

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL OF KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.17 2006

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science of Kanagawa University

Science Journal of Kanagawa University

Vol. 17

目 次

巻頭言

| | |
|------|---|
| 齊藤光實 | 1 |
|------|---|

原 著

| | |
|---|---|
| Functional Analyses of a Neural Cell Specific Variant of Microtubule-Associated Protein 4 Mohammad Rubayet Hasan, Kazuyuki Matsushima, Jin Ming Yue, Hiroyuki Nakagawa, Shigeaki Miyamoto and Susumu Kotani | 3 |
|---|---|

| | |
|---|----|
| Cloning and Sequencing of the Poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) Synthase Gene from Purple Non-Sulfur Bacteria <i>Rhodospirillum centenum</i> and Expression of the Gene in <i>Escherichia coli</i> Mari Shiraki, Takashi Nagano, Emiko Suzuki and Terumi Saito | 13 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 軟体動物タツナミガイ体壁縦走筋ダイアッド接合部の構造解析 木南雅暁、鈴木季直 | 21 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 環境調和型錯体の特長を生かした新規酸化触媒の創成とエネルギー・環境問題への展開 加藤知香、野宮健司、森 和亮、鈴木季直 | 31 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 重金属汚染土壌から汚染物質を回収する高機能環境修復植物の探索（ケナフによるカドミウム除染 の可能性） 澤上航一郎、稲住勇氣、大石不二夫、井上和仁、西本右子、鈴木祥弘 | 39 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| アカタテハ属の色彩パターン修飾と分子系統解析 大瀧丈二、油井秀臣、渋谷達明、山本晴彦 | 43 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| アルビノ・アフリカツメガエル胚に対する微量注射技術を用いた半透明な脳室形態並びに 脳室内液流の可視化 松谷武嗣、茂木和枝、日野昌也、小笠原 強、竹内重夫、豊泉龍児 | 53 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の研究 中田穰治、斎藤保直、川崎克則、服部俊幸 | 63 |
|---|----|

短 報

| | |
|--|----|
| シロイヌナズナの生殖過程に異常のある変異体の染色体解析 安積良隆、酒井麻未、黒森 崇、松永幸大 | 77 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| ポリエステル微生物分解— <i>Ralstonia metallidurans</i> における PHB 結合蛋白質の役割の検討— 齊藤光實 | 81 |
|---|----|

報告書

| | |
|--|-----|
| Design and Synthesis of Dioxetane-Based Chemiluminescent Substrates with High Efficiency in Aqueous System Masakatsu Matsumoto, Nobuko Watanabe, Mamoru Ohashi and Ken Fujimori | 83 |
| 光に安定な貴金属カルボン酸塩錯体の構造多様性と生理活性 野宮健司、力石紀子、野口龍介、木村卓央 | 85 |
| ナノ細孔をもつカルボン酸金属錯体をベースとした新しい固体触媒の構築と地球環境改善への展開 森 和亮、加藤知香 | 89 |
| 生体工学のための感光性表面修飾剤の開発 山口和夫、前田瑞夫、横山昌幸 | 91 |
| 速度定数とヒドロキシルラジカルに対する抗酸化性；UV照射 天野 力、新村和也、中嶋康乃、大竹栄子、佐藤宗行、大石不二夫、西本右子、関 邦博、 峯岸八安津子、渡部徳子 | 95 |
| 環境と健康を守るための水に関する科学的研究 西本右子、高橋法子、石子貴与晃、天野 力、井上和仁、大石不二夫、河村正一、関 邦博、 寺本俊彦、峯岸安津子、渡部徳子 | 97 |
| NMR量子コンピュータ 小澤 宏、天野 力、岡部建次、坂口 潮、福見俊夫、峯岸安津子 | 99 |
| 微量 DNA からの塩基配列決定法を用いたホタテ母貝個体群の推定 鈴木祥弘、井出功一 | 101 |
| | |
| 2005 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 |
| 編集後記 | 110 |

巻 頭 言

齊藤光實

神奈川大学総合理学研究所 所長

昨年後半から今年初めにかけて建築業界、新興企業の偽造、粉飾の事件が我が国で頻発した。科学の世界でも偽造、捏造の論文が世界中で問題になった。最も耳目を驚かせたのが韓国の ES 細胞の事件であろう。日本でも東京大学、大阪大学などで捏造論文が取りざたされている。いずれの事件も生物科学の分野での出来事であるようで、興味深い。

筆者は生物学の片隅にいて、日本生化学会に属しているが、この学会の研究内容はかなりの程度医学領域に偏っている。年々その傾向が強くなっているように思える。医学は昔は西洋では大学に入れてもらえなかった。技術の一つであると見なされたからである。いまでも米国では医学部ではなく Medical School と云って一見 University から独立しているように見える。法律の Law School と同じである。病気を治すという実際的な目的を持つ医学は応用的にならざるを得ない。この点で Medical School は格は高いが、本質的に歯医者を作る Dental School や薬剤師を養成する School of Pharmacy と変わりはない。

問題は医療に大金が動くことであろう。良く効く薬や治療法は病人を治すという本来の目的以外に大金を呼び込む。日本でも政府の補助金がわかり易い医学がらみの研究に重点的につぎ込まれる傾向がでて来ている。研究者が何億もの研究費をもらおうとどうなるか。補助金に比例して報告も多く求められる。雑誌に結果を公表しなければならない。忙しくなって、研究は雑になって、形だけ整えることになるであろう。そのとき捏造の罾が待ち受けるのかも知れない。

最近問題になる捏造論文が Nature や Science に掲載されたものが多いことも興味深い。職業に貴賤

がないと同様、研究にも貴賤はないはずではあるが、科学雑誌にはれっきとした貴賤があり、程度の高くとみなされる雑誌と、程度の低いとみなされる雑誌がある。マスコミや科学者自身も含めた社会の構成員がそのように認識している。立派な成果は立派な科学雑誌に投稿し、自信の無い結果は格下の雑誌に載せることはどんな研究者も行っていることであり、誰も不思議に思わない。立派な雑誌は人をあつと云わせる結果を進んで掲載する。自然とそうなるのは良く理解できる。捏造はだいたいにおいてあつと云わせる方向に行われるので立派な雑誌に掲載されるのであろう。論文の価値を測ることは本来それほど容易ではないにも関わらず、掲載雑誌のインパクトファクターが論文の価値を教えてくれる。ここに文化と科学との関わりを見ることができる。科学は文化と無縁の存在ではない。

理学部では研究者は応用を考えないことは無いけれども応用が研究の動機にはなる訳ではない。研究費があまり無くてもよく考えて丁寧に研究するのが理学部の特徴であろう。一般的な問題は、成果主義にひた走ることを余儀なくさせられる一流科学者の教養の低下である。捏造論文を防ぐ根本的な解決は科学者の教養による自己規制しか無いであろう。科学とは何かと云う教育もしっかりと行われているようにも思えない。これからの科学教育では教養教育をもっと重視する必要がある。

研究所の年報は昨年から新しい装いで出発した。幸い、ある程度の数の学術論文も掲載することができた。今後とも「Science Journal of Kanagawa University」については総合理学研究所の他の事業とともに所員の皆様、ご関係の皆様のご理解とご支援を賜りたい。

Terumi Saito

Director of the Research Institute for
Integrated Science, Kanagawa University

■Full-Length Paper■

Functional Analyses of a Neural Cell Specific Variant of Microtubule-Associated Protein 4

Mohammad Rubayet Hasan¹, Kazuyuki Matsushima², Jin Ming Yue¹,
Hiroyuki Nakagawa¹, Shigeaki Miyamoto¹ and Susumu Kotani^{2,3}

¹ Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology, Iizuka, Fukuoka 820-8502, Japan;

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

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

Abstract: The present study was conducted to analyze the functions of a recently reported neural cell specific variant of MAP4 (MAP4-SP) that lacks 72 consecutive amino acid residues in a region that is rich in proline and basic residues (pro-rich region). Although our previous study (Matsushima *et al.*, 2005)^{1,2}, using the microtubule-binding domains of the isoform and wild type MAP4 (MAP4-LP), demonstrated a difference in the microtubule bundling activity of the two proteins, here, using the full-length forms of the MAP4 proteins, we show that the proteins do not differ in their microtubule bundling activity both *in vitro* and *in vivo*. Expression of the MAP4 proteins, as C-terminal fusions to green fluorescent protein (GFP), in neuroblastoma cells revealed that MAP4-SP decorated microtubules were more remarkable in appearance than MAP4-LP decorated microtubules in the neuronal growth cones. Moreover, a microtubule destabilizing protein, septin2, which interacts with the pro-rich region of MAP4, was more active in destabilizing MAP4-SP-microtubules than MAP4-LP-microtubules *in vitro*. The susceptibility of MAP4-SP microtubules to destabilization by septin could be attributed to the weaker binding affinity of MAP4-SP for microtubules, as was reported earlier. Taken together, the current findings suggest the possibility that the neural MAP4, with its short pro-rich region, could be important in maintaining more dynamic microtubules in neural cells, and thus allowing more plasticity in and rapid morphological changes of these cells.

Key Words: microtubule, microtubule-associated protein 4 (MAP4), pro-rich region, neural MAP4, microtubule bundling, septin2, microtubule stability and dynamics

Introduction

While the brain microtubule-associated proteins (MAPs)* such as MAP1, MAP2 and tau were the first MAPs to be studied in great detail, subse-

quent studies on MAPs from tissues other than the brain, led to the discovery of a new, ubiquitous class of MAP referred to as 'microtubule associated protein 4' (MAP4)¹. MAP4 shares many structural and functional properties with the neuronal MAPs, MAP2 and Tau. They are all heat stable, promote the polymerization of tubulin, and stabilize microtubules *in vitro*. In the intracellular environment, MAP4 is believed to play important roles in the organization and dynamics of both interphase and mitotic microtubules²⁻⁴. MAP4 proteins are composed of an

***Abbreviations:** MAP, microtubule-associated protein; LP, long pro-rich; SP, short pro-rich; GFP, green fluorescent protein; AP, assembly promoting; MTB, microtubule binding; PJ, projection; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; FCS, fetal calf serum; PCR, polymerase chain reaction; CFP, cyan fluorescent protein; YFP, yellow fluorescent protein; IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside; FPLC, fast performance liquid chromatography; RB, reassembly buffer; MES, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid; EGTA, Ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; DIC, differential interference-contrast; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

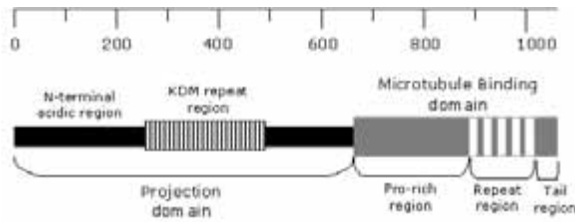


Fig. 1. Schematic diagram of the primary structure of MAP4.

N-terminal acidic domain and a C-terminal basic domain. The basic C-terminal domain binds to acidic microtubules, and is known as the microtubule-binding domain. The microtubule-binding domain of MAP4 is highly conserved among the MAP4 proteins from different species and is also partly homologous to the microtubule-binding region of the brain MAPs, MAP2 and tau^{5,6}.

The microtubule-binding domain of MAP4 is divided into three sub-domains (Fig.1): 1) *Pro-rich region*: a region rich in proline and basic residues that was suggested to promote the nucleation of microtubule assembly *in vitro* by bridging protofilaments laterally^{7,8}. 2) *Repeat region*: a region containing 3-5 imperfect repeats of assembly promoting (AP) sequences that was shown to be essential for microtubule assembly and suggested to serve as a microtubule elongating factor^{7,8}. 3) *Tail region*: a short hydrophobic C-terminal sequence which does not bind to microtubules, but was thought to be necessary for proper microtubule assembly⁷. The N-terminal acidic domain of MAP4 was termed the 'projection domain' because this domain does not bind to microtubules and protrudes from the microtubule wall as projections. The projection domain of MAP4 has been suggested to suppress the microtubule bundling activity of the microtubule-binding domain and maintain spacing between the microtubules⁹.

Differential regulation of the intracellular dynamics and organization of the microtubule cytoskeleton by different isoforms of MAPs is believed to play a key role in cell growth and morphogenesis¹⁰. To date, four types of MAP4 cDNAs have been identified that differ from each other in the number or arrangement of the AP sequences¹¹. In addition, we have identified a neural cell specific variant of MAP4 from bovine adrenal medulla that lacks 72 consecutive amino acid residues in the pro-rich region, from amino acid position 649-721,

of wild type MAP4¹². The missing region comprises a complete exon of wild type MAP4, and is possibly generated by an alternative splicing. Because of the short pro-rich region of the isoform, it was termed 'MAP4-SP', and the ubiquitous MAP4, with a long (full-length) pro-rich region, was termed 'MAP4-LP'. The missing region of MAP4-SP is highly conserved among mammalian species and a similar variant was also detected in rat cells¹². In either species, expression of the isoform is restricted to neural-ectoderm derived tissues such as the brain and adrenal medulla. *In vitro* analyses using bacterially expressed truncated fragments containing the microtubule binding domains of MAP4-LP and MAP4-SP revealed minor differences in their microtubule binding and assembly promoting activities, except that the *in vitro* reconstituted microtubules in the presence of the MAP4-SP fragment were single microtubules instead of microtubule bundles induced by the MAP4-LP fragment¹².

To date, only a few proteins reportedly interact with MAP4 *in vivo*, and most of them are involved in the phosphorylation of MAP4. Very recently, Kremer *et al.*¹³ reported that mammalian septins bind to MAP4 and thus regulate the stability of microtubules. Septins are a family of GTP binding proteins that play important roles in cytokinesis. There are about 12 proteins in this family, which forms oligomers and are often found in association with microtubules and the actin cytoskeleton *in vivo*¹³. An extensive search for septin binding partners led the authors to reveal an interaction between MAP4 and septin. The interaction occurs through the binding of septin2 to the pro-rich region of MAP4, which blocks the interaction of MAP4 with microtubules, reducing microtubule stability *in vivo*. These findings raise the possibility that the neural specific MAP4 isoform, which we have described, may differ in its ability to interact with the septins because of the short pro-rich region. A variation in the binding affinity between MAP4 and septin could have distinct effects on the cellular microtubule dynamics and organization.

In our previous study¹², the most prominent functional difference between the neural variant (MAP4-SP) and wild type (MAP4-LP) MAP4 was observed in their *in vitro* microtubule bundling

activity. These analyses were, however, carried out using only the microtubule binding domains of the corresponding proteins, and it is not known whether the proteins possess similar properties in their full-length forms. In this paper, we demonstrate that the two proteins do not differ in their microtubule bundling activity both *in vitro* and *in vivo*, but differ in their ability to organize microtubules in neuronal growth cones. Moreover, a difference was observed in the septin-mediated regulation of microtubules, assembled *in vitro*, in the presence of MAP4-LP and MAP4-SP, suggesting that neural MAP4 may differentially regulate microtubules in a tissue specific manner.

Materials and Methods

Materials

The bacterial expression vector for full-length mouse septin2 (pT7-HS-Sept2) was kindly provided by Brandon Kremer (Center for Cell Signaling, Department of Microbiology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, USA). Rabbit anti-MAP4 antiserum was obtained as described by Kotani *et al.*¹⁴. Tubulin was purified by phosphocellulose column chromatography, from a twice-cycled porcine brain microtubule protein fraction, as described previously^{15,16}. MAP4 fragments containing the microtubule binding domains of MAP4-LP and MAP4-SP were purified as described earlier¹⁰. Other reagents used in the study were of reagent grade unless otherwise mentioned.

Cell culture

Mouse neuroblastoma cell line, NG 108-15 cells were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and penicillin/streptomycin at 37.5°C in 5% CO₂. For live cell observation, NG 108-15 cells were cultured on cover slips coated with poly-L-lysine (0.01%) and laminine (12.5 µg/ml).

Construction of expression plasmids

Because cDNA clones for full-length MAP4 proteins were not found in our previous search¹², bacterial and mammalian expression vectors that encompass full-length MAP4 were constructed from shorter constructs, expressing the projection

(PJ) domain, and the microtubule-binding domains of MAP4-LP (MTB-LP) and MAP4-SP (MTB-SP). The C-terminal part of the PJ domain and the N-terminal parts of both MTB domains share a common region (Fig.2). DNA encoding the PJ domain and the MTB domains were first amplified by PCR using primers as indicated in Fig. 2. The primer sequences were: P1-F, 5'-gaagc tagcctcagtcttgcatagtcg-3'; P1-R, 5'-cacgactgcttctg gtga-3'; P2-F, 5'-ccagtcaaagacatggctc-3'; and P2-R, 5'-agaagcttagctctgtctcctggatc-3'. The PCR products were gel purified and the PCR products for PJ and MTB-LP or PJ and MTB-SP were mixed in separate reaction mixtures with dNTPs and taq DNA polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) without the addition of primers. The reaction mixtures were then subjected to 30 cycles of the thermal reaction so that the common region at the junction of PJ and MTB domains acts as a primer to complete the synthesis of the full-length MAP4 sequences. Each thermal cycle consisted of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 56°C for 30 sec and extension at 72°C for 3 min, respectively. One µl of these reaction products were then subjected to PCR using P1-F and P2-R primers to amplify full-length MAP4 encoding sequences. To construct bacterial expression vectors, primers P1-F and P2-R were designed to contain the restriction endonuclease sites *NheI* and *HindIII*, respectively. The full-length MAP4 inserts were ligated in frame to the *NheI/HindIII* sites of the expression plasmid vector pET21d(+) (Stratagene, La Jolla, CA) to generate pET-MAP4-LP and pET-MAP4-SP plasmids. Mammalian expression vectors were also constructed by employing the same strategy except that primer P1-F was designed to contain

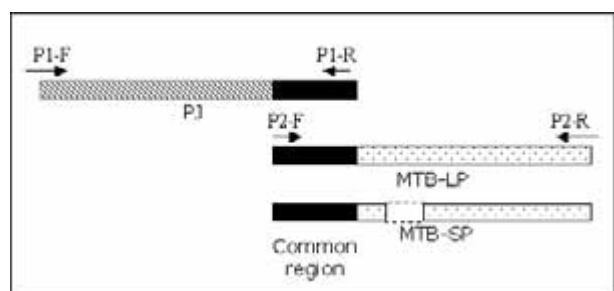


Fig. 2. Schematic diagram of the MAP4 cDNAs used to construct the expression vectors of full-length MAP4-LP and MAP4-SP. Arrows indicate the location of different primers. Diagram not drawn to scale.

a *Bgl*II site instead of the *Nhe*I site. The inserts were ligated in frame to the *Bgl*II/*Hind*III sites of pEGFP-C3 (Clontech, CA, USA) to express MAP4 genes as fusions to the C-terminus of the green fluorescent protein (GFP). To construct the expression vectors of MAP4 proteins fused with other fluorescent proteins, such as cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP), the inserts expressing CFP and YFP were first cut from pECFP-N1 and pEYFP-C1 plasmids (Clontech, CA, USA), respectively, at *Age*I and *Bsr*G1 sites. The inserts were then ligated to the *Age*I/*Bsr*G1 sites of pEGFP-C3 to replace GFP with CFP and YFP, generating pECFP-C3 and pEYFP-C3 plasmids, respectively. The full length MAP4-LP and MAP4-SP inserts were then cut from the previous GFP constructs at *Bgl*II/*Hind*III sites and ligated to the same sites of pECFP-C3 and pEYFP-C3 plasmids to express CFP-MAP4-LP and YFP-MAP4-SP, respectively.

Purification of full-length MAP4-LP and MAP4-SP

Bacterial expression of MAP4 proteins was induced by isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) to a final concentration of 0.5 mM in LB medium (10 g/liter NaCl, 10 g/liter bactotryptone, 5 g/liter yeast extract, pH 7.2) containing chloramphenicol (25 μ g/ml) and ampicillin (150 μ g/ml) at 37°C for 3-4 hours. Cells were collected by centrifugation and resuspended in 20 MEM and heat-treated directly in a boiling water bath for 8-min. The cell debris was removed by centrifugation and purification of the MAP4 proteins from the heat stable cell extracts was carried out using a prepacked, high capacity ion exchange column, Econo-Pac High S cartridge (Bio-Rad, Hercules, CA) coupled to a FPLC system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) according to the instruction manual.

Purification of septin2

The expression of septin2 was induced by the addition of IPTG (Takara Shujo, Tokyo, Japan) to a final concentration of 0.5 mM and incubation at 18°C overnight. Cells were collected by centrifugation and dissolved in 8 ml native binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, pH 8.0). Cells were lysed by one freeze thaw cycle at -80°C and

sonication. Cell debris was removed by centrifugation and the supernatant was transferred to a fresh tube. His tagged septin2 from the soluble fraction was then purified by ProBond™ Nickel chelating resin (Invitrogen life technologies, CA, USA) according to the instruction manual.

***In vitro* polymerization of tubulin**

For the turbidity assay, tubulin (10 μ M) was added to reaction mixtures containing only reassembly buffer (RB: 100 mM MES, pH 6.8, 0.1 mM EGTA, and 0.5 mM MgCl₂), MAP4-LP (0.8 mg/ml) in reassembly buffer, or MAP4-SP (0.8 mg/ml) in reassembly buffer. GTP was present in all reactions at a final concentration of 0.5 mM. Tubulin polymerization was monitored by measuring the increase in absorbance at 350 nm at 37°C in a UV spectrophotometer (U 2000, Hitachi, Tokyo, Japan) for up to 30 min. Microtubule cosedimentation assays using septin2 and MAP4 fragments were carried out under the same reaction conditions. Briefly, purified septin2 was added to reaction mixtures containing tubulin and MAP4 fragments to final concentrations of 10 μ M and 2 μ M, respectively, in a reassembly buffer containing 0.5 mM GTP. The mixtures were then incubated at 37°C for 30 min and centrifuged at 16 000 $\times g$ for 30 min. The pellets were resuspended in the same volume of RB, and both the supernatants and pellets were analyzed by electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel.

Electron microscopy

Microtubule samples were prepared as in the turbidity assay described above, and mounted on 300-mesh carbon coated copper grids. The grids were left for 1 min, blotted and negatively stained with 0.75% uranyl acetate before observation under a Philips Tecnai F20-FEG microscope, operating at 120 kV.

Transfection and live cell observation

NG 108-15 cells were transfected with 1 μ g of constructs using SuperFect transfection reagent (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells grown on laminin-coated cover glasses were mounted on an open heating chamber (Warner Instruments,

Hamden, CT) operating at 37°C. Approximately 1 ml of pre-warmed growth medium was poured onto the cover glass and the chamber was mounted on a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM510; Carl Zeiss GmbH., Jena, Germany) for live cell observation. All images were analyzed by ImageJ software (NIH, USA).

Results

Microtubule bundling activity of full-length MAP4 proteins

We reported earlier that the MAP4-LP fragment containing the microtubule-binding domain formed microtubule bundles *in vitro*, whereas the corresponding fragment of MAP4-SP did not. The difference in the microtubule bundling activities of MAP4 fragments was demonstrated by the significant variation in the turbidity values of microtubules, as well as by electron microscopy¹²⁾. In this study, we aimed to investigate whether these proteins behave similarly in full-length forms. Although the purified fractions of full-length MAP4 proteins used in this study contained a large number of degradation products of MAP4 (data not shown), it was expected that the presence of the full-length forms should exert their effects in spite the presence of their degradation products. Therefore, the partially purified, full-length MAP4 protein preparations were used for a turbidity based microtubule bundling assay. Both proteins induced microtubule assembly *in vitro*, as revealed by the significantly higher turbidity values of tubulin preparations, containing full-length MAP4-LP or MAP4-SP, than the control preparation that lacked MAP4 proteins (Fig. 3A). However, in contrast to our previous observations on MAP4 fragments¹⁰⁾, the turbidity values of preparations containing full-length MAP4 proteins were almost identical (Fig. 3A), suggesting that none of the proteins induced microtubule bundles. The turbidity data were further confirmed by the fact that no microtubule bundles were found by electron microscopy (Fig.3B). The MAP4 proteins, therefore, do not differ in their microtubule bundling activity, *in vitro*, in full-length forms.

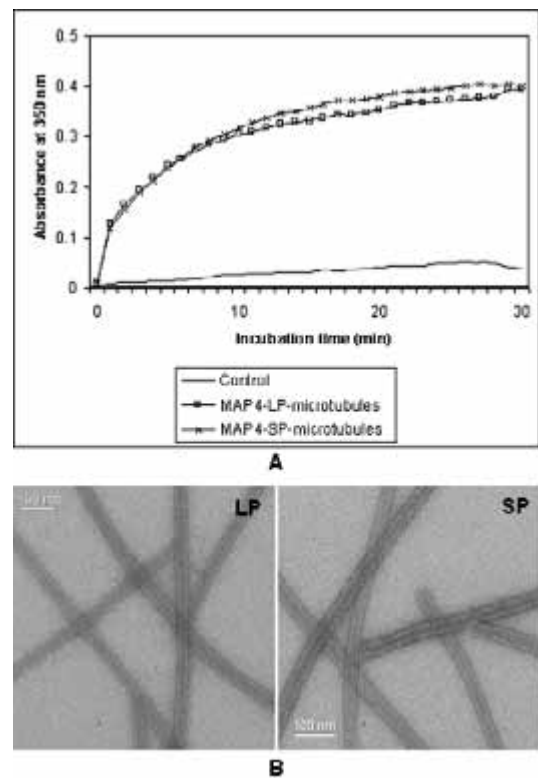


Fig. 3. Turbidometric and electron microscopic analyses of microtubules assembled *in vitro*, using the full-length forms of MAP4-LP and MAP4-SP. (A) Tubulin (10 μ M) was mixed with purified MAP4-LP or MAP4-SP (0.8 mg/ml) in reassembly buffer, and polymerization was initiated by raising the temperature from 0°C to 37°C (see Materials and Methods). Control experiment was carried out in the same way without MAP4 proteins. (B) Microtubule assembly was induced by MAP4-LP or MAP4-SP *in vitro*. The samples were mounted on carbon-coated grids and negatively stained for electron microscopy.

Microtubule organization in cells expressing GFP-MAP4-LP and GFP-MAP4-SP

With an aim to study the intracellular behavior of the neural specific isoform of MAP4 as compared to wild type MAP4, GFP-MAP4-LP and GFP-MAP4-SP were expressed in a mouse neuroblastoma cell line, NG 108-15 cells. In cell biology research, GFP and other fluorescent proteins are now being extensively used as reliable and effective fluorescent reporters of many proteins of interest that directly show the intracellular localization of the target protein in living cells. In our study, GFP was tagged to the N-terminal end of full-length MAP4 proteins, so that GFP did not interfere with the microtubule binding activity of the C-terminal microtubule-binding domain. Once expressed in mammalian cells, we found that both MAP4 proteins had a typical filamen-

tous distribution in the cytoplasm, indicating their localization with microtubules (Figs. 4A and 4B). Further evidence regarding the microtubular localization of the MAP4 proteins came from the fact that their filamentous distributions were disrupted by treatment of the cells with the microtubular inhibitor, nocodazole (Figs. 4C and 4D). These results indicate that the expressed proteins were functionally active *in vivo*, and thus the staining pattern of GFP, reports about the microtubule organization of the MAP4 expressing cells.

The general organization of microtubules was the same in cells expressing MAP4-LP or MAP4-SP (Figs. 4A and 4B), and in a co-expressed cell, both MAP4 proteins decorated the same microtubules throughout the cell (shown by open arrows in Figs. 4C and 4D). However, when individually expressed, the MAP4-SP decorated microtubules were found to be more remarkable in appearance in the neuronal growth cones than the MAP4-LP decorated microtubules (shown by closed arrows in Figs. 2E and 2F). This feature was more clearly noticeable in well-developed growth cones after considerable elongation of neurites. To investigate whether MAP4-SP could induce process formation in non-neuronal cells, as was reported for MAP2 and tau^{17,18}, rat fibroblastic cell line, 3Y1 cells were transfected with the GFP-MAP4-SP construct. However, no process formation was observed in MAP4-SP expressing cells and microtubule organizations in these cells were similar to those expressing MAP4-LP (data not shown). These data indicate that unlike MAP2 and tau, MAP4-SP itself is not capable of forming processes in non-neuronal cells.

Interactions between MAP4 proteins and septin 2

Septin 2, one of the mammalian septins, was recently reported to bind to the pro-rich region of MAP4 and thus inhibit the MAP4 activity to bind, stabilize and bundle microtubules *in vitro*¹³.

Because MAP4-SP lacks a significant portion of the pro-rich region, we wanted to investigate whether this protein differs with MAP4-LP, which possesses the full-length pro-rich region, in its ability to interact with septin2. To investigate this possibility, bacterially expressed septin2 was added to reaction mixtures containing tubulin and

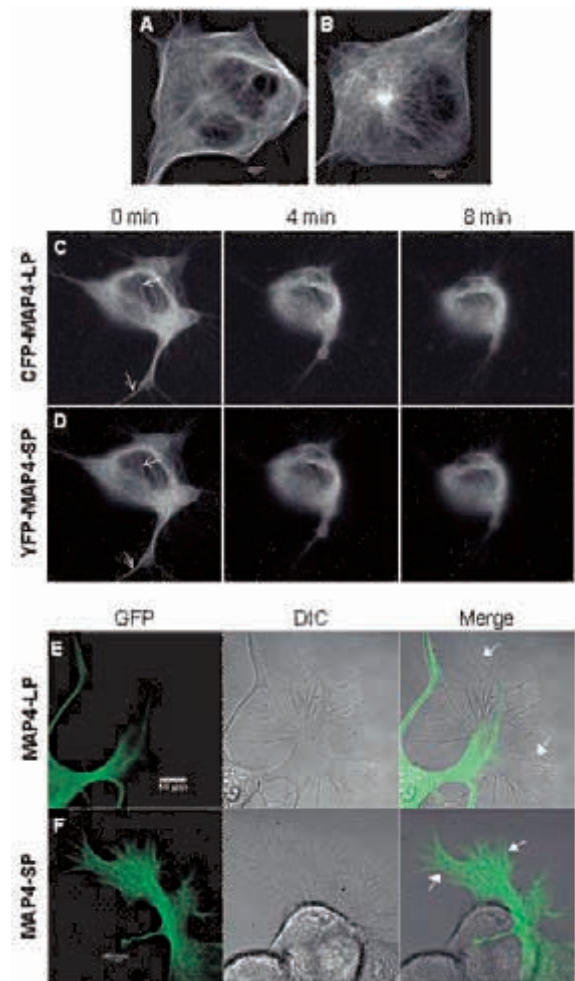


Fig. 4. Live cell observation of cells expressing GFP-MAP4-LP or GFP-MAP4-SP. (A,B) NG 108-15 cells were transfected with GFP-MAP4-LP construct (A) or the GFP-MAP4-SP construct (B) and observed as described in the Materials and Methods. (C, D) NG 108-15 cells were co-transfected with CFP-MAP4-LP (C) and YFP-MAP4-SP (D) constructs. Cells were prepared for live observation as described in the Materials and Methods and mounted on a confocal laser-scanning microscope (Zeiss LSM 510). The microscope is equipped to detect cyan fluorescence from CFP and yellow fluorescence from YFP at the same time from the same cell, using lasers of different wavelengths. Nocodazole was added to a final concentration of 10 mg/ml during live cell observation, and the effect of nocodazole was monitored by capturing images at 30 sec intervals for a total of 10 min. (E,F) NG 108-15 cells were transfected with GFP-MAP4-LP (E) or GFP-MAP4-SP (F) constructs and observed as before. Left panel: GFP staining shows the MAP4-decorated microtubule distribution. Middle panel: Differential interference-contrast (DIC) images of the cells showing cell shapes. Right panel: Merged images showing the intracellular localization of MAP4 proteins.

MAP4 fragments, possessing the microtubule binding domains of MAP4-LP or MAP4-SP, under microtubule assembly conditions. The effects of septin2 on the assembly promoting and microtubule binding activity of MAP4 proteins were then analyzed by the amounts of precipitated tubulin and co-precipitated MAP4 proteins, respectively, as revealed by SDS-PAGE. Figure 5 (lanes 1 and 2) demonstrates that the addition of septin2 had no effect on the assembly promoting and microtubule binding activity of MAP4-LP. However, the amount of precipitated tubulin was reduced in the presence of septin2, when MAP4-SP was used to assemble microtubules *in vitro* (Fig. 5, lanes 3P and 4P). Moreover, in the presence of septin2, a small amount of MAP4-SP remained in the supernatant fraction, while no MAP4-SP was detectable in the supernatant fraction of the control preparation, which lacked septin2 (Fig. 5, lanes 3S and 4S). These results suggest that the MAP4-SP-microtubules could be more prone to destabilization by septin2 than MAP4-LP-microtubules.

In addition to the MAP4 proteins, septin2 also appeared in the microtubule-pellet fraction (Fig. 5, lanes 2P and 4P). However, we found that septin2 was precipitated under microtubule assembly conditions even in the absence of tubulin and MAP4 proteins (data not shown). Therefore, the co-sedimentation of septin2 with microtubules is not related to its ability to interact with microtubules. These data are also consistent with the original report of Kremer *et al.*¹³⁾ on septin2.

The inhibitory effect of septin2 on the interaction of MAP4-SP with microtubules was not so prominent as that reported by Kremer *et al.*¹³⁾ concerning the effect of septin2 on the pro-rich region. This may be related to the fact that, in addition to the pro-rich domain, our MAP4 fragments contained the assembly promoting domains, which have higher binding affinities for the microtubules.

Moreover, Kremer *et al.*¹³⁾ used septin trimers (septin2:6:7) instead of only septin2, as was used in this study. We predict that the inhibitory effect of septin on the microtubule binding and assembly promoting activities of MAP4-SP could be more pronounced with the trimer.

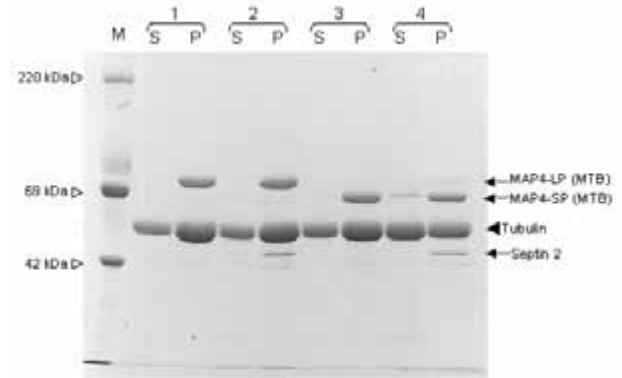


Fig. 5. Effect of septin2 on MAP4-microtubule interaction. Septin2 was added to reaction mixtures containing tubulin (15 μ M) and MAP4 fragments (2 μ M). Microtubules were polymerized and microtubule bound and unbound fractions were analyzed by SDS-PAGE. Lanes 1 and 3 contained control preparations of MAP4 LP and MAP4-SP, respectively, without septin2; Lanes 2 and 4 contained MAP4-LP/Septin2 and MAP4-SP /Septin2, respectively. S: Supernatant; P: pellet.

Discussion

The main focus of the present study was to functionally characterize the neural variant of MAP4, MAP4-SP, which lacks 72 consecutive amino acid residues in the N-terminal portion of the pro-rich region. Because many functions of the ubiquitously distributed MAP4, MAP4-LP that contains the intact pro-rich region, are known, analyses were carried out in terms of comparisons between the two proteins. In our previous report¹²⁾, we showed that MAP4-SP shares many properties with MAP4-LP, but differs in its microtubule bundling efficiency. Here, using the full-length forms of these proteins, we have shown that neither of the two proteins induces microtubule bundles *in vitro*. This is consistent with the widely accepted hypothesis that the projection domain of MAPs acts to space microtubules, which was demonstrated in the case of MAP4 by Iida *et al.*⁹⁾. However, the present data do not exclude the possibility that the deletion in the pro-rich region causes a change in the tertiary structure of MAP4-SP at the junction of the projection domain and the microtubule-binding domain, and thus MAP4-LP and MAP4-SP could maintain different spacing between microtubules, as we have discussed elsewhere¹²⁾. Further investigations using more purified MAP4 proteins are necessary to address this issue.

Next, to investigate the effect of MAP4 proteins

on the organization of microtubules, we expressed these proteins in NG 108-15 cells. GFP-MAP4 proteins were localized to microtubules, as revealed by their filamentous distribution in the cytoplasm and by the disruption of their filamentous staining pattern upon treatment of cells with the microtubular inhibitor, nocodazole (Fig.4). Overexpression of MAP4 proteins did not cause any significant change in the microtubule organization, and the general staining patterns were the same for both MAP4-LP and MAP4-SP. However, it was interesting to note that the MAP4-SP decorated microtubules were more remarkable in the neuronal growth cones than the MAP4-LP decorated ones. This observation supports our previous speculation that MAP4-SP could have a neural cell-specific role.

During neuronal development, the coordinated reorganization of microtubules and action filaments is believed to play a key role in the formation of growth cones from extending lamellipodia, but little is known about the mechanisms of such coordinated behavior. Previously, MAP2 was suggested to be a candidate that rearranges the cytoskeleton, during neuronal growth and differentiation, through its ability to interact with both microtubules and actin filaments¹⁹. Since MAP4 proteins share many structural features with MAP2 in their microtubule-binding domains, it seems possible that MAP4-SP might play a similar role in the neuronal growth cones. The predominance of MAP4-SP compared to MAP4-LP in the actin rich growth cones (Fig. 4E and 4F) also supports this idea.

Recently, Kremer *et al.*¹³ demonstrated that a small G protein, septin2, interacts with the pro-rich region of MAP4 and thus destabilizes microtubules *in vivo*. Because MAP4-SP lacks a significant portion of the pro-rich region, it was expected that the two forms of MAP4 could be differentially regulated by septin2 with respect to their microtubule binding and assembly promoting activities. Although, it was possible that MAP4-SP, with its incomplete pro-rich region, could bypass the septin-mediated regulation, the result was opposite: septin2 was more efficient in exerting its effect on the activity of MAP4-SP. We could not observe any effect of septin2 on MAP4-LP, which is consistent with the findings of

Kremer *et al.*¹³ that the inhibitory effect of septin on the binding of MAP4 to microtubules was limited to the pro-rich region alone, and the effect was not observed with a MAP4 fragment containing both the pro-rich region and the repeat region. The higher sensitivity of MAP4-SP microtubules to septin could be related to the weaker binding affinity of MAP4-SP for microtubules¹².

In conclusion, we have demonstrated, using the full-length proteins, that neural MAP4 shares many properties with its wild type counterpart *in vitro*, despite the lack of a highly conserved region within the pro-rich region. However, the two proteins showed slightly different intracellular localizations, i.e., the neural MAP4 variant was more prominent in the neuronal growth cones. Furthermore, the neural MAP4-induced microtubules were more susceptible to destabilization by septin2. These results suggest that the protein might confer dynamicity to neuronal microtubules, especially in the cell periphery, allowing remodeling of the microtubule cytoskeleton and thus providing increased plasticity to the cells during neuronal polarization.

References

- 1) Tokuraku K, Katsuki M and Kotani S (2002) Structural and functional analyses of microtubule-associated protein 4. *Rec. Res. Devel. Biochem.* **3**: 315-333.
- 2) Kotani S, Murofushi H, Maekawa S, Aizawa H and Sakai H (1988) Isolation of rat liver microtubule-associated proteins. Evidence for a family of microtubule-associated proteins with molecular mass of around 200,000 which distribute widely among mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **263**:5385-5389.
- 3) Parysek LM, Asnes CF and Olmsted JB (1984) MAP4: Occurrence in mouse tissues. *J. Cell. Biol.* **99**:1309-1315.
- 4) Olson KR, McIntosh JR and Olmsted JB (1995) Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J. Cell Biol.* **130**:639-650.
- 5) Aizawa H, Emori Y, Murofushi H, Kawasaki H, Sakai H and Suzuki K (1990) Molecular cloning of a ubiquitously distributed microtubule-associated protein with Mr 190,000. *J. Biol. Chem.* **265**:13849-13855.
- 6) West RR, Tenbarger KM and Olmsted JB (1991) A model for microtubule-associated protein 4 structure. *J. Biol. Chem.* **266**:21886-21896.
- 7) Katsuki M, Tokuraku K, Murofushi H and Kotani S (1999) Functional analysis of microtubule-binding domain of bovine MAP4. *Cell Struct Funct.* **24**:

- 337-344.
- 8) Tokuraku K, Katsuki M, Nakagawa H and Kotani S (1999) A new model for microtubule-associated protein (MAP)-induced microtubule assembly. The Pro-rich region of MAP4 promotes nucleation of microtubule assembly *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **259**:158-166.
 - 9) Iida J, Itoh TJ, Hotani H, Nishiyama K, Murofushi H, Bulinski JC and Hisanaga S (2002) The projection domain of MAP4 suppresses the microtubule-bundling activity of the microtubule-binding domain. *J. Mol. Biol.* **320**:97-106.
 - 10) Chapin SJ, Lue CM, Yu MT and Bulinsky JC (1995) Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different micro-tubule-binding domains. *Biochemistry* **34**: 2289-22301.
 - 11) Tokuraku K, Matsushima K, Matui T, Nakagawa H, Katsuki M, Majima R and Kotani S (2003) The number of repeat sequences in microtubule-associated protein 4 affects the microtubule surface properties. *J. Biol. Chem.* **278**:29609-29618.
 - 12) Matsushima K, Aosaki M, Tokuraku K, Hasan MR, Nakagawa H and Kotani S (2005) Identification of a neural cell specific variant of microtubule-associated protein 4. *Cell struct. Funct.* **29**:111-124.
 - 13) Kremer BE, Haystead T and Macara IG (2005) Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell.* **16**:4648-4659.
 - 14) Kotani S, Murofushi H, Maekawa S, Sato C and Sakai H (1986) Characterization of microtubule-associated proteins isolated from bovine adrenal gland. *Eur. J. Biochem.* **156**:23-29.
 - 15) Shelanski ML, Gaskin F and Canto CR (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**:765-768.
 - 16) Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY and Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**:1858-1862.
 - 17) LeClerc N, Kosik KS, Cowan N, Pienkowski TP and Baas PW (1993) Process formation in Sf9 cells induced by the expression of a microtubule-associated protein 2C-like construct. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:6223-6227.
 - 18) Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L and McConlogue L (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* **114**:727-733.
 - 19) Dehmelt L Smart FM, Ozer RS and Halpain S (2003) The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci.* **23**: 9479-90.

■Full-Length Paper■

Cloning and Sequencing of the Poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) Synthase Gene from Purple Non-Sulfur Bacteria *Rhodospirillum centenum* and Expression of the Gene in *Escherichia coli*

Mari Shiraki^{1,3}, Takashi Nagano¹, Emiko Suzuki¹ and Terumi Saito^{1,2}

¹ Laboratory of Molecular Microbiology, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

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

Abstract: A 10-kb genomic fragment was isolated from *Rhodospirillum centenum* by Southern-hybridization and colony-hybridization, using a probe amplified by PCR with oligo-nucleotide primers constructed from a sequence conserved in poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) synthase genes. After subcloning of an approximately 3-kb fragment (*Sma*I-*Eco*RV) that caused the production of PHB in *Escherichia coli* in the presence of β -ketothiolase (*phbA*), an acetoacetyl-CoA reductase (*phbB*) gene from *Ralstonia eutropha* H16 was obtained and sequenced. This fragment contained an open reading frame (ORF) whose amino acid sequence was highly similar to the sequences of other known PHB synthase genes, especially to a synthase from *Azospirillum brasilense* (74% identity).

Keywords: poly (3-hydroxybutyrate), PHB, PHB synthase, purple non-sulfur bacteria, *Rhodospirillum centenum*, *phbC*

Introduction

The production of intracellular polyesters belonging to the class of polymers known as polyhydroxyalkanoates (PHAs) has been observed in a wide array of prokaryotic organisms¹. The monomers composing the polyesters range in length from C4 (β -hydroxybutyrate) to C16 (β -hydroxyhexadecanoate)². PHAs have attracted attention as a potential alternative to conventional petrochemical-derived plastics³. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) is the simplest and most common PHA¹. The metabolic pathways leading to the synthesis of PHB have been investigated in many bacteria. *Ralstonia eutropha*, a bacterium which accumulates PHB intracellularly at levels equivalent to about 70-90% of dry cell weight at maximum, has been extensively studied, and the genes of three enzymes involved in the synthesis of PHB have been cloned and sequenced^{4, 5}. As in *R. eutropha*, in most bacteria, including *Zoogloea ramigera*, *Alcaligenes latus*, and *Rhodobacter sphaeroides*, a three-step metabolic pathway has been revealed. The first

step is catalyzed by the enzyme β -ketothiolase (EC2.3.1.16), which condenses acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) to acetoacetyl-CoA⁶. This intermediate is then reduced to D-(-)- β -hydroxy butyryl-CoA by an NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase

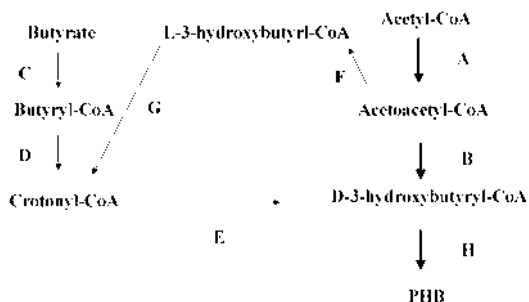


Fig. 1. Pathway of PHB synthesis and related reaction steps in PHB-accumulating bacteria. A, β -ketothiolase; B, acetoacetyl-CoA reductase (NADPH-dependent); C, Acyl-CoA synthetases; D, butyryl-CoA dehydrogenase; E, enoyl-CoA hydratase (forming D-3-hydroxybutyryl-CoA); F, acetoacetyl-CoA reductase (NADH-dependent); G, enoyl-CoA hydratase (forming L-3-hydroxybutyryl-CoA); H, PHB synthase. Thick arrows indicate the pathway of PHB synthesis in *R. eutropha* and thin arrows, the pathways in *R. rubrum* and *R. centenum*.

(EC 1.1.1.36). In the last step, PHB synthase catalyzes the polymerization of D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA to PHB. In *Rhodospirillum rubrum*, PHB is synthesized via a five-step pathway. An NADH-dependent acetoacetyl-CoA reductase (EC 1.1.1.35) catalyzes the formation of L-(+)-3-hydroxybutyryl-CoA, which is subsequently converted to D(-)-3-hydroxybutyryl CoA by two stereospecific enoyl-CoA hydratases prior to polymerization⁷ (Fig.1). *Rhodospirillum centenum* was isolated in 1987, and exhibits a number of general properties typically observed in purple non-sulfur bacteria, but also displays a number of unusual characteristics as follows: (1) absence of any repression by O₂ of photo pigment synthesis; (2) synthesis of "R-bodies"; (3) swarming motility on agar surfaces; and (4) conversion of vibrioid/spiral cells to thick-walled cysts, and accumulation of PHB at cysts, under condition of aerobic growth in darkness on butyrate as a sole carbon source^{8, 9}. Since among numerous PHB-accumulating bacteria, *R. centenum* is unique and limited in terms of the conditions it needs to accumulate PHB, investigation of the regulation of PHB synthesis in *R. centenum* may be important. As a first step in this process, we describe here the cloning and sequencing of the PHB synthase gene from *R. centenum* and its expression in *E. coli*.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids, and culture

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. All *Escherichia coli* strains were grown aerobically in Luria-Bertani (LB) medium or on solid LB agar (1.5%, wt/vol) plates at 37°C, or in M9 medium¹⁰. The following concentrations of antibiotics were used: ampicillin, 50 µg/ml; chloramphenicol, 34 µg/ml; tetracycline, 10 µg/ml. *R. centenum* was cultivated anaerobically under illumination (60-W incandescent bulb) at 30°C in 1927 CENS medium: in 1 liter, 2.2 g sodium pyruvate, 0.9 g K₂HPO₄, 0.6 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 5 mg disodium EDTA, 200 mg MgSO₄·7H₂O, 1 ml True Blue Trace Element solution (containing 2.5 g EDTA, 0.2 g MnCl₂, 0.1 g H₃BO₃, 0.1 g Na₂MoO₄, 50 mg NiCl₂·6H₂O, 20 mg CoCl₂·6H₂O, 10 mg CuCl₂·2H₂O, 5 mg Na₂SeO₃, and 5 mg NaVO₃·nH₂O per 250 ml deionized water), 75 mg CaCl₂·2H₂O, 2 ml chelated iron solution (prepared by dissolving 1 g FeCl₂·4H₂O and 2 g disodium EDTA in 1 liter deionized water, and adding 3 ml concentrated HCl), 20 µg vitamin B₁₂, 15 µg biotin, 0.5 g and Na₂S₂O₃·5H₂O; pH was adjusted to 6.8 with NaOH⁸.

DNA preparation and manipulation

Standard methods were used for the preparation and manipulation of DNA, PCR, Southern hybrid-

Table 1. Strains and plasmids

| Strains | |
|--------------------|--|
| <i>E. coli</i> | |
| JM109 | <i>recA endA gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)/F' [traD36proAB+ lacI lacZJM15]</i> |
| BLR[DE3]/pLysS | <i>F ompT hsdS_r(r_m me_l) gal dcm Δ(sr-recA)306::Tn10(Tc^r)/[DE3]/pLysS{Cm^r}</i> |
| <i>R. centenum</i> | Wild type |
| Plasmids | |
| PUC18, 19 | High copy cloning vector; Amp ^r |
| pSTV29 | Low copy cloning vector; Cm ^r |
| pET23b | Expression vector; Amp ^r |
| pET100 | pET23b carrying XbaI/EcoRI fragment containing <i>R. eutropha phaCAB</i> PHB synthetic operon |
| pSTVreAB | pSTV29 carrying Sse8387-EcoRI fragment containing <i>R. eutropha phaAB</i> |
| pUCreC | pUC19 carrying SmaI-SfiI fragment containing <i>R. eutropha phaC</i> |
| pET100Ce | pET100 carrying about 2-kbp fragment containing <i>R. centenum phaC</i> instead of <i>R. eutropha phaC</i> |
| pRcCP1 | pUC18 carrying about 10-kbp PstI fragment containing <i>R. centenum phaC</i> |
| pRcCP2 | pUC18 carrying about 10-kbp PstI fragment opposite direction containing <i>R. centenum phaC</i> |
| pRcCS1 | pUC18 carrying about 4.5-kbp SmaI fragment opposite direction containing <i>R. centenum phaC</i> |
| pRcCS2 | pUC18 carrying about 4.5-kbp SmaI fragment containing <i>R. centenum phaC</i> |
| pRcCE1 | pUC18 carrying about 3-kbp EcoRI-EcoRV fragment opposite direction containing <i>R. centenum phaC</i> |
| pRcCE2 | pUC18 carrying about 3-kbp EcoRI-EcoRV fragment containing <i>R. centenum phaC</i> |

zation, and colony hybridization. Sequencing was performed with a SEQ-4×4 system and Thermo-sequenase Cy 5.5 (Amersham Biosciences, Tokyo, Japan), and with a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (ABI PRISM 310) as recommended by the manufacturer. Sequences were processed using the program GENETYX- MAC/ATSQ, version 4.2.0 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Design of primers for cloning the PHB synthase gene

The primer of an inner part of the PHB synthase gene as a probe for Southern hybridization and colony hybridization was designed from consensus sequences based on comparisons with PHB synthase genes of purple non-sulfur bacteria, *Rhodospirillum rubrum* (accession number AF178117), and *Rhodobacter sphaeroides* (AY945501), and a root nodule bacterium, *Rhizobium meliloti* (U17227). A 500-bp fragment of the *R. centenum* PHB synthase gene was amplified by PCR with 5'-TGGATCAAY AARTTCT ACATAAT-3' as the forward primer and 5'-TTCCARTAGAGCAGRTC GAAG-3' as the reverse primer using genomic DNA of *R. centenum* as a template. The PCR product was labeled with [³²P]dCTP and used as a probe in Southern hybridization and colony hybridization. *R. centenum* genomic DNA was completely digested with *Pst*I. The resulting fragments were subjected to Southern hybridization.

Other analytical methods

PHB content was quantitated as the amount of crotonic acid by high-pressure liquid chromatography as described by Karr *et al.*¹¹⁾.

Results and Discussion

Cloning of a genomic fragment relevant to the PHB synthase gene

R. centenum genomic DNA was digested completely with *Pst*I. The resulting fragments were separated on a 1% agarose gel and transferred onto a nylon membrane. The DNA fixed on the nylon membrane was hybridized with a ³²P-labeled 500-bp probe prepared from PCR products with genomic DNA as a template (see Materials and Methods). The DNA corresponding to the positive signal, which was about 10-kbp long was extracted from

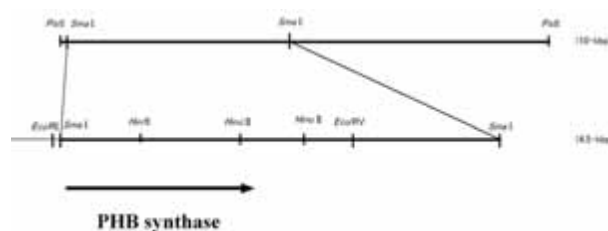


Fig. 2. Restriction map of the cloned fragment containing the PHB synthase gene of *R. centenum*.

the agarose gel, ligated to *Pst*I-digested pUC18, and introduced into *E. coli* JM109 by transformation. Of about 5,000 ampicillin-resistant recombinant colonies, two positive colonies were selected by colony hybridization. Both colonies were found to have about 10 kbp of foreign DNA, but oriented in the opposite direction to each other. One *Sma*I fragment (about 4.5 kbp) was isolated from one of two plasmids and ligated to pUC18 digested with *Sma*I. To confirm that the cloned 10-kbp and 4.5-kbp fragments have the PHB synthase gene, Southern hybridization and PCR were done using the same probe and same primers. Fig. 2 shows a restriction map of the 10-kbp fragment. According to this map, the *Sma*I-*EcoRV* fragment (about 3 kbp) contained the region for the PHB synthase gene, where the nucleotide sequence was analyzed. Within the 3-kbp fragment, one open reading frame (1,792 nucleotides) was found. It specified a protein with a deduced molecular mass of 66,962 Da (597 amino acids). The initiation codon was preceded by a putative Shine-Dalgarno sequence (Fig.3). The PHB synthase in *R. centenum* had about 74 and 64% identity to the PHB synthase in *Azospirillum brasilense* and *Rhodospirillum rubrum* in amino acid sequence, respectively (Fig.4).

Expression in *E. coli* of the PHB synthase gene from *R. centenum*

To confirm the cloning of the fragment having the ability to synthesize PHB, two systems which contain the β -ketothiolase (*phbA*) and acetoacetyl-CoA reductase (*phbB*) genes from *Ralstonia eutropha* H16 were constructed. One system consists of *E. coli* JM109 transformed with pSTVReAB carrying *R. eutropha phaAB* and pRcCP1 or pRcCE2 carrying *R. centenum phaC*. The other system consists of *E. coli* BLR transformed with pET100Ce which contains *R. eutropha phaAB* and

101 GAAAGCGGACCATTTGGGGGTGGTTCGTTTTCGAGCGGCAAGCGTCAAGGAGGATCGAGACATGCGCGAAAAGCGCAAGCGCGGAGTTGAAATTC 200
M A E S O G P E L K I P

201 GGAAGCGGTGACATGTCCCGCCCATGGCGGGATCGCGAGCACAGCGAGCCATCGTCAAGGAGTTTCCTTCGCGTCAAGCGGAGATCTCGCGCTCT 300
D P V E M S R A M A R I A E H S Q R I V T E F L S R H A E I S G S

301 GCGACCGCGTCAACTGGCGCGCGCTTCCGTGAGATGAGCAGCGCGATGATGGCGAAGCGCGCAAGCGTATGACGCGCGAGGTCTCGCTCTGCGAGG 400
A D P L N L G G A F L E M T S R M M A D P A K L M Q A Q V S L W Q D

401 ACTACATGACCGTCTCGCAAGCGCAGCAGCGGTTTCCTGCGCGCGAGCGCGAAGCGGTGATCGCGCGCGCAAGGAGGATCGCGCGTTCAAGGACAG 500
Y M T L W O R T T Q R F L G G E A E P V I Q P A K E D R R F K D S

501 CGCGTGAAGCAGAACAGCGCTGTTGACCTTCATCAAGCAGTCTATCTGCTGACCGCGCGCTTCATGCAAGCGAGCGTTCAGCGCGTGAAGGACTGAC 600
A W N E N T L F D F I K Q S Y L L T A R F M Q A T V H G V E G L D

601 GAGAGGACCGCGGAGGTGGACTTCTACAGCGCGAGTACGTGAGCGCGATGCGCGCGCAGCAACTTCGTGATGACGAAAGCGGAGTCTGCGCGACA 700
D R T A R K L D F Y T R Q Y V D A M A P S N F V M T N P E V L R T T

701 CGGTGAGACCGCGCGGAGAGATCTGTTCAAGCGCGTGGAGAACTGCTCGCGCGACTGAGCGCGCGCAAGCGTCAAGTCTCGCGATCTGACGAGACTA 800
L E T G G E N L V K G L E N L L A D L E R G K G Q L A I S M T D Y

801 TTGCAAGTTGAGGTGCGCGCGAACATCGCGGTGACCGCGCGCAAGCGTCTTTCAGAACGACTGATCGAGCTCATCGAGTACCGCGCGAGCAGCGAA 900
S K F E V G R N I A V T P G K V V F Q N D L M Q L I Q Y A P T T E

901 CAGGTGACCGCGCGCGGTGCTGATGATCGCGCGCTGATCAAGAGTTCTACATGCTGCAACTCGCGCGCGAGAACAGCTTCGTGAAGTGGCTGACCG 1000
Q V H R R P L L I I P P W I N K F Y I L D L R P Q N S F V K W L T D

1001 ACGAGCGCGACAGCGTCTTCATGCTCTCTCGCGTCAATCGCGCGAGCATCTCTCGCAAGACCTTCGAGGACTACATGCTGAGCGCGCGCTGCGCGC 1100
Q G H T V F I V S W V N P G E H L S D K T F E D Y M V E G P L A A

1101 GCTGACCGCATGAGCGCGCGAAGCGCGAGCGTGAAGCGAATGTCATCGCGTACTGCTCGCGCGAGCGCTGCTGCGGAGCAGCGTGTCTCATGATGAC 1200
L D A M E A A T G E R E A N V I **G Y C L G** | G T L L A S T L S Y M T

1201 GCGACCGCGACAGCGGATCAAGCAGCGCATGTAAGCGCGTCAAGCGTCAAGCGTTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1300
A Q G D D R I K S A M Y L V T L T D F S E P G E L S V F I D E E Q L

1301 TGCG 1400
A A L E E R M R S Q G F L D G S A M A T T F N M L R A N D L I W S

1401 GTTGTGTTGAACTACTGCTGCG 1500
F V V N N Y L L G K D P F P F D L L Y W N S D S T R M P A A M H S

1501 TTCTACTGCG 1600
F Y L R N M Y Q R N L L V Q P G G I T L K G V P I D L R R I T V P T

1601 CCTCATCTCTCG 1700
F M L S T R E D H I A P W K S T Y A A T Q L Y G G P V K F V L A A

1701 CTGCG 1800
S G H I A G V V N P P S A E K Y S H Y L N T K L P A S P D S W F E

1801 GCG 1900
G A K Q V P G S W W P E Y G K W V A R Y G G G K V P A R V P G D G R

1901 GCGTGGCG 2000
L P A L E D A P G S Y V R V K S L E *

Fig. 3. Determined nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the R. centenum PHB synthesises gene. Boxed, bold, shaded "GAGG" is a putative Shine Dalgarno sequence, and boxed bold "C" is a putative center of an active site.

| | | | |
|----------------|-----|--|-----|
| R. centenum | 1 | -----MRESQPELKI PDPVENSRAWA--RI AEH+SQRI VT--EPLSRHAEI SQ-SAD----PLNLGG-AFLEMFSRMADPA | 67 |
| A. brasilense | 1 | IMGDI GMDAQFTGRI I DM KI PFQVQDA--AQDAI HEAFI I I--I--DI -VR-VVF--GFFFI SROASDQV-GAKN-PDPVQVGH+AFI FMTTRMADPA | 89 |
| R. eutropna | 1 | -----MATGKAAA-STGEKSCP-FKVTP-GFFDPATWLEWBRQGG-TEGNCHAAASCI PQ-I DALAQKI APA | 66 |
| R. rubrum | 1 | -----MTDTRAFADI TFVWRWAAWQFKS--RTTMA-TAI GGA-APPSSPSPSCPDP-AVGGQPAVGGDAARAFI FGM IRSQ-PV | 75 |
| R. sphaeroides | 1 | -----MATEEGSPGSGDQCFERLNAV--LTRI DELSKRLTAALTKR-KLSDPALHCPSCDWFUKAMTAYMAEMKQNP----A | 71 |
| | | | |
| R. centenum | 68 | K-I MQAQVSI WD-DYM-TL WQRTTQR-FI GCFAPFM QPAKEDIRFKDSAVNENI FDFI KGSYI I TAFRMDATVHGVFI DDR-TARKI DFYTRYVDA | 167 |
| A. brasilense | 90 | K-I MKAQMI WD-DYI -TL WQRTTQR-FFGQDACPFI APAKDDIRFKDSAVNENI FDFI KGSYI I SARVMQSTVNFVQI DDH-TAKKVDYTRYVDA | 184 |
| R. eutropna | 67 | Q-LGDI QQRVYK-DFSA-LWQAVAEQ-KA-EATQPLH-----DFFRAGDAVRTNLPYFAAFYLLNAPALTELDADAVEADAKT-RGRI R-FAI SQWVA | 154 |
| R. rubrum | 76 | --LD-AQAA-WA-FDI AALQAAAKR-LRCEEAAPFI EPACDDNRFKDDAATKQPLFDTLKGGYLLTARL VATTLENSGGDPAQ-RG-RLAFYCRQWVA | 167 |
| R. sphaeroides | 72 | KII FH-QI SFWGKSI KHYVF-AHQI VKG-FI KPRFQVTKQR-RFSNPI WQHPFFNMI KQGM INAFAMQAVFAI FHI FSPDKKRVYFESQI -VQI | 166 |
| * * * * * | | | |
| R. centenum | 163 | MAPSNFVMTNPEVL-RITILETQGENLVKQLENLADLERKQGLAI SMDYSKFEVGRNI AVTPGKVVFGDLMQI QYPTTTEQVHFRPLLI I PPW NK | 261 |
| A. brasilense | 185 | MAPSNFVMTNPEVL-RITILETQGENLVKQLEHLKDLERKQGLRI SMDYDAFGVGRNI AVTPGKVVFGDLMQI QYPTTTEVVKQPLM VPPW NK | 283 |
| R. eutropna | 155 | MSRANFI ATNPEAQ-RII I FSCQFSI RAQVPMNMFDI TRG-KI SQI--DFSAFFVGRVAVTEGAVVFNVEYQI I QKRI TDVYHARRI I MPRQI NK | 249 |
| R. rubrum | 168 | IAPINFAATNPI VR-RTAI FSCQKSI I NQI EN I IRI FQGGRI RPTMSDFATFFVGRNI AMTPGKVVFNQAI MQI I I YAPITPKVHKRI I VPPW NK | 266 |
| R. sphaeroides | 167 | FSPITNFFGTNDALERAL ATDG-ESLVQGENLVQDI EANNQDLLVTLADPEAFQVGNLATTGSSVYVNRVFEI QYPTTETVHETPLLI FPPW NK | 265 |
| * * * * * | | | |
| R. centenum | 262 | FYI I DI RQNSFVKWITDQGHVFI VSWNPGEH SOKTFEYDMQFI AAI DAVEAATCEFEANM G C GGTLI ASTI SYMAGGDDRI KSAMV VTI | 361 |
| A. brasilense | 284 | YI I DI REKNSFI KWAVDGHVSMFI SWNPGFKI ASKGFEDYMFEGM AAI DAI FKVTGEKDMVAI G C GGTLI ASTI SYMAAKKDDRI KSATIFFTIM | 383 |
| R. eutropna | 250 | YI LDLPQESSLVHVMQGHVFI VSWRNPQASVAGSTWQYI EHAAL RAI EVARDI SQGDKI NMLQI C VGGTI VSTALAVLAARGEHPAASVTLTLTL | 349 |
| R. rubrum | 267 | FYI LDLTEKNSLI KYWVQGF SVPFI SWNPDQAGLAETFEQYLSQGLAAMEVMEI TQGPALGLVQI C GGTLTACTLAVLAARFDHFMK SATLTLTL | 386 |
| R. sphaeroides | 266 | FYI LDLPQNSLLKVLVQGFVFWVSWNPKSYAGI GNDYI REGYRAMEVFSI TRQKQI NAVG C AGTTLTLTLAHLKAGCQPSVMSATIFFTTL | 365 |
| * * * * * | | | |
| R. centenum | 362 | TDFSEPGELSVFI DEEQLAALER-MRSQG-F----L-DGSAMAT-TFNM RANDI I V6-FVWNNI I GQFFPFDI I YWNSDSTRMPPAAM-SFYI RMY | 452 |
| A. brasilense | 384 | I DTFEAGFI SVFI DFFQI TM FSQ-MAGQG-Y----I -DQSKMAT-TFNM RANDI I V6-FVWNNI I GQFFPFDI I YWNSDSTRMPPAAM-SFYI RMY | 474 |
| R. eutropna | 350 | LDFADTQI LDVYDEGHVQ-LREATLQG-CAGAPCALRQ-LELANTFSELPNDLVWNYVD-NYLGKNTPAFFDILLFVNDATLIPQWYOWLURHY | 445 |
| R. rubrum | 367 | VDFSEPGEL GVF DPLI DALDDQ-MARDG-G----I -DQDI I SVAFNMI RENDI I V6VFI INWII GKTPAAFDI I YWNSDSTRMPPAAMQRYI RMY | 457 |
| R. sphaeroides | 366 | TDFSPQCEVQVFNDDFVQI ERQVAVD---CI --LDKTFMSR--TFSYLRSDLI YQPAI KS-YMCEAPPDFDILLYWNGDGNLPAQWAVEYLRQIC | 456 |
| * * * * * | | | |
| R. centenum | 453 | QRNI I VQPGI TL KQVPI DI RRI TVPTFM STRFDH APWKSTYAAQI YQCPVK-FM AASGH AGVNPFSAFKYSHYI NIKI PASPQVNFQAKQW | 551 |
| A. brasilense | 475 | QKLLACPGAVTLQGVFI DLKVKVTPSPFLSARECHI APWKSTYMGHLFSCPVK-FVLAASGH AGVNPFAAGKYCYWNAKLPKASDDVALASSEQTP | 573 |
| R. eutropna | 446 | I QNEL KVPGI TVQGMVDI ASI DMPTYI YQSRFDH VFWTAAAYASTAI I ANKI R-FM GASGH AGM NPPAKVRSWINDAI PESQQNI AGAI EHI | 544 |
| R. rubrum | 458 | QKNLVQPGI TVLGHLDLRI RTPYLLSARDHI APWSTFKATGLYQPLR-FVLAGSGH AGM NPPAKARYQWINDATISLEAESVLEGATPHG | 556 |
| R. sphaeroides | 457 | QQDFI AGGT-FPMI GSPVGI KQVMI PVQAI ACFTDH APWSSFNQCFQCFSTDKTEI I SQSGHWAGI VNPSSRNKYGHYTNFQAGTFFSFRFGAFF-H | 554 |
| * * * * * | | | |
| R. centenum | 552 | -GSWPEYQKWARVYGGKVPARMPEDGR-LPALEDAPGQSY- RAKSILE | 597 |
| A. brasilense | 574 | -GSWPEYVNWVSTFSEGVPARNPEKCG-LPMLEDAPGQSY-AKAVI V- | 618 |
| R. eutropna | 545 | -GSWPDQITAVI AGGAGKRAAPANYQVARYRAI FPARPGRV-KAKA-- | 589 |
| R. rubrum | 557 | -GSWPDMAVAAGVAGPKVAARQPTKCP-FRPI FQAPGQSY-KVRI -- | 600 |
| R. sphaeroides | 555 | AGSNVPRNGAVLAERSGKQVPARQPCDSKHPFL-APAPGQSYVAAVGGA---- | 601 |
| * * * * * | | | |

Fig. 4. Comparison of the amino acid sequence es *R. centenum* PHB synthase and other bacterial PHB synthases. Bold face "C" is a putative center of an active site and well conserved.

R. centenum phaC. A system with the same vectors but carrying *R. eutropha phaC* instead of *R. centenum phaC* was used as a positive control, and JM109 harboring pSTVReAB and pUC18 was examined as a negative control. Fig. 5 shows that the cloned fragment containing the *R. centenum* PHB synthase gene synthesized PHB in *E. coli* on LB medium and M9 medium, but at only about 10% of the level produced by *R. eutropha phaC*. The reason why *R. centenum phaC* produces only a small amount of PHB in *E. coli* is not clear.

As it was only when *R. centenum* was cultivated under cyst-forming conditions with butyrate that PHB was produced, it is presumed that the

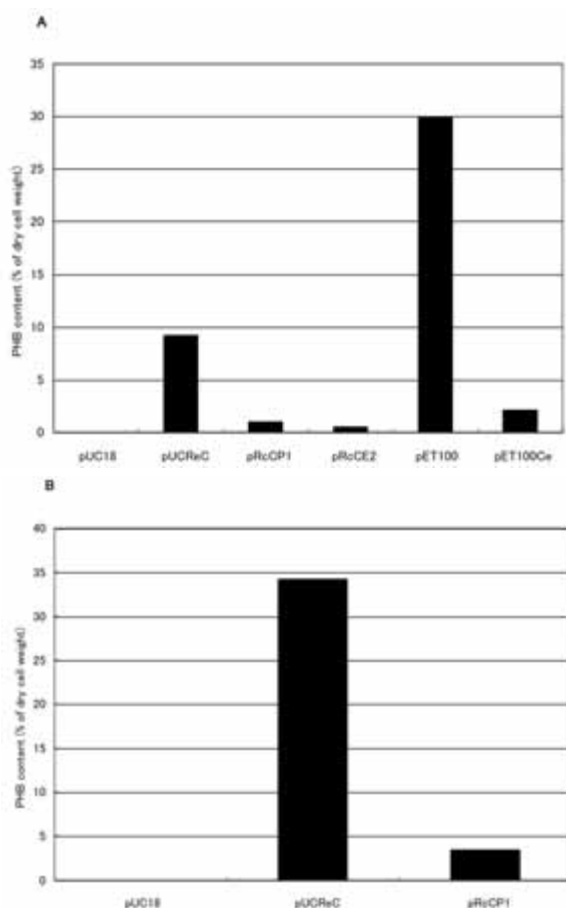


FIG. 5. Comparison of PHB accumulation in *E. coli* harboring various vectors. A) *E. coli* JM109 or BLR cultivated in LB medium with 2% glucose at 37 °C for 39 hours. PHB content was measured with a HPLC-based method. pUC18, pUCReC, pRcCP1, pRcCE2, *E. coli* JM109 harboring pSTVReAB with each vector, respectively; pET100, pET100Ce, *E. coli* BLR harboring each vector. B) *E. coli* JM109 cultivated in M9 medium with 1% glucose at 37°C for 39 hours. PHB content was measured by HPLC. pUC18, pUCReC, pRcCP1, *E. coli* JM109 harboring pSTVReAB with each vector.

synthesis of PHB is strictly controlled in *R. centenum*. *Azotobacter vinelandii*, a soil bacterium, which undergoes a process of cellular differentiation to form metabolically dormant cysts resistant to desiccation, produces the exopolysaccharide alginate, which is essential for the encystment process. Transcription of the *algD* gene, which codes for GDP-mannose dehydrogenase, a key enzyme in the alginate biosynthetic pathway, is initiated at two promoters, one of which, p2, has the sigmaE consensus sequence. An AlgU, *A. vinelandii* sigmaE factor, mutant was impaired in alginate production, encystment, and transcription of the *algD* gene^{12,13}. *R. centenum* PHB synthase may be controlled by a similar system. The control region upstream of the PHB synthase gene of *R. centenum* should be examined.

References

- 1) Anderson AJ and Daws EA (1990) Occurrence metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**: 450-472.
- 2) Merrick JM (2002) Microbial waterinsoluble aliphatic polyesters (PHA). In: *Biopolymers-Polyesters I, vol. 3*. Doi Y and Steinbüchel A, eds., Wiley-vch. pp.105-118.
- 3) Marchessault RH and Yu G (2002) Crystallization and material properties of polyhydroxyalkanoates. In: *Biopolymers-Polyesters II, vol. 3*. Doi Y and Steinbüchel A, eds., Wiley-vch. pp.157-202.
- 4) Schubert P, Steinbüchel A, and Schlegel HG (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
- 5) Bernd HAR and Steinbüchel A (2002) Microbial water-insoluble aliphatic polyesters (PHA). In: *Biopolymers-Polyesters I, vol. 3*. Doi Y and Steinbüchel A, eds., Wiley-vch. pp.173-215.
- 6) Nishimura T, Saito T, and Tomita K (1978) Purification and properties of β -ketothiolase from *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol.* **116**: 21-27.
- 7) Moskowitz GJ and Merrick JM (1969) Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)- β -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* **8**: 2748-2755.
- 8) Favinger J, Stadtwald R and Gest H (1989) *Rhodospirillum centenum*, sp. Nov., a thermotolerant cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* **55**: 291-296.
- 9) Nickens D, Fry CJ, Ragatz L, Bauer CE and Gest H (1996) Biotype of the purple nonsulfur photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum centenum*. *Arch. Microbiol.* **165**: 91-96.
- 10) Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular

cloning 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N. Y.

- 11) Karr D, Waters JK and Emerich DW (1983) Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1339-1344.
- 12) Moreno S, Najera R, Guzman J, Soberon-Chavez G and Espin G. (1998) Role of alternative sigma factor algU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **180**: 2766-2769.
- 13) Nunez C, Moreno S, Soberon-Chavez G, and Espin G. (1999) The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J. Bacteriol.* **181**: 141-148.

■原 著■

軟体動物タツナミガイ体壁縦走筋ダイアド接合部の構造解析

木南雅暁¹ 鈴木季直^{1,2}

Structural Analysis of Dyadic Contacts in the Longitudinal Body Wall Muscle of a Mollusc *Dolabella auricularia*

Masaaki Kinami¹ and Suechika Suzuki^{1,2}

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

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

Abstract: The ultrastructure of dyads in the longitudinal body wall muscle (LBWM) of a mollusc *Dolabella auricularia* was studied to elucidate electro-mechano coupling in the dyadic contacts of somatic smooth muscles, and to make clear the morphological homology with the triadic contacts of skeletal muscles. In LBWM fibers, the sarcoplasmic reticulum (SR) in vesicular forms was mostly located underneath the plasma membrane, and constructed dyads, not only along the fiber surface but also around the tubular invaginations (Sugi and Suzuki, 1978)¹⁾ which resemble the transverse tubule of skeletal muscles in shape. In the junctional gap of dyads, electron-dense foot-like structures were arrayed at regular intervals. In dyads found along the fiber surface, the diameter of the foot-like structures was 18.3 nm, the center-to-center distance was 30.5 nm, and the junctional gap was 9.7 nm. While, in triads found around the tubular invaginations, those dimensions were 18.6 nm, 30.4 nm and 9.6 nm, respectively. No significant difference was found between the respective dimensions of the two types of dyads, indicating that they are fundamentally the same in construction. On the other hand, the measured dimensions of dyadic contacts coincided well with those of the triadic contacts of skeletal muscles. Furthermore, as found in skeletal muscle triads, a two-dimensional orthogonal array of foot-like structures on the SR junctional membrane was also confirmed by observing serial sections 35 nm thick. These results indicate that the foot-like structures are truly feet, and the dyadic contacts of LBWM fibers are homologous in structure and possibly in function with the triadic contacts of skeletal muscles. This view was further supported by these experiments, proving the existence of calsequestrin in SR demonstrated by immunoelectron microscopy and the high quantity (3.02%) of fractional SR volume per fiber volume measured by the montage method.

Keywords: longitudinal body wall muscle (LBWM) of *Dolabella auricularia*, structural analysis of dyadic contacts, foot, calsequestrin, fractional SR volume

序論

骨格筋では、運動神経の興奮が神経接合部で伝達物質のアセチルコリンを介して筋線維に伝達されると、筋線維形質膜が活動電位を発生し、その活動電位は筋線維表面を伝播し、筋線維形質膜の陥入構造である横行小管(transverse tubule、T管)を経て筋線維中心部に伝わり、Ca²⁺貯蔵構造である筋小包体

(sarcoplasmic reticulum、SR)から Ca²⁺が放出され、収縮が引き起こされると考えられている²⁾。この興奮収縮連関(excitation contraction coupling、EC連関)の諸過程のうち、T管とSR終末槽で構成されるtriad(三つ組)におけるT管膜とSR膜間の興奮伝達はelectro-mechanical coupling(EM連関)説によ

り説明されている^{3, 4)}。EM 連関では、T 管膜に局在する L 型 Ca^{2+} チャネルであるジヒドロピリジン受容体 (DHPR) が膜電位変化にともない分子構造変化を起こし^{5, 6)}、SR の T 管に面した膜に局在する Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR) に接触してチャネルを開かせ、筋線維内に Ca^{2+} を遊離する⁷⁾と考えられている。RyR は、従来の電顕観察により T 管膜と SR 膜の接合部間隙で見出された foot⁸⁾と同一のものであることが明らかにされている^{9, 10)}。EM 連関説は、triad における T 管膜内の DHPR と T 管に面した SR 膜内の RyR (= foot) が物理的に接触できることが前提になっており、種々の骨格筋で triad の T 管-SR 接合部における両受容体の膜内分布が研究され、それぞれの膜内における二次元配列や T 管膜-SR 膜間の対向配列の様式が明らかにされている^{6, 11, 12)}。

一方、平滑筋では、筋収縮を引き起こす Ca^{2+} 、いわゆる活性化 Ca^{2+} は SR のみに由来せず、筋形質膜内表面からの遊離や外液からの流入によっても供給されるため^{13, 14)}、その EC 連関の諸過程についてはまだ不明な点が多い。骨格筋とは異なり、T 管構造を持たない平滑筋では、SR は、形質膜直下に小胞として広く分布し、形質膜と dyad (二つ組) を形成している。多くの平滑筋で、形質膜とそれに対向する SR 膜とで構築される接合部間隙に骨格筋の foot に良く似た粒状構造が観察されており、その微細構造学的類似性から、平滑筋でも、この部分で EM 連関機構が機能している可能性が示唆されている^{1, 14)}。1978 年に Suzuki and Sugi は、軟体動物タツナミガイ *Dolabella auricularia* の体壁縦走筋 (LBWM: longitudinal body wall muscle) の収縮調節機構について生理学及びピロアンチモン酸法を用いた細胞化学的実験を行い、この平滑筋では、筋形質膜内表面および SR が活性化 Ca^{2+} の貯蔵構造として機能していることを示した¹³⁾。彼らは、また、この筋が、形質膜直下に平滑筋としては良く発達した多くの SR を含み、T 管に良く似た形質膜の管状陥入構造に SR が近接して triad や dyad 様の構造を形成し、それらの接合部間隙には foot に良く似た粒状構造が局在することも報告している¹⁾。類似の構造は、タツナミガイに近縁のアメフラシの体壁筋でも観察されている¹⁵⁾。これらの構造上の特徴は、この体壁縦走筋が、平滑筋における EC 連関、さらには EM 連関の研究に極めて適した素材であることを示している。本研究では、平滑筋 dyad と骨格筋 triad の形態学的類似性を明確にするために、タツナミガイ体壁縦走筋を用いて dyad の微細構造観察を行い、連続切片観察法により接合部膜面での foot 様構造の二

次元配列について検討した。また、この筋の活性化に対する SR の寄与を明確にするために、筋線維内に占める SR の容積を測定し、免疫電顕法により SR 内 Ca^{2+} -結合タンパク質の同定を試みた。

材料と方法

筋線維標本作製と微細構造観察法

神奈川県三浦郡葉山町の柴崎海岸で採集し、26°C の循環海水で飼育したタツナミガイ *Dolabella auricularia* を背側正中線で切開し、内臓を全て摘出した後、頭部から体壁に沿って走行する体壁縦走筋 (LBWM) から直径約 1 mm の筋線維束を単離した。

単離した LBWM 筋線維束を pH7.2 の 0.1M カコジル酸緩衝液で希釈した 6% のグルタルアルデヒド (GA) 液および 2% の四酸化オスmium (OsO₄) で固定した。エタノール系列およびプロピレンオキサライド (PO) で脱水した後、Epoxy 樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut-N) を用い、樹脂ブロックから、通常の微細構造観察用の厚さ 70 nm の超薄切片と、foot 様構造二次元配列観察用の厚さ 35 nm の連続超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX) で観察した。

電子顕微鏡で撮影したフィルム画像はスキャナーでデジタル画像に変換した。モニタージュ法¹⁶⁻¹⁸⁾による筋線維内 SR 容積の測定にはデジタル画像解析ソフトの NIH Image を用いた。また、連続切片像をもとに三次元画像構築ソフトの VG Studio MAX (Volume Graphics 社) で LBWM の dyad 領域を三次元再構成し、dyad 接合部膜面での foot 様構造の二次元配列について解析した。

免疫電子顕微鏡法

Ca^{2+} -結合蛋白質を同定するために、LBWM の筋線維束を pH 7.2 の 0.1 M 燐酸緩衝液で希釈した 4% のパラホルムアルデヒド (PF) 液で固定、エタノール系列で脱水し、Lowicryl K4M 樹脂に包埋した後、-20°C で 3 日間、室温で 24 時間紫外線を照射して樹脂を重合させた。ウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut-N) で厚さ約 70 nm の超薄切片を作製し、Ni-150 メッシュに載物し、切片の免疫染色を行なった。0.02 M グリシン液で 30 分間処理して試料中のアルデヒド基を中和し、燐酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、1% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で 30 分間処理して非特異的反応を軽減させ、20 μg/ml 抗カルシクエストリン抗体 (rabbit anti goat IgG, Upstate Biotechnology Inc.) で 1 時間免疫染色した。0.05% Tween20 と PBS で洗浄した後、直

径 10 nm の金粒子を標識した IgG 抗体 (goat anti rabbit IgG, Amersham) で 30 分間処理し、0.05% Tween20 と PBS で洗浄した。PBS で希釈した 2.5% の GA 液で 10 分間処理して抗原抗体反応を補強した後 PBS で洗浄し、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色して透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX) で観察した。

結果

LBWM 筋線維の微細構造観察

図 1 は LBWM 筋線維の横断切片像を示している。筋線維は、既に報告されているように¹⁾、一般の平滑筋より太く直径 10~20 μm であり、筋形質中央部には核と多数のミトコンドリアが局在する領域があり、それ以外の筋形質の殆どは太いフィラメントと細いフィラメントで占められていた。形質膜は多数の小陥凹を形成しており(図 2A)、様々な大きさの小胞状 SR が形質膜直下に局在していた(図 2, 矢印)。また、形質膜は随所で筋形質内に陥入して骨格筋の T 管に似た構造を形成していた(図 2C)。この T 管様

構造の形質膜直下にも SR が局在しており、これらの SR は形質膜に面した膜が形質膜と接合部を形成して dyad を構成し、その接合部間隙では、しばしば規則的間隔で並んだ foot 様構造が観察された(図 2B-D)。T 管様構造は、隣接する細胞との細胞間隙が広い場合に見られ、細胞間隙が狭い領域では観察されなかった。形質膜と dyad を構成している SR の内腔には高電子密度の粒子が多数観察された(図 2D)。それらの粒子は、内腔中央部や包膜内表面付近で密に集合していたが、dyad 接合部膜の内表面付近には観察されなかった。これらの結果は、これまでの報告¹⁾と良く一致していた。

免疫電子顕微鏡法による Ca^{2+} -結合蛋白質の検出

抗カルシクエストリン抗体で免疫染色した切片では、抗原局在の指標となる二次抗体の金粒子は、SR 以外の細胞小器官や形質膜には観察されず、SR 内腔内の中央部や包膜内表面付近で、通常固定切片像の SR 内に観察された高電子密度の粒子上に局在していた(図 3)。免疫染色の非特異的反応の有無を検証

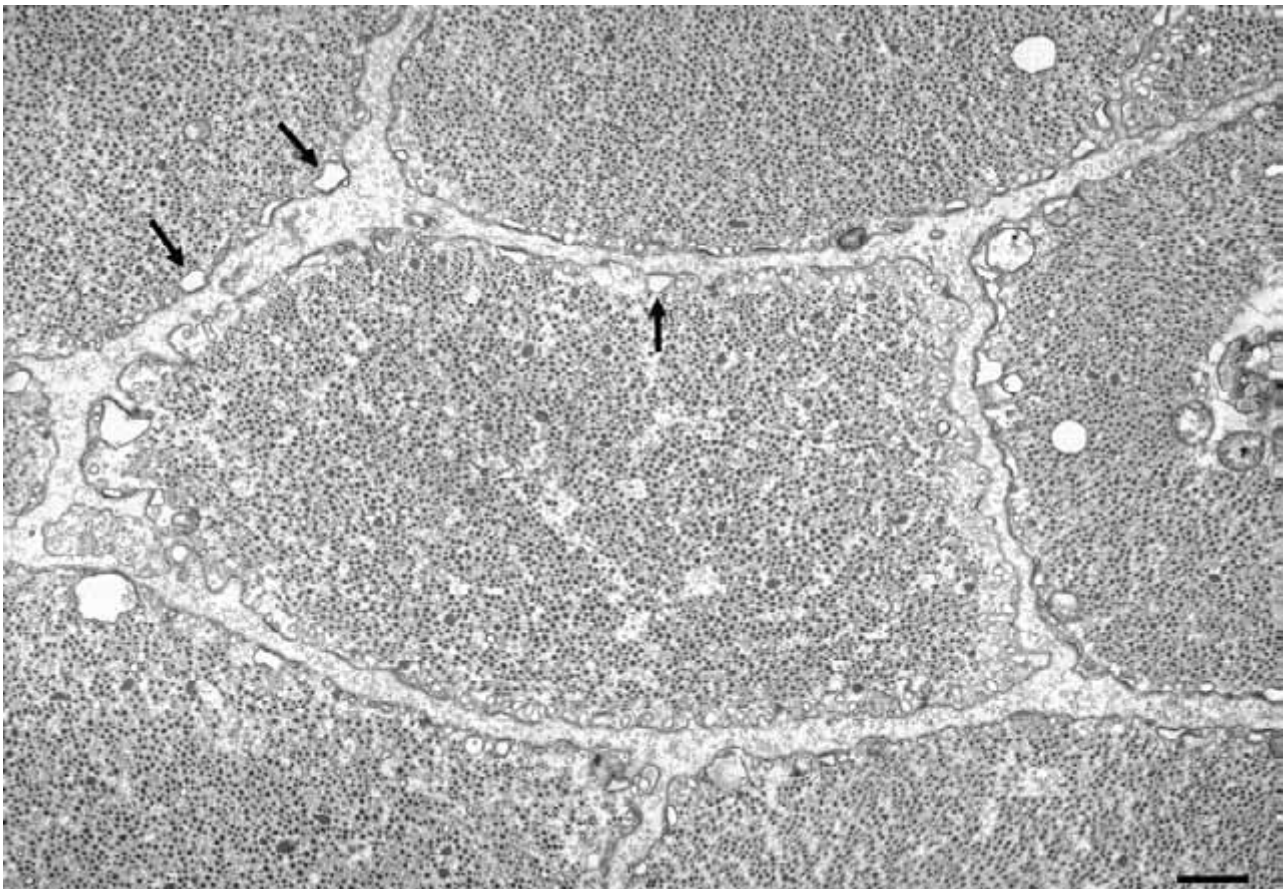


図 1. LBWM 筋線維の横断切片像。形質膜直下には、形質膜と dyad を構成する SR が多数見られる(矢印)、スケール: 1 μm 。

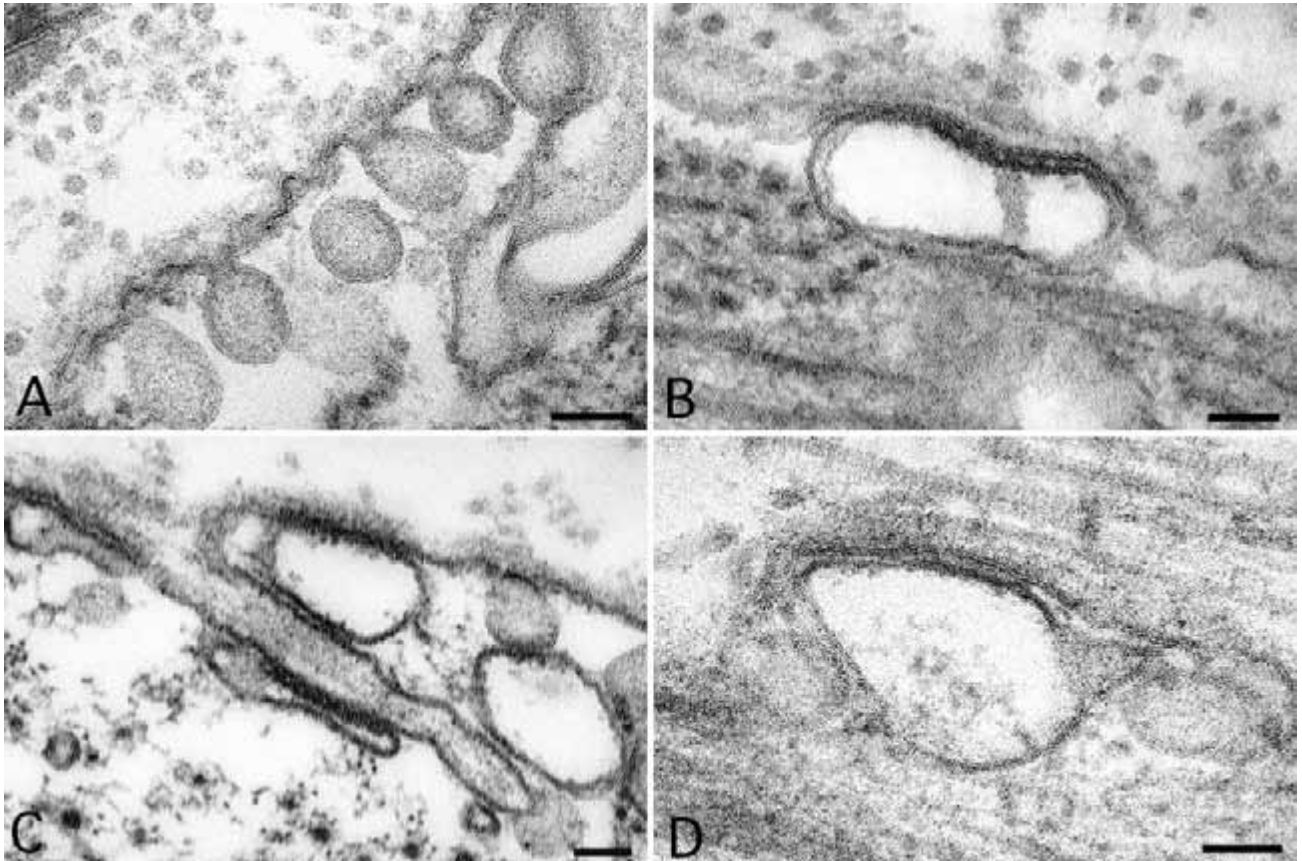


図2. LBWM筋線維の形質膜周辺の拡大像. A. 小陥凹. B. 筋線維表面形質膜と dyad を形成する SR, 接合部間隙には foot 様構造が観察される. C. T管様構造およびその形質膜と dyad を形成する SR 接合部間隙には foot 用構造が観察される. D. 内腔内に高電子密度の粒子を含む SR. スケール: 100 nm.



図3. 抗カルシクエストリン抗体で免疫染色した LBWM 筋線維の縦断切片像. 金粒子は SR 内腔や包膜上に見られる. スケール: 200 nm.

表 1. LBWM 筋線維 dyad 各部のサイズ

| Dyad 各部 | SR と筋線維表面形質膜 からなる dyad (nm) | SR と T 管様構造形質膜 からなる dyad (nm) | 有意水準 |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------|-------|
| Foot 様構造の幅 | 18.3 ± 1.5 (n=229) | 18.6 ± 1.8 (n=110) | >0.05 |
| Foot 様構造中心間距離 | 30.5 ± 2.5 (n=175) | 30.4 ± 3.2 (n= 83) | >0.05 |
| 形質膜と SR 膜間距離 | 9.7 ± 0.9 (n=183) | 9.6 ± 0.8 (n= 81) | >0.05 |

値は平均値±標準偏差(n=12)

するために染色過程で一次抗体である抗カルシクエストリン抗体を用いずに二次標識抗体のみを反応させた切片では、金粒子は一切観察されなかった。

Dyad 構築要素の構造解析

LBWM 筋線維に見られる dyad と骨格筋の triad との構造上の類似性を検討するために、その構築要素となる foot 様構造の幅と中心間距離、および形質膜と SR 膜間の接合部間隙距離を測定した。表 1 はその結果を纏めたものである。SR と筋線維表面形質膜からなる dyad では、foot 様構造の幅は 18.3 nm、

中心間距離は 30.5 nm、接合部間隙は 9.7 nm であった。一方、SR と T 管様構造形質膜からなる dyad では、foot 様構造の幅は 18.6 nm、中心間距離は 30.4 nm、接合部間隙は 9.6 nm であった。SR が筋線維表面形質膜および T 管様構造形質膜とで形成する dyad の各部の測定値のうち、同一測定部の測定値間で t 検定を行ったところ、いずれの場合でも、両者に有意の差はなかった。

Dyad 接合部における foot 様構造の膜面上二次元配列を明らかにするために、連続超薄切片観察を行った。図 4 は、SR と筋線維表面形質膜とで構成

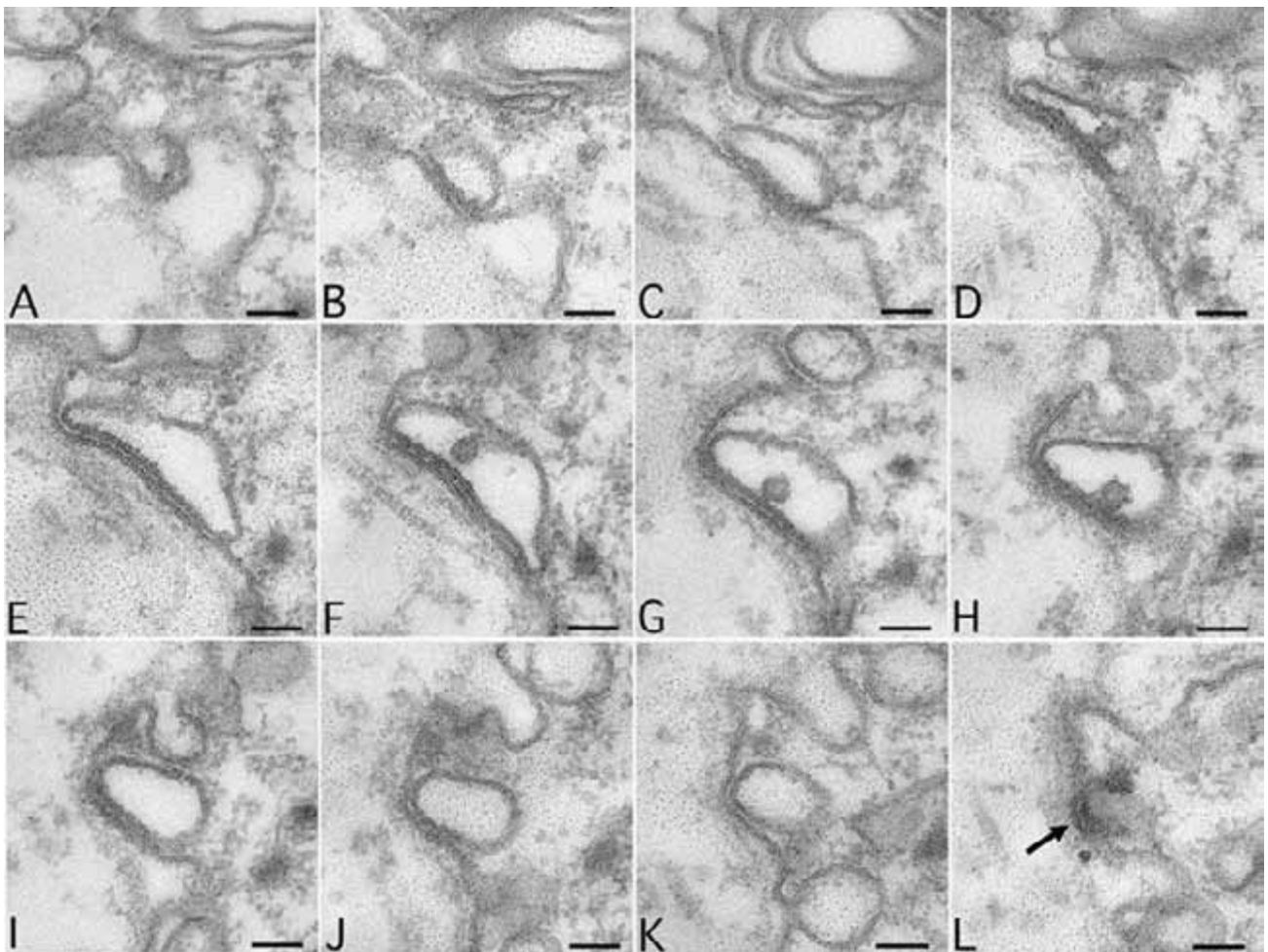


図 4. SR と筋線維表面形質膜とで構成される dyad 領域の連続切片像。A から L は薄切順を示す。L では dyad 接合部(矢印)でのみ SR 膜の断面が見られる。D から F では接合部間隙に foot 様構造が観察される。スケール: 100 nm。

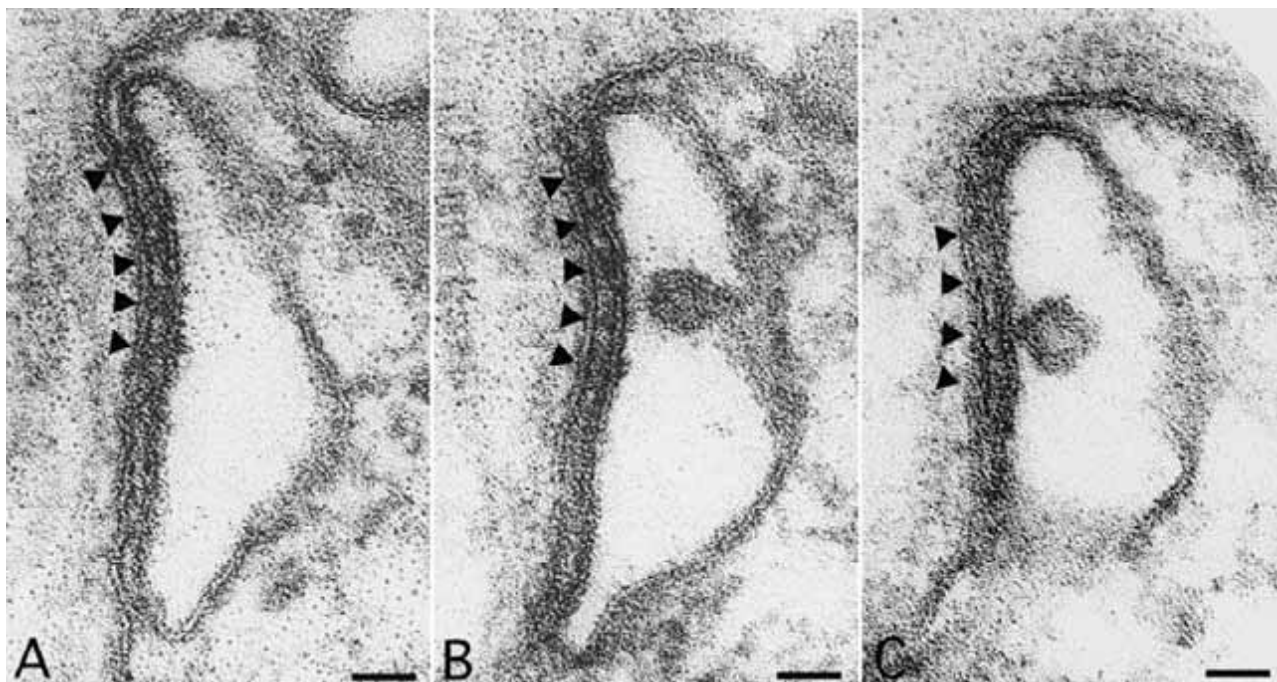


図 5. Foot 様構造(图中矢頭)が明瞭な図 4E(A), 図 4F(B), 図 4G(C)の dyad 拡大像. スケール: 50 nm.

される dyad の連続切片像である。A から L は切片が薄切された順を示し、順が進むにつれて片面凸のレンズ状 SR の切片像は徐々に大きくなり、F で最大となり、以後徐々に小さくなった。順最後の切片 L では、SR 包膜は切断像ではなく、電子密度の高い平面として観察された。また、E と F の切片では典型的な dyad の切片像が観察され、この SR の最大長径は約 370 nm であった。D、F、G、H の切片では SR の内腔に高電子密度の顆粒が観察され、その最大直径は約 58 nm であった。連続切片のうち、E、F、G の切片で明瞭な Foot 様構造が観察された(図 5)。Foot 様構造は、必ずしも接合面全体に分布していなかったが、局在領域では連続的に等間隔で並んでおり、切片 E と F で 5 個、切片 G で 4 個が確認された。

同様の結果は、SR と T 管様構造形質膜とで構成される dyad の連続切片観察によっても得られた。その一例を示す図 6 では、SR は T 管様構造の陥入先端部を包み込むようにして dyad を形成していた。薄切順 A から L の切片像のうち、C から J で dyad を構成する SR が観察され、さらに、D から I で接合部が確認された。SR 切片像は、G で最大になり、それ以降は徐々に小さくなった。F～I の切片は、典型的な dyad 像を示し、接合部では 6 個の foot 様構造が観察された(図 7)。T 管様構造とその筋線維表面からの陥入部は、図 6 の A から I の切片で連続的に観察された。T 管様構造の内径は約 70 nm で、その

形質膜上にも内径約 90 nm の多数の小陥凹が観察され、図 6 では、T 管様構造の筋線維表面からの深さは H の切片で最も大きく、約 1.1 μm であった。

図 8 は、三次元画像構築ソフトの VG Studio MAX により、図 4 の連続切片像を薄切順に重ねあわせて再構成した三次元画像と、その三次元再構成画像を、dyad 接合部付近で接合面と平行に再切断した切断面の像を示している。立体像上面は連続切片の最初の切片像(図 4A)と一致する。Foot 様構造が顕著に見られた図 4E～G の接合部膜面が観察できるように、立体像を切断し(図 4B)、回転させ(図 4C)、SR の接合部膜面を正面から透視した(図 4D)。三次元再構成では、切片の厚さが立体像の高さの情報として使われ、切片像の濃淡は単純にそのまま高さ(深さ)方向に反映される。従って、切片像で粒子やフィラメント等の電子密度が高い部位は立体像側面でも電子密度が高く表示される。連続切片像で電子密度の高い foot 様構造は、図 8D の切断面では必然的に濃い部分として示される。その結果、foot 様構造を示すと考えられる高濃度スポット(图中、○で標識)は、断面上で水平方向に 3 列観察され、連続切片 5 枚目(図 4E)に相当する水平位で 4 個、6 枚目(図 4F)に相当する水平位で 3 個、7 枚目(図 4G)に相当する水平位で 2 個観察された。連続切片像で観察された foot 様構造の数より少なかったが、3 列のスポットは、垂直方向ではおよそ同じ位置となるよう直線的に配列していた。

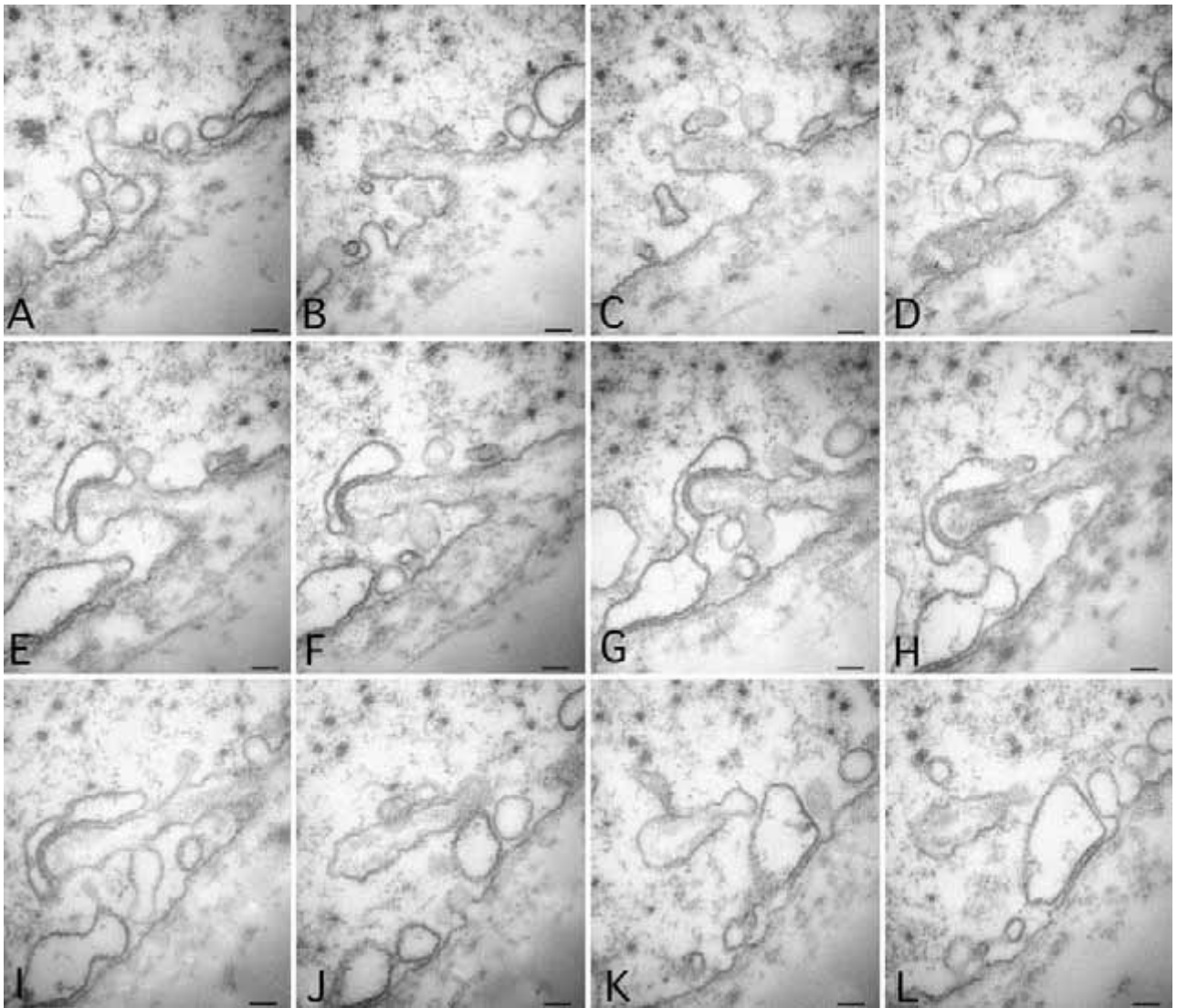


図 6. SR と T 管様構造形質膜とで構成される dyad の連続切片像. A から L は薄切順を示す. T 管様構造は小陥凹が連なって形成されているように見え(A, C), SR 膜と形質膜間の接合部間隙には foot 様構造が観察される(F-I). スケール: 100 nm.

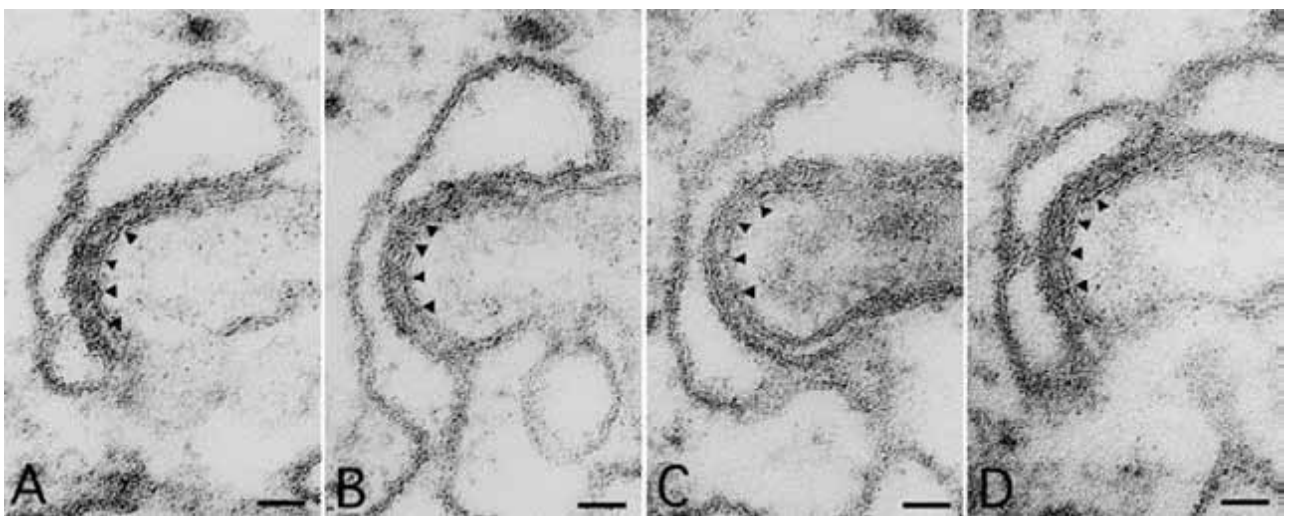


図 7. Foot 様構造(図中矢頭)が明瞭な図 6F(A), 図 6G(B), 図 6H(C), 図 6I(D)の dyad 拡大像. スケール: 50 nm.

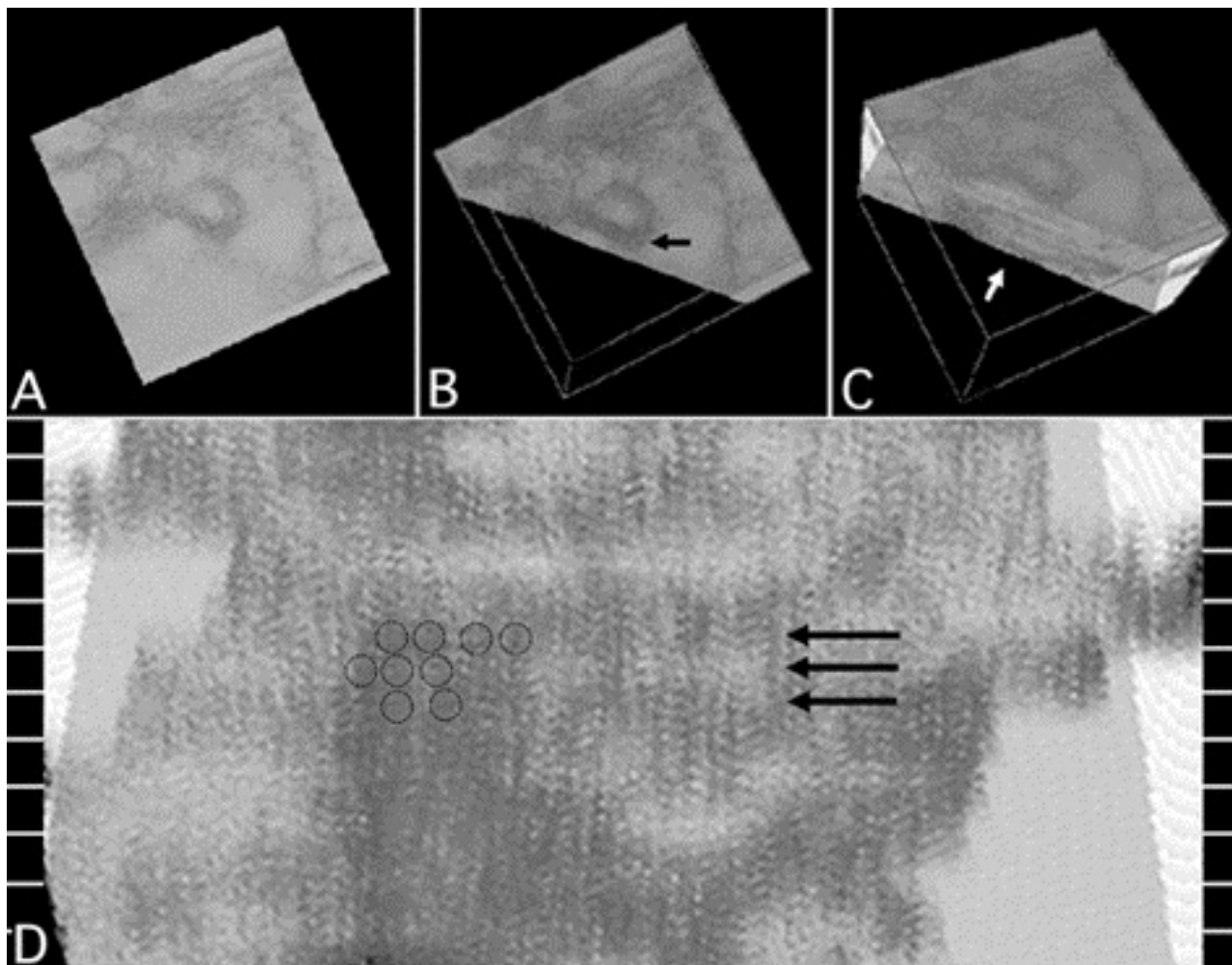


図8. 連続切片像(図4)を三次元再構成した立体像とその切断面の透視像. 電顕像を切片順に重ね(A), 接合部(B, 矢印)面に平行に切断し, 切断面(C, 矢印)が見られるように三次元的に回転し, 切断面を正面から透視(D). 切断面写真上の標識(○)は foot 様構造の局在を反映する高濃度スポットの位置. 矢印は, foot 様構造が明瞭に観察された図4の切片 E, F, G の位置. 縦軸目盛は切片の厚さ 35 nm の間隔を示す.

討論

LBWM 筋線維の dyad と foot 様構造

LBWM の筋線維で観察された dyad の接合部間隙は, SR と筋線維表面形質膜からなる dyad では 9.7 nm で, SR と T 管様構造形質膜からなる dyad では 9.6 nm であった. 一方, 骨格筋の triad や心筋の dyad の接合部間隙は, 約 10.0 nm であることが知られており¹⁹⁾, 今回測定された結果はこれとほぼ一致する. また, LBWM の dyad の接合部間隙で見られた foot 様構造については, SR と筋線維表面形質膜からなる dyad では, foot 様構造の幅が 18.3 nm、その中心間距離は 30.5 nm であり, SR と T 管様構造形質膜からなる dyad では, foot 様構造の幅が 18.6 nm、その中心間距離は 30.4 nm であった. t 検定の結果では, 二種の dyad でこれらの値に有意の差はなかったため, 両 dyad は構造的に全く同一のものと考えられる. 骨格筋 triad の foot、すなわち, RyR は, SR 膜から接合部間隙に突出した膜外部と, SR 膜内

の Ca^{2+} 放出チャネル構造を持つ膜貫通部とからなり, 膜外部の膜面に平行な平面像は各辺の中央がややへこんだ, 一辺約 30 nm のほぼ正方形を示し, 側面像は丸みを帯びた上下逆転の凸型で, 中央の突出した部分は膜貫通部となり SR 内腔に向かって細くなっていることが知られている^{20, 21)}. また, 既に知られている foot の幅は 15.0~18.0 nm、中心間距離は約 30.0 nm であり⁷⁾, 今回の各測定数値と良く一致しており, LBWM の foot 様構造は骨格筋の foot と同じ構造をしていると考えられる.

図4と5で示したSRと筋線維表面形質膜からなる dyad の連続切片像では, foot 様構造は E と F の切片で5個ずつ見られ, G の切片では4個しか見られなかった. また, foot 様構造は他の切片では観察されなかった. Foot 様構造の中心間距離は約 30 nm であり, 連続切片の厚さは 35 nm であるため, 一枚の切片には foot 様構造がほぼ1個分おさまることになり, この dyad では, 連続切片で観察されたもの

以外の foot 様構造があるとは考えられない。このことから、図 4 の dyad を構成する SR の接合部膜面には 4~5 個の foot 様構造が 3 列存在していると考えられる。一方、図 6 と 7 に示した SR と T 管様構造形質膜からなる dyad の連続切片像では、foot 様構造は F から I の切片で 6 個ずつ見られた。また、foot 様構造は他の切片では観察されなかった。このことから、この dyad を構成する SR の接合部膜面には 6 個の foot 様構造が 4 列存在していると考えられる。さらに、図 4 の連続切片像をもとに三次元再構成した立体像の接合部膜面に平行に切断した断面 (図 8D) では、SR の接合部膜面上に並走する 3 列の高濃度のスポットが確認された。この立体像断面では、連続切片像と同数のスポットは確認できなかったが、これは、三次元再構成で、欠落している深さの情報を切片像の濃淡に従ってそのまま補完するため、切片像に見られる foot 様構造以外の高電子密度の部分も類似の構造のように表示してしまうことで、スポットを明確に判定できなかったためである。以上の検討から、図 4 の dyad を構成する SR の接合部膜面では、foot 様構造は、縦方向に 3 列、横方向に 4~5 列で並んだ四角格子配列をしていると考えられる。また、同様の解析により、図 6 の diad を構成する SR 接合部膜面では、foot 様構造が縦方向に 4 列、横方向に 6 列並んだ四角格子配列をしていると考えられる。ザリガニやサソリでは、foot は SR 接合部膜上に等間隔で並んだ四角格子配列をしていることが知られており¹⁰⁾、LBWM の foot 様構造配列もこれと良く一致する。これらの微細構造上の類似から、LBWM の foot 様構造は骨格筋や心筋で観察されている foot と同等のものであると考えられる。

哺乳動物では RyR には骨格筋型の RyR1、心筋型の RyR2、脳型の RyR3 の 3 つのアイソフォームが知られている。鳥類、魚類、両生類では RyR に 2 種のアイソフォームとして α と β が見出されており、 α と β が一つ置きに配列しているという報告もある¹¹⁾。LBWM 筋線維の dyad 接合部に見られる foot が、従来知られている RyR アイソフォームのいずれに一致するかについては、免疫電子顕微鏡法などにより明らかにされるべき今後の課題である。

T 管様構造

LBWM 筋線維の T 管様構造は、陥入先端部も含めて T 管様構造形質膜に小陥凹が局在することから、この構造が小陥凹から形成される可能性を示唆した。骨格筋では、T 管形成は小陥凹の陥入から始まることが知られており²²⁾、LBWM でも骨格筋と同様に、小陥凹から T 管様構造が形成されると考えることは

合理的である。一方、図 6 の連続切片では、T 管様構造はすべての切片でほぼ同じ位置に見られ、筋線維表面形質膜からの陥入部は A~I の切片で連続的に観察されることから、この構造の陥入部は切片とは垂直な方向にかなり広い空間を占めていると思われる。このことは、この構造が単なる管状構造に留まらず、時には甲殻類で見られるような列溝 (clef) を形成しうることを示唆する。

筋線維容積に対する SR の相対容積と活性化 Ca^{2+} LBWM 筋線維内に占める SR の容積を測定した結果、筋線維容積に対する SR の相対容積は $3.02 \pm 0.84\%$ (平均値 \pm 標準偏差、 $n=50$) であった。平滑筋では、活性化 Ca^{2+} は形質膜内表面や SR からの遊離や、細胞外からの流入で供給されると考えられているが、それらの中でも、一般に、SR からの Ca^{2+} 遊離は筋収縮への寄与が少ないと考えられている。これを反映し、平滑筋での SR の相対容積は小さく、例えば、モルモット結腸紐平滑筋²³⁾ では 2.4% であり、ウサギ門脈平滑筋¹⁷⁾ では 2.2% である。LBWM の SR の相対容積はこれらと比べるとかなり高い。Suzuki とその共同研究者による報告^{4, 13)} によれば、LBWM の活性化 Ca^{2+} は細胞外からの流入によるものより細胞内貯蔵部からの遊離によるものが多い。このことは、今回測定された LBWM の SR の相対容積がかなり大きいことと矛盾しない。一方、骨格筋の SR 相対容積は、例えば、マウス指長伸筋²⁴⁾ で 5.5% 、カエル縫工筋¹⁶⁾ で 13% 、カサゴウキブクロ筋¹⁸⁾ では最大値で 25.6% である。これらの SR 相対容積は各筋線維における収縮速度や収縮力の違いを反映していると考えられるので、平滑筋としてはかなり大きい LBWM の SR 相対容積は、タツナミガイが LBWM により体運動することと深く関係していると考えられる。

SR 内 Ca^{2+} -結合蛋白質

免疫染色の非特異的反応の有無を検証したところ、一次抗体を用いなかった切片では金粒子は一切見られず、一次抗体を用いた切片では金粒子が見られたことから、金粒子はカルシクエストリンのみと反応していると考えられる。二次抗体の金粒子は、専ら、SR の内腔や膜周辺部に見られ (図 3)、通常固定を行なった筋線維の切片像で SR の内腔にあることが確認された電子密度の高い粒子 (図 2D) 上に局在していたことから、これらの粒子はカルシクエストリンであり、LBWM の SR では骨格筋と同様に Ca^{2+} -結合蛋白質としてカルシクエストリンが機能していると考えられる。

結論

LBWM の筋線維では、骨格筋とは異なり、SR は形質膜と dyad を構成しているにすぎないが、骨格筋 triad と同じ要素で構成され、SR と形質膜間の接合部間隙で見られた foot 様構造は、構造特徴の一致から foot そのものであり、SR 内腔の Ca²⁺-結合蛋白質も骨格筋と同じカルシクエストリンであることなどから、EM 関連も骨格筋と同じ機構で作働すると考えられる。

謝辞

タツナミガイの採集にご助言下さいました神奈川大学理学部生物科学科の大和田正人氏に深く感謝致します。

文献

- 1) 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.
- 2) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys mol. Biol.* **18**:123-183.
- 3) Schneider MF and Chandler WK (1973) Voltage dependent charge movement of skeletal muscle. *Nature* **242**: 244-246.
- 4) Franzini-Armstrong C and Jorgensen AO (1994) Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **56**: 509-534.
- 5) Fosset M, Jaimovich E, Delpont E and Lazdunski L (1983) [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **258**: 6086-6092.
- 6) Jorgensen AO, Shen AC-Y, Arnold W, Leung AT and Campbell KP (1989) Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle *in situ*: an immunofluorescence. *J. Cell Biol.* **109**: 135-147.
- 7) Inui M, Saito A and Fleischer S (1987) Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structure of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **262**: 1740-1747.
- 8) Franzini-Armstrong C (1970) Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* **47**: 488-499.
- 9) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kanagawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M and Hirose T (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**: 439-445.
- 10) Saito A, Inui M, Radermacher M, Frank J and Fleischer S (1988) Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **107**: 211-219.
- 11) Loesser EK, Castellani L and Franzini-Armstrong C (1992) Dispositions of junctional feet in muscles of invertebrates. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**: 161-173.
- 12) O' Brien J, Valdivia HH and Block BA (1995) Physiological differences between the alpha and beta ryanodine receptors of fish skeletal muscle. *Biophys. J.* **68**: 471-482.
- 13) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. II. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-478.
- 14) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. *In: The Role of Calcium in Biological System. vol. I.* Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 15) Prescott L and Brightman MW (1976) The sarcolemma of *Aplysia* smooth muscle in freeze-fracture preparations. *Tiss. Cell.* **8**: 241-258.
- 16) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
- 17) Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.* **52**: 690-718.
- 18) 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.
- 19) Kelly DE (1969) The fine structure of skeletal muscle triad junctions. *J. Ultrastruct. Res.* **29**: 37-49.
- 20) Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M and Fleischer S (1989) Three-dimensional architecture of sarcoplasmic reticulum channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* **338**: 167-170.
- 21) Radermacher M, Rao V, Grassucci R, Frank J, Timerman AP, Fleischer S and Wagenknecht T (1994) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **127**: 411-423.
- 22) Ishikawa H (1968) Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J. Cell Biol.* **38**: 51-66.
- 23) Popescu LM, Diculescu I, Zelck U and Ionescu N (1974) Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell. Tiss. Res.* **154**: 357-378.
- 24) Luff AR and Atwood HL (1971) Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of fast and slow skeletal muscle of the mouse during postnatal development. *J. Cell Biol.* **51**: 369-383.

■原 著■ 2004-2005 年度神奈川大学共同研究奨励助成論文

環境調和型錯体の特長を生かした新規酸化触媒の創成と エネルギー・環境問題への展開

加藤知香^{1,3} 野宮健司¹ 森 和亮¹ 鈴木季直²

Polyoxometalates and Microporous Transition Metal Carboxylates: Synthesis, Characterization, and Oxidation Catalysis

Chika Nozaki Kato^{1,3}, Kenji Nomiya¹, Wasuke Mori¹ and Suechika Suzuki²

¹ Department of Chemistry, and

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: katouc06@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The oxidation of alkenes and alcohols with hydrogen peroxide (H₂O₂) and molecular oxygen, is quite an interesting objective for both academic and industrial fields. In this paper, we focused on polyoxometalates and microporous transition metal carboxylates as oxidation catalysts. For H₂O₂-based epoxidation reactions catalyzed by dimeric *mon*, *dir*, and *trr*-titanium (IV)-substituted Keggin polyoxotungstates, *trr*-titanium (IV) - substituted Keggin polyoxotungstate was the most active because it exhibited the fastest formation rate of active hydroperoxotitanium (IV) intermediate. Furthermore, we investigated a novel method for the grafting reaction of transition metal-substituted polyoxometalates onto a silica surface. Keggin-type vanadium(V)-substituted polyoxomolybdate (PMoV) was electrostatically anchored to a modified silica surface having cationic ammonium moiety. The PMoV-grafted silica material exhibited activities higher than those of homogeneous PMoV reactions for the oxidation of various alcohols with 1 atm dioxygen in the presence of isobutyraldehyde (IBA). Microporous copper(II) carboxylates showed unique activities for the oxidation of alcohols with H₂O₂ in a heterogeneous system, in which a green-colored species, H₂[Cu^{II}(OOCCH₂CH₂COO)₂(O₂)]·H₂O was one of the active oxidizing intermediates.

Keywords: polyoxotungstate, microporous copper(II) carboxylate, alkene epoxidation, alcohol oxidation, grafting method

序論

飽和・不飽和炭化水素やアルコールの酸化反応は、工業的・有機合成的に極めて重要である¹⁾。これまで様々な酸化触媒反応系が開発されてきているが、環境に有害な酸化剤の使用や多量に生成する副生成物の廃棄、さらには触媒に含まれる重金属の処理等が問題となっている反応システムも少なくない。

一方、過酸化水素や分子状酸素を酸化剤とした炭化水素、アルコール、芳香族化合物等の酸化反応は、その副生成物が酸素と水のみであるため、環境保全の点から注目を集めている。特に、分子状酸素を酸化剤とした酸化反応は、環境保全の点だけでなく、コストや取り扱いの簡便さの点からも有用である。

しかしながら、分子状酸素は酸化剤としての活性が低い、高温度・高圧力を必要とし、工業化するには問題点が多い。

そこで本研究では、ポリ酸塩とナノ細孔をもつカルボン酸金属錯体の2系統の化合物を酸化触媒として用い、以下の3つのテーマに関して研究を行った。①分子状酸素を酸化剤とした酸化反応に高活性を示す触媒の分子設計を目指して、まず、ケギン型チタン(IV)一、二、三置換ポリ酸塩を触媒に用いて過酸化水素を酸化剤としたアルケンのエポキシ化反応を行い、活性点構造と触媒活性との相関について検討した。②続いて、均一系酸化触媒として高活性を示

すポリ酸塩の不均一系酸化触媒への応用を目指して、活性点構造の損失無くポリ酸塩をシリカ表面上へ固定化する方法を検討した。本研究では、バナジウム(V)一置換リンモリブデン酸塩を例にとり、イソブチルアルデヒド存在下でのアルコールの酸素酸化について検討している。③一方、ナノ細孔をもつシクロヘキサジカルボン酸銅(II)錯体を固体触媒として用い、不均一系での過酸化水素によるアルコールの酸化を行い、反応中間体である銅(II)-ペルオキシ種の単離・構造解析を行った。

尚、今回の助成研究テーマ①～③に関する成果は全て専門誌に発表した^{2~4)}。この報告書では要点を述べるにとどめるが、詳細についてはそちらを参照されたい。

材料と方法

(Bu₄N)₇H[(α-PTiW₁₁O₃₉)₂O](1)の合成²⁾

[(PTiW₁₁O₃₉)₂O]⁸⁻ テトラブチルアンモニウム塩(TBA 塩)の合成は、既に報告されているフリーアシッド型の合成法を改良して行った⁵⁾。以下に、その方法を記す。ドラフト中で、TiCl₄ (0.43 mL)を110 mLのK₇[α-PW₁₁O₃₉]₂·8H₂O (4.6 g, 1.47 mmol)水溶液に加える。この無色透明溶液を30分間還流し、メンブランフィルター(J. G. type, 0.2 μm)でろ過した。そのろ液に過剰のBu₄NBr (10.6 g, 0.83 mmol)を加えると白色沈殿が生成する。この白色分散液を1時間攪拌後、白色沈殿をメンブランフィルター(J. G. type, 0.2 μm)で回収した。この粗沈殿を0°Cでアセトニトリル/水から再沈殿することにより精製し、水(50 mL×3)、エタノール(50 mL×3)、エーテル(50 mL×3)で洗浄して目的物を得た。収量(収率):4.26g (80.2%)。元素分析: 実測値(計算値): C, 19.08% (18.78%); H, 3.63% (3.56%); N, 1.52% (1.37%)。カリウムは検出されなかった(0.021%)。IR (cm⁻¹): 1070vs [ν(P-O)], 964vs, 887vs, 808vs, 652s [ν(Ti-O-Ti)], 594w, 517m。³¹P NMR (CD₃CN中): δ -13.12。TG/DTA: 20.3%の重量減。発熱ピークを319.3, 337.0, 376.6, 435.7 °Cに観測した。この重量減は、7個のTBA⁺の分解(23.7%)に対応していた。吸着した水による重量減なし。

(Bu₄N)₇KH₂[(α-1,2-PTi₂W₁₀O₃₈)₂O₂](2)の合成²⁾

[(α-1,2-PTi₂W₁₀O₃₈)₂O₂]¹⁰⁻のTBA塩の合成は、pH 2.2の酸性下、[(α-1,2-PTi₂W₁₀O₃₈)₂O₂]¹⁰⁻のカリウム塩水溶液(0.8 g, 0.144 mmol)⁶⁾に過剰のBu₄NBr(9.5 g, 29.4 mmol)に加えることで行った。30分間攪拌後、白色沈殿をメンブランフィルター(J. G. type, 0.2 μm)で回収し、水(50 mL×2)、エタノール(50

mL×2)、エーテル(50 mL×2)で洗浄した。この粗沈殿を0°Cでアセトニトリル/酢酸エチルからの再沈殿により精製し、エタノール(50 mL)、エーテル(50 mL)で洗浄した。収量(収率):0.27 g (28.3%)。元素分析:実測値(計算値):C, 19.75% (19.45%); H, 3.73% (3.70%); N, 1.76% (1.42%); K, 0.58% (0.57%)。IR (cm⁻¹): 1097vs [ν(P-O)], 962vs, 887vs, 809s, 686s [ν(Ti-O-Ti)], 595w, 519m。³¹P NMR (CD₃CN中): δ -11.37。TG/DTA:22.1%の重量減。発熱ピークを311.1, 321.9, 394.2 °Cに観測した。この重量減は、7個のTBA⁺の分解(24.5%)に対応していた。吸着した水による重量減なし。

(Bu₄N)₇KH₄[(α-1,2,3-PTi₃W₉O₃₇)₂O₃](3)の合成²⁾

[(α-1,2,3-PTi₃W₉O₃₇)₂O₃]¹²⁻のTBA塩の合成は、pH 2.2の酸性下、[(α-1,2,3-PTi₃W₉O₃₇)₂O₃]¹²⁻のカリウム塩水溶液(1.0 g, 0.18 mmol)⁷⁾に過剰のBu₄NBr (2.3 g, 7.0 mmol)を加えることで行った。30分間攪拌後、白色沈殿をメンブランフィルター(J. G. type, 0.2 μm)で回収し、水(50 mL×2)、エタノール(50 mL×2)、エーテル(50 mL×2)で洗浄した。収量(収率):0.39g(32.8%)。元素分析:実測値(計算値): C, 20.42% (20.29%); H, 3.58% (3.89%); N, 1.58% (1.48%); K, 0.66% (0.59%)。IR (cm⁻¹): 1063s [ν(P-O)], 963vs [W-O_i], 889s [W-O_e], 822s [W-O_e], 738, 699s [ν(Ti-O-Ti)], 594 w, 520 m。³¹P NMR (CD₃CN中): δ -10.15。TG/DTA: 23.4%の重量減。発熱ピークは、309.6, 331.0 °Cに観測した。この重量減は、7個のTBA⁺の分解(25.6%)に対応していた。吸着した水による重量減なし。

K₄[PMo₁₁VVO₄₀] (PMoV)のシリカ表面への固定化³⁾

アモルファスシリカ (Azmax, 200m²/g)を25 °Cで2時間乾燥した。このときのシリカ表面上のOH基の数は、4.67 OH groups/nm², 1.55 mmol OH groups/g⁸⁾。この乾燥させたシリカ(1.0 g)を80 mLのメタノールに分散し、0.28, 2.78, 8.34 mL (0.5, 5.0, and 15.0 mmol)の(MeO)₃Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Clを加えた。この混合物を80°Cで6時間還流した。得られた白色沈殿を回収し、メタノール(10 mL×3)で洗浄した。元素分析 [0.5 mmolのシランカップリング剤を使用した場合] 実測値: C, 1.93%; H, 0.16%; N, 0.42%。計算値:(SiO₂)₅₉(Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl)(0.27 mmol≡Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl groups/g): C, 1.94%; H, 0.41%; N, 0.38%。BET 表面積: 138 m²/g。元素分析 [5.0 mmolのシランカップリング剤を用いた場合] 実測値: C, 2.81%; H, 0.20%; N, 0.75%。計算値:(SiO₂)₄₀(Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl) (0.39

mmol \equiv Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl group/g): C, 2.81%; H, 0.59%; N, 0.55%. BET 表面積: 130 m²/g. 元素分析 [15.0 mmol のシランカップリング剤を用いた場合] 実測値: C, 2.90%; H, 0.35%; N, 0.50%. 計算値: (SiO₂)₄₃(Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl) (0.36 mmol \equiv Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl groups/g): C, 2.62%; H, 0.55%; N, 0.51%. 元素分析結果から、シランカップリング剤の最大担持量は、0.39 mmol \equiv Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl groups/g であった。

このシランカップリング剤担持シリカ (1.0 g, 0.27, 0.39 mmol \equiv Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl groups/g) を水(40 mL)に 30 分間攪拌した。ここへ、水(50 mL)に溶解した K₄[PMo₁₁VVO₄₀]·7H₂O (1.03 g, 0.5 mmol)を加え、25 °C で 24 時間攪拌した。得られ固体を回収し、水(30 mL×3)で洗浄後、2 時間凍結乾燥した。元素分析 [0.27 mmol のシランカップリング剤を担持したシリカを使用した場合] 実測値: N, 0.66%; P, 0.16%; Si, 38.3%; Cl, < 0.02%; K, < 0.01%。計算値: {(SiO₂)₅₉}₃(Si(CH₂)₃N(CH₃)₃)₄(PMo₁₁VO₄₀)(H₂O)₁₅ (0.057 mmol PMoV/g): N, 0.32%; P, 0.18%; Si, 38.4%。元素分析 [0.39 mmol のシランカップリング剤を担持したシリカを使用した場合] 実測値: N, 0.50%; P, 0.17%; Si, 37.9%; Cl, 0.21%; K, < 0.01%。計算値: {(SiO₂)₄₀}₃(Si(CH₂)₃N(CH₃)₃)₄(PMo₁₁VO₄₀)(H₂O)₅ (0.082 mmol PMoV/g): N, 0.46%; P, 0.25%; Si, 37.54%。

[Cu^{II}]₂(OOCCH₂CH₂COO)₂·H₂O(4)の合成

上記の化合物の合成およびキャラクタリゼーションは、文献⁹⁾に従って行った。

H₂[Cu₂^{II,II}(OOCCH₂CH₂COO)₂(O₂)]₂·H₂O(5)の合成⁴⁾

[Cu^{II}]₂(OOCCH₂CH₂COO)₂·H₂O(100 mg, 206 μmol)のアセトニトリル分散溶液に、30% H₂O₂ 水溶液(648.8 μL, 8.24 mmol)を加えた。室温で 4 時間攪拌後、得られた緑色粉体を回収し、アセトニトリル(50 mL × 3)、メタノール(50 mL × 3)で洗浄した。その後 2 時間凍結乾燥した。収量(収率): 94.5 mg (87.8%)。元素分析: 実測値: C, 37.00; H, 4.66%。計算値: C₁₆H₂₄O₁₁Cu₂ = H₂[Cu₂(C₈H₁₀O₄)₂(O₂)]H₂O: C, 37.07; H, 4.47%。TG/DTA: 5.35%の重量減。発熱ピークは 132.8 °C に観測した。これは Cu(H₂O₂)種の分解(6.5%)に対応した。有機配位子の分解は、242.7 °C の発熱ピークを伴って 245 °C 付近から (54.26%の重量減)観測された。IR (cm⁻¹): 1594s, 1511w, 1423s, 1373w, 1332w, 1297m, 1222w, 1045w, 929w, 784m, 767m, 727w, 526m。BET 表面積: 328.4 m²/g。細孔径: 4.9 Å。窒素最大

吸着量: 1.09 mol/mol of copper。DR UV-vis: λ_{max} 260, 385, 665 nm。ラマンスペクトル: 805 [ν(O-O)] cm⁻¹。

酸化触媒反応²⁻⁴⁾

チタン置換ポリ酸塩、バナジウム置換ポリ酸塩固定化シリカ、ナノ細孔をもつシクロヘキサンジカルボン酸銅(II)錯体を触媒とした過酸化水素および分子状酸素によるアルケン、アルコールの酸化触媒反応条件については、Table 1-3 を参照されたい。生成物の分析は、いずれの反応の場合もガスクロマトグラフィー(TCD, DB-FFAP キャピラリカラム(0.53 mm × 15 m); FID, DB-WAX キャピラリカラム(0.53 mm × 15 m))と高速液体クロマトグラフィー(Shim-pack VP-ODS 150 mm L × 4.6 mm ID)で行った。

結果と討論

ケギン型チタン(IV)1~3 置換ポリ酸塩を触媒に用いた H₂O₂ によるアルケンのエポキシ化反応^{②)}

[(α-PTiW₁₁O₃₉)₂O]⁸⁻ (1), [(α-PTi₂W₁₀O₃₈)₂O₂]¹⁰⁻ (2), [(α-PTi₃W₉O₃₇)₂O₃]¹²⁻ (3) (図 1) を触媒とした過酸化水素によるシクロオクテン、シクロヘキセン、1-オクテンの酸化反応結果を表 1 に示す。いずれの基質を用いた場合も、化合物 3 が化合物 1、2 よりも著しく高いターンオーバー頻度(TOF)を示すことが分かった。これは、チタン一原子当たりで TOF を計算した場合でも同様であった。

さらに、触媒活性に対するプロトン数の影響について検討すると(図 2)、いずれの化合物を触媒に用いた場合もプロトン数の増加に伴って活性は直線的に増加した。

しかしながら、ポリ酸塩一分子当たりのプロトン数を統一して触媒活性を比較しても、化合物 3 が化合物 1,2 に比べて著しく高活性であった。従って、用いた触媒の活性点構造が活性に著しい影響を与え

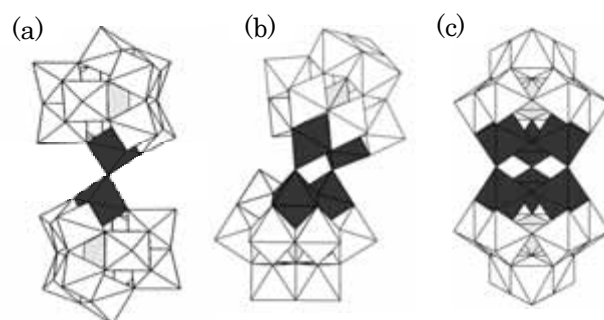


図 1. 1(a),2(b),3(c)の多面体構造モデル。黒色の八面体はチタン原子を灰色の四面体は PO₄ を示す。

表 1. Ti 置換ポリ酸塩を触媒とした H₂O₂ によるアルケンのエポキシ化反応^a

| 基質 (mmol) | 触媒 | TOFs ^{-1b} | 選択率/% |
|-------------------|----|-------------------------|-------------------|
| シクロオクテン (7.70) | 1 | 3.7 × 10 ⁻⁴ | > 99 ^d |
| | | 4.7 × 10 ^{-4c} | > 99 ^d |
| | 2 | 1.2 × 10 ⁻³ | > 99 ^d |
| | | 1.3 × 10 ^{-3c} | > 99 ^d |
| | | 3.6 × 10 ^{-3c} | > 99 ^d |
| シクロヘキセン (4.93) | 1 | — ^e | — |
| | 2 | 7.6 × 10 ^{-6e} | 83 ^f |
| | 3 | 1.2 × 10 ^{-4e} | 86 ^f |
| 1-オクテン (6.37) | 1 | — ^g | — |
| | 2 | 5.4 × 10 ^{-6g} | >99 ^h |
| | 3 | 3.1 × 10 ^{-5g} | >99 ^h |

^aReaction conditions: catalyst 0.02 mmol, substrates 4.93–7.70 mmol, 30 % H₂O₂ 9.72 mmol, solvent, 1:1 (v/v) CH₂Cl₂/CH₃CN 30 mL, under air. ^bTOF = turnover number (TON)/s after 5 min. ^cafter 1 h. ^dcyclooctene oxide was epoxidation product. ^eafter 4 h. ^fcyclohexene oxide and cyclohexanediol were epoxidation products.

^gafter 3 h. ^h1,2-epoxyoctane was epoxidation product.

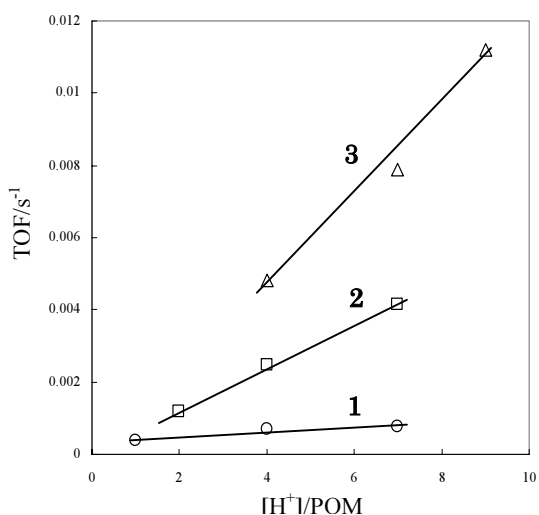


図 2. シクロオクテンのエポキシ化反応に対するプロトン数依存性.

ており、化合物 **3** の A-Ti3 サイトが本酸化反応に最も高活性を示す活性点構造であることが分かった。

そこで、反応中間体であるヒドロペルオキシ種の生成を観測するため、過酸化水素存在下での UV-vis 測定を行った。その結果、400 nm 付近に酸素種による新しい吸収帯を観測した。この段階では、不活性なペルオキシ種が生成しているのか活性なヒドロペルオキシ種が生成しているのかを区別できない。そこで、過酸化水素存在下でシクロオクテンを加えると、化合物 **3** の時のみ、モル吸光係数の著しい減少が見られた。このことから、化合物 **3** が化合物 **1,2** よりもヒドロペルオキシ種の生成量が多いことが分かった。このことは、酸化触媒活性序列と対応していた。

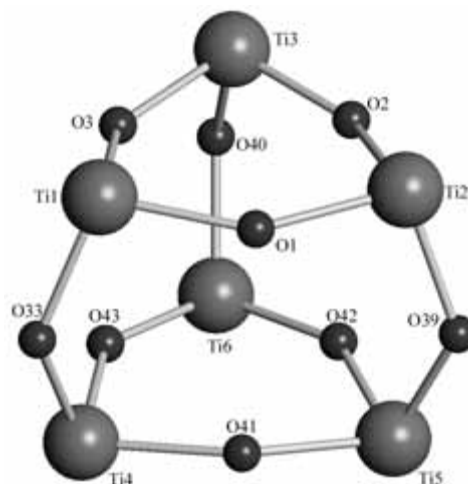
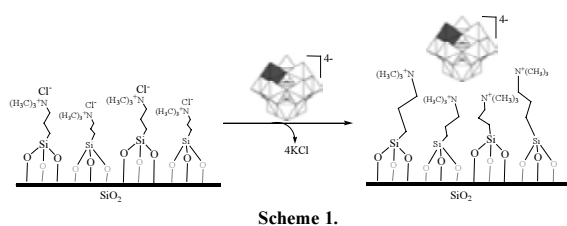


図 3. 化合物 **3** のチタン(IV)三置換サイトの X 線結晶構造.

以上のことから、Ti3 置換ポリ酸塩の A-Ti3 サイトが H₂O₂ ベースの酸化触媒反応に高活性を示し、それは、化合物 **3** と H₂O₂ との反応で生成するヒドロペルオキシ種の生成速度が他の化合物よりも速いことに起因すると結論した。さらに、X 線構造解析データから求めた酸素の Bond Valence Sum は、O(1) 1.69, O(2) 1.73, O(3) 1.45, O(33) 1.75, O(39) 1.69, O(40) 1.72, O(41) 1.65, O(42) 1.67, O(43) 1.52 となって、図 3 の A-Ti3 の Ti-O-Ti 結合酸素上(O(3) と O(43))にあるプロトンが、よりスムーズなヒドロペルオキシ種の生成を促進していることも確認した。

シランカップリング剤を介したシリカ表面へのポリ酸塩の固定化^{3,10)}

ポリ酸塩の固定化法として、アミン基をもつシランカップリング剤を介したポリ酸塩の固定化が報告されているが、活性サイトへのアミン基の配位が触媒活性の低下を招くことが明らかになっている¹¹⁾。そこで本研究では、アンモニウムカチオンをもつシランカップリング剤((MeO)₃Si(CH₂)₃N(CH₃)₃Cl)を用いて、ポリ酸塩のもつ負電荷とアンモニウムカチオンとの静電的相互作用を利用することにより、ポリ酸塩をシリカ表面に固定化し、活性点の損失を防ぐことに成功した(スキーム 1 参照)。ここでは、均一酸化触媒系で活性を示す K₄[PMo₁₁VVO₄₀] (PMoV) を例にして、固定化前後の酸化活性について検討した。また、固定化後のキャラクタリゼーションとして、固体 ³¹P NMR、DR UV-vis、TEM を行った結果、ポリ酸塩はシリカ表面に高分散して担持していることを確認した。



Scheme 1.

PMoV 固定化シリカ(PMoV-SiO₂)を固体触媒としたイソブチルアルデヒド存在下でのアルコールの酸化反応結果を表 2 に示す。酸化生成物は、それぞれベンズアルデヒド、オクチルアルデヒド、シクロヘキサノンで、選択率は>99%であった。ターンオーバー数(TON)は、いずれの場合も PMoV を用いた均一系よりも PMoV-SiO₂ を用いた不均一系のほうが高かった。また、PMoV とシリカを単に物理混合した PMoV/SiO₂ よりもシランカップリング剤を介した PMoV-SiO₂ のほうが高活性であった。以上のことから、静電的にポリ酸塩を固定化すると、活性点構造の損失なくポリ酸塩を固定化できることが分かった。

ナノ細孔をもつシクロヘキサンジカルボン酸銅(II)錯体を固体触媒としたアルコールの酸化および不均一系酸化触媒反応中の活性酸素種の単離および構造解析^{③④}

[Cu^{II,II}₂(OOCCH₆H₁₀COO)₂·H₂O(**4**)]を固体触媒とした過酸化水素による種々のアルコールの酸化反応結果を表 3 に示す。本反応中の触媒の状態は過酸化水素の濃度に著しく依存しており、銅 1 原子に対して 46 倍以下の H₂O₂ を添加した場合、触媒の色が青色から緑色に変色したのに対し、69 倍以上の添加量の場合、青色から茶色へと変色した。TOF は、H₂O₂ 添加量の増加とともに高くなった。反応中に観測

表 2. PMoV 固定化シリカを触媒とした分子状酸素によるアルコールの酸化^a

| 基質 (mmol) | 触媒 | TON ^b |
|------------------|------------------------------------|------------------|
| ベンジルアルコール (48.4) | PMoV | 54 |
| | PMoV-SiO ₂ | 153 |
| | PMoV/SiO ₂ ^c | 21 |
| | PMoV-SiO ₂ ^d | 152 |
| 1-オクタノール (6.34) | PMoV | 22 |
| | PMoV-SiO ₂ | 117 |
| シクロヘキサノール (9.40) | PMoV | 21 |
| | PMoV-SiO ₂ ^e | 84 |

^aReaction conditions: PMoV 20 μmol, PMoV-SiO₂ (0.082 mmol/g, 5 μmol of PMoV), CH₃CN 3 – 8 mL, alcohol 6.34 – 48.4 mmol, IBA 11.0 – 37.6 mmol, P(O₂) = 1 atm, reaction temperature 85 °C. ^bTurnover number (TON) after 168 h. ^cPMoV/SiO₂ (0.082 mmol/g, 5 μmol of PMoV) was used. ^dWater (5 mL) was used as a solvent. ^ePMoV-SiO₂ (0.057 mmol/g, 5 μmol of PMoV) was used.

表 3. シクロヘキサンジカルボン酸銅(II)錯体を触媒とした過酸化水素によるアルコールの酸化^a

| 基質 (mmol) | 選択率/% ^b | TOFs ^{-1c} |
|------------------------------|--------------------|------------------------|
| 2-プロパノール (13.1) | アセトン (>99) | 1.6 × 10 ⁻³ |
| 2-プロパノール (13.1) ^d | アセトン (>99) | 5.8 × 10 ⁻³ |
| シクロヘキサノール (9.5) ^e | シクロヘキサノン (>99) | 1.1 × 10 ⁻⁴ |
| シクロヘキサノール (9.5) ^d | シクロヘキサノン (>99) | 1.6 × 10 ⁻⁴ |
| ベンジルアルコール (9.7) | ベンズアルデヒド (>99) | 7.0 × 10 ⁻⁴ |
| ベンジルアルコール (9.7) ^d | ベンズアルデヒド (>99) | 1.5 × 10 ⁻³ |
| 1-オクタノール (6.4) | オクチルアルデヒド (>99) | 1.1 × 10 ⁻⁴ |
| 1-オクタノール (6.4) ^d | オクチルアルデヒド (>99) | 1.6 × 10 ⁻⁴ |

^aReaction conditions: catalyst 206 μmol, substrate 6.4 – 13.1 mmol, 30 % H₂O₂ 9.7 mmol (23-fold excess), CH₃CN 10 mL. ^bafter 1 h. ^cTOF = turnover number (TON)/s after 1 h. ^dH₂O₂ (48.5 mmol, 113-fold excess) was used. ^eH₂O₂ (19.4 mmol, 46-fold excess) was used.

された触媒の色の変化(緑色もしくは茶色)が青色に戻ってしまうと、触媒反応も進行しなくなったことから、この緑色もしくは茶色の化学種が反応中間体であると推察した。さらに、化合物 **4** はいずれの基質に対しても酸化触媒活性を示したが、分子サイズの比較的小さい 2-プロパノールのほうがベンジルアルコールやシクロヘキサノールなどの大きめの基質よりも TOF が高かったことは、化合物 **4** のもつ 5 Å 程度のナノ細孔の形状選択性によるものと思われる。また、ナノ細孔をもたない銅触媒では活性を示さなかったことから、本錯体のもつナノ細孔が触媒活性の向上に効果があることが分かった。さらに、本反応は完全な不均一系反応で進行しており、触媒の反応溶液への染み出しはなく、触媒も劣化していないことを確認した。

続いて、反応中間体と考えられる緑色もしくは茶色の化学種のうち、緑色の化学種の単離を試みた。緑色の銅(II)-ペルオキシ種 (H₂[Cu₂^{II,II}(OOCCH₆H₁₀COO)₂(O₂)·H₂O(**5**))は、アセトニトリル中で化合物 **4** に 20 倍の H₂O₂ を添加することで単離することが出来た。化合物 **4** と **5** の粉末 X 線回折データからリートベルト解析によりその構造を決定すると、化合物 **4** の 2 次元の[Cu₂(OOCCH₆H₁₀COO)]層間に、μ-1,2-*trans* 型のペルオキシ種が架橋しており、それによって層間の Cu-Cu 間の距離が 2.992(6) Å から 4.572(4) Å に長くなっていることが分かった (図 4)。

さらに、化合物 **5** のラマンスペクトルでは、805 cm⁻¹ に新たなバンドが観測された (図 5)。このバンドは、760 cm⁻¹ 付近に観測されるサイド-オン型の

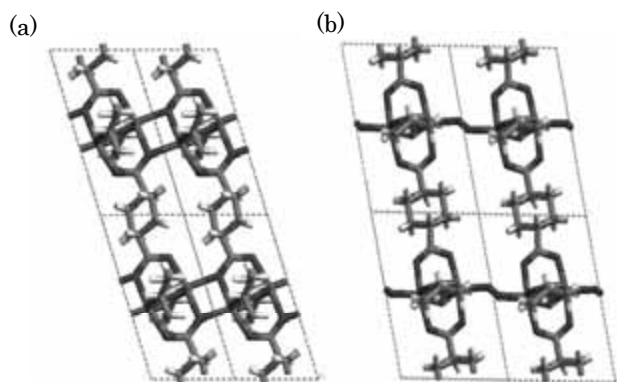


図4. *a* 軸から見た **4** の分子構造(a)、*a* 軸から見た **5** の分子構造(b).

$\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OO}\text{-Cu}^{\text{II}}$ 種や $590\text{--}616\text{ cm}^{-1}$ に観測される $\text{Cu}^{\text{III}}(\mu_2\text{-O})_2\text{Cu}^{\text{III}}$ 種のものとは異なっており、 $800\text{--}840\text{ cm}^{-1}$ に観測される $\mu\text{-}1,2\text{-trans}$ $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OO}\text{-Cu}^{\text{II}}$ 種の O-O 振動によるものと対応していた。さらに熱分析から、化合物 **5** 中のペルオキシ種は 133°C まで安定であることも確認した。このような銅-ペルオキシ種は、生体酵素類似モデル錯体では既に報告されているものの、固体触媒から単離・構造解析された例はない。また、 100°C 以上の高い熱的安定性を示す銅(II)-ペルオキシ種というものもこれまでに報告がないことから、高分子錯体がスタッキングすることによってナノ細孔を構築している本触媒のような有機-無機ハイブリッド材料が、この特異な挙動を引き起こしていると考えている。

最後に、得られた銅(II)ペルオキシ種が酸化活性のある反応中間体であるかどうかを確認するため、NMR 管中で化合物 **5** と 2-プロパノールを反応させた。その結果、 H_2O_2 が存在しなくてもアセトンを生

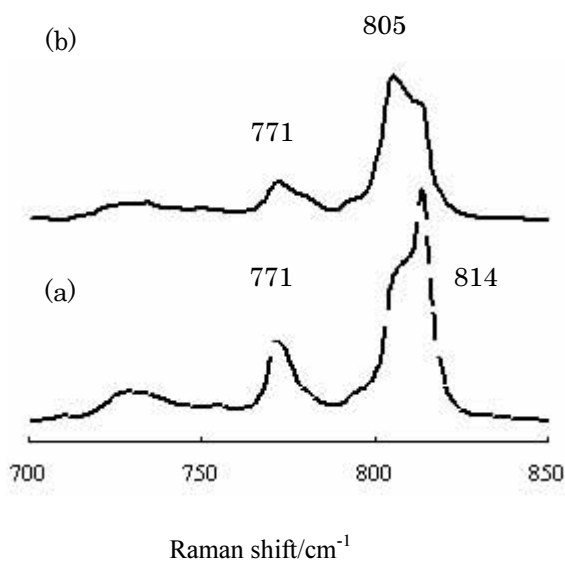


図5. 化合物 **4**(a)および化合物 **5**(b)のラマンスペクトル。

種の一つであることを確認した。もう一つの茶色の中間体については、まだ単離に成功していないが、今後、合成条件を検討して単離・構造解析を目指す予定である。

結論

上述のように、主として3つの研究テーマを遂行することにより、酸化触媒の分子設計に関する基礎的な知見が得られた。今後は、これらの知見をベースに、環境問題への解決に向けた酸化触媒の開発を目指す予定である。

謝辞

本研究は、2004-2005年度神奈川大学共同研究奨励助成のもとに行われた。また、本研究の一部は、文部科学省の科学研究費補助金(16750126)の援助を受けて行われた。

文献

- Sheldon RA and Kochi JK (1981) *Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds*. Academic Press, New York.
- Kato CN, Negishi S, Yoshida K, Hayashi K and Nomiya K (2005) The strong influence of structures around titanium centers in dimeric mono-, di-, and tri-titanium(IV)-substituted Keggin polyoxotungstates on the catalytic epoxidation of alkenes with H_2O_2 . *Appl. Catal. A: General* **292**: 97-104.
- Kato CN, Tanabe A, Negishi S, Goto K and Nomiya K (2005) An efficient $\text{PMo}_{11}\text{VVO}_{40}^{4-}$ /silica material having cationic ammonium moiety: synthesis, characterization, and catalytic performance for oxidation of alcohols with dioxygen. *Chem. Lett.* **34**: 238-239.
- Kato CN, Hasegawa M, Sato T, Yoshizawa A, Inoue T and Mori W (2005) Microporous dinuclear copper(II) trans-1,4-cyclohexanedicarboxylate: heterogeneous oxidation catalysis with hydrogen peroxide and X-ray powder structure of peroxo copper(II) intermediate. *J. Catal.* **230**: 226-236.
- Kholdeeva OA, Maksimov GM, Maksimovskaya RI, Kovaleva LA, Feditiv MA, Grigoriev VA and Hill CL (2000) A dimeric titanium-containing polyoxometalate. Synthesis, characterization, and catalysis of H_2O_2 -based thioether oxidation. *Inorg. Chem.* **39**: 3828-3837.
- Nomiya K, Takahashi M, Widegren JA, Aizawa T, Sakai Y and Kasuga NC (2002) Synthesis and pH-variable ultracentrifugation molecular weight measurements of the dimeric, Ti-O-Ti bridged anhydride form of a novel di- Ti^{IV} -1,2-substituted α -Keggin polyoxotungstate. molecular structure of the $[(\alpha\text{-}1,2\text{-PW}_{10}\text{Ti}_2\text{O}_{39})_2]^{10-}$ polyoxoanion. *Dalton Trans.* 3679-3685.
- Nomiya K, Takahashi M, Ohsawa K and Widegren JA (2001) Synthesis and characterization of tri-titanium(IV)-1,2,3-substituted α -Keggin polyoxotungstates with heteroatoms P and Si. crystal

- structure of the dimeric, Ti-O-Ti bridged anhydride form $K_{10}H_2[\alpha,\alpha-P_2W_{18}Ti_6O_{77}]\cdot 17H_2O$ and conformation of dimeric forms in aqueous solution by ultracentrifugation molecular-weight measurements. *Dalton Trans.* 2872-2878.
- 8) Furdala KL and Tilley TD (2001) An efficient, single-source molecular precursor to silicoaluminophates. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 10133-10134.
 - 9) Seki K, Takamizawa S and Mori W (2001) Characterization of microporous copper(II) dicarboxylates (fumarate, terephthalate, and trans-1,4-cyclohexanedicarboxylate) by gas adsorption. *Chem. Lett.* 122-123.
 - 10) Kato CN, Goto K, Tanabe A, Hatano A, Hayashi K, Shinohara A, Suzuki S and Nomiya K (2005) Efficient polyoxometalate/silica materials having cationic ammonium moiety: syntheses, characterization, and catalytic performances for oxidation of alcohols with dioxygen. In: *International Chemical Congress of Pacific Societies*. Honolulu, USA 1443.
 - 11) Johnson BJS and Stein A (2001) Surface modification of mesoporous, macroporous, and amorphous silica with catalytically active polyoxometalate clusters. *Inorg. Chem.* **40**: 801-808.

■原 著■ 2004-2005 年度神奈川大学共同研究奨励助成論文

重金属汚染土壌から汚染物質を回収する高機能環境修復植物の探索 (ケナフによるカドミウム除染の可能性)

澤上航一郎¹ 稲住勇氣² 大石不二夫² 井上和仁¹ 西本右子² 鈴木祥弘^{1,3}

Possible Phytoremediation of Cadmium Pollution Soil with Kenaf

Koichiro Sawakami¹, Yuki Inazumi², Fujio Ohishi², Kazuhito Inoue¹,
Yuko Nishimoto² and Yoshihiro Suzuki^{1,3}

¹ Department of Biological Sciences, and

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

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

Abstract: Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), which can grow rapidly and maintain high primary production, was examined for its ability to decontaminate cadmium ions (Cd) from polluted soil. Although its germination and growth were not affected at first, its photosynthesis dependent growth was disturbed by Cd in the soil. No growth after expanding the true leaves was observed at above 111 ppm Cd. At 74.1 ppm Cd, kenaf could acclimate and began to grow after a few weeks lag. The biomass increased by 2.4 times from 4 to 6 weeks after sawing. Higher accumulation rates were observed in the plant body at below 74.1 ppm Cd. The rate increased to 6.4 times in the plant body at 1.48 ppm Cd. Assuming the same productions of kenaf as on the soil without Cd, it could decontaminate 1.48 ppm Cd from the polluted soil for ca. 16 years and could more efficiently from the soil containing lower concentrations of Cd. These results suggested the possible phytoremediation with kenaf applied to the polluted soil with lower concentrations of Cd.

Keywords: acclimation, cadmium, decontamination, kenaf, phytoremediation

序論

工場跡地や産業廃棄物処理場などの周辺の土地を再利用する際、基準値を超える重金属や揮発性有機化合物による汚染が見つかることは少なくない。こうした土地を除染し、再び利用可能にするためには、多大なコストが必要であり、日本国内だけでも、対策費用は13兆円に達すると試算されている¹⁾。また、工業化の進んだ発展途上国でも土壌汚染は深刻な問題であり、除染費用を持たないこれら途上国にとって、低コストの除染技術が不可欠なものとなっている。

近年、低コストの除染技術として、微生物を用いる除染方法(バイオレメディエーション)が注目されている。バイオレメディエーション法は、微生物を用いて揮発性有機化合物を分解する除染法で、タンカーからの流出原油の除染などに活用されている。この方法でも、重金属化合物を可溶化あるいは無毒

化することが可能であるが、元素自体が毒性を持つ重金属を回収・除去することはできない²⁾。これに対し、維管束植物を用い、元素自身を回収・除去し、汚染土壌の除染を行う方法がある。維管束植物の蒸散に伴う水の流れを利用して、汚染物質を植物体内に回収し、植物体とともに除去することで除染を行うこの方法は、ファイトレメディエーションと呼ばれている。

これまでのファイトレメディエーションでは、鉱山地域に特異的に分布し、汚染土壌でも栽培できることが予め分かっている重金属耐性植物が用いられてきた。しかし、こうした重金属耐性植物の多くは、生長が遅く、バイオマスが小さいため、大量の汚染物質を効率よく回収することは難しかった。その後、さまざまな植物で汚染土壌に対する耐性が試験され、重金属耐性植物以外でも、一定の濃度の汚染に対し

耐性があり、しかも生長が速くバイオマスが大きい
ため、重金属を有効に回収する植物ことが分かり³⁾、
効率のよい除染が可能となりつつある。本研究では、
生長が速くバイオマスが大きいばかりでなく、蒸散
速度が高く、蒸散に伴う水や土壌からの物質移動量
が大きいことが知られているケナフ (*Hibiscus
cannabinus* L.) に着目し、ファイトレメディエー
ションへの利用を検討した。ケナフでは、農業基準
値 (1 ppm) 濃度のカドミウム (Cd) 除染に一定の
効果が期待されている⁴⁾。本研究では、様々な濃度
の Cd 汚染土壌でケナフを栽培し、汚染土壌に対す
る応答を明らかにし、さらに、どのような濃度の Cd
汚染土壌で効率よく除染することが可能かを定量的
に検討した。

材料と方法

黒土 (黒土, アイリスオーヤマ)、赤玉土 (上質赤玉
土・小粒, アイリスオーヤマ) を 1:1 の比率で混合
した土壌を用いた。プラスチック容器 (内径 380×
260×240 mm) に 20 l の混合土壌を満たし、1、
10、100、150、300 mg・l⁻¹ の Cd 濃度になるよう
硫酸カドミウム水溶液を加え、局所的な濃度の変化
をできる限り少なくするよう十分に攪拌した後、汚
染土壌として用いた。汚染土壌と Cd を混合しない
対照土壌 (0 ppm) の各 20 l に、化成肥料 (飼料作
物配合 246 号, 全国農業協同組合連合会) を 25 g 混
合し、施肥した。各容器にケナフ (*H. cannabinus* cv.
Evergrades41) の種子を 30 粒 (10 粒づつ 3 列) 播
種し、気温 30℃、湿度 65%を保ち、陽光ランプに
より 16 時間明期/8 時間暗期 (500 μmol photons・
m⁻²・s⁻¹) の光条件に制御した人工気象室 (小糸工業
株式会社) 内で栽培を行った。栽培期間中は充分な
灌水を行い、土壌が乾燥しないよう留意した。

播種 31 日後、各系列で栽培された個体の発芽率
を調べ、各個体の葉の枚数を測定した後、植物体を
回収し、光合成器官 (葉)、支持器官 (葉柄・茎・根)、
分裂器官 (茎頂・腋芽) に分けた。各器官を紙袋に
入れ、60℃に設定した乾燥機 (DRYING OVEN,
SANYO) 内で 2 週間乾燥し、乾燥重量を測定した。
植物体中の Cd 濃度を測定し、生長に伴う土壌 Cd
成分の植物体への吸収・蓄積を調べた。乾燥させた
ケナフ試料は、それぞれの器官ごとに電動ミル
(IFM・100, IWATANI) にかけて破碎した。均一な
粉末となった植物体から各 1.0 g を正確に秤量して
ルツボに移し、電気炉 (1C 型, 林電工) 中、500℃
で灰化した。灰化した試料は、0.1 M 硝酸溶液 100 ml
中で 30 分間攪拌し、重金属を溶出させた。溶液を
定量濾紙 (No.5B と No.5C, ADVANTEC) とシリ

ジフィルター (No.190, 孔径 0.45 μm, NALGENE)
で濾過し、ICP-MS とフレイム原子吸光を用いて分
析を行った。

275 ml のポットを用いて汚染土壌中でケナフを
栽培し、同様の実験を行った。Cd 濃度 0、50、75、
100 mg・l⁻¹ の混合土壌をそれぞれ 200 ml 入れ、ケ
ナフ種子を各 3 粒播種した。液体肥料 (ハイポネッ
クス液 6-10-5, Hyponex 社) の 500 倍希釈液を与
えて栽培し、子葉展開後、生育の良い 1 株を残し、残
り 2 株を間引いた。2 週間毎に地上高と地表の茎直
径を測定し、茎の形状を円錐に近似して、茎体積を
求め、生物量を推定した。

結果と討論

土壌の密度より、各汚染土壌の 1、10、100、150、
300mg・l⁻¹ の Cd 濃度はそれぞれ、1.48、14.8、148、
222、444 ppm に換算された。ケナフ種子は、全
ての濃度の汚染土壌で、播種後 2 から 3 日で発芽した。
播種後 31 日目の各汚染土壌で生育していた植物体
と播種した種子数を比較し発芽率を求めた結果、全
ての土壌で 80%以上となり、Cd によるケナフ種子
の発芽阻害は認められなかった (表 1)。また、発芽
後、子葉が展開するまでは各土壌でケナフの生長に
顕著な違いは認められなかったが、その後の生長は、
土壌の Cd 濃度により異なっていた。低濃度の Cd
を含む土壌でも生長が阻害され、その程度は Cd 濃
度が高いほど著しかった (図 1)。148 ppm を越
える汚染濃度では、本葉の展開が遅れ、その後、生
長が著しく阻害された。このため、播種 31 日目の
時点で展開した葉枚数も Cd 濃度の上昇とともに低
下した (表 1)。また、容器あたりの全乾燥重量も、
148 ppm 以上の汚染濃度では、Cd を含まない対
照土壌の 10%未満となった (図 1)。内蔵する資源
を用いて生長する子葉の展開までは汚染による影響
が認められず、その後の生長で差が生じていること
は、Cd がケナフの光合成・一次生産を何らかの形
で阻害していることを示している。

各汚染土壌で栽培したケナフの乾燥重量から地上
部と地下部比を求めると、Cd 濃度が 0~14.8 ppm
の植物体では、6.0±0.33 でほぼ一定であったの
に対し、148 ppm を超えると徐々に低下し、444 ppm
の植物体では 1.9 まで低下した (表 1)。Cd は根に
蓄積しやすい重金属であることが知られている⁵⁾。
Cd により地上部に比べ地下部の割合が増加したこ
とは、Cd の影響を強く受け、様々な活性の低下す
る地下部の生物量を増やし、影響の比較的小さい地
上部の活性とバランスをとる順化が行われた可能性
を示唆している。一方、葉と茎の比は、Cd 濃度に

表 1. 様々な濃度の Cd を含む土壌で 31 日間栽培したケナフの発芽率、葉数、全乾燥重量と乾燥重量の比

| Cd 濃度 (ppm) | 0 | 1.48 | 14.8 | 148 | 222 | 444 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|
| 発芽率(%) | 90.0 | 93.3 | 80.0 | 80.0 | 80.0 | 80.0 |
| 葉枚数 | 9.89 | 9.13 | 5.96 | 4.29 | 2.54 | — |
| 全乾燥重量(g) | 31.1 | 28.4 | 24.4 | 2.51 | 1.27 | 0.93 |
| 地上部/地下部 | 6.03 | 5.69 | 6.36 | 4.46 | 2.53 | 1.91 |
| 葉/茎 | 1.25 | 1.16 | 1.15 | 1.25 | 1.23 | 1.13 |

関わらず一定 (1.2±0.06) であった (表 1)。植物でしばしば認められる汚染物質排出に、葉に集積した汚染物質を葉とともに枯死・脱落させる方法がある⁵⁾。ケナフの葉と茎の比が Cd により変化しないことは、葉の脱落による Cd の排出がケナフでは顕著でないことを示している。

275 ml のポットを用いて各 1 個体のケナフを栽培した。それぞれのケナフの地上高と地表の茎直径を測定し、円錐に近似して求めた茎体積を求め、非破壊的に、継続して各個体の生物量を推定した。この結果をもとに生長解析を行なった。Cd を含まない対照土壌では、本葉の展開が始まる播種 2 週間後より、ケナフの茎体積が対数関数的に増加した (図 2)。これに対して、Cd を含む土壌では、本葉の展開が遅延し、展開後も茎体積の増加は 4 週間目まで認められなかった。その後、148 ppm Cd 土壌では体積の低下が始まり、最終的に枯死した。それより Cd 濃度の低い 111 ppm でも、実験期間中の体積の増加は認められなかった。しかし、さらに Cd 濃度の低い 74.1 ppm Cd 土壌では、4 週間目から生長を再開し、6 週間目には 4 週間目の体積の 2.4 倍となった。これらの結果は、ケナフの Cd 耐性の限界が、74.1~148 ppm の間の極めて高い Cd 濃度にあることを示している。また、74.1 ppm Cd 土壌で認められた生長の一時的な停止は、高濃度鉛汚染土壌でのケナフの生長にも認められた現象である⁶⁾。高濃度の重金属に汚染された土壌で栽培されたケナフに認められる、このような生長の一時的な停止と再開後の生長からは、ケナフが重金属汚染土壌で生長するための耐性を獲得するために、一定の時間を必要とすることがわかる。この間、耐性の獲得に関与する遺伝子の発現など、何らかの順化応答を行なっていることが強く示唆された。

様々な Cd 濃度の汚染土壌で栽培したケナフの地上部乾燥重量あたりの Cd 濃度は、土壌の Cd 濃度とともに上昇し、222 ppm Cd 汚染土壌の植物体では 440 ppm に達した。しかし、栽培実験で最終的に

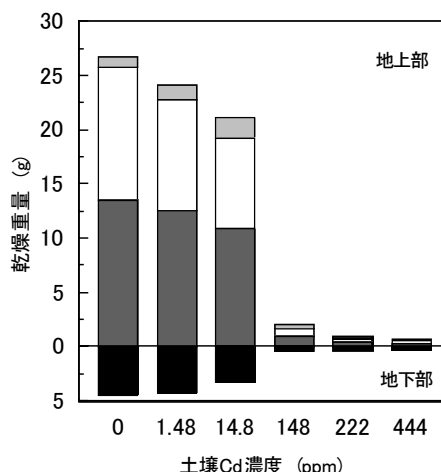


図 1. 様々な濃度の Cd を含む汚染土壌で栽培したケナフ各器官の乾燥重量. 播種後 31 日目の植物体を実験区分毎に全て集め、分裂器官(淡灰), 光合成器官(白), 支持器官(地上部:濃灰, 地下部:黒)に分け、紙袋中、60°Cで 2 週間乾燥させ測定した。

枯死した 444 ppm Cd 汚染土壌の植物体では 290 ppm の Cd しか検出されなかった (図 3)。444 ppm 汚染土壌の植物体以外では、土壌中の Cd 濃度よりも植物体中の Cd 濃度の方が高い値を示し、ケナフにより Cd が濃縮されたことが示された。植物体の Cd 濃度と土壌中の Cd 濃度から濃縮率を求めると、植物体中に最も高濃度の Cd が認められた 222 ppm Cd 汚染土壌で栽培された植物体で 2 倍となった。148 ppm Cd 汚染土壌で栽培された植物体でも濃縮率は 2 倍となったが、14.8 ppm Cd 汚染土壌で栽培された植物体で 3 倍を超える濃縮率を示し、1.48 ppm Cd 汚染土壌で栽培された植物体では、6 倍を超える高い濃縮率を示した (図 3)。これらの結果は、土壌中の Cd 濃度が低い土壌で栽培した植物体中では Cd 濃度は低い、土壌からの濃縮率は高くなることを示していた。本実験では栽培後、約 1 ヶ月で刈り取りを行なったため、植物体の生物量は非常に小さく、実際に土壌から除去された Cd 量は少なかった。しかしながら、東京近郊において夏季に圃場でケナフを栽培する場合には、ケナフが高い一次生産を示し、半年間で、約 2 kg・m⁻²達することが知られている⁷⁾。このようなケナフの高い一次生産量を考慮すると、本研究で示されたケナフによる土壌中の Cd の濃縮能力により、1.48 ppm の Cd 汚染土壌で 18.8 mg・m⁻²、14.8 ppm の Cd 汚染土壌で 98 mg・m⁻²の Cd が 1 回の栽培で回収できることが推定できる。1.48 ppm の Cd 汚染土壌の比重を 0.7 とすると、地表から 30 cm の土壌には約 310 mg の Cd を含む。この結果は、ケナフを用いて土壌から Cd 除去するために、16 年以上の時間を必要とすることも示していた。

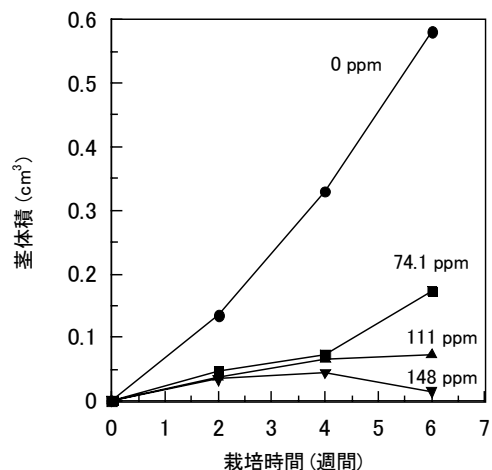


図 2. 茎体積から求めたケナフの生長に対する土壌 Cd の影響. Cd 濃度 0 ppm (●), 74.1 ppm (■), 111 ppm (▲) 148 ppm (▼) の土壌でケナフを栽培し, 2 週間毎に地上高と基部茎直径を測定し, 円錐に近似して茎体積を求めた.

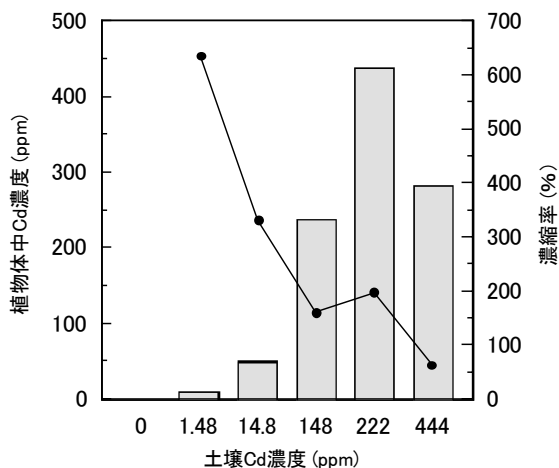


図 3. 様々な濃度の Cd 汚染土壌で栽培したケナフ中の Cd 濃度と濃縮率. 灰棒は植物体中の Cd 濃度を, 黒丸は濃縮率を示す.

植物を高濃度 (30 ppm) の Cd 汚染土壌で栽培した場合、濃縮率は 100% 前後かそれ以下となることから、これまでの研究では、ファイトレメディエーションを Cd の除染に用いることは難しいと考えられていた⁸⁾。しかし、本研究では、ケナフが極めて高い汚染状態にある 74.1~148 ppm の間に生長の耐性限界を持ち、222 ppm の Cd 汚染土壌でも Cd を濃縮できることや、14.8 ppm の Cd 汚染土壌では、高い一次生産すら維持できることなど、Cd 除染にとってこれまでに調べられた植物にない好適な特性を持つことが示された。しかし、本研究の結果からは、高い濃縮率を示し、一次生産が維持される 1.48 ppm、14.8 ppm の Cd 汚染土壌でも、ケナフによる Cd の除染には 16 年以上の時間が見積もられた。土壌からの汚染物質の回収は、回収する植物体の生物量とともに、生物体への汚染物質の濃縮がきわめて重要である。ケナフ以上の一次生産を行い、植物体の生物量が大きくなる植物が少ない。このため、ファイトレメディエーションをより効率的に行うには、植物体に高い濃縮率で Cd を回収することが不可欠であると考えられる。低濃度ほど高い濃縮率で Cd を回収することを示した本研究の結果 (図 3) は、1.48 ppm 以下の低い濃度で汚染された土壌で、ケナフが高濃縮率で Cd を回収する可能性を示唆している。

低濃度汚染土壌でのケナフの Cd 濃縮率、さらに、本実験で行なわれなかったケナフ地下部の Cd 濃縮・回収特性、他品種の特性の検証など、今後明らかにすべき点は多い。しかし、本研究は、ケナフを用いたファイトレメディエーションが、低濃度汚染土壌からの完全な Cd 除去に有効であることを定量

的にあきらかにするものである。

謝辞

本研究は、2005 年度 神奈川大学共同研究奨励金による支援を受けて実施された。本研究を進めるにあたり、多大なるご協力を賜ったスミコンソルテック株式会社の二見達也氏、釜野徳明神奈川大学名誉教授に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) 土壤環境センター編 (2000) 我が国における土壌汚染対策費用の推定—土壌汚染対策費用の推定—土壌汚染浄化費用の推定—。(社) 土壤環境センター。
- 2) 大森俊雄 (2000) 重金属汚染の微生物除去, 第 8 章. 環境微生物学 環境バイオテクノロジー. (株) 昭晃堂. pp. 106-116.
- 3) Schepers T (2003) Phytoremediation of heavy metals from soils. In: *Phytoremediation, Advance S in Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 98-123.
- 4) Kurihara H, Watanabe M and Hayakawa T. (2005) Phytoremediation with Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) for Cadmium-Contaminated Paddy Field in Southwest Area of Japan. *Jpn. J. Soil. Sci. Plant Nutr.* **76**: 27-34.
- 5) Fitter AH and Hay RKM (1987) Ionic toxicity. In: *Environmental Physiology of Plants*, 2nd ed. Academic Press Inc, San Diego. pp.225-259
- 6) Sawakami K, Ohishi F, Kurosawa S and Suzuki Y (2005) Acclimations of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) to Pb in a Polluted Soil. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 63-66.
- 7) 鈴木祥弘, 釜野徳明, 鈴木祐也 (2001) ケナフ (*Hibiscus cannabinus* L.) 12 品種の一次生産速度の季節変化と年間一次生産の違い. *神奈川大学理学部総合理学研究所年報* 2000. **12**: 67-89.
- 8) 館川洋 (1975) 植物を利用した土壌中のカドミウムの除染方法. *農業土木学会誌*. **43**: 674-681.

■原 著■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所協同研究助成論文

アカタテハ属の色彩パターン修飾と分子系統解析

大瀧丈二^{1,4,5} 油井秀臣² 渋谷達明³ 山本晴彦¹

Color-Pattern Modifications and Molecular Phylogenetic Analysis of *Vanessa* Butterflies

Joji M. Otaki^{1,4,5}, Hideomi Yui², Tatsuaki Shibuya³ and Haruhiko Yamamoto¹

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

² STAGE, Shiiku-no-kai, Soja-City, Okayama 719-1126, Japan

³ Olfactory and Gustatory Research Institute, Tsuchiura-City, Ibaraki 300-0038, Japan

⁴ Present Address: Department of Biology, Faculty of Science, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: otaki@sci.u-ryukyu.ac.jp

Abstract: We are interested in the evolutionary relationships and speciation processes among butterflies of the genus *Vanessa* (Lepidoptera, Nymphalidae). We first showed that experimental treatment of pupae with cold shock or tungstate, a protein-tyrosine phosphatase inhibitor, produces a series of unique wing color-pattern modifications in adult butterflies. We found that several *Vanessa* species can be arranged in a progressive series of the systematic color-pattern differences similar to the tungstate-induced modifications. We then investigated the phylogeny of *Vanessa* and its related butterflies in reference to DNA sequences of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 gene and cytochrome oxidase subunit I gene that are known to be highly variable even between closely-related species. Seven species that belong to the conventional *Vanessa* genus were separated into two groups: Five species, *V. indica*, *V. samani*, *V. dejeanii*, *V. buana*, and *V. dilecta*, formed an independent clade with strong bootstrap support (“INDICA Group”), excluding *V. atalanta* and *V. tameamea* as separate species that formed a separate clade (“ATALANTA Group”). Within the INDICA Group, *V. buana* and *V. dilecta* were shown to be sister taxa. They indeed may be considered to be a single species. *V. samani*, *V. dejeanii*, *V. dilecta*, and *V. buana* were shown to be a sister group of species in relation to *V. indica*. Thus, the INDICA Group contains five species with various color-patterns including *V. samani* and *V. dejeanii*, which occupy opposite ends of the progressive color-pattern series. Similarly, the ATALANTA Group consists of two species, *V. atalanta* and *V. tameamea*, whose color-patterns are very different from each other. Thus, our data argue for a speciation model in which *Vanessa* tends to evolve “bi-directionally” to species with large or small orange areas on the forewings beyond phylogenetic constraint and an opportunistic activity of the cold-shock hormone physiologically, but not genetically, “links” ecological selection and color-pattern development of *Vanessa* butterflies. This model also supports the notion that the hypothetical molecular pathway sensitive to cold shock or tungstate was involved in the speciation of *Vanessa* butterflies.

Keywords: Lepidoptera, Nymphalidae, *Vanessa*, color-pattern modification, molecular phylogeny, speciation, cold shock

序論

チョウ類の翅の色彩パターン（色模様）は非常に多様性に富んでおり、古今東西、多くの人々が関心を寄せてきた。おそらくその副産物として、今日までにいくつかの重要な生物学的知見が生み出されてきた。南米のドクチョウ類の観察からベーツが提唱した擬態の概念や、東南アジア諸島のトリバネアゲハ類などの観察を基礎の一つとしてウォレスとダーウィンが提唱した自然選択の概念はその代表例であるといえる。多くのチョウの翅の色彩パターンは、交配相手への視覚シグナルとして機能するばかりでなく、捕食者への警戒シグナルとしても機能するため、それが自然選択における重要な形質の一つであることは疑い得ない。このように、自然選択の結果として生み出されてきたチョウの翅の多様性は、生物の遺伝的な潜在能力を如実に示している好例とみることができる。

生物（特に動物）は種を単位として生殖活動を行い、遺伝物質を次の世代に継承していく。つまり、進化の最小単位は種分化であると考えられることができる。種分化が起こるということは、程度の差こそあれ、表現型に変化が起こるということである。当然のことながら、表現型の変化は遺伝子型の変化を反映する。種分化における遺伝子型の変化については、現在でもほとんど未解明のままであるが、現在の見解では、種分化において新規遺伝子が作り出される必要はなく、「ツールキット遺伝子群」の発現調節の変化が種分化において重要な役割を果たしていると考えられている¹⁾。

このツールキット遺伝子群は、発生過程において機能する、いわゆる「形態形成遺伝子群」に相当する。それらの多くは転写因子である。表現型を上げるための発生過程に関与する遺伝子発現パターンを変化させることが、多くの場合において種分化の必要条件であると推測されている。

そのような発生生物学的な視点から、チョウの翅の色彩パターン形成に関する多くの研究が行われてきた²⁾。特に、眼状紋の形成過程は精力的に研究されており、その中心（焦点）が色彩パターン形成のオーガナイジング・センターとして働いていることが明確となっている³⁻⁶⁾。しかも、チョウの蛹の表面にはオーガナイジング・センターの位置が模様として表出されている場合も多い⁷⁾ため、チョウの翅はパターン形成に関する格好の研究材料となる。ただし、オーガナイジング・センターから分泌されると仮定されているモルフォゲンの実体については不明のままである。

このように、オーガナイジング・センターからのモ

ルフォゲンが色彩パターン形成に重要な役割を果たしていると考えられているが、その一方で、鱗粉細胞にはモルフォゲンを受容するための受容体分子が発現していなければならない。鱗粉細胞に対するモルフォゲンの生理活性は、ホルモン様因子の作用によって修飾されると考えられている。エクジステロイドや仮想的な冷却ショックホルモンなどによる色彩パターン修飾は、ホルモン作用によるモルフォゲン活性の修飾によって起こると考えられている⁸⁻¹²⁾。

我々は、発生過程における翅全体に及ぶ色彩パターン決定メカニズムとその種分化との関係に興味を持っている。この論文では、仮想的な冷却ショックホルモンと同様の効果を持ち、蛋白質チロシン・フォスファターゼ阻害剤であるタングステン酸ナトリウムを色彩パターン形成中の蛹に注射すると、*Vanessa indica*（アカタテハ）および*Cynthia cardui*（ヒメアカタテハ）の色彩パターンを変化させることを最初に示した。また、*Vanessa* 属（アカタテハ属）に含まれる少なくとも6種においては、色彩パターンの定量的比較をもとにして、直線的な色彩パターン系列として種間の色彩パターン関係を捉えることができることを示した。そのような背景を考慮しつつ、*Vanessa* 属およびその近縁属のうち合計12種について、ミトコンドリアの *NADH* デヒドロゲナーゼ・サブユニット5 (*ND5*) 遺伝子とシトクローム・オキシダーゼ・サブユニットI (*CO I*) 遺伝子のDNA配列を対象として種間の系統関係を明らかにすることを試みた。その結果、*Vanessa* 属内では、*V.samani* と *V.dejeanii* が、色彩パターン系列では両端に位置しているにもかかわらず、系統的に近いことがわかった。同様に、*Vatalanta* と *Vtameamea* は、色彩パターンが大きく異なるにもかかわらず、互いに近縁であることがわかった。これらの結果を勘案し、*Vanessa* 属の進化史について総合的に考察した。

尚、今回の助成研究結果は、近々専門誌に発表される予定である。また、この報告書に紹介された内容の一部はすでに発表されているため¹²⁻¹⁵⁾、ここでは要点を述べるにとどめる。詳細については、そちらを参照されたい。

材料と方法

実験動物

沖縄県石垣島にて野外採集された *V. indica* の幼虫を25℃前後で飼育し、フォスファターゼ阻害剤であるタングステン酸ナトリウム（1.0M, 2μL）を蛹化直後の蛹の腹部に注射した。その後、羽化するまで同様の条件下で飼育した。

表 1. 使用された成虫標本に関するデータ

| 種 (species, taxon) | 標本 ID (specimen ID) | 採集地 (locality) | 採集年月 (date caught in the field) | ND5 (GenBank Accession Number) | COI (GenBank Accession Number) |
|------------------------|------------------------|-----------------------------------|--|---|---|
| <i>V. indica</i> | JMO0001(KU) | Kanagawa, Japan | Jun 2004 | DQ028749 | DQ385858 |
| <i>V. buana</i> | JMO0002(KU) | Sulawesi, Indonesia | Aug 2002 | DQ028750 | DQ385867 |
| <i>V. dejeanii</i> | JMO0003(KU) | Mt. Lawu, Central Java, Indonesia | Oct 2000 | DQ028751 | DQ385862 |
| <i>V. tameamea</i> | JMO0004(KU) | Kauai, Hawaii | May 2000 | DQ028752 | DQ385861 |
| <i>V. samani</i> | JMO0005(KU) | Sumatra, Indonesia | unknown | DQ028753 | DQ385863 |
| <i>V. dilecta</i> | JMO0006(KU) | Mt. Mutis, Timor | unknown | DQ028754 | DQ385864 |
| <i>V. atalanta</i> | JMO0007(KU) | Slovakia | Aug 2000 | DQ028755 | DQ385860 |
| <i>B. itea</i> | JMO0008(KU) | Melbourne, Australia | Feb 1996 | DQ028756 | DQ385859 |
| <i>B. gonerilla</i> | JMO0009(KU) | Auckland, New Zealand | Feb 2003 | DQ028757 | DQ385865 |
| <i>C. cardui</i> | JMO0010(KU) | Kanagawa, Japan | Dec 2004 | DQ028758 | DQ385856 |
| <i>C. myrinnna</i> | JMO0011(KU) | Huallega, Peru | Mar 2001 | DQ028759 | DQ385857 |
| <i>C. braziliensis</i> | JMO0012(KU) | Tingo mana, Paru | Jan 2003 | DQ028760 | DQ385866 |
| <i>J. westermanni</i> | JMO0013(KU) | Bangui, Central Africa | Jul 1981 | DQ028761 | DQ385855 |

分類体系と標本

この論文では、議論を簡潔化するために、分類基準として Field (1971)¹⁶⁾ に従い、*Vanessa* 属、*Cynthia* 属、*Bassaris* 属は別属として扱った。この分類体系はやや古く、現在の系統分類学では、これらの属は *Vanessa* 属として統合されている¹⁷⁾。

Field (1971) によれば、*Vanessa* 属には、5 種が認知されている。その 5 種とは、*V. indica*、*V. atalanta*、*V. tameamea*、*V. dejeanii*、および *V. samani* である。*V. buana* および *V. vulcania* は Field (1971) では *V. indica* の亜種として扱われているが、その後、別種として扱われるようになった¹⁸⁾。さらに、近年、*V. dilecta* がチモールから発見され、新種として記載された¹⁹⁾。以上の 8 種のうち、入手困難な *V. vulcania* 以外の 7 種を今回の研究対象とした。さらに、近縁の *Bassaris* 属 2 種、*Cynthia* 属 3 種を含め、合計 12 種について解析した。*Vanessa* 属が含まれる Nymphalini 族の姉妹群である Junoniini 族の一種 *Junonia westermanni* を外群として分子系統樹を作成した。対象とした標本の基本データについては、表 1 にまとめた。

分子生物学的方法・分子系統解析法

DNeasy Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて、成虫の乾燥標本より Total DNA を抽出した。この DNA サンプルについて、*Pfu* DNA ポリメラーゼ (Promega 社) を用いて PCR 反応を行った。PCR 産物は pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen 社) あるいは pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen 社) にクローニング

し、M13R あるいは M13F プライマーによる DNA 塩基配列決定をタカラバイオ社に委託した。

多重配列アラインメントには、ClustalX1.83 を使用した^{20,21)}。系統樹には PAUP*4.0810 を使用した²²⁾。ブーツストラップ値は 1000 回のサンプリングをもとに算出した。

結果

V. indica と *C. cardui* の色彩パターン修飾

蛹化直後の蛹に実験的に冷却ショックを与えると色彩パターン異常個体が得られることが知られている¹⁰⁾。同様の効果を薬理学的に誘導する目的で、我々は蛋白質チロシンリン酸フォスファターゼ阻害剤であるタングステン酸に注目した。*V. indica* にタングステン酸を注射すると、色彩パターンに顕著な修飾

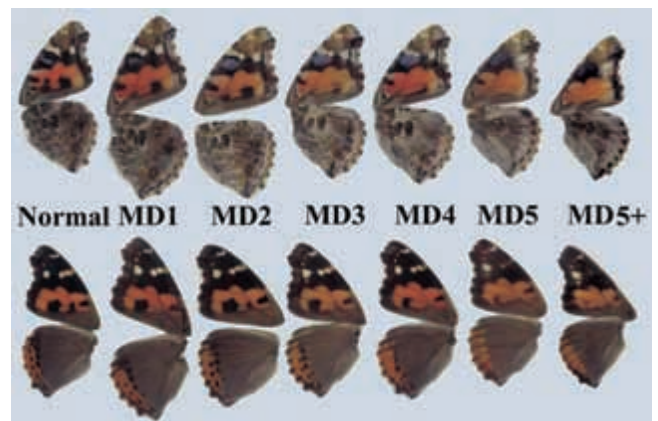


図 1. タングステン酸処理によって色彩パターンが修飾された *V. indica* 個体。上段：腹側（裏）、下段：背側（表）。

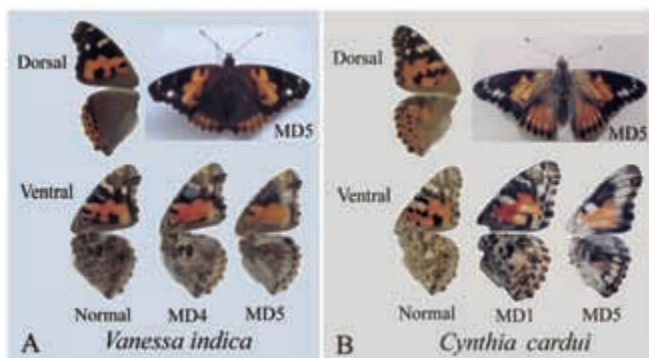


図 2. *V. indica* (A) および *C. cardui* (B) における色彩パターン修飾.

がみられた (図 1)。修飾の程度は個体によって様々であったが、修飾には一定の方向性があり、すべての個体を直線的な系列として並べることができる。修飾程度の最も高いものを MD5 (Modification Degree 5) とし、正常個体 (MD0) を含め、6 段階の階級 (修飾度) を、すべてのパターン・エレメントの変化を総合的に評価したうえで設定した。修飾程度の高いものほど前翅の橙色領域が拡大し、黒斑は減少していく傾向が顕著にみられた。同時に、すべてのパターン・エレメントは基部へ向かって全体的に流れていく傾向にあるが、特に、後翅のパラフォーカル・エレメント (眼状紋よりも外縁側に位置しているエレメント) が翅の基部側に移動することが特徴的であった。このような色彩パターン修飾の傾向は、*V. indica* だけでなく、近縁種である *C. cardui* でも得られた (図 2)。

また、野外において、類似の色彩パターン異常を示す個体が採集される例も少なくないことを付記しておく。これは、野外において、天然の冷却ショックを受けることで生じたものと推定される。

Vanessa 属の色彩パターン系列

前項で得られた色彩パターン系列は、前翅の橙色領域の拡大によって特徴付けられている。ここで、*Vanessa* 属 8 種に目を向けてみると、薬剤処理個体と同じように、それぞれの種によって橙色領域の面積値が異なるのではないかと予想される。前項ではすべてのパターン・エレメントの変化を総合的に評価するために修飾度という概念を用いたが、橙色領域だけに注目してより定量的に議論することは可能である。

そこで、それぞれの種について、前翅面積全体に占める、前翅基部付近の連続する橙色面積の割合を相対橙色領域値 (%) として算出した。すると、予想通り、それぞれの種には固有の相対橙色領域値が認められた (図 3)。*Vanessa* 属 6 種につ

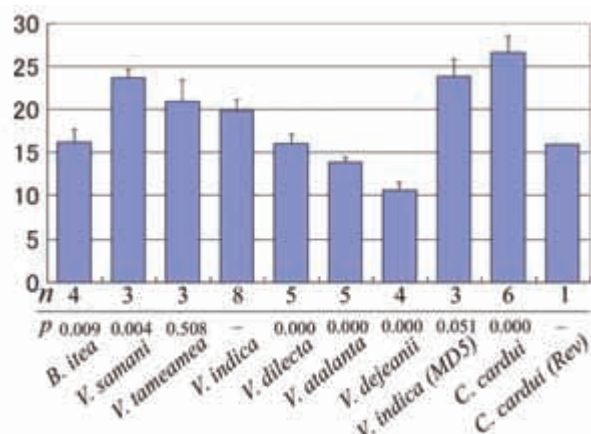


図 3. *Vanessa* 属 6 種およびその近縁種の相対橙色領域値。平均値±標準偏差、対象とされた個体数 (n)、*V. indica* と他種 (他個体) との相違の目安としての p 値 (t テスト) が示されている。

いて、*V. samani*、*V. tameamea*、*V. indica*、*V. dilecta*、*V. atalanta*、*V. dejeanii* の順で、相対橙色領域値の段階的な減少が認められた。この色彩パターン系列においては、*Vanessa* 属を大きく三つのタイプに分けることができる。橙色タイプ (*V. samani*、*V. tameamea*)、中間タイプ (*V. indica*、*V. dilecta*、*V. buana*)、黒色タイプ (*V. atalanta*、*V. dejeanii*) である (図 5 参照)。また、*V. indica* の MD5 個体においては、相対橙色領域値が *V. samani* に匹敵するほど増大していることが明確に認められた。

この色彩パターン系列において、もうひとつ注目すべき形質として、*V. indica* の前翅前縁部黒色域内に位置する「白色帯」がある。橙色タイプに属する種では、2 種ともこの「白色帯」が橙色化しており、黒色タイプに属する種では、2 種とも白色である。さらに、中間タイプに属する種では、橙色のもの (*V. dilecta*)、白色のもの (*V. buana*)、および基本的に白色で一部橙色のもの (*V. indica*) が見受けられる。このように、白色帯の色と相対橙色領域値には単純な相関関係が存在するように思われる。また、白色帯というパターン・エレメントは、タングステン酸による修飾個体では縮小・消失してしまうため、実際の種分化には冷却ショックホルモンのみならず、エクジステロイドなど別の要因も絡んでいることが想像される。

Vanessa 属、*Cynthia* 属、*Bassaris* 属の関係

この論文では、基本的には *Vanessa* 属内の種間関係に焦点が当てられているが、*Vanessa* 属とその近縁属 (*Cynthia* 属および *Bassaris* 属) との関係についても多少言及しておく必要がある。

多重配列アラインメントの結果、3 属 12 種から得られた ND5 および COI の DNA 配列には、長さの

違いは見受けられず、それぞれ 357 bp および 667 bp (合計 1024 bp) となった。近隣接合法 (図 4)、最節約法、最尤法を用いて系統樹を作成したところ、どの系統樹においても、*Bassaris* 属 2 種および *Cynthia* 属 3 種は高いブーツストラップ値で単一のクラスターを形成した。一方、どの系統樹においても、*Vanessa* 属では二つのクラスターが示された。一つは、*V. indica*、*V. samani*、*V. dejeanii*、*V. dilecta*、*V. buana* を含むクラスター (INDICA グループ) であり、もう一つは *V. atalanta* と *V. tameamea* を含むクラスター (ATALANTA グループ) であった。このように、対象としたサンプルが 4 群に分かれることは確実であるが、上記の 4 群の相互関係はそれぞれの系統樹で異なっており、今回の研究では確定できなかった。これらの結果は、*Bassaris* 属、*Cynthia* 属、*Vanessa* 属は明確に区別することができないという現在の系統分類学の結果¹⁷⁾と矛盾するものではない。

Vanessa 属内の種間関係

上記の結果は、*Vanessa* 属、*Cynthia* 属、*Bassaris* 属の関係を明確に示すには至らなかったが、*Vanessa* 属内の種間関係については重要な情報を提供している。*Vanessa* 属の 7 種のうち 5 種 (*V. indica*、*V. samani*、*V. dejeanii*、*V. buana*、*V. dilecta*) は高いブーツストラップ値によって単一のクラスターを形成した (INDICA グループ)。他の 2 種 (*V. atalanta*、*V. tameamea*) は別のグループを形成した (ATALANTA グループ)。

この系統関係において、*V. indica* と *V. buana* は旧来は同種として取り扱われてきたにもかかわらず、単純な姉妹関係にはなっていないということには多少意外性がある。また、*V. buana*、*V. dilecta*、*V. dejeanii*、*V. samani* の 4 種全体が *V. indica* と姉妹関係を形成している。そのうち、*V. buana* と *V. dilecta* は極めて近縁であり、同種としてまとめることも不可能ではないと思われる。

この INDICA グループには、相対橙色領域値が極めて大きい *V. samani*、極めて小さい *V. dejeanii*、中間的な *V. dilecta*、*V. buana*、*V. indica* が含まれている。つまり、相対橙色領域値を基準とした色彩パターン系列は単純に分子系統関係を反映しているわけではないことが判明した。同様に、ATALANTA グループにおいても、色彩パターンが大きく異なる *V. atalanta* と *V. tameamea* が互いに近縁であることがわかった。

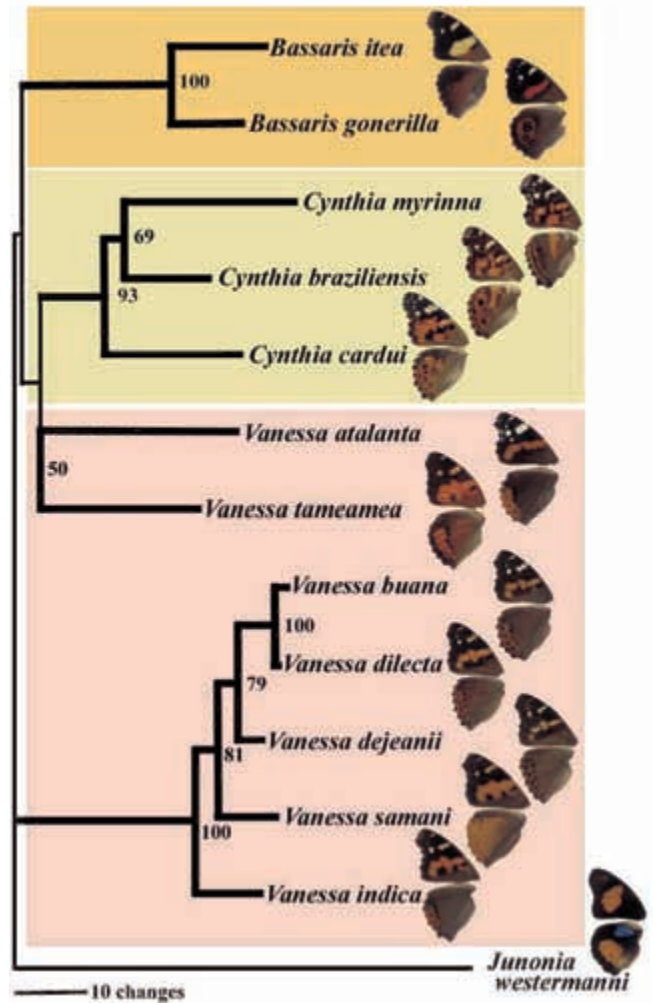


図 4. *Vanessa* 属およびその近縁属の近隣接合法による分子系統樹。数値は 1000 回試行におけるブーツストラップ値。ブーツストラップ値 50%以上の部分を太線で示した。

討論

分子系統関係と色彩パターンの進化

本研究において、我々は *Vanessa* 属における色彩パターン系列と分子系統の関係を明らかにすることを目的とした。両者の間には単純な関係は成り立たないことがわかった。チョウの翅の色彩パターンは近縁種あるいは同種内ですら劇的に変化することがあるため、系統分類の手段としては一般的には用いられない。そのようなことを考慮すれば、色彩パターンと分子系統との関係が単純ではないという結果は、特に驚くには値しない。

一方、分子系統解析から、*Vanessa* 属における相互関係を特定することができた。*Vanessa* 属は、5 種 (*V. indica*、*V. buana*、*V. dilecta*、*V. samani*、*V. dejeanii*) を含む「INDICA グループ」と *V. atalanta* と *V. tameamea* を含む「ATALANTA グループ」に分けられる。これらの分子系統関係を色彩パターン系列に当てはめてみると、種間の相互関

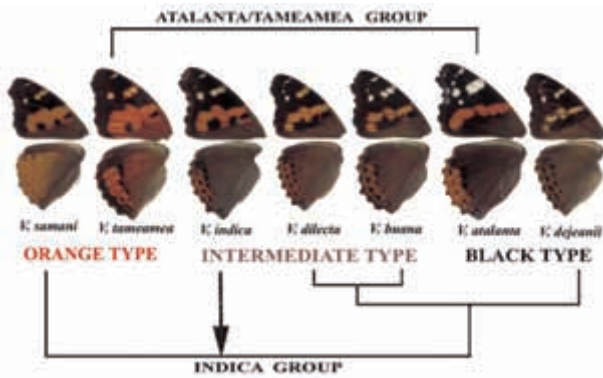


図5. *Vanessa* 属の色彩パターン系列と分子系統との関係. INDICA グループと ATALANTA グループに大きく分けられる.

係がよりよく理解できる (図5)。

後者の ATALANTA グループでは、一種は広い橙色領域を持つ橙色タイプ (*V. tameamea*)、他の一種は狭い橙色領域を持つ黒色タイプ (*V. atalanta*) である。つまり、近縁種同士にもかかわらず、相対橙色領域値は大きく異なっている。前者の INDICA グループでは、中間的な橙色領域を持つ *V. indica* (中間タイプ) が他の 4 種と姉妹関係を形成している。これらの 4 種には、橙色タイプ、黒色タイプ、中間タイプのすべてが存在する。つまり、極めて近縁であるにもかかわらず、INDICA グループ内でも、相対橙色領域値には大きな自由度があるということの意味している。

さらに、*V. indica* の前縁部黒色域内に位置する白色帯の橙色化についても、それぞれのグループに独立に認められることは注目し得る。この白色帯の橙色化現象は、前翅基部の連続的橙色領域が広い(つまり、相対橙色領域値が大きい)種である *V. samani* と *V. tameamea* において明瞭に認められる。このことを考慮すれば、中間タイプを示す 3 種の中でも、*V. dilecta* はより橙色タイプに近く、*V. buana* はより黒色タイプに近いと推測できる。*V. indica* はまさにその中間的表現型を示し、白色帯の一部が、微小ではあるが、明瞭な橙色を呈している。

二方向性進化

Vanessa 属の進化の歴史を再現するために、ここでは、*Vanessa* 属共通の仮想的な祖先種は、*V. indica* に形態的・遺伝的に近かったと仮定してみる。その理由は以下の通りである。第一に、*V. indica* は東洋区および旧北区に広く分布し、Field (1971)¹⁶⁾ によれば、亜種の数 (*V. indica buana* と *V. indica vulcania* も含めて 5 亜種) も *Vanessa* 属内で最大である。これらの事実は、*V. indica* が様々な環境に適応する能力を秘めていることを意味すると考えら

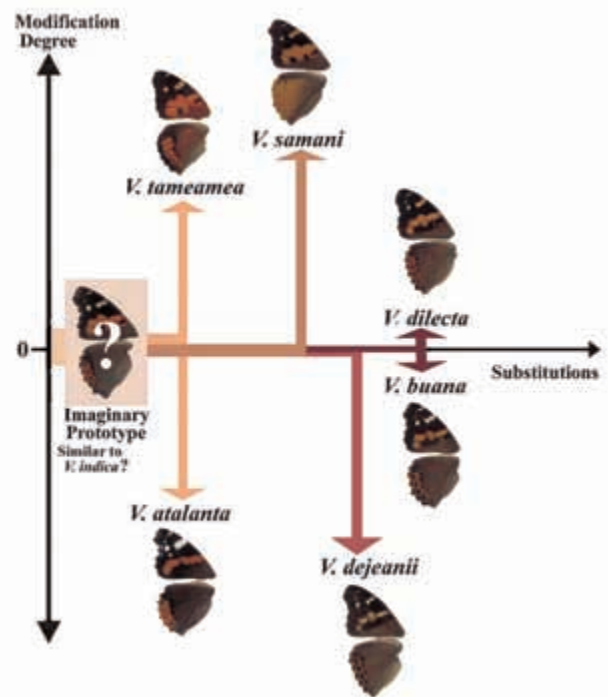


図6. *Vanessa* 属の二方向性進化. *V. indica* に類似していた仮想的なプロトタイプから、ATALANTA グループが、両極端な橙色領域を持つように進化した。同様に、INDICA グループにおいても、両極端な橙色領域を持つものが現われた。

れる。第二に、*V. indica* は色彩パターン系列において中位に位置している。相対橙色領域値を基準に考えると、*V. indica* は中間タイプに属する。そればかりではなく、*V. indica* の白色帯には、小さいが明瞭な橙色領域が認められる。つまり、色彩パターン系列の中間タイプの中でも、最も中間的存在である。この事実も同様に、橙色領域の拡張および縮小のどちらの方向にも進化しうることを意味している可能性がある。第三に、*V. indica* の色彩パターンは *C. cardui* のものに非常に類似している。後者は前者よりも広く北半球に分布しており、*Cynthia* 属の中でも最も特化していない種であると思われる。これらのことを総合して考えると、*Vanessa* 属の共通の祖先は *V. indica* に類似していたと考えてもよいであろう。

この共通の祖先が、橙色領域を拡張あるいは縮小させるように様々な種に分化していったと思われる (図6)。それぞれの種分化にはそれぞれ異なった環境要因が作用したと考えられる。そのような環境要因の一つが、蛹に冷却ショックを与える気温変動であろうと思われる。この推測は、気温変動と同様な表現型模写を *V. indica* の蛹のタンゲステン酸処理によって作出することができ、それらが様々な *Vanessa* 属の種と類似した相対橙色領域値を持つという事実に基づいている。*V. tameamea*、*V. buana*、

V. dejeanii, *V. dilecta* はすべて 1200m 以上の熱帯の高地のみに分布していることは注目に値する。気温変動は、緯度が低く、高度が高いほど大きいことが知られている。ただし、冷却ショックが起こりやすい環境は、*Vanessa* 属の種分化の必要条件ではあっても、決して十分条件ではないであろう。

ここで重要なことは、橙色領域の拡大・縮小が少なくとも独立に 2 回起こっていることである。白色帯について考慮すれば、3 回目が起こりつつあると思われる。このような進化の方向性は、*Bassaris* 属、*Cynthia* 属をはじめ、その他の近縁のタテハチョウ科の属でも決してみられない。*Vanessa* 属のみに、このような進化の傾向があるという事実については、より詳細な説明が求められるであろう。ただし、ある程度類似した進化史は、おそらく *Maculinea* 属（ゴマシジミ属）のチョウでも見られることを付記しておく²³⁾。

生物地理学からの展望

Vanessa 属のうち、2 種 (*V. indica* と *V. atalanta*) は分布域が非常に広い。*V. indica* はアジアを中心に広く分布している。*V. atalanta* は欧米を中心に広く分布している。これら 2 種は広域に分布しているとはいえ、基本的に地理上で棲み分けしており、異所的種分化が行われたことを物語っているように思われる。

それとは対照的に、*V. tameamea* はハワイ諸島のみに分布している。ハワイ諸島内でも、特に山岳地帯に生息する。他の 4 種 (*V. samani*, *V. dejeanii*, *V. dilecta*, *V. buana*) はすべてインドネシアの島々に生息するが、それぞれ別々の島の限られた山岳地帯のみに分布している (図 7)。インドネシアに分布する 4 種に関しては、分子系統樹において単一のクラスタを形成している (図 4 参照)。



図 7. インドネシア諸島における *Vanessa* 属の分布。アジア大陸から仮想的な祖先が侵入し、隔離された結果、INDICA グループを形成するようになったと考えられる。

このように考えると、想像上の祖先は東洋区からインドネシアへ移動してきたのではないかと推測される。それらが高地において冷却ショックという環境要因にさらされる中で、異所的に種分化が進行した結果、INDICA グループが形成されたと考えられる。また、同様に、想像上の祖先は欧米およびハワイ諸島にも分布を広げ、ATALANTA グループを形成するようになったと考えられる。

「副作用」モデル

Vanessa 属の進化史について上述の結果を考慮しつつ、その分子的基盤について考えてみたい (図 8)。

仮想的な祖先種がインドネシア諸島やハワイ諸島に移動したあと、熱帯の高山地帯などに隔離されたとする。そのような場所では、短期間でも寒暖の差が激しく、蛹は冷却ショックを受けやすい。冷却ショックを受けた個体では、細胞を冷却ショックから保護する機能を持つ仮想的な冷却ショックホルモンが血リンパ中に分泌される¹²⁻¹⁵⁾。このホルモンは、受容体型チロシンキナーゼを活性化することで細胞の冷却ショック耐性を高める働きを持つ。このホルモンを迅速に分泌できるような遺伝子型を持つ個体は、冷却ショックを伴う環境条件においてより確実に生存することができる。

しかしながら、このホルモンは鱗粉細胞に作用すると、その「副作用」として色彩パターンを変えてしまうと推測される。細胞の保護に適切な量のホルモンを迅速に分泌できる個体が、冷却ショックによる死亡を避けることができるが、その「副作用」として色彩パターンが変化してしまう。冷却ショックに耐えて生き残った個体でも、色彩パターンが変化しているため、同種他個体に対して「魅力的な」視覚シグナルを発することはできない。その結果、多くの子孫を残すことができない。このようなサイクルが続けば、基本的にはその個体群は消滅してしまうであろう。

しかしながら、冷却ショックによる修飾個体のうちでも、*Vanessa* 属のリリーサー・シグナルにより「魅力的」に修飾された個体が現われたとする。あるいは、冷却ショックによる修飾パターンを好む個体が突然変異によって偶然に出現したとする。すると、そのような個体間で急速に選択的交配が進む結果、個体群の中に冷却ショックホルモンをよりの確に分泌する遺伝子型が広まり、ついには固定されるようになる。その結果として、*Vanessa* 属に新種が確立されるのである。

このような冷却ショックホルモンの「副作用」に起因すると推測される二方向性の進化が、*Vanessa*

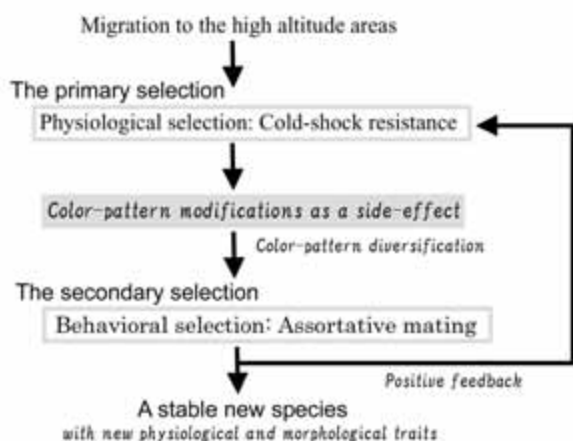


図 8. *Vanessa* 属進化の副作用モデル。

属の二つのグループ（INDICA グループと ATALANTA グループ）で同時に起こっていることは注目に値する。このような種分化は *Cynthia* 属、*Bassaris* 属、あるいは他の近縁のタテハチョウ科の属では決してみられない。なぜこれが *Vanessa* 属に限定された現象なのかは現在のところまったく不明である。今後、冷却ショックホルモンの分子の実体を明らかにし、その発現調節機構を解明すれば、ある程度はそのような謎に迫ることができるだろう。

ただし、前翅前縁部の白色帯は、タンゲステン酸処理個体では、縮小・消失してしまうため、必ずしも、冷却ショックホルモンによる色彩パターンだけが種分化に関与しているのではないこともまた確かである。*Vanessa* 属におけるエクジステロイドの影響も現在検討中である。エクジステロイドを投与された個体は全体的に黄色化し、色彩のコントラストが低くなるが、タンゲステン酸のようにみごとに橙色領域が拡大することはない(大瀧、未発表)。また、冷却ショック処理ではなく、長期的な低温処理においては、黒色領域が拡大することが判明した(大瀧、未発表)。これは *V. dejeanii* や *V. vulcania* を思わせるパターンである。今後は、これらの実験結果をもとに、生態、形態、生理、分子などの様々なレベルで *Vanessa* 属の種分化のメカニズムについて探っていきたい。

謝辞

本研究は、2005 年度神奈川大学総合理学研究所産学共同プロジェクト助成のもとに行われた。

文献

- 1) Carroll SB, Grenier JK, and Weatherbee SD (2001) *From DNA to Diversity*. Blackwell Science, Malden.
- 2) Nijhout HF (1991) *The Development and Evolution of Butterfly Wing Patterns*. Smithsonian Institution Press, Washington.

- 3) French V and Brakefield PM (1992) The development of eyespot patterns on butterfly wings: Morphogen source or sinks? *Development* **116**: 103-109.
- 4) Brakefield PM and French V (1995) Eyespot development on butterfly wings: the epidermal response to damage. *Dev. Biol.* **168**: 98-111.
- 5) French V and Brakefield PM (1995) Eyespot development on butterfly wings: the focal signal. *Dev. Biol.* **168**: 112-123.
- 6) Brakefield PM Gates J, Keys D, Kesbeke F, Wijngaarden PJ, Monteiro A, French V and Carroll SB (1996) Development, plasticity and evolution of butterfly eyespot patterns. *Nature* **384**: 236-242.
- 7) Otaki JM Ogasawara T and Yamamoto H (2005) Morphological comparison of pupal wing cuticle patterns in butterflies. *Zool. Sci.* **22**: 21-34.
- 8) Koch PB and Bückmann D (1987) Hormonal control of seasonal morphs by the timing of ecdysteroid release in *Araschnia levana* L. (Nymphalidae: Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* **33**: 825-829.
- 9) Koch PB Brakefield PM and Kesbeke F (1996) Ecdysteroids control eyespot size and wing color pattern in the polyphenic butterfly *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Satyridae). *J. Insect Physiol.* **42**: 223-230.
- 10) Nijhout HF (1984) Colour pattern modification by coldshock in Lepidoptera. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **86**, 191-203.
- 11) Rountree DB and Nijhout HF (1995) Hormonal control of a seasonal polyphenism in *Precis coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J. Insect Physiol.* **41**: 987-992.
- 12) Otaki JM (1998) Color-pattern modifications of butterfly wings induced by transfusion and oxyanions. *J. Insect Physiol.* **44**: 1181-1190.
- 13) Otaki JM and Yamamoto H (2004) Species-specific color-pattern modifications on butterfly wings. *Dev. Growth Differ.* **46**: 1-14.
- 14) Otaki JM and Yamamoto H (2004) Color-pattern modifications and speciation in butterflies of the genus *Vanessa* and its related genera *Cynthia* and *Bassaris*. *Zool. Sci.* **21**: 967-976.
- 15) Otaki JM, Ogasawara T and Yamamoto H (2005) Tungstate-induced modifications of butterfly wings are independent of stress response and ecdysteroid effect. *Zool. Sci.* **22**: 635-644.
- 16) Field WD (1971) *Butterflies of the genus Vanessa and of the resurrected genera Bassaris and Cynthia* (Lepidoptera: Nymphalidae). In: *Smithsonian Contributions to Zoology 84*. Smithsonian Institution Press, Washington.
- 17) Wahlberg N Brower AVZ and Nylin S (2005) Phylogenetic relationships and historical biogeography of tribes and genera in the subfamily Nymphalinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **86**: 227-251.
- 18) Leestmans R (1978) Problèmes de spéciation dans le genre *Vanessa*. *Vanessa vulcania* Godart *stat. nov.* et *Vanessa buana* Frhst. *stat. nov.*: bonae species (Lepidoptera Nymphalidae). *Linn. Belgica* **7**(5): 130-156.
- 19) Hanafusa H (1992) Three new Nymphalid butterflies from Indonesia and Philippines. *Futao* **10**: 1-2.

- 20) Higgins DG and Sharp PM (1988) Clustal: A package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244.
- 21) Thompson JD Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG (1997) The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* **25**: 4876-4882.
- 22) Swofford DL (2000) *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods* (software). Sinauer Associates, Sunderland
- 23) Otaki JM and Yamamoto H (2003) Color-pattern modifications and speciation in lycaenid butterflies. *Trans. Lepidopterol. Soc. Jpn* **54**: 197-205.

■原 著■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

アルビノ-アフリカツメガエル胚に対する微量注射技術を用いた 半透明な脳室形態並びに脳室内液流の可視化

松谷武嗣¹ 茂木和枝² 日野晶也¹ 小笠原強^{1,3} 竹内重夫¹ 豊泉龍児^{1,4}

Visualization of the Semitranslucent Brain Ventricle and Its Fluid Flow Using Microinjection Technique for Albino *Xenopus laevis* Larvae

Takeshi Matsuya¹, Kazue Mogi², Akiya Hino¹, Tsuyoshi Ogasawara^{1,3},
Shigeo Takeuchi¹ and Ryuji Toyoizumi^{1,4}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science,

² Research Institute for Integrated Sciences, and

³ High-tech Research Center, Faculty of Science, Kanagawa University, Tsuchiya 2946, Hiratsuka,
Kanagawa, 259-1293, Japan

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

Abstract: In vertebrates, the central nervous system (CNS) develops as a tube called the neural tube. Ependymal cells seal the inner surface of the brain ventricle, and movement of the cilia on the apical surface of the ependymal cells generates fluid flow called cerebrospinal fluid flow. The role of cerebrospinal fluid flow for the process of neurogenesis and regionalization of the CNS remains unveiled. In this study, using albino larvae of *Xenopus laevis*, we report a new methodology to clearly visualize the semitranslucent morphology of the brain ventricle and patterning of the fluid flow within the cavity during amphibian CNS development. Microinjection of the quantum dot (fluorescent nanocrystal) through the roof plate of the fourth ventricle rapidly and efficiently visualized the whole brain ventricle under fluorescent micrography, enabling us to trace the complicated morphology during development of the third, fourth and lateral ventricles. Microinjection of polystyrene beads (3.1 μ m in diameter) into the fourth ventricle also efficiently dispersed into every corner of the brain ventricle. This technique revealed that fluid flow within fourth ventricle displays dorso-ventral asymmetry. In 60% of the embryos examined, the rearward fluid flow within the third ventricle shifted to the left at the dorsal portion of the ventricle, whereas, in the other larvae, it was quite bilateral. These results suggest that fluid flow within the developing CNS is generated by a highly integrated, position-dependent metachronal wave of cilia on ependymal cell surfaces. This report is the first description of left-right asymmetric fluid flow in the brain ventricle of vertebrates, encouraging us to examine the relationships between the laterality of tadpole behavior and left-right asymmetry underlying the molecular anatomy of the developing brain.

Keywords: albino, cerebrospinal fluid flow, nanocrystal, polystyrene beads, left-right asymmetry

序論

脊椎動物の脳の中心部には脳室と呼ばれる腔所があり、脳室は発生初期の脳の形態形成時に出現する。脳室は脳の正常な発生のために必要な構造であり、その形状は発生に伴う脳の部域化と共に変化する。脳室内部は

脈絡叢から分泌される脳脊髄液で満たされており、脳室の内表面は上皮性の上衣細胞(ependymal cell)で覆われている^{1,2,3)}。上衣細胞の表面には繊毛が生えており、その繊毛の運動によって脳脊髄液が一定の速度で

流動することが、ヒト成人の脳室内液流を MRI などの手法で調べた低解像度の研究から指摘されている⁴⁷⁾。しかしながら、胎児期/発生初期の脳室内液流が担っている機能に関する研究は極めて少ない⁸⁾。脳室内の液流は、どの発生段階から生じ始め、発生の進行に伴ってどのように変化していくのか、また特定の発生段階において脳室内液流は一定の流動パターンを示すのか、即ち発生プログラムの制御下にあるのかという問題については、哺乳類胚を含め、脊椎動物胚全般を見渡しても殆ど知見がない⁹⁾。脊椎動物の神経発生における脳室内液流の役割に関する研究が進んでいない理由のひとつとして、脳室内液流研究の適切な実験モデルが確立していないことが挙げられる。このような背景を踏まえ、我々は、比較的容易に入手可能な両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のアルビノ幼生の脳領域は比較的透明度が高いことに着目した。野生型のアフリカツメガエル幼生では、幼生全体の透明度が高くなる発生段階にメラノフォアでメラニン色素が合成され、着色したメラノフォアが中枢神経系の背側を覆うように分布するので脳胞構造の観察が妨げられるが、アルビノの幼生ではメラニンが合成されないため、野生型幼生よりも遙かに頭部の観察に都合がよい。そこで我々は、ツメガエルのアルビノ幼生の脳室内に毒性の低い蛍光試薬を注入すれば、生きている状態で脳室構造の観察が可能となり、脳室内液流の研究の良いモデル実験系になると考えた。本研究では、アルビノのアフリカツメガエル幼生を研究対象として、生きた個体内での脳室内液流の可視化を行った。研究の第一段階として、蛍光色素を微量注射し脳室を可視化することで脳室の発生に伴う形態変化を追跡した。第二段階として、脳室内液流を可視化することで脳脊髄液の流動のパターンの調査を行った。

本研究は、神経発生における脳室内液流の役割を解析するための実験モデルを確立することを志向した萌芽的研究であり、このような研究の方向性は、脳脊髄液と相関する水頭症や脊髄空洞症などの病態の理解に寄与してゆくことが期待される。

材料と方法

アルビノのアフリカツメガエル雌雄成体に、生殖腺刺激ホルモンである gonadotrophin を皮下注射し(雌 400 unit、雄 200 unit)、自然交配により有精卵を得た。胚が胞胚期に達するまでに、チオグリコール酸溶液(pH8.6)で有精卵のゼリー層を除去した後に、人工淡水である 10% Steinberg 氏液を満たしたシャーレ中で実験に必要とする発生段階(stage 41-48)に達するまで 15-26°C のインキュベーター内で飼育した。発生段階の同定は、Nieuwkoop と Faber の 1967 年の発生段階表

に従った¹⁰⁾。

蛍光試薬

脳室の標識に使用する蛍光試薬としては、蛍光色素の FITC-dextran (50mg/ml DDW) と、超微粒子である量子ドット(nanocrystal)の Qdot655 (Quantum Dot Co., USA) 懸濁液を原液(2 μ M)のまま用いた。stage 41-48 の幼生頭部の脳室内に、これらのいずれか一方を 1 個体あたり 5nl ずつ注射した。

微量注射

微量注射の際には、10% Steinberg 氏液で希釈した 0.01% MS-222 溶液中に幼生を入れて全身麻酔をかけた後に、同濃度の MS-222 溶液を満たしたテラサキプレート(住友ベークライト製)のウェルとウェルの間隙に並べ、Drummond 社製の微量注射器「Nanoject」を用いて、脳室の中で最も広い第 4 脳室の蓋板(roof plate)を通して、その後方背側から前方腹側めがけて正中線上で低角度に注射針を差しこみ、蛍光試薬を注射した。その後、主に注射当日から翌々日にかけて蛍光像を観察した。

蛍光観察

蛍光による脳室形態の観察の際には、落射蛍光ユニットを装着した蛍光実体顕微鏡(オリンパス, SZX12)下で、幼生頭部に励起光を照射し、蛍光フィルターを通して主に背側から観察し、脳室を可視化する蛍光試薬としての有用性を検証した。FITC-dextran 注射時の励起光の波長は 460-490nm、Qdot655 注射時の励起光の波長は 545-580nm のバンドパスの励起フィルターをそれぞれ使用した。予備実験の結果、脳室の詳細な形態観察には、主に Qdot655 を蛍光試薬として用いた。蛍光で可視化した脳室像は、顕微鏡用デジタルカメラ(オリンパス, DP-70)で撮影した。

ビーズを用いた脳室内液流の可視化

脳脊髄液の流動パターンの観察には、予備実験の結果、観察に最適と思われた平均直径 $3.135 \pm 0.146 \mu\text{m}$ の無着色のポリスチレンビーズ(Polysciences Inc., USA)の懸濁液を脳室内に注入することで液流を可視化した。stage 47-48 に達するまで飼育した幼生を上記の手順で麻酔をかけ、テラサキプレート中に並べ、微量注射器「Nanoject」を用いて 1 個体あたり 50nl のビーズ懸濁液(原液を 20 倍に DDW で希釈)を第 4 脳室内に注入した。CCD カメラ装置(ニコン, CS5270B)を装着した SZX12 実体顕微鏡下で、注入したビーズの動きを観察し、30fps の密度で DVD ディスクに記録し(総合倍率 $\times 250$)、コンピュータ上で脳脊髄液の流動パター

ンを解析した。脳室内に注入したポリスチレンビーズの観察に際しては、SZX12 の高級架台(型番 SZX-ILLB100)からの透過光と、斜め上方から照射した冷光装置の反射光の 2 種類の光を当て、ポリスチレンビーズが白く光る状態で、なおかつ脳室形態が判別できるように、双方の光量を調節した。

結果

Qdot で可視化される脳室・脊髓中心管について

FITC-dextran を第 4 脳室内に注射した幼生では、約 60 分後には脳室だけではなく中枢神経系全体が緑色の蛍光によって染色された(図 1b)。しかし、Qdot655 を脳室内に注射した幼生では、注射当日の間は、脳室のみが FITC-dextran よりも強い蛍光強度で鮮明に可視化された(図 1d)。注射 1 日後の蛍光を比較すると、FITC-dextran を注射した幼生では、蛍光が脳組織から滲出し、頭部を中心に体全体に広がっていたが、Qdot655 を注射した幼生では脳組織内への蛍光の広がりには生じたが、FITC-dextran に比べて脳組織の外側への Qdot655 の滲出は遙かに少なかった(図 2a)。以上の結果から、FITC よりも Qdot の方が生きたツメガエルアルビノ幼生の脳室形態の観察に適した蛍光ツールであることが明らかになった。

Qdot655 注射 1 日後の幼生では、脳室から脊髓中心管へとラベリングが進行した(図 2a)。さらに、Qdot655 注射 2 日後には赤色蛍光が脊髓神経の尾端にまで行き

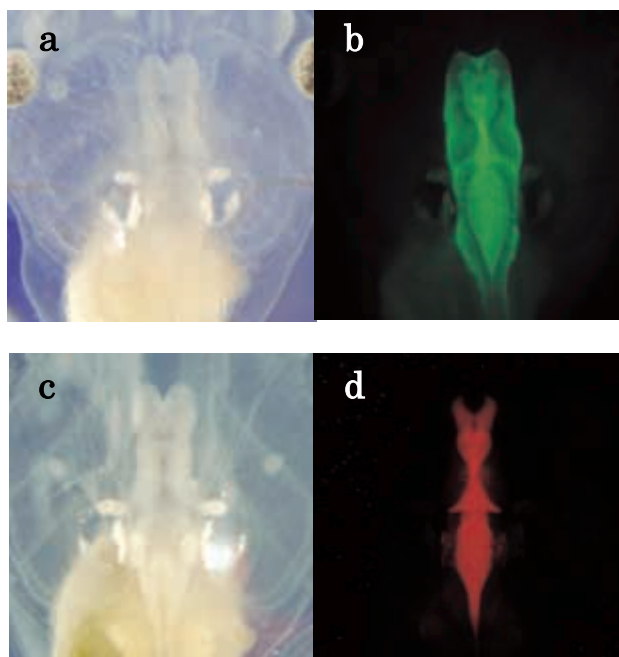


図 1. 蛍光試薬の比較。FITC-dextran を脳室内に注射した幼生(a, b)と Qdot655 を脳室内に注射した幼生(c, d)。同一胚を同一視野で撮影した反射光像(a, c)と蛍光像(b, d)を示す(dorsal view)。注射当日、FITC-dextran は脳室周辺領域も染めたが、Qdot655 は脳室のみを染めた。

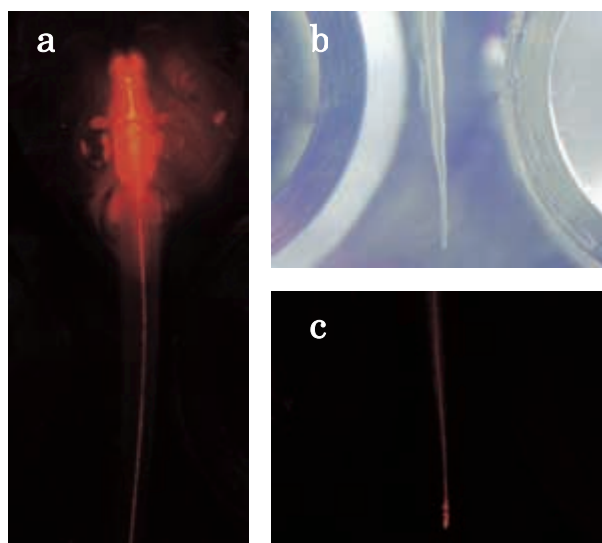


図 2. 脊髓中心管の蛍光。(a) Qdot655 を脳室内に注射してから 1 日後の幼生の蛍光像 (dorsal view)。 (b, c) Qdot655 注射 2 日後の幼生。同一幼生を同一視野で撮影した反射光像と蛍光像 (dorsal view)。脊髓中心管の隅々まで Qdot が行き渡り、特に尾の末端に強い蛍光が見られた。

渡っており、しばしば尾端部には特に強い蛍光のスポットが観察された(図 2b, c)。FITC-dextran を用いた場合には、注射 1 日後には頭部を中心に幼生全体に緑色蛍光が散逸してしまい、脊髓中心管は後脳に接した頭部側の一部を除き、ラベリングされることはなかった。

次に Qdot655 注射幼生の生存率を調査した。脳室内に Qdot655 を注射し MS-222 存在下で麻酔したまま観察した幼生を、観察終了後に通常の人工淡水(10% Steinberg 氏液)に戻すと、数分後に麻酔から覚醒し、再び遊泳を開始した。Qdot655 を注射した幼生を、汲み置き水(約 1 週間取り置いた水道水)を満たした 12 穴のポリスチレン製浮遊培養用テストプレート(岩城硝子製)に 1 穴につき 2 個体ずつ静置し、18°C で 5 日間飼育し、長期生存率を調査した結果、Qdot655 を脳室内に注射した幼生は無処理の幼生と比較して生存率は低かったが、注射 5 日後では注射幼生総数の 3 分の 2 にあたる 16 個体の幼生が生存していた(表 1)。Qdot655 を注射した個体は、麻酔から覚醒した後、長期飼育中に異常な行動を示すことはなく、Qdot が中枢神経系の機能に悪影響を与えていないことが示唆された。

各発生段階の脳室形態を比較すると、stage 41-48 で脳室形態が絶え間なく変化している様子が観察された。脳室の前端にある第 3 脳室は、発生の進行に伴いその容積を拡大していった。stage 46 になると第 3 脳室の前端が左右に分離し始め、側脳室が形成され始めているのが観察された(図 3d-f)。

表 1. Qdot655 を脳室内に注射した幼生の長期生存率.

| | 0日 | 1日 | 2日 | 3日 | 4日 | 5日 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Qdot 655 | 100% 24/24 | 88% 21/24 | 79% 19/24 | 79% 19/24 | 71% 17/24 | 67% 16/24 |
| 無処理 | 100% 12/12 | 100% 12/12 | 100% 12/12 | 100% 12/12 | 100% 12/12 | 92% 11/12 |

上段は生存率, 下段は生存数 / 注射幼生数.

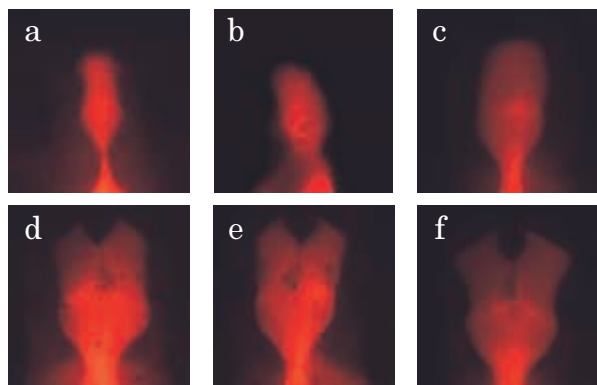


図 3. 第 3 脳室とそこから派生する側脳室の形態 (dorsal view). (a) stage 41-42. (b) stage 42-43. (c) stage 44-45. (d) stage 46. (e) stage 47. (f) stage 48 後期.

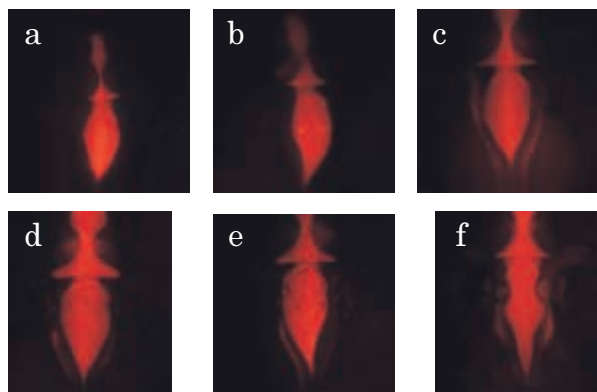


図 4. 第 4 脳室の形態 (dorsal view). (a) stage 41-42. (b) stage 42-43. (c) stage 44-45. (d) stage 46. (e) stage 47. (f) stage 48 後期.

CNS 後方の脳室である第 4 脳室は、stage 41-42 の幼生では菱形に近い形態をしていたが、発生の進行に伴ってその容積を拡大し、同時に、第 4 脳室の前端部は丸みを帯びて楕円形に近い形態へと変化していった (図 4)。さらに、stage 48 の後期には、第 4 脳室の側面に位置する内リンパ嚢が肥大成長し、それに圧迫される形で、第 4 脳室の中央部分の両側面に括れが出来るのが観察された (図 4f)。

脳室内液流のパターニングについて

脳脊髄液の流動パターンは、脳室内に注入したビーズを背側から観察し、その動きを解析することで可視化することが出来た (図 5)。胚側面からの観察では、頭蓋部の組織の厚みと湾曲に妨げられて、ビーズの動きをトレースすることは殆ど出来なかった。

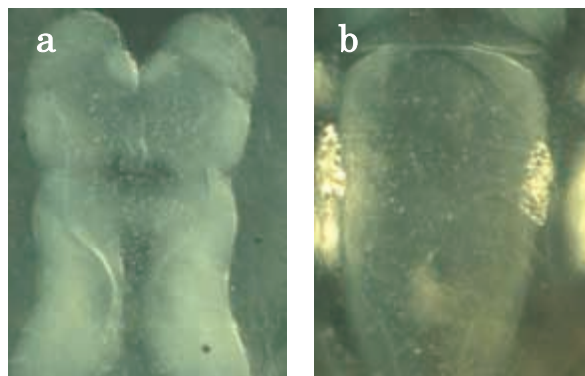


図 5. 脳室内に注入されたビーズ (dorsal view). (a) 第 3 脳室. (b) 第 4 脳室. 第 4 脳室に微量注射したビーズが、脳脊髄液の循環によって数分後には第 3 脳室にまで拡散していた。

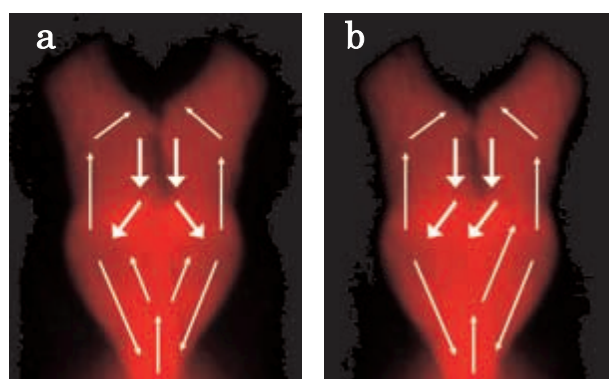


図 6. 第 3 脳室における脳脊髄液の流動パターンの模式図 (dorsal view). (a) 左右対称の液流を示したケース. (b) 左右非対称の液流 (左寄り) を示したケース. 太い矢印は、移動速度の速いビーズの流れを示している。

第 3 脳室の脳室内液流については、脳室の上層と下層でのビーズの流動パターンに大きな差異は見出されなかった。第 3 脳室背側の蓋板付近中央部では、録画した 37 個体のうち 22 個体 (59.5%) でビーズの流れに左右非対称性が観察され、15 個体 (40.5%) で左右対称なビーズの流れが観察された (図 6a)。液流が左右非対称性を示した 22 個体のうち、21 個体は左寄り (図 5a の撮影個体)、1 個体では右寄りの液流が認められた。また、観察した全ての個体において、第 3 脳室の蓋板付近中央部のビーズ移動速度は、第 3 脳室内の他領域のビーズの移動速度よりも遙かに速かった。

一方、第 4 脳室および中脳水道では、脳室の上層と下層でビーズの流動パターンが大きく異なっていた (図 7)。第 4 脳室では、ビーズの流れは左右対称で、脳室の左右両側面の脳室壁付近でビーズの移動速度が速く、脳室底に近い下層から蓋板に近い上層へとビーズが上昇していた。上層へと移動したビーズは脳室壁、蓋板に沿って左右両側から上層中央に移動し、ビーズは正中部分で下層へと下降していた (図 7a)。第 4 脳室下層におけるビーズの流れは、正中線上では直線状に尾部方向へと、その他の領域では後方に流されつつも

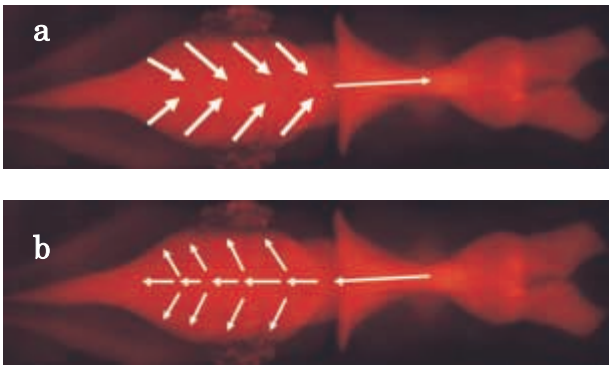


図 7. 第 4 脳室・中脳水道における脳脊髄液の流動パターン
の模式図 (dorsal view). (a) 脳室の上層でのビーズの流動
パターン. (b) 脳室の下層でのビーズの流動パターン. 太い
矢印は、移動速度の速いビーズの流れを示している.

左右両側の脳室壁方向に向かうという、主に 2 方向の流れを形成していた(図 7b)。第 4 脳室上層におけるビーズの流れは、左右の脳室壁付近で前方に移動しながら上昇し、上層中央部でビーズがやや後方へ引き戻されながら下降し、この上昇と下降を繰り返しながら、第 4 脳室上層全体としては、ビーズは概ね頭部方向へと分散していった。

第 4 脳室と第 3 脳室を連絡している中脳水道の部分では、ビーズは蓋板に近い上層では頭部方向へと直線的に移動し、脳室底に近い下層では尾部方向へと直線的に移動していた。第 4 脳室に注入したビーズは(数分後には)速やかに第 3 脳室へと分散していったので、狭隘な中脳水道を頭部方向に向けて流れる液流にビーズが運搬されて第 3 脳室に効率よく運ばれたと考えられ、ツメガエル幼生の脳室内液流が強く速いものであることを示唆している。実際、第 3 脳室や第 4 脳室のビーズ流の運動スピードは 30fps のフレームレートでぎりぎり撮影可能となるような、毎秒めまぐるしくビーズ相互の位置関係が変わるものであった。

討論

本研究で用いた量子ドットは、蛍光強度が極めて強い、細胞毒性が低い、ならびに、全く褪色しないという特性から、細胞生物学分野で近年急速に普及している蛍光標識薬である^{11,12,13}。我々は、これをアフリカツメガエル脳室の可視化に適用し、一定の成果を得ることが出来た。脳室の形態形成には、細胞層の増殖パターンの他に、脳室という閉空間に封入された脳脊髄液の作り出す脳圧が関与することが明らかになりつつある¹⁴。量子ドットの蛍光像が明らかにした目まぐるしい脳室形態の変化は、脳胞全体で統合された脳組織の分節的な増殖パターンや、脳胞を構成する CNS 前駆細胞の脳圧に対する生理的応答に加え、脳室を括る方向に働く収縮力の存在を予想させる。脳室内での液流は、

三次元的な複雑な流動パターンを生成していることが明らかになったが、第 3 脳室背側における左右性のある液流パターン(図 6)を除いては、個体差に乏しく、脳室内液流がランダムな繊毛運動の産物ではなく、発生プログラムに従って部域特異的に運動方向を統合された、高度に同調的な繊毛波の産物であることを示唆する。第 3 脳室においては、左右非対称な液流を示す個体と示さない個体があったが、観察に用いた幼生の発生段階である stage 47-48 が、左右非対称から両側性に、あるいはその逆の、液流の側性の切り替えが起こる発生段階であるためかも知れない。今後、前後の発生段階の幼生における脳室内液流パターンの観察が必要となる。

第 3 脳室背側の左右非対称な脳室内液流の役割

ヒトを含む霊長類の脳は、側頭回やシルビウス溝などいくつかの領域で左右非対称性を示し、左脳と右脳との機能的分業と脳の神経解剖学的な左右非対称性とが密接に関連することが知られている。一方、両生類においては、幾つかの種において、間脳背側の神経核である手綱核が、変態期幼生や成体において形態的な左右非対称性を示すことが 20 世紀前半から知られていたが¹⁵、脳の他の領域に左右非対称性があるか否かに関しては報告がない。また、本研究で用いたアフリカツメガエルの手綱核は、終生左右対称とされる。下等軟骨魚類の手綱核の非対称性が報告されていたにもかかわらず、硬骨魚類の脳については、両生類とは異なり終生左右対称であると 20 世紀末まで信じられていた¹⁶。しかしながら、共焦点レーザー顕微鏡技術の進展に伴い、2000 年ごろから、孵化直後のゼブラフィッシュ幼魚において、手綱核の神経回路網が、一過的に左手綱核で肥大し、より緻密になることが報告された¹⁷。更に、手綱核近傍の組織である松果複合体を形成する副松果体も、正中よりも左寄りに位置することが報告された^{18,19}。

両生類脳の左半球と右半球との機能的分業の存否については、長らく不明であったが、1990 年代になって、嘔吐行動や、幼生の驚愕反応(逃避的遊泳行動)などに左右非対称性があることが相次いで報告され、その高次行動に「利き脳」があることが明らかになった²⁰⁻²⁴。しかしながら、これまで「利き脳」の存在が報告された種の多くは、*Rana* 属や *Bufo* 属の比較的高等な無尾両生類であり、本研究で用いた *Xenopus laevis* などの最も下等な水棲無尾両生類であるピバ科の種において、利き脳の明快な左右性を示した研究はない。

硬骨魚類ゼブラフィッシュにおいては、*nodal*, *lefty* (*antivin*), *pitx2* の 3 種類の遺伝子が、孵化直後のごく短期間において、間脳背側の視床上部の一領域(おそら

くは手綱核、副松果体の原基を形成する発生拘束を受けた一領域の左側に偏って発現することが1990年代後半以降明らかになっている^{25,26,27}。しかしながら、両生類 *Xenopus laevis* 胚/幼生においては、その相同遺伝子の発現が左右非対称であるとの報告はない。

以上のように、現時点では、手綱核が左右対称なアフリカツメガエルについて、神経解剖学的あるいは分子レベルでの脳の左右非対称性を研究した報告は全く無い状態である。しかしながら、本研究は、アルビノのアフリカツメガエル幼生を材料とした簡便で新しい方法を用いて、両生類の脳室内液流を生きた幼生個体内で可視化することに成功し、その過半数の個体の第3脳室背側の中央部で左右非対称な脳室内液流が発生していることを世界で初めて明らかにした。即ち、組織形態でも、分子でもない、液流という第三のメルクマールは、両生類において左右非対称性を示していたのである。両生類の利き脳については、その存在を疑問視する研究者もいるが、液流方向の左右性を変更する方法が見出されれば、脳室内液流が行動の側性に与える影響を定量的に評価することを通じて両生類の利き脳の存在を実験発生学的に明証することが出来ると思われる。

第3脳室内の液流は、その背側領域で、脈絡叢ないし松果複合体原基になるとと思われる中央組織を挟んで、後方に向かう両側性の液流を形成していた。その中央組織に接近したビーズは、周囲のビーズよりも俄にスピードが増し「跳ね飛ばされる」ような振る舞いをしていたので、この組織の表面には強い繊毛流があると思われた。ヘマトキシリン-エオシン染色を施した横断切片を用いた観察から、stage 46-48 幼生の、この中央組織の表面には他の領域よりも密に繊毛が生えていた(n=3, データは示さず)。近年、ホメオボックスを有する転写因子 *otx5* (*orthodenticle homeobox-5*) が硬骨魚類ゼブラフィッシュ胚や両生類ツメガエル胚の松果複合体の分子マーカーとなることが報告されている^{28,29}。今後、*otx5* をマーカーとして、digoxigenin 標識 cRNA プローブを用いて *in situ hybridization* を行い、この第3脳室背側の中央組織に松果複合体原基が含まれるか否かについて検討したい。

第3脳室の左右非対称な液流の生理的な意義は何であろうか? 1998年、野中茂紀らは、*monocilia* の繊毛運動を司るモータータンパク質 *Kinesin family* のうち、*KIF-3B* のノックアウトマウスが内臓逆位を示すことをきっかけに、野生型マウス胚のノード(*node*, オルガナイザー領域)の腹側の窪みの表面に右から左に向けた左右非対称な液流があることを発見し、これをノード流と名付けた^{30,31}。KIF や *Dynein* などがモータータンパク質としての機能を喪失し、ノード表面の

monocilia が繊毛運動を行わない変異型マウスにおいては、ノード流がきわめて弱いか存在せず、その後の体節期胚において、左側板のみで発現を示す *nodal* や *pitx2* などの遺伝子発現の左右非対称性が乱れることが分かった^{32,33,34}。従って、ノード領域で生成される左向きの液流が、内臓の左右性を制御する *nodal* の左側板における発現を誘導し、その後の *nodal*→*pitx2* への左側特異的なシグナル伝達経路を活性化し、内臓の左右の向きを規定すると考えられている。上述のように、*nodal* は、ゼブラフィッシュの間脳一部の背側領域でも左側特異的な発現をする。(厳密に云うと、ゼブラフィッシュに3種類ある *nodal* 相同遺伝子のうち *cyclops* のみが左側特異的な発現をする。) *nodal* は TGF- β superfamily に属し、中胚葉誘導活性など多彩な分化誘導活性を有する拡散性の分泌因子 Nodal をコードするので^{35,36}、マウスの内臓の左右性決定においても、ゼブラフィッシュの脳の左右性決定においても、Nodal が左側組織に向けて選択的に拡散し、そのシグナル伝達経路を左側組織で活性化すると考えられている^{37,38}。しかしながら、一方で、マウスオルガナイザー領域のノード流は、ノードの窪みと、胚を包むライヘルト膜(Reichert's membrane)との間を回転運動しているとの観察結果や、ノードの縁の部分でカルシウムセンサーが機能し、ノード周縁組織の細胞内カルシウム濃度に左右非対称性が発見されたことなどから³⁹、ノード流が拡散性の Nodal あるいは GDF-1 (Growth Differentiation Factor-1⁴⁰)、Shh (Sonic hedgehog³⁴)などの他の分泌因子を左側組織に非対称に運搬することが左右非対称シグナル伝達生成の契機になるのではなく、ノード流によって、左側のカルシウムシグナリングが活性化され、この興奮が左側板に伝わることで左特異的な *nodal* 遺伝子の発現が誘導されるとの対立仮説を支持する動きも依然として活発である^{41,42}。

孵化直後の(脳で *nodal* が左右非対称に発現する時期の)ゼブラフィッシュ幼生は微小で、脳室が腹側に弓なりに屈曲しているために観察しにくいいためか、脳室内液流のモニタリングについての報告は昨年ようやく第1報が出たが、CNS から脊髄神経の方向に液流があると記載しているのみである⁹。一方、*Xenopus* 幼生のアルビノは比較的育てやすく、ゼブラフィッシュに比べて遙かに大型であり、しかも幼生の脳は扁平で直線上に発生するために、脳室内液流のパターニングについては、透明度ではゼブラフィッシュに敵わぬまでも、トータルでは後者よりも観察に有利である。更に我々は、結果の項の前半に記したように、最新のテクノロジーである量子ドット法を用いてやや透明度で劣るツメガエル幼生の脳室を鮮明に可視化することに成

功したので、透明度が低いことから生じる技術的な困難も今後は乗り越えられると思われる。Qdot655の蛍光強度は非常に強く、脳室内にQdotを注入したアルビノ幼生に励起光を照射すると、室内照明下で更に冷光装置(白色光)を同時に照射した状態でも、その赤色蛍光を肉眼で容易に視認できる程であった。今後は、ポリスチレンビーズと量子ドットとの混合液の共注射を行い、高速スキャンの可能な共焦点レーザー蛍光顕微鏡と三次元像再構成技術を組み合わせて用いて、背腹軸方向の脳室内液流のより精密な計測を行いたい。

第3脳室の液流に関する我々の観察結果では、ノード流研究の初期の論文に記載のあるような右から左への単純で平面的な液流パターンのみではなく、脳室というコンパクトな閉空間内での複雑で三次元的な攪拌運動の中で、一領域のみに左右非対称な液流が観察された。液流のスピードは、その運動の複雑性から計測し難かったが、モニター画面一杯に第3脳室や第4脳室を映写した際に、秒毎にビーズがめまぐるしく相互の位置を変えていて、動きの複雑さを30fpsのフレームレートでようやく記録出来た程度であった。即ち、脳室内液流は、想像していたよりも遙かに速い秒単位の現象であり、仮に、ツメガエル幼生脳において脳室内に向けた左右非対称なNodalリガンドの分泌があったとしても、脳室内では速やかに均一に拡散をしてしまうことが予想された。分子レベルではNodal分子よりもやや大きいと予想される直径約20nmのQdot粒子を第4脳室に注入すると、数分以内に第4脳室ならびに第3脳室や側脳室にまで均一に分布するほど、脳室内液流が速かったことから、上記の予想は支持される。我々は、現段階では、脳における左右非対称性の分子機構を、マウス胚オルガナイザーにおけるノード流の単純なアナロジーで捉えるのは難しいと考えている。脳室内液流のモーター役である上衣細胞が比較的ルースな単層上皮であることから、我々は、「激しい」脳室内液流が、上衣細胞層を隔てた背側の脳組織の細胞外基質の中に、緩やかな左向き液流を形成し、分泌性因子が(脳室内ではなく)脳室壁の基底側の組織中を左向きに拡散する効果をもたらしているとの作業仮説を持つに至った。このアイデアを検証するためには、アルビノツメガエル幼生の脳胞組織中にFITC溶液や量子ドット懸濁液を局所に注入し、その拡散の様子を定量化する必要がある。

第4脳室、中脳水道における脳室内液流の役割

第4脳室や中脳水道における、上記のような速く強い脳室内液流の背腹でのパターンニングの差異については、その生理的意義を推察することが難しい。しかしながら、中枢神経系や脊髄神経の背腹のパターンニングには、

神経管底板における分泌因子Sonic hedgehogや最も背側の構造である蓋板におけるBone Morphogenetic Protein (BMP)やDorsalinなどの分泌因子の発現が、一連の神経組織特異的な転写因子コード(転写因子群の発現の組み合わせ)を誘導し、それが背腹に沿った領域特異的な細胞種の分化につながるということが明らかになりつつある^{43,44}。一見すると「速すぎる」第4脳室内の安定した液流パターンは、上衣細胞よりも基底側の脳組織中の組織液に伝わり、これを動かすことで液流パターンに沿ったBMPやShhの緩やかな拡散を促し、後部CNSにおける安定した前後・背腹軸分化を支えているのかもしれない。

中脳・後脳境界の主に背側組織に発現するFGF familyのリガンド群は、小脳と中脳の前後軸ならびに領域特異的な組織分化を規定することが明らかになっている。中脳水道におけるシンプルな双方向性の液流は、FGF-8a, 8b, 17などの「中脳・後脳境界オルガナイザー(isthmus organizer)」で合成される分泌因子の脳組織内での拡散に寄与するのかもしれない⁴⁵。中脳・後脳境界領域の脳組織片を脳室液やFGF分子を添加した培養液中で培養した結果から、脳室液が「中脳・後脳境界オルガナイザー」の活性を媒介することをParadaら(2005)は報告しているが、これは、上記推論の一部を支持する⁴⁶。

本研究の今後の展開について

今後は、繊毛運動の麻酔剤や繊毛運動を制御する細胞内カルシウム濃度の調節薬(カルシウムイオノフォアなど)を用いて、脳室内液流全体を、あるいは局所的に停止させたり擾乱させたりすることで、中枢神経組織の前後・背腹軸、左右軸に沿った分子マーカーの発現パターンがどのように変化するかを観察したい。その際に、脳室内液流を止めることで低酸素症に関連した病的な遺伝子発現が誘導されないようにし、実験結果の解釈をシンプルになるように実験的な工夫を加える必要があると予想している。

謝辞

本研究は、共同研究「両生類胚・幼生の脳形態形成における脳室内液流の役割の研究」として神奈川大学総合理学研究所の助成のもとで行いました。所長ならびに所員各位に感謝いたします。

文献

- 1) Sarnat HB (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**: 1-15.
- 2) Redzic ZB and Segal MB (2004) The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**: 1695 - 1716.

- 3) Emerich DF, Skinner SJ, Borlongan, CV, Vasconcelos AV and Thanos CG (2005) The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays* **27**: 262-274.
- 4) Enzmann DR and Pelc NJ (1993) Cerebrospinal fluid flow measured by phase-contrast cine MR. *Am. J. Neuroradiol.* **14**: 1301-1307; discussion 1309-1310.
- 5) Bradley WG, Jr., Scalzo D, Queralt J, Nitz WN, Atkinson DJ and Wong P (1996) Normal-pressure hydrocephalus: evaluation with cerebrospinal fluid flow measurements at MR imaging. *Radiology* **198**: 523-529.
- 6) Atkinson DJ and Wong P (1996) Normal-pressure hydrocephalus: evaluation with cerebrospinal fluid flow measurements at MR imaging. *Radiology* **198**: 523-529.
- 7) Greitz D and Hannerz J (1996) A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography. *Am. J. Neuroradiol.* **17**: 431-438.
- 8) Jones HC, Dack S and Ellis C (1987) Morphological aspects of the development of hydrocephalus in a mouse mutant (SUMS/NP). *Acta Neuropathol.* **72**: 268-276.
- 9) Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF and Drummond IA (2005) Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* **132**: 1907-1921.
- 10) Nieuwkoop PD, Faber J (1967) External and internal stage criteria in the development of *Xenopus laevis*. In: *Normal table of Xenopus laevis*. pp. 162-188. Elsevier/North Holland Co. (Amsterdam).
- 11) Bruchez M Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S and Alivisatos AP (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**: 2013-2016.
- 12) Stsiapura V, Sukhanova A, Artemyev M, Pluot M, Cohen JH, Baranov AV, Oleinikov V and Nabiev I (2004) Functionalized nanocrystal-tagged fluorescent polymer beads: synthesis, physicochemical characterization, and immunolabeling application. *Anal. Biochem.* **334**: 257-265.
- 13) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M and Yamamoto K (2004) Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol. Immunol.* **48**: 985-994.
- 14) Lowery LA and Sive H (2005) Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nagie oko* and *snakehead/atp1a1a.1* gene products. *Development* **132**: 2057-2067.
- 15) Morgan MJ (1991) The asymmetrical genetic determination of laterality: flatfish, frogs and human handedness. *Ciba Found Symp.* **162**: 234-247; discussion 247-250.
- 16) Concha ML and Wilson SW (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* **199**: 63-84.
- 17) Concha ML, Burdine RD, Russell C, Schier AF and Wilson SW (2000) A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* **28**: 399-409.
- 18) Gamse JT, Thisse C, Thisse B and Halpern ME (2003) The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development* **130**: 1059-1068.
- 19) Halpern ME, Liang JO and Gamse JT (2003) Learning to the left: laterality in the zebrafish forebrain. *Trends Neurosci.* **26**: 308-313.
- 20) Naitoh T and Wassersug RJ (1996) Why are toads right-handed? *Nature* **380**: 30-31.
- 21) Wassersug R, Naitoh T and Yamashita M (1999) Turning bias in tadpoles. *J. Herpetology* **33**: 543-548.
- 22) Yamashita M, Naitoh T and Wassersug RJ (2000) Startle response and turning bias in *Microhyla* tadpoles. *Zool. Sci.* **17**: 185-189.
- 23) Bisazza A, De Santi A, Bonso S and Sovrano VA (2002) Frogs and toads in front of a mirror: lateralisation of response to social stimuli in tadpoles of five anuran species. *Behav. Brain Res.* **134**: 417-424.
- 24) Alashichev YB and Wassersug RJ (2004) Left and right in the amphibian world: which way to develop and where to turn? *Bioessays* **26**: 512-522.
- 25) Rebagliati MR, Toyama R, Fricke C, Haffter P and Dawid IB (1998) Zebrafish *nodal*-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev. Biol.* **199**: 261-272.
- 26) Thisse C and Thisse B (1999) Antivin, a novel and divergent member of the TGF- β superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**: 229-240.
- 27) Essner JJ, Branford WW, Zhang J and Yost HJ (2000) Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development* **127**: 1081-1093.
- 28) Kuroda H, Hayata T, Eisaki A and Asashima M (2000) Cloning a novel developmental regulating gene, *Xotx5*: its potential role in anterior formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* **42**: 87-93.
- 29) Gamse JT, Shen YC, Thisse C, Thisse B, Raymond PA, Halpern ME and Liang JO (2002) *Otx5* regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat. Genet.* **30**: 117-121.
- 30) Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M and Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**: 829-837.
- 31) Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y and Hamada H (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**: 96-99.
- 32) Okada Y, Nonaka S, Tanaka Y, Saijoh Y, Hamada H and Hirokawa N (1999) Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell* **4**: 459-468.
- 33) Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, Belmonte JC and Hirokawa N (2005) Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* **121**: 633-644.
- 34) Tanaka Y, Okada Y and Hirokawa N (2005) FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* **435**: 172-177.
- 35) Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL and Kuehn MR

- (1993) Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**: 543-547.
- 36) Jones CM, Kuehn MR, Hogan BL, Smith JC and Wright CV (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**: 3651-3662.
- 37) Hamada H, Meno C, Watanabe D and Saijoh Y (2002) Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 103-113.
- 38) Concha ML, Russell C, Regan JC, Tawk M, Sidi S, Gilmour DT, Kapsimali M, Sumoy L, Goldstone K, Amaya E, Kimelman D, Nicolson T, Grunder S, Gomperts M, Clarke JD and Wilson SW (2003) Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron* **39**: 423-438.
- 39) Raya A, Kawakami Y, Rodriguez-Esteban C, Ibanes M, Rasskin-Gutman D, Rodriguez-Leon J, Buscher D, Feijo JA and Izpisua-Belmonte JC (2004) Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* **427**: 121-128.
- 40) Zhang XM, Ramalho-Santos M and McMahon AP (2001) Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell* **105**: 781-792.
- 41) McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X and Brueckner M (2003) Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**: 61-73.
- 42) Shimeld SM (2004) Calcium turns sinister in left-right asymmetry. *Trends Genet.* **20**: 277-280.
- 43) Lee SK and Pfaff SL (2001) Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* **4** Suppl: 1183-1191.
- 44) Shirasaki R and Pfaff SL (2002) Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**: 251-281.
- 45) Sato T and Nakamura H (2004) The Fgf8 signal causes cerebellar differentiation by activating the Ras-ERK signaling pathway. *Development* **131**: 4275-4285.
- 46) Parada C, Martin C, Alonso MI, Moro JA, Bueno D and Gato A (2005) Embryonic cerebrospinal fluid collaborates with the isthmic organizer to regulate mesencephalic gene expression. *J. Neurosci. Res.* **82**: 333-345.

■原 著■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の研究

中田穰治^{1,4} 斎藤保直¹ 川崎克則² 服部俊幸³

Research for Formation of High-Quality Diamond Epitaxial Thin Layers on the Diamond Substrates and Evaluation of These Layers

Jyoji Nakata^{1,4}, Yasunao Saito¹, Katsunori Kawasaki² and Toshiyuki Hattori³

¹ Department of Information Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-shi, Kanagawa-ken, 259-1293, Japan

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

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

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

Abstract: We have developed a microwave-plasma CVD apparatus for depositing epitaxial diamond layers on the diamond substrates. We used Ib-type substrates and succeeded in depositing high-quality diamond epitaxial layers on these substrates, confirmed by measuring Raman shift spectra and the electrical characteristics of CVD layers using a Hall effect measuring instrument. However, the surface morphology of the deposited layers is not so good, as ascertained by Atomic Force Microprobe. We also measured impurity profiles in the CVD layers, using Secondary Ion Mass Spectroscopy. Moreover, we found an abrupt concentration difference of N impurity at the interface between the deposited layer and the substrate, showing that the concentration of N impurity is lower in the CVD layer than in the substrate.

Keywords: microwave-plasma, CVD, diamond, epitaxial layer, Hall-effect, AFM, SIMS

序論

はじめに

ワイドギャップ半導体の代表格であるダイヤモンド半導体は、Si 半導体では動作しないような高温環境下や高放射線環境下においても動作する半導体として注目されている。そればかりではなく、高電子移動度や高正孔移動度、あるいは飽和電子ドリフト速度が大きい等の性質から高速電子デバイスへの応用が期待されている。さらに絶縁耐圧が高いことから高パワーデバイスとしての役割も大きい。このようにダイヤモンド半導体は Si 半導体よりもはるかに優れた特徴をもつ高温動作可能な半導体素子として、また耐放射線性素子としての応用が期待されている。ダイヤモンド半導体の伝導性制御技術が確立されれば、ワイドギャップ半導体の実用化を大きく促進することができる。ワイドギャップ半導体材料を用いた耐環境性素子が普及すれば、電力制御システムや内燃機関の高効率化による資源の有効利用、温室効果ガスの低減等が期待され、現

在最重要の課題となっている環境問題に対して解決への大きな糸口を与えることになる。また、人工衛星搭載電子機器への宇宙線の影響を低減でき、マルチメディア時代に向けた衛星放送や移動体通信の普及に寄与するものと考えられ、社会に大きなインパクトを与える。しかし、以下のような問題点がある。

残念ながら現在まで良好なN型ダイヤモンド半導体の実現されていない。半導体素子実現のためには、P型とN型領域を形成するために伝導性制御の不純物導入技術が必要となるが、拡散係数が小さいために熱拡散による不純物導入は困難である。従って、イオン注入による不純物元素導入が有望視されている。しかし、ダイヤモンドではイオン注入に伴う損傷形成、或いはイオン注入後の熱処理に伴うグラファイト形成により、ダイヤモンドとしての結晶性維持が困難な状況にある。また、良好なN型層はできておらず、やっと最近CVD法により堆積時に同時ドーピングによりN

型層形成の報告が出てきたばかりである。しかし、この方法による N 型層の電気伝導性は低く、電子移動度も低い。さらに電子デバイス化を考えれば不純物プロファイルの制御性、注入領域の選択性に優れたイオン注入による N 型不純物導入は必至である。しかし、イオン注入による N 型層形成は世界各地における 40 年以上にも及ぶさまざまな試みにも拘わらず、未だ成功していない。

本研究の独創的な点及びその着想に至った経緯

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

その中でも特に Van-de-Graaff 加速器を利用したイオンビーム誘起結晶成長法(Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization, IBIEC)は、著者の代表的な業績である。IBIEC は著者が Si に MeV 級イオンビームを照射することにより、通常の熱処理温度(550-600°C)より遥かに低温(200-300°C)で非晶質 Si 層が下地の単結晶 Si 基板に対してエピタキシャル単結晶成長することを見出したのが世界最初である^{1,2)}。その後、世界各地でこの研究が活発に行なわれた³⁻¹⁸⁾。対象も Si だけではなく、Ge, SiGe, BP, Al₂O₃ 等さまざまな材料に広がり、この現象が観測されている。理論的検討も活発に行なわれ、この現象を説明する各種モデルが提案された¹⁹⁻²¹⁾。

通常イオン照射は照射損傷を誘起し、結晶性を低下させる方向に作用する。しかし、IBIEC により通常の熱処理よりも遥かに低温において、非晶質層がエピタキシャル成長して、むしろ逆に結晶性が増加する方向に作用する。このような一見逆説的な現象がなぜ起きるのか、さまざまなモデルが提案され議論されている。基板単結晶界面付近で非晶質層内部に誘起される何らかの形の欠陥(空格子点や未結合手等)が低温結晶化或いは欠陥回復に寄与していること、また照射イオンの電子的非弾性散乱が単結晶化を増速することも分かってきた²²⁻²⁴⁾。しかし、この現象を総括的かつ定量的に説明するモデルは未だ提案されていない。

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

この IBIEC を Si に応用した例では、この非熱平衡過程という特徴を最大限に生かして、Si の固溶限界を超えて高濃度(10²¹/cm³)に As イオン注入でドーパされた Si に対しても、その注入した As の 80%以上を置換位置に入れて電氣的に活性化させることに成功している。

前記したように 40 年以上に及ぶ世界中の努力にも拘わらず、通常の熱処理によるイオン注入ダイヤモンドの N 型化は実現出来ていない。唯一、Prince が酸素イオン注入により、N 型を形成したとの報告があるが^{25,26)}、N 型ドーパントではない酸素イオン注入で N 型がどうしてできるのか(ダブルドナーなのか)とか、或いは酸素そのものの性質ではなく、酸素イオン注入による欠陥が誘起した N 型層ではないかとか議論の余地があり、ドーパントイオン注入による N 型活性化と断定するには至っていない。一方、著者は独立行政法人 産業技術総合研究所と共同で P イオン注入した高品質ホモエピタキシャルダイヤモンド薄膜が、MeV 級 Ne イオンビーム照射(IBIEC)により N 型の導伝層を形成している確かな兆候をつかんでおり、特許(特願平 11-345410)を 1999 年 12 月に提出した。さらに、通常の熱処理ではイオン注入した P 原子が熱処理温度が高くなると、置換位置からはずれ格子間位置或いはランダムなサイトへ入っていくのに対して、IBIEC では逆に置換率が上昇するという予備的結果も得ている。このようにこの分野の研究は日本が最高水準にある。従って、実用化できる可能性は非常に高い。世界的な IBIEC の研究の盛り上がりが一段落した現在も、日本では基礎研究を中心に研究が継続されている。日本が発信地ともいえるこの研究課題を、応用まで視野に入れて日本で育てていく意義は大きい。

現在、不純物をドーピングする以前に良好なダイヤモンド薄膜を先ず形成する基本的な研究が行われている。その際、有効な手法として高温高压合成で形成したダイヤモンド基板上に CVD 法で高品質な薄膜を堆積させる方法がある。その場合でも有力なのはマイクロ波プラズマ CVD 法である。これが有効な方法である理由は、プラズマ形成時放電電極が必要なく、直接マイクロ波パワーで水素希釈されたメタンガスのプラズマを形成するためである。即ち、電極材料に起因した不純物の膜中への取り込みがなく、純粋な CVD 薄膜が形成される。

材料と方法

マイクロ波プラズマ CVD 装置の製作

以上の理由から中田研究室においてもマイクロ波プラズマ CVD 装置を試作し、それを使用して高品質なダイヤモンド薄膜を形成することを試みた。

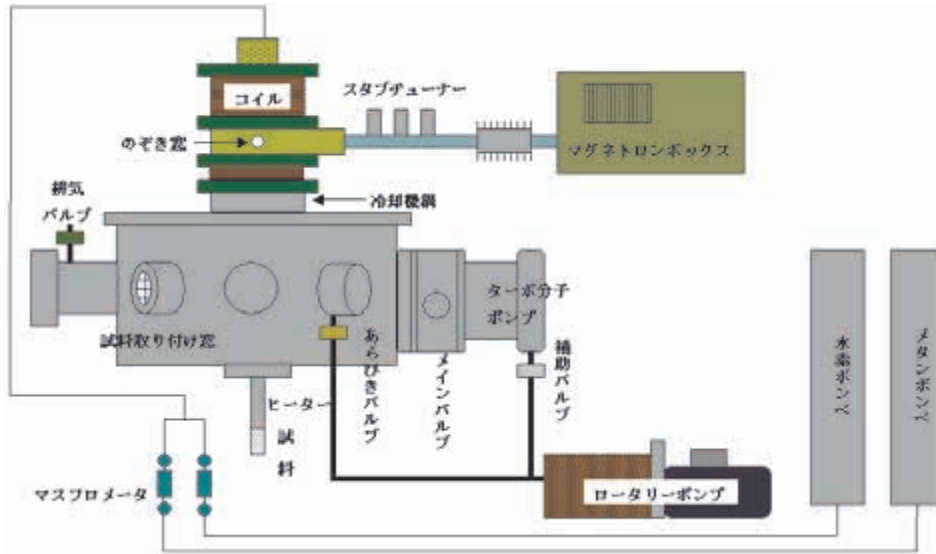


図1. 試作したマイクロ波プラズマ CVD 装置.

図1に試作したマイクロ波プラズマ CVD 装置を示す。図中マグネトロンボックスから放出された 2.45 GHz の周波数の電磁波（マイクロ波）がスタブチューナーを配した導波管の中を通過する。円筒形の石英ガラス中に置かれたダイヤモンド基板試料にマイクロ波が投入される。円筒形石英管中には、マスフローメータを介して水素ガスとメタンガスの混合ガスが供給される。石英管全体はステンレス製の真空チャンバーに置かれターボ分子ポンプとロータリーポンプを通して真空排气される。円筒形石英管は自作のコイルで囲まれており、プラズマ形成空間中に磁場を発生できる。従来、マイクロ波プラズマ CVD 装置でダイヤモンド薄膜を堆積させる際は、磁場を使わず直接マイクロ波パワーだけでプラズマを形成していた。今回、初めての試みとして磁場を形成させ、それによる堆積速度向上を狙って装置を組み上げた。更に、基板試料を独立にヒーターで 1000℃程度に加熱できる構造にした。通常はマイクロ波パワーのみで加熱している装置が殆どであった。このように各種の工夫をして2年がかりでこの装置をくみ上げたが、多くの部品は理活用して製作した。

表1. 去年と今年の実験値比較

| | 去年 | 今年 |
|---------|---------------------|----------|
| 成膜時間 | 30 時間 | 10 時間 |
| メタン濃度 | 0.1 % | 0.05 % |
| 水素流量 | 200 sccm | 400 sccm |
| メタン流量 | 0.2 sccm | 0.2 sccm |
| マイクロ波電力 | 500 W | 750 W |
| 圧 力 | 25 Torr (約 3.3 kPa) | |
| 基板温度 | 約 800 °C | |

ダイヤモンド薄膜形成条件

表1に昨年と今年の実験におけるダイヤモンド薄膜形成条件の比較を示す。

この表から明らかなように昨年度と今年度とでマイクロ波パワーと水素流量の値が大幅に異なっている。水素ガスとメタンガスとの混合ガス圧力は **25 Torr (約 3.3 kPa)** と変更はないが、水素流量を2倍にしたためにメタン濃度（メタンガス流量と水素ガス流量との比）は昨年の 0.1% から今年度の 0.05% へと半分になっている。メタン濃度を減少させると堆積速度（薄膜成長速度）は半分になる。従って、昨年度と同一の膜厚にするためには成膜時間を2倍にしなければならないはずであるが、実際にはマイクロ波パワーを2倍にしたために石英管の温度上昇が大きく、真空を保つためのタイトンの O リングが溶けてしまい、真空を長く保つことが困難になった。そのため、成膜時間はこの実験においては 10 時間を限界とした。しかし、石英管の冷却機構を工夫し、O リング付近の溝の冷却も行った結果、現在では数 10 時間の成膜にも耐えられる。

結果

ダイヤモンド薄膜の各種分析結果:

AFM による分析

CVD 装置により堆積したダイヤモンド薄膜を AFM (Atomic Force Microprobe) により評価した結果を次に示す。AFM は表面の凹凸を高感度に検出する装置である。

図2に評価した表面の凹凸を示す。走査した範囲は 20 μm × 20 μm の広い領域である。

図 2A は高温高压合成基板で薄膜堆積前の表面状態を表わしている。極めて滑らかな表面であることが明らかである。図 2B と D は薄膜堆積後の場所を変えて

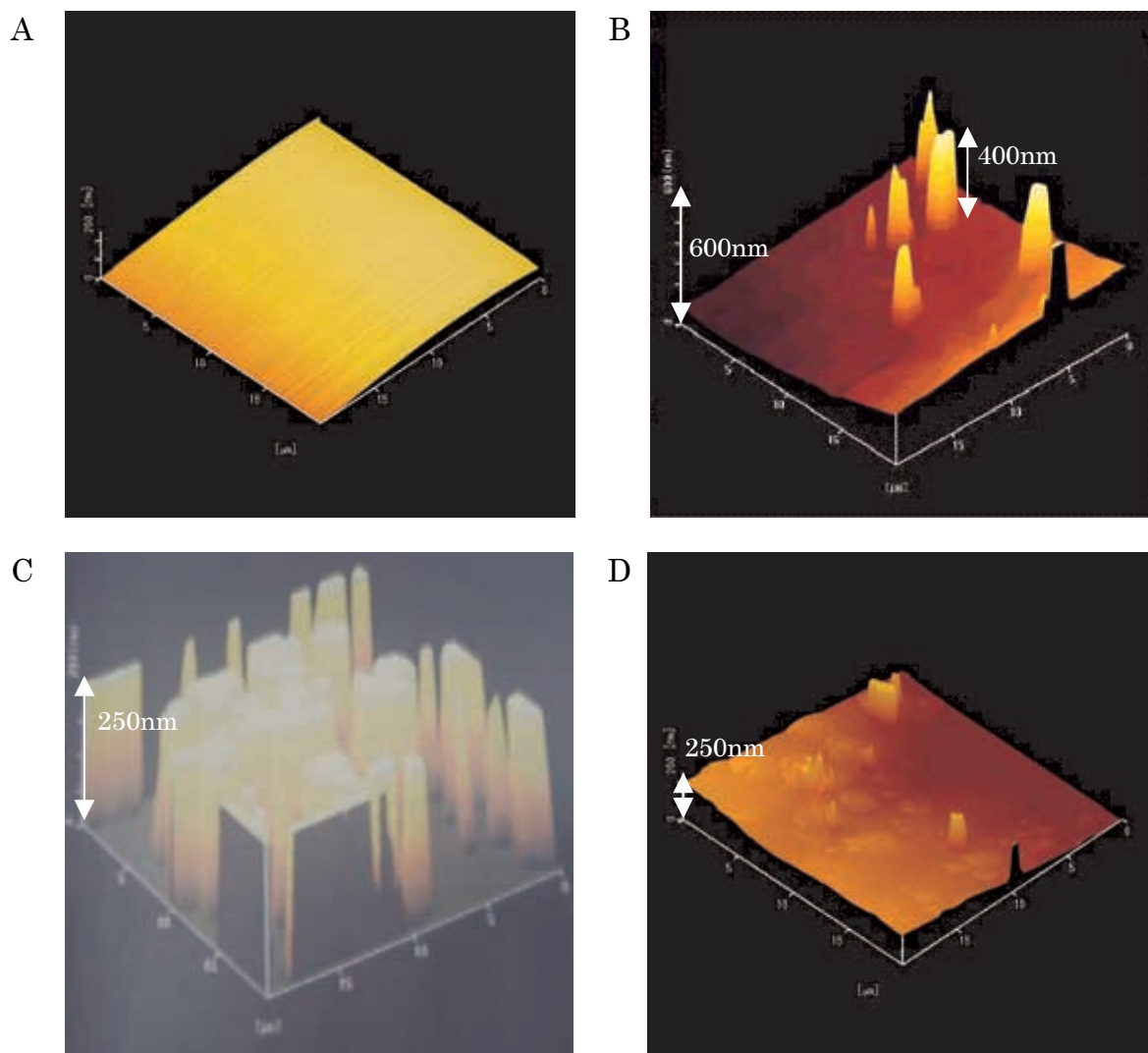


図 2. 20 μm \times 20 μm の広い領域において走査した各種試料の AFM 像. A. Ib 型ダイヤモンド基板(成長無し). B. 10 時間成長(異常な凹凸が確認できた部分). C. 30 時間(去年). D. 10 時間成長(比較的平坦な部分).

測定した表面状態である。図 2B においては鋭い突起が幾つか観測されている。図 2D は比較的滑らかな領域を観測している像である。ベースになる部分にかなり広いうねり(数 10 μm の範囲でコンマ数 μm の高さの起伏が見える)が観測されているが、突起は極めて先鋭に成長している。図 2C には昨年度の条件で堆積したときの表面状態を示す。昨年度の条件とは表 1 左に示した条件である。

非常に明らかなように昨年度においては膜が成長しているという形跡はなく、島状にたくさんの突起物が成長しているというイメージの方が強い。昨年と今回の堆積条件の中で大きく異なるのはマイクロ波パワーである。昨年 500 W であったが今回は 750 W に上昇させた。これによりプラズマ密度が上昇したことは間違いない。メタンガスと水素ガスの流量比は前회가 0.1%

なのに対して今回は 0.05% である。この 2 倍の差は表面の形状に大きな影響は与えないと思われる。この流量比はむしろ成長速度に大きく影響してくる因子だからである。いずれにしても昨年度とは格段に表面状態の優れたダイヤモンド薄膜が成長できた。

図 3 に図 2 よりも更に狭い範囲である 2 μm \times 2 μm の領域について観測した AFM 像を示す。図 2A は堆積前の基板、図 2B は今回の条件で堆積した薄膜の像である。この狭い範囲になるとほぼ基板と同様な極めて平坦性の優れた薄膜が成長していることが明らかである。以上により表面形状だけに注目すれば、昨年よりも極めて良好な膜が成長していることが確認できた。しかし、この分析評価だけでは総合的に何とも言えないので、更に他の分析方法で CVD ダイヤモンド薄膜の評価を行うことにした。

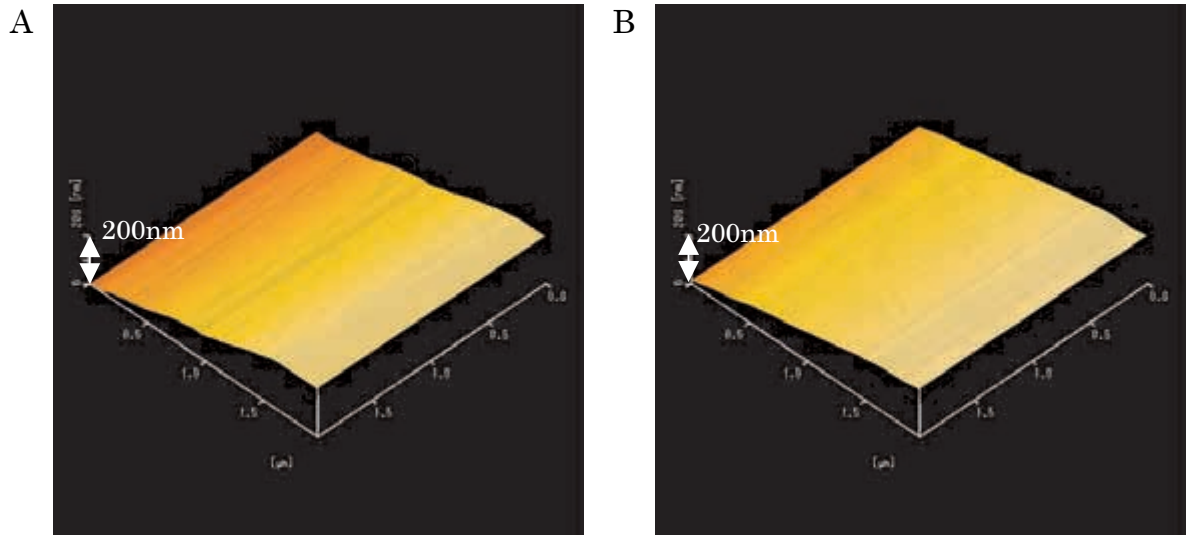


図3. 20 μm \times 20 μm の狭い領域において走査したAFM像. A. Ib型ダイヤモンド基板(成長無し). B. 10時間成長.

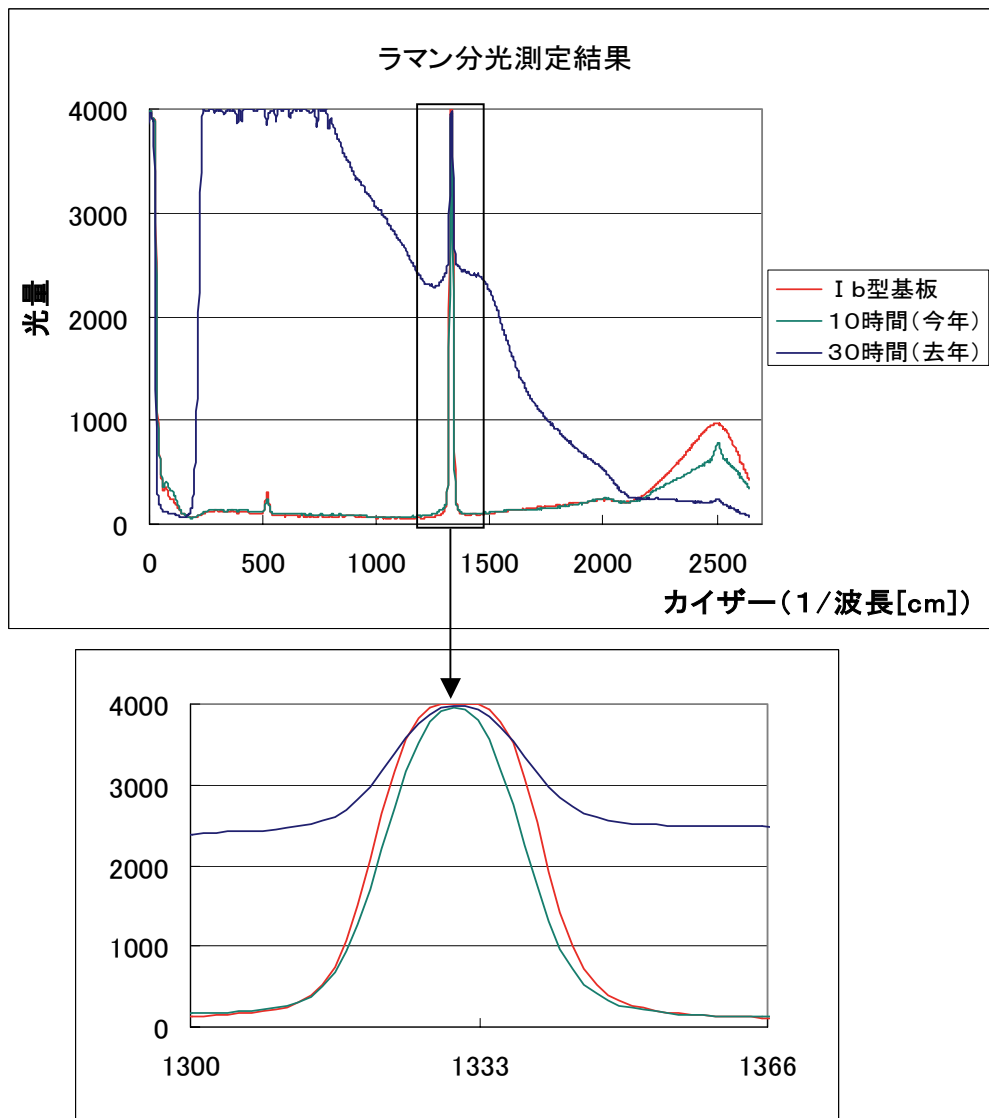


図4. ラマンスペクトルの測定結果および拡大図.

ラマン分光法による分析

ダイヤモンドの結晶性を評価する上で非常に簡便に測定する方法の一つがラマン散乱分光である。この評価方法の原理について詳細には述べないが、 $1333/\text{cm}$ の位置に鋭いピークが観測される。これによってダイヤモンドの単結晶が形成されているかどうかを判断できる。中田研究室では今年度簡便なラマン散乱分光装置を導入した。分解能は $10/\text{cm}$ 程度であるが、極めて簡便な取り扱い方でラマンスペクトルが観測できる。

図4に測定したラマンスペクトルを示す。図4の上のスペクトルはラマンシフトの波数 $2500/\text{cm}$ までの範囲で測定した昨年度の試料と今回の試料、更にレファレンスとしてIbタイプの高圧高温合成基板のスペクトルを示す。このスペクトルから明らかなように、Ib基板試料と今回の試料ではダイヤモンド単結晶特有の $1333/\text{cm}$ の位置に鋭いピークが観測できた。これにより基板と同程度以上に結晶性のよいダイヤモンド薄膜が形成されている可能性があることが分かった。一方、昨年度の条件で形成した薄膜はピーク強度が弱く、しかも、大きなバックグラウンドの上に存在する。こうして結晶性については昨年度の試料は非常に悪いが、今回は良好な膜が形成されている。下のスペクトルは $1333/\text{cm}$ の位置の鋭いピークを拡大したスペクトルである。基板よりも明らかに半値幅が小さいスペクトルが得られており、基板以上の良好な結晶性が保たれていることを強く示唆している。以上の結果から結晶性に優れ、表面も比較的平坦であるダイヤモンド薄膜が形成できたと思われるが、さらに膜中に存在する不純物の分布をSIMS分析という手法を使って直接評価した。この方法はCsの1次イオンビームを試料表面に照射して表面をスパッタリングしながら穴を掘り、その時出てくる各種2次イオンビーム強度を質量分析することにより、微量な不純物分布を測定する手法である。

SIMSによる分析

図5Aは8 keV Csイオンを1次ビームとして、 45° の角度から試料に照射してスパッタリングしながら出てくる2次イオンを質量分析したスペクトルである。ダイヤモンド薄膜中には各種不純物が混入されていると思われるが、特にN不純物に注目している。というのはダイヤモンドCVD膜には空気中の窒素に起因する不純物混入が非常に起きやすいことが知られているからである。

実際、高温高圧合成基板においては空気中の窒素に起因する窒素不純物が100-200 ppm程度含有されて

いる。空気中の酸素はあまり取り込まれていないようであるが、CVD薄膜においてもこの窒素不純物がどの程度含まれているかは非常に興味あるところであり、特にこの元素に注目してみる。

図5Aは各種質量数を持った多原子分子の2次イオン強度分布である。横軸は深さである。ここで窒素原子の不純物分布を測定する場合、14という質量数の原子をそのまま測定すると、バックグラウンドとして多く存在するであろう CH_2 多原子分子と区別がつかない。そこで、 $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ という質量数27の多原子分子に注目する。この分子は ^{13}C という通常の ^{12}C とは自然界存在比で1%という微量元素であるCとNの多原子分子である。これはバックグラウンドとして質量数14である $^{12}\text{CH}_2$ より遥かに少ないであろうから、この分布が窒素原子の分布に比例していると考えられる。さらに、質量数26である $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ 多原子分子と、もし2次イオン強度比で100:1となっていれば、確実に上記多原子分子の相対的分布はN原子の分布を忠実に表現していることになる。そのような観点に立って図5Aを眺めると確かに両分布はちょうど100:1の割合になっており、N原子分布を再現したものであることが確信できる。この図では明らかでないが、質量数26と27の分布において $0.6\ \mu\text{m}$ 付近を拡大したものが、図5B、Cである。

図5Bは質量数26の $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ 多原子分布であり、図5Cは質量数27の $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ 多原子分子分布である。ともに、 $0.6\ \mu\text{m}$ 付近の濃度に段差が見られる。この $0.6\ \mu\text{m}$ という深さがCVDダイヤモンド薄膜と基板との界面である。何故なら、基板においては窒素が高濃度に含まれており、薄膜には窒素濃度がそれより少ないことが期待されるからである。

しかし、図5B、Cにおいて明らかなように、基板と膜の窒素濃度差はあまり顕著ではないように思われる。もし、膜中窒素濃度が1 ppm以下であれば、少なくとも基板に100 ppm程度含有されているのであれば、界面において2桁程度2次イオン強度に段差があってしかるべきと思われる。ところが、図5B、Cに示すようにそんなに2次イオン強度に差はない。この原因は実は、巻く中に多量の窒素不純物が含まれているということではなく、むしろ、SIMSの測定上の問題であることを、後に議論する。いずれにしても、ここで明らかになったことはCVD薄膜は厚さが $0.6\ \mu\text{m}$ 程度あり、基板中より窒素不純物濃度は低減しているということである。次に最後の分析測定としてHall効果測定結果を示す。

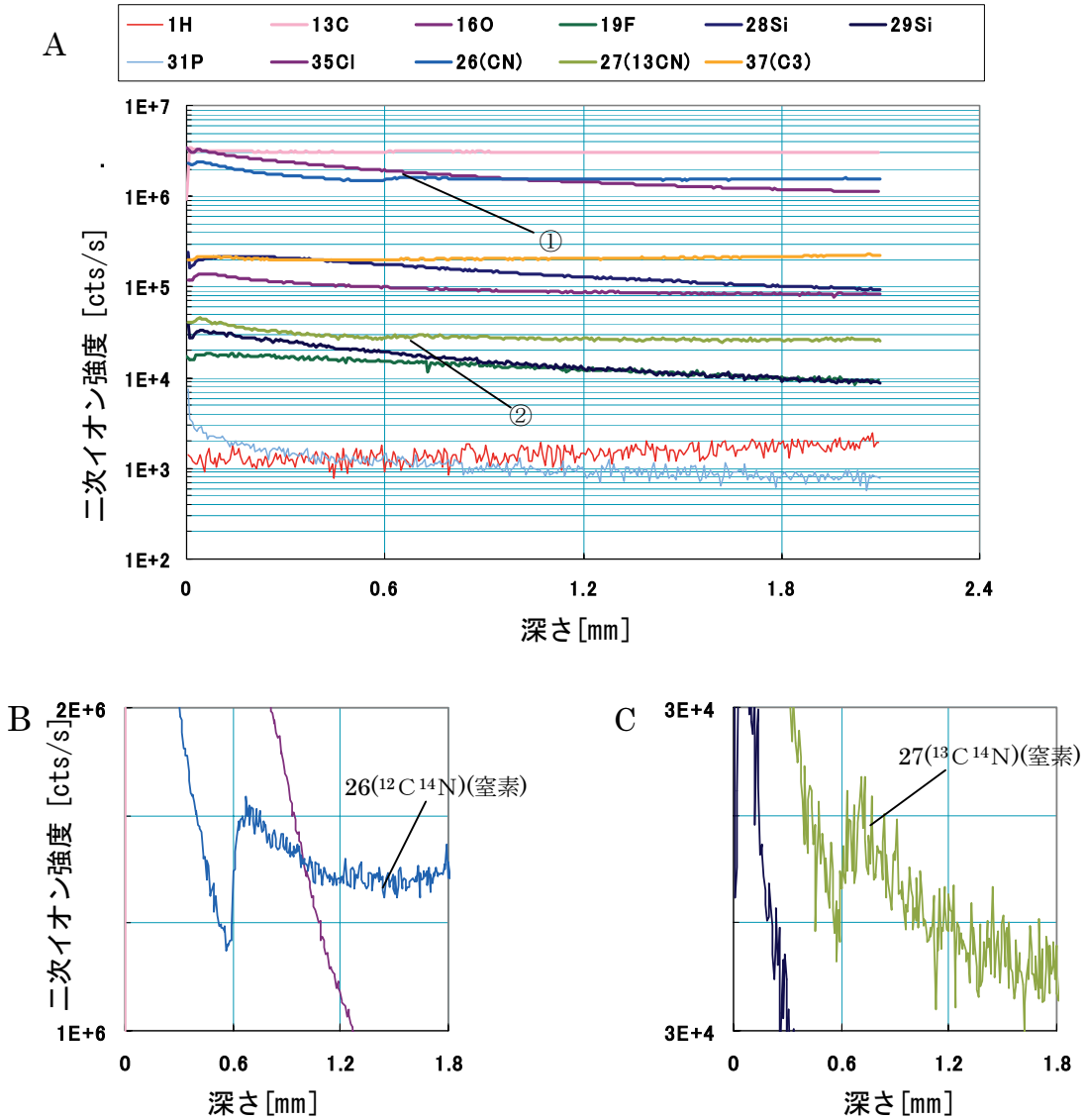


図5. A.10時間成長膜のSIMS分析結果. B. 12C14Nスペクトル(A図①)の拡大図. C. 13C14Nスペクトル(B図②)の拡大図.

Hall 効果測定による分析

Hall 効果測定装置は試料の電気的特性を測定する装置で、磁場中で試料に電流を流すことにより、ローレンツ力で電流が試料中で偏り、そのとき励起される電圧の符号で試料中を流れる電流の担い手が電子であるか正孔であるかを判定する測定法である。即ち、半導体であれば試料の導電タイプがP型であるか、N型であるかを判定する。その他にもシート抵抗の値、シートキャリア濃度、移動度等が測定できる。

図6Aはシート抵抗の絶対温度の逆数依存性を示すグラフである。赤い三角印が今回作製したCVD試料の結果であり、緑の三角印が産総研で以前作製したCVD試料の産総研での測定結果である。また、青色の四角印は産総研で測定したIb基板試料の測定結果である。この図から明らかなように、今回作製した試料では300°C付近を境に傾きが大きい温度領域と、小

さい領域とに分れていることが分かる。また、500°C付近で測定値が異常な値を示している点があるが、この特異点は後に示すシートキャリア濃度の温度依存性においても、移動度の温度依存性においても観測されているので、何らかの測定上の問題が起こったと考えている。

300°C付近からどの試料においても見られる高温領域で傾きが大きい活性化エネルギーの値は1.4-1.7 eVである。これは今回我々が製作したCVD試料については、その中に含まれているかもしれない微量の窒素(おそらく1 ppm以下)が活性化したことにより生成されたキャリア(電子)に基づいたエネルギーを示していると思われる。しかし、SIMS分析の項でも述べたように、膜厚が0.6 μmと薄いため、基板で活性化した窒素キャリアが薄膜まで回ってキャリアを供給した可能性を否定しきれものではない。この高温領域

においてはすべての試料でN型を示した。また、この試料についての低温側での低活性化エネルギーは0.2-0.3 eVであった。そして、この低温領域ではN型、P型の判別はできなかった。産総研で形成したCVD薄膜についての測定データでは高温領域から低温領域に至るまでほぼ1.4 eVの活性化エネルギーを示しており、この値はIb基板のそれとほぼ同じである。このことは産総研が当時(1998年頃)堆積した膜中にはかなり多量の窒素元素が不純物として含まれていた(恐らく100 ppm程度)事を強く示唆している。今回我々

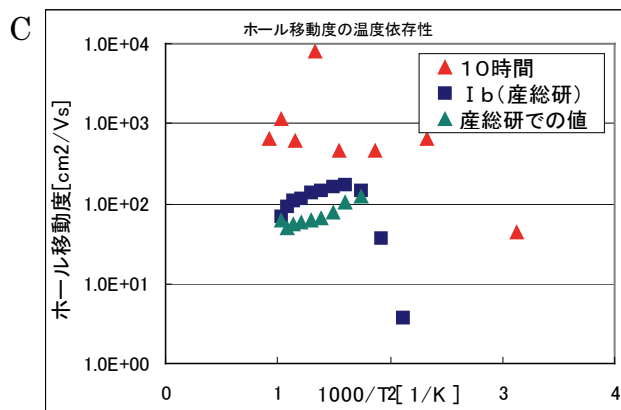
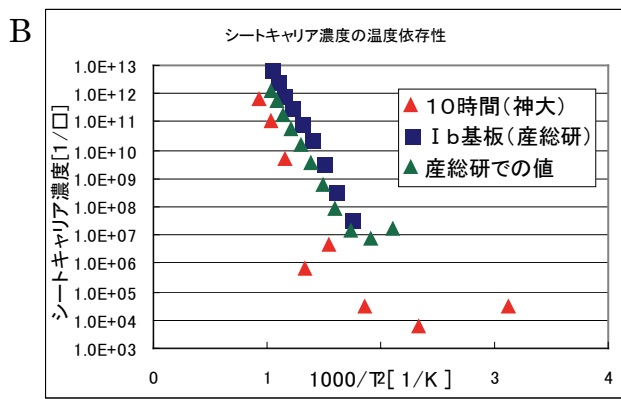
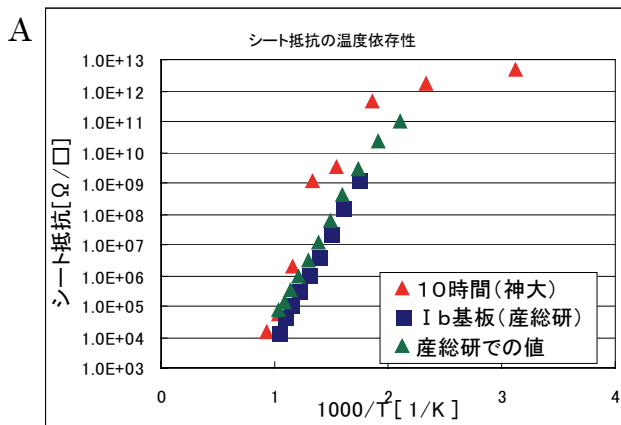


図 6. A. シート抵抗の温度依存性. B. シートキャリア濃度の温度依存性. C. Hall 移動度の温度依存性.

が形成した膜中には少なくともそれよりは遥かに少ない窒素不純物しか含まれていないことを明確に示している。

図 6B にはシートキャリア濃度の温度依存性を示す。温度が高くなるにつれ、シートキャリア濃度は高くなっている。但し、シート抵抗のグラフと同じように500°C付近で測定点が異常な値を示していることがわかり、測定上の問題だと思われる。

図 6C にホール移動度の温度依存性を示す。500°Cの点において異常な値を示しているのは他の2つのグラフと同じであり、測定上何らかの問題が発生したと思われる。

このグラフから明らかなことは産総研でのCVD膜の移動度の値よりも1桁近く高い値を示しているということである。これにより、結晶性が良好で不純物が少なく、従って不純物や欠陥に起因するキャリアの散乱因子が少なく、高い移動度を確保しているということから、良好な膜質のCVD膜が形成されていると予測される。

以上の、AFM、ラマン散乱、SIMS分析、ホール効果測定の結果を踏まえ、いかに今回堆積したCVDダイヤモンド薄膜の性質を議論する。

討論

カーボンナノチューブ形成の検討

まず、AFMの結果から導かれる基板を含めたCVD薄膜の構造は以下のようにできていると考えられる。

幅数10 μmで高さがコンマ数 μm程度のうねりを持った基板上にそれと平行して膜厚0.6 μm程度のCVD膜が形成されている。その膜上に所々切り立った突起が観測される。この突起については恐らくカーボンナノチューブが形成されたものと考えているが、詳細は後に議論する。

幅数10 μmで高さがコンマ数 μm程度のうねりを

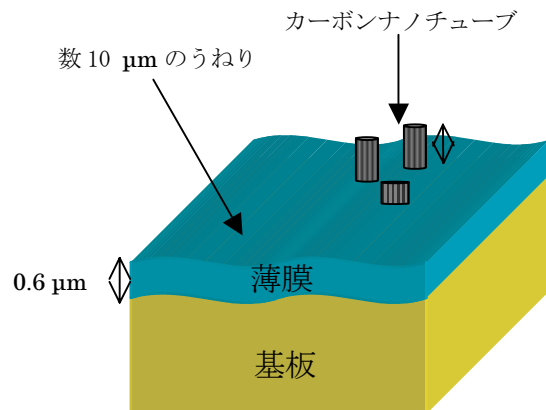


図 7. 堆積したダイヤモンド薄膜の構造.

持った基板というのは図 2B や D に示された AFM 像から類推したものである。この時、観測された突起物の原因であるがダイヤモンドが突起状に成長するとは考えにくい。カーボン原子で構成されている何らかの構造と思われる。ここで考えられる一つの可能性として、カーボンナノチューブが形成されているのではないかと推察している。というのは通常ホモエピタキシャルダイヤモンド薄膜を CVD で合成する場合、メタン濃度が数%高濃度の場合にはカーボン製のチューブが形成されることが分かっている。今回の場合、

0.05%という極微量であることからその可能性は薄いと思われたが、ダイヤモンド基板に薄膜をデポする前に基板洗浄をする工程を今回は行っていない。このような基板には多くの不純物原子が表面に多量に付着していることが、RBS チャネリング測定により分かっている。

図 8A に I b 型ダイヤモンド基板の RBS チャネリングスペクトルを、また、図 8B に I b 型と II a 型ダイヤモンド基板のチャネリングスペクトルを示す。

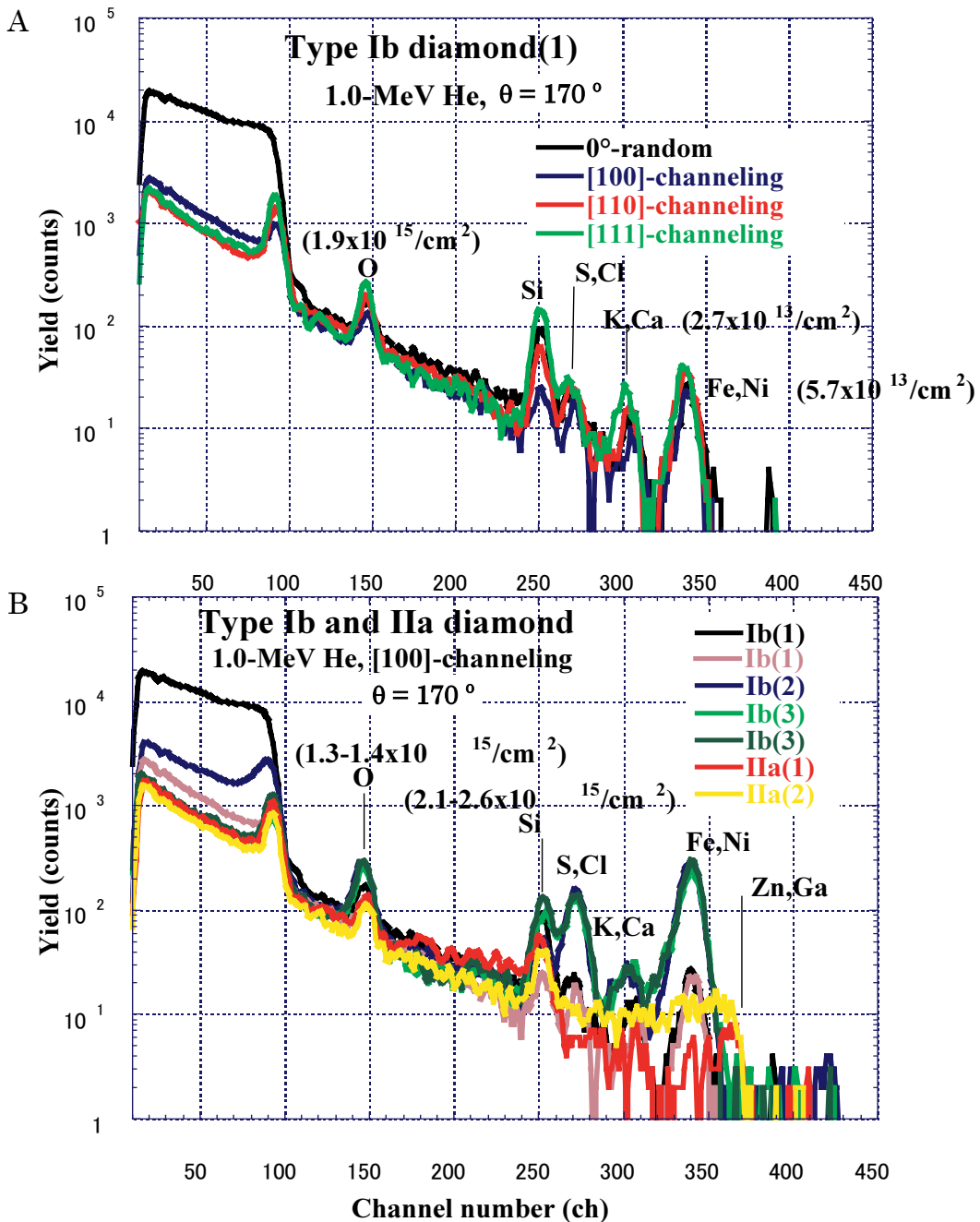


図 8. A. 高温高压合成ダイヤモンド I b 基板の[100]-, [110]-, [111]-チャネリングスペクトル. B. 各種 I b 基板と各種 II a 基板の[100]チャネリングスペクトル.

RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) とは MeV 級のエネルギーの He イオンを試料に入射させ、Rutherford 後方散乱により、ビーム進行方向から後方に弾性散乱される He イオン或いは中性 He 原子のエネルギースペクトルを測定する手法である。この方法により、表面から $1\ \mu\text{m}$ 程度の深さに存在する不純物の分布を測定できる。また、He イオンを高精度にコリメートして試料の結晶軸に平行に入射させるチャネリングと言う手法により結晶性の程度を深さ方向に測定することもできる。

この RBS 測定は現在東京工業大学大岡山キャンパスヴァンデグラフ実験棟において行っている。加速器本体は、東工大の 4.75 MeV ヴァンデグラフ加速器を使い、偏向電磁石、電磁石電源、2本のビームライン、2つのチャンパー、測定系等はすべて神奈川大学から持って行って組み上げた。平均して1ヶ月に5-6日のマシンタイムを割り当てられ、そこで実験をしている。

図 8A、B に示す RBS スペクトルは東工大で測定したのではなく、以前筆者が NTT 物性科学基礎研究所に在籍していた時に、測定したデータである。図 8A は I b タイプの高温高压合成ダイヤモンド基板のランダムスペクトルと [100]-、[110]-、[111]-チャネリングスペクトルである。基板そのものは [100] 基板である。このスペクトルの 100 ch 付近以下において現われているスペクトルは基板の炭素原子から後方散乱されてきたヘリウムである。ランダムスペクトルは大きな収率であるが、チャネリングスペクトルは後方散乱されるヘリウムの収率が落ちるため、カウント数が少なくなっている。そして、基板の表面ピークと呼ばれる鋭いピークが 100 ch 付近に観測される。このピークが大きいほど表面から数原子層の原子配列の乱れが大きいということになる。その他高エネルギー側（チャネル数の大きい部分）に現われる各種のピークは、エネルギー保存則と運動量保存則の2つを使ってどのような種類の原子からヘリウムが後方散乱されてきたのかを厳密な数式を用いて計算することができる。それにより、各ピークの位置を同定すると 150 ch 付近が酸素、250 ch 付近がシリコンであることが分かる。更に、300 ch 付近がカリウムやカルシウムであること、340 ch 付近が鉄、クロム、ニッケル等の元素であることが同定できる。しかも、各チャネリングスペクトルを測定する際、試料がビーム進行方向に対して傾くにも関わらず、ピークの「位置が変化していないことが明らかである。これは、これらの元素が基板内部ではなく、表面に付着している不純物であるということを示している。実に多くの不純物元素が表面に付着していることが分かる。これらは基板購入時そのままの試料を測定したためであり、何らかの洗浄処理を施すことによ

り、表面に付着しているこれら元素が大幅に低減することが期待できる。これらのピークの大きさ（面積）から表面付着原子の面密度の絶対値を算出することができる。たとえば酸素は $1.9 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ であり、カリウム或いはカルシウムは $2.7 \times 10^{13}/\text{cm}^2$ であり、鉄クロムニッケルの類は $5.7 \times 10^{13}/\text{cm}^2$ であることが算出できる。RBS 測定法においては重元素ほど感度がよく検出される。この図 8A から明らかなように、鉄、クロム、ニッケルのようないわゆる鉄族の元素が非常に多く基板表面上に付着していることが分かる。これは、高温高压合成基板を製作する時、触媒として鉄の熔融溶液中で合成するためである。しかし、基板内部にはこれら触媒金属は含まれていないようである。このように鉄類の金属がダイヤモンド基板表面にかなり高濃度に付着していることにより、それを核としてカーボンナノチューブが形成されたのではないかと推察される。

図 8B は 3 種類の I b 基板と 2 種類の II a 基板の [100]-チャネリング測定した結果を示すスペクトルである。II a 基板とは高温高压合成する際に窒素不純物の取り込み量を極めて少量に抑える合成法により作製した基板である。この基板に含まれる窒素量は 1 ppm 以下であり、I b 基板が窒素不純物による黄色い色を帯びているのに対して全くの無色透明なダイヤモンド基板である。この図から分かるように I b 基板は鉄、クロム、ニッケル等の不純物が試料の違いにより増減はあるものの、押しなべて高い不純物濃度を示している。II a 基板は I b 基板と比較すれば表面に付着している不純物は少ないもののやはり、かなり大きな重元素が表面に付着していることには変わりはない。いずれにしろ、表面に付着している不純物元素は洗浄処理により、大幅に低減できることが期待される。

これら RBS 測定の結果により、表面に高濃度に付着している鉄類元素の不純物が核となり、カーボンナノチューブが形成されたものが AFM の測定結果に出てきた突起であると推察しているが、これらが本当にカーボンナノチューブであるかどうかということは今後、TEM 等の手段により詳細に検討してゆかなければはっきりとした直接の証拠とはならない。

SIMS 分析の検討

SIMS 分析とは図 9 に示したように Cs のような一次イオンビームを低エネルギー（数 keV）で斜めから試料に照射し、表面からカーボン原子をスパッタしながら穴を掘っていく。この時、スパッタされた原子（大部分が炭素であるが、他の不純物も多く含まれる）が飛び出してくる。これらの原子を電場と磁場を直角に交差させた場の中を通すことにより、質量の違いを

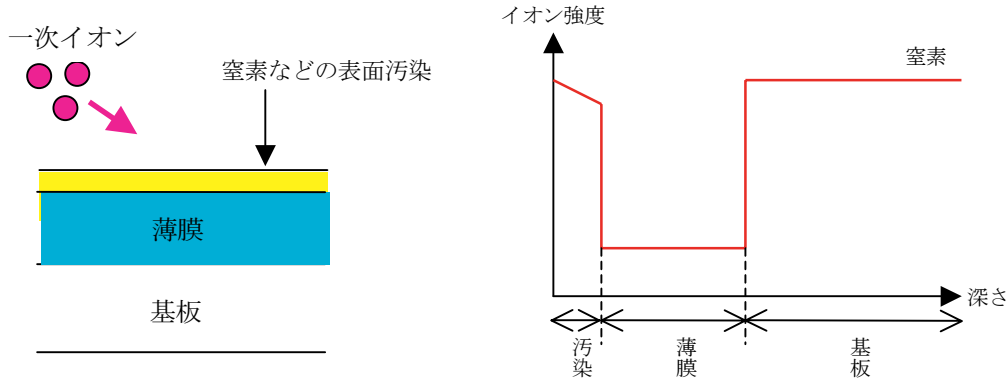


図 9. SIMS 分析の原理と予想された窒素不純物分布。

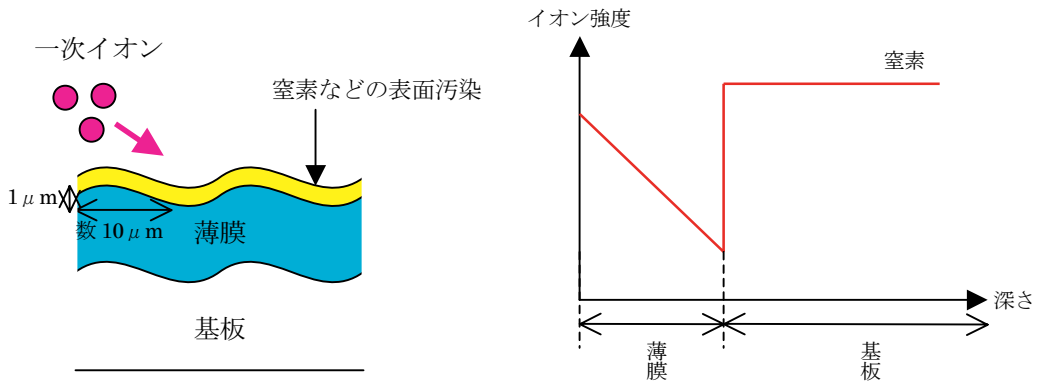


図 10. 実際に測定された窒素の SIMS 分析スペクトル。

分離できるマスキングフィルターを通すことにより、各種原子に分類してそれぞれの 2 次イオン強度を測定することができる。今回堆積した膜中には Ib 基板のように窒素不純物が数百 ppm も含まれることはないかと期待していたので図 9 右側に示したようなスペクトルを予想していた。ところが、実際には図 5 に示したように基板と膜の界面において顕著な窒素 2 次イオン強度の差は認められなかった。ここで実際に、膜中に高濃度に窒素が含まれているのかどうかということが問題になる。

図 10 に実際に測定された窒素スペクトルの膜中分布を模式的に示した。スペクトルの生データは図 5A-C に示している。この図 5 からは今回堆積した膜中にもかなり高濃度の窒素不純物が含まれているのではないかとと思われるが、実はそうではない。AFM の描像から Ib 基板それ自体が図 10 の左側に示したようなかなりなだらかな起伏が存在することが分かった。これは図 2 の AFM の像を見ると明らかなように、基板や堆積膜が数 10 μm 程度の周期で最大 1 μm 程度の起伏を持っているからである。すると、斜めから入射する Cs 1 次イオンビームは膜の表面を一樣にスパッタしているのではなく、起伏の影に隠れた領域はスパッタによる穴掘り速度が遅くなっている。こうして表面が一樣に彫れているのではなく、かなり領域によってばらつ

きがあるスパッタ速度になっていることが予測される。すると、一次ビームが一部基板に到達して窒素濃度が上がったとしても、他の領域はまだ膜中をスパッタしていて窒素濃度が少ないにも関わらず、全体として膜中の窒素濃度が見かけ上上昇しているように見えることになる。従って、正確な膜中の窒素濃度分布を測定するためにはあらかじめ平坦な基板上に幕を堆積させることが必要である。今回の測定においては本当に膜中の窒素濃度が基板と比較して 2 桁以上少ないのかどうかを検証することはできなかった。しかし、明らかに基板との界面において、窒素濃度が変化していることから、基板よりは少ない窒素濃度であることは確実であると思われる。

Hall 効果測定による分析の検討

膜の物性を一番敏感に表現するのは電氣的測定である。今回、ホール効果測定装置を使用して測定した結果、キャリアの移動度に関して図 6C に示したように、低温領域から高温領域に渡るまで、産総研で作製した試料よりも高移動度の膜が得られていることが分かった。得られた移動度の値が本当だとすると非常に高品質な膜が得られている可能性がある。ただ、今回初めてホール効果測定装置を駆使して測定したが、まだ、使いこなせておらず、電源等の故障もあって今後検討すべき

課題は多い。

ラマン分光測定による分析の検討

ダイヤモンド膜の結晶性を評価する手法としてよく利用されるのはラマン散乱分光法である。

図4に示すラマン散乱スペクトルにおいてダイヤモンドに特有な 1333/cm におけるシャープなピークが観測されている。Ib 基板のスペクトルピークよりも半値幅が狭い。さらに、昨年堆積した膜と比較してバックグラウンドが格段に小さくなっている。これらのことは今回堆積したダイヤモンド膜が非常に結晶性がよいことを表わしている。このことは前節のホール効果測定によるキャリア移動度が高いことと連動することであり、膜質として不純物が少なく、結晶性が高い膜、即ち、キャリアの散乱が小さい良好な膜であることを示唆している。現在のラマン散乱分光測定装置の波数分解能が 10/cm 程度しかないので、さらに、高分解能のラマン散乱分光測定器を用いれば、Ib 基板と比較してもっと半値幅が狭まり、さらに結晶性がよいことの証が得られるかも知れない。

まとめ

ダイヤモンド半導体が未来の半導体として如何に期待されているのかということから、現在までに克服されていない問題点等に言及した。それを克服するための方策を述べ、それを実現するためにはどのようなプロセスで進めばいいかも示した。現在までに神奈川大学において、高純度、高品質のダイヤモンド薄膜試料を形成できる μ 波プラズマ CVD 装置を開発したこと、さらに、それを使用してかなり高品質なダイヤモンド薄膜を形成でき始めたことを紹介した。また、カーボンナノチューブという現在極めて注目されている物質も成長させることのできる可能性も示すことができた。これらの膜の品質を評価するためには各種測定装置が必要であるが、現在までに、ラマン分光測定装置、AFM 装置、私学助成によりホール効果測定装置が導入され、試料形成から評価に至る一貫したプロセスを大学内部で閉じた形で実現できるようになった。さらに、今年度私学助成で導入することになっている中電流イオン注入装置を利用することにより、ダイヤモンド半導体のみならず、シリコン半導体や各種化合物半導体等に不純物をドーピングしたり、物質の組成を非熱平衡過程により改質することができるようになり、半導体のみならず、固体物性のあらゆる領域において研究の幅が広がることが期待できる。

謝辞

この研究を遂行するにあたり、情報科学科の多くの先生方から、いろいろ財政的援助を頂き深く感謝いたします。また、産業技術総合研究所 ダイヤモンドセンター大串秀世氏にはいろいろ討論していただき、深く感謝いたします。

文献

- 1) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temperature recrystallization of amorphous silicon by high-energy ion beam. *Appl. Phys. Lett.* **40**: 686.
- 2) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low temperature (<300°C) annealing of amorphous Si by scanned high energy (~2.5 MeV) heavy ion beam. *Jpn. J. Appl. Phys.* **21**:211.
- 3) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam-induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon. *Materials Science Reports* **5**:319.
- 4) Linnros J, Svensson B and Holmen G (1984) Ion-beam induced epitaxial regrowth of amorphous layers in silicon on sapphire. *Phys. Rev.* **B30**: 3629.
- 5) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1985) Proportionality between ion-beam induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev.* **B32**: 2770.
- 6) Williams JS, Elliman RG, Brown WL and Seidel TE (1985) beam induced crystallization of amorphous silicon. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **37**: 127.
- 7) Svensson B, Linnros J and Holmen G (1983) ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum & Methods* **209/210**: 755-760.
- 8) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1984) Influence of energy transfer in nuclear collisions on the ion beam annealing of amorphous layers in silicon. *Appl. Phys. Lett.* **45**(10):1116-1118.
- 9) Elliman RG, Johnson ST, Pogany AP and Williams JS (1985) ion beam induced epitaxial crystallization of silicon. *Nucl. Instrum & Methods* **B7/8**:310-315.
- 10) Williams JS, Brown WL, Elliman RG, Knoell RV, Mahr DM and Seidel TD (1985) The kinetics and microstructure of ion beam induced crystallization of silicon. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **37**, 79.
- 11) Linnros J, Elliman RG and Brown WL (1987) The composition between ion beam induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon: the role of the divacancy. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **74**: 477.
- 12) Heera V (1996) Comment on 'Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic of mega-electron-volt heavy-ion-beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **80**: 4235-4236.
- 13) Kinomura A, Williams JS and Fujii K (1999) Mass effects on regrowth rates and activation energies of solid-phase epitaxy induced by ion beams in silicon. *Phys. Rev.* **B59**: 15214-15224.
- 14) Williams JS, Elliman RG, Brown WL and Seidel TE (1985) Dominant Influence of beam-induced interface rearrangement on solid-phase epitaxial crystallization of Silicon. *Rev. Lett.* **55**: 1482-485.
- 15) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam induced epitaxial regrowth of amorphous layers in silicon on

- sapphire. *Mater. Sci. Rep.* **5**:319.
- 16) Linnros J, Svensson B and Holmen G (1984) Proportionality between ion-beam induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev.* **B30**: 3629.
 - 17) Elliman RG, Williams JS, Brown WL, Leiberich A, Maher DM and Knoell RV (1983) ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum & Methods* **19/20**: 755-760.
 - 18) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1984) Influence of energy transfer in nuclear collisions on the ion beam annealing of amorphous layers in silicon. *Appl. Phys. Lett.* **45**(10): 1116-1118.
 - 19) Jackson KA (1988) A defect model for ion-induced crystallization and amorphization. *Mater. Res.* **3**(6): 1218.
 - 20) Heera V, Henkel T, Kgler R and Skorupa W (1995) Evidence for diffusion-limited kinetics of ion-beam-induced epitaxial crystallization in silicon. *Phys. Rev.* **B52**:15776.
 - 21) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature crystallization and amorphization of amorphous Si layer on the crystalline Si by high-energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev.* **B43**: 14643.
 - 22) Nakata J (1996) Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **79**: No.2, 682.
 - 23) Nakata J (1997) Enhanced crystallization of amorphous Si containing hydrogen without oxygen during ion-beam irradiation at 310°C and during furnace annealing below 450°C. *J. Appl. Phys.* **82**(11): 5433.
 - 24) Nakata J (1999) Annealing of ion-implanted defects in diamond by MeV ion-beam irradiation. *Phys. Rev.* **B60**: 2747.
 - 25) Prins JF (2000) N-type semiconducting diamond by means of oxygen-ion implantation. *Phys. Rev.* **B61**: 7191.
 - 26) Prins JF (1999) Towards improving the quality of semiconducting diamond layers doped with large atoms. *Diamond Relat. Mater.* **8**: 1635.

■短 報■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

シロイヌナズナの生殖過程に異常のある変異体の染色体解析

安積良隆^{1,4} 酒井麻未¹ 黒森 崇² 松永幸大³

Analysis of Chromosome Behavior of *Arabidopsis* Mutants Defective in Reproductive Processes

Yoshitaka Azumi^{1,4}, Asami Sakai¹, Takashi Kuromori² and Sachihiro Matsunaga³

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

² Plant Functional Genomics Group, RIKEN Genomic Science Center, RIKEN, Yokohama Institute, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

³ Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita-ku, Osaka, Osaka 565-0871, Japan

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

Abstract: From *Arabidopsis* mutant collections, more than 30 meiotic mutants have been isolated. However, the molecular mechanism of plant meiosis is still largely obscure. For the purpose of further understanding, we searched for new *Arabidopsis* meiotic mutants. As a results of our collaboration, we found several new mutants, which were defective in reproductive processes. Since our main interest was in meiosis, we selected one meiotic mutant among them, and analyzed its chromosome behavior during meiosis.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, reproduction, meiosis, chromosome, DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole)

序論

生物は一つの個体で永遠に生きていくことはできない。次の世代へと命の引き継ぎを行うため、生殖によって子孫を生み出す。ほとんどの高等生物は雌性配偶子と雄性配偶子が合体（受精）することによって次世代が生み出される有性生殖を行う。受精の際に染色体の倍加が起こるが、世代を通じて染色体数を一定にするために、減数分裂を行い、予め配偶子の染色体数を半減させておく。減数分裂はせっかく二組ある染色体を一組に減らす分裂で、不可欠なものではあるが、一本でも染色体が多かったり少なかったりしても致命的な影響が現れ、大きな危険を伴う分裂である。

減数分裂は一度の染色体の複製の後、二度の分裂が起こる。それぞれ第一分裂、第二分裂と呼ばれ、前期、中期、後期、終期からなる。減数第一分裂の前期は、染色体が細い糸状に見え始める細糸期（レプトテン期）、相同染色体がペアリングし始める合糸期（ザイゴテン期）、完成したシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が互いに接着する太糸期（パキテン期）、シナプトネマ構造が崩壊し染色体がさらに

凝縮する複糸期（ディプロテン期）、凝縮がほぼ完成する移動期（ディアキネシス期）の5つの時期に分けられる。

減数分裂と体細胞分裂の顕著な違いは第一分裂前期に相同染色体が対合することで、このことが相同染色体の正常な分配の前提条件となる。相同染色体の対合が完成するまでには、テロメアのクラスタリング、相同染色体の並列（alignment, juxtaposition）、減数分裂期相同組み換え、シナプトネマ構造の完成といったプロセスがある。このなかで相同組み換えに関する研究が最も進んでいる。酵母などの研究から相同組み換え反応は SPO11 蛋白質による二本鎖 DNA 切断から開始することが知られている¹⁾。その後、一本鎖 DNA 部分が削り出され、その一本鎖が相同染色体の相同部分と組換えを起こし、反応が進むといったモデルが提案されている²⁾。

酵母や動物では SPO11 遺伝子はゲノム当たり1つしか見つかっていないが、シロイヌナズナでは3つの相同遺伝子、*AtSPO11-1*、*AtSPO11-2*、*AtSPO11-3*が存在することが知られている³⁾。

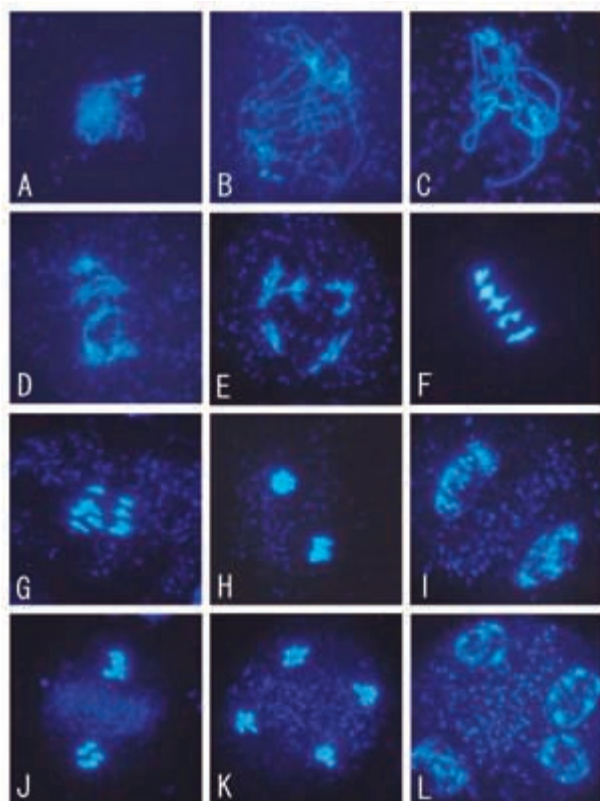


Fig. 1. 野生型シロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期染色体像. 野生型のシロイヌナズナの花序を採取し、ファーマー液で固定した後、適当な大きさの蕾を選び、消化展開法によって染色体試料を作製した. 染色体は DAPI で染色した. A; レプトテン期, B; ザイゴテン期, C; パキテン期, D; ディプロテン期, E; ディアキネシス期, F; 第一分裂中期, G; 第一分裂後期, H; 第一分裂終期, I; 第二分裂前期, J; 第二分裂中期, K; 第二分裂後期, L; 第二分裂終期.

AtSPO11-1 は実際に相同組み換えの開始に必要で、この遺伝子の変異体では相同染色体の対合が起こらないことが知られている⁴⁾。 *AtSPO11-3* の変異体では栄養生長に異常が見られることから体細胞分裂時に機能していると考えられている⁵⁾。 *AtSPO11-3* との類似性から *AtSPO11-2* も体細胞分裂に関与すると考えられていたが、まだ実際には調べられていなかった。そこで我々は *AtSPO11-2* の変異体を入手し、その表現型を解析したところ、相同染色体の対合に必須であることが判明した。

材料と方法

実験植物

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型及びその変異体は、神奈川県・平塚キャンパス内の植物育成棟内で栽培した。 $60 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白色光、14 時間 10 時間の明暗周期、気温 24°C 、湿度 60% の条件下で、ハイポネックスと MS 培地を交互に、週に一度与えながら栽培した。播種後、5-7 週間目

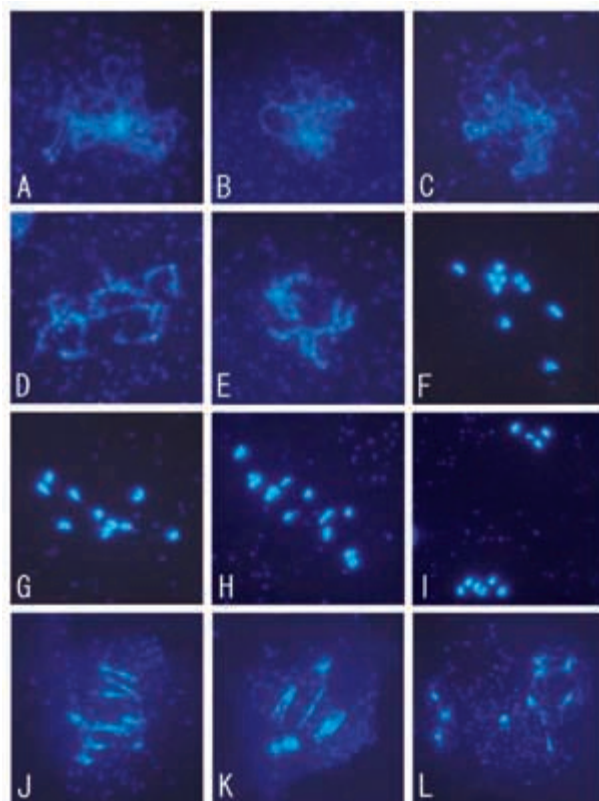


Fig. 2. *atspo11-2* 変異体の花粉母細胞の減数分裂期染色体像. 野生型の場合と同様に、 *atspo11-2* の花序を採取し、消化展開法によって染色体試料を作製した. A-C; レプトテン期からザイゴテン期, D-E; ディプロテン期, F-G; ディアキネシス期, H; 第一分裂中期, I; 第一分裂後期, J-K; 第一分裂終期, L; 第二分裂前期.

の植物の花序を採取し、ファーマー液 (Ethanol, Acetic Acid; 3:1) 中、室温で 20 時間程度置くことによって固定した。その後は -20°C で保存した。

消化展開法

花粉母細胞の染色体試料作製は Azumi らの方法⁶⁾ に従った。固定した試料を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) 中で洗った後、cytohelicase (Sigma)、cellulase “ONOZUKA” R-10 (Yakult)、pectolyase (Kikkoman) (各 0.4% (w/v)) を含む同緩衝液中、適宜脱気をしながら、 37°C 3 時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、 4°C で保存した。消化した花序をシャーレ上の 60% 酢酸中に移した後、適当な大きさの蕾を取り出し、同じく 60% 酢酸を滴下したスライドガラス上で解剖した。薬をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、 45°C のホットプレート上に 1 分間静置した。氷冷したファーマー液を周囲に滴下し、緩やかに混和させた後、ファーマー液を捨て、スライドを乾燥させた。DAPI 溶液

(Vector) を滴下し、カバーガラスを載せた後、顕微鏡 (オリンパス BX61) で観察した。

結果

ET3962 (atspo11-2-1)

SALK 研究所のトランスポゾンタギングラインの中に *AtSPO11-2* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されている株 *ET3962* を見出した。そこでこの株を取り寄せ、表現型を解析することにした。

栄養成長期においては野生型と同じく良く生長し、葉の形状・枚数、草丈、生長速度などに特に異常は見つからなかった。生殖成長期においても、萼、花弁、雄しべ、雌しべの花器官の分化では、形状や数に異常は見られなかった。しかし、この変異体の鞘は発達せず、種子はほとんど得ることが出来なかった。生殖細胞に異常があることが予想されたので、花粉母細胞における減数分裂時の染色体を観察することにした。

atspo11-2-1 の染色体観察

野生型のシロイヌナズナの染色体像に関しては Ross らの詳しい報告がある⁷⁾。細胞壁を消化した後、スライドガラス上に染色体を展開する消化展開法によって染色体試料を作製し、我々も同様の観察結果が得られた。第一分裂前期では、糸状に染色体が観察され始めたレプトテン期 (Fig.1A)、ペアリングが起きていると予想されるザイゴテン期 (Fig.1B)、対合が完成したパキテン期 (Fig.1C)、シナプトネマ構造が崩壊してゆく過程のディプロテン期 (Fig.1D)、凝縮がほぼ完成したディアキネシス期 (Fig.1E) などが観察された。

この変異体でも、減数分裂期に入り、レプトテン期の染色体は数多く観察することができたが (Fig.2A-C)、ザイゴテン期のものはごくわずしか見られなかった。パキテン期の染色体は全く見られなかった。初期のディプロテン期の染色体でははっきりとした異常を確認することはできなかったが (Fig.2D,E)、凝縮が完了したディアキネシス期のもものでは、ほとんどの場合 10 個の染色体を確認することができた (Fig.2F,G)。このことは相同染色体同士が分離しており、一価染色体の状態で存在していることを示している。

第一分裂中期には各染色体は一価のまま赤道面付近に接近してくるが (Fig.1H)、安定せず、整列することはなかった。ある染色体は、いずれかの極に早くから移動してしまい、ある染色体は第一分裂終期になっても赤道面付近に停滞した (Fig.1J,K)。野生型のシロイヌナズナでは染色体は両極に 5 本ずつ

分配されるのに対し、この変異体では 4:6 に分配されたり (Fig.1I)、7:3 とか 8:2 に分配されるものもあった。さらには赤道面付近にいくつかの染色体が残ってしまい、二極以外のところにも染色体が分布し多極化するものもあった (Fig.1L)。中には、第一分裂中期から後期にかけて一価染色体が姉妹染色体に分裂してしまっていると考えられるものも観察された。これらのことは、相同染色体がキアズマによって連結された二価染色体となっていないためと考えられる。

減数第二分裂に関しては、各染色体が姉妹染色体に分離し、細胞質分裂が起こって花粉小胞子が作られると言った点では、ほぼ正常に進行していると考えられる。しかし、第一分裂で染色体が多極化しているため、第二分裂では細胞内の不特定の部位で姉妹染色体への分離が起こり、異数体 (polyad) が形成された。異数体から形成された花粉小胞子は規定の染色体を有さず、この変異体では種子がほとんど形成されないことから、ほとんどの花粉は稔性を持たないものと考えられる。

討論

AtSPO11-2 は相同染色体の対合に必要である

SPO11 遺伝子は古細菌の DNA topoisomerase VI の A サブユニットと相同性があり、古細菌のそれは B サブユニットと共同で体細胞分裂時の DNA 複製に関わる。酵母や昆虫、脊椎動物では B サブユニット遺伝子は存在せず、*SPO11* 遺伝子は、減数分裂時の二本鎖 DNA 切断に特異的に関わっている。シロイヌナズナでは 3 つの A サブユニットのホモログ (*AtSPO11-1*, *AtSPO11-2*, *AtSPO11-3*) と 1 つの B サブユニットのホモログが存在する。*AtSPO11-1* 蛋白質はすでにシロイヌナズナでも減数分裂期の二本鎖切断に関わっていることが知られている⁴⁾。*AtSPO11-3* は DNA 複製に関わるとの私信を得ている⁵⁾。B サブユニットの有無と機能の保存性との関連は興味深い。酵母では失われてしまった働きが植物で保存されているというのは、一見矛盾しているように思えるかも知れないが、酵母の祖先是複製に関わる機能をもった *SPO11* を保有していたが、その機能は進化の過程で他の遺伝子に取って代われ、*SPO11* は減数分裂期の機能のみを維持しているのかも知れない。

AtSPO11-2 蛋白質に関しては、その機能に関する報告はまだ無かったが、B サブユニットと結合し得るといった情報から、*AtSPO11-3* と同様の働きをするのではないかと考えられていた。しかし、今回の研究で *atspo11-2* 変異体では相同染色体のペアリン

グが全く起きないことが明らかにされ、AtSPO11-1と同様に、減数分裂期の DNA の二本鎖切断をするというのがその働きではないかと推測される。酵母や動物での実験により二本鎖切断が起こらないと相同染色体のペアリングが生じないことが明らかにされているので、ペアリングに至る二本鎖切断以外の段階で働いている可能性も完全には否定できないが、*AtPO11-2* は二本鎖切断に必要な遺伝子と考えられる。

AtSPO11-1 と *AtSPO11-2* の変異体はそれぞれ単独の変異で相同染色体のペアリング障害を起こすことから、AtSPO11-1 蛋白質も AtSPO11-2 蛋白質も共に存在することが二本鎖切断に必要で、片方の遺伝子でも欠損すると二本鎖切断は起こらないことがわかる。古細菌の DNA topoisomerase VI は AABB サブユニットからなる四量体であるが、これから類推すると AtSPO11-1 と AtSPO11-2 の遺伝子産物が二量体あるいは四量体を形成している可能性が考えられる。しかし、酵母や動物では *SPO11* 遺伝子は一つしか見つかっていない。動物や酵母では何らかの補助因子が働いていることも考えられるが、一つの遺伝子産物が多量体を形成することもあるのだろうか？あるいは二本鎖切断用の *SPO11* が多量体

を形成するというのは、植物特有の現象なのであるか？今後のこの分野の研究の発展が期待される。

文献

- 1) Keeney S, Giroux CN and Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375-384.
- 2) 坪内英生 (2003) 出芽酵母で明らかになった減数分裂期の相同染色体分配メカニズム. *実験医学* **21** (No. 5 増刊): 700-707.
- 3) Hartung F and Puchta H (2000) Molecular characterization of two paralogous *SPO11* homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acid Res.* **28**: 1548-1554.
- 4) Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001) *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589-600.
- 5) Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J and Roberts K (2002) DNA topoisomerase VI is essential for endoduplication in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**: 1782-1786.
- 6) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence *in situ* hybridization procedure applicable to whole stages of male meiosis of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Sci.* **5**: 1-6.
- 7) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.

■短 報■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ポリエステルの微生物分解 -*Ralstonia metallidurans*における PHB 結合蛋白質の役割の検討-

齊藤光實^{1,2,3}

Nature of Poly(3-hydroxybutyrate) Inclusion Body-Binding Proteins in *Ralstonia metallidurans* CH34

Terumi Saito^{1,2,3}

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

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

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

Abstract: The genes of two poly(3-hydroxybutyrate) inclusion body-binding proteins (GAP1 and GAP2) were cloned from *Ralstonia metallidurans* CH34, and their gene products were purified. The molecular masses of GAP1 and GAP2 were 24 kDa and 18 kDa, respectively. GAP1 comprised the major part of proteins in the PHB inclusion body of *R. metallidurans* and its amino acid sequence was quite similar to that of Phasin of *R. eutropha* H16. These results indicate that GAP1 probably play the role of the major protective protein of the inclusion body. The content of GAP2 in the PHB inclusion body of *R. metallidurans* was very small. Although GAP2 accelerated the degradation of the PHB inclusion body in a similar manner to Apd from *Rhodospirillum rubrum*, the physiological role of GAP2 was not clear.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), PHB, PHB-binding protein, *Ralstonia metallidurans*

序論

生分解性ポリエステルであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸 (PHB) の細胞内での合成と分解の機作を解明する基礎的知見を得るために、PHB 封入体に結合する蛋白質の性質とその役割に付いて検討した。

細胞内に蓄積される PHB は封入体として存在し、その周りを数種類の蛋白質が覆っている。PhaP は最もよく研究されている蛋白質で *R. eutropha* では PHB 封入体蛋白質の 90%以上を占め、その発現量が封入体の大きさと数に影響を及ぼしている。*R. rubrum* では ApdA と呼ばれる PHB 分解の活性を促進する因子が知られていたが^{1,2)}、最近になって PHB 封入体上に存在しており PhaP と同様の役割を果たしているのではないかと報告されている³⁾。

Ralstonia metallidurans は PHB 蓄積菌のモデル生物である *R. eutropha* の近縁種であり、現在ゲノムプロジェクトにより全塩基配列の決定が行われている。BLAST 検索の結果、これまでに解析されている *R. metallidurans* の塩基配列中には *R.*

eutropha で見つかっている PHB 代謝系の蛋白質が見つかり、更に *R. rubrum* の ApdA のアミノ酸配列と類似性を示す蛋白質も見つかった。ApdA の細胞内での働きは未だ不明な点が多く、活性促進作用が報告されていることから PHB 分解の調節に関わっているのではないかと考えられる。本研究では *R. eutropha* の PhaP、*R. rubrum* の ApdA と類似のアミノ酸配列を持つものをそれぞれ GAP1、GAP2 とし、遺伝子のクローニングを行った後に大腸菌で発現させた蛋白質を精製してその性質を検討した。また、これらの遺伝子の大量発現株を作成して PHB の蓄積量と形態に及ぼす影響を調べた。

材料と方法

Ralstonia metallidurans CH34 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。GAP1 と GAP2 の遺伝子はゲノムプロジェクトの塩基配列を基にクローニングした。クローニングした両遺伝子

が発現する蛋白質のカルボキシル末端にヒスチジン標識を付けて大腸菌で発現させ、発現蛋白質をニッケルカラムで精製した。

結果と討論

GAP1、GAP2とも *R. metallidurans* の細胞内で発現しており、その量は GAP1 が全封入体蛋白質の70%以上を占めているのに対して GAP2はごくわずかであった。GAP1 と GAP2 の分子質量はそれぞれ 24 kDa と 18 kDa であった。GAP2 は ApdA と同様に活性促進作用を示したが GAP1 は阻害作用を示した。活性促進作用がどのようにして起こるかを調べる為に抽出した PHB 封入体 (native PHB) を含む反応液に GAP2 を加えた時に、元々 PHB 上に存在する GAP1 及び添加した PHB 分解酵素がどのような挙動を示すかを調べた。GAP2 を加えると GAP1 は PHB 封入体上から外れる事が分かった。また、PHB 分解酵素は GAP2 を加えない場合には PHB 封入体上に結合しているが GAP2 を添加した後では結合を阻害されるという事がわかった。表面上を PHB 結合蛋白質で覆われていない人工 PHB 顆粒を基質とした場合には GAP2 による活性促進作用は見られなかった。以上の結果から GAP2 による活性促進作用は PHB 分解酵素に作用して起こるのではなく、GAP2 によって native PHB の構造変化が引き起こされて分解されやすくなるのではないかと考えられる。

GAP1 および GAP2 の大量発現株は野生株と比較すると PHB を蓄積している状態では細胞内の PHB 含有率に大きな変化はなかった。蓄積した PHB を分解する条件で培養すると GAP1 大量発現株では野生株と違いが見られなかったが、GAP2 大量発現株では野生株よりも分解速度が遅く、最終的に細胞内に残った PHB の含有率も高かった。

native PHB を基質とした試験管内での活性促進作用とは反対の阻害的な効果が細胞内では見られた。

GAP1、2 大量発現株における PHB 蓄積時の PHB の形態は PhaP を大量発現させたときと同様に多数の小さな顆粒状になっていた。以上の結果から *R. metallidurans* において GAP1 は PhaP に相当するものであると考えられる。GAP2 は PhaP と同様の機能も持っていると考えられるが、発現量の少なから考えると PhaP として働いているのではないと考えられる。また、GAP2 による活性促進作用が細胞内で起こっている可能性は少なく GAP2 が常に発現しており、大量発現株では PHB 分解時に阻害的に働く事を考えると GAP2 の細胞内での役割は PHB 分解時に誘導される PHB 分解酵素の発現量の調節を行っているのではないかと予測される。

謝辞

この研究は 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究「環境にやさしい有機材料設計のための劣化の制御に関する研究」(代表者: 大石不二夫) の研究の一環として研究助成を受けて行われました。お礼申し上げます。

文献

- 1) Merrick JM and Doudroff M (1964) Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* **88**: 60-71.
- 2) Handrick R, Technow U, Reichart T, Reinhardt S, Sander T and Jendrossek D (2004) The activator of the *Rhodospirillum rubrum* PHB depolymerase is a polypeptide that is extremely resistant to high temperature (121 degree C) and other physical or chemical stresses. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 265-274.
- 3) Handrick R, Reinhardt S, Schultheiss D, Reichart T, Schuler D and Jendrossek D (2004) Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the Activator is a PHB-granule-bound protein (phasin). *J. Bacteriol.* **186**: 2466-2475.

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

Design and Synthesis of Dioxetane-Based Chemiluminescent Substrates with High Efficiency in Aqueous System

Masakatsu Matsumoto,^{1,3} Nobuko Watanabe,¹ Mamoru Ohashi¹
and Ken Fujimori²

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

² Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

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

Abstract: The chemiluminescent efficiency of hydroxyphenyl-substituted dioxetanes is well known to decrease significantly in an aqueous medium, though more than bioluminescence in an aprotic medium. We investigated here the effect of hydrogen bonding on singlet-chemiexcitation and fluorescence efficiency of the emitter produced for charge-transfer-induced chemiluminescence by the use of dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl moiety substituted with a proton-donating group at the 4-position as a model substrate. Based on this investigation, four bicyclic dioxetanes bearing a 4-(benzoazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl moiety were designed and synthesized. The thus-realized dioxetanes exhibited chemiluminescence with markedly high efficiency in aqueous medium as well as in aprotic medium.

Keywords: dioxetane, chemiluminescence, hydrogen bonding

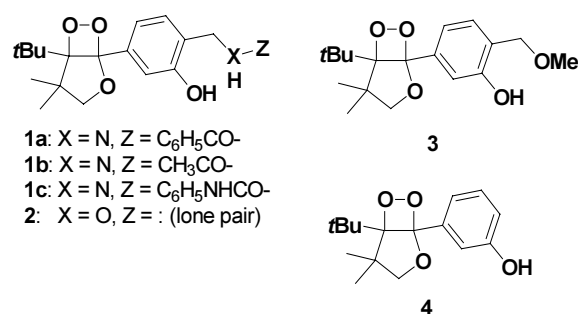
Introduction

Dioxetanes bearing a phenoxide anion decompose rapidly with accompanying efficient emission of light in an aprotic solvent by the intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence (CTICL) mechanism.¹⁾ Nowadays, CTICL-active dioxetanes have been designed that exhibit luminescent efficiencies in aprotic solvent as high as most bioluminescences. However, the chemiluminescence efficiency decreases markedly for their CT-induced decomposition in an aqueous medium. We report here a study to identify how water molecule(s) decreases chemiluminescent efficiency for the CTICL of dioxetanes, and a successful attempt to realize a new type of substrates emitting light with high efficiency even in an aqueous medium.

Result and Discussion

Base-induced decomposition of dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl moiety substituted with a proton-donating group at the 4-position: effect of intramolecular hydrogen bonding on decomposition rate and chemiluminescence efficiency²⁾

The pronounced decrease of Φ^{CL} in the aqueous system has been suggested to be mainly due to the hydrogen bonding of H₂O molecules with intermediary oxyanions of dioxetanes, and with the excited emitter produced, which causes significant decrease of singlet-chemiexcitation efficiency (Φ_S) and fluorescence efficiency (Φ^f) of the emitter. However, experimental evidence is still lacking to clarify the effect of hydrogen bonding on the chemiluminescent efficiency of dioxetanes active toward intramolecular CT-induced decomposition. Thus, we attempted to examine the CTICL-decomposi-



Scheme 1.

tion of dioxetanes bearing a phenolic moiety capable of forming an intramolecular hydrogen bonding as a clue to elucidate this effect of water. The thus-designed dioxetanes bore a 3-hydroxyphenyl substituted with an amidomethyl ($-\text{CH}_2\text{NHCOR}$), **1a-1c**, or a hydroxymethyl **2** as a proton-donating group at the 4-position, and dioxetane **3** bearing a 3-hydroxy-4-methoxy- methylphenyl group as a reference (Scheme 1).

All these dioxetanes decomposed rapidly with accompanying emission of blue light in TBAF / CH_3CN . Comparing their chemiluminescent properties with those of a parent dioxetane **4**, it is realized that for dioxetanes **1a-1c** and **2** the rates of CTICL-decomposition decrease by $1/1.6 \sim 1/6.8$ of the rate for **4**, and even chemiluminescence efficiencies decrease by $1/1.1 \sim 1/5.5$, though the maximum wavelengths of emission are not exactly different from **4**. The decrease of the CTICL-decomposition rate for **1a-1c** and **2** can be attributed to an amidomethyl or a hydroxymethyl group on a phenoxy moiety as a proton-donor for intramolecular hydrogen bonding.

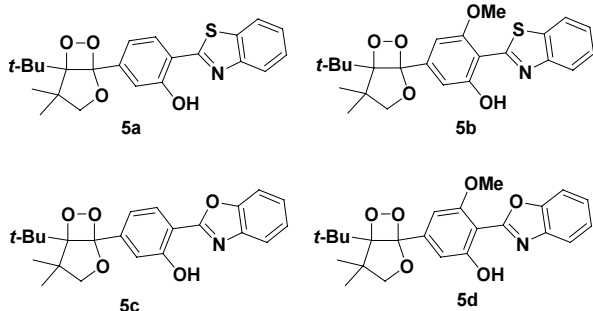
These results reveal that for a dioxetane bearing a phenoxide anion hydrogen bonding to the oxyanion decreases the rate of CTICL- decomposition of dioxetane as well as decreasing chemiluminescence efficiency. However, as reported previously, in addition to the hydrogen bonding of H_2O molecules with the phenoxide anion, other factors such as hydrogen bonding to the carbonyl oxygen of the emitter produced from a dioxetane may participate with the significant decrease of chemiluminescence efficiency in the aqueous system. Bicyclic dioxetanes bearing a 4-(benzoazol-2-yl)-3- hydroxy phenyl moiety: chemiluminescence profile for base-

induced decomposition in aprotic medium and in aqueous medium³⁾

Four bicyclic dioxetanes, **5a-5d**, bearing a 4-(benzothiazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl or 4-(benzoxazol-2-yl)-3-hydroxyphenyl group were synthesized. When dioxetane **5a** was treated with TBAF in acetonitrile, **5a** decomposed to emit blue light with chemiluminescent efficiency $\phi^{\text{CL}} = 0.39$, which was twice higher than that from the parent dioxetane **2**. The dioxetane **5a** exhibited markedly effective chemiluminescence even in an $\text{NaOH} / \text{H}_2\text{O}$ system; $\phi^{\text{CL}} = 0.12$ was ca 11000 times higher than that from **2**.⁴⁾ It was clarified for the CTICL of **5a** that both singlet chemiexcitation efficiency and fluorescence efficiency of the emitter were very high even in the $\text{NaOH} / \text{H}_2\text{O}$ system. Dioxetane **5b** displayed chemiluminescence more effective than **5c** in both triggering systems ($\phi^{\text{CL}} = 0.46$ in TBAF / acetonitrile, and $\phi^{\text{CL}} = 0.18$ in $\text{NaOH} / \text{H}_2\text{O}$, though the CTICL-decomposition rate was slower than that for **5a**. The other dioxetanes, **5b** and **5d** afforded light less effectively than **5a** and **5c**, without any acceleration of CTICL-decomposition rate.

References

- 1) Matsumoto M and Watanabe N (2005) Structural aspects of 1,2-dioxetanes active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Bull. Chem. Soc. Jpn, Accounts* **78**: 1899-1920.
- 2) Watanabe N, Matsumoto Y, and Matsumoto M (2005) Base-induced decomposition of dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl moiety substituted with a proton-donating group at the 4-position: effect of intramolecular hydrogen bonding on decomposition rate and chemiluminescence efficiency *Tetrahedron Lett.* **46**: 4871-4874.
- 3) Matsumoto M, Akimoto T, Matsumoto Y, Watanabe N (2005) Bicyclic dioxetanes bearing a 4-(benzoxazol-2-yl)-3-hydroxy-phenyl moiety: chemiluminescence profile for base-induced decomposition in aprotic medium and in aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **46**: 6075- 6078.
- 4) Matsumoto M (2004) Advanced Chemistry of Dioxetane-Based Chemiluminescent Substrates Originating from Bioluminescence. *J. Photochem. Photobiol. C, Photochem. Reviews* **5**: 27-53.



Scheme 2

■報告書■ 2005年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

光に安定な貴金属カルボン酸塩錯体の構造多様性と生理活性

野宮健司^{1,4} 力石紀子¹ 野口龍介² 木村卓央³

A Variety of Ag-O Bonding Modes and Antimicrobial Activities of Light-Stable Coinage Metal Complexes with Carboxylate Ligands

Kenji Nomiya^{1,4}, Noriko Chikaraisi Kasuga¹, Ryusuke Noguchi²
and Takao Kimura³

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

² Technical Department, Nippon Rare Metal, Inc., Nakayama 1200, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8591

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

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

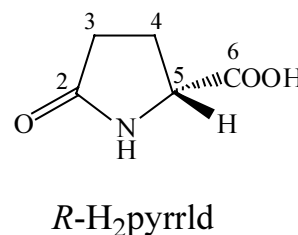
Abstract: Using light-stable dimeric silver(I) carboxylate precursors $\{[Ag(Hpyrrld)]_2\}_n$ formed with chiral and racemic forms of 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid ($H_2pyrrld$) ligand, six novel light-stable, triphenylphosphinesilver(I) complexes consisting of both a hard Lewis base (O atom) and a soft Lewis base (P atom) were prepared, i.e. $[Ag_2(R-Hpyrrld)_2(H_2O)(PPh_3)_2] \cdot H_2O$ **1**, $[Ag_2(R-Hpyrrld)(PPh_3)_2]_2$ **2**, $[Ag_2(S-Hpyrrld)_2(H_2O)(PPh_3)_2] \cdot H_2O$ **3**, $[Ag_2(S-Hpyrrld)(PPh_3)_2]_2$ **4**, $\{[Ag(R,S-Hpyrrld)(PPh_3)]_2\}_n$ **5** and $[Ag(R,S-Hpyrrld)(PPh_3)_2]$ **6**. Their solid-state and solution structures were unequivocally characterized with elemental analysis, TG/DTA, FTIR, X-ray structure analysis, molecular weight measurements in EtOH with the vaporimetric method, solution (1H , ^{13}C , ^{31}P) NMR and solid-state ^{31}P CPMAS NMR spectroscopy. Two sets of enantiomeric complexes were isolated as (**1** and **3**) and (**2** and **4**). X-ray crystallography revealed that these complexes possessed different Ag-O bonding modes, depending on the number of PPh_3 ligands and the chirality of the $Hpyrrld$ ligand. Complexes **1-6** behaved as a monomeric species in EtOH and CD_2Cl_2 . Antimicrobial activities by silver(I) complexes in the water-suspension system against selected bacteria, yeast and molds were significantly correlated with the number of coordinating PPh_3 ligands per silver(I) atom in the complexes.

Keywords: silver(I) complexes, 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid, triphenylphosphine, Ag-O bonding modes, crystal and molecular structures, antimicrobial activities

序論

カルボキシ基酸素による Ag-O 結合錯体はソフト性ルイス酸(Ag 原子)とハード性ルイス塩基(O 原子)からなる置換活性錯体であり、反応性や抗菌活性が期待されている。しかし、多くのカルボン酸銀(I)錯体は難溶性で光に不安定であり、構造解析が難しいとされてきた。我々はこれまでに複素環カルボン酸の1つである2-ピロリドン-5-カルボン酸($H_2pyrrld$)を配位子に選び、光に安定で水溶性の銀(I)錯体 $[Ag(Hpyrrld)]_2$ を合成し、それらの結晶構造を明ら

かにした^{2,3}。本研究では、その銀(I)錯体 $[Ag(Hpyrrld)]_2$ を前駆体に用いて、 PPh_3 配位子とのモル比を変えた反応からハード性ルイス塩基(O 原子)とソフト性ルイス塩基(P 原子)の両方を含む新しい O-Ag-P 結合を有する錯体をいくつか合成し



た⁴⁾。固体状態で銀(I)原子とカルボキシ基との間に多様な Ag-O 結合モードが存在することを見出し、それらをタイプ分類した。その PPh₃ 誘導体の溶液中における挙動を分子量測定および PPh₃ 誘導体同士の配位子交換反応から調べ、固体構造との比較を行った。さらに複素環カルボン酸銀(I)錯体および PPh₃ 誘導体の抗菌活性を調べ、構造活性相関などを検討した。

結果と討論

二核カルボン酸銀(I)錯体の合成と構造^{2,3)}

2-ピロリドン-5-カルボン酸 (*R*-体、*S*-体、*R,S*-体) を配位子とする水溶性カルボン酸銀(I)錯体の合成を行った^{2,3)}。水溶液中、Ag₂O : H₂pyrrld = 1 : 2 のモル比から得られる無色透明溶液を内部溶媒、アセトンを外容溶媒とする vapor diffusion により水に可溶、有機溶媒に難溶な無色透明針状結晶として [Ag(*R*-Hpyrrld)]₂ を 57.4 %, [Ag(*S*-Hpyrrld)]₂ を 76.0 %, [Ag(*R,S*-Hpyrrld)]₂ を 86.2 % 収率で単離した。キャラクタリゼーションは、FT-IR、TG/DTA、CHN 元素分析、solution (¹H, ¹³C) NMR、solid-state NMR (¹³C, ¹⁵N)、positive-ion ESI-MS、単結晶 X 線構造解析で行った。単結晶 X 線構造解析の結果、*R*-体および *S*-体錯体 [Ag(*R*- or *S*-Hpyrrld)]₂ は Ag-Ag 相互作用と Ag-O 結合を有する二核錯体からなるポリマーであり、窒素原子は配位に関与していなかった。このポリマーは [Ag(Hpyrrld)]₂ 中の 1 つの Ag 原子と隣接する錯体のカルボニル基酸素原子との間の結合に基づいた自己集合によるらせんポリマーであった (*R*-体が右巻きらせん構造、*S*-体が左巻きらせん構造)。*R,S*-体錯体 [Ag(*R,S*-Hpyrrld)]₂ は二核錯体中の 2 つの銀原子が隣接するそれぞれ別のカルボニル基酸素と結合した網目状のポリマー構造であった。一方、水溶液中のキャラクタリゼーションから、溶液中では *R*-体、*S*-体、*R,S*-体の各錯体は、いずれも二核錯体として存在していた。

二核カルボン酸銀(I)錯体の PPh₃ 誘導体の Ag-O 結合モードの多様性⁴⁾

光に安定な水溶性複素環カルボン酸銀(I)錯体 [Ag(Hpyrrld)]₂ (*R,S*-体、*R*-体、*S*-体) を前駆体として、エタノール/ジクロロメタン混合溶媒中において [Ag(Hpyrrld)]₂ : PPh₃ = 1 : 2 および 1 : 4 のモル比で反応させ、Ag 原子に対して PPh₃ が 1 つ配位した錯体 (*R*-体、*S*-体、*R,S*-体の PPh₃ 誘導体) および Ag 原子に対して PPh₃ が 2 つ配位した錯体 (*R*-体、*S*-体、*R,S*-体の PPh₃ 誘導体) を良好な収率で得た。それらは水に不溶であり、多くの有機溶媒に可溶な単結

晶として単離した。単結晶 X 線構造解析の結果、Ag 原子に対して PPh₃ が 1 つ配位した化合物 [Ag₂(*R*-Hpyrrld)₂(H₂O)(PPh₃)₂]·H₂O **1** は、固体状態で Ag⁺ : *R*-Hpyrrld : H₂O : PPh₃ = 2 : 2 : 1 : 2 の組成で、1 つの水分子の酸素及びカルボキシ基の 1 つの酸素が 2 つの Ag 原子に非対称に架橋した二核錯体であり、Ag 原子は 1 つの PPh₃、2 つの架橋カルボキシ基酸素、1 つの水分子酸素による 4 配位構造をとっており、Ag···Ag 相互作用を持っていた。また、架橋している水分子の酸素と隣接する錯体のカルボニル基酸素との間に水素結合が存在していた。*S*-体錯体の化合物 [Ag₂(*S*-Hpyrrld)₂(H₂O)(PPh₃)₂]·H₂O **3** は *R*-体錯体の化合物 **1** のミラーイメージとなっていた。化合物 [Ag(*R,S*-Hpyrrld)(PPh₃)₂] **5** は固体状態で Ag⁺ : *R,S*-Hpyrrld : PPh₃ = 1 : 1 : 1 の組成で Ag 原子は 1 つの PPh₃、1 つのカルボキシ基酸素及び 1 つのカルボニル基酸素と結合した二核錯体であり、隣接する錯体の Ag···O 間のファンデルワールスコンタクトに基づく超分子構造をとっていた。また、この化合物 **5** は二核錯体中に *R*-体と *S*-体配位子を含むメソ体であった。

Ag 原子に対して PPh₃ が 2 つ配位した化合物 [Ag(*R*-Hpyrrld)(PPh₃)₂]₂ **2** は固体状態で Ag⁺ : *R*-Hpyrrld : PPh₃ = 1 : 1 : 2 の組成で、Ag 原子に対して 2 つの PPh₃、1 つのカルボキシ基酸素及び 1 つのカルボニル基酸素による 4 配位銀(I)の二核錯体であった。*S*-体錯体の化合物 [Ag(*S*-Hpyrrld)(PPh₃)₂]₂ **4** は *R*-体錯体の化合物 **2** のミラーイメージとなっていた。化合物 [Ag(*R,S*-Hpyrrld)(PPh₃)₂] **6** は Ag⁺ : *R,S*-Hpyrrld : PPh₃ = 1 : 1 : 2 の組成で Ag 原子は 2 つの PPh₃、2 つのカルボキシ基酸素の

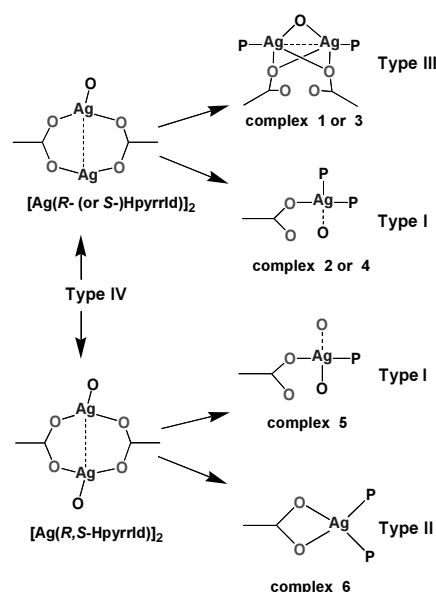


図 1. Ag-O 結合モードのタイプ分類。

キレート配位による単核の4配位四面体錯体であった。この錯体は unit cell 内に *R*-体と *S*-体錯体を含むラセミ化合物であった。

Ag 原子とカルボキシ基との間で形成される Ag-O 結合モードにおいて、Ag 原子と一つのカルボキシ基酸素の単座配位によって形成される Type I (化合物 **2**, **4**, **5**)、カルボキシ基酸素の2つが Ag 原子にキレート配位した Type II (化合物 **6**)、カルボキシ基酸素の1つが2つの Ag 原子の間を非対称に架橋配位した Type III (化合物 **1**, **3**) が新たに見出され、PPh₃ を含まない前駆体 [Ag(Hpyrrld)]₂ の Ag₂O₄ コアの Type IV を含め4つのタイプが存在することを見出した (図 1)。これらの Ag-O 結合モードの違いは、Hpyrrld 配位子のキラリティ及び配位している PPh₃ 配位子の数に強く依存している。

PPh₃ 誘導体の溶液中の挙動と固体構造との比較⁴⁾

O-Ag-P 結合を持つ PPh₃ 誘導体の化合物 **1-6** の固体状態と溶液中の構造を比較するために分子量測定 (Vapor pressure osmometer method) を行った。化合物 **1** の固体状態における式量 FW = 1032.56 に対して、エタノール中での分子量測定結果は MW = 546 であった。それは二核錯体の式量のほぼ 1/2 であり、溶液中では完全な解離平衡に基づく monomeric species として存在していると考えられる。一方、化合物 **2** の式量 FW = 1521.12 に対して、エタノール中での分子量測定結果は MW = 647 であり、二核錯体の式量の 1/2 に近い値を示したことから、溶液中では完全な解離平衡に基づく monomer として存在していると考えられる。これらの錯体が溶液中で monomeric species として存在していることは、solution (¹H, ¹³C, ³¹P) NMR から示唆されている。

6つの PPh₃ 誘導体の溶液中の配位子交換性を調べた。化合物 **1** と化合物 **3** から化合物 **5** の形成 (メソ体を形成する反応)、化合物 **2** と化合物 **4** から化合物 **6** の形成 (ラセミ化合物を形成する反応)、化合物 **5** から化合物 **6** の形成 (再編成を伴う反応) が確認された。化合物 **6** はそれ以上変化しないことが分かった。以上のことより、化合物 **1-6** の PPh₃ 誘導体は、キラル錯体よりもラセミ錯体が、また Ag に対して配位 PPh₃ が1個の錯体よりも2個の錯体の方が、溶液中の錯体の安定性が高い。

二核カルボン酸銀(I)錯体および PPh₃ 誘導体の抗菌活性⁴⁾

銀(I)錯体の抗菌性は錯体の分子構造や配位子交換性が密接に関係していると考えられる。合成化学の

経験則から銀(I)原子と配位供与原子の結合力の関係は Ag-P > Ag-S >> Ag-Cl > Ag-N >> Ag-O という順序であり、配位子交換性は右の方ほどより起こりやすい。Ag-S 結合錯体は Ag-N 結合錯体よりも配位子交換性が制限されている。Ag-O 結合錯体は他の配位子との配位子交換性が最も高い。これは Ag-O 結合錯体が極めて良好な広い抗菌スペクトルを示し、逆に Ag-P 結合錯体がほとんど示さないというこれまでの結果と対応している。

本研究で得た二核カルボン酸銀(I)錯体 [Ag(Hpyrrld)]₂ (*R,S*-体, *R*-体, *S*-体) は O₂Ag や O₃Ag のコアを持ち、いずれもバクテリア、酵母、カビ類に極めて良好な広いスペクトルの抗菌性を示した。配位子の H₂pyrrld は単独では抗菌活性を示さないことから、この抗菌活性は錯形成によって初めて発現したものである。また、これら銀(I)錯体の抗菌活性に配位子のキラリティは影響を与えておらず、活性は主として Ag 原子の周囲の配位環境で決まるものと思われる。O-Ag-P 結合の PPh₃ 誘導体の化合物 **1** および **5** は O₃AgP コアを持ち、前駆体の Ag-O 結合錯体よりは弱いもののバクテリア、酵母、カビ類に広いスペクトルの抗菌活性を示した。しかし、O₂AgP₂ コアを持つ PPh₃ 誘導体の化合物 **2** および **6** は、全く抗菌活性を示さなかった。Ag 原子に対して親和性の高い P 原子を配位させた錯体では、これまで活性はないとされてきたが、本研究で合成した化合物 **1** および **5** のように PPh₃ が配位しているにもかかわらず、広いスペクトルの抗菌活性を示すものは極めてめずらしい。従ってこれらの錯体の抗菌性は Ag-O 結合モードや PPh₃ の数及び配位子交換性に強く依存していると考えられる。

文献

- 1) Gimeno MC and Laguna A (2004) Silver and gold. *Comprehensive Coordination Chemistry II*. **6**: 911-1145.
- 2) Nomiya K, Takahashi S, Noguchi R, Nemoto S, Takayama T and Oda M (2000) Synthesis and characterization of water-soluble silver(I) complexes with L-histidine (H₂his) and (S)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (H₂pyrrld) showing a wide spectrum of effective antibacterial and antifungal activities. Crystal structures of chiral helical polymers [Ag(Hhis)]_n and {[Ag(Hpyrrld)]₂}_n in the solid-state. *Inorg. Chem.* **39**: 3301-3311.
- 3) Nomiya K, Takahashi S and Noguchi R (2000) Water-soluble silver(I) complexes of (R)-(+)- and (S)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid and their antimicrobial activities. Chiral helical polymer and polymer sheet structures in the solid state formed by self-assembly of dimeric [Ag(Hpyrrld)]₂ cores. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4369-4373.
- 4) Noguchi R, Sugie A, Okamoto Y, Hara A and

Nomiya K (2005) Syntheses, structures and antimicrobial activities of light-stable, di- and mononuclear silver(I) carboxylate complexes composed of triphenylphosphine, and chiral and racemic forms of 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (H₂pyrrld). A variety of Ag-O

bonding modes in the silver(I) complexes constructed with hard oxygen and soft phosphorus atoms. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**: 1953-1962.

キレート配位による単核の4配位四面体錯体であった。この錯体は unit cell 内に *R*-体と *S*-体錯体を含むラセミ化合物であった。

Ag 原子とカルボキシ基との間で形成される Ag-O 結合モードにおいて、Ag 原子と一つのカルボキシ基酸素の単座配位によって形成される Type I (化合物 **2**, **4**, **5**)、カルボキシ基酸素の2つが Ag 原子にキレート配位した Type II (化合物 **6**)、カルボキシ基酸素の1つが2つの Ag 原子の間を非対称に架橋配位した Type III (化合物 **1**, **3**) が新たに見出され、PPh₃ を含まない前駆体 [Ag(Hpyrrld)]₂ の Ag₂O₄ コアの Type IV を含め4つのタイプが存在することを見出した (図 1)。これらの Ag-O 結合モードの違いは、Hpyrrld 配位子のキラリティ及び配位している PPh₃ 配位子の数に強く依存している。

PPh₃ 誘導体の溶液中の挙動と固体構造との比較⁴⁾

O-Ag-P 結合を持つ PPh₃ 誘導体の化合物 **1-6** の固体状態と溶液中の構造を比較するために分子量測定 (Vapor pressure osmometer method) を行った。化合物 **1** の固体状態における式量 FW = 1032.56 に対して、エタノール中での分子量測定結果は MW = 546 であった。それは二核錯体の式量のほぼ 1/2 であり、溶液中では完全な解離平衡に基づく monomeric species として存在していると考えられる。一方、化合物 **2** の式量 FW = 1521.12 に対して、エタノール中での分子量測定結果は MW = 647 であり、二核錯体の式量の 1/2 に近い値を示したことから、溶液中では完全な解離平衡に基づく monomer として存在していると考えられる。これらの錯体が溶液中で monomeric species として存在していることは、solution (¹H, ¹³C, ³¹P) NMR から示唆されている。

6つの PPh₃ 誘導体の溶液中の配位子交換性を調べた。化合物 **1** と化合物 **3** から化合物 **5** の形成 (メソ体を形成する反応)、化合物 **2** と化合物 **4** から化合物 **6** の形成 (ラセミ化合物を形成する反応)、化合物 **5** から化合物 **6** の形成 (再編成を伴う反応) が確認された。化合物 **6** はそれ以上変化しないことが分かった。以上のことより、化合物 **1-6** の PPh₃ 誘導体は、キラル錯体よりもラセミ錯体が、また Ag に対して配位 PPh₃ が1個の錯体よりも2個の錯体の方が、溶液中の錯体の安定性が高い。

二核カルボン酸銀(I)錯体および PPh₃ 誘導体の抗菌活性⁴⁾

銀(I)錯体の抗菌性は錯体の分子構造や配位子交換性が密接に関係していると考えられる。合成化学の

経験則から銀(I)原子と配位供与原子の結合力の関係は Ag-P > Ag-S >> Ag-Cl > Ag-N >> Ag-O という順序であり、配位子交換性は右の方ほどより起こりやすい。Ag-S 結合錯体は Ag-N 結合錯体よりも配位子交換性が制限されている。Ag-O 結合錯体は他の配位子との配位子交換性が最も高い。これは Ag-O 結合錯体が極めて良好な広い抗菌スペクトルを示し、逆に Ag-P 結合錯体がほとんど示さないというこれまでの結果と対応している。

本研究で得た二核カルボン酸銀(I)錯体 [Ag(Hpyrrld)]₂ (*R,S*-体, *R*-体, *S*-体) は O₂Ag や O₃Ag のコアを持ち、いずれもバクテリア、酵母、カビ類に極めて良好な広いスペクトルの抗菌性を示した。配位子の H₂pyrrld は単独では抗菌活性を示さないことから、この抗菌活性は錯形成によって初めて発現したものである。また、これら銀(I)錯体の抗菌活性に配位子のキラリティは影響を与えておらず、活性は主として Ag 原子の周囲の配位環境で決まるものと思われる。O-Ag-P 結合の PPh₃ 誘導体の化合物 **1** および **5** は O₃AgP コアを持ち、前駆体の Ag-O 結合錯体よりは弱いもののバクテリア、酵母、カビ類に広いスペクトルの抗菌活性を示した。しかし、O₂AgP₂ コアを持つ PPh₃ 誘導体の化合物 **2** および **6** は、全く抗菌活性を示さなかった。Ag 原子に対して親和性の高い P 原子を配位させた錯体では、これまで活性はないとされてきたが、本研究で合成した化合物 **1** および **5** のように PPh₃ が配位しているにもかかわらず、広いスペクトルの抗菌活性を示すものは極めてめずらしい。従ってこれらの錯体の抗菌性は Ag-O 結合モードや PPh₃ の数及び配位子交換性に強く依存していると考えられる。

文献

- 1) Gimeno MC and Laguna A (2004) Silver and gold. *Comprehensive Coordination Chemistry II*. **6**: 911-1145.
- 2) Nomiya K, Takahashi S, Noguchi R, Nemoto S, Takayama T and Oda M (2000) Synthesis and characterization of water-soluble silver(I) complexes with L-histidine (H₂his) and (S)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (H₂pyrrld) showing a wide spectrum of effective antibacterial and antifungal activities. Crystal structures of chiral helical polymers [Ag(Hhis)]_n and {[Ag(Hpyrrld)]₂}_n in the solid-state. *Inorg. Chem.* **39**: 3301-3311.
- 3) Nomiya K, Takahashi S and Noguchi R (2000) Water-soluble silver(I) complexes of (R)-(+)- and (S)-(-)-2-pyrrolidone-5-carboxylic acid and their antimicrobial activities. Chiral helical polymer and polymer sheet structures in the solid state formed by self-assembly of dimeric [Ag(Hpyrrld)]₂ cores. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4369-4373.
- 4) Noguchi R, Sugie A, Okamoto Y, Hara A and

Nomiya K (2005) Syntheses, structures and antimicrobial activities of light-stable, di- and mononuclear silver(I) carboxylate complexes composed of triphenylphosphine, and chiral and racemic forms of 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (H₂pyrrld). A variety of Ag-O

bonding modes in the silver(I) complexes constructed with hard oxygen and soft phosphorus atoms. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**: 1953-1962.

■報告書■ 2005年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

ナノ細孔をもつカルボン酸金属錯体をベースとした新しい固体触媒の構築と地球環境改善への展開

森 和亮^{1,2} 加藤知香¹

Novel Microporous Iron(III) Carboxylate Polymer Complexes Containing Metalloporphyrin: Synthesis and Heterogeneous Photo-oxidation Catalysis

Wasuke Mori^{1,2} and Chika Nozaki Kato¹

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

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

Abstract: The photo-oxidation catalysis of hydrocarbons with 1 atm dioxygen in a heterogeneous system is quite an interesting objective for both academic and industrial fields. The remarkable progress of the past decade in photocatalysis has been limited to ultraviolet light instead of the more useful visible-light region. The development of visible-light photocatalysts, therefore, has become one of the most important topics in photocatalysis research today. Here, we focused on the synthesis of novel microporous iron(III) carboxylate complexes having metalloporphyrins, Fe[MTCPP] (M = Cu, Fe, Pd, Mn, Co; H₂TCP = 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis benzoic acid). The complexes were characterized by elemental analysis, TG/DTA, magnetic susceptibility, FT-IR, diffuse reflectance (DR) UV-vis, EPR, EXAFS, BET surface area, pore size distribution, and nitrogen occlusion measurements. In the DRUV-vis spectra, the iron complexes showed some adsorption bands in the visible-light region. Therefore, we demonstrated the catalytic activities of Fe[MTCPP] complexes for the photo-oxidation of hydrocarbons with 1 atm dioxygen under visible-light irradiation. Fe[PdTCP] showed 37 turnover numbers after 3 h for the photo-oxidation of cyclohexene, which was higher than those of the other iron(III) carboxylate complexes.

Keywords: microporous iron(III) carboxylate, metalloporphyrin, photo-oxidation, visible-light irradiation

序論

可視光を利用した炭化水素の酸素酸化は、環境的・有機合成的に極めて重要である。これまで様々な光触媒が報告されているが、紫外光照射下でのみ活性を示すものがほとんどである。また最近では、色素増感剤等を利用した可視光応答型光触媒の開発がさかんに進められているが、分子レベルでの活性点構造の制御、不均一系光触媒反応での構造と反応性との相関については未だ不明瞭な点が多い。一方、我々はこれまで、フマル酸などのジカルボン酸を配位子としたロジウム(II)錯体が酢酸銅(II)一水和物型二核構造をとり、これが積層することにより均一な一次元細孔を形成することを見出してきた¹⁾。また、最近ではポルフィリンを含むテトラカルボン酸ロジウム(II)錯体がオレフィンの水素化に対し高い触媒活

性を示すことを見いだした²⁾。本研究では、Fe、Cu、Co、Pd、Mn等の種々の金属を配位した金属ポルフィリンを含むテトラカルボン酸鉄(III)錯体 Fe^{III}[MTCPP] (M = Fe^{III}, Cu^{II}, Co^{II}, Pd^{II}, Mn^{II}) (図1)に注目し、それらの錯体の物性、光触媒活性について検討したので報告する。

材料と方法

塩化鉄(III)四水和物と H₂TCP (4,4',4'',4'''-(21H, 23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl) tetrakis benzoic acid)、Cu^{II}TCP³⁾、Pd^{II}TCP³⁾、Co^{II}TCP³⁾、Mn^{II}TCP³⁾のメタノール溶液を酸素気流下、室温で2日間攪拌することで目的物を得た。同定は元素分析、EXAFS、ESR、TG/DTA、DRUV、磁化率測定、表

表 1. ナノ細孔をもつメタロポルフィリン鉄(II)錯体を触媒としたシクロヘキサンの光酸素酸化

| catalyst | reaction time(h) | TON(b) | TOF/(s ⁻¹)(c) | selectivity(%) | | |
|--|------------------|--------------|---------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | | | Cyclohexene oxide | 2-Cyclohexen-1-one | 2-Cyclohexen-1-ol |
| Fe ^{II} [Fe ^{II} TCPP] | 1 | 2.66 | 7.4×10 ⁻⁴ | 2.4 | 79.3 | 18.3 |
| | 3 | 2.25 | 2.1×10 ⁻⁴ | 3.3 | 78.6 | 18.1 |
| Fe ^{II} [Co ^{II} TCPP] | 1 | 2.22 | 6.0×10 ⁻⁴ | 7.5 | 62.5 | 30.0 |
| | 3 | 6.18 | 5.7×10 ⁻⁴ | 4.1 | 70.2 | 25.8 |
| Fe ^{II} [Cu ^{II} TCPP] | 1 | 6.39 | 1.8×10 ⁻³ | 5.1 | 71.5 | 23.5 |
| | 3 | 14.17 | 1.3×10 ⁻³ | 3.8 | 72.3 | 23.9 |
| Fe ^{II} [Mn ^{II} TCPP] | 1 | 1.20 | 3.3×10 ⁻⁴ | 13.5 | 61.2 | 25.3 |
| | 3 | 3.25 | 3.0×10 ⁻⁴ | 5.6 | 76.5 | 17.9 |
| Fe ^{II} [Pd ^{II} TCPP] | 1 | 9.82 | 2.7×10 ⁻³ | 5.5 | 67.5 | 27.1 |
| | 3 | 36.83 | 3.4×10 ⁻³ | 4.7 | 69.4 | 26.0 |

a) Reaction conditions: catalyst 20 mg, cyclohexene 5 mL, ethanol 5 mL, P(O₂) = 1 atm, light irradiation (λ = 400 nm), reaction temperature 25°C.

b) Turnover number (TON) = [mol of products]/[mol of catalyst]

c) Turnover frequency (TOF) = TON/s after 1 h

面積・細孔分布測定を用いて行った。窒素ガスによる吸蔵量測定は Faraday 型磁気天秤を用い、圧力(20 torr)、温度範囲(77-250 K)で行った。光酸化触媒反応はバッチ式で、Xe ランプ(500 W)を照射して行った。分析は、ガスクロマトグラフィー(TCD, DB-FFAP キャピラリカラム(0.53 mm × 15 m); FID, DB-WAX キャピラリカラム(0.53 mm × 15 m))と高速液体クロマトグラフィー(Shim-pack VP-ODS 150 mm L × 4.6 mm ID)で行った。

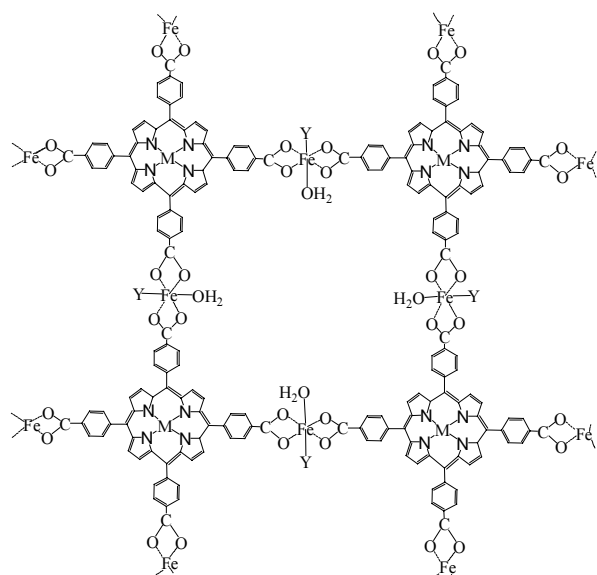
M = Fe^{III}, X, Cu^{II}, Co^{II}, Mn^{II}, Pd^{II}X, Y = Cl⁻ or OH⁻

図 1. Fe[MTCPP]の推定構造.

結果と討論

Ar の等温吸着測定から得られた BET 表面積は、Fe[FeTCPP]、Fe[CuTCPP]、Fe[PdTCPP]でそれぞれ

れ 1195、541、650 m²/g であった。細孔径分布測定では、いずれの錯体も 6 Å 付近に均一なナノ細孔を観測した。また、400 nm 以上の光照射下での分子状酸素によるシクロヘキサンの酸化活性を表 1 に示す。生成物は、いずれの錯体を用いた場合も 2-シクロヘキセン-1-オールと 2-シクロヘキセン-1-オンがほとんどで、シクロヘキセンオキシドは 3-14% であった。このことから、本反応は主にラジカル機構で進行していると結論した。3 時間後のターンオーバー数(TON)は、Fe[Pd^{II}TCPP]の 37 が最も高く、ポルフィリン中心金属による活性序列は Pd^{II}>Cu^{II}>Co^{II}>Mn^{II}>Fe^{III} となった。これは、触媒の表面積に依存しておらず、ポルフィリン環中心の金属に依存していた。

文献

- 1) Mori W, Takamizawa S, Kato CN, Ohmura T and Sato T (2004) Molecular-level design of efficient microporous materials containing metal carboxylates: inclusion complex formation with organic polymer, gas-occlusion properties, and catalytic activities for hydrogenation of olefins. *Micropor. Mesopor. Mater.* **73**: 31-46.
- 2) Sato T, Mori W, Kato CN, Ohmura T, Sato T, Yokoyama K, Takamizawa S and Naito S (2003) Microporous rhodium(II) 4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakisbenzoate. synthesis, nitrogen adsorption properties, and catalytic performance for hydrogenation of olefin. *Chem. Lett.*, **32**: 854-855.
- 3) Sato T, Mori W, Kato CN, Yanaoka E, Kuribayashi T, Ohtera R and Shiraishi Y (2005) Novel microporous rhodium(II) carboxylate polymer complexes containing metalloporphyrin: synthesis and catalytic performance in hydrogenation of olefin. *J. Catal.* **232**: 186-198.

■報告書■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

生体工学のための感光性表面修飾剤の開発

山口和夫^{1,4} 前田瑞夫² 横山昌幸³

Development of Photosensitive Surface Modifying Agents for Bioengineering

Kazuo Yamaguchi^{1,4}, Mizuo Maeda² and Masayuki Yokoyama³

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

² Bioengineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

³ Kanagawa Academy of Science and Technology, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012

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

Abstract: The caged cell-culturing substrate is composed of a glass substrate coated with an alkylsiloxane monolayer having a photocleavable 2-nitrobenzyl group. In the present study, we examined the effect of terminal functional groups on the efficiency of photoactivation for cell adhesion. Among four tested substrates terminating with different functional groups, the photoactivation of cell adhesion was the most effective on that terminating with an amino group. We succeeded in preparing single-cell arrays on this substrate without using fibronectin.

Keywords: photosensitive silane coupling agent, 2-nitrobenzyl ester, self-assembled monolayer, surface modification

序論

我々はこれまでに、光分解性の 2-ニトロベンジルエステルで保護したシランカップリング剤 **1** を合成し、無機材料表面への修飾、光照射を行い、カルボキシ基の導入を接触角、XPS の測定などにより確認している^{1,2)}。さらに **1** で処理して得られるガラス基板上の感光性単分子膜を用いて、標準的な蛍光顕微鏡下で細胞接着性を制御する方法を開発している³⁾。この方法では、基板表面に吸着させた細胞接着を抑制するウシ血清アルブミン (BSA) を、2-ニトロベンジルエステルの光分解によって表面から解離させ、露出したカルボキシ基に細胞接着を促進させるフィブロネクチン (FN) を吸着させることで表面を細胞接着性へと変換する。本研究では Fig. 1 に示すように、FN を用いることなく細胞接着性を制御する方法を開発することを目的とする。感光性シランカップリング剤として、光照射によりカルボキシ基、アミノ基、チオール、ヒドロキシ基を表面に露出する

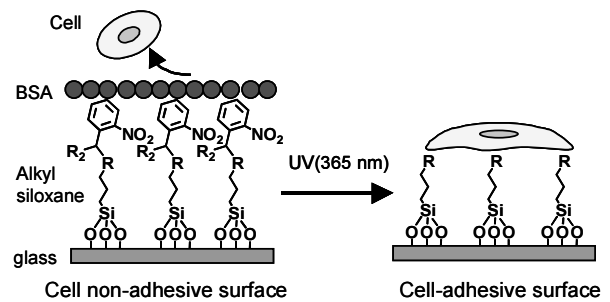
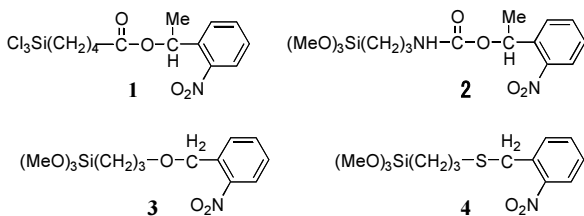


Fig. 1. Schematic illustration of photoactivation of cell adhesion.

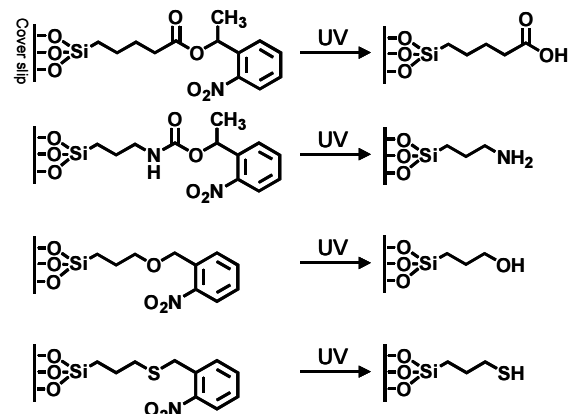
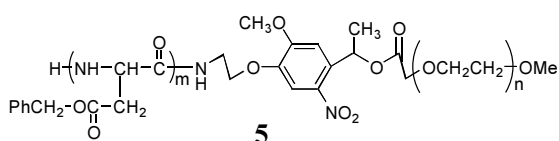


Fig. 2. Photoactivation of alkylsiloxanes having caged functional groups used in this study.

1-4 で修飾した基板を用いて検討した (Fig. 2)。

親水性、疎水性成分からなる両親媒性ブロック共重合体は、細胞接着性を制御する表面修飾剤として用いられており、さらに疎水性あるいは親水性薬物を内包できるポリマーミセルやポリマーソームなどの薬物送達システム (DDS) としての利用も検討されている。本研究では、光分解性基で連結された両親媒性ブロック共重合体の合成を試みた。このような共重合体を得られれば、上記のシランカップリング剤に代わる細胞接着性を光で制御する新たな表面修飾剤として期待されるだけでなく、光で放出を制御する新しい DDS の構築も可能であると予想される。本研究では、親水性成分としてポリエチレンオ



キシド (PEO)、疎水性成分としてポリベンジルアスパルテートを連結させたブロック共重合体 **5** の合成を試みた。両成分を直接連結させたブロック共重合体は、薬物を内包するポリマーミセルを形成し、DDS としての実用化が検討されているものである⁴⁾。

材料と方法

1-4 で修飾した基板を用いた一細胞アレイの作製

1-4 のベンゼン溶液にガラス基板を投入し、1 時間還流させ修飾ガラス基板を得た。修飾基板を 10mg/mL の BSA 水溶液に 1 時間浸漬後、波長 365 nm の光を 10 秒間照射した。無血清培地中でサル腎臓由来 COS7 細胞を播種し、30 分後に培地交換して細胞を観察した。光照射領域は、OHP シートに印刷したフォトマスクを蛍光顕微鏡の視野絞りに挿入することで制御した。

光分解性ブロック共重合体 **5** の合成

Scheme 1 に示す方法で、合成を行なった。

結果と討論

1-4 で修飾した基板を用いた一細胞アレイの作製

COOH 基、NH₂ 基、SH 基、OH 基を露出する 1-4 で修飾したガラス基板に対して円形領域に光照射を行って COS7 細胞の接着性の光変換効率を比較した。その結果、NH₂ 基を露出する基板のみで光照射領域に対応した細胞接着が確認された (Fig. 3)。

この NH₂ 基を露出する基板を用いて一細胞アレイを作製した。細胞を接着させるアレイスポットの大きさと細胞播種濃度について最適条件を探索した。

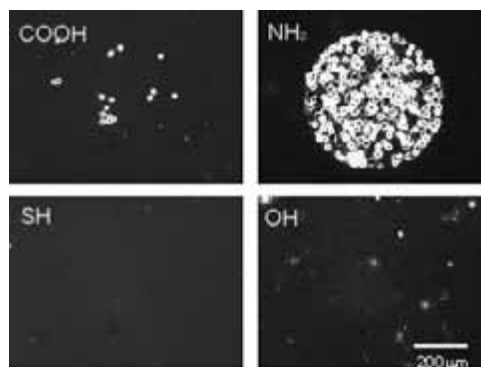


Fig. 3. Formation of cell-adhesive spots in response to light on the alkylsiloxanes having caged functional groups.

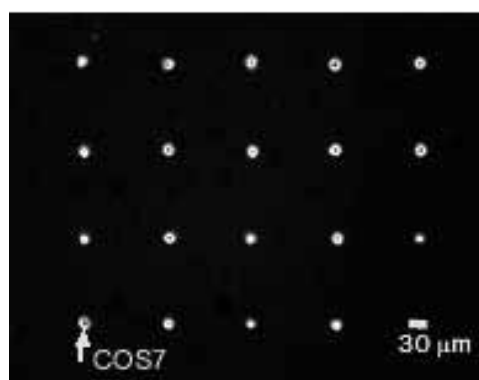


Fig. 4. A single-cell array of COS7 cells on a substrate having caged amino groups.

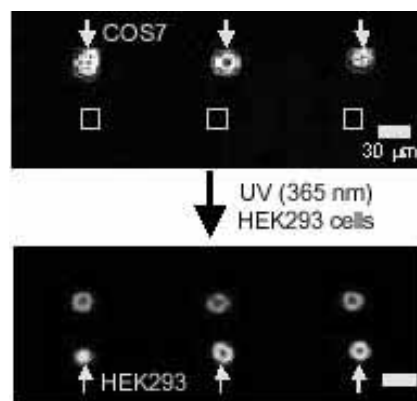


Fig. 5. Positioning of HEK293 cells in the proximity to COS7 cells. Squares represent the irradiated regions.

その結果、1つのスポットサイズが 18 μm × 18 μm、細胞播種濃度が 8 × 10⁵ 個/ml の場合に、光照射したスポットの大部分に一細胞が接着することが明らかになった (Fig. 4)⁵⁾。

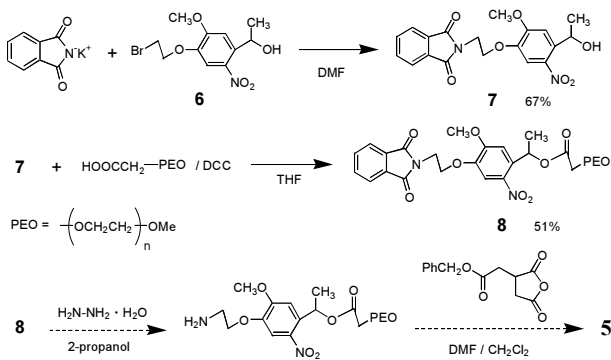
続いて、上記の方法で作製した COS7 細胞アレイの近接した領域に再び光照射を行い、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞を新たに播種した。その結果、一細胞のすぐ横に異種の一細胞を配置することに成功した (Fig. 5)。原理的には、この操作を繰り返すこと

で、同一基板上で多種類の細胞を共培養した細胞アレイを作製することが可能である。

光分解性ブロック共重合体 5 の合成

Scheme 1 に示すように、5 段階の反応によって合成した 6 に対し、フタルイミドカリウムを反応させ 7 を 67% の収率で得た。さらに DCC を縮合剤として末端にカルボキシ基をもつポリエチレンオキシドを反応させ、収率 51% で 8 を得た。さらに 2 段階の反応による 5 の合成を検討している。

Scheme 1



結論

光分解によって NH_2 基を露出する基板は、FN の添加を必要とせずに細胞接着領域を形成することが

できるため、これまでに報告した手法より短時間で簡単に細胞アレイを作製できることが明らかになった。本手法は、ユーザーの目的に応じた細胞アレイを蛍光顕微鏡のみを用いて自在に作製できるので、汎用性の高い細胞アレイ作製法として期待できる。

文献

- 1) Yamaguchi K, Kitabatake T, Izawa M, Fujiwara T, Nishimura H and Futami T (2000) Novel Silane Coupling Agents Containing a Photolabile 2-Nitrobenzyl Ester for Introduction of a Carboxy Group on the Surface of Silica Gel. *Chem. Lett.* **2000**: 228-229.
- 2) Nakayama H and Yamaguchi K (2003) Controlled Surface Properties of Photoreactive Monomolecular Layers Containing Nitrobenzyl Ester. *Polym. Prep. Jpn.* **52**: 820.
- 3) Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K and Maeda M (2004) Photoactivation of a Substrate for Cell Adhesion under Standard Fluorescence Microscopes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 16314-16315.
- 4) Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y and Okano T (2005) Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Controlled Release* **104**: 313-321.
- 5) Kikuchi Y, Nakanishi J, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K, Yoshida Y and Maeda M (2005) Preparation of single-cell arrays on caged cell-culturing substrates. *Polym. Prep. Jpn.* **54**: 4998.

■報告書■ 2005年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

速度定数とヒドロキシルラジカルに対する抗酸化性;UV照射

天野 力^{1,4} 新村和也¹ 中嶋康乃¹ 大竹栄子¹ 佐藤宗行¹ 大石不二夫¹ 西本右子¹
関 邦博² 峯岸安津子¹ 渡部徳子³

Rate Constant and Anti-oxidative Activity toward Hydroxyl Radicals; UV Irradiation

Chikara Amano^{1,4}, Kazuya Shinmura¹, Yasuno Nakajima¹, Eiko Otake¹,
Muneyuki Sato¹, Fujio Oh-ishi¹, Yuko Nishimoto¹, Kunihiro Seki²,
Atsuko Minegishi¹ and Tokuko Watanabe³

¹ Department of Chemistry, Faculty 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 Department of Management, Aoyama Gakuin Women's Junior College, Shibuya-Ku, Tokyo 150-8366, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. Email: amano@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The anti-oxidative activity toward hydroxyl radicals was expressed by the reaction rate constant. Rate constants were presented for basic organic substances and reducing reagents. Hydroxyl radicals were generated by UV-irradiation of hydrogen peroxide. The pH was controlled through the reaction in the range 6.5- 7.0. The dependence on the concentration of anti-oxidative substances was so small that the validity of the theoretical analysis was guaranteed.

Keywords: anti-oxidative activity, reaction rate constant, hydroxyl radical, UV-irradiation, Fenton reaction

著者らはヒドロキシルラジカルに対する物質の抗酸化性を ESR スピントラッピング法を用いて研究してきた。物質の抗酸化性は、ヒドロキシルラジカルに対するスピントラッピング試薬と抗酸化物質との間の競争反応を利用することにより、反応速度定数として定量的に表現される。その表現に基づいて基本的な有機化合物と還元剤の速度定数を求めたところ、その値は多くの物質に関しては文献値とほぼ一致したが、アミンや還元剤に関しては文献値を大幅に上回った。その原因の一つがヒドロキシルラジカル生成に用いたフェントン反応の特殊性にあるかどうかを知るために、本実験では過酸化水素を紫外線により線により分解することでヒドロキシルラジカルを生成する方法を試みた。

ヒドロキシルラジカルはその電子状態の特異性のために ESR 信号を与えない。そこで、通常はスピントラッピング試薬 DMPO との付加体ラジカルを測定する。実験結果から速度定数を求めるには次の

競争反応を利用する：



ここで SODL は抗酸化物質を表し、そのヒドロキシルラジカルとの反応生成物をまとめて SODL/OH と表した。これら 2 つの式から次の式が導かれる。

$$\frac{k_2}{k_1} \cong \frac{b \{a(\infty) - x(\infty)\}}{c x(\infty)} = \frac{b(1-f)}{cf}$$

この式で b は DMPO の初期濃度、 c は抗酸化物質の初期濃度、 f は DMPO-OH 信号の減衰率である。実験から求められる b , c , f の値を用いて、各抗酸化物質の速度定数 k_2 を決定した。その際にメタノールを標準物質として、その k_2 が文献値に一致するように k_1 の値を定めた。この k_1 の値を用いて抗酸化物質の速度定数 k_2 を求めた。表 1 にその速度定数を先に求

Table 1. Rate constant of basic organic substances and reducing reagents

| substance | $k_2(\text{UV})/10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ | $k_2(\text{Fenton})/10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ | $k_2(\text{reference})/10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
|-------------------|---|---|--|
| methanol | 0.97 | 0.97 | 0.78-1; pH 6-10.7 |
| ethanol | 1.8 | 1.9 | 1.7-2.2; pH 6-11 |
| formaldehyde | 4.9 | 0.64 | 1.0; pH 1 |
| acetaldehyde | 19 | 11 | 0.73; pH 1 |
| acetone | 1.3 | 0.17 | 0.083-0.14; pH 6-7 |
| ethylmethylketone | 300 | 1.8 | 0.90; pH 6-7 |
| formic acid | 2.1 | 5.0 | 0.13-4.1; pH 1-11 |
| acetic acid | 0.066 | 0.10 | 0.0092-0.85; pH 1-10.7 |
| methylamine | 0.39 | 42 | 0.035-5.7; pH 4-12.5 |
| ethylamine | 0.31 | 23 | 0.30-13; pH 3.1-13.1 |
| tartaric acid | 2.4 | 19 | 0.68-0.70; pH 2-9 |
| citric acid | 1.1 | 230 | 0.050; pH 1 |
| ascorbic acid | 760 | 1700 | 4.1-13; pH 1-11 |

めたフェントン反応を用いた実験から求められた値および文献値とともに示した。文献値の大部分はパルス放射線分解の実験から求められたものである。本実験で求められた k_2 の値はフェントン反応を用いて得られた k_2 の値と比較して、いくつかの物質に

ついては文献値に近づいたが、アスコルビン酸はまだかなりかけ離れた大きい値に止まった。また、エチルメチルケトンの値は反対に文献値からかけ離れてしまった。

■報告書■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

環境と健康を守るための水に関する科学的研究

西本右子^{1,5} 高橋法子¹ 石子貴与晃¹ 天野 力¹ 井上和仁¹ 大石不二夫¹
河村正一² 関 邦博¹ 寺本俊彦³ 峯岸安津子¹ 渡部徳子⁴

Study on Water Science

Yuko Nishimoto^{1,5}, Noriko Takahashi¹, Kiyoteru Ishiko¹, Chikara Amano¹,
Kazuhito Inoue¹, Fujio Oh-ishi¹, Shoichi Kawamura², Kunihiro Seki¹, Toshihiko
Teramoto³, Atsuko Minegishi¹, and Tokuko Watanabe²

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

² National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Chiba 263-0801, Japan

³ Natural Environment Research Inc. Ltd. jp. Shinjuku, Tokyo 162-0801, Japan

⁴ Aoyama Gakuin Women's Junior College, Shibuya, Tokyo 150-8366, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. Email: y24moto@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: In this study, we intended to clarify the effect of various treatments such as magnetic and ultraviolet light irradiation on acidic electrolyzed aqueous solutions and alkali halide aqueous solutions. The results indicated that the available chloride concentration of acidic electrolyzed aqueous solution was decreased by these treatments. It was proved that hydroxyl radicals and bound water varied by these treatments in the alkali halide aqueous solution. It was proved that the most effective treatment in aqueous solutions relates to the salt concentration in both the acidic electrolyzed aqueous solution and the alkali halide aqueous solution.

Keywords: functional water, magnetic treatment, ultraviolet light irradiation, bound water, salt concentration

序論

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

材料と方法

試料は電解水のモデル溶液^{1~4})として、有効塩素量 0.3, 1.0 mmol/L、共存塩 (NaCl, KCl, CaCl₂) 濃度 200mmol/L 以下、pH2.5~4 の非電解調製水を使用し、飲用を考慮し NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ 水溶液 (1~100mM) を用いた。磁気処理には、永久磁石 (NIKKENSURU-WATER magnet : Nd 磁石 : 80mT, 120mT)、紫外線照射には、UV ランプ (SLUV-8 アズワン製, 254nm : 光源から 50mm で 1013, 2020 μ W/cm²) を使用した。測定装置は、

NIR(近赤外分光光度計) : Jasco V-570, ESR(電子スピン共鳴) : X-BAND (JEOL RE2X), UV-VIS (Shimadzu Multispec1500), pH, ORP (酸化還元電位) : (CUSTOM 製 TES 1380), DO (溶存酸素) : (TOA DKK DOL-40), オゾン電極 (TOA DKK OZ-20), ¹⁷O NMR (JEOL JNM EX 400) を使用した。各処理前後の測定値を比較し、¹⁷O NMR 測定では緩和時間 (T_2) を求めた。

結果と討論

電解水の有効塩素濃度は UV 法により検討した。その結果、いずれの電解助剤においても処理による有効塩素濃度の低下がみられた。UV 照射では照射時間、磁気処理では濃度低下は磁場が減少率に関係していたが、共存塩(電解助剤)CaCl₂ が処理による変化が最大であった。また少量の共存塩により有効塩素濃度の減少が抑えられることがわかり、最適塩濃度の存在が示唆された。

また OH ラジカルは磁気処理により減少し、紫外線照射により増加した。別途実施した殺菌効果試験の結果は有効塩素量と相関がみられ、CaCl₂を除く磁気処理では未処理とほぼ同程度、それ以外は殺菌効果は低下した。

有効塩素を含有しない塩のみの水溶液においては、磁気処理によって OH ラジカルの増加が確認された。また水の束縛状態も処理によって変化した。いずれの場合も最適塩濃度、処理強度及び時間の存在が示唆された。

謝辞

本研究は、神奈川大学総合理学研究所共同研究として平成 15 年度から 17 年度にかけて実施したもので

ある。総合理学研究所に感謝する。

文献

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

■報告書■ 2005年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

NMR 量子コンピュータ

小澤 宏¹ 天野 力^{2,6} 岡部建次³ 坂口 潮⁴ 福見俊夫⁵ 峯岸安津子²

NMR Quantum Computer; Efficient Simulation of C^n NOT with Elementary Quantum Gates

Hiroshi Ozawa¹, Chikara Amano^{2,6}, Kenji Okabe³, Ushio Sakaguchi⁴,
Toshio Fukumi⁵ and Atsuko Minegishi²

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

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

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

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

⁵ Department of Management, Faculty of Management, Matsuyama University, Matsuyama-City, Ehime 790-8578, Japan

⁶ To whom correspondence should be addressed. E-mail: amano@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: On an $(n+2)$ -bit quantum network, a gate for conditional NOT operation with $n \geq 5$ bits of controls (a C^n NOT gate) can be simulated with $24n-64$ gate of conditional two-bit operations, as well as with $32n-4$ gates of CNOT and one-bit operations. These small numbers of elementary gates (which are approximately half or two thirds of the number known so far) help toward implementation of the oracle $U_f: |x\rangle|y\rangle \rightarrow |x\rangle|y+f(x)\rangle$ on quantum computers.

Keywords: quantum computer, NMR, C^n NOT gate, Shor's algorithm, oracle unitary transformation

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

Shor (1994)による整数の素因数分解アルゴリズムなど、多くの量子アルゴリズムは、ユニタリー変換 $U_f: |x\rangle|y\rangle \rightarrow |x\rangle|y+f(x)\rangle$ (x は n 個, y と $f(x)$ は m 個のビットで表される 2 進数。+は 2 進和)をオラクルとして用いることにより、関数 f の評価を行なっている。このオラクルは、与えられた x に対し、高々 m 個の C^n NOT ゲート(n 個の control ビットがすべて 1 のときに限り target ビットの状態を反転するゲート)でインプリメントされる。Barenco ら(1995)は、 n が 5 以上の C^n NOT ゲートは、量子ビットが 1

つだけ余分に存在するとき、すなわち $n+2$ ビットの系において、 $8(n-3)$ 個の C^n NOT ゲートより成るシーケンスでシミュレート可能であることを示し、さらにその中の 4 個を除く C^2 NOT は、いずれも 6 個の基本量子ゲートでインプリメントできると報告した。

我々はこの C^2 NOT ゲートのシーケンスを、基本量子ゲートで、より効率的にインプリメントする方法について考察し、先に、 n が 5 以上の C^n NOT は、 $16n-8$ 個の 2 ビット CNOT ゲートと $16n+4$ 個の 1 ビットゲート(量子ビットの位相を回転するゲート)より成る、合計 $32n-4$ 個の基本ゲートでインプリメント可能であることを示した。今回、我々はさらに考察を進め、同じ C^n NOT ゲートが、 $8n-24$ 個の CNOT ゲートと $16n-40$ 個のルート CNOT ゲート(自乗すると CNOT になるゲート。すなわち control ビットが 1 のときに限り target ビットの位相を x 軸のまわりに $\pi/2$ だけ回転するゲート)より成る、合計 $24n-64$ 個の 2 ビットゲートでインプリメント可能であること

を見出した。ここに現れる n の係数 24 は Barenco らが示した係数の $1/2$ であり、この CNOT とルート CNOT によるインプリメントは、現時点において知られているもっとも少ない基本ゲート数での CⁿNOT のシミュレーション法である。

実際に量子系を用いて CⁿNOT を実行するにあたっては、実行時間の短縮を図ることが重要である。1 ビットゲートは当該量子ビットと外場との相互作用を用いて実現できるのに対し、2 ビットゲートの

実現には系内に元来備わっている相互作用を用いねばならず、一般に後者は前者に比し格段に弱い。このため CⁿNOT の実行に要する時間は、その基本ゲートシーケンス中に含まれる 2 ビットゲートの実行時間で押さえられる。我々が見出した 2 種の方法による CⁿNOT の実行時間は、ともに CNOT を $16n$ 回実行する時間にほぼに等しく、これは Barenco らが示したインプリメント法での実行時間を $2/3$ に短縮するものである。

■報告書■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

微量 DNA からの塩基配列決定法を用いたホタテ母貝個体群の推定

鈴木 祥弘^{1,2} 井出 功一¹

Estimation of Parental Populations of Scallop with Sequencing Method from Total DNA in Individual Larva

Yoshihiro Suzuki^{1,2} and Koici Ide¹

¹ Department of Biological Sciences School of Science Kanagawa university
2946 Tsuchiya, Hiratsuka, 259-1205, Japan

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

Abstract: Total DNA was extracted from each individual larva of scallop (*Patinopecten yessoensis*) collected at Saromako Lagoon Hokkaido Japan in May and June 2005 and sequence of NcR11 in mitochondrial DNA of each individual was determined with a small scale sequencing method. We could classify 146 individuals to 4 groups with NcR11 sequence. Population of AHG12 increased particularly during recent 5 years corresponding to the high temperature in Saromako Lagoon in Summer.

Keywords: mitochondrial DNA, NcR11, Saromako Lagoon, scallop

序論

養殖漁業において、母貝・母魚の保全是優良な稚貝・稚魚を採苗し、効率よく養殖を行うために不可欠である。しかし多くの魚介類では、海中を広範囲に浮遊する微少なプランクトン幼生を種苗に用いるため、母貝・母魚の特定が困難であった。プランクトン幼生を種苗に用いる養殖漁業の一つにホタテ貝 (*Patinopecten yessoensis*) がある。これまでの研究でプランクトン幼生の個体群間の違いを DNA 塩基配列を指標に検出する方法を開発し、その結果に基づく母貝集団の変化を追跡してきた。本研究では、2005 年 5~6 月に出現したプランクトン幼生の個体群構成を詳細に解析し、過去の結果と比較した。

材料と方法

北海道サロマ湖では 5~6 月にプランクトン幼生が出現する。本年は 5/30、6/2、6/6 と 6/9 の 4 回、サロマ湖内の 2 海域で採水を行いプランクトン幼生を採集した。試水中のプランクトン幼生を顕微鏡下でマイクロマニピュレーションにより単離し、岩谷らの Chelex100 法により個体毎に全 DNA を抽出した。抽出した全 DNA を鋳型として、ホタテ個体群の識別にしばしば用いられるミトコンドリア DNA 上の NcR11 領域を PCR 法によって増幅し、ABI PRISM310Genetic Analyzer を用いて、塩基配列を

決定した。ソフトウェア ClustalW ver.1.83 を用いて塩基配列を整理し、系統群に分類した。

結果

湖口付近の採水海域では 6/2、湖内奥の採水海域では 6/6 にプランクトン幼生の密度が最大となった。4 回の採水で計 1536 個体を単離し、全 DNA を抽出した。抽出 DNA の全てにホタテ貝に特異的に反応するプライマーを用いて PCR を行ったところ、780 試料で DNA が増幅した。この時期、外見が非常に類似したイガいの幼生がホタテ貝の幼生と共存するため、単離個体に多くのイガイ幼生が混入したことが、低い収率の原因と考えられる。このうち無作為に選んだ 200 試料について、塩基配列を解析し、146 試料について NcR11 領域の塩基配列を決定した。塩基配列より試水中の個体群に 33 種のハプロタイプを確認できた。これを長島らの系統群で分類すると、4 系統が確認された。

討論

本研究で検出されたハプロタイプを過去に北海道全域のホタテガイについて行われた解析結果と比較すると、33 ハプロタイプの内 14 が新規なハプロタイプであった。この結果は、NcR11 領域には極めて多

くの変異があり、個体群の識別に十分な多様性を持つことを示している。また、より詳細な解析を行うためには、さらに多くの個体の解析が必要であることが明らかになった。これらのハプロタイプを NcRII 領域の中の指標塩基を用いて系統群に分類すると、HG01、HG04、HG12 と HG21 の 4 系統群が確認できた。4 系統群の割合は 1980、1998 および 2000 年の解析結果とほぼ一致したものの、HG12 系統群が急激に増加する傾向が認められた。この個体群はホタテ貝分布の南限付近で特徴的に優先する

ことが知られている。近年の下記海水温の上昇との関連も疑われる。今後の継続した解析が極めて重要であることが改めて示された。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご支援をいただきました、サロマ湖養殖漁業協同組合・サロマ湖養殖調査研究センター・研究部長・前川公彦氏に深く感謝いたします。

2005年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

所 長： 生物科学科 教授 齊藤光實
 運 営 委 員： 情報科学科 教授 桑原恒夫
 情報科学科 教授 中田穰治
 化学科 教授 大石不二夫
 化学科 教授 天野 力
 生物科学科 教授 鈴木季直
 生物科学科 教授 小笠原 強

(2) 顧問・特別所員・客員研究員

顧 問： 藤原鎮男、門屋 卓、村田健郎、
 武内義尚
 特 別 所 員： 田仲二朗、藤原 讓、釜野徳明、
 大橋 守、猪木慶治、高木伸司、
 鈴木秀穂、村上 悟、竹内敬人
 客員研究員： 藤林俊生、平野哲也、松浦育敏、
 藤原昭子、豊泉和枝、河合 忍、
 中原昌明、小石眞澄、高梨雅彦、
 濱元千絵子

(3) 理学部産官学連携推進委員会

委 員 長： 化学科 教授 大石不二夫
 総合理学研究所所長： 生物科学科
 教授 齊藤光實
 情報科学科： 教授 中田穰治
 化 学 科： 教授 松本正勝
 生物科学科： 助教授 鈴木祥弘
 情 報 系： 情報科学科 教授 桑原恒夫
 広 報 委 員： 情報科学科 教授 後藤智範
 産官学連携推進室： 課長 田口澄也
 産官学連携推進室平塚： 審議役 大石剛士

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第22回湘南ハイテクセミナー

—機器分析入門—

日時： 2005年6月16日(木)・17日(金)

10時～16時30分

会場： KU ポートスクエア

(みなとみらいクイーンズタワー14階)

主催： 神奈川大学総合理学研究所

共催： 神奈川大学みなとみらい

エクステンションセンター

後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「分析総論」
杉谷嘉則(神奈川大学理学部化学科)
- 2) 「質量分析」
明石知子(横浜市立大学大学院総合科学研究科)
- 3) 「環境分析」
功刀正行(独立行政法人国立環境研究所)
- 4) 「NMR 分析」
天野 力(神奈川大学理学部化学科)
- 5) 「赤外分光」
尾崎幸洋(関西学院大学工学部化学科)
- 6) 「有機材料分析」
宇野佳孝(株式会社日東分析センター)

(2) 第23回湘南ハイテクセミナー

—研究開発と分析技術—

日時： 2005年12月8日(木)・9日(金)

10時～16時30分

会場： KU ポートスクエア

(みなとみらいクイーンズタワー14階)

主催： 神奈川大学総合理学研究所

共催： 神奈川大学みなとみらい

エクステンションセンター

後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「研究開発における NMR 分析」
嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 2) 「超微量分析の新展開」
原口紘丞(名古屋大学大学院工学研究科)
- 3) 「高分子・ゴムの分析技術」
西本右子(神奈川大学理学部化学科)
- 4) 「研究開発と IR 分析」
古川行夫(早稲田大学工学部化学科)
- 5) 「研究開発と X 線分析」
田沼繁夫(独立行政法人物質・材料研究機構)
- 6) 「研究開発と材料分析」
志智雄之(株式会社日産アーク)

(3) 第16回神奈川大学平塚シンポジウム

—有機ケイ素化学の最前線—

日時： 2006年3月17日(金)

11時～17時30分

会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス
(61号館332室AV教室)

主催： 神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所

共催： 日本化学会

演題・発表者：

- 1) はばたけ神大出身の若手研究者
「 π -アリアルパラジウムを経由する新しい反応の開発」
服部初彦(東京工業大学大学院総合理工学研究科)
「長鎖DNAの折りたたみ転移におけるキラリティー識別」
伊藤倫子(独立行政法人物質・材料研究機構)
- 2) 「有機ケイ素とフラーレンの化学」
加部義夫(神奈川大学理学部化学科)
- 3) 「ケイ素化フラーレン」
赤坂 健(筑波大学大学院数理物質科学研究科)
- 4) 「遷移金属上でのヒドロシランの振るまい」
田中正人(東京工業大学資源研究所)
- 5) 「はしご型骨格をもつケイ素化合物」
松本英之(群馬大学大学院工学研究科)
- 6) 「世界をリードする日本のケイ素化学」
玉尾皓平(独立行政法人理化学研究所)

(4) 構造解析サマースクール2005

日時： 第1回 2005年8月3日(水)
第2回 2005年9月8日(木)
第3回 2005年9月9日(金)
10時30分～17時

会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス
(61号館332室AV教室)

主催： 神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
神奈川大学総合理学研究所

演題・講師：

第1回

- 1) 「核磁気共鳴法の基礎と最近の進歩」
竹内敬人(神奈川大学名誉教授)
実用例の紹介
「機能水の分析と ^{17}O NMR」
西本右子(神奈川大学理学部化学科)
「非環状カルボン酸型イオノホアの構造解析」
力石紀子(神奈川大学理学部化学科)
「ジルコニウム(IV)を含むポリオキシメ

タレート)の分子構造とNMRスペクトル」
篠原 旭(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士前期課程2年)
「ポリマー中の末端官能基の定量」
森 博範(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士前期課程2年)
「ブロック共重合体の分子量の決定」
稲男洋一(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士前期課程2年)

第2回

- 2) 「質量分析法の基礎と最近の進歩」

大橋 守(電気通信大学名誉教授)

実用例の紹介

「MALDI-TOF-MSによるタンパク質の同定」
小林照幸(神奈川大学ポスト・ドクター)
「環状過酸化物、1,2-ジオキセタン類のMALDI-TOF-MSにおけるイオン化の検討」
伊集院久子(研究支援スタッフ)
「ヘリウム同位体による海流の追跡」
清田 馨(東京大学海洋研究所)
「環状過酸化物、1,2-ジオキセタン類のESIマスマスペクトロメトリー」
星谷尚亭(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士後期課程2年)
「新規チオセミカルバゾン Ag(I)四核錯体のESIマスマスペクトロメトリー」
小野寺邦晶(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士前期課程2年)

第3回

- 3) 「X線解析法の基礎と最近の進歩」

大橋祐二(東京工業大学名誉教授)

実用例の紹介

「錯体の構造解析—光に安定な水溶性銀(I)を中心として」
力石紀子(神奈川大学理学部化学科)
「有機化合物におけるX線結晶解析の有用性—1,2-ジオキセタン類の測定—」
伊集院久子(研究支援スタッフ)
「ベンゼンルテニウム(II)基を担持したDawson型タングストポリ酸塩のX線結晶構造」
坂井善隆(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士後期課程3年)
「ルテニウムクラスター錯体の構造解析」
坂本英士(神奈川大学大学院理学研究科
化学専攻博士前期課程2年)
「カルボン酸金属錯体の構造解析」
竹井 徹(神奈川大学大学院理学研究科

化学専攻博士後期課程2年)

(5) 研究集会「植物染色体の分子細胞生物学：減数分裂、クロマチン修飾、生殖」

日時： 2005年7月15日(金)13時～
16日(土)15時

会場： 国立遺伝学研究所ゲストハウス
2階セミナールーム

主催： 国立遺伝学研究所

共催： 神奈川大学総合理学研究所

演題・発表者：

- 1) 「担子菌ヒトヨタケの減数分裂の生化学」
坂口謙吾(東京理科大学)
- 2) 「ユリの減数分裂特異的ヒストン遺伝学の発現解析」
田中一郎(横浜市立大学)
- 3) 「アラビドブシスの Rad52 経路遺伝子の解析とアラビドブシス・イネのジーンターゲットティング」
土岐精一(独立行政法人農業生物資源研究所)
- 4) 「イネの第一減数分裂に特徴的な動原体の挙動」
野々村賢一(大学共同利用機関法人国立遺伝学研究所)
- 5) 「オオムギ分裂期染色体におけるヒストン修飾の動態」
若生俊行(独立行政法人農業生物資源研究所)
- 6) 「胚乳発生とゲノムインプリンティング」
木下 哲(大学共同利用機関法人国立遺伝学研究所)
- 7) 「植物細胞は中心体なしでどのように微小管を形成するか」
村田 隆(自然科学研究機構基礎生物学研究所)
- 8) 「モデル動植物にみられる減数分裂の染色体ダイナミクス」
東谷篤志(東北大学)
- 9) 「異数体酵母の染色体不安定性について」
丹羽修身(財団法人かずさDNA研究所)
- 10) 「コムギの配偶子致死遺伝子は花粉成熟過程で染色体切断を誘発する」
那須田周平(京都大学)
- 11) 「イネ DMC1 の機能を利用した相同組換え率向上への試み」
中島麻里奈(独立行政法人農業生物資源研究所)

12) 「テッポウユリの生殖細胞形成時期特異的遺伝子群に関する研究」
平塚和之(横浜国立大学)

13) 「トランスポゾン・タグラインを用いたシロイヌナズナの不稔変異体の分類と解析」
黒森 崇(独立行政法人理化学研究所)

14) 「シロイヌナズナ減数分裂変異体 solo dancers の解析と減数分裂期染色体の動態」
安積良隆(神奈川大学)

(6) 講演会

日時： 2005年4月15日(金)
15時10分～16時40分

会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館304室)

主催： 神奈川大学総合理学研究所
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター

演題： 「赤潮藻感染症 RNA ウイルスに関する分子生態学的研究」

講演者： 外丸裕司(独立行政法人水産総合研究センター)

(7) 講演会

日時： 2005年5月6日(金)
16時50分～18時20分

会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館201室)

主催： 神奈川大学総合理学研究所
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター

演題： 「骨格筋の興奮収縮連関とリアノジン受容体」

講演者： 村山 尚(順天堂大学医学部)

(8) 講演会

日時： 2005年7月14日(木)
16時50分～18時20分

会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館305室)

主催： 神奈川大学総合理学研究所

演題： 「球状βアミロイド凝集体アミロソフェロイド形成から毒性の阻止まで」

講演者： 星美奈子(株式会社三菱化学生命科学研究所)

(9) 講演会

日 時： 2005年9月27日(火)
15時10分～16時40分
会 場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス(67号館308室)
主 催： 神奈川県総合理学研究所
神奈川県ハイテク・リサーチ・センター
演 題： 「酵母の産生する抗酵母タンパク質
‘キラートキシン’に関する研究—抗
イディオ抗体を用いた抗体医薬の開
発をめざして—」
講演者： 小宮山忠純(新潟薬科大学)

(10) 講演会

日 時： 2006年3月14日(火)
15時10分～16時40分
会 場： 神奈川県湘南ひらつかキャンパス(67号館228室)
主 催： 神奈川県総合理学研究所
神奈川県ハイテク・リサーチ・センター
演 題： 「シロイヌナズナの根端成長に関する細胞動力学的研究」
講演者： 岩元明敏(東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

Science Journal of Kanagawa University 投稿規定

1 編集方針

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

2 研究論文の種類

総説(Review)、原著(Full-length Paper/ Note)、および報告書(Report)とする。原著には短報(Note)を含み、報告書は原著に準ずる。掲載する研究論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁（総説および原著）

総説および原著論文（短報を含む）の原稿は、下記要領に従って、そのまま印刷できるように仕上げる。なお、報告書については次の4に示す。

(1) 頁数

短報は、刷り上がり 4 頁以内とするが、それ以外の論文には特に頁制限はない。但し、編集委員会により論文が冗長と判断された場合には頁数は限定される。

(2) 原稿用紙サイズ

A 4 版の用紙を用いる。本文および図表の占める範囲(紙面)は縦横 245×170mm とする。この場合、余白は、上辺 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

(3) 段組み

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

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

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文献は 2 段組み、左右両端揃えとする。

(4) 使用文字（フォントの種類）

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

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

(5) 論文構成

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

(6) 論文種の表示

第 1 頁、第 1 行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

例えば、■総説■、■原著■、■原著（短報）■、■報告書■ など、英文では、■Review■、■Full-length Paper■、■Note■、■Report■ など。

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、MS ゴシックで 11P（ポイント）とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで 1 行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

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

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

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

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

著者の所属が複数の場合には、各著者名末尾および対応する所属の先頭に上つき数字（1、

2、3、など)を付し区別する。

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

次の Abstract までは1行あける。

(8) Abstract

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

見出し (Abstract :) からは1文字あけて要旨本文を書く。

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

(9) Keywords

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

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

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横 2 段組、各段 48 行とする。

1 行の文字数は和文 23 文字、英文 46 文字とする。

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞の各項目の見出しは左揃えとする。

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で 12P、本文は 10P とする。

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

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で 10P とする。

項目の見出しと小見出しの間は1行スペースをあける。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

番号は片括弧 (閉じ括弧のみ) 表示とする。

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

文字サイズは、項目の見出しは太字で 12P、各文献は 9P とする。

文献が日英混合の場合、和文の文献のアルフ

アベットと数字には、Century のフォントを用いる。

以下は記入例である。

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* 10 Suppl: 89-109.
- 2) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 3) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 4) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料の元素分析法. *微生物* 5(1) : 34-44.
- 5) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) 生命へのアプローチ. 弘学出版、東京.
- 6) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第 6 章. よくわかる電子顕微鏡技術. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
- 7) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川大学総合理学研究所年報 2003*. pp.41-80.

(12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

表の上部には必ず番号 (表 1.、Table 1. など) とタイトルを付し、本文との整合を期す。表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。

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

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図の説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図の説明文に限り、和文でもピリオド(.)とカンマ(,)を用いる(和文の句読点はいない)。図の番号および説明文の文字サイズは9Pとする。

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

(14) 単位

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

(15) 作製見本

希望者には作製見本を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁(報告書)

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

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

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

多人数による共同研究のうち、

- (1) 各研究者が全員原著と同等の論文(短報の場合も含めて)を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は3の規定に準じて作製する。
- (2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は3の規定と同じである。

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

5 投稿

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

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

6 投稿論文の審査

適時、レフリーによる校閲を行ない、採否や再投稿請求は編集委員会で決定する。

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

7 原稿の校正

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

8 投稿料

原則として投稿は無料であるが、カラー印刷を含むものについての著者経費負担の有無および負担額は編集委員会で決定する。投稿原稿の体裁が規定にあわず、編集段階で修正に経費が生じた場合は著者が実費を負担するものとする。

9 別刷

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

10 著作権等

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



編集後記

本誌、Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌)は、昨年、従来発行されていた神奈川大学総合理学研究所の機関誌(年報)を改訂し、理学部および大学院理学研究科の学内紀要の役割も果たす理学専門の科学誌として再出発致しました。既刊の新巻(Vol. 16)は、幸いにも多くの方々にご好意を持って迎えられ、編集者一同、今後の発展に大きな希望を抱くことが出来ました。

若手研究者が研究成果を公表できる場を増やすということも本誌の目的の一つですが、総合理学研究所研究助成の報告書の他に、若手研究者からの自由投稿論文も数編加えて、今回、ここにVo. 17を無事発刊できましたことは喜ばしい限りです。昨年の編集時に、編集実務と印刷をご担当頂きました光和サービス株式会社のご協力で論文投稿のためのフォーマットを作成致しました。このため、今回の原稿作成と編集がよりスムーズに行なわれましたことは編集上の大きな前進でした。しかしながら、今回投稿された原稿では、フォーマットに合っていなかったものも多く、特に図の表現と引用文献のリスト表記

には不適合なものがあったり、編集上の校正で多くの労力と時間をさかなければなりません。投稿される方には、本誌の投稿規定を熟読され、既に出版されている論文も参考にして、フォーマットに適した原稿作成を心がけて下さるようお願い申し上げます。

本誌は、既に、国立情報学研究所を通じてオンライン化されていますが、研究成果を広く世界に発信するために今後は独自のホームページによる論文開示も検討したいと考えています。論文審査体制のより一層の充実、より多くの若手研究者の投稿促進、英文論文の投稿促進など、本誌をより発展させるための課題はまだ多く残されています。逸ることなく、一步一步前進することを心掛けたいと思います。

最後になりましたが、本巻の発行にご協力頂きました各位に心からお礼申し上げます、あわせて、本誌のより一層の発展のため、皆様のさらなるご協力、ご支援を賜りますようお願い申し上げます。

[神奈川大学総合理学研究所、
理学部生物科学科 鈴木季直]

神奈川大学理学誌編集委員会

委員長
鈴木季直 生物科学科
委員
天野 力 化学科
石岡俊也 情報科学科
井上和仁 生物科学科
加部義夫 化学科
張 善俊 情報科学科

Science Journal of Kanagawa University

Editor-in-Chief
Suechika Suzuki Department of Biological Sciences
Editors
Chikara Amano Department of Chemistry
Shunya Ishioka Department of Information Sciences
Kazuhito Inoue Department of Biological Sciences
Yoshio Kabe Department of Chemistry
Zhang Shan Jun Department of Information Sciences

Science Journal of Kanagawa University Vol. 17

| | |
|-----|--|
| 発行日 | 2006年5月25日 |
| 編集者 | Science Journal of Kanagawa University 編集委員会 |
| 発行者 | 神奈川大学総合理学研究所 |
| 発行所 | 〒259-1293 平塚市土屋 2946 Tel. 0463-59-4111(内 2500) Fax. 0463-58-9684 |
| 印刷所 | 光和サービス株式会社 |

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