temperature stage. It is suggested that 900℃ implantation is favorable for RT implantation, in the sense of achieving activation energy of 0.6 eV , which is thought to be the ionization energy of P-implanted samples. However, in almost all samples measured in the present experiments, we cannot judge *n*-type conduction by Hall Effect measurements. This fact strongly suggests that hopping conduction occurred in the sub-band formed in the wide band gap in the diamond substrate. It is suggested that this sub-band is formed by secondary defects consisting of stacking faults or dislocations resulting from primary defects of vacancies and interstitials introduced by RT ion implantation. It is proposed that the IBIEC (Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization) method is favorable to any other annealing method such as furnace annealing, rapid thermal annealing, and electron or laser beam annealing, in order to reduce secondary defects that might cause the formation of a conductive sub-band in the wide-band gap of the diamond substrates. This is because IBIEC is a low-temperature annealing method involving a non-equilibrium process. Low temperature decreases the formation of secondary defects, resulting in reducing the formation of conductive sub-bands. Eventually, hopping conduction would not occur, and *p*-type or *n*-type conduction might be expected . It is concluded that fundamental and basic research is needed on the mechanism of defect formation during ion implantation into diamond substrates, and on the mechanism of secondary defects during electrical measurement and annealing.

Keywords: ion implantation, diamond, hopping conduction, ion-implanted defects

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

序論

現代社会は電力によって成り立っている。スマートフォンをはじめ、テレビや冷蔵庫といった家電、車や電車、飛行機などの輸送機器など、身の回りの多くの製品が電力によって動作している。しかし、電力に頼りすぎた結果、地球温暖化などの環境問題や、石油や天然ガスの枯渇といったエネルギー問題が取り上げられ、省エネが叫ばれるようになっている。そこで注目されているのが、パワーエレクトロニクスがある。パワーエレクトロニクスとは、主に電力変換や制御、輸送、供給などに関わる技術であり、近年の高密度記録、エンジン制御、移動体通信等の技術進歩に伴い、盛んに研究が続けられている。パワーエレクトロニクスのシステム構築に大きな役割を果たしているのが、半導体パワー電子デバイスである。この電子デバイスの基板として今まで Si が用いられてきた。しかし、Si そのものの性能限界が近づいてきており、Si パワー電子デバイスのさらなる改良は困難であると考えられている。そこで、新たな半導体素材としてワイドギャップ半導体が注目されている。

ワイドギャップ半導体とは、Si よりもバンドギャップが大きい半導体の総称である。主なワイドギャップ半導体には、SiC や GaN、ダイヤモンドが挙げられる（図 1）。特にダイヤモンドは、広いバンドギャップ、高熱伝導率、高い絶縁破壊電界、高キャリア移動度など、ワイドギャップ半導体の中でも多くの優秀な物性を持っているため、次世代型パワー電子デバイス素材として期待されているが、実用化への課題が多いのが現状である。

ダイヤモンド半導体実用化への課題の 1 つに、不純物導入がある。半導体内に不純物を導入する方法は、CVD (Chemical Vapor Deposition) での成膜中に不純物ガスを用いるか、イオン注入によって基板内に直接イオンを打ち込むかの 2 通りがある。CVD 法では、PH_3（ホスフィン）を不純物ガスとして導入して作製した *n* 型ダイヤモンド半導体が、ホール効果測定より *n* 型伝導が確認されている [1)]。しかし、CVD 法では素子の微細化や複雑な導入層の形成、不純物濃度の調節が難しい。一方、イオン注入では、注入による結晶欠陥や導入した不純物の電気的活性化が難しいといったことから、*n* 型伝導の報告はされていない。しかし、注入領域や注入量の制御がしやすい、不純物がガスでなくても注入が可能であることから、ダイヤモンド半導体の実用化には必要不可欠な技術である。課題である注入欠陥の低減や導入した不純物の活性化には、高温イオン注入やポストアニール処理が有効であると考えられている。

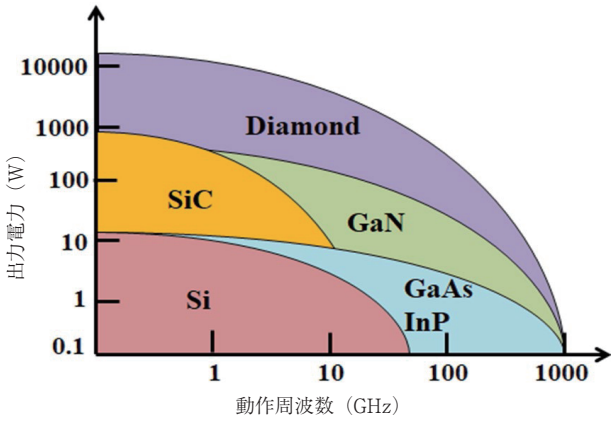


図 1. 各種半導体の動作領域.

本研究室の最終目的は、高品質ダイヤモンド基板にイオン注入とポストアニールによって、基板に導入した不純物の電気的活性化を図ることである。今まで注入欠陥の低減と導入した不純物の置換や活性化を狙い、Element Six 社製タイプ IIa 型 CVD ダイヤモンド基板に対し、基板温度を高温の 900℃にしてイオン注入とポストアニールによってダイヤモンド半導体を作製している。しかし、B 注入実験で基板温度室温でのイオン注入でも非常に良好な結果が得られた [2, 3)]。

そのため本研究では、基板温度を室温と 900℃に保ってイオン注入した。ポストアニール温度は 1150℃と 1300℃で、注入イオン種は *n* 型の代表的なドナー元素である P または O を平坦な平均濃度が $1,2,5 \times 10^{19}/cm^3$ になるようにイオン注入した。その後電気特性評価を行なった。

材料と方法

P, O イオン注入とポストアニールの条件および電気的測定方法

測定した基板は、Element Six 社製タイプ IIa 型 CVD ダイヤモンドを使用した。この基板に対し、基板温度を室温または 900℃で、P または O イオン注入を行った。基板表面から深さ 100 nm まで注入したドーパント濃度を一定にするため多段注入を行なった。多段注入によって伝導層に幅を持たせた理由は、伝導層の厚さを定義するためと、伝導層を広くすることで電流を流しやすくするためである。

イオン注入時の注入エネルギーとドース量を決定するため、TRIM シミュレーションを行った。図 2 に P 注入の TRIM シミュレーション結果、図 3 に O 注入の TRIM シミュレーション結果を示す。P 注入では、基板表面から深さ 100 nm まで、平坦な平均 P 濃度が $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ と $5.0 \times 10^{20}/cm^3$ での 900℃注入と、$1.0 \times 10^{19}/cm^3$ での室温注入を行なった。

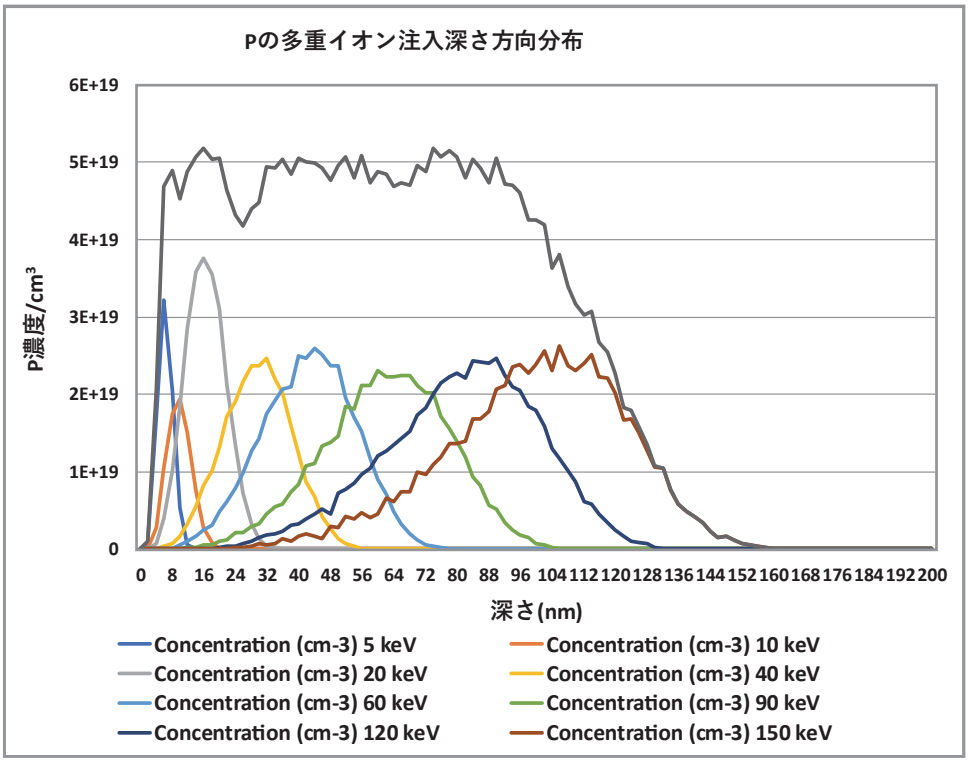


図 2.　P^+ を 5~150 keV でダイヤモンド基板へ注入した時の注入イオンの深さ方向分布.

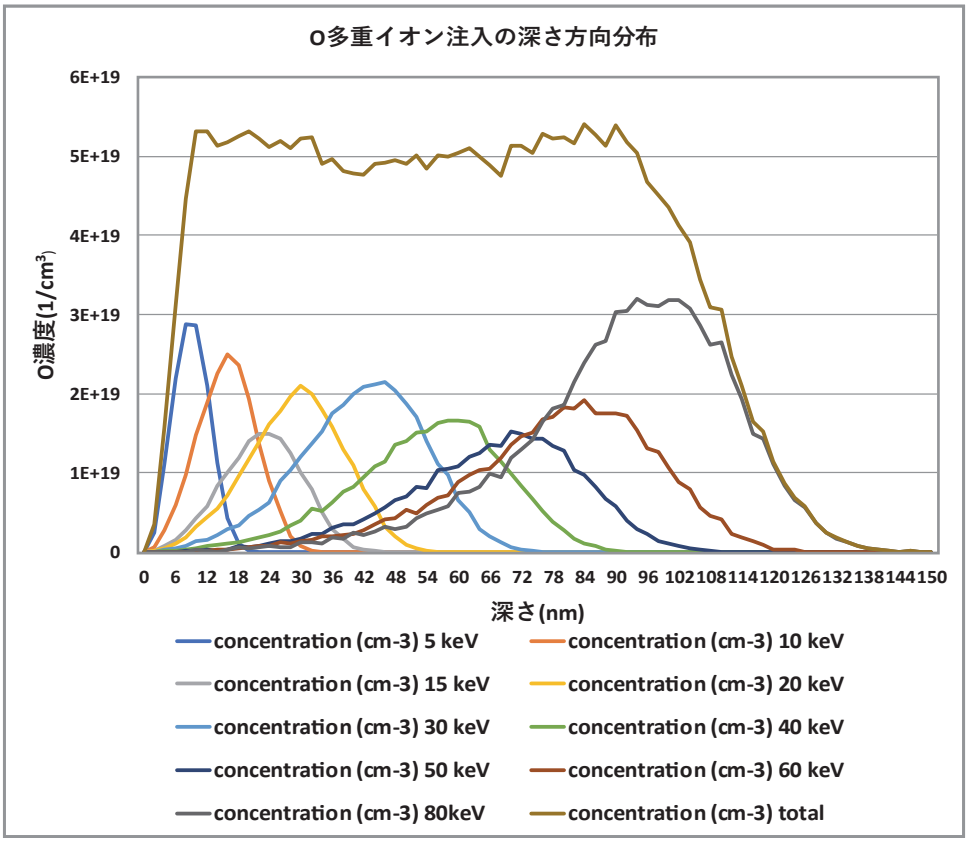


図 3.　O^+ を 5~80 keV でダイヤモンド基板へイオン注入した時の注入イオンの深さ方向分布.

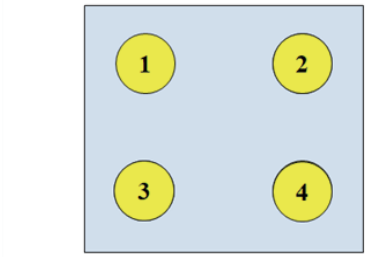


図 4. 電極配置平面図.

O 注入では基板表面から深さ 100 nm まで、平坦な O 濃度が $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ の室温注入を行った。P 注入後アニール前と O 注入後アニール前において、電極オーミック性向上のため、電極下部に対し最表面のドーパント濃度が $1.0 \times 10^{20}/cm^3$ になるように、5 keV で P と O の追加注入を行った。イオン注入後、Ar 雰囲気下でポストアニールを行うが、そのままアニールすると、注入欠陥が回復せずに炭化する恐れがあるため、SiO_2 膜をスパッタで 100 nm 程度蒸着し、Ar 雰囲気でアニールした。アニール後、基板表面の SiO_2 膜フッ酸処理で除去して、混酸、アルカリ洗浄、超音波洗浄によって基板表面を清浄化した。その後、マグネトロンスパッタ装置で、基板温度 400℃で Au/Pt/Ti(200/50/50 nm) の断面構造を持つ電極を基板表面に図 4 に示す平面配置で形成した。本研究では、Resi Test 8300 ホール効果測定装置 (東陽テクニカ) を用いて電気特性を評価した。この装置での電気特性評価は Van der Pauw 法で行うので、図 4 に示した 4 個の電極配置で、各電極間の I-V 特性（オーミック特性）測定、シート抵抗測定、ホール効果測定を行なった。

結果と討論

900℃注入 P 濃度 $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ のシート抵抗とホール効果の測定結果

図 5 に平坦な平均 P 濃度が $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ になるように 900℃で注入を行ったダイヤモンド基板のシート抵抗の絶対温度依逆数存性を示す。電気特性評価は、初めに室温測定を行った後に 800℃まで昇温し、その後 700℃……100℃と 100℃づつ降温して最後に室温での測定を再度行なった。未注入基板のシート抵抗よりも 900℃で平均 P 濃度 $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ 注入した直後の方がシート抵抗の値が減少した。900℃注入直後と 1150℃アニール後ではほとんど同様なシート抵抗値の値であった。これは注入温度がポストアニール温度と大きな差はないため、注入中にアニールされたものと思われる。さらに 300~600℃のシート抵抗測定温度範囲において、測定した絶対温度の逆数依存性の傾きから P の活性化エネルギーを求めると 0.6 eV という値が求められた。この活性化エネルギーの値は従来 CVD 法で P ドープした場合の活性化エネルギーの値とほぼ同じであった。しかしホール効果測定では *n* 型の判定はできなかった。このことに関しては、この条件下での P イオン注入においては、P がたとえ置換位置に導入されても注入中またはポストアニール中に 2 次欠陥（転移や積層欠陥）由来で形成されたサブバンドが伝導帯直下に形成された可能性がある。そのサブバンド中を電子キャリアが何らかのホッピング伝導を起こし、それ故に磁場鈍感になって、ホール効果が顕現しなかったのではないかと推量している。今後の重要な検討課題の一つである。

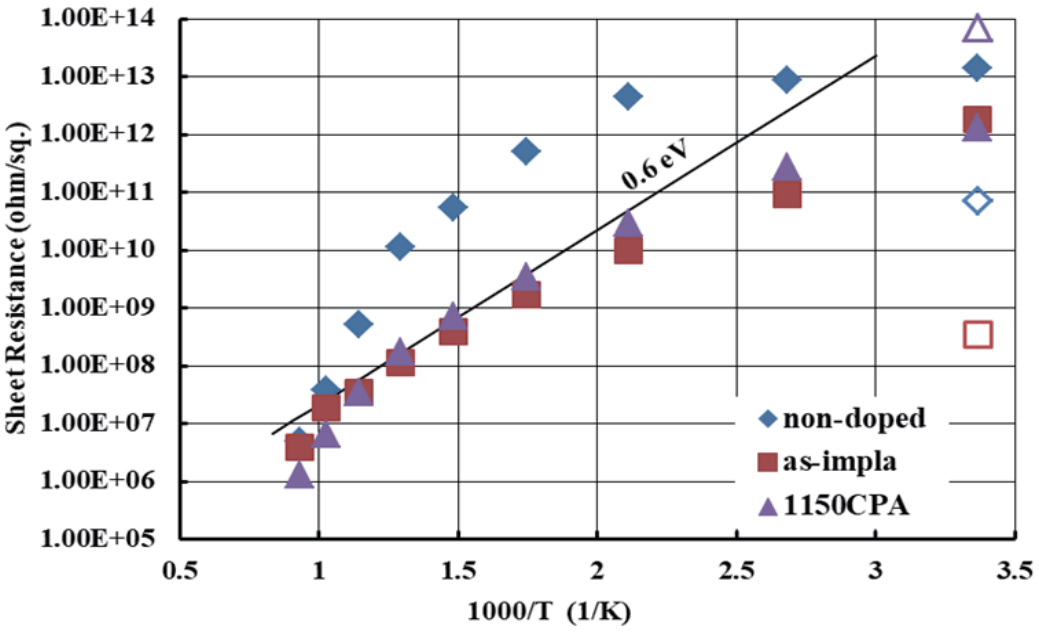


図 5. 900℃イオン注入 P 濃度が $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ のダイヤモンド基板のシート抵抗の絶対温度逆数依存性.

900℃注入 P 濃度 5.0×10^{20}/cm^3 のシート抵抗とホール効果の測定結果

図 6 に平坦な平均 P 濃度が 5.0×10^{20}/cm^3 になるように 900℃で注入を行なったダイヤモンド基板のシート抵抗の絶対温度依逆数存性を示す。電気特性評価は P 濃度 5.0×10^{19}/cm^3 と同様に、初めに室温測定を行った後に 800℃まで昇温し、その後 700℃……100℃と 100℃づつ降温して最後に室温で測定を再度行なった。P 濃度 5.0×10^{19}/cm^3 と同様に P 注入することでシート抵抗が下がった。注入直後 500~700℃と、1150℃アニール後の 200~600℃の温度範囲のシート抵抗から、ほぼ P の活性化エネルギーと考えられている 0.6 eV が求められた。

ホール効果測定では、1150℃アニール後の 600℃と 700℃で n 型の判定が出たが、この 2 点のシート抵抗値から活性化エネルギーを求めたところ 0.16 eV であり、P の通常の活性化エネルギー（イオン化エネルギー）である 0.6 eV とは全く異なる低い値を得た。

P の置換位置への導入についての考察

P 濃度 5.0×10^{19}/cm^3 の注入直後と 1150℃アニール後の試料と、P 濃度 5×10^{20}/cm^3 の注入直後と 1150℃アニール後の 2 つの試料について、それぞれ測定温度範囲 500~700℃と 200~600℃のシート抵抗値から、P の活性化エネルギーである 0.6 eV に近い値が求められた。しかし、ホール効果測定では、P 濃度 5.0×10^{20}/cm^3 で 1150℃アニール後の測定温度 600℃と 700℃しか n 型と判定されず、またこの 2 点間の活性化エネルギーを求めると 0.16 eV だった。

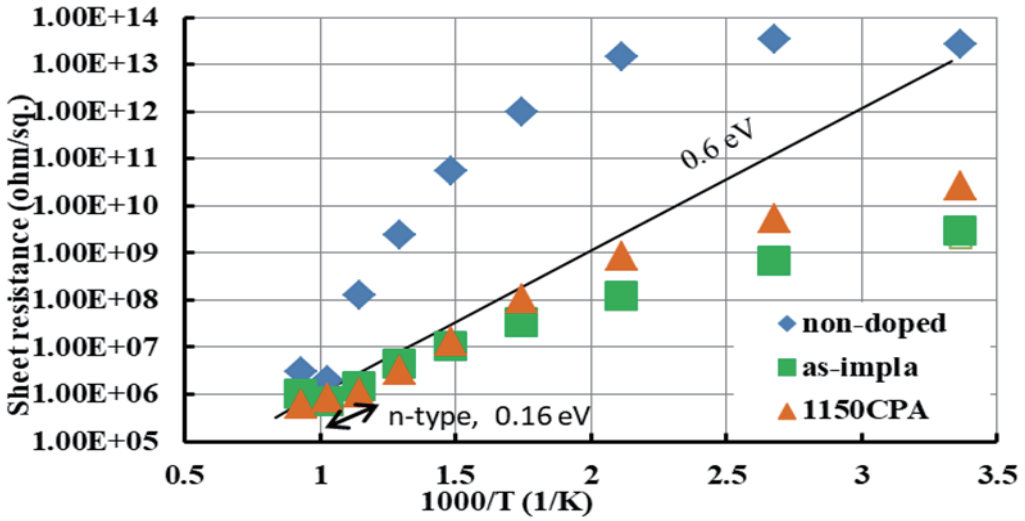


図 6.　900℃イオン注入 P 濃度が 5.0×10^{20}/cm^3 のダイヤモンド基板のシート抵抗の絶対温度逆数依存性.

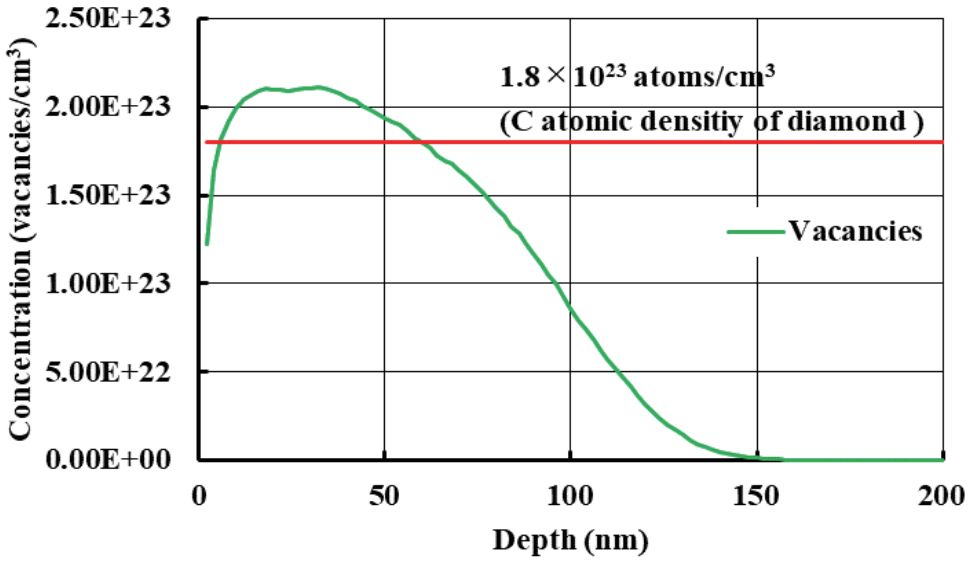


図 7.　イオン注入 P 濃度がダイヤモンド基板中で平均 5.0×10^{20}/cm^3 時の空格子点濃度の深さ依存性.

そのため、今回の条件では電子キャリアが伝導層を流れることによる電気的活性化は起きていないと考えられる。この基板は、1150℃アニール後に表面が炭化し、洗浄によって炭化部が除去された。この現象について注入欠陥との関連について考察した。図7にP濃度 $5\times10^{20}/cm^3$ になるようにイオン注入した時の注入欠陥（空格子点）濃度を示す。注入欠陥濃度のピークは約 $2.1\times10^{23}/cm^3$ である。この濃度はダイヤモンド中のC原子密度よりも高く、ダイヤモンドがアニールによって結晶回復できる注入欠陥の閾値である 10^{21}~$10^{22}/cm^3$ よりも多量である。Pイオン注入によってほぼ完全に結晶構造が破壊されている。今回のPイオン注入は基板温度900℃で行ったために注入直後の1次欠陥は抑えられたがさらに1150℃のアニールをすることによって基板表面が炭化（グラファイト化）した。また、600℃と700℃において *n* 型伝導が確認されたが、グラファイトによる伝導も *n* 型伝導を示すことから、この伝導形態には1150℃アニールにより形成された表面グラファイト伝導を含む可能性も考えられる。

RT注入P濃度 $1\times10^{19}/cm^3$ のシート抵抗とホール効果の測定結果

900℃注入でP濃度 $5.0\times10^{20}/cm^3$ では図6から注入量が多過ぎて高温側でのシート抵抗値の飽和傾向を示し活性化エネルギーが減少した。注入量を減らすことで注入欠陥濃度の低減を図った。P注入の目安として、B注入実験で、B濃度 $5.0\times10^{19}/cm^3$ の室温注入において良い結果が得られたことから、B濃度 $5.0\times10^{19}/cm^3$ での注入欠陥濃度と同程度の注入欠陥ができる量である、P濃度 $1.0\times10^{19}/cm^3$ の室温P注入を行った。図8に注入温度と注入量の異なる、1150℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性を示す。この図からP濃度が最低の $1.0\times10^{19}/cm^3$ の時、最も低抵抗になったが、どの温度範囲でもPの活性化エネルギーである0.6 eV付近のイオン化エネルギーは得られず、またホール効果測定によって *n* 型伝導は確認されなかった。

P濃度 $1.0\times10^{19}/cm^3$ が低抵抗になる原因の考察

RT注入では図8から一番低いP濃度 $1.0\times10^{19}/cm^3$ でも900℃注入 $5.0\times10^{19}/cm^3$ や900℃注入 $5.0\times10^{20}/cm^3$ 以上に最も低抵抗になった。RT注入では900℃高濃度注入よりも多量の1次欠陥（注入直後に形成される空格子・格子間原子対形成を中心とした点欠陥集合体）を形成してポストアニールにより、高温高濃度注入より多量の2次欠陥が形成されたと思われる。その2次欠陥がサブバンドを形成してそこをホッピング伝導し、低抵抗化したと推量される。しかし、図8の傾きからサブバンドエネルギーレベルは伝導帯下0.6 eVより浅い0.2 eV程度である。また、ホッピング伝導している電子キャリアの運動は磁場に鈍感なので *pn* 判定もできない。Bイオン注入で良好な電気特性が得られた室温、$5\times10^{19}/cm^3$ 程度の注入量、1150℃アニールの組合わせでは、P注入の場合とは全く異なる2次欠陥形成の様相を呈していると思われる。

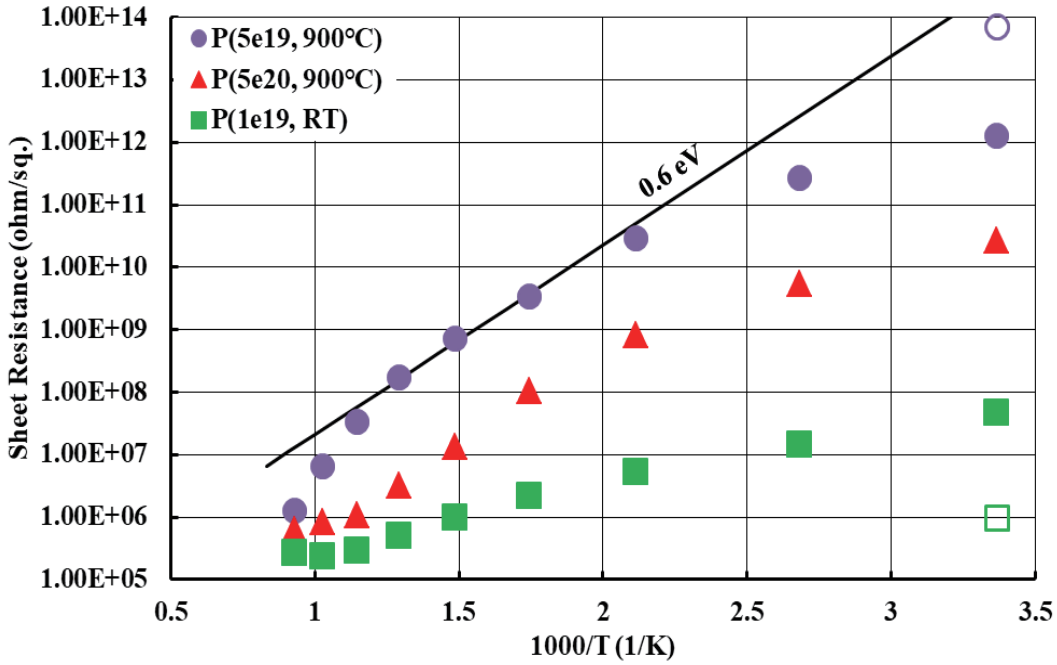


図8. 注入温度と注入量の異なるPイオン注入ダイヤモンド基板の1150℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性.

RT 注入 P 濃度 1.0×10^{19}/cm^3 の 1300℃アニール後のシート抵抗測定結果

室温注入で P 濃度 1.0 × 10^{19}/cm^3 の 1150℃アニールでは *pn* 判定ができなかったため、さらに高温の 1300℃でアニールした。アニール前に、電極のオーミック特性を高める目的で、電極下部に基板温度室温で P の追加注入を行った。電気特性評価は初めに室温測定を行った後に 800℃まで昇温し、その後 700℃……100℃と 100℃づつ降温して最後に室温で測定を再度行なった。これを 2 回繰り返した。図 9 に室温イオン注入した P 濃度 1.0 × 10^{19}/cm^3、1300℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性を示す。1300℃アニール後では 1150℃アニール後よりも測定におけるノイズが大きく、信用できる測定結果が出なかった。1 回目の昇順の測定では、未注入基板のシート抵抗とほぼ同じシート抵抗であった。

1300℃アニール後のシート抵抗に関する考察

1300℃アニール後では測定におけるノイズが大きく、信用できる測定結果が出なかった。1 回目の昇順のシート抵抗が未注入基板のシート抵抗とほぼ変わらないため、1300℃アニールによって注入欠陥がある程度回復したが、P の置換は起きていないと考えられる。しかし、未注入基板よりも測定におけるノイズが小さかったので、1300℃アニールよって注入欠陥が完全に回復せず、注入欠陥の回復と同時にグラファイトなどが形成されたと考えられる。

1 回目の降順と 2 回目の昇順・降順のシート抵抗測定が下がっているが、これは測定中に温度を上げることで、基板表面に何か変化が生じた結果、表面伝導などによりシート抵抗が下がったと考えている。

RT 注入 O 濃度 5.0×1019/cm3 の 1150℃アニール後のシート抵抗とホール効果の測定結果

O は P よりも C 原子の大きさに近いため注入欠陥があまり多く形成されないで置換位置への導入も容易であると考えた。そこで B 注入で良い結果が出ている平坦な平均濃度 5.0 × 10^{19}/cm^3 で室温注入を行なった。また、電極のオーミック性を向上させるため、電極下部に室温で O を追加注入をした。

図 10 に室温注入した平均 O 濃度 5.0 × 10^{19}/cm^3 で 1150℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性を示す。1 回目 2 回目の測定共に、降順のシート抵抗が昇順よりも下がった。また、1 回目の測定よりも 2 回目の測定の方がシート抵抗が全体的に高くなった。ホール効果測定では、ほぼ全ての温度で測定ノイズが大きく信用できる値が出ていないが、500~600℃で *p* 型伝導が確認された。

RT 注入 O 濃度 5.0×10^{19}/cm^3 の 1300℃アニール後のシート抵抗とホール効果の測定結果

図 11 に室温注入した平均 O 濃度 5.0 × 10^{19}/cm^3 で 1300℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性を示す。1150℃アニール後と同様に、降順でのシート抵抗が昇順よりも減少した。ホール効果測定では、測定ノイズが大きく信用できる値が出ていないが、500~ 600℃で *p* 型伝導が確認された。

シート抵抗が昇順・降順で変動する原因の考察

一連の実験結果から、O 注入でも P 注入と同様に昇順よりも降順のシート抵抗が下がるという現象が室温注入試料において見られた。これについては、測定温度は室温～最大 800℃である。これは 1150℃

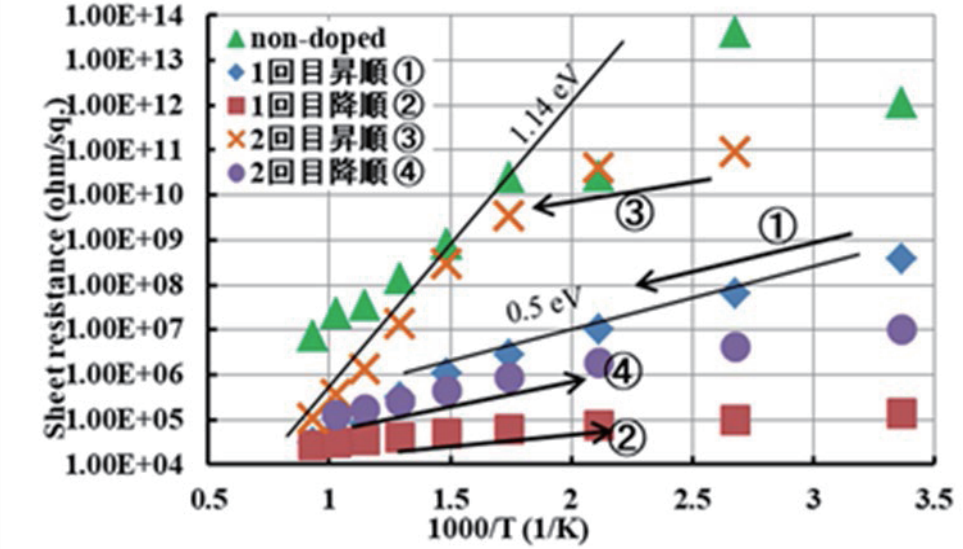


図 9.　室温イオン注入 P 濃度の平均が 1.0 × 1019 /cm3 の 1300℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性.

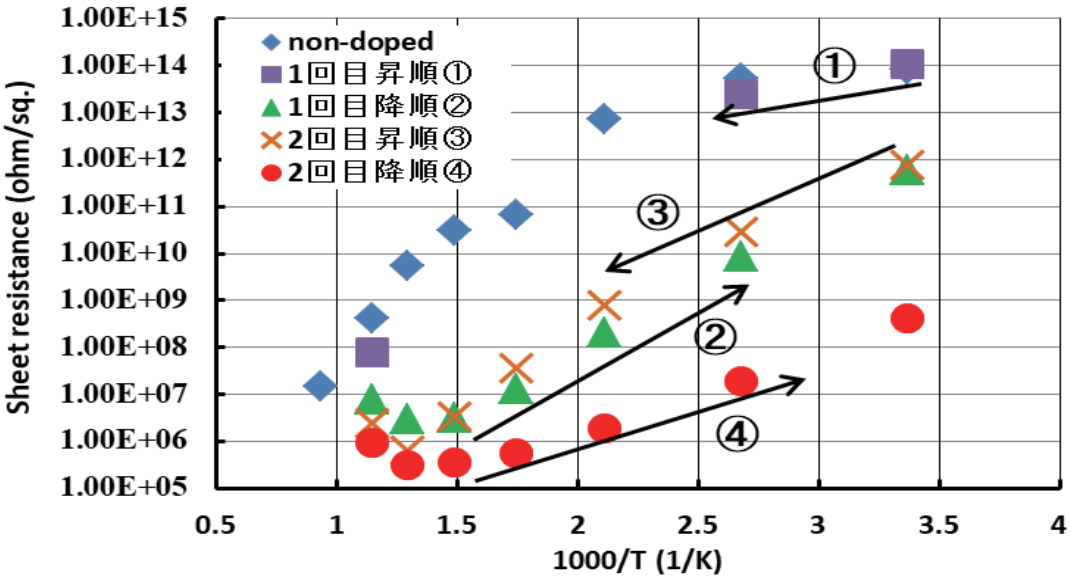


図 10. 室温イオン注入 O 濃度の平均が 5.0 × 1019 /cm3 で 1150℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性.

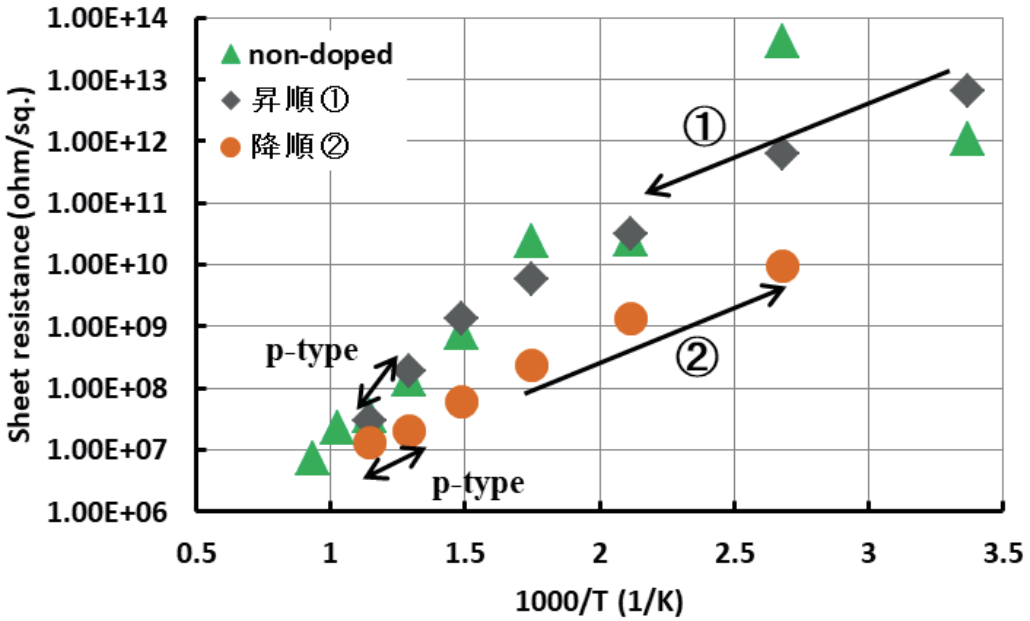


図 11. 室温イオン注入 O 濃度の平均が 5.0×10^{19}/cm^3 である試料の 1300℃アニール後のシート抵抗の絶対温度逆数依存性.

または 1300℃のポストアニール温度より低温である。アニール後のシート抵抗やホール効果測定においてさらに室温 ~800℃という温度範囲で熱履歴が加わる。その熱履歴の昇温過程で室温注入直後に形成された 1 次欠陥がポストアニールと測定のための昇温過程により、さらなる 2 次欠陥の成長が促進されと思われる。ポストアニールや測定中の昇温過程の中で欠陥回復が起こると同時に 2 次欠陥の形成がある程度進行してサブバンドを形成した。そこを電子キャリアがホッピング伝導したと推量した。従って、シート抵抗は下がったものの、2 次欠陥中を電子キャリアがホッピング伝導したためにホール測定による n 型顕現がなかったと思われる。図 10 の 1150℃アニールした試料において 1 回目の測定よりも 2 回目の測定の方がシート抵抗が上昇している原因は、1 回目の測定後に基板洗浄したため、基板表面に 1 回目の昇温測定中に何らかの変化（例えば O の拡散と表面からの離脱）が起こり、基板内部の伝導物質が減少してシート抵抗が上昇した可能性も考えられる。1300℃アニール後では、昇順のシート抵抗が未注入基板とほぼ同じシート抵抗であることから、1300℃アニールでは O 注入欠陥はほぼ回復していると考えられる。また、基板中に残ったドーパント O は電気的に活性化してサブバンド中をホッピング伝導しているが、*pn* 判定はできなかった。

まとめと今後の展望

本実験では、IIa 型 CVD ダイヤモンド基板に対し、基板温度室温または 900℃で P 注入し、1150℃、1300℃アニールによって形成した P ドープダイヤモンドと、基板温度室温で O 注入し、1150℃、1300℃アニールによって形成した O ドープダイヤモンドについて電気特性評価を行なった。P 注入に関しては 900℃注入で平坦な平均 P 濃度が $5.0 \times 10^{19}/cm^3$ の場合、注入直後と 1150℃アニール後および $5.0 \times 10^{20}/cm^3$ の 1150℃アニール後の 300~600℃の測定温度範囲のシート抵抗から P の活性化（イオン化）エネルギー付近である 0.6 eV が求められた。P 濃度 $1.0 \times 10^{19}/cm^3$ の 1150℃アニール後は最も低抵抗になったが、100~700℃の温度範囲におけるシート抵抗から活性化エネルギーを求めると 0.2 eV と非常に小さな値になった。そして 1300℃アニールではシート抵抗の値が未注入基板とほぼ同じになった。ホール効果測定では P 濃度 $5.0 \times 10^{20}/cm^3$ の 1150℃アニール後の 600℃と 700℃の測定温度においてのみ *n* 型伝導が確認された。しかし、小さな活性化エネルギーからグラファイト由来の伝導であるかもしれない。また、室温注入ではシート抵抗値の測定値が昇温時の方が降温時よりも大きく、顕著なヒステリシス現象が観測された。結論的には今回の注入・アニール条件では、P は置換はされていないか、されていても *n* 型を示す通常の伝導帯におけるバンド伝導は起きていないと考えられる。

O 注入に関しては室温注入のみの実験結果だけではあるが、平坦な平均 O 濃度 $5 \times 10^{19}/cm^3$ の注入で、昇順測定よりも降順測定の方がシート抵抗が下がるというヒステリシス現象が P の室温注入と同様に観測された。これについては、測定温度を最高 800℃まで上昇させる時に基板内部において 1 次欠陥回復と同時に 2 次欠陥形成等の何らかの変化が起きてホッピング伝導を誘起したことがヒステリシス現象の原因と考えた。P 注入でも O 注入でもヒステリシス現象が起きるのは室温注入の時のみであるようだ。また、O 注入では測定温度によっては *n* 型ではなく、*p* 型が顕現したり非常に複雑な現象を示した。これらの現象を包括的に理解するためにはイオン注入中やポストアニール中、あるいは測定中に形成されるであろう 2 次欠陥の挙動やドナー準位付近に位置するであろうフェルミエネルギー準位のレベルについてさらなる考察・検討が必要である。P 注入と同様に今回の O 注入実験条件でも明確な *pn* 判定が困難であり、たとえ O が置換位置へ入って電子キャリアを放出しても、そのキャリア電子が走行するバンドは伝導帯ではなく、伝導帯付近あるいはバンドギャップ中深部に形成されている可能性のあるサブバンドをホッピング伝導している可能性もある。すると必然的にキャリアの運動は磁場に対して鈍感になり、*pn* 判定は困難になる。以上のように、B イオン注入で得られた実用化レベルの良好な電気的測定結果と比較すると *n* 型ドーパントイオン注入による電気的活性化に関しては非常に多くの克服すべき問題点が残っている。特にホール効果測定において *pn* 判定が困難であることの原因として、注入中あるいはポストアニール中あるいは測定中に形成される 2 次欠陥を起因とするサブバンドの形成とそこをホッピング伝導するメカニズムを明らかにすることが重要である。これら議論の詳細についてはどこにも発表していないが、今まで得られたデータを整理して結果をまとめ、参考文献として挙げた論文[4-8]に発表した。

今後の展望として、*n* 型ダイヤモンド作製のために、⑴ 浅いドナー準位を形成しかつ C 原子と原子半径が近いドーパントの探索、⑵ 導入した不純物の置換および活性化を促す注入プロセス（注入中温度、ポストアニール温度、注入量）の検討、⑶ 液体窒素温度から 1000℃近くまでの幅広い温度範囲でのイオン注入、という大きな 3 つの項目についてさらなる検討を行う。

さらに、*n* 型化が期待されるドーパント元素の種類に関してそのイオン化エネルギーを第 1 原理計算を含めた検討をする。N, P, As 等の V 族元素に関して同様に注入温度、ポスト熱処理温度、注入量の最重要パラメータの最適化を行い、イオン注入による *n* 型半導体の形成を試みる。そしてこれらイオン注入 *n* 型ドーパント元素の電気的活性化の可能性を追求する。

ドーパント N に関して

N 原子はドナー準位が深く、伝導帯の下 1.4 eV ~ 1.7 eV である。注入量にもよるが、室温から *n* 型を顕現するにはかなり困難を伴う。実際、数百 ppm も N ドープされた Ib 型ダイヤモンド基板においては 200~300℃からしか、*n* 型を発現しなかった。しかし、ダイヤモンド半導体を構成する母材 C 原子と同程度の原子半径なので B と同様に比較的容易に置換位置に導入できるかもしれない。それ故、N の高ドース注入で高抵抗の可能性はあるが、室温から *n* 型を顕現できるかもしれない。

ドーパント P, As, Sb に関して

P のドナー準位は伝導帯の下 0.6 eV ~0.7 eV である。As は 0.4 eV で、B のアクセプタ準位とほぼ同じである。Sb は 0.2 eV で一番浅い準位である。しかし、

いずれの *n* 型ドーパント原子も C よりも原子半径が大きい。置換位置にドーパント原子を導入するには困難を伴う。実際、CVD 法で P を同時にドープして *n* 型薄膜形成を試みると、B を CVD でドープして *p* 型を形成するよりもはるかに困難である。まして、イオン注入で P や As 等の原子半径の大きな元素を置換位置に導入するのは困難であるというのが世界中の共通認識であり常識であった。注入中温度を高温にして注入時に導入される欠陥を減少させても、ポスト熱処理でドーパント原子をうまく置換位置に導入できるかどうかさえも不透明であった。そこでそのような場合に対処する方法として、ポスト熱処理法に関して以下の新しい方法を提案・計画している。

MeV 級イオン照射による新しいポスト熱処理法

この新しいポスト熱処理方法は、この理学誌論文の First 著者である研究代表者が学位取得時以前に執筆していた各種論文に基づいて発想した[7-17]。Si 半導体分野で使われているイオン注入技術は数十 ~100 keV 程度の注入エネルギーでドーパント等のイオン注入を行うことが主流である。本理学論文誌の著者は数 MeV 程度のエネルギーで深い注入層を形成して Si デバイスを作製することを主眼に、その基本的な照射損傷や注入イオンの詳細な分布を研究してきた。その中で MeV 級イオン照射が Si 基板に与えるダメージが計算値よりも著しく減少していることに気が付いた。これはいわゆる照射中欠陥アニールとも呼ぶべき現象 (SIBA, Self Ion Beam Annealing)[8] である。この SIBA 機構を徹底的に検討する中で得た結論は以下の様である。

MeV 級イオンの原子核的弾性衝突で形成される空格子点・格子間原子が再結合して結晶が回復する際に、MeV 級イオン照射に伴う電子的非弾性散乱で多量の電子・正孔対が形成される。それらが再結合して輻射エネルギーが解放されるときに、空格子点・格子間原子の拡散係数が輻射エネルギーにより増速されて効率的に結晶が回復するという機構が働いていると推論した。例えば 2 価に負にチャージされた拡散係数の大きい空格子点を形成するとか、電子・正孔対が再結合する際に解放される輻射エネルギーが格子間原子に転移され、空格子点・格子間原子の再結合（再結晶化）を促進・増速する。こうして、計算値よりも格段に少ない欠陥しか Si 基板に残さず、照射中の欠陥回復が活発に行なわれる。

実はこの MeV 級イオンは、基板単結晶表面上に非晶質 Si 層が存在している時に照射すると、非晶質 Si 層を 300℃以下の極めて低温で Si 基板単結晶の結晶方位と同じ方位に 2 次元エピタキシャル成長させる働きがあることが分かった (IBIEC, Ion Beam Induced Epitaxial Crystallization)[10-19]。これらの知見をまとめて本論文の First 著者は東京大学から理学博士の学位を取得した。また、この現象を低温での大面積 SOI(Si On Insulator) 構造形成に応用し、2 つの特許を取得している[20, 21]。イオン照射で進行する低温エピタキシャル成長現象は、通常熱処理による固相エピタキシャル成長が熱平衡過程による単結晶化現象なのに対して、非熱平衡過程による低温度における結晶化現象である。この IBIEC がダイヤモンド単結晶にイオン注入した P や As のような C 原子よりも原子半径が大きい元素を置換位置に導入することを、その非熱平衡的な特長ゆえに可能ならしめると考えた。すなわち MeV 級 IBIEC は照射直後、個別のイオン飛跡の周囲に多量の空格子点・格子間原子対を形成する。それらが基板温度によって決定される拡散係数で移動して再結合して結晶回復が起こる。さらにその飛跡に沿って同時に形成される多量の電子・正孔対が再結合する時に解放される輻射エネルギーが、格子間母材原子や格子間位置にあるドーパント原子に転移される。そして熱振動状態にあるそれらの原子に転移された輻射エネルギーが加わり、格子間位置にある母材原子やドーパント原子が格子位置（置換位置）に大きく変位する。即ち、母材格子間原子は空格子点との再結合後に再結晶化する。また、格子間ドーパント原子を空格子点に導き、そこで置換されて電気的に活性化される[12-19]。その結果、MeV 級イオン照射は注入ドーパント元素を効率的に置換位置に導入して電気的に活性化させることが期待できると推論した。それのみならず、MeV 級 IBIEC によりアニールするとその低温での結晶性回復現象により、1 次欠陥がアニール中に 2 次欠陥に成長する可能性も低いのではないかと推測している。すなわち Si プロセスの場合、注入されたドーパント原子を活性化させる手法として、最初に低温（500~600℃）でエピタキシャル成長させて 1 次欠陥を消滅させ、続いて 1000℃以上の高温で注入ドーパントイオンの活性化と 2 次欠陥の発生を抑えるという 2 段階アニールを行なうことが有用であるという報告がある。最初から低温（電気炉による通常熱処理で起こる固相エピタキシャル成長温度よりもさらに低い温度）でアニール処理を一度で済ませれば、ダイヤモンド基板に対してドーパント原子を置換位置に効率的に導入すると同時に 2 次欠陥形成も抑制できるので結果的にサブバンド形成も抑制できる。その帰結としてホッピング伝導さえも抑えることが出来るのではないかと考えている。

謝辞

本研究の一部は、神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金 (RIIS201902) の援助を受けた。

文献

1) Koizumi S, Kamo M and Sato Y (1997) Growth and characterization of phosphorous doped {111} homoepitaxial diamond thin films. *Appl. Phys. Lett.* **71**: 1065.
2) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J (2019) Remarkable p-type activation of heavily doped diamond accomplished by boron ion implantation at room temperature and subsequent annealing at relatively low temperatures of 1150 and 1300℃. *Appl. Phys. Lett.* **115**: 072103.
3) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J (2020) Electrical properties and conduction mechanisms of heavily B+-ion-implanted type IIa diamond：effects of temperatures during the ion implantation and postannealing upon the electrical conduction. *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**: 021003.
4) 稲垣俊哉，森谷　昴，関　裕平，星野　靖，中田穣治 (2018) ダイヤモンド半導体の n 型ドーパント高温イオン注入による電気的活性化の研究．*第 37 回法政大学イオンビーム工学研究所シンポジウム予稿集*．p.34.
5) 稲垣俊哉，森谷　昴，関　裕平，星野　靖，中田穣治 (2019) ダイヤモンド半導体の n 型ドーパント高温イオン注入による電気的活性化の研究．*第 38 回法政大学イオンビーム工学研究所シンポジウム予稿集*．p.37
6) 稲垣俊哉，関　裕平，星野　靖，中田穣治 (2019) イオン注入とポストアニールによって形成した P ドープ IIa 型 CVD ダイヤモンドの電気特性評価．*第 80 回応用物理学会秋季学術講演会予稿集*．DVD.
7) 関　裕平，星野　靖，中田穣治 (2019) 室温 $^{11}B^{+}$ イオン注入及び 1150℃，1300℃アニール処理による IIa 型ダイヤモンド基板への高効率 p 型ドーピング．*第 80 回応用物理学会秋季学術講演会予稿集*．DVD.
8) Inagaki T, Seki Y, Hoshsino Y and Nakata J (2019) Electrical properties of diamond formed by P^{+} ion implantation at 900℃ and nd room temperature followed by 1150℃ annealing. *Proceedings of 38-th symposium on Materials Science and Engineering Research Center of Ion Beam Technology, Hosei University*. in press.
9) Nakata J, Takahashi M and Kajiyama K(1981) In situ self ion beam annealing of damage in Si during high energy (0.53Mev-2.56MeV) As^{+} ion implantation, *Jpn. J. Appl. Phys.* **20**: 2211-2221.
10) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temperature recrystallization of amorphous sillicon by high-energy ion beam, *Appl.Phys.Lett.* **40**: 686-688.
11) Nakata J and KajiyamaK (1982) Novel Low Temperature (≦ 300℃) annealing of amorphous Si by scanned high energy heavy ion beam. In: *Proceedings of the 13th Conference on Solid State Devices, Tokyo,1981*. Jpn. *J. Appl. Phys.* **21** (Supplement **21**-1): 211-216.
12) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature (≦ 300 ℃) crystallization and amorphization for the amorphous Si layer on the crystalline Si substrate by high energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev.* **B43**: 14643-14668.
13) Nakata J (1994) The role of inelastic electronic scattering in low-temperature crystallization of amorphous Si under high-energy heavy-ion beam irradiation. *Invited lecture in to the International Conference on the Application of Accelerators in Research and Industry November 7-10, Denton, Texas, U.S.A.*
14) 中田穣治 (1995)『イオンビーム誘起低温結晶成長』―その機構と応用―．*荷電粒子ビームの工業への応用 132 委員会第 129 回講演会論文集* 1-8 頁．pp.1-8.
15) Nakata J (1996) Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **79**: 682-698.
16) Nakata J (1996) Reply to comment on evidence of enhanced epitaxial crystallization at temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **80**: 4235-4239.
17) Nakata J (1997) Enhanced crystallization of amorphous Si containing hydrogen without oxygen during ion-beam irradiation at 310℃ and during furnace annealing below 450℃ . *J. Appl. Phys.* **82**: 5433-5445.
18) Nakata J (1997) Epitaxial crystallization during 600℃ furnace annealing of amorphous Si layer deposited by low-pressure chemical-vapor-deposition and irradiated with 1-MeV Xe-ions. *J. Appl Phys.* **82**: 5446-5459.
19) Nakata J (1999) Annealing of ion implanted defects in diamond by MeV ion-beam irradiation. *Phys. Rev.* **B60**: 2747-2761.
20) 中田穣治，梶山健治　特許第 1316930 号「非晶質膜上の単結晶形成方法」
21) 中田穣治，梶山健治　特許第 1683801 号「単結晶層上の非晶質層または多結晶層の結晶成長法」

Science Journal of Kanagawa University **31** ：53-60 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

連分割トライに基づく決定木の枝刈り法

原田崇司 [1, 2]　田中　賢 [1, 4]　三河賢治 [3]

A Pruning Method for the Decision Tree Based on Run-Based Trie

Takashi Harada[1, 2], Ken Tanaka[1, 4] and Kenji Mikawa[3]

[1] Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Kochi University of Technology, 185 Miyanokuchi, Tosayamada, Kami, Kochi 782-8502, Japan
[3] Center for Academic Information Service, Niigata University, Nishi-ku, Niigata City, Niigata 950–2181, Japan
[4] To whom correspondence should be addressed. E-mail: ktanaka@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Numerous methods for packet classification have been developed. We proposed a decision tree method based on Run-Based Trie. In this paper, we propose a pruning method for the decision tree. Space complexity of the pruning method is still $O(l3^l)$ where l is the length of a rule. Applying the proposed pruning method, we can construct a decision tree where $l = 64$, which can not be constructed with the conventional method. This result shows that, although our decision tree method based on Run-Based Trie is not feasible in theory, it can be used in a practical sense.

Keywords: packet classification, arbitray bitmask, trie, decision tree

序論

インターネット上の DDoS 攻撃、コンピュータウィルスの蔓延､情報流出などのサイバー脅威の数は年々増加している。パケット分類はこれらの脅威を防ぐ手段の一つである。L3 スイッチなどのネットワーク機器は、到着パケットとフィルタリングルールを照らし合わせることによりパケットの通過の可否を判断する機能をもつ。これらの機器では、フィルタリングポリシをフィルタリングルールのリストで表現し, ルールリストを線型探索することによってパケットフィルタリングを実現する。しかし、この方法では全てのパケットがルールリストの大部分のルールと比較される。このことは、ルール数が多くなると通信の遅延を引き起こす。効率の良いパケットフィルタリングを行うために、従来 (1) ルールリスト最適化アルゴリズムの開発、(2) パケットに合致する一番優先度の高いルールを探索するアルゴリズムの開発という二つの研究が行われている。フィルタリングルールリスト最適化問題に対して我々は、隣接するルール間の従属関係に注目してルールリストを並び替える発見的解法 [1] と、ルールリスト中で最大の重みを持つルールとそのルールが依存するルールに注目してルールリストを並び替える発見的解法 [2] を提案した。Tapdiya らは、ルールリストをルール数分の部分リストに分解して、各部分リストの重みの平均値によってルールリストを並び替える発見的解法を提案した [3]。

(2)の問題に対しても種々の方法が提案されてきた [4]。Gupta らは、パケット分類問題を計算幾何学の問題として捉え、ルールの数を閾値以下になるように分類対象となる領域を超平面で再帰的に分割する HiCuts と呼ばれる手法を提案した [5]。Singh らは, HiCuts が対象領域を超平面で分割するのに対して対象領域を超立方体で分割する HyperCuts と呼ばれる手法を提案した [6]。Li らは、ルールリストをルールリストの特徴に従って幾つかの部分リストに分割してから、各部分リストが表す対象領域を分割する HybridCuts と呼ばれる手法を提案した [7]。これらの三つの手法は、最終的には線型探索を行うので分類時間の計算量はルール数 n に対して $O(n)$ である。また、これらの手法は任意の位置にビットマスクを含むルールには適用できない。

Srinivasan らは、ルールのフィールド毎にトライ

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

を作成し、それらのトライをつなげた階層型トライ用いたアルゴリズムを提案した [8]。この手法は分類時間がルール長 l に比例する手法で分類時間がルール数 n には依存しないが、やはり任意の位置にビットマスクを含むルールには適用できない。

任意のビットマスクルールに対応できる手法として、Ternary Content Addressable memories (TCAM)[9] があるが、TCAM は，あらかじめルール数が制限され、また特殊なハードと膨大な電力を必要とする。パケットフィルタリングは、携帯電話やタブレット端末などの一般的な機器でも必要とされる処理なので、特殊なハードを必要としないソフトウェアに基づくアルゴリズムの開発が必要である。Ligatti らは、ルールをいくつかのグループに分けて各グループ毎にビットマスクを 0, 1 に展開し、各グループ毎にパケットに合致するルールを調べて、その結果の bitwise-AND をとることによりパケットに合致する最優先ルールを得る、Grouper と呼ばれる手法を提案した [10]。この手法は、最終的に bitwise-AND をとるので分類時間がルール数 n に依存する。

一般に外部の脅威が排除されたことを確かめる方法はないので、ルールリストに一旦追加されたルールは削除されることがない。これよりフィルタリングルールリストのルール数は増える一方であるので、探索時間がフィルタリングルールのルール数に依存しないフィルタリングアルゴリズムが求められる。また、今後 SDN の普及によってより複雑な条件に従ったパケット分類が必要となり、プレフィックスルールやレンジルールよりも表現力の強いビットマスクルールに対応するアルゴリズムが求められる。

ビットマスクルールに対応してかつ分類時間がルール数に依存しないアルゴリズムが存在しない中で、我々は連分割トライ (Run-Based Trie, RBT) というデータ構造を用いたビットマスクルールに対応して分類時間がルール数に依存しないアルゴリズムを提案した [11]。しかし提案した手法は、探索に用いる決定木の領域計算量が $O(n^l)$ と膨大になるという問題がある。

本論文では、文献 [11] で提案された探索法に用いられる決定木の枝刈りアルゴリズムを提案する。提案アルゴリズムよって構築される決定木の領域計算量は $O(l3^l)$ となるが、従来の方法では決定木を構築できなかったルールリストに対しても決定木を構築できるようになる。このことから提案手法の領域計算量は $O(l3^l)$ よりも低く抑えられる可能性がある。

方法

本章以降では、フィルタリングルールは任意の位置にビットマスクを含む $\{0, 1, *\}$ から構成される長さ l の文字列とする。表 1 に任意の位置にビットマスクを含むルールの例を示す。

表 1. 任意の位置にビットマスクを含むルールのリスト

Filter	F_1	Filter	F_1
r_1	$*0*1$	r_7	$**10$
r_2	0000	r_8	$01**$
r_3	$0*00$	r_9	$*11*$
r_4	$0*1*$	r_{10}	$*000$
r_5	1100	r_{11}	$*1*1$
r_6	$*01*$	r_{12}	$***1$

連分割トライ (Run-Based Trie, RBT)

ビットマスクルールとパケットのビット列との比較を行う際には、ルールのビットマスク* 部分は省略できるので、* 以外の 0, 1 の部分が重要である。我々の手法は、連とよばれるルール中で 0, 1 が連続する部分に注目する。

定義 2.1. $r \in \{0, 1, *\}^l$ を長さ l のビットマスクルールとする。下記の二つの条件を満たす r の部分列 $b_i b_{i+1} \ldots b_j$ $(1 \le i \le j \le l)$ を r の連と呼ぶ。

- $b_k = 0 \vee b_k = 1$ $(i \le k \le j)$
- $(i \ge 2 \Rightarrow b_{i-1} = *) \wedge (j \le l-1 \Rightarrow b_{j+1} = *)$

例えば、長さ 16 のビットマスクルール* 10 1 * * 0
0 1 * 1 * * 0 1 0
は、2 番目，7 番目，11 番目，14 番目から始まる四つの連 101, 001, 1, 010 を含む。ルール r_i の k 個の連を $\rho_i^1, \rho_i^2, \ldots, \underline{\rho_i^k}$ $(1 \le k \le \lceil \frac{l}{2} \rceil)$ と表す。なお、ルール中の最後の連には下線を引く。

Run-Based Trie の構築

我々の探索法の基本的な考えは、パケットのビット列がルールリスト中のどの連と合致するかを調べ、すべての連が合致するルールを調べ、合致するルールの中で一番優先度の高いルールを返す、というものである。パケットのビット列がどの連と合致するかを調べるために、ルールリスト中の連の開始位置毎に l 個のトライを構成する。長さ l のルールを n 個含むルールリスト

$R = [r_1, r_2, \ldots, r_n]$

から構成した l 個のトライを $T_1, T_2, \ldots, T_l$ する。トライ T_k はルールリストに含まれる連の中で k ビット目から始まる連で構成される。この l 個のトライ $T_1, T_2, \ldots, T_l$ の集まりを連分割トライ (Run-BasedTrie, RBT) という。表 1 から構成した Run-Based Trie を図 1 に示す。

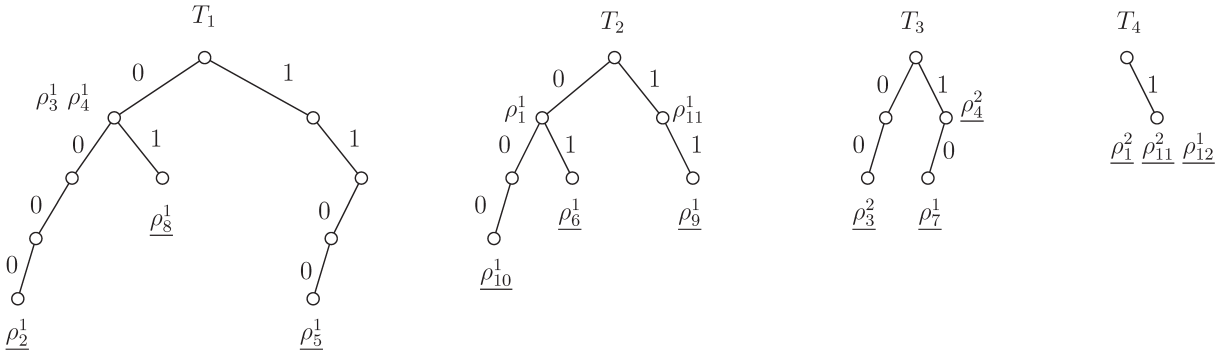


図 1.　Run-Based Trie.

Run-Based Trie は長さ l，ルール数 n のルールリストに含まれる連から構成され、かつ Run-Based Trie においてそれぞれの連は一カ所にのみ出現するので、Run-Based Trie の領域計算量は $O(nl)$ である。

Simple Search

我々が Simple Search と呼んでいる Run-Based Trie の直感的な探索法を示す。Simple Search は、トライを T_1 から T_l まで順に入力パケットのビット列で辿り、入力パケットに合致する連を集めて合致するルールを探し、合致したルールの中で最優先のルールを返す、という探索法である。Simple Search では、各ルールの連の添字を格納する配列 $A[n]$ と最優先ルールを格納する変数 B を用意し、それぞれ $A[i] \coloneqq 0\ (1 \le i \le n)$、$B = n + 1$ と初期化する。そして、各トライ $T_i(1 \le i \le l)$ を入力パケット p の i 番目からのビット列 $p[i]p[i+1] \ldots p[l]$ で辿る。各トライを辿るとき、トライのノードに連の印 ρ_i^j が付いていたら、連の添字 j の値と配列 $A[i]$ の値とを比較して、$j = A[i-1] + 1$ ならば、$A[i] \coloneqq j$ とする。さらに、連の印に下線が引いてあり $i < B$ ならば、$B \coloneqq i$ とする。全てのトライを辿り終えたときの B の値が、入力パケットに対する最優先のルールとなる。

Simple Search の探索時間計算量を示す。各トライ $T_1, T_2, \ldots, T_l$ を探索するのに $l+(l-1)+\cdots+1$ ステップ必要なので、各トライ T_i の探索時間は $O(l_2)$ である。そして、ビット長 l のルールを n 個含むルールリストの連の総数は高々 nl なので、合致した連と配列との比較に必要な時間計算量は $O(nl)$ である。また、合致したルールと最優先ルールとの比較回数は高々ルール数分の n 回なので、最優先ルールを見つけるのに必要な時間計算量は $O(n)$ である。よって、Simple Search の時間計算量は $O(l^2 + nl)$ となる。

決定木

本章では Run-Based Trie 用いた決定木による探索法を示す。この探索法は Simple Search に基づいているが、Simple Search の探索時間がルール数 n に依存してしまう原因を取り除くことを主眼として提案された探索法である。

Simple Search の探索時間がルール数 n に依存してしまうのは、各トライ T_i を辿る中で、連の照合を順に行っているからである。一方、Simple Search におけるパケットの $T_1, T_2, \ldots, T_l$ の探索パタンは有限である。よって、パケットの探索パタンを列挙して、それぞれのパタンにおける最優先ルールを前もって求めることができる。この点に注目して、パケットで Run-Based Trie を辿りパケットがどのパタンに対応するかを調べるだけでパケットに合致する最優先ルールを返す決定木を構築できる。

合致連集合

前記の考えに基づいて Run-Based Trie を探索した際に合致する連の組み合わせの集合 S_i を各トライ毎に前もって作る。そして、各トライ T_i での S_i の直積 $S_1 \times S_2 \times \cdots \times S_l$ をとり、すべての l 項組に対してそれぞれの l 項組が保持する連を照合して対応するルール番号をつけ加える。つまり、$|S_1| \times |S_2| \times \cdots \times |S_l|$ 個の $l+1$ 項組を構成する。

この合致連集合をもとに決定木を次のように構築する。はじめに、Simple Search での各トライ T_i を探索した際のパケットと連との合致の組み合わせ $S_1, S_2, \ldots, S_l$ を構成する。

$$S_1 = \{\ S_1^1,\ S_1^2, \ldots, S_1^{m_1},\ \phi\ \}$$
$$S_2 = \{\ S_2^1,\ S_2^2, \ldots, S_2^{m_2},\ \phi\ \}$$
$$\vdots$$
$$S_l = \{\ S_l^1,\ S_l^2, \ldots, S_l^{m_l},\ \phi\ \}$$

但し、各 S_i において ϕ は入力パケットが T_i のトライでいずれの連とも合致しないパタンを表す。この集合のことを合致連集合と呼ぶ。例えば，図 1 の Run-Based Trie から構成される合致連集合は(1)のようになる。

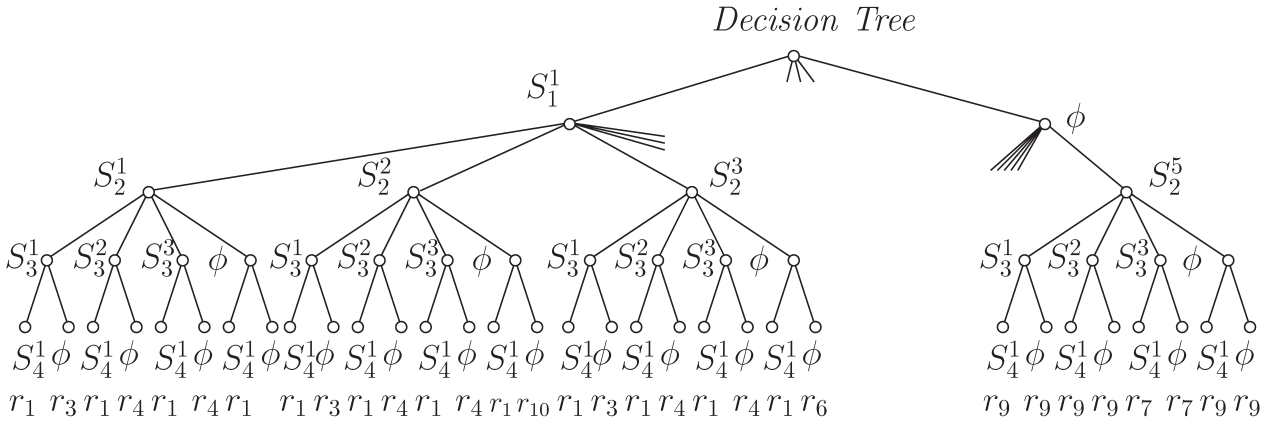


図 2. 決定木 .

$$
\begin{aligned}
S_1 &= \{\ \{\rho_3^1, \rho_4^1\},\ \{\underline{\rho_2^1}, \rho_3^1, \rho_4^1\},\ \{\rho_3^1, \rho_4^1, \underline{\rho_8^1}\},\ \{\underline{\rho_5^1}\},\ \phi\ \} \\
S_2 &= \{\ \{\rho_1^1\},\ \{\rho_1^1, \underline{\rho_{10}^1}\},\ \{\rho_1^1, \underline{\rho_6^1}\},\ \{\rho_{11}^1\},\ \{\underline{\rho_9^1}, \rho_{11}^1\}\ \} \\
S_3 &= \{\ \{\underline{\rho_3^2}\},\ \{\underline{\rho_4^2}\},\ \{\underline{\rho_4^2}, \underline{\rho_7^1}\},\ \phi\ \} \\
S_4 &= \{\ \{\underline{\rho_1^2}, \underline{\rho_{11}^2}, \underline{\rho_{12}^1}\},\ \phi\ \}
\end{aligned} \tag{1}
$$

ここで、図 1 の例では S_2 の元として ϕ が存在しないことを注意しておく。図 1 の T_2 を見ると、高さ 1 のラベルが 0 のノード 0 とラベルが 1 のノード 1 に ρ_1^1 と ρ_{11}^1 という連が存在する。これより、すべてのパケットは T_2 において ρ_1^1 か ρ_{11}^2 のいずれか一方だけに必ず合致する。よって、(1)の S_2 には ϕ を含めない。

決定木は、合致連集合 $S_1, S_2, \ldots, S_l$ の直積 $S_1 \times S_2 \times \cdots \times S_l$ の各要素に最優先ルールのルール番号を加えたものとする。直積の各要素に対応する最優先ルールは、Simple Search を用いて計算する。図 1 から構成した決定木を図 2 に示す。ノード数が $\sum_{i=1}^{l} \prod_{j=1}^{i} |S_i| = 5{+}25{+}100{+}200 = 30$ と大きくなるので、一部を省略している。各パスに対応する最優先ルールを葉の下に記している。このようにして構成された決定木の領域計算量は $O(n^l)$ となる [11]。

Algorithm 1: Construct the Decision Tree

input : Match Runs Tries $\bar{S}_1, \bar{S}_2, \ldots, \bar{S}_l$
output: Decision Tree D
1 make the root node of Decision Tree D
2 Algorithm2(1, &$\bar{S}_1$, D)
3 return D

決定木探索

前節のようにして構築した決定木を用いた探索法を下記に示す。Run-Based Trie 上のトライ T_i を入力パケットの i 番目からのビット列で辿り、パケットと連との合致のパタンを調べる。そして、合致のパタンと決定木の i 番目の高さのノードを比較して一致している決定木のノードを辿る。これを、決定木の根から葉に至るまで繰り返す。葉に至ったとき、葉に与えられているルールが、入力パケットに対する最優先ルールとなる。

例として、図 1 の Run-Based Trie と図 2 の決定木を用いて、入力パケット 0010 の最優先ルールを調べる。はじめに、T_1 を 1 ビット目からの 0010 で辿ると、連との合致のパタンは、$\{\rho_3^1, \rho_4^1\} = S_1^1$ となるので、決定木を根から S_1^1 のノードへと辿る。次に、T_2 を 2 ビット目からの 010 で辿ると、連との合致のパタンは、$\{\rho_1^1, \underline{\rho_6^1}\} = S_2^3$ となるので、決定木を S_1^1 のノードから S_2^3 のノードへと辿る。次に、T_3 のノードを 3 ビット目の 10 で辿ると、連との合致のパタンは、$\{\underline{\rho_4^2}, \underline{\rho_7^1}\} = S_3^3$ となるので、決定木を S_2^3 のノードから S_3^3 のノードへと辿る。最後に、T_4 のノードを 3 ビット目の 0 で辿ると、連との合致のパタンは ϕ となるので、決定木のノードを S_3^3 から ϕ へと辿る。ここで、$S_1^1 - S_2^3 - S_3^3 - \phi$ のパスの葉には、r_4 が与えられているので、入力パケット 0010 に対応する最優先ルールは r_4 となる。

決定木探索の時間計算量のオーダは、Run-Based Trie を入力パケットで探索するのにかかる時間のオーダとなるので、$O(l^2)$ となり n に依存しない。

決定木の枝刈り法

Run-Based Trie から素朴に決定木を構成すると、決定木の領域計算量は $O(n^l)$ となってしまう [11]。本章では、素朴に構成した場合に不要となる辺を含まないような決定木を構成する方法を示す。決定木を枝刈りする方法は大きく分けて三つある。そのうち二つは、決定木の辺を構成する際に，その辺を構成しようとするまでに既に構成した決定木を参照することにより、合致連のパタンとしてあり得ない辺を排

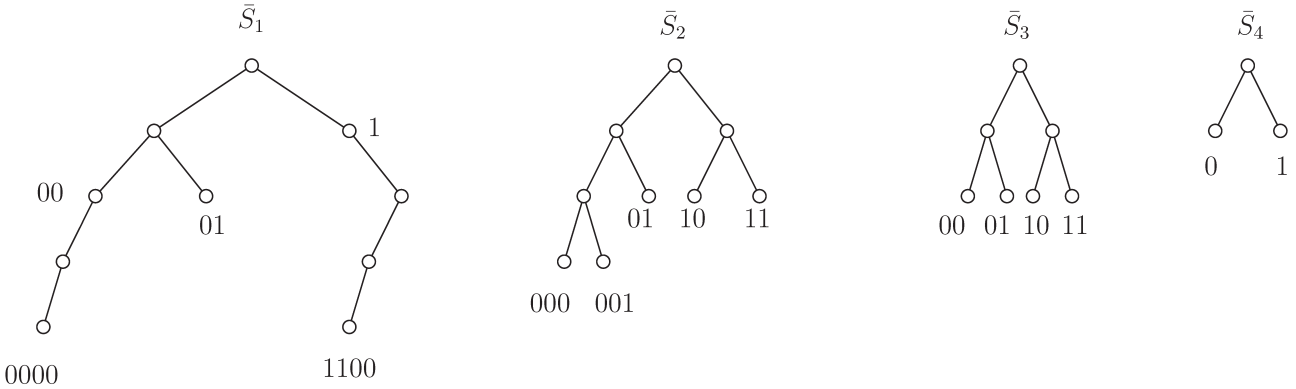


図 3.　合致連集合(3)に対応する二分木 .

Algorithm 2: Traverse $\bar{S}_h$ and make a Node

```
   input  : height h
   input  : A pointer v to a node on S̄_h
   input  : A node of Dtree p
 1 if v = NULL then
   |  return;
   end
 2 Algorithm2(h + 1, v.left, p)
 3 Algorithm2(h + 1, v.right, p)
 4 if *v has a element of S̄_h then
 5 |  make a node u as the child of v
 6 |  if h < l then
 7 |  |  A pointer q points to the root of S̄_{h+1}
 8 |  |  modifyTrieS(S̄_{h+1}, u)
 9 |  |  modifyPointer(S̄_{h+1}, q, u)
10 |  |  Algorithm2(h + 1, q, u)
11 |  |  revert(S̄_{h+1})
   |  end
   end
```

除するというものである。もうひとつは，前記の方法で決定木を構成した後に、決定木の葉のルールを確認して不要な部分が存在したら枝刈りするというものである。

これ以降の枝刈りアルゴリズムの説明のために、SimpleSearch における連とパケットとの合致パタン、合致連集合S_i^jの元を、その元を得るパケットのビットバタンに置き換える。ただし、ϕは置き換えない。例えば、図 1 から構成される合致連集合(1)を次の(2)ように表す。

$$\begin{aligned} S_1' &= \{\ 0,\ 0000,\ 01,\ 1100,\ \phi\ \} \\ S_2' &= \{\ 0,\ 000,\ 01,\ 1,\ 11\ \} \\ S_3' &= \{\ 00,\ 1,\ 10,\ \phi\ \} \\ S_4' &= \{\ 1,\ \phi\ \} \end{aligned} \tag{2}$$

さらに、S'_1には 0 があるのでS'_1のϕのパタンに

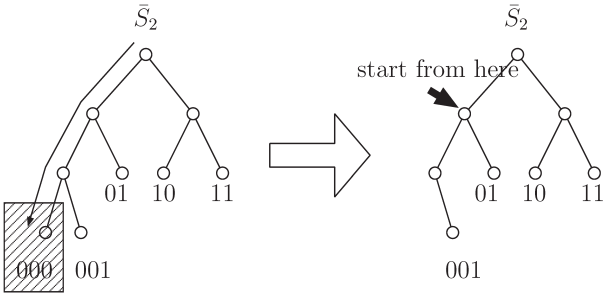


図 4.　modifyTrieS, modifyPointer によってあり得ない候補を削除 .

合致するパケットの一ビット目は 1 のはずである。よってϕを 1 と表す。同様にS'_1には 01 があるので、S'_1の 0 は 00 に対応する。このように、冗長なパタンをあらかじめ排除し、合致するパタンの文字列を更新して(2)から(3)を構成する。(3)を二分木で表現したのが図 3 である。

$$\begin{aligned} \bar{S}_1 &= \{\ 00,\ 0000,\ 01,\ 1100,\ 1\} \\ \bar{S}_2 &= \{\ 001,\ 000,\ 01,\ 10,\ 11\ \} \\ \bar{S}_3 &= \{\ 00,\ 11,\ 10,\ 01\ \} \\ \bar{S}_4 &= \{\ 1,\ 0\ \} \end{aligned} \tag{3}$$

このようにすることで、決定木の各ノードはラベルとして長さ l の系列 $a_1a_2\cdots a_l$ を持ち、子孫のラベルとしてあり得ないラベルの集合として k 個の系列 $b_{k1}b_{k2}\cdots b_{kl}$, $b_{ki}\in\{0, 1, \epsilon\}$を持つ. 但し、$a_i$, $b_{ki}\in\{0, 1, \epsilon\}$ $0\le i\le 2^{l-1}-2$ である。また、系列内で一番右に表れる 0 または 1 までの長さをその系列の長さとする。

枝刈りを伴う決定木構築アルゴリズムを Algorithm 1, 2 に示す。アルゴリズムの本体は Algorithm 2 である。合致連集合の要素をノードに持つ各$\bar{S}_h$をそれぞれ後行順で辿り、合致連集合の要素があったら、その要素に対応する決定木のノードを作成し、次に$\bar{S}_{h+1}$の二分木を辿るという再帰的な方法で決定木を構築する。

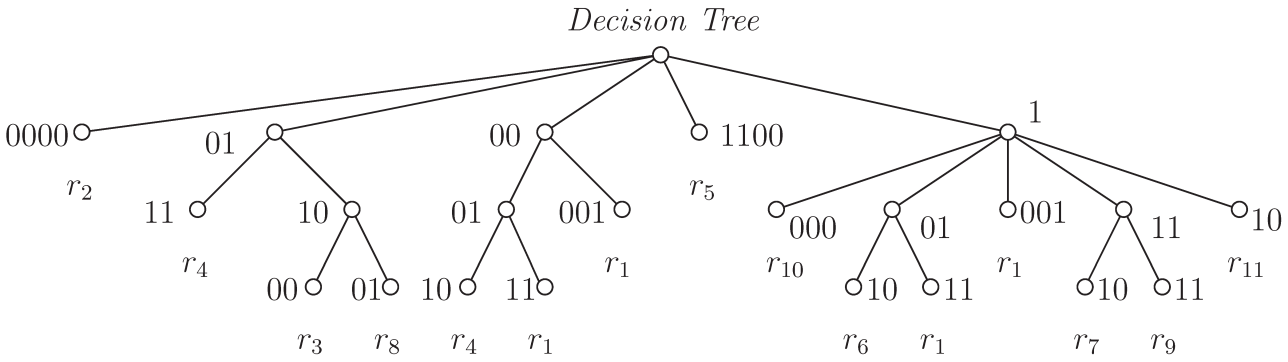


図 5. 枝刈り法を適用して構成した決定木.

Algorithm 2 の詳細について説明する。5 行目で v の子ノード u を作成する時、v のラベルが u のラベルより 2 以上長い場合は、作成される u のノードのラベルを v のラベルで上書きする。8 行目の modifyTrieS は、親ノードが持つ、子ノードとしてあり得ないラベルで下位の$\bar{S}_{h+1}$を辿りあり得ないラベルの子を作るのを防ぐ。図 4 は、決定木の高さ 1 の親ノード 00 から子ノードを作成する状況を示している。図 4 の例では、$\bar{S}_1$に 0000 があるので、決定木の高さ 1 の 00 の子ノードを$\bar{S}_2$から作るときは、先に$\bar{S}_2$を 000 で辿った先の網掛け部分の木を削除する。9 行目の modifyPointer では、u の子ノード作成のために$\bar{S}_{h+1}$を u のラベルで先に$\bar{S}_{h+1}$を辿る。これより、u のラベルと一致しない子ノードが決定木の高さ h+1 に作成されない. 図 4 の例では、00 の 2 ビット目の 0 で$\bar{S}_2$を辿ってから$\bar{S}_2$を探索している。11 行目の revert はトライを編集する前の状態に戻す関数である。Algorithm 1, 2 で構成した決定木の中で、一本道になっているパスや葉が同じ部分木を縮約すると図 5 の決定木が得られる。表 1 の例では決定木のノード数が 330 から 23 となり、約 93% のノードを削減できた。

決定木の領域計算量

本章では、提案手法によって構成される決定木の領域計算量がルール長 l に関して $O(l3^l)$ となることを示す。そのために、まず二つの補題を示す。

補題 2.1. 決定木の各高さ h において、それぞれのノードのラベルは互いに異なる。

Proof. 決定木の高さ h に関する数学的帰納法で示す。

・$h = 1$ で成り立つことを示す。

高さ 0 の根ノードは$\bar{S}$を変更するための要素を持たないので、決定木の高さ 1 の各ノードが持つラベルは$\bar{S}$の要素のラベルのいずれかであり、重複はない。よって、高さ 1 のノードのラベルは互いに異なる。

・$h = k$ で成り立つと仮定して、$h = k + 1$ で成り立つことを示す。

枝刈りアルゴリズムにより、決定木の高さ $k + 1$ のノードのラベルは高さ k にある親ノードのラベルの長さ分は親ノードのラベルと必ず一致する。

帰納法の仮定より、決定木の高さ k のノードのラベルは全て異なるので、親ノードのラベルの長さ分で見れば，決定木の高さ $k + 1$ でのラベルは全て異なる。

さらに枝刈りアルゴリズムにより、決定木の高さ k のノードから高さ $k + 1$ へ子ノードを作る際には子孫ノードのラベルとしてあり得ない系列を参照するので、高さ $k + 1$ の各ノードのラベルは親ノードのラベルの長さ分に子ノードのラベルを足した分もそれぞれ異なる。よって、$h = k + 1$ でも各ノードのラベルは異なる。以上より、補題 2.1 は成り立つ。

定理 2.1. 決定木の領域計算量は $O(l3^l)$ である。

Proof. 補題 2.1 より、高さ h にあるノードが持つラベルはそれぞれ異なるので高さ k に現れる系列の数は高々 3^l である。決定木全体のノード数は木の高さを掛けた高々 $l3^l$ である。

決定木の領域計算量は構築されるノード数により支配されるので、決定木の領域計算量はルールリストのルール長 l に関して $O(l3^l)$ である。

結果

提案した枝刈り法の有効性を確かめるために C++ 言語を用いて計算機実験を行った。実験環境は、主記憶容量が 24GB, CPU が Intel Corei7-980X 3.33GHz, OS は CentOS Release6.2 である。

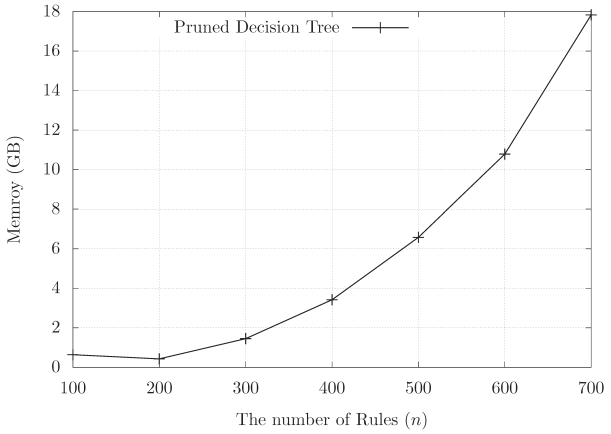


図 6. 決定木構築に必要なメモリ量 .

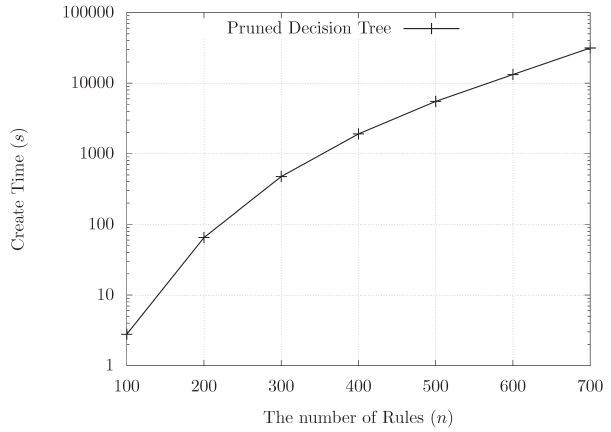


図 7. 決定木の構築時間 .

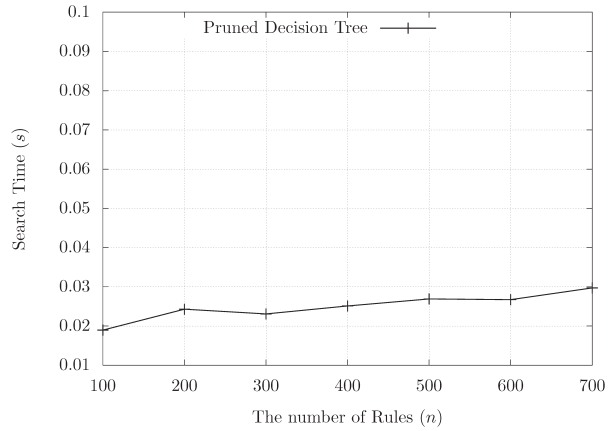


図 8. 決定木探索の探索時間 .

ルール数が 100 から 700 までのルールリストをランダムに作成して実験を行った。ルール長は 64 で、長さが 16 以上の連を丁度二つ持つよう設定した。パケットもランダムに作成した。

枝刈りを行わずに合致連集合の直積をそのまま取って構成する方法では、ルール数が 100 のルールリストでメインメモリ 24GB を使い切ってしまい決定木を構成できなかった。一方、提案枝刈り手法は決定木を構築することできた。結果を図 6 と図 7 に示す。図 8 に、決定木を用いた探索時間を示す。これより枝刈り法を適用して構成した決定木が、最も重要な性質である探索時間がルール数に依存しないという性質を保つことがわかる。

討論

本稿では Run-Based Trie に基づいて構成された決定木の枝刈り法を提案した。決定木の領域計算量は $O(l3^l)$ となるものの、提案した枝刈り法は長さ 16 以上の連を丁度二つ含むルールのルールリストではルール数 700 まで有効であることを計算機実験で確認した。本手法により素朴な構成法では構成できなかったルールリストに対しても決定木が構成きる。

本稿で提案した枝刈り法は合致連集合のラベルのみを基に枝刈りを行っており、どの連に合致しているかという情報は葉ノードまで活用されない。今後の課題は、このような情報にも基づいた決定木の枝刈り法を考案し、より多くのルール数に対して決定木を構成可能とすることである。

謝辞

本研究の一部は、神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金（RIIS201903）の援助を受けた。

文献

1) Tanaka K, Mikawa K and Hikin M (2013) A heuristic algorithm for reconstructing a packet filter with dependent rules. *IEICE Trans. Commun.* **96**: 155-162.
2) Tanaka K, Mikawa K and Takeyama K (2013) Optimization of packet filter with maintenance of rule dependencies. *IEICE Communications Express* **2**: 80-85.
3) Tapdiya A and Fulp EW (2009) Towards optimal firewall rule ordering utilizing directed acyclical graphs. In:*Computer Communications and Networks, 2009. ICCCN 2009. Proceedings of 18th Internatonal Conference*. pp.1-6.
4) Taylor DE (2005) Survey and taxonomy of packet classification techniques. *ACM Comput. Surv.* **37**: 238-275.
5) Gupta P and McKeown N (2000) Classifying packets with hierarchical intelligent cuttings. *Micro. IEEE* **20**: 34-41.
6) Singh S, Baboescu F, Varghese G and Wang J (2003) Packet classification using multidimensional cutting. In: *Proceedings of the 2003 Conference on Applications, Technologies, Architectures, and Protocols for Computer Communications*, *SIGCOMM* '03. pp. 213-224.
7) Li W and Li X (2013) Hybridcuts: A scheme combining decomposition and cutting for packet classification. In: *2013 IEEE 21st Annual Symposium on High-Performance Interconnects*. pp. 41-48.

8) Srinivasan V, Varghese G, Suri S and Waldvogel M (1998) Fast and scalable layer four switching. *SIGCOMM Comput. Commun. Rev*. **28**: 191-202.
9) Pagiamtzis K and Sheikholeslami A (2006) Contentaddressable memory (CAM) circuits and architectures: tutorial and survey. *IEEE. Solid-state Circuits* **41**: 712-727.
10) Ligatti J, Kuhn J and Gage C (2010) A packetclassification algorithm for arbitrary bitmask rules, with automatic time-space tradeoffs. In: *Proceedings of the International Conference on Computer Communication Networks (ICCCN)*. pp. 145-150.
11) Mikawa K and Tanaka K (2015) Run-based trie involving the structure of arbitrary bitmask rules. *IEICE Transactions on Information and Systems* E98.D(6): 1206-1212.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：61-64 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

アルキル置換オリゴシランの励起状態に関する研究

辻　勇人[1,4]　金澤悠紀[2]　江原正博[2,3]

Studies on Excited State of Alkylated Oligosilanes

Hayato Tsuji[1,4], Yuki Kanazawa[2] and Masahiro Ehara[2,3]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, 259-1293, Japan
[2] Sokendai, The Graduate University for Advanced Studies, Okazaki City, Shizuoka 444-8585, Japan
[3] Institute for Molecular Science and Research Center for Computational Science, Okaxaki City, Shizuoka 444-8585, Japan
[4] To whom correspondence should be addressed. E-mail: tsujiha@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Geometric optimization of the excited states of *n*-Si_5Me_{12} and *n*-Si_7Me_{16} was performed using time-dependent density functional theory calculations to compare their structures and emission properties. It was found that the geometry of *n*-Si_5Me_{12} changes from all-*transoid* in the ground state to all-*anti* in the excited state, whereas that of *n*-Si_7Me_{16} remains all-*transoid* in both states. This is related to elongation of the Si-Si bond lengths in the excited state, showing σσ*：those of pentasilane elongate to 2.45-2.49 Å with bond angles up to 141° in the excited state, which facilitates its conformation to relax all-*anti* by releasing the 1,3-repulsion between the methyl groups. Meanwhile, those of heptasilane (less than 2.434 Å and 125°) do not elongate as much as those of pentasilane, which restrict its conformation similar to that in the ground state. Calculated emission wavelengths and oscillator strengths of these oligosilanes effectively reproduced the experimental data: large and small Stokes shifts in pentasilane and heptasilane, respectively, were estimated in agreement with calculated geometric changes.

Keywords: oligosilanes, excited state, structure, photophysical properties

序論

半導体シリコンとその加工等は現在のエレクトロニクスを支える重要な物質とテクノロジーであるが、いわゆるムーアの法則の限界が近づいていると言われるように、小型化による高集積化が困難になってきている。これを踏まえて、従来のトップダウン的手法に変わって、ナノもしくはサブナノサイズの分子をボトムアップ的に構築する分子デバイスへのパラダイムシフトが注目されている。現在は不飽和炭素を基本骨格とするπ共役系有機化合物が主流であり、分子ワイヤなどの研究が盛んに行われている[1,2]。その一方で、半導体シリコンの一次元類縁体であるオリゴシランについても、π共役系に比べればはるかに例は少ないものの、実験および理論の双方から様々なアプローチがなされてきた[3,4]。このような研究がなされてきた背景としては、オリゴシランが単結合しかもたないにも関わらず、炭素π共役系（炭素－炭素多重結合を持つ物質）に似た性質を示すという点に注目されたためである。1960 年代に、紫外光領域の吸収や発光特性が報告され、これがケイ素－ケイ素σ軌道の非局在化効果（σ共役）によるものであると説明されている。

われわれの研究グループも 2000 年代から、炭素鎖を用いることでケイ素主鎖の立体配座が制御されたオリゴシランを構築し、それらを用いて実験と計算の両方を用いて、主鎖構造と電子状態の関係性について研究を行っている[5-15]。これまでの研究から、基底状態の情報についてはかなりのことが明らかとなり、ケイ素主鎖の構造と電子状態との関係性や、それに基づく吸収スペクトル等の解釈などが可能となった。それに対して、励起状態の研究については、実験的検証に適したモデル化合物の欠如や励起状態の分子構造決定の困難さのためにほとんど進んでお

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

らず、その一方で、近年の計算機とプログラムの進化のために、計算を用いた理論的研究が先行している。励起状態に関する知見は、発光スペクトルや光反応等の解釈に関連するため、これらを予測し、分子設計へとフィードバックする上で重要であり、「一次元シリコン」化合物の応用のための基盤となるものである。

筆者らは2年前の本誌で、直鎖のドデカメチルペンタシラン（*n*-Si_5Me_{12}）と、ケイ素主鎖構造が all-anti に制御されたペンタシラン化合物の励起状態について、計算による最適化構造を報告した。その際の課題であった、ケイ素鎖長の違いによる励起状態の局在化 / 非局在化の違いに関する知見と、発光スペクトルのシミュレーションについて今回検討を行ったので報告する。

材料と方法

実験から、励起状態が非局在化すると考えられている[16]直鎖のメチル置換ヘキサシラン化合物（*n*-Si7Me_{16}）の励起状態における構造最適化を行い、基底状態の構造と比較した。また、ヘキサシランとペンタシラン化合物の構造の比較も行った。計算には、基底状態は密度汎関数（DFT）、励起状態は時間依存 DFT（TD DFT）法を用い最低励起状態の構造最適化を行った。汎関数には TPSSh、基底関数としては、Si には 6-31G(d)、C と H には 6-31G を用いた。

結果

構造最適化計算によって求められたケイ素－ケイ素結合長と結合角のデータを Fig. 1 に示す。ペンタシランとヘプタシラン共通して、基底状態ではいずれの化合物も C_2 対称性を有し、ケイ素－ケイ素結合長は 2.37 Å 前後で、結合角はほぼ 112°、主鎖中のケイ素原子4つが形成する二面角は 163-164° と all-*transoid* 配座をとっていた。励起状態では、いずれの化合物も非対称化した。ペンタシランの結合長は4つのうち2つは 2.497 および 2.455 Å（基底状態比 103.5%）にまで伸張する一方で、他の2つは 2.377、2.408 Å に留まった。結合角は 122°、128°、141° と大幅に増大した。ケイ素主鎖の二面角は2つとも 180° となり、all-*anti* 配座へと変化することがわかった。

ヘプタシラン化合物では、結合長は 2.378-2.434 Å の範囲で、6つあるケイ素―ケイ素結合のうち4つまでは 2.43 Å 前後と、ほぼ均等に伸張しており、その程度はペンタシランよりも小さかった（最大で 2.7% の伸張）。結合角は、2カ所は 107°、109° と小さくなり、別の2カ所は 125° と増大し、残りの

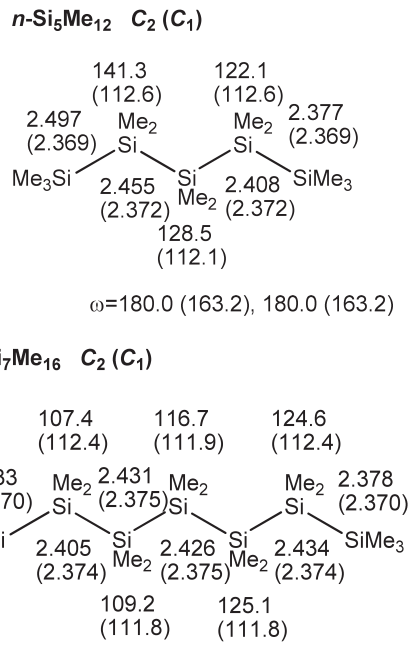


Fig. 1. Optimized structures of *n*- Si_nMe_{2n+2} with n = 5 and 7. Bond lengths and angles of the excited states, together with those of the ground state in the parentheses are shown.

2カ所は基底状態と大きな変化はなかった。ケイ素主鎖の二面角については、1カ所だけ 178° にまで増加したが、そのほかは 162.8-166.5° と基底状態からほとんど変化が見られなかった。

吸収および発光極大の計算値は、ペンタシランではそれぞれ 233 nm（振動子強度 f = 0.835）、372 nm（f = 0.166）で、Stokes シフトは 16,000 cm^{-1} と大きな値であった。ヘプタシランでは吸収波長 260 nm（f = 1.057）、発光波長 301 nm（f = 0.166）と計算され、Stokes シフトは 5,200 cm^{-1} と、ペンタシランに比べるとかなり減少していた。

討論

これまでの研究から、ケイ素鎖長が3以上のオリゴシランでは、一般に第一励起状態（S_1）は σ σ * 性、すなわち σ 結合性軌道から反結合性軌道に1電子が遷移した状態に相当することが知られている。したがって、励起状態ではケイ素―ケイ素結合長は基底状態に比べて伸張することが予測され、実際に計算でもそれが反映されている。ケイ素の数が少ない化合物ではケイ素―ケイ素結合1つあたりの伸張率が大きくなることが予測され、実際にペンタシランでは一部の結合が基底状態に比べて著しく伸張するのに対し、ヘプタシランでは多くの結合がほぼ均等に伸張するという傾向がみられた。このような、励起

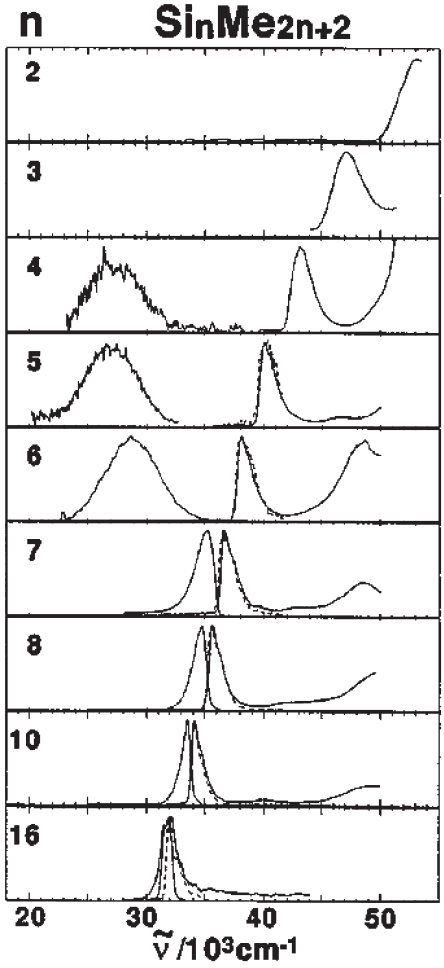


Fig. 2. Emission (left solid line from $n = 4$) and absorption (right solid line for all) spectra of n- $SinMe_{2n+2}$ (n = 2-8, 10, 16). Copyright (1999) Wiley. Used with permission from Ref 16.

状態における結合１つあたりの「負担」の系統的な変化は直感と一致するが、Fig. 2 の実験データに見られるようなヘキサシランからヘプタシランへの変化によるスペクトル、特に発光スペクトルの顕著な変化はどのように理解すれば良いのであろうか？

これを考える鍵が立体配座の変化にあると考えられる。よく知られるように、ブタン（C_4H_{10}）は炭素主鎖の二面角が 180° の *anti* 配座がエネルギー的に最安定な立体配座である。これに対して、メチル置換テトラシラン（n-Si_4Me_{10}）ではケイ素主鎖の二面角が 165° の *transoid* 配座がエネルギー的に最安定であり、180° の *anti* 配座はエネルギー的に極大に相当する。これは、一般式 A_4X_{10} で表される化合物に対して、主鎖内の A－A 結合長 $r_{A\text{-}A}$ に対する置換基 X の van der Waals 半径 r_X^{vdW} の比 $R = r_X^{vdW}/r_{A\text{-}A}$ の違いによって、最安定配座が異なることに起因する[17]。すなわち、置換基 X が嵩高いと、主鎖の二面角が 180° の際には１位と３位（または２位と４位）の置換基 X 間の立体反発（1,3- 立体反発）が大きく、これを解消するために主鎖が捻れ、その結果、*transoid* 配座が最安定配座となる。

このモデルにしたがって、オリゴシランの鎖長依存性を考えると、ペンタシランのようなケイ素主鎖が短いものの励起状態では $r_{A\text{-}A}$ が大幅に伸びるために比 R が小さくなり、したがってメチル基の 1,3- 立体反発が解消されるためにブタンのように *anti* 配座が最安定配座となると考えられる。その結果、all-*transoid* から all-*anti* へと構造緩和を示す。一方で、ヘプタシランのように $r_{A\text{-}A}$ 変化が小さくなると、R の変化が認められず、その結果励起状態でも all-*transoid* 配座に留まるものと考えられる。最安定配座が *anti* か *transoid* かを決める R の閾値がケイ素鎖 6 と 7 の間に存在するため、このような急峻な物性の変化として顕在化すると考えられる。したがって、ケイ素鎖が短いヘキサシランまでは励起状態で all-*anti* へと構造緩和を示し、基底状態と構造が大きく異なるために Stokes シフトが大きく振動子強度が小さな蛍光を示すのに対し、ケイ素鎖が長いヘプタシランになると両者の構造にほとんど変化が見られないために Stokes シフトが小さく振動子強度が大きな蛍光を示すことが理解される。

謝辞

本研究の一部は 2019 年度総合理学研究所共同研究助成（RIIS201904）のサポートにより行われた。ここに感謝申し上げる。

文献

1) Schubert C, Margraf JT, Clark T and Guldi DM (2015) Molecular wires - impact of π-conjugation and implementation of molecular bottlenecks. *Chem. Soc. Rev.* **44**: 988-998.
2) Sukegawa J, Schubert C, Zhu X, Tsuji H, Guldi DM and Nakamura E (2014) Electron transfer through rigid organic molecular wires enhanced by electronic and electron-vibration coupling. *Nature Chem.* **6**: 899-905.
3) Su TA, Li H, Klausen RS, Kim NT, Neupane M, Leighton JL, Steigerwald ML, Venkataraman L and Nuckolls C (2017) Silane and germane molecular electronics, *Acc. Chem. Res.* **50**: 1088-1095.
4) Miller RD and Michl J (1989) Polysilane high polymers, *Chem. Rev.* **89**: 1359-1410.
5) Tsuji H, Michl J and Tamao K (2003) Recent experimental and theoretical aspects of the conformational eependence of UV Absorption of short chain peralkylated oligosilanes. *J. Organomet. Chem.* **685**: 9-14.
6) Kanazawa Y, Tsuji H, Ehara M, Fukuda R, Casher DL, Tamao K, Nakatsuji H and Michl J (2016) Electronic transitions in conformationally controlled peralkylated hexasilanes. *ChemPhysChem*, **17**: 3010-3022.

7) Tsuji H, Fogarty HA, Ehara M, Fukuda R, Casher DL, Tamao K, Nakatsuji H and Michl J (2014) Electronic transitions in conformationally controlled tetrasilanes with a wide range of SiSiSiSi dihedral angles. *Chem. Eur. J.* **20**: 9431-9441.
8) Fukazawa A, Tsuji H and Tamao K (2006) All-*anti*-octasilane: conformation control of silicon chains using the robust bicyclic trisilane as the building block. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 6800-6801.
9) Tsuji H, Fukazawa A, Yamaguchi S, Toshimitsu A and Tamao K (2004) All-*anti* pentasilane: conformation control of oligosilanes based on bis (tetramethylene)-tethered trisilane unit. *Organometallics* **23**: 3375-3377.
10) Mallesha H, Tsuji H and Tamao K (2004) UV absorption and mass spectra of n-alkylsilyl end-capped *anti, cisoid*-alternating oligosilanes up to docosasilane (Si_{22}). *Organometallics* **23**: 1639-1642.
11) Seki S, Okamoto K, Matsui Y, Tagawa S, Tsuji H, Toshimitsu A and Tamao K (2003) Transient absorption spectroscopy of radical ions of rigid *anti*- and *syn*-yetrasilane. *Chem. Phys. Lett.* **380**: 141-145.
12) Tsuji H, Terada M, Toshimitsu A and Tamao K (2003) σ σ * Transition in *anti, cisoid* alternating oligosilanes: clear-cut evidence for suppression of conjugation effect by a *cisoid* turn. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 7486-7487.
13) Fogarty HA, Tsuji H, David DE, Ottosson CH, Ehara M, Nakatsuji H, Tamao K and Michl M (2002) Peralkylated tetrasilanes: conformational eependence of the photoelectron spectrum. *J. Phys. Chem. A* **106**: 2369-2373.
14) Tsuji H, Toshimitsu A, Tamao K and Michl J (2001) UV, MCD, and LD spectra of a conformationally constrained *ortho*-tetrasilane: support for the avoided crossing model of conformational effects on excited states. *J. Phys. Chem. A* **105**: 10246-10248.
15) Tamao K, Tsuji H, Terada M, Asahara M, Yamaguchi S and Toshimitsu A (2000) Conformation control of oligosilanes based on configurationally constrained bicyclic disilane units. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3287-3290.
16) Raymond MK and Michl J (1999) Quantum confinement induced collapse of a large to a small radius self-trapped exciton in a permethylated polysilane chain. *Int. J. Quantum Chem.* **72**: 361-367.
17) Neumann F, Teramae H, Downing JW and Michl J (1998) Gauche, ortho, and anti conformations of saturated A_4X_{10} chains: when will all six conformers exist? *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 573-582.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：65-73 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

芳香族置換基を導入した N,C,S- ピンサー鉄錯体の合成と分光学的性質

川原井一成 [1]　中島　洋 [1]　伊藤亮孝 [2]　磯田脩斗 [3]　廣津昌和 [3, 4, 5]

Synthesis and Spectroscopic Properties of N,C,S-Pincer Iron Complexes Bearing an Aromatic Substituent

Kazunari Kawarai[1], Hiroshi Nakajima[1], Akitaka Ito[2], Shuto Isoda[3] and Masakazu Hirotsu[3, 4, 5]

[1] Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka City, Osaka 558-8585, Japan
[2] Graduate School of Engineering, Kochi University of Technology, 185 Miyanokuchi, Tosayamada, Kami City, Kochi 782-8502, Japan
[3] Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[4] Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[5] To whom correspondence should be addressed. E-mail: mhiro@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A series of N,C,S-pincer iron(II) complexes bearing an aromatic substituent was synthesized from 4-(pyridyn-2-yl)dibenzothiophene derivatives via C-S bond cleavage. The general formula of the complexes is *trans*-[Fe(L)(CO)(PMe_3)$_2$], where L represents the N,C,S-tridentate ligands consisting of biphenylthiolate dianion and pyridine moieties. 8-Quinolyl (Q) and 1-naphthyl (N) groups were introduced into the pyridyl group at the 4 or 5 position of the original ligand L^H, giving L^{4Q}, L^{4N}, L^{5Q}, and L^{5N}. The electronic absorption spectra of *trans*-[Fe(L)(CO)(PMe_3)$_2$] showed an intense band in the range of 400-450 nm with a shoulder in the longer wavelength region. TD-DFT calculations suggested that the former originates in the transition from the orbitals around the thiolate-containing metallacycle to the pyridine moiety, while the latter is ascribed to that from the antibonding π^* orbital of the Fe-S bond to the pyridine moiety. In both transitions, the charge transfer to the aromatic substituent can be induced. The most intense band for the latter charge transfer was found for *trans*-[Fe(L^{4Q})(CO)(PMe_3)$_2$].

Keywords: iron complex, dibenzothiophene derivatives, N,C,S-tridentate ligand, quinolyl group, naphthyl group, charge transfer transition, electronic spectrum

序論

人間社会が自然と共存し、持続的に発展するために、太陽光エネルギーを化学エネルギーに変換する人工光合成や、電気エネルギーに変換する太陽電池が益々重要になってきた [1]。人工光合成では、効率よく光エネルギーを捕集するための光増感剤が、物質変換を担う触媒と共に中心的な役割を果たしている。また、色素増感太陽電池においては、トリス (ビピリジン) ルテニウム錯体が光増感色素として採用され、広く研究が進められてきた。このルテニウム錯体は光化学的触媒反応の光増感剤としても利用されており [2, 3]、その誘導体の開発はエネルギー関連分野の共通課題となっている。しかしルテニウムは希少元素の一つであり、近年は有機色素の開発や、地球に豊富な金属の利用にも注目が集まっている [4-6]。一方、ルテニウムと同族元素の鉄もトリス（ビピリジン）錯体を形成し、可視領域に強い吸収帯を示すことが知られている。鉄は元素存在度において圧倒的に優位であるにもかかわらず、鉄錯体を基調とする光増

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

感剤は開発途上にある[4-9]。

ルテニウム錯体と鉄錯体の決定的な違いは、配位子により誘起される金属 d 軌道分裂の大きさである。一般に、3d 軌道を結合形成に用いる鉄錯体は、4d 軌道を用いるルテニウム錯体よりも d 軌道分裂が小さく、金属内遷移に基づく励起状態（MC 状態）の準位がルテニウム錯体よりも低い。そのため可視領域の金属－配位子電荷移動遷移により生じる励起状態（MLCT 状態）は、ルテニウム錯体では長寿命であるが、鉄錯体では MC 状態を経由して速やかに失活する[5,6]。この失活経路を抑制することができれば、鉄錯体においてもルテニウム錯体と同様に長寿命励起状態が期待できる。

そのような戦略のもと、近年、比較的長寿命の励起状態をもつ 6 配位低スピン型の鉄（Ⅱ）錯体が報告されている[7,8]。我々が開発してきたジアニオン性の N,C,S- 三座配位子（L^H）を有する鉄（Ⅱ）カルボニル錯体 *trans*-[Fe(L^H)(CO)(PR_3)$_2$]（図 1）は、軸位に 2 つのリン配位子をもち、その種類によらず 400 nm 付近に強い吸収帯を示す[10-12]。この吸収帯はチオラトメタラサイクル周辺の軌道からフェニルピリジン骨格の反結合性π軌道への電荷移動遷移に帰属されており、MLCT 遷移を含んでいる。より長波長側にも吸収帯が現れるが、その強度は小さい。この N,C,S- 三座配位子は強配位子場を与えるため、鉄系光増感剤への応用が期待できる。しかし、N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体の分光学的性質は十分に理解されておらず、合成と理論の両面から検討が必要である。

本研究では、N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体において MLCT 遷移のアクセプターとなるピリジン部位に芳香族置換基を導入した。アクセプター軌道に対する摂動が MLCT 遷移に及ぼす影響を調査することで、光増感剤としての基礎的知見を得ることを目的とした。

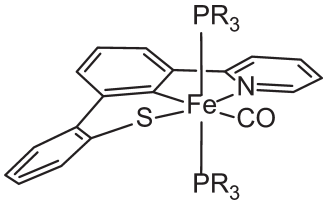


図 1. 軸位にリン配位子をもつ N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）カルボニル錯体 *trans*-[Fe(L^H)(CO)(PR_3)$_2$].

材料と方法

実験手法と測定機器

鉄錯体の合成はグローブボックスもしくはシュレンク法を用いて行った。光反応には石英ガラス水冷保護管を備えた高圧水銀灯 HL400BH-8（400 W、セン特殊光源株式会社）を用いた。IR スペクトルは、KBr 錠剤法を用いて Jasco FT/IR-4600 分光計により測定した。NMR スペクトルは JEOL ECA-400、ECS-400 FT-NMR 分光計により測定した。UV-Vis 吸収スペクトルは Jasco V-770 分光光度計を用いて測定した。サイクリックボルタモグラムは ALS/DY2325 バイポテンショスタットを用いて測定した。元素分析は大阪市立大学分析センターに依頼し、J-SCIENCE LAB JM10 もしくは FISONS Instrument EA1108 元素分析装置により行った。

配位子の前駆体となるジベンゾチオフェン誘導体は図 2 に従って合成した。また、鉄錯体は図 3 および図 4 に従って合成した。

4-(4'- ブロモピリジン -2'- イル) ジベンゾチオフェン（A）の合成

炭酸カリウム（1.36 g, 11 mmol）の水溶液（50 mL）と 2,4- ジブロモピリジン（1.95 g, 8.2 mmol）の 1,2- ジメトキシエタン（DME）溶液（150 mL）を混合し、窒素ガスを 30 分間通じた。4- ジベンゾチオフェンボロン酸（2.04 g, 8.9 mmol）と [Pd(PPh_3)$_4$]（73 mg, 0.06 mmol）を加え、窒素気流下、100 ℃で 12 時間加熱撹拌した。得られた黄色懸濁液をジクロロメタン（150 mL）で抽出した後、水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去することで黄褐色固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：CH_2Cl_2/*n*-hexane = 1/3, Rf = 0.2）で精製し、A の白色固体を得た（1.54 g, 55%）。

4-(5'- ブロモピリジン -2'- イル) ジベンゾチオフェン（B）の合成

炭酸カリウム（1.26 g, 9.0 mmol）の水溶液（40 mL）と 2,5- ジブロモピリジン（1.90 g, 8.0 mmol）の DME 溶液（120 mL）を混合し、窒素ガスを 30 分間通じた。4- ジベンゾチオフェンボロン酸（2.02 g, 8.9 mmol）と [Pd(PPh_3)$_4$]（91 mg, 0.08 mmol）を加え、窒素気流下、100℃で 12 時間加熱撹拌した。得られた黄色懸濁液をジクロロメタン（150 mL）で抽出した後、水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去することで黄褐色固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：CH_2Cl_2/*n*-hexane = 1/5, Rf = 0.5）で精製し、B の白色固体を得た（2.07 g, 76%）。

芳香族置換基を導入したピリジル基を持つジベンゾチオフェン誘導体の合成

前述の A を用いて、ピリジン環 4 位に芳香族置換基を導入した。炭酸カリウム（846 mg, 6.2 mmol）の

水溶液（20 mL）と A（1.76 g, 5.2 mmol）の DMF 溶液（80 mL）を混合し、窒素ガスを 30 分間通じた。8- キノリンボロン酸（999 mg, 5.8 mmol）と [Pd(PPh$_3$)$_4$]（60 mg, 0.05 mmol）を加え、窒素気流下、100℃で 12 時間加熱撹拌した。得られた黄色懸濁液をジクロロメタン（100 mL）で抽出した後、水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去することで黄褐色固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液 : CH_2Cl_2, Rf = 0.4）で精製し、1a を無色飴状物として得た（467 mg, 23%）。

1- ナフタレンボロン酸を用いた同様の方法により 1b を合成した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液 : CH_2Cl_2, Rf = 0.6）で精製し、白色固体を得た（74%）。

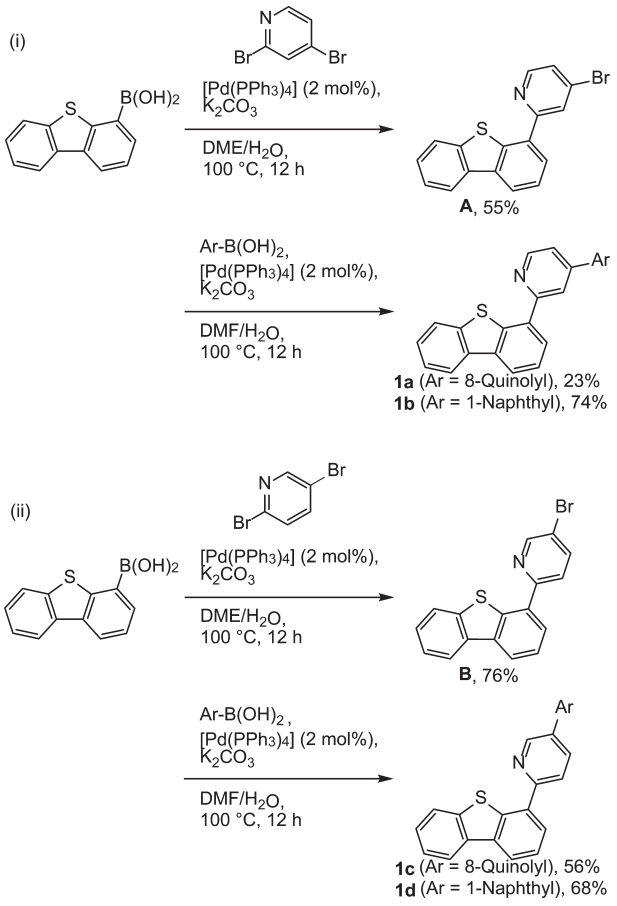


図 2. 配位子前駆体の合成. ピリジン環 4 位 (i) への芳香族置換基の導入およびピリジン環 5 位 (ii) への芳香族置換基の導入.

また、前述の B を用いて、ピリジン環 5 位に芳香族置換基を導入した。炭酸カリウム（158 mg, 1.2 mmol）の水溶液（5 mL）と B（157 mg, 0.46 mmol）の DMF 溶液（15 mL）を混合し、窒素ガスを通じて脱酸素した。8- キノリンボロン酸（100 mg, 0.58 mmol）と [Pd(PPh$_3$)$_4$]（13 mg, 0.01 mmol）を加え、窒素気流下、100 ℃で 12 時間加熱撹拌した。得られた黄色懸濁液にジクロロメタンを加えて沈殿を溶解させ、水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去することで黄褐色固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液 : CH_2Cl_2, Rf = 0.8）で精製し、1c の白色固体を得た（100 mg, 56%）。

1- ナフタレンボロン酸を用いた同様の方法により 1d を合成した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液 : CH_2Cl_2/*n*-hexane = 1/1, Rf = 0.2）で精製し、無色飴状物を得た（68%）。

二核鉄錯体の合成

グローブボックス中でテフロンコック付き石英シュレンク管に 1a（271 mg, 0.70 mmol）、[Fe(CO)$_5$]（0.23 mL, 1.7 mmol）、THF（30 mL）を加えた。得られた淡黄色溶液を凍結脱気した後、高圧水銀灯で 9 時間光照射を行った。光照射時は 3 時間ごとに凍結脱気を行った。反応後、暗褐色溶液を減圧下で溶媒留去し、褐色固体を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液 : CH_2Cl_2, Rf = 0.7）で精製し、[Fe$_2$(L^{4Q})(CO)$_5$]（2a）の赤色固体を得た（255 mg, 57%）。

配位子前駆体 1b、1c、1d を用いた同様の方法によ り、[Fe$_2$(L^{4N})(CO)$_5$]（2b）、[Fe$_2$(L^{5Q})(CO)$_5$]（2c）、[Fe$_2$(L^{5N})(CO)$_5$]（2d）を合成した。収率はそれぞれ 48%、58%、19% であった。

単核鉄錯体の合成

シュレンク管中で二核鉄錯体 2a（130 mg, 0.20 mmol）のトルエン溶液（10 mL）にトリメチルホスフィン（1 M トルエン溶液 , 1.0 mL, 1.0 mmol）を加え、100 ℃で 12 時間加熱撹拌した。反応溶液を減圧下で溶媒留去し、黄緑色固体を得た。この固体をグローブボックス中で再結晶し（toluene/*n*-hexane）、*trans*-[Fe(L^{4Q})(CO)(PMe$_3$)$_2$]（3a）の黄緑色結晶を得た（50 mg, 39%）。

二核鉄錯体 2b を用いた同様の方法により、*trans*-[Fe(L^{4N})(CO)(PMe$_3$)$_2$]（3b）の黄褐色結晶を得た（15%）。また、2c、2d を用いた同様の方法により、*trans*-[Fe(L^{5Q})(CO)(PMe$_3$)$_2$]（3c）、*trans*-[Fe(L^{5N})(CO)(PMe$_3$)$_2$]（3d）を赤色結晶として得た。収率はそれぞれ 56%、30% であった。

X 線結晶構造解析

良好な結晶が得られた錯体 3c について、Rigaku MicroMax-007HF/Saturn 724 HG CCD 回折計を用いて回折データを測定した。CrystalClear プログラムを用いてデータを処理し、解析には WinGX

プログラムを用いた。SIR97 を用いて初期構造を決定し、SHELXL-2013 を用いて精密化した。結晶学的データ：Mo K α 線；0.06 × 0.12 × 0.16 mm; $C_{33}H_{34}FeN_2OP_2S$; M = 624.47; 斜方晶系；a = 15.3732(18), b = 18.702(2), c = 21.484(2) Å; V = 6176.9(11) Å^3; T = 200 K; 空間群 *Pnab* (no. 60); Z = 8; D_{calcd} = 1.343 Mg/m^3; μ = 0.688 mm^{-1}; F(000) = 2608.00; 測定反射数 96130; 計算に用いた独立反射数 7061 (R_{int} = 0.0690); 精密化後の R 因子 $R1$ [$I > 2\ \sigma(I)$] = 0.0636, $wR2$ (all data) = 0.1493; GOF = 1.241（CCDC 2020065）。

結果と討論

配位子前駆体の合成

これまでに報告してきた N,C,S- 三座配位子 L^H（図 1）の前駆体となる 4-(ピリジン -2- イル) ジベンゾチオフェンに対して、ピリジン環の 4 位もしくは 5 位に芳香族置換基を導入した（図 2）。芳香族置換基としては、8- キノリル基（Q）あるいは 1- ナフチル基（N）を選んだ。4- ジベンゾチオフェンボロン酸に対して、ジブロモピリジン、アリールボロン酸の段階的なクロスカップリング反応を行い、目的の配位子前駆体 1a－1d を得た。第一段階の反応ではジブロモピリジンの 2 つのブロモ基が反応しうるが、窒素に隣接したブロモ基が優先的に反応し、比較的良好な収率でブロモ中間体（A, B）が得られた。第二段階の反応は、2- ピリジル基の 4 位に 8- キノリル基を導入した 1a を除いて、良好な収率で進行した。

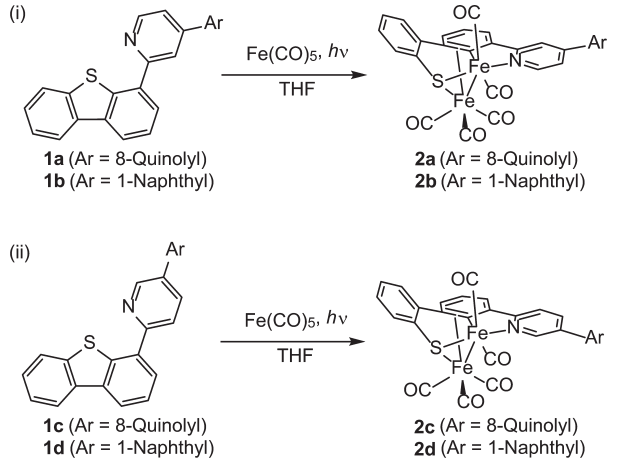


図 3. ピリジン環 4 位 (i) およびピリジン環 5 位 (ii) に芳香族置換基を導入した N,C,S- 三座配位子を持つ二核鉄錯体の合成 .

二核鉄錯体の合成

芳香族置換基を導入した前駆体 1a－1d を用いて、N,C,S- 三座配位子を持つ二核鉄錯体を合成した（図 3）。配位子前駆体 1a － 1d とペンタカルボニル鉄の THF 溶液を、高圧水銀灯を用いて光照射し、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製することで二核鉄錯体 [Fe_2(L)(CO)$_5$]（2a, L = L^{4Q}; 2b, L = L^{4N}; 2c, L = L^{5Q}; 2d, L = L^{5N}）を得た。ここで L^{4Q}, L^{4N}, L^{5Q}, L^{5N} は、前駆体 1a－1d の C-S 結合開裂により生じる配位子であり、それぞれピリジン環の 4 位に 8- キノリル基、4 位に 1- ナフチル基、5 位に 8- キノリル基、5 位に 1- ナフチル基を持つ。単離した錯体は、^{1}H NMR スペクトル、^{1}H-^{1}H COSY スペクトルおよび IR スペクトルにより構造を解析し、置換基を持たない既報の錯体 [$Fe_2(L^H)$(CO)$_5$] に類似の構造をもつと推定した [10]。

N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体の合成と性質

先行研究の合成法を参考にして、二核鉄錯体 2a－2d からトリメチルホスフィンを軸配位子とする N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体を合成した（図 4）[10, 12]。二核鉄錯体のトルエン溶液に 5 当量のトリメチルホスフィンを加え、100 ℃で 12 時間撹拌すると赤褐色溶液が得られた。溶媒を留去した後、再結晶により目的の N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体 *trans*-[Fe(L)(CO)(PMe$_3$)$_2$]（3a, L = L^{4Q}; 3b, L = L^{4N}; 3c, L = L^{5Q}; 3d, L = L^{5N}）を得た。

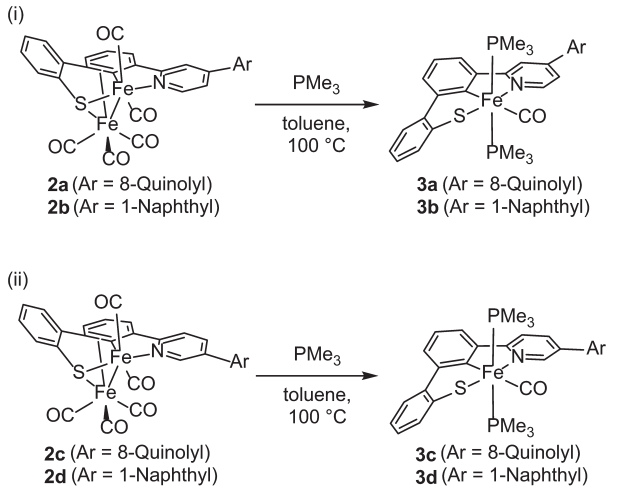


図 4. ピリジン環 4 位 (i) およびピリジン環 5 位 (ii) に芳香族置換基を導入した N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体の合成 .

鉄（Ⅱ）錯体 3a－3d の IR スペクトルでは、1900 cm^{-1} 付近に CO 伸縮振動に帰属される一本のシグナルが観測された（3a, 1900 cm^{-1}; 3b, 1898 cm^{-1}; 3c, 1900 cm^{-1}; 3d, 1890 cm^{-1}）。いずれも無置換体 *trans*-[Fe(L^H)(CO)(PMe$_3$)$_2$]（4）（1891 cm^{-1}）に近い値を示している [12]。このことは、錯体 3a－3d における N,C,S- 三座配位子（L^{4Q}, L^{4N}, L^{5Q}, L^{5N}）の中心金属に対する電子的な効果が、L^H と同等であることを示している。

鉄（Ⅱ）錯体 3a－3d の ^{1}H NMR スペクトルにお

いて、PMe_3 に帰属される三重線のシグナルが観測された。また、^{31}P NMR スペクトルは錯体 4 のスペクトル（15.1 ppm）と同様に 1 つのシグナルを示した（3a - 3d, 15.6 ppm）。このことは 2 つの PMe_3 が軸位に位置することに一致している。また、いずれの錯体においても芳香族置換基のシグナルはシャープであり、2 つの PMe_3 に対応するシグナルが 1 本だけ現れることから、芳香族置換基は室温で自由回転しており、錯形成による立体的な制約は受けていないことが分かる。

錯体 3c の構造を単結晶 X 線構造解析により決定した（図 5）。2 つのリン配位子は軸位を占めており、溶液中における NMR スペクトルの結果と一致している。鉄まわりの代表的な結合距離と結合角を錯体 4 のデータと共に表 1 に示す [12]。錯体 3c と錯体 4 の構造パラメーターは非常に近い値であり、導入したキノリル基の影響はほとんどないことが分かる。

また、錯体 3a と 3c のサイクリックボルタモグラムを測定したところ、Fe^{III}/Fe^{II} に対応する酸化還元電位（3a, − 0.54 V; 3c, − 0.55 V vs Fc^+/Fc, Fc = フェロセン）は錯体 4（− 0.52 V vs Fc^+/Fc）と同様であった。このことも、芳香族置換基の導入が中心金属の環境に大きな影響を与えないことを支持している。これらのデータを *trans*-$[Fe(L^H)(CO)(PMe_2Ph)_2]$ のピリジン環にアミノ基を導入した場合と比べると、芳香族置換基の場合は導入位置による酸化還元電位の変化も小さいことが分かる [11]。

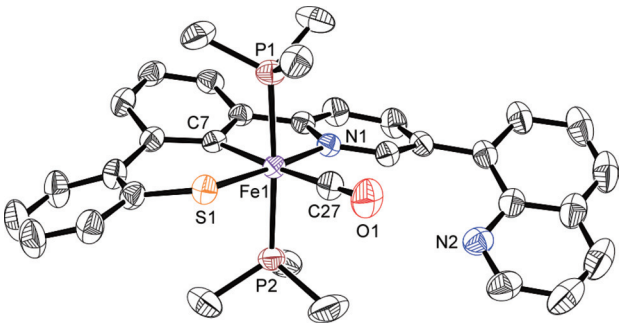


図 5. 錯体 3c の結晶構造（熱振動楕円体の確率は 50%, 水素原子は省略）.

表 1. 錯体 3c, 4 の結合長 (Å) および結合角 (°)

	3c	4 [12]
Fe1–S1	2.2843(8)	2.2777(7)
Fe1–N1	1.983(2)	1.9799(19)
Fe1–P1	2.2493(9)	2.2511(8)
Fe1–P2	2.2458(9)	2.2340(8)
Fe1–C7	2.000(3)	1.997(2)
Fe1–C27	1.762(3)	1.761(2)
S1–Fe1–N1	176.34(7)	175.97(6)
P1–Fe1–P2	176.08(4)	174.68(3)
C7–Fe1–C27	176.66(14)	178.46(10)

N,C,S- ピンサー鉄（II）錯体の分光学的性質

錯体 3a - 3d および 4 の紫外可視吸収スペクトルを図 6 に示す。いずれの錯体も 300 nm 付近にモル吸光係数が 20000-30000 $dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ の吸収帯を、430 nm 付近にモル吸光係数が 6000 - 7000 $dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ の吸収帯を示す。より長波長側の 500 - 600 nm にかけても吸収帯が見られるが、その強度は比較的小さい。各吸収帯の波長とモル吸光係数を表 2 にまとめた。

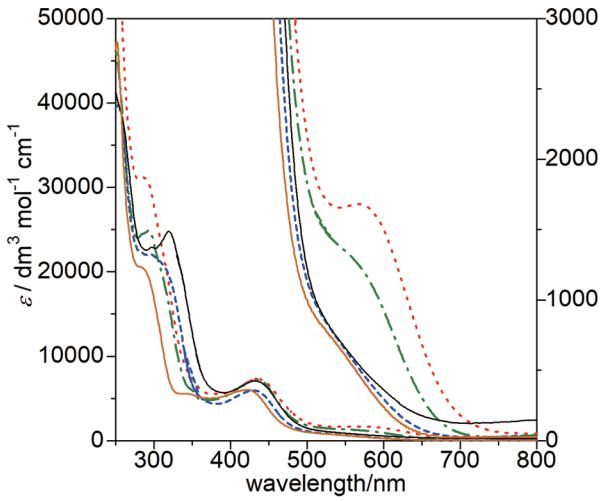


図 6. N,C,S- ピンサー鉄（II）錯体 3a - 3d, 4 の吸収スペクトル（溶媒：CH_2Cl_2）. 3a ·····, 3b -·-·-·-·-, 3c ———, 3d ·····, 4 ———.

表 2. 錯体 3a - 3d の吸収帯（溶媒：CH_2Cl_2）

錯体	λ / nm (ε / $10^3\ dm^3\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)		
3a	286 (31)	435 (7.3)	567 (1.7)
3b	294 (25)	432 (7.0)	570 (1.2)^{sh}
3c	320 (24)	430 (7.0)	540 (0.73)^{sh}
3d	300 (22)^{sh}	430 (6.0)	540 (0.72)^{sh}
4	290 (20)^{sh}	422 (6.0)	540 (0.68)^{sh}

芳香族置換基を導入した錯体 3a - 3d を錯体 4 と比較すると、4 位置換体 3a, 3b において可視領域の吸収帯が長波長側にシフトする傾向があることが分かる。また、錯体 3a, 3b においては 500 - 650 nm の吸収帯のモル吸光係数が錯体 4 よりも増大していることが分かる。これに対して 5 位置換体 3c, 3d のモル吸光係数は錯体 4 と同程度である。

各吸収帯を帰属し、上記の傾向を検証するために、計算化学による考察を行った。鉄（II）錯体 3a - 3d について密度汎関数法（DFT）により構造最適化を行った後、時間依存密度汎関数法（TD-DFT）によ

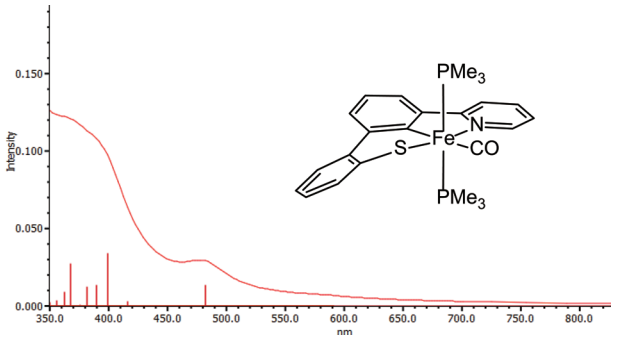


図 7. TD-DFT 計算の結果を基に描いた錯体 4 の吸収スペクトル.

表 3. 錯体 4 の代表的な分子軌道（isovalue = 0.03）

LUMO+3 (−0.244 eV)	LUMO+2 (−0.503 eV)
LUMO+1 (−1.351 eV)	LUMO (−1.702 eV)
HOMO (−4.474 eV)	HOMO−1 (−5.498 eV)
HOMO−2 (−5.801 eV)	HOMO−3 (−5.882 eV)

り光物性を評価した。基底関数として 6-311G(d,p) を選び、B3LYP 混成汎関数を用いて Gaussian16 プログラムにより計算した。錯体 4 については以前に報告したが、基底関数が異なるため、再度計算を行い、詳細に比較した [12]。

最初に錯体 4 について、計算により求めた励起エネルギーと振動子強度を基に描いたスペクトルを図 7 に、代表的な分子軌道を表 3 に示す。400 nm 近傍に観測される吸収帯は HOMO − 1 → LUMO の成分を含んでおり、チオラトメタラサイクル周辺の軌道からピリジン環周辺の軌道への電荷移動遷移に帰属できる。表 3 の HOMO − 1 および LUMO の図は、この遷移が配位子内遷移と MLCT 遷移を併せもつことを示している。また、この電荷移動遷移のアクセプター軌道は、フェニルピリジン部位の反結合性 π 軌道とみなすことができる。500 nm 近傍に観測される吸収帯は HOMO → LUMO+1 の成分を含んでおり、チオラート－鉄の反結合性 π 軌道からピリジン部位の反結合性 π 軌道への遷移と帰属できる。つまり、この遷移は MLCT の性格をもつことが分かる。さらに長波長側の吸収帯は d-d 遷移の成分も含むため、強度が弱い。

次に、芳香族置換基を導入した鉄錯体 3a - 3d の計算結果を示す。錯体 3c の構造解析結果を基に計算の初期モデルを構築した。芳香族置換基は自由回転すると予想されるため、置換基の配向を変えた分子についても計算を行ったが、最適化構造のエネルギー、励起エネルギー、振動子強度等に大きな差はみられなかった。そこで、図 8 に示す最適化構造を基本として議論を進める。

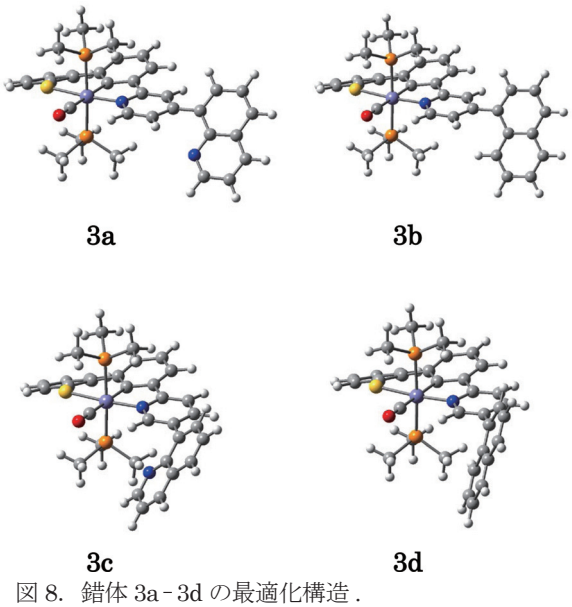


図 8. 錯体 3a - 3d の最適化構造 .

錯体 4 において 400 nm に予測される HOMO − 1 → LUMO の成分を含む強い電荷移動遷移は、4 位にキノリル基を持つ錯体 3a では 461 nm に予測され、長波長側にシフトすることが分かる（図 9A, 表 4）。実測のスペクトルにおいてもこの傾向は現れており、計算結果は実験結果と良い一致を示す。錯体 3b では、HOMO − 1 → LUMO の成分を含む電荷移動遷移は 423 nm に予測されており、長波長側へのシフトは小さい（図 9B, 表 5）。これはナフチル基の軌道エネルギーがキノリル基よりも高いことに起因する。実際のスペクトルでは錯体 3b は 3a と同程度の吸収を 430 nm 付近に示している。5 位にキノリル基を持つ

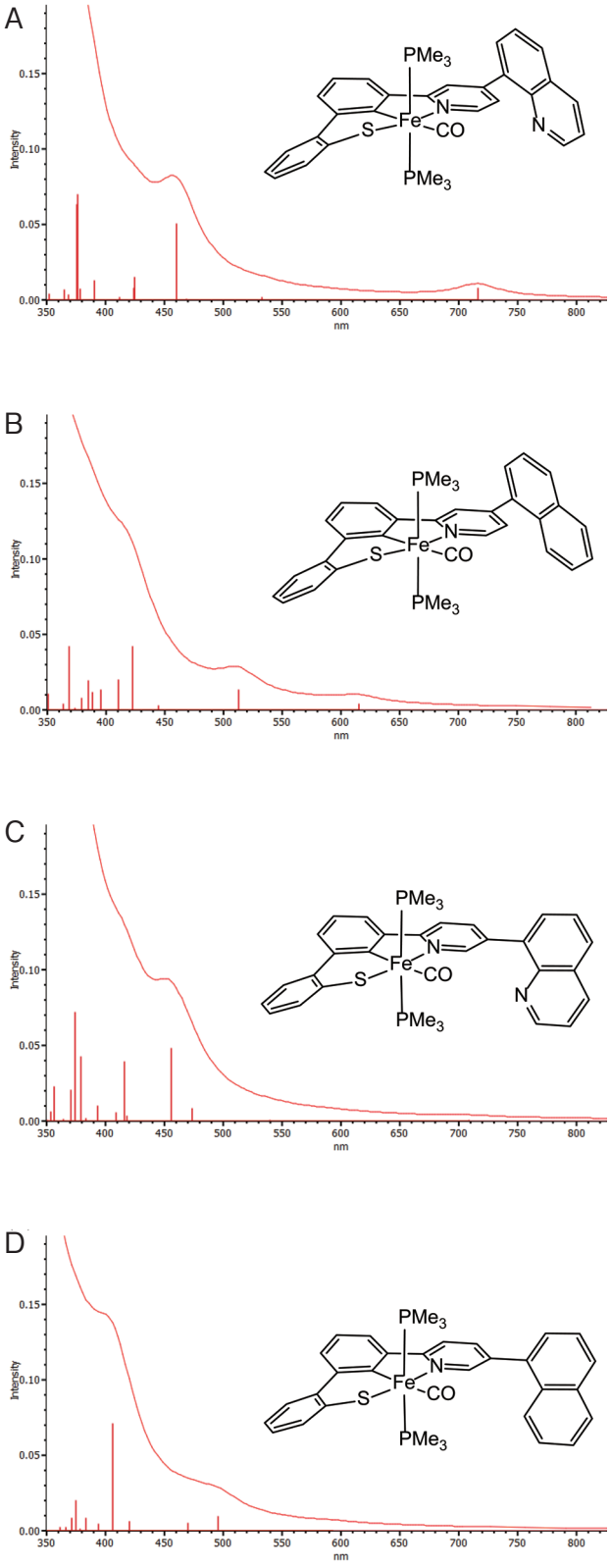


図 9. TD-DFT 計算の結果を基に描いた *trans*-[Fe(L)(CO)(PMe$_3$)$_2$] の吸収スペクトル．A. 3a, L = L^{4Q}. B. 3b, L = L^{4N}. C. 3c, L = L^{5Q}. D. 3d, L = L^{5N}.

表 4. 錯体 3a の代表的な分子軌道（isovalue = 0.03）

LUMO+3 (−1.127 eV)	LUMO+2 (−1.190 eV)
LUMO+1 (−1.494 eV)	LUMO (−2.264 eV)
HOMO (−4.356 eV)	HOMO−1 (−5.373 eV)
HOMO−2 (−5.658 eV)	HOMO−3 (−5.753 eV)

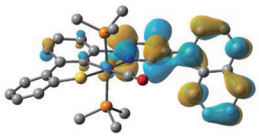
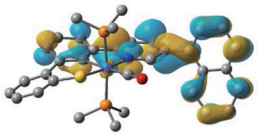
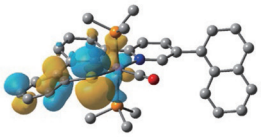
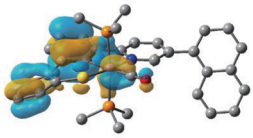
表 5. 錯体 3b の代表的な分子軌道（isovalue = 0.03）

LUMO+1 (−1.538 eV)	LUMO (−1.950eV)
HOMO (−4.456 eV)	HOMO−1 (−5.474 eV)

表 6. 錯体 3c の代表的な分子軌道（isovalue = 0.03）

LUMO+1 (−1.497 eV)	LUMO (−2.201 eV)
HOMO (−4.339 eV)	HOMO−1 (−5.353 eV)

表 7. 錯体 3d の代表的な分子軌道（isovalue = 0.03）

LUMO+1 (−1.485 eV)	LUMO (−1.845 eV)
	
HOMO (−4.464 eV)	**HOMO−1 (−5.478 eV)**
	

錯体 3c では、HOMO－1 → LUMO の成分を含む電荷移動遷移が 456 nm に予測される（図 9C, 表 6）。一方、5 位にナフチル基を持つ錯体 3d では 406 nm である（図 9D, 表 7）。同じ芳香族置換基を持つ錯体で比較すると、5 位置換体は 4 位置換体よりも長波長シフトがわずかに小さいと予想され、実際のスペクトルの傾向と一致する。

ここで、HOMO－1 → LUMO の遷移にかかわる分子軌道の分布を考察する。ドナー側の軌道はチオラトメタラサイクルの周辺に広がっているので、芳香族置換基の影響はほとんど受けていない。アクセプター側の軌道は、錯体 4 においてはフェニルピリジン骨格に広がる反結合性π軌道である（表 3）。芳香族置換基を導入すると、LUMO は芳香族置換基の反結合性π軌道にも広がり、三座配位子中央のベンゼン環の分布は小さくなる（表 4 －表 7）。ただし、キノリル基の場合はキノリル基側に分布が大きくなるのに対し、軌道エネルギーが高いナフチル基の場合は三座配位子のピリジン環上の分布が大きい。また、4 位に芳香族置換基を導入した場合は、錯体 4 においてピリジン環上に広がるπ軌道と位相がそろうため、LUMO の軌道エネルギーが低くなる。このような置換基の種類と導入位置による傾向が計算から予想されるが、実際のスペクトルでは導入位置による違いの方が目立っている。

前述したように、錯体 4 の TD-DFT 計算では HOMO → LUMO+1 の成分を含む電荷移動遷移が 483 nm に予想され、実際のスペクトルにおいてショルダーとして観測される。この吸収帯は、錯体 3a－3d において、置換基の導入位置による違いが顕著である。実際のスペクトルでは 4 位に芳香族置換基を持つ錯体 3a および 3b において長波長シフトが観測されている。計算によると、錯体 3a では 533 nm に HOMO → LUMO+1 の電荷移動遷移が予測されるが、その遷移確率は非常に小さい。かわりに 716 nm における HOMO → LUMO の成分を含む遷移の確率が大きくなっている（図 9A, 表 4）。錯体 3b においては 513 nm に予測される HOMO → LUMO+1 の遷移確率が錯体 4 と同程度であるが、615 nm における HOMO → LUMO の遷移確率は 3a よりも小さい（図 9B, 表 5）。5 位置換体 3c と 3d では、HOMO → LUMO+1 の遷移が 540 nm および 496 nm にそれぞれ予想されるが、錯体 3c においては遷移確率が非常に小さく、計算結果を基に描いたスペクトルにおいてもショルダーが現れない。（図 9C, 表 6；図 9D, 表 7）

HOMO → LUMO+1 の遷移では、ドナー側の軌道はチオラトー鉄の反結合性π軌道である。アクセプター側の軌道を見ると、錯体 4 においてはピリジン環上に広がっているが、錯体 3a－3d においては芳香族置換基の影響を受けてフェニルピリジン骨格に広く分布している。錯体 3a－3d では置換基の導入により新たな分子軌道が挿入されるので、錯体 3a－3d の LUMO+2 が、錯体 4 の LUMO+1 に相当すると考えるべきである。錯体 3a－3d の計算結果を見ると、450－500 nm の遷移は HOMO → LUMO+2 の成分をある程度含んでいる（分子軌道図は表 4 を参照）。

以上のように、芳香族置換基を導入することで、芳香族置換基まで広がったアクセプター軌道への電荷移動遷移を誘起することができる。特に 4 位に導入した場合には長波長側へのシフトと遷移確率の増大が予想される。

結論

N,C,S- ピンサー鉄（Ⅱ）錯体のピリジン配位部位に芳香族置換基を導入した錯体について、電子吸収スペクトルを測定し、TD-DFT 計算と併せて詳細に解析した。400－450 nm に現れる吸収帯はチオラトメタラサイクル周辺の軌道からピリジン環周辺の軌道への電荷移動遷移であり、エネルギーの低い LUMO をもつ芳香族置換基を導入することで、芳香族置換基への電荷移動を誘起することができる。その効果はピリジン環の 4 位に導入した場合に大きく現れる。一方、500 nm よりも長波長側の吸収帯はチオラトー鉄の反結合性π軌道からピリジン環への電荷移動遷移に帰属できるが、その強度は小さい。しかし、4 位に芳香族置換基を導入することで、その遷移確率が増大することが明らかとなった。従って、ピリジン環の 4 位に芳香族置換基を導入することで MLCT 遷移を効果的に利用した分子設計が可能になる。

謝辞

本研究は、研究課題「チオフェン誘導体を用いたメタラサイクル鉄錯体の合成と光機能」に対する

2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成（RIIS201905）の支援を受けて行われました。深く感謝いたします。また、川原井一成は 2019 年 3 月～ 2020 年 2 月の期間、神奈川大学の受託学生として便宜を図っていただきました。関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

文献

1) 日本化学会（2010）人工光合成と有機系太陽電池 *(CSJ Current Review)*. 化学同人，京都 .
2) Eckenhoff WT and Eisenberg R (2012) Molecular systems for light driven hydrogen production. *Dalton Trans*. **41**: 13004-13021.
3) Prier CK, Rankic DA and MacMillan DWC (2013) Visible light photoredox catalysis with transition metal complexes: applications in organic synthesis. *Chem. Rev*. **113**: 5322-5363.
4) Mukherjee S, Bowman DN and Jakubikova E (2015) Cyclometalated Fe(II) Complexes as Sensitizers in Dye-Sensitized Solar Cells. *Inorg. Chem*. **54**: 560-569
5) Förster C and Heinze K (2020) Photophysics and photochemistry with Earth-abundant metals – fundamentals and concepts. *Chem. Soc. Rev*. **49**: 1057-1070.
6) Liu Y, Persson P, Sundström V and Wärnmark K (2016) Fe N-Heterocyclic carbene complexes as promising photosensitizers. *Acc. Chem. Res*. **49**: 1477-1485.
7) Chábera P, Kjaer KS, Prakash O, Honarfar A, Liu Y, Fredin LA, Harlang TCB, Lidin S, Uhlig J, Sundström V, Lomoth R, Persson P and Wärnmark K (2018) Fe^{II} hexa N-heterocyclic carbene complex with a 528 ps metal-to-ligand charge-transfer excited-state lifetime. *J. Phys. Chem. Lett*. **9**: 459-463.
8) Braun JD, Lozada IB, Kolodziej C, Burda C, Newman KME, van Lierop J, Davis RL and Herbert DE (2019) Iron(II) coordination complexes with panchromatic absorption and nanosecond charge-transfer excited state lifetimes. *Nat. Chem*. **11**: 1144-1150.
9) Chábera P, Liu Y, Prakash O, Thyrhaug E, Nahhas AE, Honarfar A, Essén S, Fredin LA, Harlang TCB, Kjær KS, Handrup K, Ericson F, Tatsuno H, Morgan K, Schnadt J, Häggström L, Ericsson T, Sobkowiak A, Lidin S, Huang P, Styring S, Uhlig J, Bendix J, Lomoth R, Sundström V, Persson P and Wärnmark K (2017) A low-spin Fe(III) complex with 100-ps ligand-to-metal charge transfer photoluminescence. *Nature* **543**: 695-699.
10) Hirotsu M, Santo K, Tsuboi C and Kinoshita I (2014) Diiron carbonyl complexes bearing an N,C,S-pincer ligand: reactivity toward phosphines, heterolytic Fe-Fe cleavage, and electrocatalytic proton reduction. *Organometallics* **33**: 4260-4268.
11) Nakae T, Hirotsu M and Kinoshita I (2015) Di- and mononuclear iron complexes of N,C,S-tridentate ligands containing an aminopyridyl group: effect of the pendant amine site on catalytic properties for proton reduction. *Organometallics* **34**: 3988-3997.
12) Nakae T, Hirotsu M and Nakajima H (2018) CO release from N,C,S-pincer iron(III) carbonyl complexes induced by visible-to-NIR light irradiation: mechanistic insight into effects of axial phosphorus ligands. *Inorg. Chem*. **57**: 8615-8626.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：75-78 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構の分子基盤の解明

関　友信[1]　松田　乾[2]　馬久地みゆき[3]　鈴木道生[4]　鈴木信雄[5]　大平　剛[1,6]

Transcriptomic Characterization of Exoskeletal Proteins Involved in Fluoride Deposition from the Antarctic Krill *Euphausia superba*

Tomonobu Seki[1], Tsuyoshi Matsuda[2], Miyuki Mekuchi[3], Michio Suzuki[4], Nobuo Suzuki[5] and Tsuyoshi Ohira[1, 6]

[1] Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Port of Nagoya Public Aquarium, Minato-ku, Nagoya City, Aichi 455-0033, Japan
[3] National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Yokohama City, Kanagawa 236-8648, Japan
[4] Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan
[5] Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Division of Marine Environmental Studies, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan
[6] To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohirat-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Generally, the exoskeleton of crustaceans is mineralized with calcium carbonate. However, a high concentration of fluorapatite, which is one of the calcium phosphate crystals, is deposited in the exoskeleton of the Antarctic krill *Euphausia superba*. In order to identify exoskeletal proteins involved in fluoride deposition from *E. superba*, the tail fan and swimming legs with the epidermis inside the exoskeleton were subjected to RNA-seq analysis. We successfully predicted nine transcripts encoding exoskeletal proteins similar to calcification-associated peptide-1 (CAP-1), CAP-2, calcification-associated soluble protein-2 (CASP-2), and strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, crustocalcin from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*, exoskeletal proteins HACP127 and HACP188 from the American lobster *Homarus americanus*, arthrodial cuticle protein AMP8.1 from the blue crab *Callinectes sapidus*, and cuticle protein AM/CP1114 from the crab *Cancer pagurus*. These transcriptomic data will promote further studies on the functional roles of the exoskeletal proteins involved in fluoride deposition in *E. superba*.

Keywords: iron complex, dibenzothiophene derivatives, N,C,S-tridentate ligand, quinolyl group, naphthyl group, charge transfer transition, electronic spectrum

序論

ナンキョクオキアミは南極海に分布し、巨大な群れを作って群泳する。エビ類と外見が似ているが、エビ類が属する十脚目とは異なり、オキアミ目に属する甲殻類である。ナンキョクオキアミは南極の生態系のキーストーン種であり、鯨類や鳥類などの重要な餌資源となっている。ナンキョクオキアミのバイオマスは数億トンと見積もられており、地球上で最も多いと考えられている[1)]。ナンキョクオキアミ由来のタンパク質は、すべての必須アミノ酸を含んでおり、栄養的に優れている[2)]。これらのことから、ナンキョクオキアミは家畜用飼料や養殖用飼料の原材料として、また人類のための食料として有望な資源と考えられている。しかし、ナンキョクオキアミの外骨格には高濃度のフッ素が含まれていることから、そのまま餌料や食料として使うことは不適である[3-6)]。そのため、漁獲直後のナンキョクオキアミの外骨格を船上で除去する必要があり、脱殻するための機械が 1970 年代に開発された[3)]。しかし、脱殻機の性能が低く、ナンキョクオキアミのむき身に殻が残存することが問題となった。これらの理由から、

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

ナンキョクオキアミの膨大な資源は有効に利用されているとはいえない状況にある。

ナンキョクオキアミの外骨格にフッ素が高濃度で存在していることは古くから知られていた[7]。しかし、外骨格に存在するフッ化物の正体は永らく不明であった。ナンキョクオキアミが脱皮した直後の外骨格のフッ化物含有量は 100 ppm 以下であるが、外骨格が硬化するにつれ含有量が急激に増加する[8]。この結果は、フッ素の取り込みは外骨格の石灰化と連動していることを示している。そのため、ナンキョクオキアミの外骨格にはリン酸カルシウムのフルオロアパタイト結晶が存在し、外骨格の硬化に役立っているのではないかと考えられるようになった。一方、エビやカニなどの甲殻類の外骨格は、炭酸カルシウムのカルサイト結晶で構成されているため、ナンキョクオキアミの外骨格にフルオロアパタイトが本当に存在しているのかを疑問視する見方もあった。しかし、ごく最近、ナンキョクオキアミの外骨格に含まれるフッ化物の主成分はフルオロアパタイトであることが明らかにされた[9]。

以上の背景から、ナンキョクオキアミのフッ素の取り込みには外骨格に存在して石灰化を制御している蛋白質が重要な役割をしていると考えられた。本研究では、ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構に関わる分子基盤を明らかにすることを目的として、ナンキョクオキアミの表皮で発現している遺伝子の網羅的な解析を行った。

材料と方法

ナンキョクオキアミ

名古屋港水族館で継代飼育されているナンキョクオキアミを実験に用いた。2018 年 3 月 14 日、ナンキョクオキアミの雌 6 尾と雄 4 尾から遊泳肢と尾扇を摘出し、使用するまで RNAlater ™ Stabilization Solution（Thermo Fisher Scientific）中で保存した。2018 年度は、ナンキョクオキアミの脱皮周期の同定は行わなかった。2019 年度は 6 月 12 日から 10 月 22 日にかけてナンキョクオキアミの雌 7 尾と雄 8 尾から遊泳肢と尾扇を摘出し、使用するまで RNAlater ™ Stabilization Solution 中で保存した。2019 年度は、サンプリングした 15 個体を個別に飼育し、脱皮間隔を観察することで脱皮周期の同定を行った。

Total RNA の抽出

ナンキョクオキアミの遊泳肢と尾扇の Total RNA は ISOGEN II（ニッポンジーン）を使用して抽出し、RNeasy Micro Kit（QIAGEN）を用いて精製した。Total RNA の濃度はナノドロップ（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定した。抽出および精製した total RNA が分解していないことをアガロース電気泳動で確認した。

RNA-seq 解析

ナンキョクオキアミの遊泳肢と尾扇から抽出・精製した total RNA から cDNA ライブラリーを構築した。そして、イルミナ社の NextSeq システムを用いてペアエンド法で各ライブラリー約 1000 万リードずつ解析した。得られた塩基配列を de novo アセンブルすることによりコンティグを作製した。アセンブルした塩基配列を CLC Genomics Workbench（QIAGEN）に取り込み、相同性検索（tblastn 解析）を行った。

結果

ナンキョクオキアミの表皮で発現している遺伝子の網羅的解析

RNA-seq 解析で得られた配列の新規アセンブルにより、N50 長が 558 b の 155,099 個のコンティグが構築された。総塩基配列は約 75 Mb であった。相同性検索を行った結果、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* の Calcification-associated peptide-1 (CAP-1) と 80 %、CAP-2 と 75 %、Calcification-associated soluble protein-2 (CASP-2) と 92 %、Strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1) と 80 %、クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の Crustocalcin と 55.6%、アメリカンロブスター *Homarus americanus* の Exoskeletal protein HACP127 と 51.2 %、Exoskeletal protein HACP188 と 82.4 %、アオガニ *Callinectes sapidus* の Arthrodial cuticle protein AMP8.1 と 56.6%、ヨーロッパイチョウガニ *Cancer pagurus* の Cuticle protein AM/CP1114 と 63%の相同性を示す配列が見つかった（表 1）。

討論

CAP-1

CAP-1 はアメリカザリガニの外骨格から精製された基質ペプチドである[10]。アメリカザリガニ CAP-1 は、炭酸カルシウムの結晶形成を抑制し、キチンとの結合活性を有していた。また、アメリカザリガニ CAP-1 は、外骨格の石灰化が起こる脱皮後期に、表皮で特異的に発現していた[11]。そして、大腸菌発現系を用いて組換えアメリカザリガニ CAP-1 が作製され、それを用いてカルシウム結合活性が調べられた[12]。その結果、CAP-1 の C 末端領域がカルシウムとの結合に重要であることが明らかにされた。これらの研

表 1. トランスクリプトーム解析で同定したナンキョクオキアミの外骨格蛋白質遺伝子

Protein name	Identity (%)	E-value	Species	Accession numbers
Calcification-associated peptide-1 (CAP-1)	80.0	5.45118E-27	*Procambarus clarkia*	BAC81566
Calcification-associated peptide-2 (CAP-2)	75.0	1.53421E-19	*Procambarus clarkia*	BAD16776
Calcification-associated soluble protein-2 (CASP-2)	92.0	5.05631E-35	*Procambarus clarkia*	BAF73806
Strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1)	80.0	2.11612E-36	*Procambarus clarkia*	BAM99303
Crustocalcin	55.6	6.7621E-16	*Marsupenaeus japonicus*	BAB13739
Exoskeletal protein HACP127	51.2	1.17054E-07	*Homarus americanus*	Q7M499
Exoskeletal protein HACP188	82.4	2.9091E-32	*Homarus americanus*	Q7M497
Arthrodial cuticle protein AMP8.1	56.6	1.35686E-26	*Callinectes sapidus*	AAV28476
Cuticle protein AM/CP1114	63.1	1.45202E-24	*Cancer pagurus*	P81575

究により、アメリカザリガニの CAP-1 は、外骨格においてキチンと結合し、カルシウムと結合することで、炭酸カルシウム結晶の核形成を誘導し、結晶成長の制御を行っていると考えられた。本研究により見出されたナンキョクオキアミの CAP-1 は、アメリカザリガニ CAP-1 と 80% という高い配列相同性を有することから、アメリカザリガニ CAP-1 と同様の活性を有すると推測される。今後、ナンキョクオキアミ CAP-1 がフッ素の取り込みに関与しているのかを明らかにしていく必要がある。

Crustocalcin

甲殻類の外骨格の石灰化は脱皮後期に特異的に起こる。Crustocalcin は脱皮後期にのみ特異的に発現している遺伝子の一つとしてクルマエビで同定された[13]。クルマエビの Crustocalcin は、ショウジョウバエの Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルフォチンと類似していた。大腸菌発現系を用いて組換えクルマエビ Crustocalcin を作製し、それを用いて Ca^{2+} 結合活性を調べたところ、実際にクルマエビ Crustocalcin は Ca^{2+} 結合活性を有していた[13, 14]。また、クルマエビ Crustocalcin は他の節足動物のクチクラタンパク質で保存されている Rebers & Riddiford コンセンサス配列と似た配列を有していた。そのため、クルマエビの Crustocalcin はキチンに結合する可能性が示唆された。これらの結果より、クルマエビ Crustocalcin は、アメリカザリガニ CAP-1 と同様に外骨格の石灰化に関与している分子と考えられた。本研究により見出されたナンキョクオキアミの Crustocalcin はクルマエビ Crustocalcin と 55.6% の相同性を示した。しかし、クルマエビ Crustocalcin との相同性はそれほど高くないことから、ナンキョクオキアミの Crustocalcin が同様の機能を果たしているかどうかは分からない。そのため、ナンキョクオキアミの Crustocalcin の場合は、フッ素の取り込みとの関わりを調べるのではなく、石灰化への関与を調べる研究からスタートする必要がある。

その他の外骨格蛋白質

アメリカザリガニの CAP-2[15]、CASP-2[16]、SCBP-1[17]、アメリカンロブスターの Exoskeletal protein HACP127 と HACP188[18]、アオガニの Arthrodial cuticle protein AMP8.1[19]、ヨーロッパイチョウガニの Cuticle protein AM/CP1114 は[20]、全ての外骨格から抽出・単離され、構造決定された蛋白質である。これら外骨格蛋白質が外骨格の石灰化を直接制御しているかどうかは分かっていないが、外骨格の形成に何かしらの役割を演じている可能性が高い。本研究で見出したナンキョクオキアミの CAP-2、CASP-2、SCBP-1、Exoskeletal protein HACP127、Exoskeletal protein HACP188、Arthrodial cuticle protein AMP8.1、Cuticle protein AM/CP1114 の 機能について今後解析していきたいと考えている。

謝辞

本研究は 2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構の分子基盤の解明」（RIIS201906）で行われたものです。ここに謝意を表します。

文献

1) Nicol S and Foster J (2003) Recent trends in the fishery for Antarctic krill. *Aquat. Living Resour.* **16**: 42-45.
2) Chen YC, Tou JC and Jaczynski J (2009) Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J. Food Sci.* **74**: H31-H39.
3) Suzuki T and Shibata N (1990) The utilization of Antarctic krill for human food. *Food Rev. Int.* **6**: 119-147.
4) Sands M, Nicol S and McMinn A (1998) Fluoride in

Antarctic marine crustaceans. *Mar. Biol.* **132**: 591-598.
5) 吉富文司，大嶋俊一郎，高橋正征 (2007) 海産バイオマス（ナンキョクオキアミ，*Euphausia superba* Dana）資源の多次元利用．*黒潮圏科学* **1**: 56-71.
6) Jung HR, Kim M-A, Seo Y-S, Lee Y-R, Chun B-S and Kim S-B (2013) Decreasing effect of fluoride content in Antarctic krill (*Euphausia superba*) by chemical treatments. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**: 1252-1259.
7) Soevik T and Breakkan OR (1979) Fluoride in Antarctic krill (*Euphausia superba*) and Atlantic krill (*Meganyctiphanes norvegica*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **36**: 1414-1416.
8) Adelung D, Buchholz F, Culik B and Keck A (1987) Fluoride in tissues of krill *Euphausia superba* Dana and *Meganyctiphanes norvegica* M. Sars in relation to the moult cycle. *Polar Biol.* **7**: 43-50.
9) Peng Y, Ji W, Zhang D, Ji H and Liu S (2019) Composition and content analysis of fluoride in inorganic salts of the integument of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Sci. Rep.* **9**: 7853.
10) Inoue H, Ozaki N and Nagasawa H (2001) Purification and structural determination of a phosphorylated peptide with anti-calcification and chitin-binding activities in the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **65**: 1840-1848.
11) Inoue, H, Ohira T, Ozaki N and Nagasawa H (2003) Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish. *Comp. Biochem. Phys. B* **136**: 755-765.
12) Inoue H, Ohira T and Nagasawa H (2007) Significance of the C-terminal acidic region of CAP-1, a cuticle calcification-associated peptide from the crayfish, for calcification. *Peptides* **28**: 566-573.
13) Endo H, Persson P and Watanabe T (2000) Molecular cloning of the crustacean DD4 cDNA encoding a Ca^{2+}-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **276**: 286-291.
14) Endo H, Takagi Y, Ozaki N, Kogure T and Watanabe T (2004) A crustacean Ca^{2+}-binding protein with a glutamate-rich sequence promotes $CaCO_3$ crystallization. *Biochem. J.* **384**: 159-167.
15) Inoue H, Ohira T, Ozaki N and Nagasawa H (2004) A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **318**: 649-654.
16) Inoue H, Yuasa-Hashimoto N, Suzuki M and Nagasawa H(2008) Structural determination and functional analysis of a soluble matrix protein associated with calcification of the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**: 2697-2707.
17) Suzuki M, Sugisaka-Nobayashi A, Kogure T and Nagasawa H (2013) Structural and functional analyses of a strongly chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **77**: 361-368.
18) Nousiainen M, Rafn K, Skou L, Roepstorff P and Andersen SO (1998) Characterization of exoskeletal proteins from the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **119**: 189-199.
19) Wynn A and Shafer TH (2005) Four differentially expressed cDNAs in *Callinectes sapidus* containing the Rebers–Riddiford consensus sequence. *Comp. Biochem. Physiol. B* **141**: 294-306.
20) Andersen SO (1998) Exoskeletal proteins from the crab, *Cancer pagurus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **121**: 375-383.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：79-82 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ウニ類の各クレードに適した分子系統解析法の開発

若山典央 [1, 3]　齋藤礼弥 [1]　金沢謙一 [2]

A Comparison of Effectiveness between Regions on Phylogenetic Analysis of Sea Urchins Using Mitochondrial Genomes

Norio Wakayama[1, 3], Masaya Saitoh[1] and Ken'ichi Kanazawa[2]

[1] Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[3] To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt120120xc@jindai.jp

Abstract: Phylogenetic analyses were carried out using various reconstructed datasets to examine the quality and quantity of information for each region in the sea urchin mitochondrial genome. Smaller sized data produced no reliable results. As the data size increased, orders were organized into individual clades. An almost exact relationship between orders was acquired from an approximately 6500-bp dataset from the ND protein group, but it was not perfect. Probably, the entire mitochondrial genome or a larger dataset will be required to accurately determine phylogenetic relationships of sea urchins.

Keywords: sea urchin, molecular phylogeny, mitcondria, NGS

序論

初期のウニ類の分子系統解析は形態による系統解析を補助するにとどまり、小規模かつ限定的な解析が主であった [1, 2]。しかし、主要な目を用いた分子系統解析 [3] により一定の系統学的成果は得られている。これらの解析はいくつかの遺伝子領域（ミトコンドリア COI、16Sr RNA、ゲノム 18Sr および 28Sr RNA など）を組み合わせて行われた。その結果は低ブートストラップ値がもたらす多分岐のために詳細な系統関係を読み取ることができないという問題を抱えていたため、系統関係から議論を展開することが難しかったと思われる。ここで問題となる精度の不足や樹形の不安定さは限定されたデータサイズや変異率が低い領域を用いたことに起因する情報量の不足により生じていたと思われる。これに対し近年の研究 [4, 5] ではトランスクリプトームやミトコンドリアゲノムを用いる事で系統解析に用いるデータサイズが大幅に拡大された。これらの解析で得られた樹形は大枠においては既知の知見を支持するものであったが、系統樹の信頼性や安定度が先行研究に比べて向上しており、より強い根拠をもって系統関係を論じることが可能になった。これはデータサイズの拡大の重要性がうかがえる結果である。しかし、データの質という面ではまだまだ検討は進んでおらず、領域間のデータ傾向の差についてはいまだ不明である。

この報告ではウニ類 8 目のデータを用い、ミトコンドリアゲノムが含む 38 の領域を再構成して系統解析を行い、ミトコンドリアゲノム全体から求めた系統樹を基準にして、どの組み合わせならばそれに近い樹形を出しうるかという観点からウニ類の系統解析における情報量の分水嶺を探った。

材料と方法

西太平洋産ウニ類の生態と系統を解析するプロジェクト [6, 7] において得たサンプルを用いた。本報告の中で新たに解析したのは次の 7 種である：*Asthenosoma iijimai*、*Calverisoma gracile*、*Hygrosoma hoplacantha*、*Phormosoma bursarium*、*Toxopneustes pileolus*、*Lissodiadema purpureum*、*Echinarachnius parma*。ミトコンドリアゲノムの抽出およびシークエンスは従前 [5] の方法に準じた。*Echinarachnius parma* を除いた 6 種については体

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

腔内組織をダウンス型ホモジナイザで破砕し、細胞および核画分を遠心分離して除いてミトコンドリアを分画した。精製ミトコンドリアからフェノール・クロロホルム法により DNA を抽出し、IonPGM (Thermo Fisher Scientific) を用いてショットガンシークエンスを行った。*Echinarachnius parma* のみ体腔内組織から抽出した total DNA を用いてショットガンシークエンスした。

シークエンスデータのアセンブルは Geneious (Biomatters) と SeqMan NGen (DNASTAR) を用いて行い、両ソフトウェアの結果を照合することで整合性をチェックした。新たに得た配列に前記プロジェクトにおいて過去にシークエンスを行ったウニ 24 種のミトコンドリアゲノムと NCBI の GenBank より取得したミトコンドリアゲノム（ウニ 25 種、ナマコ 1 種）を加え、計 57 種を解析対象とした。ウニのミトコンドリアゲノムは綱全体を通じて同様の構成であり、38 の領域（タンパク質 13 種、rRNA2 種、tRNA 22 種および D-loop）からなる。ミトコンドリアゲノム中からそれぞれの領域を切り出した後に MAFFT[8] でアライメントを行い、個別の領域の解析データとした。タンパク質コード領域についてはさらにコドンごとに分離し、種間の相同性を箱ひげ図としてまとめた。

従前 [5] と同様にタンパク質コード領域の 3rd コドンを除いた合成配列から得た系統樹を基準系統樹とした。検討対象の系統樹としてそれぞれの領域を個別に用いて系統解析を行った他、同系列の遺伝子をまとめた合成配列を用いた解析も行った。使用した合成配列は次のとおり：tRNA(tRNA22 種：1604 bp)、rRNA 系（12Sr、16Sr:2841 bp)、CO 系 (COI、COII、COIII：3030 bp)、ND 系（ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6：6516 bp)、ATP 系（ATP6、ATP8：873bp)。解析対象の配列は領域

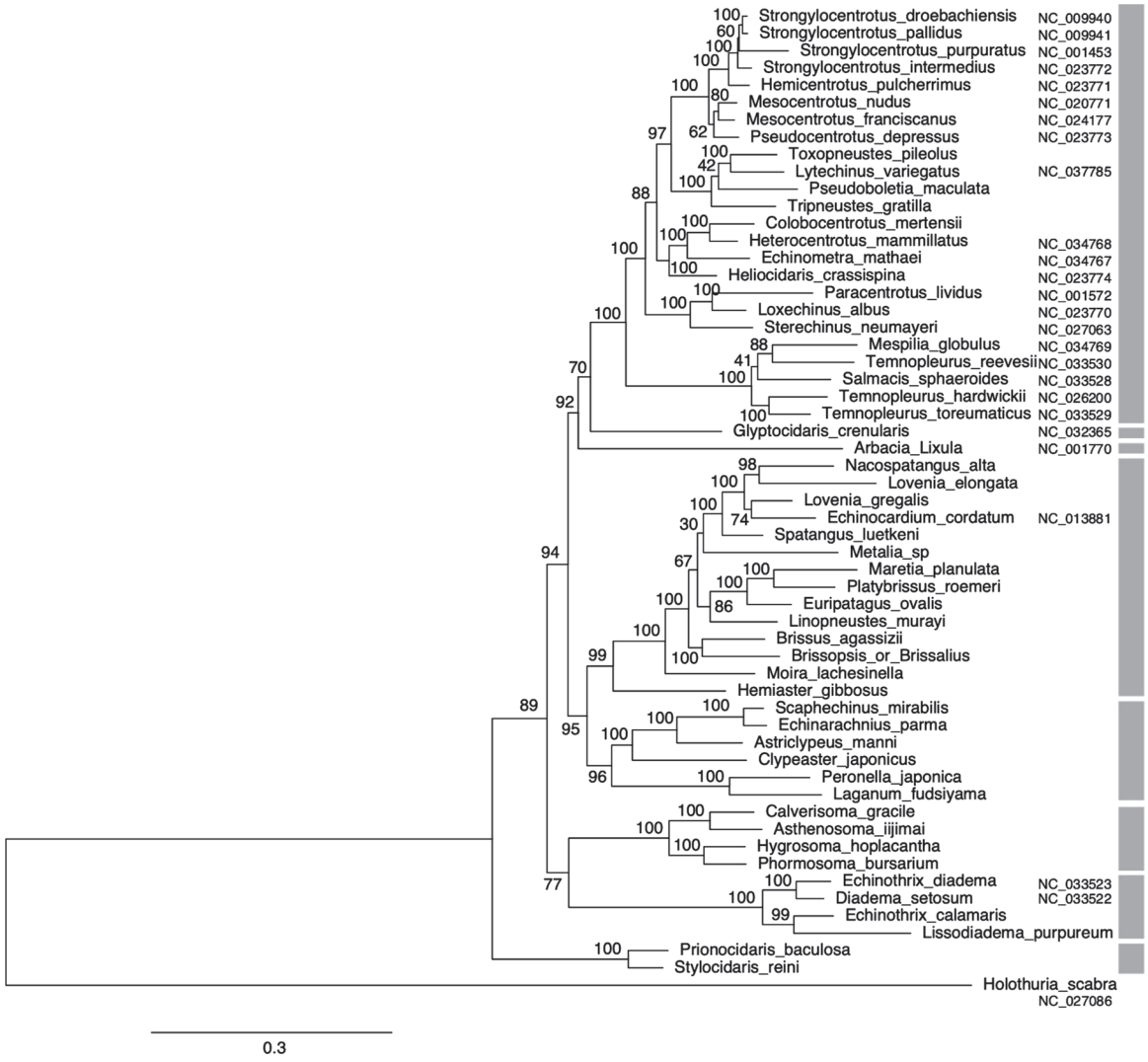


図 1. タンパク質コード領域の 3 rd コドンを除いたデータから得た基準系統樹．右端のグレーのバーで示す 8 つの目が明確に識別できる．下端のスケールバーは進化距離を示す．

ごとにパーティションに分け、ModelTest-NG[9] で分子進化モデルを選択、RAxML-NG[10] によって最尤系統樹（ブートストラップ解析 1000 回試行）を求めた。

結果

タンパク質コード領域の 3rd コドンを除いた合成配列から得られた基準系統樹（図 1）では明確に目が識別されており、分岐関係も明瞭であった。ほとんどの分岐で良好なブートストラップ値が得られており信頼性も十分であった。各領域を単独で用いた場合に、基準系統樹と同様の樹形を算出しえた領域はなかった。ブートストラップ値も低く、検討に値しうる樹形は得られなかった。複数領域をまとめた合成配列を用いた場合、tRNA（合計 1604 bp）から求めた系統樹は限られた末端部を除いてはブートストラップ値が低かった。異なる目に含まれる種がしばしば入り混じっており、基準系統樹との類似性は非常に低かった。rRNA（合計 2841 bp）から求めた系統樹は目ごとのまとまりは得られているものの、目間の分岐においてはブートストラップ値は低く、分岐関係が基準系統樹とは大きく異なっていた。ATP 系（合計 873 bp）から求めた系統樹は目ごとのまとまりはおおむね得られているが、ガンガゼ目がブンブク目に含まれるなど､明確に基準系統樹とは異なっていた。また近縁な属間を除いてはおおむねブートストラップ値が低く、50 未満を多分岐として処理した場合にはほとんどの分岐関係が不明となった。CO 系（合計 3030 bp）から求めた系統樹は目ごとのまとまりはおおむね得られているが、目間関係すなわち目の分岐順は基準系統樹とは大幅に異なり、目間の分岐のブートストラップ値は低かった。ND 系（合計 6516 bp）から求めた系統樹は Arbacioida を除いては全体の構成は基準系統樹に近く、ほとんどの分岐におけるブートストラップ値が 50 を超していた。ただし、Arbacioida の分岐位置は基準系統樹と一致せず、ブートストラップ値が低かった。

討論

基準系統樹の評価

基準系統樹は過去に示した系統樹[5] にフクロウニ目を含む新たなデータを追加して拡大解析したものであるが、既知の樹形との共通部分には変化がみられない。形態から推定されてきた系統関係やトランスクリプトームの解析から得られた系統関係[4] と整合性があることから十分に説得力のある系統樹であるといえる。

ウニ類の系統解析における情報量の意義

今回の再構成データの中で最も基準系統樹に近い樹形を得られたのは ND 系列から求めた系統樹であった。ND 系列の樹形は Arbacioida の分岐位置を除いては基準系統樹と一致する。当該分岐のブートストラップ値が低いことから、これを多分岐とみなせばトポロジーとしては基準系統樹と同一とみなすことが可能となる。配列長の短い個別の領域からは、目レベルの系統関係すら求めることはできなかった。3000 bp 前後となる rRNA や CO 系列の合成配列では目レベルのまとまりはおおむね得られているが、不十分な信頼性や混乱した目間関係しか得られてい

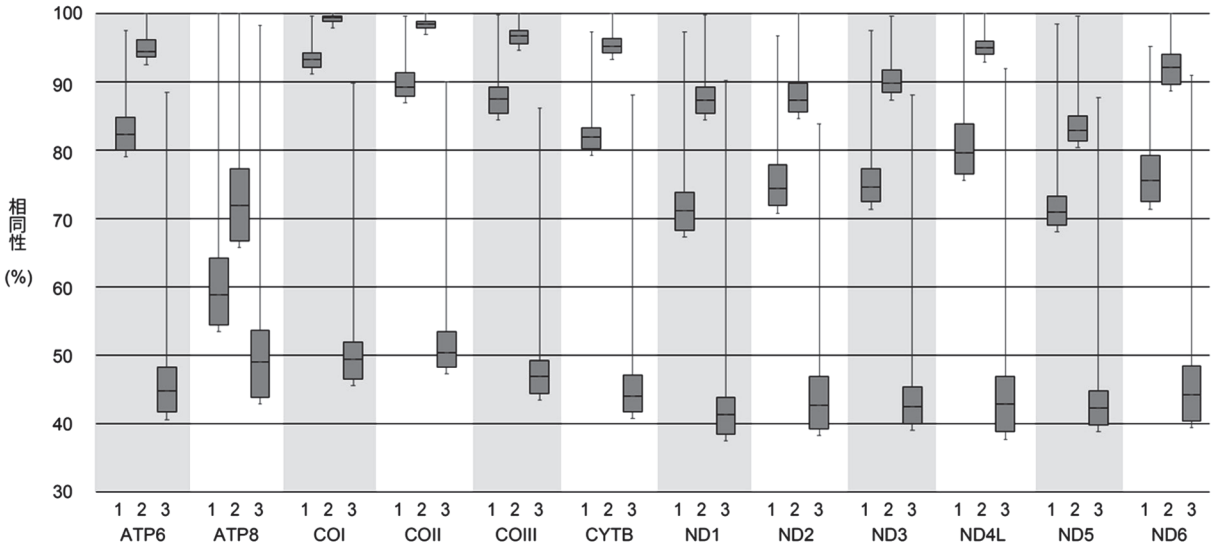


図 2. タンパク質コード領域の相同性の比較．各領域を第 1-3 コドンに分けて相同性を箱ひげ図として示した．使用した種の中に非常に近縁な 2 種が含まれたため，最大値が大きく正方向に偏っている．

ない。唯一、6500 bp を超える ND 系列から求めた系統樹のみ基準系統樹に近い樹形が得られたという事実は、ウニ類の系統解析においては解析に用いる配列長、すなわち情報量が多いことが絶対的な必要条件であることを示しているであろう。

3rd コドンの評価

図２のコドンごとの相同性の違いから 3rd コドンのみ明確に相同率が低いことがわかる。変異が飽和しているかどうかについては慎重な検討が必要だが、3rd コドンの変異率は領域を問わず 40－50% 程度で安定している。ウニの系統解析において 3rd コドンを解析対象から外す事で樹形の安定性が高まる [5] が、これは 3rd コドンが他のコドンや領域とは大幅に異なる情報を持っている、すなわち突然変位の過剰な蓄積により系統情報をとどめていない可能性があるだろう。今回の再構成データでは基準系統樹を除いては 3rd コドンを除いていないが 3rd コドンがノイズとして働く可能性を考えると、これを除くことで解析精度が向上する可能性があるだろう。

過去の報告 [5] と本報告をもって、ウニの系統関係を推定する場合にミトコンドリアゲノム全体を再構築したデータを用いる事で検討に足る系統関係を得られることが明確になった。過去の研究において系統樹の信頼性が不十分であったため議論の展開が制限されていた事とあわせ、今後の研究において少数の遺伝子座の組み合わせから系統を求めることに意義を見出すことは難しいといって差し支えないであろう。今後のウニ類の系統解析においては、最低でもミトコンドリアゲノム全体、さらにはトランスクリプトームといったより規模の大きな解析手法が必要とされると思われる。

謝辞

本研究は 2019 年度年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成（RIIS201907）および神奈川大学共同研究奨励助成金による支援のもと行った。

文献

1) Littlewood DTJ and Smith AB (1995) A combined morphological and molecular phylogeny for sea urchins (Echinoidea: Echinodermata). *Philos. T Roy. Soc. B.* **347**: 213–234.
2) Stockley B, Smith AB, Littlewood DTJ, Lessios HA and Mackenzie-Dodds JA (2005) Phylogenetic relationships of spatangoid sea urchins (Echinoidea): taxon sampling density and congruence between morphological and molecular estimates. *Zool. Scr.* **34**: 447-468.
3) Smith AB, Pisani D, Mackenzie-Dodds JA, Stockley B, Webster BL and Littlewood DTJ (2006) Testing the molecular clock: molecular and paleontological estimates of divergence times in the echinoidea (Echinodermata). *Mol. Biol. Evol.* **23**: 1832-1851.
4) Mongiardino Koch N, Coppard SE, Lessios HA, Briggs DEG, Mooi R and Rouse GW (2018) A phylogenomic resolution of the sea urchin tree of life. *BMC Evol. Biol.* **18**: 189.
5) Wakayama N, Kiyono Y, Matsumono N, Saitoh M and Kanazawa K (2019) Effective DNA extraction methods for mitochondrial phylogenomics of the sea urchins. *Zoosymposia* **15**: 192-202.
6) Kanazawa K, Saitoh M, Wakayama N, Obuchi M, Nakachi S and Kroh A (2019) A project for analyzing the ecology and phylogeny of western Pacific echinoids. *Zoosymposia* **15**: 83-87.
7) Saitoh M, Kroh A, Bronstein O, Nakachi S, Obuchi M, Kiyono Y and Kanazawa K (2019) The echinoid fauna from middle and southern Japan: a preliminary report. *Zoosymposia* **15**: 123-128.
8) Katoh K and Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 772-780.
9) Darriba D, Posada D, Kozlov AM, Stamatakis A, Morel B and Flouri T (2019) ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* **37**: 291-294.
10) Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B and Stamatakis A (2019) RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* **35**: 4453-4455.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：83-88 (2020)

■原　著■　2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模川河口域における長期環境変動のモニタリング (冬期相模川河口域の特徴的水塊中に認められた 植物プランクトンの群集構造)

酒井駿輔 [1]　川延京子 [3]　多田雅章 [1]　金沢謙一 [1, 3]　西本右子 [2]　鈴木祥弘 [1, 3, 4]

Species Composition of Phytoplankton Communities in Characteristic Water Bodies of the Sagami River Estuary

Shunsuke Sakai[1], Kyoko Kawanobe[3], Masaaki Tada[1], Ken'ichi Kanazawa[1, 3], Yuko Nishimoto[2, 3] **and** Yoshihiro Suzuki[1, 3, 4]

[1] Department of Biologaical Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[3] Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[4] To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuky03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: In the Sagami River estuary, 3 different water masses, brackish coastal and open sea water-mass's, were observed in the winter of 2019, although the brackish water-mass could be limited by the low-level rainfall of the area in this season. The water temperature was ca. 19 ℃ and little difference was observed from the surface to a 45-m depth. Vertical mixing in winter occurred. Only in the brackish water-mass, a vertical salinity gradient established stratification and a higher biomass of phytoplankton was observed. Phytoplankton communities in the surface water at different points in this area showed different species compositions. These differences could have occurred due to different conditions for growth of each algal species in each different water mass. The colony size of diatom species of the *Skeletonema costatum* complex suggested higher growth rates in the brackish water-mass than in the open sea water-mass. The *S. costatum* complex in the estuary could spread to other sea areas and become dominant there. We observed the accumulation of algal biomass in the coastal water-mass around the bottom.

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

序論

相模湾は伊豆半島から三浦半島を経て房総半島に至る、太平洋にむかって開かれた湾である。この湾の沖合には黒潮が流れる一方で、陸の様々な河川からは淡水が流入し、湾内には複雑な環境が形成されている [1)]。中でも平塚市周辺の海域は、相模川からの淡水の流入にくわえて、平塚海谷と呼ばれる特異な海底地形が存在し、環境が複雑に変動している [2)]。このような環境では、様々な生物が植物プランクトンの行なう光合成・一次生産に支えられて棲息している。植物プランクトンを解析し、生息環境と対応付けて考えることはこの海域の生態系を理解するために重要である [2-4)]。本研究では冬期の平塚市周辺海域の海況を解析し、これと対応付けて植物プランクトンの分布と群集構造を検討した。さらに、この海域のプランクトン群集の形成過程について推定した。

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

材料と方法

環境要因と植物プランクトン生物量の測定

観測は2019年12月19日に実施した。相模川河口から南に向かって沖合に100m、200m、500m、1000 m、2000 m、3000 m、5000 mの各7測点(Station 1 ～ 7、以降　St.1 ～ 7とする)を設定し、測定を行った　(図1)。全地球測位システム(GPS)端末(FG-530,EMPEX社)を用いて観測点を算出した。測点の位置より河口からの正確な距離を求めた。測点の水深は音響測定器を用いて測定した。各側点では、調査船舷側より、直読式総合水質計(AAQ126,JFEアドバンテック株式会社)を垂下して、電気伝導度、温度、圧力に加えて、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力は、測定器付属のソフトウェアにより塩濃度(‰)と水深(m)に換算した。海水の密度指標(σ)は、塩濃度と温度、圧力から算出した海水密度(kg m^{-3})より1000を引いて求めた。表層1mより採水した海水をガラス濾紙(GF/F, Whatman)上に濾過し、N,N-ジメチルホルムアミド(富士フイルム和光純薬株式会社)で色素を抽出した。抽出した色素中のクロロフィル*a*濃度は蛍光分光器(TD-700, TurnerDesigns)を用いて蛍光法で求めた[5]。水質計の蛍光強度をこの値で較正してクロロフィル濃度(μg ℓ^{-1})に換算した。同時に測定された圧力と対応付けて、各測点での塩濃度、海水密度指数、クロロフィル*a*濃度の鉛直分布を求めた。観測点の河口からの距離とあわせて計算し、測定された水深を考慮した境界条件を設定した上で、コンターマップを作成した(Gsharp, 日本電子株式会社)。

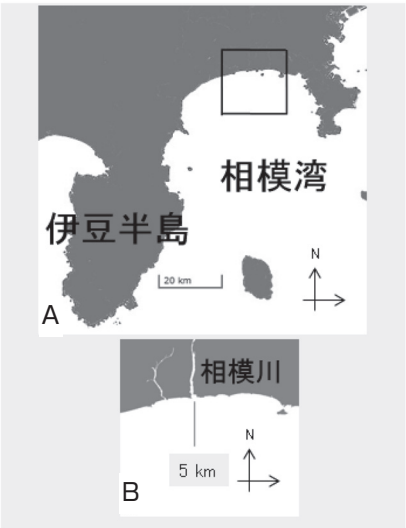


図1. 観測海域. 相模川河口より南方沖合5 kmの線上に測点を設けた. A. 相模湾全景　図中の四角形は図Bの位置を示す. B. 観測海域　図中直線は調査した側点のラインを示す.

植物プランクトン群集の解析

相模川河口から南に向かって沖合に100 m、500 mの2測点(St.1、St.3)で水深10 mからニスキン採水器(G.O.1010-5031- A、離合社)を用いて海水を採水、沖合に5000 mの測点(St.7)では、水深1 mからバケツを用いて採水した。海水試料は250 ml黒色ポリびんに入れ、速やかに0.1%中性ホルマリン-0.025%グルタルアルデヒド固定液を添加した。固定試料は、黒ビニール袋で遮光の上、保冷剤を入れたクーラーバックで保存し、固定試料の濃縮と光学顕微鏡の観察まで、暗所・冷蔵庫(5℃)に3ヶ月間保管した。固定試料250 mlは, 引圧せずに膜フィルター(孔径0.2 μm)(ISOPORE、Millipore)で約30 mlまで濃縮後、utermöhl法[6]により倒立光学顕微鏡(DMIL、Leica社)を用いて観察した。プランクトンマニュアル(Edler, L. and Malte E., 2010)に従い細胞密度を推定した。微小な細胞は、チャンバー視野面積を分割して高倍率の対物レンズで観察し、全視野面積は低倍レンズで確認した。プランクトンの同定(属名、種名)は、Tomas C. R. (ed.) (1997)[7]およびTakuo, O. et al. (2012)[8]に従った。光学顕微鏡下では判別できず、複数種が混在する種群は、種名の後にcomplexとして記載した。

結果と討論

海況

2019年冬季の相模川河口域の水温は、測定したほとんどの地点で18.5℃以上であった(図2A)。例外的に河口の限定された海域の水温は低く18.5℃であった。表層の水温は沖へ向かうほど徐々に高くなり、沖合300 mで19.0℃、4000 mで19.5℃と推定された。沖合5000 m (St.7)で実測された表層の温度は19.7℃であった。水深30 m以深には、沖合700 mから3000 mにかけて19 ℃以下の相対的に低い水温の水塊が認められた。3500 m以遠の沖合ではこの低温の水塊は認められなくなり、測定された45 mまでの水深でほぼ均一な温度となった。塩分濃度は河口とその周辺海域で低く、河口表層では33.1‰であった(図2B)。沖合500 m以遠の表層では、塩分濃度は34.4 ～ 34.5‰でほぼ一定であった。沖合700 mから3000 mの水深30 m以深の低温の水塊に対応して、この範囲の水深30 m以深に34.1 ～ 34.4‰の比較的塩分濃度の低い水塊が存在していた。

塩濃度、水温、圧力から求めた密度指標σは河口の限定された海域の表層1 m以浅で低かった。この結果は、河川からの淡水による低塩分・低密度の水塊による塩分成層を示していた。しかし、その範囲は狭く、沖合100 m以遠ではほぼ均一となり、成層

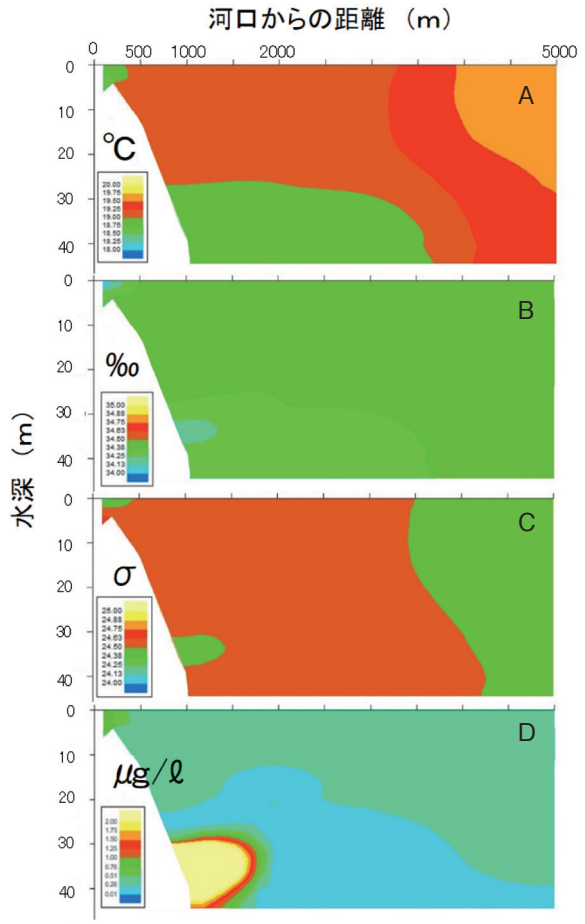


図 2. 測定海域の海況と植物プランクトン現存量（クロロフィル *a* 濃度）の分布．相模川河口より南方沖合 5 km の線上に設けた 7 測点の測定結果より算出した．A. 温度, B. 塩濃度，C. 密度指標、D. クロロフィル *a* 濃度をそれぞれを示す.

は認められなくなった（図 2C)。この範囲では測定された 45 m 以浅の水深では鉛直混合が生じていたと推定される。全層で σ は沖合いに向かって僅かに高くなっていた（図 2C)。

相模川河口域では、湾沖合の黒潮域からの水塊と相模川からの淡水流入により生じる水塊、さらに、湾岸を流れる海流に対応した水塊の 3 種類の水塊がしばしば認められる [2-3]。これらの独立した水塊により相模川河口沖合の複雑に変動する環境を整理して考えることが出来る [2-3]。測定を実施した時期、この地域の降水量は低く（平塚市で 11 月に 82 mm、12 月に 75 mm）[9]、相模川からの淡水の流入は限定されていたと推定される。相模川からの淡水流入により生じる水塊（河口から 300 m 以内、水深 5 m 以浅の低温、低塩濃度の水塊）が限定的であったことは低い降水量と対応していた（図 2A)。一方で、沖合 700 m から 3500 m の水深 30 m 以深には相対的に低温で低塩分濃度の水塊が存在しており、3500 m 以遠とそこからつながる 30 m 以浅の高塩濃度、高温の水塊とは異なっていた（図 2A, B)。これら 3 つの水塊はそれぞれ、汽水水塊、沿岸水塊と外洋水塊と考えることが可能である。2019 年 12 月 19 日の測定時点で、相模川河口域の海況を検討すると、汽水水塊、沿岸水塊、外洋水塊が存在していたが、低い降雨量に対応して汽水水塊は小さく限定されていたと整理できる。海水密度の指標 σ は、汽水水塊の存在する沖合 300 m までは、表層で低く水深とともに増加する成層が認められた（図 2C)。それ以遠の海域では沖合に向かって少しずつ σ が高くなったが、各測点で算出された σ は水深に因らず 45 m までの水深で一定であった。沿岸水塊は外洋水塊に比べて低塩濃度、低温であったが（図 2A, B)、その結果、両者の密度はほぼ等しくなっていたと考えられる。さらに、外洋水塊で水深に因らず σ が一定の値を示したことは、少なくとも測定した 45 m までの水深で鉛直混合が生じていたことを示唆していた。

植物プランクトンの分布

クロロフィル蛍光値と実測されたクロロフィル *a* 濃度を比較して較正することで水域のクロロフィル *a* 濃度の分布を推定した。クロロフィル *a* 濃度は汽水水塊の存在する水域（河口から 300 m 以内、水深 5 m 以浅の海域）で 0.5-1.0 $\mu g Chla\ \ell^{-1}$ であり、特に河口付近で高い値が認められた。これに対して外洋水塊の存在する水域ではクロロフィル *a* 濃度は相対的に低く、表層の 0.5-0.25 $\mu g Chla\ \ell^{-1}$ から水深とともに低下した（図 2D)。しかし、測定されたクロロフィル *a* 濃度の最低値は St.5 の水深 27 m で測定された 0.03 $\mu g Chla\ \ell^{-1}$ であり、測定を行なった水深 45 m 以浅の水塊では、一定以上のクロロフィル *a* 濃度が維持されていた。光環境の鉛直変化を考えると、表層近くでは藻類の光合成・増殖が維持されており、水深が深くなるにつれ、光強度の低下とともに光合成・増殖速度が低下していると考えられる。弱光の下層でも一定のクロロフィル *a* 濃度が認められたことは、上層で増殖した藻類が、鉛直混合により下層に移動し、その結果一定の密度を維持していることを示唆していた。

沿岸水塊の存在する水域（沖合 700 m から 3500 m の水深 30 m 以深）のうち、河口に近い水深 45 m 以浅の水域には、海底付近に極めて高いクロロフィル *a* 濃度の分布が認められた（図 2D)。水深 35 m 付近を中心に、2.0 $\mu g Chla\ \ell^{-1}$ 以上の濃度が観測され、St.4（沖合 1000 m）の水深 32.4 m で最大 6.2 $\mu g Chla\ \ell^{-1}$ となった。この高いクロロフィル *a* 濃度は海底ではなく、その上部で 12 m にわたって維持されていた。高いクロロフィル *a* 濃度が認められた水中では濁度が高く（～ 639 FTU)、測定されたほ

表 1. 相模川河口域表層の植物プランクトン群集の種組成

	species		St. 1	St. 3	St. 7
	diatoms				
1	*Detonula pumila*	<w	144	41	245
2	*Lauderia annulata*	w		41	
3	*Skeletonema costatum* complex		57,038	13,437	12,458
4	*Thalassiosira anguste-lineata*		61	61	41
5	*Th. diporocyclus*			440	122
6	*Th.* spp.		3,427	816	1,632
7	*Stephanopyxis palmeriana*	w	96		
8	*Leptocylindrus danicus*		92		
9	*Corethron criophilum*				41
10	*Co. pelagicum*				4
11	*Coscinodiscus granii*		54	24	16
12	*Co. wailesii*	w	252	8	20
13	*Co.* spp.		24	20	16
14	*Actinoptychus senarius*			4	
15	*Rhizosolenia robusta*	w	9	4	
16	*Rh. setigera*				41
17	*Rh. styliformis*	c	15	8	4
18	*Guinardia flaccida*		54		
19	*Gu. striata*		551		408
20	*Dactyliosolen phuketensis*			82	41
21	*Eucampia cornuta*		24		
22	*Eu. zodiacus*				1,224
23	*Bacteriastrum delicatulum*		857	20	1,020
24	*Ba. elongatum*	<w		61	734
25	*Chaetoceros atlanticus*			408	82
26	*Ch. danicus*		245	122	408
27	*Ch. peruvianus*	<w		12	8
28	*Ch. rosratus*	w	30	12	28
29	*Ch. affinis*				265
30	*Ch. anastomosans*	<w		122	367
31	*Ch. curvisetus*	<w	367	204	286
32	*Ch. diadema*			40	245
33	*Ch. didymus*	<w	337		245
34	*Ch. lorenzianus*	w	734	122	449
35	*Ch. messanensis*	w	275	122	
36	*Ch. socialis*		979		
37	*Ch. subtilis*	b	490		
38	*Ch. tenuissimus*	ib	1,714	1,142	1,469
39	*Ch. teres*	c			61
40	*Ch. wighamii*	b		143	
41	*Ditylum brightwellii*		245	61	163
42	*Lithodesmium undulatum*	<w		4	12
43	*Helicotheca tamesis*	<w		4	
44	*Thalassionema nitzschioides*				82
45	*Thalassiothrix* spp.		61	224	224
46	*Nanoneis hasleae*	wo			326
47	*Licmophora abbreviata*		122		
48	*Navicula* spp.		8,323	163	490
49	*Diproneis* sp.		490		
50	*Pleurosigma/Gyrosigma* sp.		490	41	
51	*Cylindrotheca closterium*		4,570	1,414	1,632
52	*Fragilariopsis doliolus*	w			12
53	*Fr.* spp.		490	163	
54	*Pseudo-nitzschia seriata* complex		245	204	2,122
55	*Ps.-ni.* sp.		61		
56	*Nitzschia* spp.		979	326	163
	diatoms total (cells / l)		83,944	20,123	27,204

	species		St. 1	St. 3	St. 7
	flagellates				
1	Cryptophyceae		4,325	5,168	5,603
	Dinophyceae				
2	*Prorocentrum micans*			4	4
3	Gymnodiniaceae			490	326
4	*Ceratium furca*	i		8	
5	*Ce. kofoidii*	wo		8	4
6	*Ce. teres*	wo			4
7	*Oxytoxum* sp.		245	163	163
8	*Ostreopsis* spp.				41
9	*Protoperidinium bipes*		245	163	
10	*Pr. diver*	i		4	
11	*Pr. ocea*	<w	6		
12	*Pr. sinuosu*		12	4	4
13	*Podolampas palmipes*	wo			4
14	Peridiniales		490	326	1,142
15	*Pronoctiluca spinifera*				41
	Haptophyceae				
16	*Gephyrocapsa oceanica*		21,053	18,115	20,400
17	Coccolithophorid type 1		490		653
	Dictyochophyceae				
18	*Dictyocha fibla*	o			82
19	*Di. speculum*			41	
	Prasinophyceae				
20	*Pyramimonas* spp.		979	816	4,406
	flagellates total (cells / l)		27,844	25,310	32,878

注) w: warm water region, <w is tended to have that persona
c: cold water region.
b: brackish water region.
i: inshore or coastal region.
o: open water region.
blank: cosmopolitan or world wide, and unknown.

河口から 100 m, 500 m, 5000 m の測点（St.1, St.3 と St.7）の試水について光学顕微鏡観察で同定した．光学顕微鏡下で判別できない場合は種名の後に type として，また複数種が混在する種群は complex として表記した．

かの水域の濁度（～ 6.4 FTU）とは大きく異なっていた。この結果は、水中に高い密度で懸濁粒子が存在することを示しており、同時に示された高いクロロフィル *a* 濃度から、水中に微細藻類、植物プランクトンが高密度で存在していることが示唆された。また、この付近の水中で測定された溶存酸素濃度（6.8 ～ 6.9 mgO_2 ℓ$^{-1}$）には、他の海域で測定された値（7.0 ～ 7.1 mg O_2 ℓ$^{-1}$）よりやや低い値を示した。海中の限定された水塊で光合成・増殖が行われている場合、高い溶存酸素濃度が予想される。測定された溶存酸素濃度は、高密度の植物プランクトンがこの水塊中での増殖により形成されたとは考えにくいことを示していた。高い密度で存在するこの植物プランクトン群集がどこから移入し、どのように形成されたかを明らかにするためには、さらに解析を進めることが必要であった。

表層植物プランクトン群集の解析

相模川河口から南に向かって沖合 100 m、500 m と 5000 m の 3 測点（それぞれ St.1、St.3 と St.7）で

表層の海水試料を採集し、光学顕微鏡を用いて植物プランクトンの種組成を求めた。鞭毛藻の多くは微小であり、光学顕微鏡観察では、種レベルで同定できる範囲に限界があった。また、固定により細胞の変形が生じやすい種もあり、種レベルでの同定が限られていた。プランクトン群集の詳細な解析には、固定法が極めて重要であることが確認された。不明種としてまとめた鞭毛藻の同じ種群には、採水した測点により異なる種が含まれていた可能性がある。クリプト藻、渦鞭毛藻、ハプト藻、ケイ質鞭毛藻、プラシノ藻の広い系統群に属する細胞を鞭毛藻とし、比較的種同定の容易な珪藻類とは区別して扱った。3 測点で観察された鞭毛藻は 20 種群で、珪藻は 56 種群であった（表 1)。珪藻 56 種群のうち、三割に相当する 17 種は、*Chaetoceros rosratus* や *Fragilariopsis doliolus* などの暖海性の種であり、鞭毛藻の二割に相当する 4 種群も、*Ceratium kofoidii* や *Podolampas palmipes* などの暖海性の種であった。相模川河口域の植物プランクトン群集は暖海性の種を多く含んでいた。各測点の試水では、珪藻が 35 ～ 39 種群、鞭毛藻は 9 ～ 15 種群であったが、全ての測点で観察された種群は、珪藻で 20 種群、鞭毛藻で 6 種群に限られていた。各水域で認められた種群の半数程度がそれぞれの水域に特徴的な種群であった。各水域には特徴的な群集が形成されていたと言える。珪藻のうち St.1 でのみ観察された 9 種群には、汽水種として知られる *Chaetoceros subtilis* が認められるのに対し、St.7 でのみ観察された 9 種群には、外洋性として知られる *Nanoneis hasleae* が含まれていた。さらに、St.7 でのみ観察された鞭毛藻のうち 5 種群にも、外洋性として知られる [7] *Ceratium teres*、*Podolampas palmipes* と *Dictyocha fibla* が含まれていた。これらの特徴的な種群は St.1 が汽水水塊にあること、St.7 が外洋水塊にあることと良く対応していた。全細胞密度は，St.1 が 111×10^3cells ℓ^{-1}、St.3 が 45×10^3cells ℓ^{-1}、St.7 が 60×10^3cells ℓ^{-1} で、St.1 は St.3 や ST.7 の約 2 倍の密度を維持していた。珪藻の優占率は St.1 が 75%、St.3 が 44%、St.7 が 45% だった（図 3A)。St.3 は河口域に距離的に近いにも関わらず、細胞密度と珪藻の占める割合は外洋水塊のプランクトン群集に類似していた。群集の類似性について詳細な解析を行なうため、Barya-Curtis 指数を用いて比較した。Barya-Curtis 指数は、全く一致しない群集間で 1、完全に一致する群集間で 0 となる。密度補正後に全ての藻類を用いて計算すると、St.1 と St.3 の間の類似度指数が 0.16 であるのに対し、St.3 と St.7 の間の類似度指数が 0.30 となり、St.3 の群集は St.7 の群集よりも St.1 の群集に類似していることが示めされた。この結果は、密度や珪藻類と鞭毛藻類の比では示すことが出来なかった、個体群間の関連を強く示していた。さらに、詳細な種同定が可能な珪藻の群集に限定して類似度を計算すると、St.1 と St.3 の間の類似度指数が 0.16 であるのに対し、St.3 と St.7 の間の類似度指数が 0.50 となり、St.3 の群集が St.7 の群集よりも St.1 の群集に類似していることがより明確に示唆された。汽水水塊の植物プランクトン群集は、隣接する外洋水界の植物プランクトン群集群の構造に強く影響を与えていた。

共通優占種の個体群形成

この時期の 3 測点の珪藻群集を特徴付ける主な要因の一つに優占種である *S. costatum comp.* の動態がある *S. costatum comp.* は河口から沖合に向かうにつれて密度を急激に減少させた。St.1 と St.3 を比較すると、珪藻類全体の細胞密度がほぼ四分の一に低下したが（図 3A)、*S. costatum comp.* はこれに対応して、密度を減少させた。このため、優占度だけ見ると、St.1 で 68%、St.3 で 67% とほぼ一致していた（図 3B)。さらに、St.3 と St.7 を比較すると、珪藻類全体の細胞密度は維持されて 20%増加したが、*S. costatum comp.* の密度はこれに対応せず減少し続けたため、優占度は St.3 の 67% から St.7 では 46% に低下した（図 3B)。細胞密度の急激な減少と対応して、*S. costatum comp.* は、コロニー当たりの細胞数を大きく変化させていた。St.1 ではコロニー当たりの細胞数が 1 ～ 6 Cells colony^{-1} で、平均が 2.7 Cells colony^{-1} であった。ところが、St.3 では 85% のコロニーの細胞数が 1 Cells colony^{-1} となり、平均の細胞数は 1.3 Cells colony^{-1} となった。さらに、外洋の St.7 でも 78% のコロニーの細胞数が 1 Cells colony^{-1} となり、平均の細胞数は 1.3 Cells colony^{-1} となった（図 4)。コロニー当たりの細胞数は、増殖による細胞数

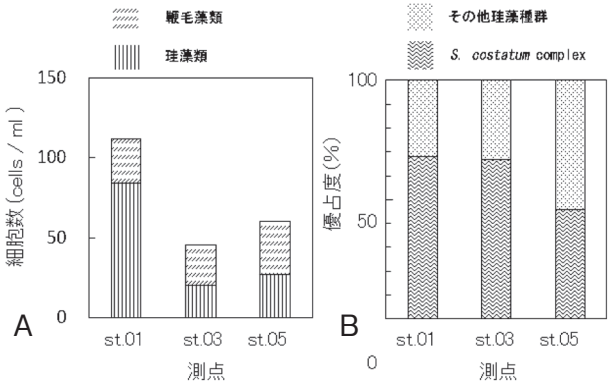


図 3. 各測点での全藻類に占める珪藻類の割合 (A) と珪藻群集中の *S. costatum complex* の優占度 (B).

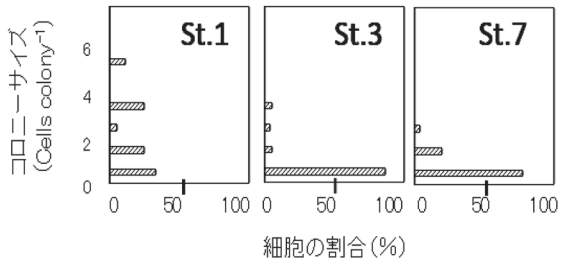


図 4. 各測点での*S. costatum complex* のコロニーサイズの分布.

の増加とコロニーの分割により決定される[10]。最大 5 km 程度の距離しかない各測点で、コロニー内の細胞の分離に大きな違いが生じるような物理的環境の大きな相違は想定し難い。このことは、St.1 に対して、St.3 や St.7 では、優占種*S. costatum comp.* の細胞分裂速度が明瞭に低下していること示していた。優占種*S. costatum comp.* は河口の汽水水塊で盛んに増殖しているのに対し、沖合では活発な増殖は認められないこと。活発な増殖がないにも関わらず優占度が高いことは、汽水水塊から何らかの形で移動している可能性が高いことを示唆していると考えられた。

結論

冬季、相模川河口域には汽水水塊、沿岸水塊、外洋水塊が存在していたが、低い降雨量に対応して汽水水塊は小さく限定されていた。上層で増殖した藻類が、鉛直混合により下層に移動し、一定の密度を維持していた。汽水水塊と外洋水塊では異なる種組成の植物プランクトン群集が形成される。汽水水塊の近傍には、その影響を受けた類似度の高い植物プランクトン群集が存在した。汽水水塊で増殖した優占種*S. costatum comp.* が移動し、外洋水界の植物プランクトン群集の種組成に影響している可能性が、測点によるコロニーサイズの相違から示唆された。沖合 1000-1500 mの海底に植物プランクトンの集積が認められた。

謝辞

相模川河口域の継続的調査研究の一環として、プランクトン群集形成の解析を行なった本研究は、神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201908) をうけて実施された。研究にご理解を頂き、支援いただいた神奈川大学理学部総合理学研究所の所員の皆さんに深くお礼申し上げる。

文献

1) 日本海洋学会編 (1985) *日本全国沿岸海洋誌*. 東海大学出版会 , 東京.
2) 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2010) 相模川河口域の海況と植物プランクトンの分布. *Sci. J. Kanagawa Univ*. **21**: 65-69.
3) 平賀義路, 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2011) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ*. **23**: 59-66.
4) 栗飯原海人 , 平賀義路 , 鈴木祥弘 (2014) 相模川河口域海況の日変化. *Sci. J. Kanagawa Univ*. **25**: 111-116.
5) Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measure Ments (1994UNESCO)
6) Edler L and Malte E (2010) The utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis. Bengt K, Caroline C and Eileen B, eds, UNESCO*. pp. 13-20.
7) Tomas CR (Ed.) (1997) *Identifying Marie Phytoplankton*. Academic Press.
8) Takuo O, Mitunori I, Valeriano MB, Haruyoshi T and Yasuo F (2012) *Marin Phyotoplankyon of the Western Pacific*. Kouseisha Kouseikaku, Tokyo.
9) 日本気象協会 tenki.jp [https://tenki.jp/]
10) Hayakawa T, Kudoh S, Suzuki Y and Takahashi M (1994) Temperature-dependent changes in colony size of the freshwater pennate diato Asterionella formosa (Bacillariophyceae) and their possible ecological implications. *J. Phycol*. **30**: 955-964.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：89-92 (2020)

■短　報■

相模湾平塚沖の貝類相：2018 年と 2019 年の調査結果

大和田正人[1,3]　齋藤礼弥[1,2]　加瀬友喜[1,2]　金沢謙一[1,2]

Molluscan Fauna in Sagami Bay off Hiratsuka: Results of the Investigation by Dredging in 2018 and 2019

Masato Owada[1,3], Masaya Saito[1,2], Tomoki Kase[1,2] and Ken'ichi Kanazawa[1,2]

[1] Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[2] Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan
[3] To whom correspondence should be addressed. E-mail: owada-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Molluscs and bottom sediments were collected by dredging in Sagami Bay off Hiratsuka in September 2018 and 2019. A total of 350 live specimens were collected, belonging to 24 species: 11 gastropods, 1 scaphopod, 11 bivalves, and 1 cephalopod. Three species (*Thais clavigera*, *Glycymeris vestita*, and *Paphia amabilis*) were the first record since the dredging investigation started in 2006. All the collected species were warm-water species. The bottom sediment at depths above 5 m was composed of fine to medium sand containing 2.4-3.1% mud, and that about 10 m deep was composed of the same sand with 3.0-4.6% mud. At depths of 20, 30 and 40 m, the bottom sediments were composed of very fine to fine sand containing 4.4-6.4, 9.9-16.4 and 15.3-24.4% mud, respectively. In comparison with the investigation results of 2018, the bottom sediments of 2019 contained more plant fragments and mud.
Keywords: molluscan fauna, bottom sediment, dredge, Hiratsuka, Sagami Bay

序論

相模湾に分布する貝類については、東部の三浦半島周辺、西部の伊豆半島周辺を中心にドレッジを用いた調査が数多く行われており、代表的な報告としては、Horikoshi[1)]、黒田ほか[2)]、Okutani and Matsukuma[3)]、Okutani[4)] などが知られている。中央部についての調査例は多くないが、2006 年から大和田ほか[5-10)] によって継続的に行われている平塚沖に分布する貝類の調査、また、佐藤ほか[11, 12)] の藤沢市地先のダンベイキサゴおよび大磯のチョウセンハマグリの分布調査などがある。これらの調査結果から、相模湾中央部では少なくとも 16 種の貝類が再生産していることが確認され、生息場所の堆積物と貝類の解析から、底質によって分布が制限される種とそうでない種がいることが分かってきた。本稿では、2018 年と 2019 年の調査結果を報告するとともに、これまでに行われてきた大和田ほか[5-10)] の調査結果と比較して、平塚沖の貝類相の現況、さらに貝類の分布と底質の関係について考察する。

材料と方法

2018 年 9 月 10 日（特別採捕許可番号：第 30-47 号）と 2019 年 9 月 10 日（特別採捕許可番号：第 31-51 号）に調査を行った。神奈川県平塚市の平塚新港から沖合約 1500 m 以内の海域で、漁船によるドレッジを行い、貝類と海底堆積物を採集した（Table 1、Fig. 1）。ドレッジは間口 50 × 15 cm、袋部のメッシュサイズ 20 mm（離合社、5121-B）を用いた。堆積物の採集では直径 17 cm、長さ 42 cm の小型円筒形ドレッジ（離合社、5113）を用いた。ドレッジの後部に小型円筒形ドレッジを取り付けて貝類と堆積物を同時に採集した。採集した貝類は実験室に持ち帰って種ごとに整理し、100% エタノールで固定した。種の同定は奥谷[13, 14)] 及び黒田ほか[2)] に基づいて行い、さらに記載されている分布域を記録した。堆積物については、乾燥重量を計測し、目合い 2 mm、1 mm、0.5 mm、0.25 mm、0.125 mm、0.063 mm の連続篩を使用して、各粒径に篩い出された堆積物の重量を精密天秤で計測した。

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

Table 1. Depths and positions where a dredge was dropped or lifted

sampling date	station	position	depth (m)
September, 2018	St. 1	35°18'09.9"N, 139°22'26.7"E–35°18'00.8"N, 139°21'51.2"E	42.5–44.5
	St. 3	35°18'09.4"N, 139°22'17.1"E–35°18'07.0"N, 139°21'55.0"E	30.9–31.3
	St. 4	35°18'10.0"N, 139°22'17.5"E–35°18'07.7"N, 139°21'56.8"E	29.9–29.8
	St. 5	35°18'15.4"N, 139°22'13.0"E–35°18'08.9"N, 139°21'56.8"E	19.7–28.0
	St. 6	35°18'15.2"N, 139°22'11.3"E–35°18'12.1"N, 139°21'47.9"E	19.4–21.9
	St. 7	35°18'26.9"N, 139°22'11.8"E–35°18'21.2"N, 139°21'53.5"E	10.5–14.7
	St. 8	35°18'27.3"N, 139°22'10.0"E–35°18'24.9"N, 139°21'47.9"E	9.9–13.3
	St. 10	35°18'43.3"N, 139°21'44.2"E–35°18'45.9"N, 139°21'25.3"E	5.2–4.7
	St. 11	35°18'46.3"N, 139°21'43.3"E–35°18'49.1"N, 139°21'26.9"E	3.7–3.2
September, 2019	St. 1	35°17'59.8"N, 139°21'54.6"E–35°18'05.0"N, 139°22'13.8"E	47.3–44.6
	St. 2	35°18'08.2"N, 139°21'57.2"E–35°18'09.5"N, 139°22'16.1"E	30.6–31.6
	St. 3	35°18'13.7"N, 139°21'52.5"E–35°18'13.7"N, 139°22'14.1"E	20.8–22.8
	St. 4	35°18'27.2"N, 139°21'49.1"E–35°18'21.3"N, 139°22'08.6"E	12.6–13.7
	St. 5	35°18'31.7"N, 139°21'46.3"E–35°18'29.4"N, 139°22'05.8"E	10.8–9.4
	St. 6	35°18'42.6"N, 139°21'45.6"E–35°18'45.1"N, 139°21'28.2"E	5.5–5.2

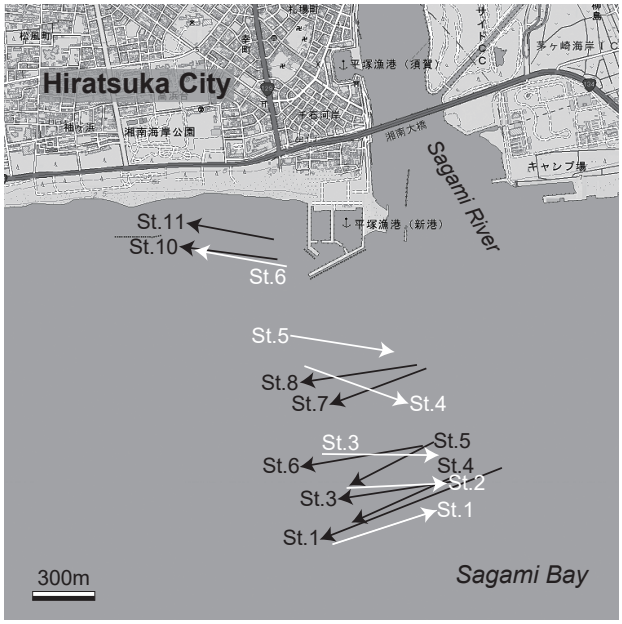


Fig. 1. Sampling localities. Arrows show the positions and directions of dredging. The black arrows indicate the investigation in September 2018, and the white arrows indicate that in September 2019.

結果

貝類

2018 年の調査では腹足綱 10 種、掘足綱 1 種、二枚貝綱 8 種の合計 19 種 306 個体、2019 年の調査では腹足綱 8 種、二枚貝綱 8 種、頭足綱 1 種の合計 17 種 44 個体の生貝が採集された（Table 2）。調査全体では、腹足綱 11 種、掘足綱 1 種、二枚貝綱 11 種、頭足綱 1 種の合計 24 種 350 個体の生貝が採集された。このうち 3 種（イボニシ、タマキガイ、サツマアカガイ）は、2006 年から継続している調査では初めて採集された。採集された貝類の分布域を Table 3 にまとめた。採集された全ての種は房総半島以南に分布する暖流系種であり、本州を分布の中心とする種であった。

海底堆積物

採集した海底堆積物の粒度分布を Fig. 2 に示した。水深 5 m 以浅の堆積物は、細粒砂 56.9 ～ 61.8%、中粒砂 16.7 ～ 28.6% で構成され、含泥率は 2.4 ～ 3.1% であった。水深 10 m 付近の堆積物は、2019 年の St.5 を除き、細粒砂 33.2 ～ 55.8%、中粒砂 20.4 ～ 39.6% で構成され、含泥率は 3.0 ～ 4.6% であった。水深 20 m 付近の堆積物は、細粒砂 45.6 ～ 52.9%、極細粒砂 29.7 ～ 34.4% で構成され、含泥率は 4.4 ～ 6.4% であった。水深 30 m 付近の堆積物は、細粒砂 39.1 ～ 60.6%、極細粒砂 21.0 ～ 31.5% で構成され、含泥率は 9.9 ～ 16.4% であった。水深 40 m 付近の堆積物は細粒砂 24.4 ～ 52.7%、極細粒砂 25.6 ～ 43.5% で構成され、含泥率は 15.3 ～ 24.4% であった。

2019 年の調査では、St.1、St.2、St.3、St.5 の堆積物に植物片が多く含まれていた。また、St.5 の堆積物は、水深 10 m 付近では例外的に泥を多く含み、細粒砂 42.7%、極細粒砂 22.7% で構成され、含泥率は 11.5% であった。

討論

2019 年と 2018 年の調査を比較すると、2019 年の調査では採集された種数と個体数が極端に少なかった。さらに、海底堆積物には多くの植物片が含まれており、含泥率も比較的高かった。これは、2019 年の調査では前日に大雨が降り、相模川から土砂や植物片が大量に運ばれ、それらが海底を覆ったことが影響しているのであろう。

採集された 24 種のうち、ダンベイキサゴ、ツメタガイ、カスミコダマ、ハナムシロ、ナガニシ、ムシボタル、ヒメトクサ、キセワタガイ、ウスキセワタ、セトモノツノガイ、ゲンロクソデガイ、ヒメバカガイ、ウズザクラ、ミゾガイ、ハナガイ、ヒメカ

Table 2.　List of the species collected in the investigations in September 2018 and 2019

class	scientific name	Japanese name	September, 2018									September, 2019						total
			st.1	st.3	st.4	st.5	st.6	st.7	st.8	st.10	st.11	st.1	st.2	st.3	st.4	st.5	st.6	
Gastropoda	*Umbonium costatum*	キサゴ								4						5	6	15
	Umbonium giganteum	ダンベイキサゴ								6	167						1	174
	Glossaulax didyma	ツメタガイ					1			1		2					3	7
	Natica buriasensis	カスミコダマ		1														1
	Thais clavigera	イボニシ															1	1
	Zeuxis castus	ハナムシロ					2					2						4
	Fusinus perplexus	ナガニシ						2				1						3
	Olivella fulgulata	ムシボタル									1					1		2
	Brevimyurella japonica	ヒメトクサ							1	1								2
	Philine argentata	キセワタガイ	1									1						2
	Philine vitrea	ウスキセワタ					1											1
Scaphopoda	*Laevidentalium coruscum*	セトモノツノガイ			1													1
Bivalvia	*Jupiteria confusa*	ゲンロクソデガイ	2			1							2	3	1			9
	Glycymeris vestita	タマキガイ											1					1
	Mactra crossei	ヒメバカガイ								3	2					1	2	8
	Nitidotellina minuta	ウズザクラ													2	3		5
	Siliqua pulchella	ミゾガイ														1		1
	Placamen tiara	ハナガイ					2						1					3
	Veremolpa micra	ヒメカノコアサリ						12	88							1		101
	Pitar japonicus	ウスハマグリ					2											2
	Paphia amabilis	サツマアカガイ					1											1
	Callista chinensis	マツヤマワスレ				1		1					1	1				4
	Cyclosunetta menstrualis	ワスレガイ									1							1
Cephalopoda	*Octopus ocellatus*	イイダコ										1						1

Table 3.　Distributions of the species collected in the investigation

distribution areas	number of species
Hokkaido to Kyushu	1
southern Hokkaido and southward	3
southern Hokkaido to Kyushu	5
Tohoku and southward	2
Tohoku to Shikoku	1
Kashima sea to Okinawa	1
Kashima sea to Kyushu	1
Boso Peninsula and southward	5
Boso Peninsula to Kyushu	4
Sagami Bay and southward	1

ノコアサリ、ウスハマグリ、マツヤマワスレ、ワスレガイの 19 種は本州を分布の中心としており、これまでの調査でも複数回採集されている。したがって、平塚沖で再生産している可能性が高い。一方、イボニシ、タマキガイ、サツマアカガイの 3 種は今回の調査で初めて採集された。イボニシは岩礁域の潮間帯に生息する種であるが、2019 年の調査において水深 5 m 付近の砂底から 1 個体のみ採集された。この個体は前日の大雨で潮間帯から流されてきたと思われる。タマキガイは 5 ～ 30 m の粗砂底に生息する種であり、2019 年の調査において水深 30 m 付近の細粒砂と極細粒砂で構成された砂底から 1 個体のみ採集された。この種は殻幅が 7 cm を超える大型の種であるが、採集された個体は殻幅 1.2 cm の幼貝であった。したがって、今年になって平塚沖に入ってきた可能性が高い。サツマアカガイは水深 10 ～ 70 m の砂底に生息する種であり、2018 年の調査において水深 20 m 付近の砂底から 1 個体のみ採集された。この種も殻幅が 9 cm に達する大型の種であるが、採集された個体は殻幅 8.2 cm の成貝であった。サツマアカガイは以前から平塚沖に生息していたとみられるが、生息密度が非常に小さいためにこれまでの調査で採集されなかったのであろう。

ダンベイキサゴは水深 3 ～ 5 m に多数生息するとみられるが、2019 年の調査では 1 個体しか採集されなかった。これまでの調査を含め、ダンベイキサゴの採集個体数は調査ごとに大きく異なる。ダンベイキサゴが多く採集されるときには体サイズが比較的揃っており、これは同じコホートに属することを示唆する。ダンベイキサゴの幼生定着率は年ごとに大きく異なると考えられる。キサゴは 2016 年の調査において水深 3 m から初めて採集されたが、今回の調査では水深 5 ～ 11 m から採集されており、採集された水深のばらつきが大きい。キサゴはダンベイキサゴと比べて、幅広い水深に生息できるのであろう。佐藤ほか[11]は、藤沢市地先ではダンベイキサゴは水深 1 ～ 5 m 付近、キサゴは水深 8 m 以深に生息するが、それらの帯状分布は安定していないと述べている。平塚沖のダンベイキサゴとキサゴについても、同様のことが当てはまるとみられる。

これまでの調査ではサザナミマクラなどの南方系の種が少なくとも 1 種は採集されていたが、今回の調査では全く採集されなかった。これは偶然採集されなかった可能性が高いが、2017 年頃から変化した黒潮の流れも影響しているかもしれない。これらを詳しく調べるためには今後も調査を続けていく必要がある。

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と伏黒哲司氏、神奈川県農政部水産課の諸氏、神奈川大学の池谷幸子氏にご協力を頂いた。底生生物の選別、リストの作成については、神奈川大学において 2018 年度、2019 年に博物館実習 I を履修した学生諸氏にご協力を頂いた。これらの方々に心より感謝を申し上げる。

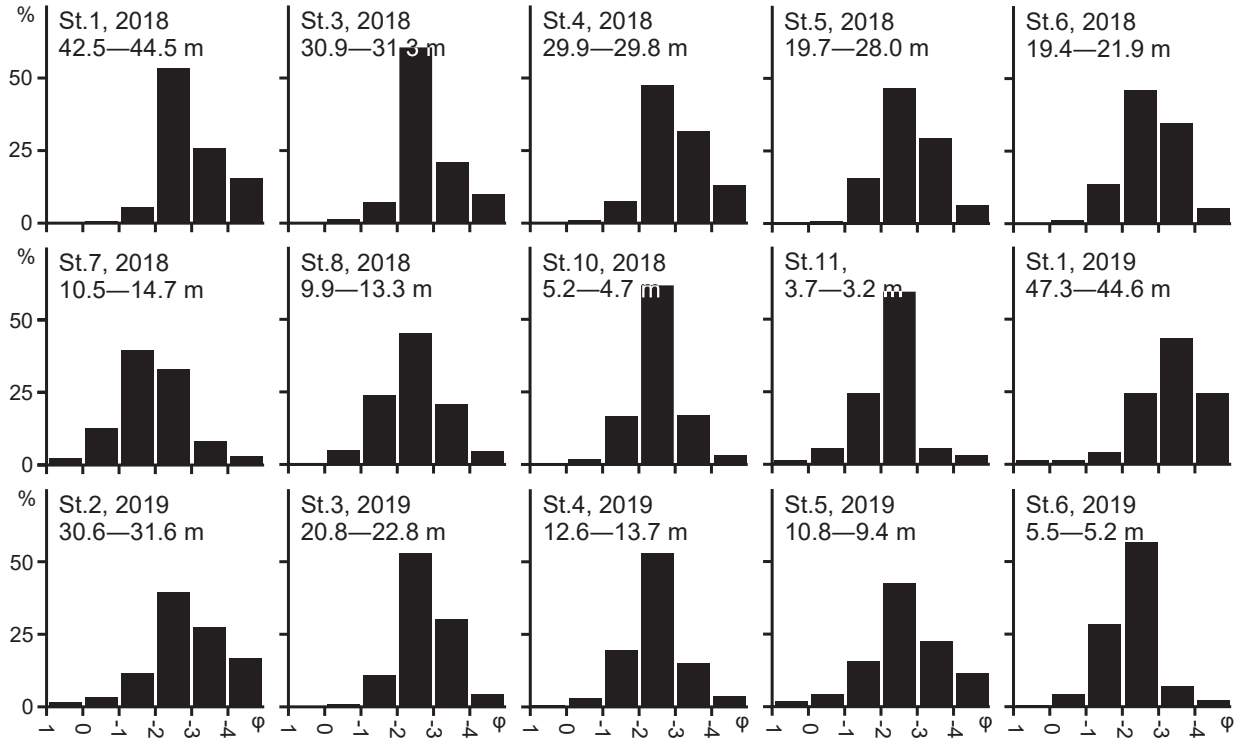


Fig. 2. Grain size distribution and depth on each locality. Grain size was shown in phi scale.

文献

1) 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.
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) Okutani T and Matsukuma A (1982) Some interesting mollusks dredged from the shelf around the southern coast of the Izu Peninsula, Honshu, with description of two new species. *Mem. Natn. Sci. Mus., Tokyo* **15**: 163-183.
4) Okutani T (2006) Protobranchia and Anomalodesmata (Mollusca: Bivalvia) collected in shelf, slope and bathyal zones in Sagami Bay, 2002-2004. *Mem. Natn. Sci. Mus., Tokyo* **40**: 295-306.
5) 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.
6) 大和田正人，金沢謙一 (2011) 相模湾平塚沖の貝類相：2010 年夏の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **22**: 79-82.
7) 大和田正人，小林由弥，大久保至，金沢謙一 (2012) 相模湾平塚沖の貝類相：2011 年 9 月と 10 月の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**: 71-74.
8) 大和田正人，小林由弥，大久保至，金沢謙一 (2014) 相模湾平塚沖の貝類相:2012 年と 2013 年の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**: 87-90.
9) 大和田正人，齋藤礼弥，小林　剛，吉田汐里，金沢謙一 (2016) 相模湾平塚沖の貝類相：2014 年と 2015 年の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**: 59-62.
10) 大和田正人，齋藤礼弥，緒方大地，清野裕暉，加瀬友喜，金沢謙一 (2018) 相模湾平塚沖の貝類相：2016 年と 2017 年の調査結果. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 73-76.
11) 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 Pref. Mus. (Nat. Sci.).* **38**: 95-106.
12) 佐藤武宏，渡邉芳明，小玉大介 (2013) 相模湾大磯地域におけるチョウセンハマグリの生息を制限する要因. *Bull. Kanagawa Pref. Mus. (Nat. Sci.).* **42**: 97–106.
13) 奥谷喬司 (2004) *決定版生物大図鑑貝類 改定新版*. 世界文化社，東京.
14) 奥谷喬司 (2017) *日本近海産貝類図鑑 第２版*. 東海大学出版，東京.

Science Journal of Kanagawa University **31** ：93-102 (2020)

■教育論文■

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (7)

加部義夫 [1, 2]

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdote of Discoveries (7)

Yoshio Kabe[1, 2]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan,
[2] To whom correspondence should be addressed. E-mail: kabe@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since 19th century and have been widely used to effect synthetic transformation in modern organic chemistry. It seemed that many educational benefits could result in the use of reaction types and discovery episodes for undergraduate and graduate classes in organic and organometallic chemistry. The former half of this report deals with O_2 and the related chemistry, the latter half deals with transition metal peroxo- and oxo- complexes. The dangerously explosive properties of hydroperoxide disturbed the development of O_2 chemistry, which is primarily a product of autooxidation. However, Criegee successfully isolated hydroperoxide for the first time and also proposed and developed the mechanism of ozonolysis and OsO_4 reagent of 1,2-dihydroxylation for alkenes. Then, hydroperoxide was employed in industrial synthesis of phenol and propylene oxide, the so called cumene and oxirane methods respectively. In the chemical laboratory, carbonic peracid is frequently used for the epoxiation of alkenes and Bayer-Villiger reaction of ketones. Instead of carbonic peracid, persulfate (caroate) with ketone resulted in the formation of dioxirane, which is a three membered cyclic peroxide. Singlet oxygen in dye-sensitized photooxygenation was verified as non-radical oxidation, which afforded hydroperoxide as well as four-membered cyclic peroxide via a concerted mecahnism. The four-membered peroxide called 1,2-dioxetanes produced light during decomposition, begging the chemistry of chemiluminescence. In biological systems, O_2 serves a central role in aerobic respiration to make energy. Oxygen binding hemoprotein such as Hemoglobin, superoxo-Fe（Ⅲ）complex, transport bound oxygen to cells, which was chemically modeled by Collmann and others. In hem-containing monooxygenase, oxo O=Fe(V) complexes such as the P-450 enzyme catalyzes hydroxylation and epoxidation for the detoxification of metabolites. These were also chemically modeled by Groves and others. In synthetic organic chemistry, many oxo- and peroxometal O=M and O_2M have been used in stoichiometric oxidation of alcohol to carbonyl compounds and alkene to epoxide and 1,2-diol. Finally, asymmetric epoxidation and dihydroxylation by Ti-tert-butyl hydroperoxide and OsO_4 were achieved by Sharpless and coworkers.

Keywords: oxygen, peroxide, oxo-metal complex, peroxometal complex

はじめに

酸素が関与するペルオキソ・オキソ錯体の前に、酸素と酸化反応について解説する[1-7]。酸素が関わる化学は呼吸や生体内酸化から化学工業、さらには有機合成まで広範囲であるため大学や高校化学で教え難く、実際にほとんど取り上げられていない。よく知られているように、近代化学は 18 世紀、Priestly の

©Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

脱フロジストン空気（O_2）の発見と Lavoisier によるフロジストン説の否定、さらには酸化（燃焼）反応前後における質量不変の法則の発見から始まる[1)]。生物の酸素呼吸も体内に取り込まれた食物が燃焼して CO_2 を生成する化学反応であることを明らかにしたのも Priestly と Lavoisier である[4, 8)]。Lavoisier はフランス革命で断頭台の露と消えたことは有名な史実であるが[9)]、ソーダ合成法の Leblanc も同時期に活躍している。近代化学と化学工業の基礎をつくった人物たちは、いまでは疑似化学とされる錬金術や窯業の実験道具を駆使してその新しい扉を開いていった[10)]。一方 18 世紀は蒸気機関による第 1 次産業革命の時代であるが、必ずしもこの新しい科学革命の発見がすぐには産業に応用されていない[11)]。その原因は西欧ではギリシャ以来の伝統で、職人の技芸（アルス）と貴族・知識人の技芸（今日のリベラルアーツの源流）には大きな壁が存在したためである。この壁を乗り越えたのが科学革命の担い手の Lavoisjer たちでもあった[12, 13)]。その後、19 世紀に入ると Farady らにより電磁誘導の法則が発見されると電気が照明や交通機関に使われ、世の中が第２次産業革命の電気の時代を入る。Faraday により溶液の電気分解と続いて気体放電の実験がはじまると、アルカリ金属元素や異臭の放つ気体としてオゾン（O_3）が見出された。近年ではフロンによるオゾン層破壊の問題が生じ、このオゾンの重要性が認識された[14)]。また高分子化学の誕生の発端がポリエチレンの高圧合成にあり、高圧容器に漏れがあり、O_2 がラジカル開始剤となって重合反応が偶然に起きたことが原因であることはすでに紹介した[15)]。

O と酸化反応

O_2 による酸化反応は、これは理論化学（分子軌道法）の最初の成果でもあるが、O_2 自身が基底三重項ジラジカルであり、スピン保存則により一般に有機化合物とはそのままでは反応しない。開始剤により系中にラジカル（R・）を発生させてはじめてスピンが反応前後で保存され反応過程が実現し、ペルオキシラジカル（ROO・）続いてヒドロペルオキシラジカル（ROOH）が生成する。ペルオキシラジカル（ROO・）は水素を引き抜きラジカル（R・）が再生するので、自動酸化反応は微量な開始剤があればラジカル連鎖反応で爆発的に進行することになる（図 1（1））。1940 年代、第 2 次世界大戦前夜、アメリカはゴム生産の東南アジアを日本に占領され、ゴムの製造とその劣化の研究が急務の課題に上がった。そのためにゴム工業の研究者たちが、この反応機構の詳細を解明することになった[16-19)]。反応が高温になると複雑になり、ヒドロペルオキシドも爆発的に分解するのでたいへんに危険である。一方ドイツの Criegee はシクロヘキセンのヒドロペルオキシドをはじめて単離した（式１）[20)]。さらに Hock によりアリル位やベンジル位の自動酸化反応は選択的に起きることが示され、イソプロピルベンゼンのベンジル位の酸化でフェノールとアセトンが生成できるクメン法を見出し工業化された（式２）[21, 22)]。オレフィンの自動酸化反応は水素引き抜きと付加が競合し、付加反応からはエポキシドが生成する。とくにアシルヒドロペルオキシド（過酸）は付加反応が優先しエポキシドを合成的な収率で与える。これに対して Bartlett は過酸の末端酸素が求電子的にオレフィンに反応す

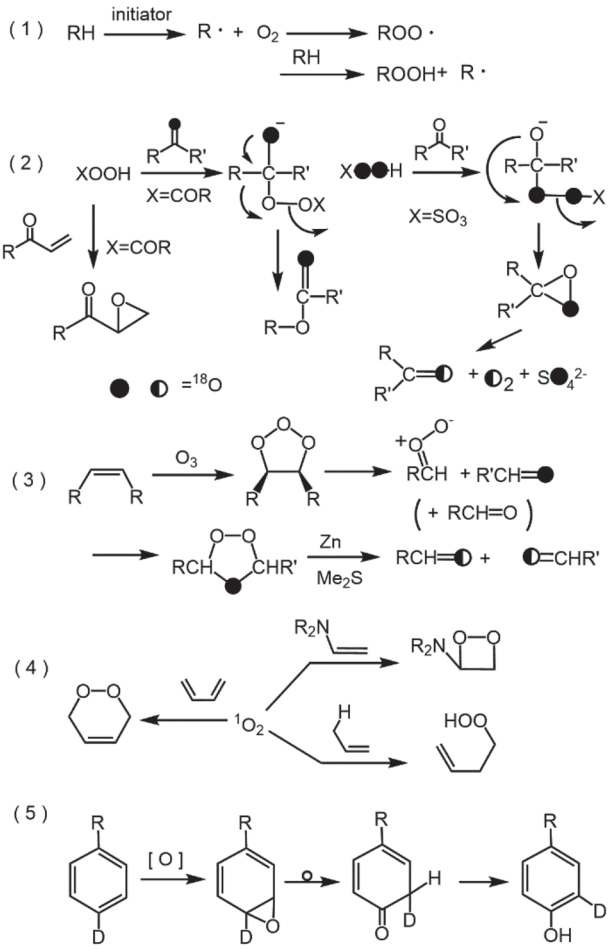
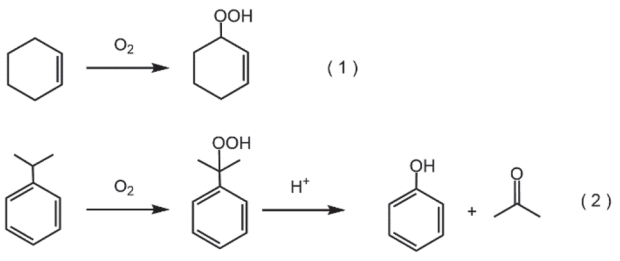


図 1. O_2 と関連酸素活性種の反応，(1)自動酸化反応，(2)求核的エポキシ化反応，Bayer-villiger 反応，(3)オゾン酸化反応，(4) 一重項酸素，(5) NIH シフト．(2)(3)(5)には ^{18}O と D 標識実験の結果.



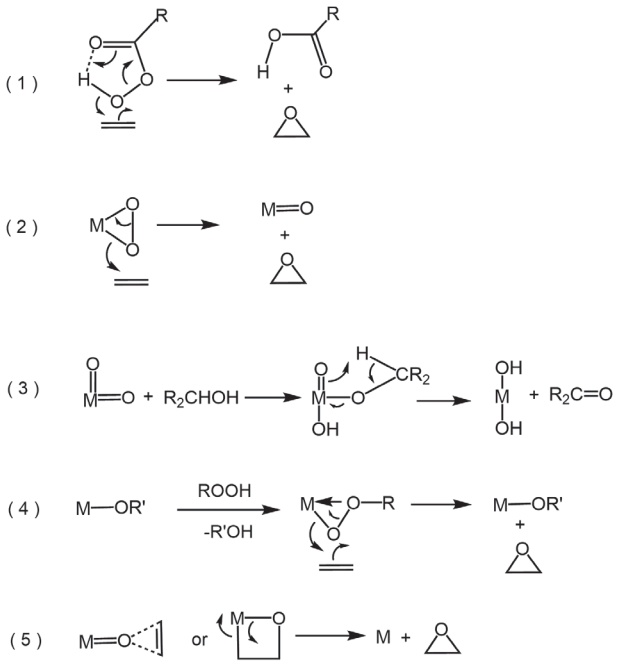


図 2. オレフィンの求電子的エポキシ化とアルコールの酸化，(1) Baerlett 酸化，(2) ペルオキシメタル機構，(3) アルコールの協奏的酸化機構，(4) アルキルペルオキシメタル機構，(5) オキソメタルまたはメタラオキセタン機構.

る機構を提案した（図 2 (1)）[23]。一方、ペルオキシアニオン（ROO-）は単なるオキシドアニオン（RO-）よりも桁違いに求核性が高く、α、β カルボニル化合物とは求核的なエポキシ化が進行する（図 1 (2)）[24, 25]。カルボニル化合物とは求核付加の中間体からアルキル基が 1,2 転移してエステルが生成することが古くから知られている（Baeyer-Villiger 反応）（図 1 (2)）[26]。近年になって Bayer-Villiger 反応のときに用いられるペルオキシドを過硫酸（$KHSO_5$、オキソン）にかえると求核付加の中間体から新しいタイプの付加脱離が起きてジオキシラン（RR‘CO_2）が生成することが Curci らにより報告された（図 1 (2)）[27]。しかしジオキシランの環状三員過酸物構造の高い歪みを考えると、最初は誰もがその報告に耳を疑った。このジオキシランは求電子的なエポキシ化剤ばかりでなく、ラジカル的な酸化剤としても働くことが知られている。

ところで、O_3 はオレフィンと反応するのでテルペン [28]、ステロイド [29]、ビタミン [30, 31] などの天然物中の二重結合の分析に利用されてきた。Criegee らにより一次オゾニドの生成が確かめられていたが、カルボニルオキシド中間体を経由する機構が提案され、その反応機構の全容がはじめて明らかにされた（図 1 (3)）[20, 32, 33]。カルボニルオキシド中間体 ($RHC=O^+-O^-$) はアルコールで補足されヒドロペルオキシドが生成したり、非対称オレフィンのオゾン酸化や、アルデヒドやケトン存在で交差 2 次オゾニドが生成することより証明されている [34, 35]。カルボニルオキシドはジアゾ化合物の酸化（一重項酸素）でも生成できる [36]。

1960 年代に入り、O_2 の一重項励起状態が 22kcal/mol とそのエネルギーが小さいために色素増感反応で容易に発生できることが、Foote[37, 38], Corey[39] により明らかにされると、非ラジカル的で協奏的な [2+4]、[2+2] 付加反応により環状ペルオキシドやエン型反応によるヒドロペルオキシドの生成が報告された（図 1 (4)）[40-43]。とくの [2+2] 付加で生成する四員環状ペルオキシド（1, 2- ジオキセタン）は分解にともない発光し、化学発光の研究を可能にした [44, 45]。最近、松本らは蛍の発光をしのぐ高効率で発光する 1, 2- ジオキセタンの合成に成功している [46]。1774 年に酸素の発見者の Priestly はイギリスからアメリカに移住した。その 100 年後にアメリカの化学者たちは Priestly の家に集り、その 3 年後にアメリカ化学会が発足することになる。そして 200 年後のお祝いにアメリカ化学会は C&E News 誌上で特集号を掲載した。その中で Roberts が 18 世紀から 20 世紀中葉までの酸素の化学について寄稿し、この一重項酸素の発見と、後述する Collman の Picked-fence　ポリフィリンを大きな成果であると述べている [47]。

一方、生体内の酸化反応は Lavoisier が明らかにしたように、食物として摂取した栄養（糖、たんぱく質、脂質）を呼吸により酸素で燃焼させ、そのときに生成する熱エネルギーと高エネルギー物質（アデノシン三リン酸、ATP）を利用して生命を維持している [48-50]。生体内の酸素呼吸の解明のエピソードはその大きな流れだけを以下紹介するにとどめ、詳しくは関連書籍を参照されたい [8, 48-50]。フランス革命後、フランスで創設された高等教育機関のエコールポリテックでは技芸（実験）が重視された。この教育が Liebig によりドイツにもたらせれ、とくに多くの有機化学者を育て大学と企業に排出した [9]。その結果、第 2 次産業革命でドイツの染料・医薬工業の興隆をもたらした [51]。19 世紀後半、その興隆がもたらされた有機化学は Kekule, Bayer,　Fischer によりほぼ確立された。一方イギリスの有機亜鉛化合物の Frankland の弟子の Hopkins により、それが欠乏すると難病が引き起こされる微量栄養素（ビタミン）の研究やドイツの Fischer の弟子の Warburg により、それまでコロイドとしてその取扱いが難しい酵素の研究が始まった。そして医学の生理学と有機化学から新しく生化学の分野が独立した。生体（細胞）の酸素の呼吸の機作として当初ステロイド研究の Wieland が提唱する水素活性説と Warburg が提唱する酸素活性説が対立したが、今日の理解では酸

素呼吸鎖の前半が水素活性説に、後半が酸素活性説に対応していることになる[49]。さらに栄養（糖、たんぱく質、脂肪）は回路を形成する連続した酵素反応で水と CO_2 に分解されるが、その酵素反応に必要な微量栄養素が補酵素（ビタミン）であることが明らかにされている。こうして酸素呼吸の全容が解明されたのである。このような酸素呼吸によるエネルギー代謝は酸素を使わない嫌気的なエネルギー代謝に比べてはるかに効率がよい。酸素呼吸鎖で生成する水素イオンが細胞膜を通過す時に ATP としてエネルギーが貯蔵されるのが Michell の化学浸透圧説である[52, 53]。その後しばらく、生体内酸化では酸素活性化説のような直接に酸素で酸化される反応はなく、生体物質から脱水素で起きると考えられてきた。例外は Perutz や Kendrew らにより Hemoglobin や Mioglobin の酸素運搬酵素が知られているのみであった。しかし 1953 年早石らにより O_2 が直接生体物質に取り込まれる酸素添加酵素が発見された[4, 54]。酸素添加酵素には 2 原子酸素添加酵素と 1 原子酸素添加酵素が知られている。肝臓の解毒作用に働く P-450 は後者に分類され、Groves らの研究を中心にどのようにして、酸素 1 原子を基質に移動させるのかが盛んにモデル化合物を使って研究された[55]。前述のオゾン酸化の中間体のカルボニルオキシドや N-オキシドも比較的簡単なモデル化合物である[25, 36]。これら 1 原子酸素添加酵素とそのモデル反応では、芳香族化合物の水酸化において、アメリカの NIH の Witkop が見出しだ標識した D 水素の転位反応が見られ、NIH シフトと呼ばれている。反応は求電子的にベンゼンがエポキシ化されることで起きると考えられている（図 1(5)）[56]。

NIH シフトの D 水素に見られるような安定同位体の有機や生体内反応の機構の解明への応用は、1930 年代に Urey らによる、液体水素や水の濃縮から D 水素や ^{18}O の分離濃縮の研究にはじまる[57-59]。その後、原子炉や加速器が普及するとこれに放射性同位体が加わることになる。有機反応では最初に用いられたのは、エステルの加水分解反応で、$H_2{}^{18}O$ で加水分解することで ^{18}O は生成するアルコールではなくカルボン酸に含まれることから、アシル—酸素結合が切断されることが解明された[58, 59]。一方生体反応では初期の光合成研究で Ruben と Kamen がクロレラの光合成に CO_2 と $H_2{}^{18}O$ を用いて、$^{18}O_2$ が発生することことから光合成で生じる O_2 が水分子に由来することを解明した[60, 61]。Ruben は短寿命の放射性 ^{11}C を用いた CO_2 取り込みの研究を行い、長寿命の ^{14}C 同位体も見出しているが、第 2 次大戦中の化学兵器の開発による事故で死亡してしまう[62, 63]。その後、放射性 ^{14}C ラベルした化合物を利用して解明されたのが Calvin の炭酸ガス固定回路[64] と Bloch のステロイドの生合成機構である[65]。前述した Bayer-Villiger 酸化では、^{18}O で標識したケトンを用いたエステルのカルボニル酸素に ^{18}O が含まれる[66]。このとき ^{18}O の過硫酸を用いると、ケトンや酸素に半分の ^{18}O が含まれることから、それぞれアルキル基の 1, 2 転位やジオキシランの存在が支持された（図 1(2)）[67]。さらに O_3 の酸化反応では添加するカルボニル化合物を ^{18}O で標識すると 2 次オゾニドのエーテル部分に ^{18}O が含まれることで Criegee 機構が支持されている（図 1(3)）[20]。

遷移金属ペルオキソ・オキソ錯体

Co- アンモニア錯体に空気中の酸素が可逆的に吸脱着されることは古く、1852 年 Fremy により見出されている。19 世紀末には配位錯体説を提唱した Werner も Co(II) アンモニア水溶液と酸素から茶色の錯体を単離、この錯体を過剰にアンモニアで処理すると酸素が遊離することを確認している（式 3）[68]。アンモニア以外にも CN^-、アセチルアセトナト（acac）イオン、N,N- エチリデンビス（サリチリデン）イミデート（salen）などの四配位シッフ塩基を配位子とする Co 錯体が μ - ペルオキシ構造をとることが X 線結晶構解析により明らかにされた（図 3）。Co(II) の 2:1 金属：酸素錯体生成の中間体として 1:1 の金属酸素錯体、スーパーオキソ錯体の存在の可能性が考えられた。この点、日本人の研究者の妻木らは 1938 年にいち早く Salen 配位子を有する 1:1 金属酸素錯体の生成を報告している（式 4）。その後の研究により Co(II)2:1 酸素錯体の酸素はパーオキシドイオン（O_2^{2-}）, Co(II)1:1 錯体はスーパーオキシドイオン（$O_2^{-\cdot}$）の性質を有することが明らかにされた。西長らは Co(II)salprO_2 錯体とフェノール類の反応でフェノールの過酸化物やキノンが生成することを報告し、

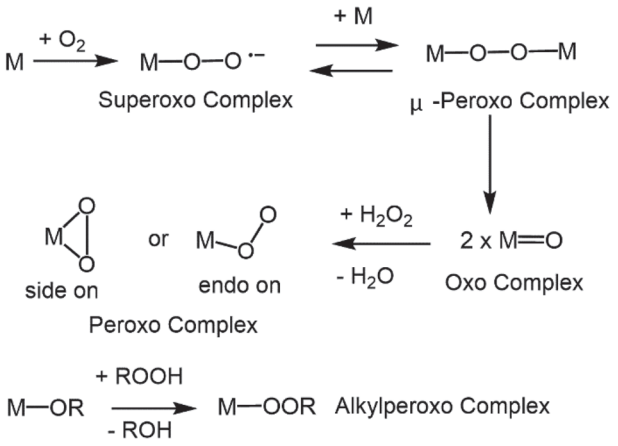
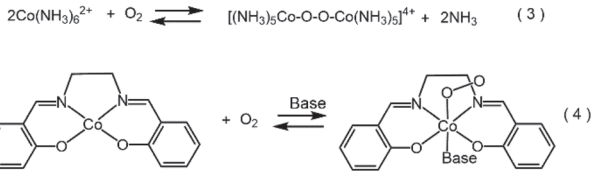
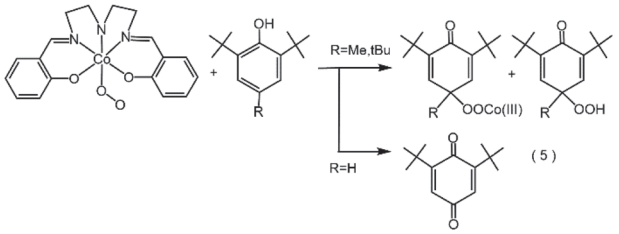


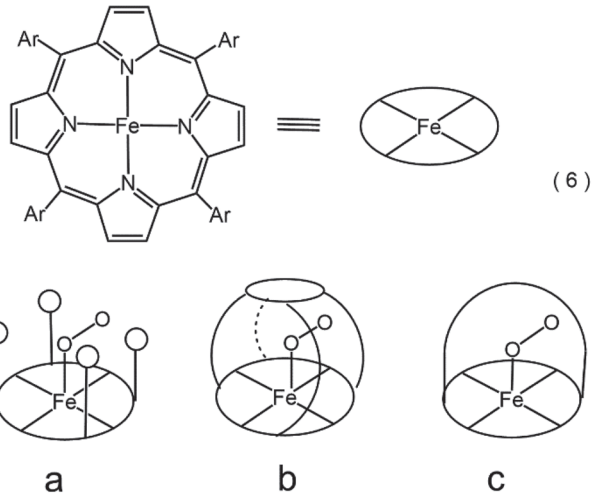
図 3. 遷移金属ペルオキシ・オキソ錯体の生成.



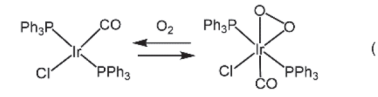
Co(II)1:1 酸素錯体のラジカル反応を見出している（式５）[68, 69]。このキノンの生成反応は工業的製造法としても注目されている[70]。

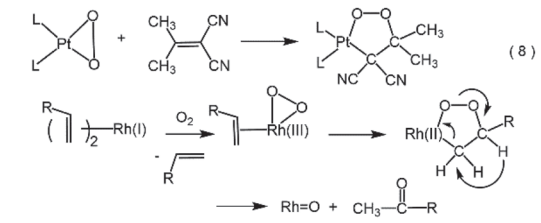


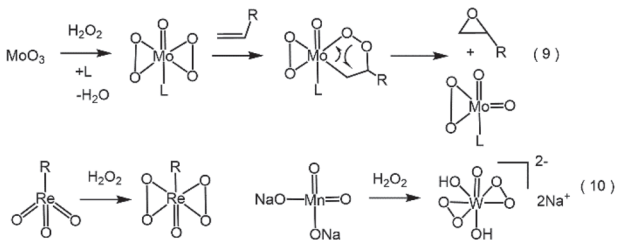
一方、生体内の酸素運搬と貯蔵に関する多くの金属錯体が知られている。その中の Mioglobin の X 線結晶構造解析が 1960 年に Kendrew により、Hemoglobin が 1967 年 Perutz により成し遂げられた[68, 71, 72]。酸素は Fe にエンド型で配位している（図 3）。Fe を Co(II) に置きかえた人工酵素やポルフィリン Fe（II）修飾モデル化合物が多く合成された。その際、Mioglobin と Hemoglobin たんぱくは(1) Fe (II) の軸配位子としてヒスチジン残基からイミダゾールを供与している。(2) Fe(II) から O_2 へ一電子移動を起こし難しくしている。(3) Fe-O-O-Fe 2 量体化することを妨げているの 3 点が考慮され、Collman の picket-fence ポリフィリン（式 6 a）、Baldwin の capped ポリフィリン（式 6b）、Baldwin や生越らに strapped（シクロファン）ポリフィリン（式 6c）などのモデル化合物が合成された。Collman の picked-fence ポリフィリンは Hemoglobin とほぼ同程度の可逆な酸素親和性を示した[73, 74]。



酸素が金属にサイドオンペルオキソ型で配位した金属酸素 1:1 錯体（図 3）は、Vaska 錯体が空気中の酸素と可逆的に反応して生成するペルオキソ錯体が最初である（式 7）[74]。その後 Pt、Pd、Ni、Rh、Ru などでペルオキソ錯体が合成された。Pt のペルオキソ錯体は電子不足オレフィンを求核的にペルオキソメタル化し、Rh（I）カチオン錯体ではケトンを生成することが見いだされた（式 8）[74, 75]。Mo のペルオキシ錯体はオキソ錯体を過酸化水素と反応させることで容易に合成できることを Mimonn らが報告している。このペルオキソ錯体はオレフィンをエポキシ化することでができる（式 9）[75]。このタイプのエポキシ化は Hermann らの ReO_3/H_2O_2 や佐藤・野依の Na_2WO_4 と H_2O_2 から調整すれるペルオキソ錯体によるエポキシ化剤でも見られるが、反応は求電子的に進行する（図 2(2)ペルオキソメタル機構）[76, 77]。H_2O_2 が工業的にアントラキノンの空気酸化などの比較的にクリーンな製造法で合成できることから、H_2O_2 を用いた触媒的なエポキシ化は注目されている。





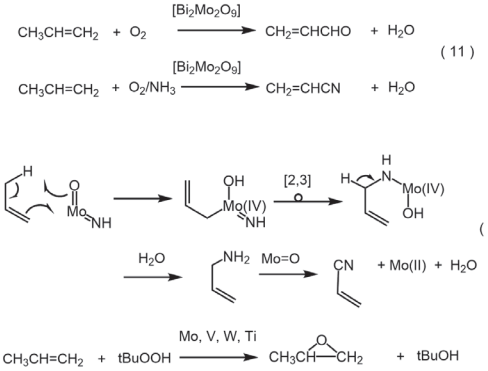


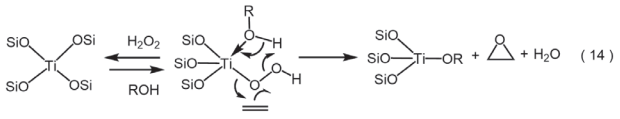
$KMnO_4$、クロム酸化物、OsO_4, RuO_4 や MnO_2 などの遷移金属オキソメタル化合物は実験室での有機化合物の量論的な酸化反応剤として長く使われてきた。とくにクロム酸化物は、Jone 酸化（CrO_3-H_2SO_4）や Collins 酸化（CrO_3-Pyridine）が知られ、4 級アンモニウムでさらに反応性を低下させたピリジニウムクロメート（PCC）酸化（$PyH^+CrO_3Cl^-$）が Corey らにより開発され、アルコールのケトン、アルデヒドへの酸化反応に用いられていた。最近では $nPr_4N(RuO_4)$(TPAP) を N- メチルモルフォリン—N－オキシドで再酸化する触媒的酸化反応が広く用い

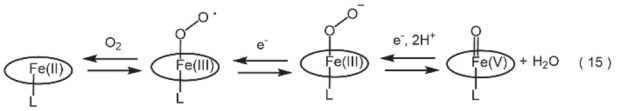
られている[78]。その反応機構はアルコキシオキソメタル中間体から協奏的に水素引き抜きが考えられている（図 2 (3)）[78]。

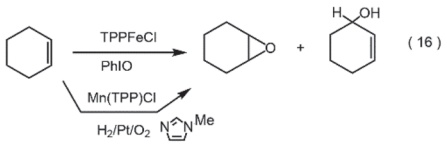
一方、化学工業で使われる高温気相酸化反応として、プロピレンからアクロレインの製造に、CuO メタルオキソ触媒の使用が 1948 年に Shell 社で開発された（式 11)。それをきっかけに、スタンダードオイルソハイオ（SOHIO）社が 1959 年にメタルオキソ触媒ビスマスモリブデン酸を開発しプロピレンとアンモニアからアクリロニトリルの製造法を完成させアンモオキシデーションと呼ばれている（式 11)。その反応機構はメタルイミド触媒とプロピレンのエン反応と続く [2,3] シグマトロピー転位を経由していると考えられている（式 12)。Mo（II）は酸素で酸化されアンモニアと反応してイミド錯体を再生し触媒反応として進行する[74]。有機過酸によるエポキシ化は実験室的には行われてきたが、化学工業でも 1969 年にオキシラン社によりプロピレンの tBuOOH（TBHP）で酸化するプロピレンオキシドの製造法が開発された。TBHP はイソブタンの空気酸化で容易に合成でき、副生成物の tBuOH も用途が広いので、世界中で工業化されている（式 13）[70]。この過酸によるエポキシ化は過酸とオキソメタルあるいはアルコキシメタルなどから生成するアルキルペルオキシ中間体が活性種として提案されている (図 2 (4)) アルキルペルオキシメタル機構）[79, 80]。ごく最近不均一系のチタナシリケート（TS-1）と H_2O_2 がオレフィン類のエポキシ化反応をはじめとする種々の酸化反応の触媒となることが見出された。その反応もヒドロペルオキシメタル中間体が活性種と考えられている（式 14）[81]。

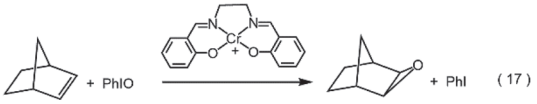
一方生体内の P-450、ペルオキダーゼ、カタラーゼなどの酸素添加酵素にも高原子価オキソ鉄ポリフィリン（Fe(V) = O）を含んでいると考えられている（式 15)。Fe = O オキソメタルポルフィリンを生成するのに酸素や電子供与体が存在しなくてもヨードシルベンゼン（ArIO）や過酸を存在させると、オレフィンのエポキシ化やヒドロキシ化ができることを 1978 年に Groves が見出し、shunt 機構と呼ばれている (式 16) [78]。ほぼ同時に田伏らも金属ポルフィリンを還元剤存在下で酸素と反応させてオキソ錯体が生成する方法を報告し、オキソ錯体を用いる酸化反応が活発に研究された (式 16)[78]。ポルフィリン以外の配位子として Kochi は容易に合成される金属 Co サレン錯体を用いてオレフィンのエポキシ化に成功している（式 17）[78]。さらに Jacobsen、香月は光学活性マンガンサレン錯体触媒を設計し、これをオレフィンの不斉エポキシ化に応用してきわめて高いエナンチオ選択性を得ている（式 18）[78]。向山らも O_2 とアルデヒド RCHO から RCO_3H 種を発生させ、光学活性オキソマンガン触媒存在で高い不斉収率を報告している（式 19）[82]。これらのポルフィリンおよびサレンオキソ錯体のエポキシ化の反応機構は，三員環または四員環遷移状態を経由するオキソメタル機構と考えられている（図 2 (5))。このときポルフィリンおよびサレン配位子が嵩高いためにシスオレフィンに対してトランスオレフィンの反応性が低いことが知られている。

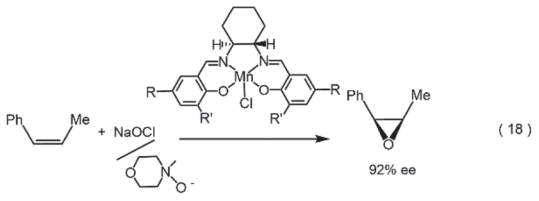


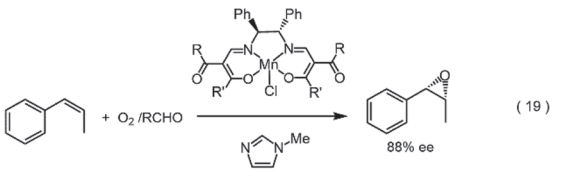




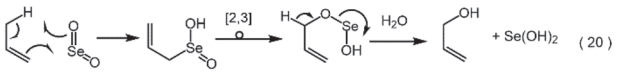




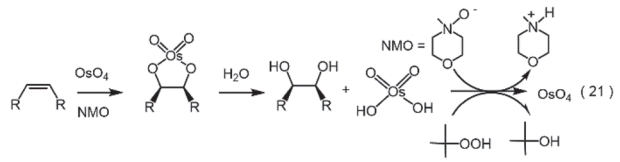




最後に遷移金属ペルオキソ・オキソ錯体の有機合成への応用を Sharpless らの研究を中心に解説する[83]。Sharpless は不斉エポキシ化反応の研究ですでに紹介した Knowles と野依らの不斉水素化反応と一緒に 2001 年ノーベル化学賞を共同受賞している[84]。彼は picket-fence ポリフィリンの Collman とスクワレンの生合成類似環化合成で有名な Tamelen のところでポスドクをしており、その後の有機合成に役立つ遷移金属酸化触媒の開発のきっかけになっていることは間違いなく、彼のノーベル賞受賞講演の中でも述べられている[83]。Sharpless は遷移金属オキソ錯体の研究を開始する前に、SeO_2 のアリル位酸化反応のエン型反応の反応機構を研究している（式 20）[74, 85]。この反応は前述のアンモオキシデーションと同じで Se のイミド化合物を用いるとアリル位のアミノ化が進行する[86, 87]。次に Sharpless が手をつけたのが OsO_4 である。OsO_4 は Criegee が開発した酸化剤である。Criegee は 1,2- ジオールと $KnMnO_4$ からオレフィンの炭素 - 炭素結合が開裂する反応を見出し、原料 1,2- ジオールの合成する酸化剤として開発した[20]。OsO_4 は高価で毒性のある点から再酸化剤を加えて触媒量で使うことが必要になる。再酸化剤として Sharpless はオキシラン法で使われている tBuOOH（TBHP）を選択した（式 21）[88]。SeO_2 のアリル位酸化についても TBHP を添加し触媒量で実現された。一方 Os イミド化合物からは SeO_2 のときと同じくオキシアミノ化生成物を与えた[89, 90]。

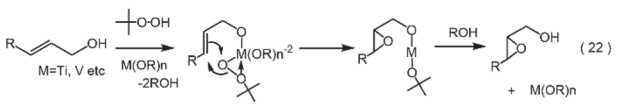


（20）

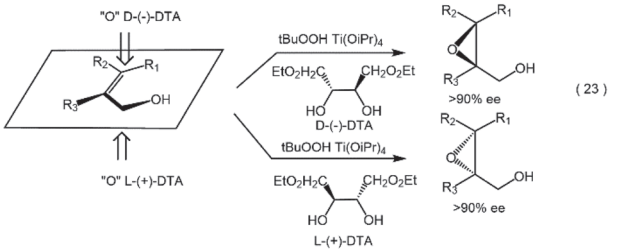


（21）

この TBHP の再酸化剤の報告と同時に、Upjhon 社の研究グループから、再酸化剤として N- メチルモルフォリンオキシド（NMO）を用いる方法が発表され、現在では TBHP の方法にとってかわっている。こうした中 V 触媒存在下、単純なアリルアルコールが TBHP でエポキシ化されるとの報告に基づいて、より複雑なアリルアルコールの TBHP/$VO(acac)_2$ のエポキシ化について検討し、その立体選択性が通常の過酸よりも優れていることを見出した[91, 92]。アリルアルコールは単純なオレフィンに比べて 10 倍以上速く、後で Sharpless は金属を Ti にかえたときにより活性な 2 核金属アルコキシ錯体を単離しているが[93]、反応は単核の金属で TBHP がアルコキシド配位子と交換し、生成したペルオキシ錯体により分子内でエポキシ化が起きていると考えられている（式 22）[78, 93]。この立体選択的なアリルアルコールのエポキシ化反応の報告は多くの有機合成化学者に歓迎された。日本の野崎研究室とも共同研究が行われ、この後、大島が野崎研からポストドクとして Sharpless 研に留学することになる。さらに不斉なヒドロサム酸を配位子として用いると 30% ee でアリルアルコールが不斉エポキシ化されることも見出された[94]。大島らもこの不斉エポキシ化反応の研究に加わり、多くの失敗の中、L- プロリンから調整したヒドロキサム酸配位子でフェニルシンナミルアルコールから 80% ee の不斉反応を見出したが（未発表）、ほかのアルコールではまったく不斉誘導が起きなかった[95]。この厄介な研究を大島から引き継いだのが日本人ポストドクの香月であった。香月は酒石酸エステルを不斉配位子として $Ti(OiPr)_4$-TBHP という組み合わせを用いれば、ほとんどどんなアルコールでも 95% ee 以上の不斉収率でエポキシアルコールに変換できることを見出した。酒石酸の（−）体を（＋）体を使い分けることによって鏡像体をつくり分けることも可能になった（式 23）[96]。その発見の経緯について香月自身による記事が残されているので一読をおすすめする[97-99]。最初の不斉エポキシから 7 年間の年数がたっていた。この不斉エポキシ化の最初の投稿論文もあわや却下されそうになり、そのとき MIT で同僚の正宗が審査員に直接反論を送り、この不斉反応の重要性を再認識させたことから、このあと正宗と Sharpless と共同研究が開始されることなった。その成果の一つが不斉エポキシ化を用いた逐次的な非天然の L- ヘキソース（糖）の全合成である[100, 101]。ときあたかも天然物の合成が従来の環式立体制御から鎖式立体制御の方法論へ移り、その 1 つとして不斉エポキシ化反応が不斉アルドールなどと並ぶ重要な反応に成長することになった[102]。Ti-TBHP を用いた不斉エポキシ化が完成して、



（22）



（23）

Sharplessは香月やJacobsenらと共同で先に取り組みたかったOsO_4の不斉ジヒドロキシ化反応を開始し、前述したC_2対称性のサレン配位子による官能基のないオレフィンのジヒドロキシ化が実現することになった（式18）[83, 103-105]。

おわりに

前半では自動酸化反応、オゾン酸化さらには一重項酸素（光増感）酸化など、酸素と酸素に関連した酸化反応の全般について解説した。自動酸化で生成するヒドロペルオキシドの分解爆発性にもかかわらず、Griegeeがはじめてヒドロペルオキシドを単離することに成功した。さらにオゾン酸化の反応機構を明らかにするとともに、現代の有機合成につながるオキソ錯体のOsO_4酸化剤を開発した。三重項酸素のラジカル的酸化に対して、過酸はオレフィンの求電子的なエポキシ化やα、β-不飽和ケトンなどに対して求核的エポキシ化さらにはケトンに対してBayer-Villiger酸化反応やジオキシランの生成を導く。一重項酸素はイオン的で協奏的な反応を実現し、とくに四員環状化合物ジオキセタンはその分解による化学発光の研究を発展させた。後半では遷移金属ペルオキソ・オキソ錯体について解説した。ペルオキソ・オキソ錯体を用いた種々の酸化剤が、オレフィンのエポキシ化やアルコールの酸化に用いられてきた。生体内の酸素運搬酵素のHemoglobinのモデル錯体がCollmanらに合成され、P-450などの酸素添加酵素のモデル反応がGrovesらにより研究された。そして有機合成分野においてSharplessらによりTi-tert-BuOOH（TBHP）と不斉配位子から実用的な不斉エポキシ化が実現された。

文献

1) 三宅康雄 (2016) 空気の発見．角川ソフィア文庫.
2) 林　太郎，森　佳洋，井口洋夫，坪村　宏，徳丸克己，牧野誠夫，山田敏郎，後藤俊夫 (1973) *共立化学ライブラリー 4, 酸素の化学*．共立出版，東京.
3) 松浦輝男 (1977) *合成化学シリーズ「酸素酸化反応」酸素および酸素活性種の化学*．丸善株式会社，東京.
4) 早石　修 (1985) *UP Biology「酸素と生命」*．東京大学出版会，東京.
5) 永田親義（1998）*ブルーバックス B-1138「活性酸素の話」病気や老化とどうかかわるか*．講談社，東京.
6) 高柳輝夫, 大阪武男編, 大阪武男, 井上正康, 大澤俊彦, 荒金久美 (1999) *夢化学 21「活性酸素」*．日本化学会監修　丸善株式会社，東京.
7) 三村芳和（2007）*「酸素のはなし」生物を育んできた気体の謎*．中公新書，東京.
8) 杉　晴夫（2013）*ブルーバック B-1811「栄養学を拓いた巨人たち」*．講談社，東京.
9) 小山慶太 (2020) *高校世界史でわかる科学史の核心*．NHK出版，東京.
10) テイラー　FS [平田　寛, 大槻真一郎 訳]（1978）*「錬金術師」近代化学の創設たち*．人文書院，京都.
11) 佐々木力（2001）*科学論入門*．（岩波新書）岩波書店，東京.
12) 伊達宗行 (2010) *「理科」で歴史を読みなおす*．（ちくま新書）．筑摩書房，東京.
13) 中山　茂 (2013) *パラダイムと科学革命の歴史*．講談社，東京.
14) 富永　健 (1996) 1995年ノーベル化学賞　オゾン層破壊を警告した3人の化学者－F.S.ローランド教授，M.モリーナ教授，P.クルッツエン教授の業績．*現代化学* **1**: 16-20.
15) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (2). *Sci. J. Kanagawa Univ.*, **28**: 267-270.
16) Walling C (1978) Forty years of free radicals. In: *Organic Free Radicals*. Pryor WA, ed. pp.1-10.
17) Mayo FR and Walling C (1950) Copolymerization. *Chem. Rev.* **46**: 191-287.
18) Mayo FR (1968) Free Radical Autooxiadtion of Hydrocarbons. *Acc. Chem. Res.* **7**: 193-201.
19) Benson S and Nangia PS (1979) Some unresolved problems in oxidation and combustion. *Acc. Chem. Res.* **12**: 223-228.
20) Husigin R and Gilde HG (1979) Rudolf Criegee (1902-1975). *J. Chem. Educ.* **56**: 369-374.
21) 山形　京（1969）フェノール製造プロセスの変遷．*化学* **24**: 839-846.
22) Hock H and Kropf H (1957) Autooxidation of hydrocarbons and the phenol-cummene synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **69**: 313-321.
23) 徳丸克己 (1963) 過酸化物の種々の試剤による分解機構．*有機合成化学協会誌*　**21**: 164-181.
24) Yang NC and Finmegan RA (1958) A new method for the epoxiation of α, β-unsatsurated keteones. *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 5845-5845.
25) 小槻日吉三，齋藤　烈 (1980) 新しいエポキシ化反応．*有機合成化学協会誌*　**38**: 936-946.
26) Hassell CH (1957) The bayer-villiger oxidation of aldehydes and ketones. *Organic Reaction* **9**: 73-106.
27) Adam W, Curci R and Edwards JO (1989) Dioxiranes: a new class of powerful oxidants. *Acc. Chem. Res.* **22**: 205-211.
28) Christmann M (2010) Otto Wallach: Founder of terpene chemistry and nobel laureate 1910. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**: 9580-19586.
29) ハリソン 著 [塩田三千夫　訳] (1970) *共立全書　540 ステロイド化学入門*．共立出版，東京.
30) 島薗順雄，万木庄次郎 (1980) *共立全書 104 ビタミン [1] 研究史を中心として*．共立出版，東京.
31) 島薗順雄，万木庄次郎 (1980) *共立全書 234 ビタミン [2] 研究史を中心として*．共立出版，東京.
32) Criegee R (1975) Mechanism of ozonolysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **14**: 745-752.
33) Criegee R and Schroder G (1960) Ein Kristallisiertes Primarozonide. *Chem. Ber.* **93**: 689-700.
34) Mitchell PR and Darisch RU (1969) The eighteen electron rule. *J. Chem. Educ.* **46**: 811-814.
35) Baily PS (1958) The reaction of ozone with organic compounds. *Chem. Rev.* **58**: 925-1010.
36) 安藤　亘，関口　章，宮崎　元 (1981) カルボニルオキシドの化学．*有機合成化学協会誌* **39**: 613-623.
37) Foote CS and Wexler S (1964) Singlet oxygen, a probable intermediates in photosesitized

autooxidations. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 3880-3881.
38) Fooote CS (1968) Photosesitized oxygenation and the role of singlet oxygen. *Acc. Chem. Res.* **1**: 104-110.
39) Cory EJ and Taylor WC (1964) A study of the peroxidation of organic comounds by externally generated singlet oxygen molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 3881-3882.
40) 安藤　亘，鈴木　順次（1972）一重項酸素．*有機合成化学協会誌* **30**: 391-400.
41) 児玉三明 (1974) 1973 年の化学　一重項酸素の反応機構．*化学* **29**: 484-486.
42) 松浦輝男 (1981)　1980 年の化学　一重項酸素の化学―最近の進歩―．*化学* 36: 764-767.
43) 安藤　亘，加辺義夫（1981）活性酸素の化学　ー一重項酸素とスーパーオキシドイオンを中心にー．*化学の領域* **35**: 88-98.
44) 徳丸克己（1971）1970 年の化学　ジオキセタンの化学．*化学* **26**: 646-649.
45) 斉藤　烈，松浦輝男 (1976) 1975 年の化学　低温光増感酸素酸化反応による不安定な過酸化物の単離．*化学* **31**: 151-155.
46) Matsumoto M (2004) Advanced chemistry of dioxetane based chemiluminescent substances originating from bioluminescence *J. Photochem. & photobiol.* **5**: 27-53.
47) Roberts JD (1974) Love story: *Oxygen in Organic Chemitsry C & EN* **6**: 29-31.
48) 丸山工作 (1972) *生命現象を探る　生化学の創始者たち*．中央公論社，東京 .
49) 篠原兵庫 (1983) *生命科学の先駆者*．講談社学術文庫．講談社，東京 .
50) 丸山工作 (2001) *生化学をつくった人々*．裳華房，東京 .
51) 道家達将 (1995) *放送大学教材　科学技術史*．㈶放送大学教育振興会，東京 .
52) 香川靖雄（1978）生体エネルギー伝達の仕組み　1978 年のノーベル化学賞は P.Mitchell 博士に．*現代化学* **12**: 34-37.
53) ヒンクル PC，マッカーティ RE (1978) 細胞は ATP をどのようにつくるか．*日経サイエンス* **8**: 86-103.
54) 野崎光洋 (1973) 酸素添加酵素　文化勲章を受章した早石教授の業績．*現代化学* **1**: 18-18.
55) 斎藤光実（1981）チトクロム P-450 とそのはたらき．*化学* **36**: 456-461.
56) Witkop B，金岡祐一 (1969) NIH シフト　芳香族の水酸化過程における転位．*化学の領域* **23**: 949-956.
57) 石渡明弘 (2013) 重水素発見の経緯と重水素標識による生体関連分子の化学研究への応用．*化学と教育* **61**: 400-403.
58) 大饗　茂，北尾弟次郎 (1961) 18O を用いた有機反応機構の解明．*有機合成化学協会誌* **19**: 880-899.
59) Sykes P [久保田尚志 訳] (1974) 有機反応経路の調べ方．東京化学同人，東京 .
60) Ruben S. Randall M. Kamen M and Hyde L (1941) Heavy oxygen (O^{18}) as a tracer in the study of photo synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **63**: 877-879.
61) 柴田和雄 (1999) 光合成における光反応とカルビンーベンソン・サイクル．*化学と教育* **47**: 363-369.
62) 丸尾文治，赤沢　堯（1997）草創期の光合成研究 Ruben と Kamen の仕事とその波紋．*化学と生物* **35**: 808-814.
63) 赤沢　堯，丸尾文治（1999）草創期の光合成研究 (II) Calvin-Benson サイクルの光と影．*化学と生物* **37**: 66-71.
64) 小方芳郎 (1961) 1961 年度ノーベル化学賞受賞者カルビン教授について．*化学の領域* **16**: 69-74.
65) Woodward RB and Bloch K (1953) The cyclization of squalene in cholesterol synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 2023-2024.
66) Doering WE and Dorfman E (1953) Mechanism of the peracid ketone-ester conversion analysis of organic comounds for oxygen-18. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 5595-5598.
67) Edwards JD, Pater RH, Curci R and Furia FD. (1979) On the formation and reactivity of dioxirane intermediates in the reaction of peroxoanions with organic substrates. *Potochem. & Photobiol.* **30**: 63-70.
68) Hanzlik RP (1976) Inorganic aspects of biological and organic chemistry chapt X oxygen and nitrogen. Academic Press, New York.
69) 西長　明 (1980) 遷移金属酸素錯体の有機化学．*化学の領域* **34**: 689-696.
70) 今村寿一，竹下勝臣，水上富士夫（1986）工業的均一酸化触媒．*化学増刊 109 錯体触媒化学の進歩* 大塚，中村，山崎 編集．化学同人，東京．pp.159-166.
71) Perutz MF [藤木博太，堀勝治 訳] (1973) ヘモグロビンー分子サイズの肺ー．*現代化学* **5**: 21-28.
72) ペルーツ MF [長野　敬，川村　越 訳] (1979) ヘモグロビンの構造と酸素輸送．*日経サイエンス* **2**: 16-31.
73) Collman JP and Suslick KS (1978) Models for cooperative oxygen binding in hemoglobin. *Pure & Appl chem.* **50**: 951-961.
74) Sheldon RA and Kochi JK (1981) *Metal-catalyzed Oxidations of Organic Compounds*. Academic Press, New York.
75) Mimoun H (1982) Oxygen transfer from inorganic and organic peroxides to organic substrates: acommon mechanism? *Angew. Chem. Int. Ed.* **21**: 734-750.
76) Hermann W and Khun FE (1997) Organorhenium oxides. *Acc. Chem. Res.* **30**: 169-180.
77) 林　昌彦 (1999) アジピン酸の“グリーン”合成ー地球にやさしい反応の開発．*化学* **54**: 64-65.
78) 村橋俊一，直田　健 (1995) 均一触媒反応設計のための戦略　酸化活性種を鍵とする反応．*化学同人* **1995**: 135-146.
79) Sheldon RA (1991) Finechemicals by cagtalytic oxidation. *Chemtech* **1991**: 566-576.
80) Jorgensen KA. (1989) Transition-metal-catalyzed epoxidation. *Chem. Rev.* **89**: 431-458.
81) Arends IWCE, Sheldon RA, Wallau M and Schuchardt U (1997) Oxidative transformation of organic comounds medaiated by redox molecular sieves. *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**: 1144-1163.
82) Yamada T, Imagawa K, Nagata T and Mukaiyama T (1994) Aerobic enantioselective epoxidation of unfunctionalized olefins catalyzed by optically active salen-manganese(III). *Bull. Chem. Soc. Japan* **67**: 2248-2256.
83) Sharpless KB (2002) Searching for new reactivity (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 2024-2032.
84) 加部義夫 (2019) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (6). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **30**: 111-118.
85) Sharpless KB and Lauer RF (1972) Selenium

oxidation of olefins. evidence for the intermediacy of allyselenic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 7154-7155.
86) Sharpless KB, Hori T, Truesdale LK and Diedrich CO (1976) Allylic amination of olefins and acetylens by imido selenium compound. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 269-271.
87) Sharpless KB. Singer SP. (1976) 1,2-Diamination of 1,3-dienes by imino selenium compounds. *J. Org. Chem.* **41**: 2504-2506.
88) 磯江幸彦 (1981) 新しい酸化反応　化学の増刊 119 高選択的反応 - 新しい有機合成ー. *新しい酸化反応*. 野崎一，向山光昭，野依良治 編. 化学同人，東京. pp. 31-45.
89) Sharpless KB and Akashi K(1976) Osmium catalysed vicinal dihydroxylation of olefins by tert-butylhydroperoxide under alkaline conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 1986-1987.
90) Chong AO, Oshima K and Sharpless KB (1977) Synthesis of dioxobis(tertalkylimide)osumium (VIII) and oxotris(tert-alkylimido)asmium(VIII)complexes. stereospecific vicinal deamination of olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 3420-3426.
91) Sharpless KB and Michaelson RC (1973) High stereo- and regioselectivities in the transition metal catalyzed epoxidation of olefinic alcohols by tert-butyl hydroperoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **95**: 6136-6137.
92) Sharpless KB and Verhoeven TR (1979) Metal-catalyzed, highly selective oxygenations of olefin and acetylens with tert-butyl hydorperoxide. practical consideration and mechanism. *Aldrich chimica Acta* **12**: 63-74.
93) Mosher HS and Morrison JD (1983) Current Status of asymmetric synthesis. *Science* **221**: 1013-1019.
94) Michaelson RC. Palermo RE and Sharpless KB (1977) Chiral hydoxamic acids as ligand in vanadium catalyzed aymmetri epoxidation of allylic alchohols by tert-butyl hydoroperoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 1990-1992.
95) 大嶌幸一郎（2001）ノーベル化学賞解説　キラル触媒による不斉合成. *現代化学* **56**: 22-39.
96) Katsuki T and Sharpless KB (1980) The first practical method for asymmetric epoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 5974-5976.
97) 香月　勗（1982）Sharpless 酸化の新展開 化学増刊 96 有機合成の新反応剤　ー設計と使い方のコツー. *化学同人* **1982**: 105-112.
98) 香月　勗（1991）香月－シャープレス酸化反応の開発裏話　*有機合成化学協会誌* **49**: 340-345.
99) 香月　勗（2006）「予断は禁物」予期せぬ結果と新たな展開　化学者たちの感動の瞬間. *化学同人* **2006**: 23-27.
100) Koo SY, Lee AWM, Masamune S, Reed III LA, Sharpless KB and Walker FJ (1983)) Total synthesis of the L-hexoses. *Science* **220**: 949-951.
101) Stinson S (1983) Syntjetic techniques inserts two-carbon. Sequences *C & EN* **5**: 27-28.
102) Masamune S, Choy W, Pertersen JS and Sita LR. (1985) Double aymmetric synthesis and new strategy for stereochemical control in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **24**: 1-30.
103) 中島　誠，富岡　清，古賀憲司 (1978) 1987 年の化学　四酸化オスミウムを用いたオレフィンの不斉酸化反応. *化学* **42**: 422-423.
104) 香月　勗（1993）1993 年の化学　新段階を迎えた不斉酸化反応. *化学* **48**: 284-285.
105) Whitsell (1989) C2 Symmetry and asymmetric inductions. *Chem. Rev.* **89**: 1581-1590.

2019年度　神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

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

(2) 編集委員

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

(3) 産官学委員

委 員 長：	数理・物理学科	教授	水野智久
運営委員：	数理・物理学科	准教授	加藤憲一
	数理・物理学科	教授	本間正明
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張　善俊
	化学科	教授	辻　勇人
	化学科	教授	堀　久男
	生物科学科	教授	井上和仁
	生物科学科	教授	大平　剛

(4) 顧問・特別所員・客員教授・客員研究員

顧　　問：	門屋　卓	
特 別 所 員：	上村大輔、	紀　一誠
	鈴木季直、	野宮健司
	羽鳥尹承	
客員教授	内田隆史、	菅原　正
客員研究員：	安部　淳、	阿部孝宏
	内田英伸、	大石不二夫
	大林　祝	河合　忍
	川上義輝、	韓　　浩
	岸　康人、	菊地原愛
	北村匠磨、	金　善正
	河野　優、	齋藤礼弥
	櫻井英博、	佐藤　剛
	篠原直貴、	高橋広奈
	田中輝彦、	田仲二朗
	陳　　帆、	辻本和雄
	堤　一統、	豊泉和枝
	豊田賢治、	永島賢治
	永島咲子、	西井かなえ
	橋友理香、	原田崇司
	付　哲斌、	藤原　研
	村下　達、	谷地田剛介
	山﨑淳也、	八柳祐一
	吉田　剛、	若山典央

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第50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)「赤外分光」
　高柳正夫(東京農工大学大学院 連合農学研究科)
2)「液体クロマトグラフィー」
　渋川雅美(埼玉大学大学院理工学研究科)
3)「環境分析」
　西本右子(神奈川大学理学部化学科)
4)「NMR分光」
　天野　力(神奈川大学理学部化学科)
5)「原子スペクトル分析」
　高橋純一(日本大学非常勤講師・元アジレントテクノロジー社シニアスタッフ)
6)「工業材料の実分析と総合的な解析」
　米森重明(米森技術士事務所・元AGC)

日時：2019年6月6日㈭・7日㈮
　　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

⑵第51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・開発に対し、いかに重要な寄与をなし得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・開発と質量分析」
明石知子（横浜市立大学大学院・生命医科学研究科）
2)「研究・開発と赤外分光」
由井宏治（東京理科大学理学部第一部化学科）
3)「研究・開発と表面分析」
田沼繁夫（国立研究開発法人 物質・材料研究機構）
4)「研究・開発とNMR分光」
嶋田一夫（東京大学大学院薬学系研究科）
5)「研究・開発と環境分析」
田中　敦（国立研究開発法人国立環境研究所）
6)「研究・開発と材料分析」
志智雄之（公益社団法人日本分析化学会）

日時：2019年12月5日㈭・6日㈮
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

⑶ 講演会
演　題：「Learning to Learn Better in science?」
講演者：Fun Man FUNG
（ALSET, National University of Singapore）
日　時：2019年6月7日㈮
15時20分～ 17時00分
会　場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
（6号館319室）
主　催：神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所
報　告：
Fung博士はシンガポール国立大学（NUS）で化学教育（理学部では基礎教育に相当する）に携わり、最新の教育技術についての研究をしています。シンガポール国立大学はTHE大学世界ランキングでアジア1位（世界23位）で、その基礎教育を支えています。IUPACの「世界の注目の若手化学者100人」の１人にも選ばれています。
今回、来日に当り、神奈川大学で講演をお願いしました。当日は、教員３名、学生６名の参加がありました。
（報告者　木原伸浩　2019.6.8）

⑷ 講演会
演　題：「ゲノムから突き止めたウキイネの起源とゼニゴケの細胞壁合成遺伝子」
講演者：黒羽剛 博士
（農業・食品産業技術総合研究機構）
日　時：2019年7月19日㈮
17時10分～ 19時00分
会　場：神奈川大学　湘南ひらつかキャンパス
（6号館228室）
主　催：神奈川大学理学部生物科学科
神奈川大学総合理学研究所
報　告：
この講演では、イネゲノム解読と遺伝学的手法を組み合わせることで、黒羽氏が最近明らかにした浮きイネ（ウキイネ）と呼ばれる特殊なイネの起源が紹介された。ついで、ゲノム編集を駆使することで黒羽氏が明らかにしたゼニゴケの細胞壁合成遺伝子についての最新の知見も紹介された。講演の後、この二つのテーマに関して、約20名の聴衆との間で1時間に亘って活発な議論が行われ、19時に閉会した。
（報告者　西谷和彦　2019.7.22）

⑸講演会
演　題：「校庭のイチョウが散るとき」
講演者：辻本和雄 名誉教授
（北陸先端科学技術大学院大学）
日　時：2019年8月5日㈪
16時00分～ 17時20分
会　場：神奈川大学　湘南ひらつかキャンパス
（6号館207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
報 告：

化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館207号室で開催しました。小学校教育の話から今現在サプリメントとしても注目されているイチョウ葉の成分であるギンコライト発見の話まで、幅広い話題が提供されました。イチョウに関する日本の二大研究者である平瀬作五郎と中西香爾の話に始まり、中医学でのイチョウ成分の調査研究、イチョウ成分に関連したN-CID質量分析について、コロンビア大学の中西香爾研究室にご留学されていたご自身の経験談も含めて、わかりやすくご紹介いただきました。講演後、学校教育に関する質疑応答から化学に関する専門的内容まで活発な討論がなされました。

（報告者　川本達也　2019.8.6）

(6) 講演会

演　題：「シラノールから高機能材料まで
～ How to be a happy researcher」
講演者：海野雅史 教授
（群馬大学理工学府）
日　時：2019年11月18日(月)
15時30分～ 17時00分
会　場：神奈川大学　湘南ひらつかキャンパス
（6号館305室）
主　催：神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所
報　告：

ケイ素と酸素を骨格とする化合物はシロキサンと呼ばれ、最近では電子材料などに用いられるなど広く研究が展開されている。本講演では、”有機合成的手法に基づいた新規シロキサン合成”において、どのように研究が進んでいったかを軸にし、素反応開拓、合成法、機能性材料への展開などについて詳説していただいた。また、全体を通して「幸福な研究者になるためには」も併せてお話いただいた。講演後の質疑応答セッションでは、大学院生からも積極的な質問や、教員も交えた非常に活発な討論がなされた。

（報告者　辻 勇人　2019. 11.20）

(7) 講演会

演　題：「レーザーと顕微鏡で探る温度応答性ポリマーの科学」
講演者：坪井泰之 教授
（大阪市立大学）
日　時：2019年12月9日(月)
14時00分～ 15時30分
会　場：神奈川大学　湘南ひらつかキャンパス
（1号館305室）
主　催：神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所
報　告：

講師の坪井泰之教授は、蛍光の相関分光法を用いた溶液中分子の並進拡散係数測定を始めとしたレーザー分光計測の先駆的研究者の一人である。本講演会では、ポリマーの相転移や拡散イナミクスについてのご自身の行った最先端研究成果について解説した。

まず初めに、講師の用いたいくつかのレーザー分光法の原理について解説を行った。拡散過程を計測するための最先端技術である蛍光相関分光法を紹介し、また昨年のノーベル賞受賞対象にもなった光ピンセット法についても概説した。これらの基礎的解説に引き続き、具体的研究内容として、アクリルアミドに親水基と疎水基をもつポリマーであるPNIPAMの物性変化についての、講師の行った最先端研究を紹介した。水中におけるマイクロ秒台の時間スケールで起こるPNIPAMポリマーの相転移速度が、PNIPAMの疎水基と水の間の相互作用に密接に関係することを提唱した。

（報告者　河合明雄　2019.12.12）

(8) 平塚祭　特別参加企画

テーマ：「神大理学部の産官学連携へのアプローチ」公募に参加した理学部の研究をポスターで紹介
日　時：2019年10月26日(土)、27日(日)
10時00分～ 16時00分
会　場：神奈川大学　湘南ひらつかキャンパス
（6号館226室）
主　催：神奈川大学総合理学研究所

3　産官学　活動実績

(1) 展示会

「フォーマラボEXPO 2019」
日　時：2019年7月3日(水)～ 5日(金)
会　場：東京ビッグサイト
出展者：神奈川大学理学部化学科
山口和夫 教授
国立研究開発法人物質・材料研究機構
中西　淳 グループリーダー
テーマ：「創薬・組織工学のためのメカノバイオ

ロジカル材足場材料」
主　催：リードエグジビションジャパン㈱

(2)展示会
「イノベーションジャパン2019」
日　時：2019年8月29日㈭～8月30日㈮
会　場：東京ビッグサイト
出展者：神奈川大学理学部化学科
木原伸浩 教授
テーマ：「不要になったら直ちに分解できる耐候性・耐熱性ポリマー」
主　催：国立研究開発法人科学技術振興機
国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

(3)展示会
「JASIS 2019　最先端科学・分析システム＆ソリューション展」
日　時：2019年9月4日㈬～6日㈮
会　場：幕張メッセ
出展者：神奈川大学理学部化学科
西本右子 教授
テーマ：「分析技術で分析技術で素敵な未来を！」
主　催：一般財団法人日本分析機器工業会
一般財団法人日本科学機器協会

(4)展示会
「湘南ひらつかテクノフェア 2019」
日　時：2019年10月17日㈭～19日㈯
会　場：ひらつかサン・ライフアリーナ
出展者：神奈川大学理学部生物科学科
丸田恵美子 教授
岩崎貴也 特別助教
テーマ：「神奈川大学湘南ひらつかキャンパスの植物相・チョウ相」
主　催：平塚商工会議所

(5)展示会
「エコプロ2019」
日　時：2019年12月5日㈭～7日㈯
会　場：東京ビッグサイト
出展者：神奈川大学理学部化学科
西本右子 教授
テーマ：「環境を守るために私たちが今できること」
主　催：一般社団法人産業環境管理協会
日本経済新聞社

(6)展示会
「コンバーティングテクノロジー総合展2020」
日　時：2020年1月29日㈬～31日㈮
会　場：東京ビッグサイト
出展者：神奈川大学理学部化学科
山口和夫 教授
テーマ：「金属ナノ粒子インクの微細パターンを可能にする新たな表面修飾剤と手法の開発」
主　催：株式会社加工技術研究会

(7)展示会
「さがみ自然フォーラム」
日　時：2020年2月6日㈭～11日㈫
会　場：アミューあつぎ
出展者：神奈川大学理学部生物科学科
丸田恵美子 教授
岩崎貴也　特別助教
テーマ：「自然調査研究展示」
主　催：厚木市・NPO法人神奈川県自然保護協会

(5)特　許
［日本出願］
1)「化合物、表面処理剤及び表面処理方法」
山口和夫
2)「フッ素原子含有ポリマーの分解方法、及びフッ素原子含有ポリマーの分解装置」
堀　久男

Science Journal of Kanagawa University
投稿規定

1　編集方針

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

2　掲載論文の種類

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

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

掲載する論文は和文および英文である。

3　原稿の体裁（総説および原著）

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

(1)　頁数

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

(2)　原稿用紙サイズ

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 × 170 mm とする。この場合、余白は、上辺 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

(3)　段組み

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

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

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

(4)　使用文字（フォントの種類）

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

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

(5)　論文構成

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

(6)　論文種の表示

第１頁、第１行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

例えば、■総　説■、■原　著■、■原著（短報）■、■報告書■ など、

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

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、ＭＳゴシックで 11P（ポイント）とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

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

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

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

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

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

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

次のAbstractまでは1行あける。

(8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切である。

見出し（Abstract：）からは1文字あけて要旨本文を書く。

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

(9) Keywords

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

文字は10Pを用い、見出し（*Keywords：*）はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

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

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で12P、本文は10Pとする。

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

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で10.5Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

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

文字サイズは、項目の見出しは太字で12P、各文献は9Pとする。

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

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

1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.

2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus eduis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.

3) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.

4) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol.I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.

5) Owada M (2011) Phylogeny and adaptation of endolithic bivalves in the Mytilidae. *D.Sc. thesis, Kanagawa University*, Japan.

6) Taiz L and Zeigen E［西谷一彦，島津研一郎 監訳］(2003) *テイツザイガー植物生理学 第3版*．培風館，東京.

7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料

の元素分析法．*微生物* **5**: 34-44.

8) 佐藤賢一，鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*．弘学出版，東京．

9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法，第 6 章．*よくわかる電子顕微鏡技術*．平野　寛，宮澤七郎監修，朝倉書店，東京．pp. 137-148.

10) 安積良隆，鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003．*神奈川大学総合理学研究所年報* 2003. pp.41-80.

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

(12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

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

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

なお、本文への挿入の他に各表の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。

図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

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

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

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

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

なお、本文への挿入の他に各図の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。これらの図は、あまり圧縮せず、電子密度 300dpi 程度の原図とする。

(14) 単位

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

(15) 作製見本

希望者には作製見本（デジタルファイル）を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁（報告書）

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

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

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

多人数による共同研究のうち、

(1) 各研究者が全員原著と同等の論文（短報の場合も含めて）を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は 3 の規定に準じて作製する。

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

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

5 原稿の体裁（テクニカルノート）

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

6 原稿の体裁（教育論文）

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

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

7 原稿の体裁（研究交流報告）

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

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

8 投稿と略題名（Running Title）提出

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

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

9 投稿論文の審査

適時、レフリーによる校閲を行ない、採否や再投稿請求は編集委員会で決定する。

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

10 原稿の校正

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

11 投稿料

原則として投稿は無料であるが、カラー印刷を含むものについての著者経費負担の有無および負担額は編集委員会で決定する。投稿原稿の体裁が規定にあわず、編集段階で修正に経費が生じた場合は著者が実費を負担するものとする。また、いずれの範疇であっても、論文が 12 頁を超える場合には、超過分に係る経費は著者がその実費を負担するものとする。

12 別刷

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

13 版権等

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

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

Author Index

A

Aoki, Takashi 青木　孝…… 25, 33

E

Ehara, Masahiro 江原正博…… 61

F

Fujita, Misato …… 15, 21

H

Hachisuka, Mizuho …… 1
Hamamoto, Chieko …… 1, 11
Hanyuu, Madoka …… 1
Harada, Takashi 原田崇司…… 53
Hatakeyama, Risa …… 1
Hino, Akiya …… 21
Hirotsu, Masakazu 廣津昌和…… 65
Hoshino, Yasushi 星野　靖…… 41
Hosoya, Hiroshi …… 21
Hosoya, Natsumi …… 21

I

Itoh, Akiji …… 1
Ito, Akitaka 伊藤亮孝…… 65
Inagaki, Toshiya 稲垣俊哉…… 41
Isoda, Shuto 磯田脩斗…… 65
Ishii, Naonori …… 1
Izumi, Susumu …… 15

K

Kabe, Yoshio 加部義夫…… 93
Kajino, Akiho …… 1
Kanazawa, Ken'ichi 金沢謙一…… 79, 83, 89
Kanazawa, Yuki 金澤悠紀…… 61
Kase, Tomoki 加瀬友喜…… 89
Kawanobe, Kyoko 川延京子…… 83
Kawarai, Kazunari 川原井一成…… 65
Kotani, Susumu …… 21

M

Matsuda, Tsuyoshi 松田　乾 …… 75
Mekuchi, Miyuki 馬久地みゆき …… 75
Mikawa, Kenji 三河賢治 …… 53
Mizuno, Tomohisa 水野智久 …… 33
Murayama, Norihiro …… 1
Murofushi, Narumi …… 1

N

Nakajima, Hiroshi 中島　洋 …… 65
Nakata, Jyoji 中田穣治 …… 41
Nishimoto, Yuko 西本右子 …… 83
Nomura, Kento …… 1

O

Ohira, Tsuyoshi 大平　剛 …… 75
Ono, Yuriko …… 1
Owada, Masato 大和田正人 …… 89

S

Sakai, Shunsuke 酒井駿輔 …… 83
Saitoh, Masaya 齋藤礼弥 …… 79, 89
Sameshima, Toshiyuki 鮫島俊之 …… 33
Seki, Tomonobu 関　友信 …… 75
Seki, Yuhei 関　裕平 …… 41
Suzuki, Kyosuke …… 21
Suzuki, Michio 鈴木道生 …… 75
Suzuki, Nobuo 鈴木信雄 …… 75
Suzuki, Suechika …… 1, 11
Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘 …… 83

T

Tada, Masaaki 多田雅章…… 83
Tanaka, Ken 田中　賢…… 53
Tanno, Yumi …… 1
Tsuji, Hayato 辻　勇人…… 61

W

Wakayama, Norio 若山典央 …… 79

Y

Yamamoto, Takenori …… 1
Yamanaka, Yukio …… 1

編集後記

Science Journal of Kanagawa University 第 31 巻をお届けします。今回は原著論文 13 件、短報 1 件、教育論文 1 件が掲載されています。遠隔授業という異常事態の中で、教育・研究が息長く続けられていることに、大いに勇気づけられます。著者の皆様に厚く御礼申し上げます。

感染モデルやワクチンのように、科学の有効性は揺るぎませんが、科学技術文明の拡大で人間と野生動物の接触が増えたことが、グローバリゼイションとともにパンデミックの引き金であると指摘されています。

テレワークが定着するのか等、どのような「コロナ後の社会」を目指すのか、「AI との共存」などの問題は、科学と人文・社会科学に渡る視点からの議論が必要です。私自身は数学のごく狭い範囲の素養しか身につけていませんが、学生には是非、幅広い学問分野に目を向けて欲しいものです。副専攻や総合理学プログラムは、そのような認識に基づくもののはずです。

今後の理学部に関しては、将来構想委員会を軸に、多大な努力が続けられています。学科の垣根を越えるにとどまらず、文系学部との連携も可能な環境が横浜移転で得られます。これは、総合理学研究所についても言えます。I have a dream.・・・。

最後になりましたが、本誌のさらなる発展を祈り、皆様の一層のご支援をお願い申し上げます。

神奈川大学総合理学研究所、
理学部数理・物理学科　阿部吉弘

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

Science Journal of Kanagawa University Vol. 31
(*Sci. J. Kanagawa Univ.*)

発行日　2020 年 10 月 30 日
編集者　Science Journal of Kanagawa University 編集委員会
発行者　神奈川大学総合理学研究所
発行所　〒 259-1293　平塚市土屋 2946
Tel. 0463-59-4111（内 2500）
Fax. 0463-58-9684
印刷所　光和アドバンス株式会社

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University