

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.26 2015

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

原 著

Molecular Evolution of a Group of Microtubule-Associated Proteins Sharing Patrial Similarities in Their Primary Structures

Yurika Hashi, Susumu Kotani and Kiyotaka Tokuraku 1

Silicide Synthesis by Fe⁺ Implantation in Si Substrates

Yasushi Hosino, Gosuke Yachida, Tomoaki Yoneda and Jyoji Nakata 7

計算物理学と関数型プログラミングー Java 8 新仕様の物理学への応用と並行計算の可能性ー

川東 健 13

PHASE を用いた二次元 Si のバンド計算と実験比較

青木 孝 17

若い中質量星周りの原始惑星系円盤の中間赤外撮像

本田充彦、Koen Maaskant、岡本美子、片坐宏一、山下卓也、宮田隆志、酒向重行
藤吉拓哉、左近 樹、藤原英明、上塚貴史、Gijs D. Mulders、Enrique Lopez-Rodriguez
Christopher Packham、井上昭雄、尾中 敬 23

二次元半導体デバイスの研究

水野智久、前田辰郎、多田哲也、青木 孝 33

Q&A コミュニティに注目したブラウジング行動に基づく検索満足度の予測分析

韓 浩、郭 俊霞、中山 堯 41

ヒスチジンを中心とした塩基性アミノ酸を配位子とするポリマー性銀 (I) 錯体の合成、構造解析及び抗菌活性

力石紀子、野宮健司、松永 諭、両角宗一郎、高山晃彦、高木由貴、井上ちさと
柳田貢助、吉川理絵 47

オジギソウの振動計性反応に伴う小葉枕細胞の微細構造変化と細胞内イオン動態

青木 唯、丸茂 幸、西方秀之、小塚麻衣子、深田麻希、小浦七美、早津 学、鈴木季直 53

断片化した珪藻類全ゲノム DNA のからの高品質 DNA の精製

鈴木祥弘、金沢謙一、森本貴之、米澤直樹、中山 堯 71

イソスジェビのインスリン様造雄腺因子の血中動態解析に向けた高感度測定系の確立

大平 剛、埼玉瑞帆、鈴木竜太、鶴岡慎哉、片山秀和、泉 進 75

FIB-SEM を用いたシロイヌナズナの雄性配偶体の形成過程の解析

安積良隆、松島英輝 79

ウミホタル類の体色と色素の進化 若山典央、中井静子、金沢謙一	85
相模川河口域プランクトン生物量の周年変化 野木大輝、平賀義路、金澤謙一、西本右子、武井尊也、鈴木祥弘	91
研究交流報告	
第十回神奈川大学 - 国立台湾大学学術交流 加部義夫	97
2014 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	107
Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	115
Author Index	119
編集後記	121

■ Full-length Paper ■

Molecular Evolution of a Group of Microtubule-Associated Proteins Sharing Partial Similarities in Their Primary Structures

Yurika Hashi^{1,4}, Susumu Kotani² and Kiyotaka Tokuraku³

¹ Graduate School of Engineering, Muroran Institute of Technology, Muroran City, Hokkaido 050-8585, Japan

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

³ Department of Applied Sciences, Muroran Institute of Technology, Muroran City, Hokkaido 050-8585, Japan

⁴ To whom corresponded should be addressed. E-mail: y.hashi@mmm.muroran-it.ac.jp

Abstract: Several microtubule-associated proteins (MAPs), including mammalian MAP2, MAP4, and τ , share a repeated motif called the assembly-promoting (AP) sequence, and the evolutionary relationship among the MAPs is claiming increased attention. In this report, we first searched the protein database for AP sequence-bearing proteins using the MAP4 repeat sequences as a query, and found some 600 proteins from 170 different species. We assessed the authenticity of the detected sequences by manually aligning them along the consensus sequence, v-sk-gs-nikh-pggg. Interestingly, the AP sequence-bearing proteins were found only in *Bilateria*, despite the importance of microtubules for all eukaryotes. The differentiation of the AP sequence-dependent microtubule regulation likely followed the emergence of *Bilateria* in biological evolution. Secondly, we closely inspected the resemblance of the AP sequences in the MAPs from three mammals and one nematode. By carefully comparing the AP sequences of the four MAPs, we discovered that the nematode MAP, PTL-1, is most similar to MAP4 among the three, although it was originally identified as a τ -like protein. From an evolutionary point of view, the closer relationship of PTL-1 to the ubiquitous MAP4 is more reasonable than to a protein restricted to mammalian brains.

Keywords: microtubule, microtubule-associated proteins (MAPs), Assembly-Promoting (AP) sequence

Introduction

Microtubules are major cytoskeletal components that play important roles in multiple cellular events, such as cell division, intra-cellular transport, and cell movement¹. These microtubule-mediated functions are regulated by a variety of accessory proteins, referred to as microtubule-associated proteins (MAPs)²⁻⁶, which include motor proteins, severing factors, depolymerizing factors, stabilizing factors, and others.

The mammalian MAPs, MAP1, MAP2, MAP4, and τ , are stabilizing factors: they bind to the surface of microtubules, stimulate microtubule assembly, and stabilize preformed microtubules⁷⁻¹⁰. Among them, MAP2, MAP4, and τ share structural similarities, with distinct N-terminal projection and

C-terminal microtubule-binding domains¹¹. The microtubule-binding domain is further divided into three subdomains, the Pro-rich region, the Repeat region, and the Tail region (Fig. 1), based on the characteristics of their primary structures. We and others have studied the functions of the three subdomains¹¹ and concluded that their coordination accomplishes the overall MAP activity¹².

The Repeat region has attracted much attention, since the region contains a trio, quartet or quintet of 18-amino-acid-residue repeated motifs, with sequences that are more than 70% identical among MAP2, MAP4, and τ . Synthetic polypeptides with the motif sequence exhibited microtubule-binding activity^{13, 14}, and we named the motif the assembly-

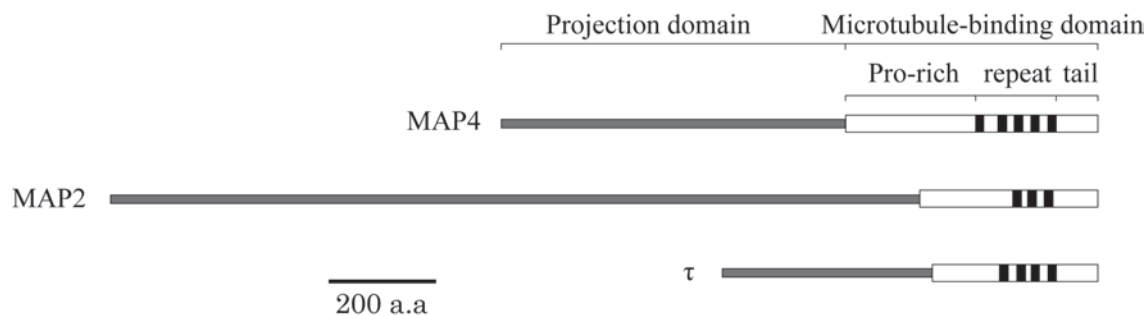


Fig. 1 Schematic primary structures of MAP4, MAP2, and τ . AP sequences are indicated by black boxes in the Repeat region.

promoting (AP) sequence¹⁵). Since the Repeat region is essential for a MAP to bind properly to microtubules, we hypothesized that MAP2, MAP4, and τ share a common microtubule-binding mechanism mediated by the AP sequences. We are presently performing comparative biochemical analyses, using the microtubule-binding domains of the three mammalian MAPs (Hashi *et al.*, manuscript in preparation).

Meanwhile, various organisms besides those in *Mammalia* reportedly express proteins containing repeat sequences that are very similar to those of the mammalian AP sequences¹⁶). Since the AP sequence itself is capable of binding to microtubules¹³⁻¹⁵), it is highly probable that those AP-like sequence-bearing proteins function as MAPs in their own organisms, and interact with microtubules *via* a mechanism common to that of the mammalian MAPs. Considering the biological significance of microtubules and their regulatory systems in eukaryotic cells, it is reasonable to expect that a certain primitive MAP molecule emerged at an early stage of eukaryote evolution. Currently, an AP sequence-bearing protein is the most promising candidate for the ancestral MAP, and the present-day AP sequence-bearing proteins may be its descendants. To investigate this idea, we are now analyzing an AP sequence-bearing nematode MAP, PTL-1, and examining its evolutionary relationship with the mammalian MAPs by comparing their biochemical characteristics (Hashi *et al.*, manuscript in preparation).

In this study, we tackled the evolutionary problem by taking another approach, *i.e.*, bioinformatics. We performed a thorough investigation of the sequences homologous to the AP sequence, using the protein database, and discussed their relationship from a

phylogenetic point of view. We also made detailed inter-molecular and intra-molecular comparisons among the primary structures of the AP sequences in MAP2, MAP4, τ , and PTL-1.

Materials and Methods

All of the protein sequences were retrieved from Uniprot (<http://www.uniprot.org>) and were analyzed by the BLAST search program¹⁷), using the repeat sequence of *Bos taurus* MAP4 (amino acid residues 881-1007, GenBank: D90149.1) as the query sequence. We also compared the sequences manually, to judge the authenticity of the BLAST search results. The multiple alignment was performed using ClustalW, version 2.1¹⁸).

Results and Discussion

Tubulin, the principal constituent of microtubules, is a highly conserved protein, and its MAP binding site is reportedly localized to a restricted region of the C-terminal α -helices¹⁹). Consequently, the binding site on the MAP side should also share some structural similarity, and the AP sequence-like structure is the most promising candidate for the similarity, as described in the introduction. Some 600 proteins from 170 different species were found to contain sequences homologous to the Repeat region of MAP4, by the BLAST search. To exclude pseudo-homologues from the BLAST results, we manually checked the detected sequences to confirm that they contain the consensus sequence of the MAP2/MAP4/ τ AP sequences (v-sk-gs-nikh-pggg). Among the 170 candidates, 165 biological species were verified to contain AP sequence-bearing proteins, while the remaining five did not. Incidentally, all five belonged to fungi. AP sequence-bearing proteins were found to be present in a variety of species, as

Clonorchis sinensis (Platyhelminthes)
(137)GTPRL**IT**SKINSLKNVHHK**PPGG**NVSV(164)
(168)VQLG**P**IASKNCFANVKHK**PPGG**NVVIV(195)
(199)LDLTCVH**SK**ISSLKNVKV**PPGG**QTQIK(226)
(231)NFTENAT**SK**IGPLSKM**HT**PPGGNVQIR(258)
(263)NFTENAS**PK**IGHLSKM**HT**PPGGNVQIV(290)
(295)EPDKT**AK**SKIGSLKNA**QH**RRAGGVDVQIF(322)

Caenorhabditis elegans (Nematoda)
(285)NAKFV**NV**SKVGS**V**TNHK**AG**GNVEIFS(312)
(314)KRLYNA**Q**SKVGS**L**KNATH**V**AGG**N**VQIE(341)
(343)RKLDF**SA**SPK**V**G**S**KTY**Q**PAKS**D**VKIV(370)
(373)KLT**W**Q**AK**SKVGS**MD**NA**HK**PA**GG**NVQIL(400)
(403)KLN**W**KA**ES**KVGS**KDN**M**HH**SP**GG**NVQIF(430)

Branchiostoma floridae (Chordata)
(32)SDTK**V**SK**I**G**S**T**AN**I**H**HK**PP**GGNVSLF(59)
(77)KD**S**AV**S**SK**C**GS**KDN**I**K**HT**PP**GGNVAIT(104)
(108)Q**D**LS**K**VT**S**RC**G**SK**DN**I**K**HS**PP**GGNVKIA(135)
(139)Q**D**FS**R**V**S**SR**C**GS**KDN**I**K**HT**PP**GGNVKIA(166)
(170)ID**F**TK**V**GS**R**CG**S**K**DN**I**K**HT**PP**GGDLGRE(197)
(229)LD**F**SN**V**Q**S**K**C**GS**M**NI**K**H**K**AG**GG**QHRL(256)
(279)DF**K**DA**Q**SKVGS**L**D**V**D**H**Q**PP**GGDKKVG(306)

Drosophila melanogaster (Arthropoda)
(90)PN**L**KA**V**RS**K**IG**S**LD**N**AT**Y**Q**PP**GGHVKIE(117)
(120)KK**I**DI**K**AA**P**RI**E**AK**DN**M**H**RP**GG**EKKIV(147)
(149)KL**Q**W**NA**RS**K**IG**S**LE**NA**HH**PK**GGDKKIE(176)

Gallus gallus (Chordata)
(155)PDL**KN**V**S**K**I**G**S**T**EN**L**H**Q**PP**GGKVQII(182)
(186)LD**F**SS**V**Q**S**K**C**GS**KDN**I**K**HP**GG**SVQIV(213)
(217)V**D**LS**H**VT**S**K**C**GS**L**NI**H**HK**PP**GGQVEVK(244)
(249)DF**K**DK**V**Q**S**K**I**G**S**LD**NI**SH**V**PP**GG**NKKIE(276)

Aplysia californica (Mollusca)
(123)DL**G**W**K**A**E**PL**V**GS**L**M**N**VE**H**K**PP**GGDSQIF(150)
(153)V**P**KW**K**A**K**AV**G**SL**D**NI**D**Y**N**RR**S**SSQSDP(180)
(186)Q**F**STR**Y**GA**L**AN**V**GV**S**SH**Y**TP**GG**A**E**VIK(213)
(216)K**Q**Y**E**N**V**GA**K**VGS**L**DN**A**SH**V**PP**GG**DLVIH(243)
(246)R**L**R**W**K**R**ES**R**VGS**L**EN**I**SH**Q**PP**GG**DIYIM(273)
(277)N**Q**RL**T**W**K**SK**P**VGS**L**EN**V**SH**Q**PM**V**SVGR(304)
(306)K**T**D**W**Q**R**AR**V**GS**L**DN**I**H**H**T**PP**GGQVLIP(333)

Strongylocentrotus purpuratus (Echinodermata)
(1470)P**R**NG**A**AS**K**IG**S**LD**N**SR**H**S**PP**GGNVKIQ(1497)
(1501)S**N**YS**R**V**Q**SK**C**GS**L**GN**S**TR**AG**GGNVKIL(1528)
(1532)V**T**FS**P**SS**R**VGS**L**EN**A**HH**S**PP**GG**KVKIL(1559)
(1565)F**P**K**S**V**S**SS**K**IG**S**LD**NA**Q**HS**PP**GG**NVKIT(1592)
(1597)D**F**SK**A**K**S**K**I**G**S**LD**NA**HH**S**PP**GG**NVKIL(1624)
(1629)D**Y**SK**T**V**S**K**I**G**S**LD**N**ATH**S**PP**GG**NVKIE(1656)
(1661)D**F**G**K**V**T**SK**I**G**S**LD**N**ATH**K**PP**GG**KVKIE(1688)
(1693)D**F**K**D**KA**S**K**I**G**S**K**DN**I**K**H**Q**AG**GG**QVKIE(1720)
(1725)D**F**K**V**K**A**T**S**K**I**G**S**K**DN**I**E**HK**PP**GGQVKIQ(1738)
(1757)E**F**KA**K**AS**S**K**I**G**S**LD**N**A**S**H**K**PP**GG**VHIL(1784)
(1789)E**F**ST**K**AQ**S**K**V**GS**MD**N**A**D**H**Q**PP**GGVKIF(1816)

Xenopus laevis (Chordata)
(484)PDL**KN**V**S**K**I**G**S**TD**N**I**R**H**Q**PP**GG**KVQIV(511)
(515)V**D**LGN**V**Q**S**K**C**GS**KDN**L**K**H**V**PP**GG**AIQIT(542)
(546)ID**L**TR**V**T**S**K**C**GS**F**V**N**I**H**HK**PP**GGNVELK(573)
(577)LE**F**D**K**I**Q**S**K**IG**S**LD**N**V**H**T**V**PP**GG**AKKIE(604)

Bos taurus (Chordata)
(876)PDL**KN**V**S**K**V**GS**T**EN**I**K**H**Q**PP**GGRAKVE(903)
(915)K**P**EP**N**AV**T**KA**A**GP**I**GN**A**K**P**PT**G**KVQIQ(942)
(945)V**D**ISK**V**SS**K**CG**S**K**AN**I**K**H**K**PP**GG**DVKIE(972)
(977)N**F**KE**K**A**Q**AK**V**GS**L**D**N**V**G**L**P**AG**G**AVKTE(1004)

Helobdella robusta (Annelida)
(19)LD**S**K**S**V**S**K**I**G**S**LD**NA**K**H**T**PP**GGAVKIQ(46)
(49)V**D**FS**N**V**Q**SK**C**GS**KDN**M**HT**PP**GG**NVKIE(77)
(79)K**L**EW**K**V**S**K**I**G**S**LD**NA**K**H**K**PP**GGDKKIE(107)
(109)K**L**EW**K**V**T**SK**I**G**S**LE**NA**K**H**I**P**GGDVKID(137)
(141)D**F**K**D**KA**Q**SK**V**GS**KDN**I**K**H**K**PP**GG**AKKIE(169)

Saccoglossus kowalevskii (Hemichordata)
(271)K**S**PK**T**ST**P**RI**D**AK**R**E**D**Y**K**PP**GG**NVKIK(298)
(301)K**I**D**V**KK**V**T**S**R**I**EAK**K**E**H**G**K**PP**GG**NIKIF(328)
(448)P**D**I**K**NV**S**K**I**G**S**T**D**Y**L**K**H**T**PP**GGKVKIF(475)
(479)K**D**Y**S**K**V**S**A**R**C**G**S**M**AN**A**H**K**AG**GGNVKIV(506)
(509)K**L**D**I**K**V**Q**S**R**V**GS**KDN**L**H**K**AG**GGKVKVV(536)
(541)G**F**R**Q**KA**S**K**I**G**S**LE**N**D**Y**CP**GG**EVKIT(568)
(573)G**F**KK**A**RS**K**VGS**Y**D**N**I**D**Y**T**PP**GG**VVQII(600)
(604)LD**F**HS**T**SS**R**IG**S**LD**N**A**G**Y**K**PP**GG**EVKIE(631)
(636)Q**F**RES**A**Q**S**K**V**GS**KAN**I**T**HT**PP**GGTKKIE(663)
(668)D**F**KE**A**Q**S**K**V**GS**KD**Y**I**D**H**V**PP**GGTVQIE(695)
(700)E**F**KE**A**Q**S**K**V**GS**KD**Y**I**D**H**T**PP**GGKVKIE(727)
(732)E**F**KE**A**Q**S**K**V**GS**KD**Y**I**D**H**T**PP**GGKVKIK(759)
(764)E**F**KE**A**Q**S**K**V**GS**KD**Y**I**D**H**T**PP**GGKVKIE(791)
(796)D**F**KE**A**Q**S**K**V**GS**KD**Y**M**D**H**V**PP**GGNIQIE(823)
(828)D**F**N**E**N**A**T**S**K**I**G**S**LD**A**PK**ST**R**Q**T**D**SFAVE(855)

Danio rerio (Chordata)
(175)PDL**KN**V**S**K**V**GS**T**DN**L**K**H**Q**PP**GGRIQIL(202)
(206)V**D**FS**N**V**Q**SK**C**GS**KAN**L**K**HT**PP**GGNVKIL(233)
(237)V**D**FT**K**V**Q**SK**C**GS**KDN**I**K**H**AP**GGNVKIL(264)
(268)LD**F**SN**V**Q**S**K**C**GS**KDN**I**K**Y**AP**GGNVQIL(295)
(299)LD**L**T**N**V**Q**ARC**G**S**KDN**L**K**H**V**PP**GG**KVQIL(326)
(330)ID**L**SN**V**Q**S**K**C**GS**KDN**L**R**H**K**PP**GG**NRRIE(357)

Fig. 2 Examples of proteins containing the consensus v-sk-gs-nikh-pggg sequence. Consensus regions are vertically aligned, and presumed AP sequences are in bold letters. The numbers in parentheses at both ends of each line are the amino acid numbers. The name of the species and its phylum are shown at the top of each sequence. Data sources are: *C. sinensis*, GAA48685.1; *H. robusta*, XP_009024666.1; *A. californica*, XP_005107341.1; *B. floridae*, XP_002603235.1; *S. kowalevskii*, XP_006821572.1; *C. elegans*, NP_001022576.1; *S. purpuratus*, XP_788973.3; *D. melanogaster*, NP_001287566.1, *X. laevis*, NP_001082230.1; *G. gallus*, ABY86222.1; *D. rerio*, XP_009304694.1; *B. taurus*, NP_776530.1.

shown in Fig. 2.

Interestingly, the expression of AP sequence-bearing proteins was restricted to *Bilateria* (Fig. 3). Although microtubules are essential in all eukaryotic cells, it is highly probable that the emergence of *Bilateria* was accompanied by new microtubule-dependent cellular events that required the AP sequence-based regulation. Poriferans are unigerminal, and cnidarians and ctenophores are diploblastic, whereas bilaterians are triploblastic. Consequently, bilaterians are expected to be equipped with a highly sophisticated mechanism of division plane determination in mitosis. Since the plane is under the control of microtubule-based mitotic apparatuses, new accessory proteins may have emerged to regulate the quite complicated microtubule dynamics at this stage of evolution. In addition, bilaterians are known to have developed a central nervous system consisting of neuronal cells,

in which microtubules are involved in a variety of essential events, including neurite formation and axonal transport. It is also possible that new roles, which required novel regulatory factors, were assigned to microtubules in neural cells.

The Repeat regions of mammalian MAP2, MAP4, and τ contain three to five AP sequences, which share very similar, but not identical primary structures. We reported elsewhere the detailed comparison of the AP sequences in the three MAPs, and discussed their evolutionary relationship¹¹. In this study, we expanded the analysis to include the PTL-1 AP sequences.

Our previous results indicated that the primary structure of each AP sequence is more similar to the corresponding AP sequence in other MAPs, rather than to the AP sequences within the same molecule. Therefore, we first aligned the entire Repeat regions of the four MAPs, starting from the first AP

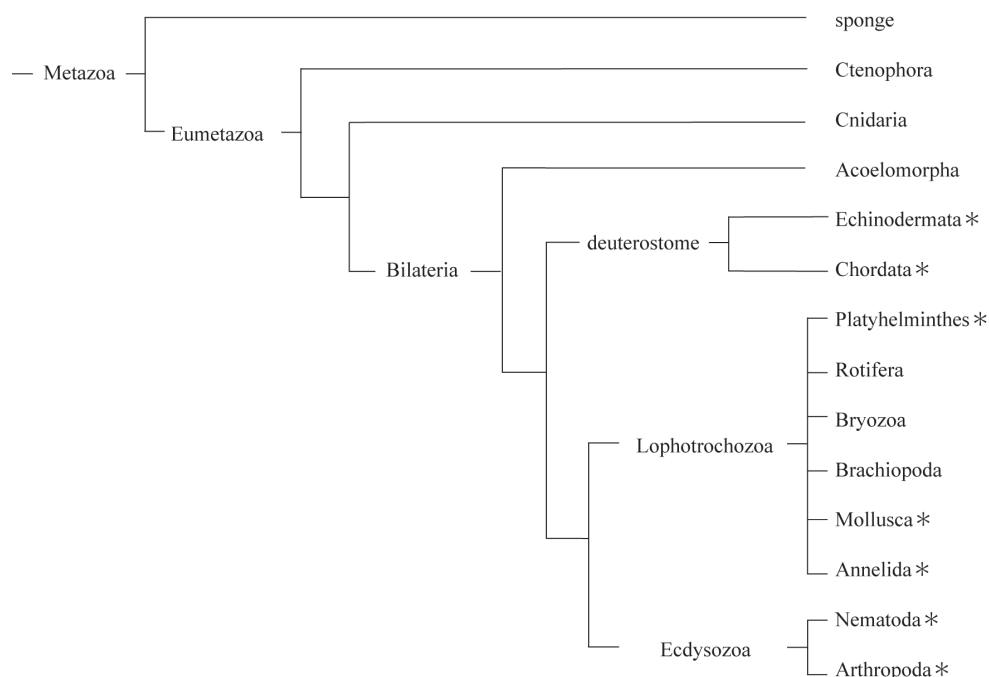


Fig. 3. Phylogenetic tree of the animal kingdom, showing the distribution of organisms that express AP sequence-bearing proteins. The tree was cited from Campbell Biology 9th Edition²⁰, and was slightly modified. The phyla marked with asterisks include animals that express AP sequence-bearing proteins.

sequences, and compared them (Fig. 4A). We found that the first AP sequences were very similar: the four proteins have 7 amino acid residues in common. Nevertheless, the similarity was considerably lower in the second (2 identical residues) and third (4 identical residues) AP sequences. We then modified our approach, and compared each AP sequence to every AP sequence in the other MAPs. This approach revealed that the first AP sequence of MAP4 was similar to the first AP sequences of τ and PTL-1, but not to that of MAP2. The three AP sequences of MAP2 were similar to the third to fifth AP sequences of MAP4, in this order (Fig. 4B). The primary structures of the second to fourth AP sequences of τ , and the second to fourth AP sequences of PTL-1, also resembled the same region of MAP4. The second AP sequence of MAP4 is quite unique: no counterparts were found in MAP2, τ , and PTL-1. MAP4 may have acquired the sequence in the course of its evolution as a ubiquitous MAP in *Mammalia*. The fifth AP sequence of PTL-1 is also unique. Since its sequence is most similar to the fourth AP sequence in the same molecule, it is possible that the AP sequence was specifically duplicated during the evolution of the nematode MAP. The similarities in the primary structures of the AP sequences of the four MAPs are much

more pronounced, as shown in the new alignment based on our findings (Fig. 4C). The inter-repeat sequences of the four MAPs also showed greater similarities in the new alignment (data not shown).

The nematode MAP, PTL-1, was originally identified as a τ -like protein, and hence it was named Protein with τ -like repeats (PTL-1). The characteristics of PTL-1, such as its primary structure, molecular mass, and localization, were considered to be similar to those of τ ²¹. However, our thorough analysis of the primary structure similarity clarified that PTL-1 is more similar to MAP4 (53% identity) than τ (48% identity), on a structural basis (Fig. 4C). As shown in Fig. 3, AP sequence-bearing proteins emerged at a rather early stage of eukaryotic development, and all of these proteins may be evolutionarily related. Considering the fact that PTL-1 is the only AP sequence-bearing protein in the organism, the closer relationship between PTL-1 and MAP4 is more reasonable, since MAP4 is a ubiquitous protein in mammalian cells and tissues, while τ is restricted to a specific type of cell.

Many questions still remain ahead of us, in our efforts to elucidate the molecular evolution of AP sequence-bearing proteins. First of all, the homology search technique adopted in the present

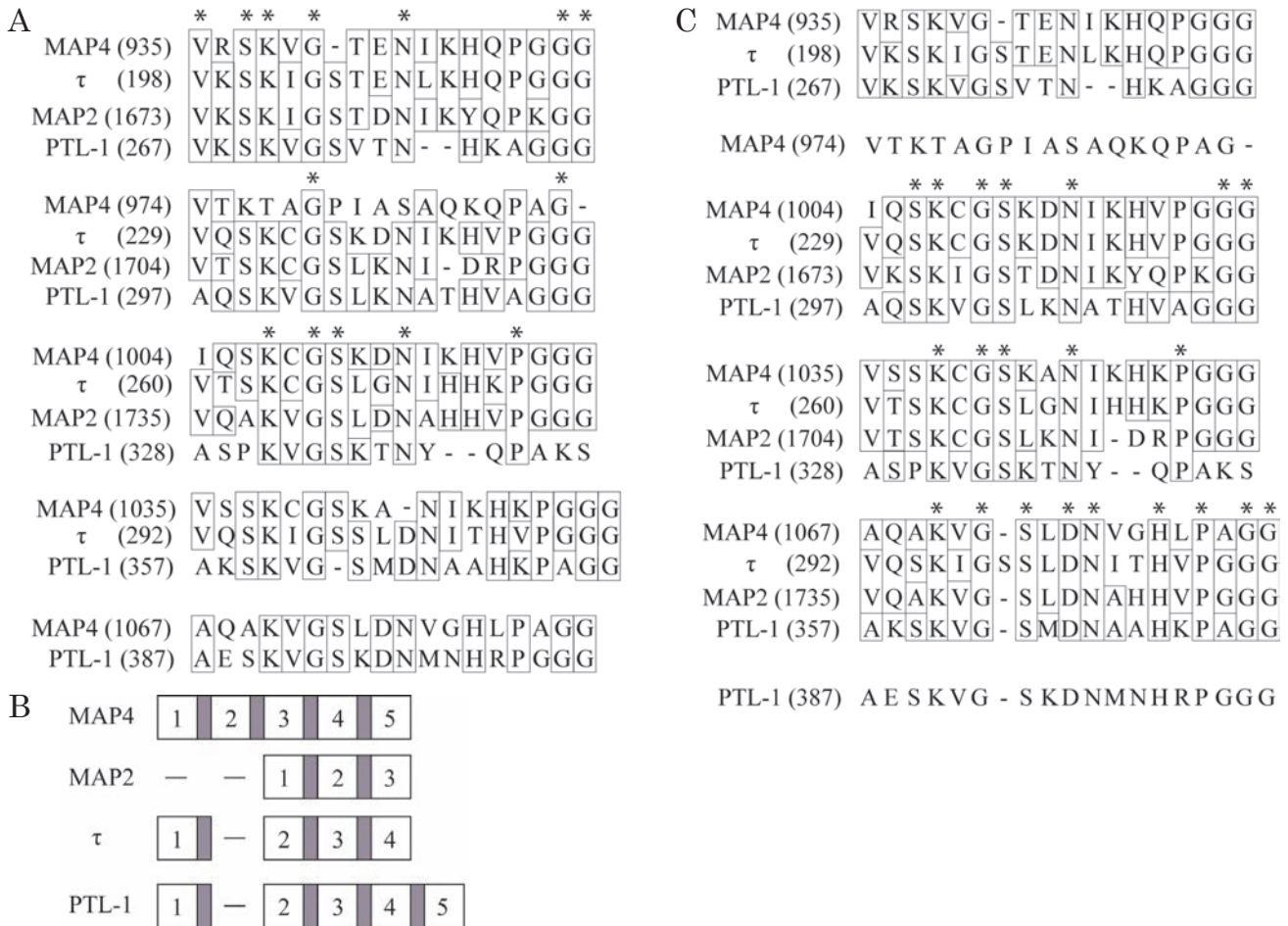


Fig. 4. Alignment of the Repeat regions of MAP2, MAP4, τ , and PTL-1. A, The four sequences are aligned, starting from the first AP sequence. Residues identical in at least two proteins are boxed, and identical residues in all four proteins are marked by asterisks. B, Schematic representation of the new alignment rule. The four sequences are aligned so that the most similar AP sequences are vertically lined up. The AP sequences are depicted as white boxes. The gray boxes are inter-repeat sequences. AP sequences are numbered from the N-terminus. The horizontal lines indicate the absence of homologous sequences. C, Alignment of the four MAP sequences based on the rule in b. Residues identical in at least 2 proteins are boxed, and identical residues in all four proteins are marked by asterisks.

study should be pursued further. We should also investigate the biochemical characteristics of the proteins, as well as their tertiary structures from an evolutionary viewpoint. By addressing these issues, we seek to clarify the phylogeny of AP sequence-bearing proteins, and the evolution of microtubule regulating systems in eukaryotic cells in the future.

References

- 1) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P (2007) *Molecular Biology of The Cell 5th edn.* Garland Science, New York.
- 2) Belmont LD and Mitchison TJ (1996) Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* 84(4):623-631.
- 3) Vale RD, Reese TS and Sheetz MP (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.
- 4) Gibbons IR (1966) Studies on the adenosine triphosphatase activity of 14 S and 30 S dynein from cilia of Tetrahymena. *J. Biol. Chem.* 241:5590-5596.
- 5) McNally FJ, and Vale RD (1993) Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75:419-429.
- 6) Roll-Mecak A, and Vale RD. (2008) Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* 451(7176):363-367.
- 7) 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.
- 8) Murphy DB, Vallee RB and Borisy GG (1977) Identity and polymerization-stimulatory activity of the nontubulin proteins associated with microtubules. *Biochemistry* 16:2598-2605.

- 9) Aizawa H, Murofushi H, Kotani S, Hisanaga S, Hirokawa N and Sakai H. (1987) Limited chymotryptic digestion of bovine adrenal 190,000-Mr microtubule-associated protein and preparation of a 27,000-Mr fragment which stimulates microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **262**:3782-3787.
- 10) Lewis SA, Ivanov IE, Lee GH and Cowan NJ (1989) Organization of microtubules in dendrites and axons is determined by a short hydrophobic zipper in microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Nature* **342**:498-505.
- 11) Tokuraku K, Katsuki N and Kotani S (2002) Structural and functional analysis of microtubule-associated protein 4. *Recent Res. Devel. Biochem.* **3**:315-333.
- 12) 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.
- 13) Joly JC, Flynn G and Purich DL (1989) The microtubule-binding fragment of microtubule-associated protein-2: location of the protease-accessible site and identification of an assembly-promoting peptide. *J. Cell Biol.* **109**:2289-2294.
- 14) Ennulat DJ, Liem RK, Hashim GA and Shelanski ML (1989) Two separate 18-amino acid domains of tau promote the polymerization of tubulin. *J. Biol. Chem.* **264**:5327-5330.
- 15) Aizawa H, Kawasaki H, Murofushi H, Kotani S, Suzuki K and Sakai H (1989) A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* **264**:5885-5890.
- 16) Tokuraku K, Matsushima K, Nakagawa H and Kotani S (2011) Microtubule-associated protein 4. Structural and Functional Features. In: *Cytoskeleton of the Nervous System*. Nixon RA and Yuan A, eds., Springer, New York, USA. pp.151-166.
- 17) Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- 18) Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.
- 19) Amos LA and Schlieper D (2005) Microtubules and MAPs. *Adv. Protein Chem.* **71**:257-298.
- 20) Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB (2011) *Campbell Biology 9th edn*. Benjamin Cummings, Boston.

■ Full-length Paper ■ By a grant from Reserch Institute for Integrated Science, kanagawa University

Silicide Synthesis by Fe⁺ Implantation in Si Substrates

Yasushi Hoshino^{1,3}, Gosuke Yachida¹, Tomoaki Yoneda² and Jyoji Nakata¹

¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Electrics and Electronics, National Institute of Technology, Fukui College, Geshicho, Sabaie, Fukui 916-8507, Japan

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

Abstract: We performed Fe ion implantation in Si(001) substrates at room temperature with fluences of 1×10^{16} , 2×10^{16} , 5×10^{16} , and 1×10^{17} cm⁻² followed by annealing treatments at 900, 950 and 1000°C for 1 h, aiming at the characterization and optimization of the process to synthesize β -FeSi₂. The elemental depth profiles and reaction products were quantitatively investigated by Rutherford backscattering (RBS) and Raman spectroscopy. It was clarified by RBS analysis of as-implanted samples that the implanted Fe atoms are mostly located around the depth predicted by Monte Carlo simulation. We could not observe β -FeSi₂-derived components in the Raman spectra. After annealed at 900°C, Fe silicide compounds are segregated on the surface. The elemental composition depends on ion fluences and the atomic concentration of Fe for the highest-dosed sample with 1×10^{17} cm⁻² is found to reach $\sim 25\%$. Strong Raman peaks corresponding to β -FeSi₂ are observed in all prepared samples. The depth profile of Fe is markedly changed for the samples postannealed above 950°C. Raman signals become much weaker with increasing ion fluences and postannealing temperatures. Under the present experimental conditions, using Raman analysis low-dose implantation around 2×10^{16} cm⁻² followed by annealing at low temperatures was suggested to be effective for the synthesis of β -FeSi₂ crystals.

Keywords: ion implantation, iron silicide, semiconductor, light-emitting devices

Introduction

As miniaturization and high integration of electronic devices are progressing, delay of electronic signals in wiring metals cannot be negligible, causing that the performance is gradually deviated from the “scaling law”. One of the methods to overcome the issue is to replace a means of communication from electron to light. If high-performance light-emitting devices are fabricated on integrated circuits (IC), the problem could be significantly solved and then the opto-electronic IC should be realized. So far, many researchers made great efforts for fabricating optical devices directly on a Si substrate¹⁾. In the process, however, harmful and rare elements are usually necessary. At present, enough emission has not been realized yet.

It is recently expected that β -FeSi₂ is one of the candidates for realizing new opto-electronic devices.

It is well known that β -FeSi₂ has semiconducting properties with a bandgap of ~ 0.85 eV¹⁾. A particular structure of β -FeSi₂ shows a direct optical transition at 1.5 μ m band, which is expected to be light-emitting devices for glass fiber^{2,3)}. Indeed, the composition elements of Si and Fe exist a lot in the earth and can be safely treated; therefore β -FeSi₂ is called as environmental semiconductor. In spite of a lot of works, the optimum condition to form single crystalline β -FeSi₂ with low defect densities, which is thought to be necessary for realizing high-quality light emitting devices, has not been found yet. In order to realize reliable devices, we have to understand the physical and chemical properties of Fe-silicides. Although there are a lot of reports so far, it is not clearly understood that the formation process of Fe-silicides depending on

various parameters of implantation temperature, fluence, and postannealing temperature.

In the present work, we aim at formation of high-quality β -FeSi₂ crystals grown by Fe implantation in the Si substrate followed by thermal annealing and ion beam irradiation. The elemental depth profiles of Fe-silicide were quantitatively analyzed by Rutherford backscattering spectroscopy (RBS). The stoichiometry and crystal type of products are determined by micro Raman spectroscopy (MRS) analysis. In this paper, we show the results and discuss the optimum condition to obtain effectively β -FeSi₂ crystals in a silicon substrate.

Methods

We performed Fe⁺ ion implantation at an energy of 50 keV in Si(001) substrates at room temperature (RT). The ion-fluences were 1×10^{16} , 2×10^{16} , 5×10^{16} , and 1×10^{17} ions/cm². Some of the samples were postannealed at 900, 950 and 1000°C for 1 h. The details of the condition are summarized in table 1.

Table 1. Implantation condition

Incident ion	Fe ⁺
Energy	50 keV
Substrate temp.	Room Temp.
Ion fluence ($\times 10^{16}$ ions/cm ²)	1.0, 2.0, 5.0, 10.0

It is well known that depth profiles of ions implanted in materials are readily calculated by Monte Carlo simulation based on binary collision approximation. The simulation code called as TRIM (Trajectory and Ranges of Ions in Matter) now prevails all over the world by Ziegler *et al.*⁴⁾

Figure 1 shows calculated depth-distributions of Fe ions introduced in Si at an incident energy of 50 keV. Surface sputtering effect by ion-bombardment is taken into account for this profile. As a result, the Fe concentration is slightly raised near the surface region as increasing ion-fluence.

Here, the atomic density of β -FeSi₂ crystal is known as 4×10^{22} atoms/cm³. The Fe concentration in FeSi₂ compound therefore should be 1.3×10^{22} atoms/cm³. The stoichiometric FeSi₂ can be obtained by Fe-implantation at fluence of between 5×10^{16} and 1×10^{17} ions/cm² as shown in Fig.1. The depth giving the maximum concentration is estimated to be 30-40

nm. Here, it must be noted that dynamical effects of thermal diffusion and aggregation processes are not considered in the TRIM simulation; therefore it is necessary to optimize the condition to form iron silicides for various conditions of ion implantation and postannealing.

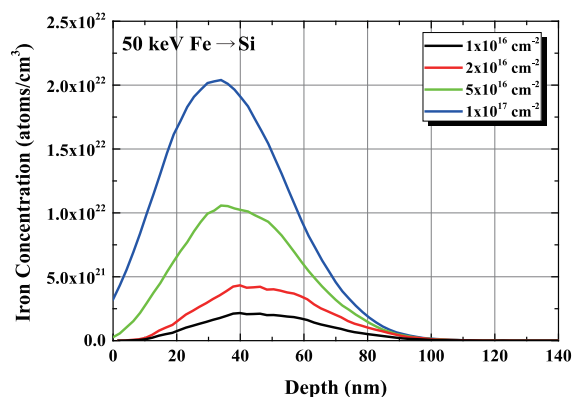


Fig. 1. Depth profiles of Fe concentration implanted in Si estimated by TRIM simulation.

The elemental depth profiles of Fe and Si concentrations were quantitatively analyzed by RBS. In the RBS measurement, Li²⁺ ions at an energy of 1988 keV were incident on the specimen with respect to surface normal and scattered Li particles were collected by two Si-surface-barrier detectors set at the scattering angles of 160° and 100°. For the high-resolution depth profiling, we mainly use the spectrum measured in the grazing angle condition.

The existence of β -FeSi₂ was confirmed by MRS excited by LASER with a wave length of 532 nm. It has been previously reported that typical Raman signals of β -FeSi₂ are observed at Raman shifts of around 190 and 250 cm⁻¹. These components are assigned to be Ag phonon mode of β -FeSi₂⁵⁾.

Results

RBS analysis

Figure 2 shows RBS spectra measured by 1988 keV Li²⁺ incidence for the Fe-implanted Si(001) substrates prepared at various ion-fluences of (a) 1×10^{16} cm⁻², (b) 2×10^{16} cm⁻², (c) 5×10^{16} cm⁻² and (d) 1×10^{17} cm⁻². Black, red, green and blue dots correspond to the spectra recorded for the samples as-implanted and postannealed at 900, 950 and 1000°C, respectively. We show depth profiles of the elemental composition of Fe obtained by analyzing the RBS spectra using computer

simulation code in Fig. 2^{6,7,8}). Implanted Fe ions for as-implanted sample at ion fluences of 1×10^{16} , $2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ and $5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ are distributed around the depth expected in the TRIM simulation (shown by black curves in Fig. 1). On the other hand, Fe component for the $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ dosed sample appears at the surface position. It is responsible for surface sputtering of Si during the high-dosed ion irradiation.

After postannealed at 900°C (red curves), some of the implanted Fe atoms are found on the surface, indicating that surface segregation occurred significantly. The elemental composition of Fe-embedded layers strongly depends on ion-fluences; the atomic fraction of Fe for the $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$ -dosed sample reaches to $\sim 25\%$.

Postannealing above 950°C dramatically changes the elemental depth profiles as shown with green and blue dots in Fig. 2. The shift of surface position of Fe should be due to surface oxidation by residual oxygen-containing species such as water vapor, carbon oxides and oxygen molecule in the furnace. It should be interestingly noted that any Fe atoms are located in the silicon oxide layer. Here, Fe has segregation coefficient value of $k = 1 \times 10^{-7}$ at 1000°C , where $k = N_{\text{Si}} / N_{\text{SiO}_2}$; therefore Fe atom exhibits a strong tendency to preferentially segregate to the SiO_2/Si interface. That seemingly impedes the diffusion of Fe from SiO_2 into the Si bulk^{9,10,11}). The fact is indeed contradictory to our experimental result.

The atomic fraction of Fe is found to be considerably decreased to $\sim 10\%$ for the highest-dosed specimen. The depth profile is also diffused in deeper layers. The diffusion rate for the highly dosed samples seems to be faster. The reason is now under consideration.

Raman analysis

Figure 4 shows Raman spectra observed for the as-implanted sample at ion-fluence of $5 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ typically. Each spectrum was measured at five different positions on the sample.

We cannot clearly confirm the signals derived from β - FeSi_2 and Si, indicating that the crystallinity disappears due to high-dose ion irradiation. Other samples with different ion-fluences also showed similar tendency.

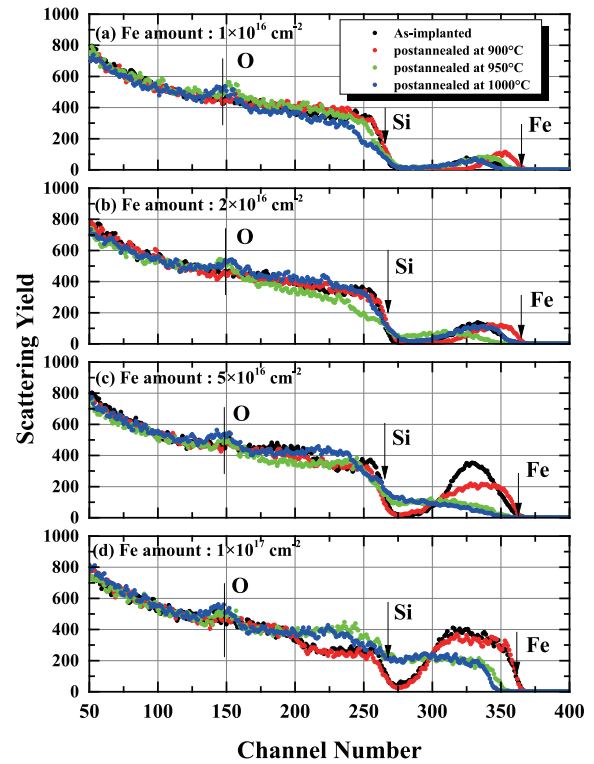


Fig. 2. RBS spectra observed for Fe-implanted Si by 1988 keV Li^{2+} incidence for Fe-implanted Si(001) substrates prepared under various ion-fluences of (a) 1×10^{16} , (b) 2×10^{16} , (c) 5×10^{16} , and (d) $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-2}$.

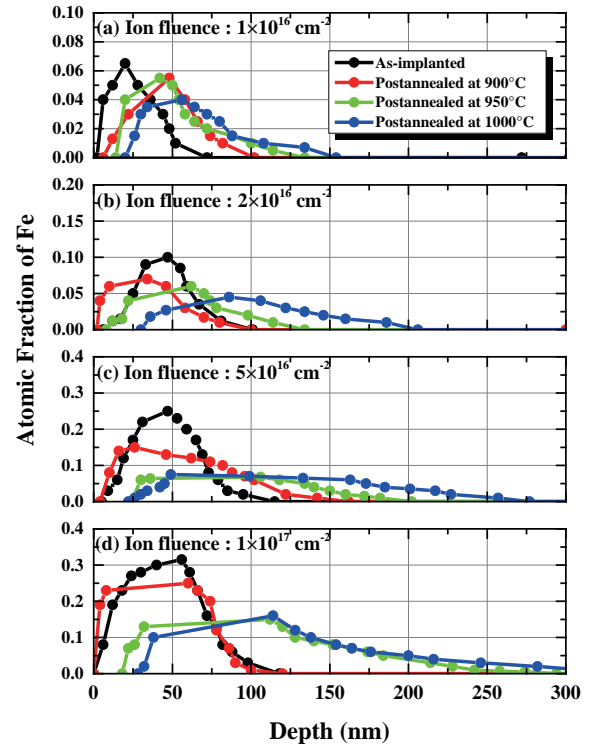


Fig. 3. Elemental depth profiles of Fe obtained by best-fitting the spectra shown in Fig. 2.

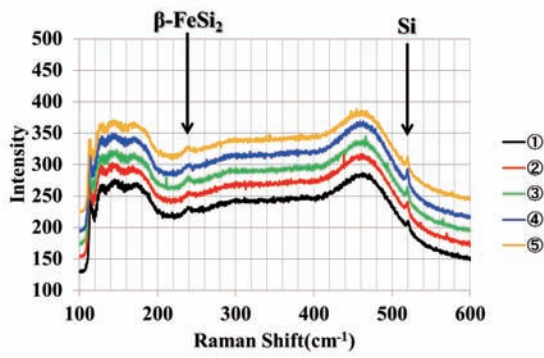


Fig. 4. Raman spectra recorded for the as-implanted

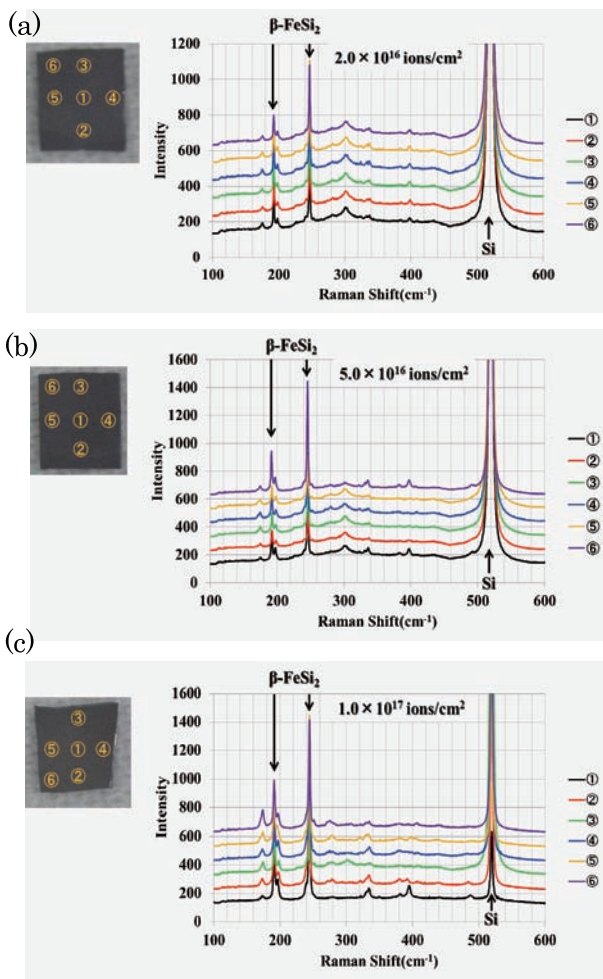


Figure 5. Raman spectra recorded for the samples postannealed at 900°C with different ion-fluences of (a) 2×10^{16} , (b) 5×10^{16} cm^{-2} and (c) 1×10^{17} cm^{-2} .

Figure 5 shows Raman spectra observed for the 900°C-annealed samples depending on ion-fluences of (a) 1×10^{16} , (b) 2×10^{16} , (c) 5×10^{16} and (d) 1×10^{17} cm^{-2} . We observe strong $\beta\text{-FeSi}_2$ -derived components (around 190 and 250 cm^{-1}) at any positions

regardless of the ion fluences. The FWHM of the Raman components for the sample with 1×10^{17} dose is found to be slightly wider, indicating that the quality of $\beta\text{-FeSi}_2$ compound should be worse. The peak intensity is getting higher with respect to the ion fluence. Considerable increase of the Si component appearing at 520 cm^{-1} indicates that the crystallinity is quite recovered by high-temperature annealing.

After annealing at 950 and 1000°C shown in Figs. 6 and 7, respectively, Raman peaks corresponding to $\beta\text{-FeSi}_2$ are found to be weaker with increasing ion doses. The signals are rarely observed for the highly-dosed samples above 1×10^{17} and 5×10^{16} cm^{-2} followed by annealing at 950°C and 1000°C, respectively.

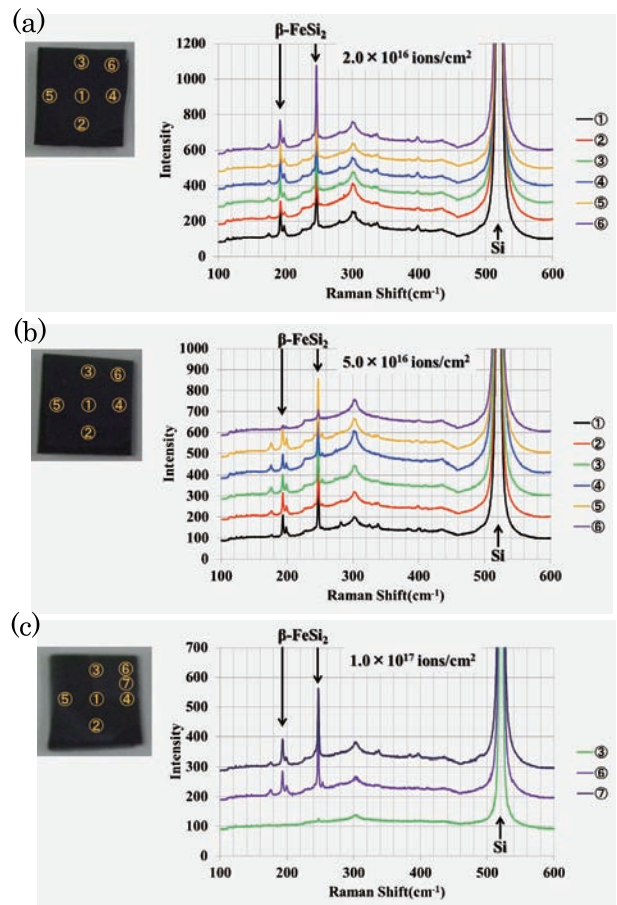


Fig. 6. Raman spectra recorded for the samples postannealed at 950°C with different ion-fluences of (a) 2×10^{16} , (b) 5×10^{16} cm^{-2} and (c) 1×10^{17} cm^{-2} .

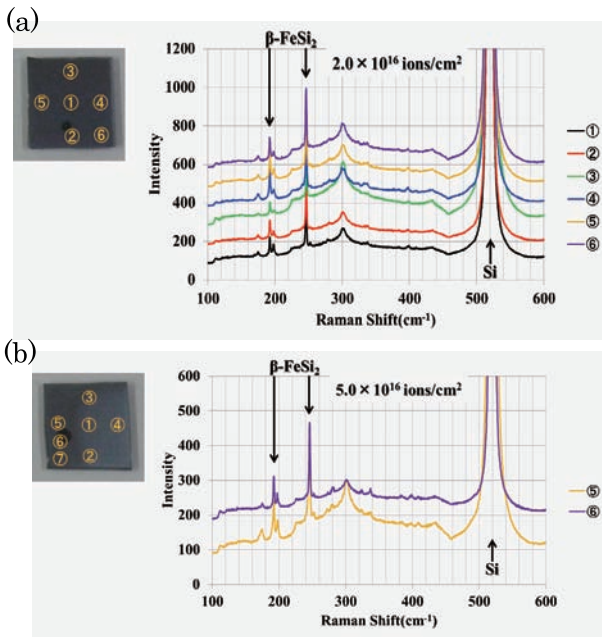


Fig. 7. Raman spectra recorded for the sample postannealed at 1000°C with different ion-fluences of (a) 2×10^{16} and (b) 5×10^{16} cm⁻².

Discussion

It is found in the Raman analysis that low dose implantation around 2×10^{16} cm⁻² followed by $\sim 900^\circ\text{C}$ annealing should be effective for synthesizing β -FeSi₂ crystal. On the other hand, the elemental depth profile of Fe embedded in Si with areal density of 2×10^{16} cm⁻² obtained by RBS analysis shows much lower than 33%, which corresponds to the atomic fraction of Fe in FeSi₂. It is indicated that the β -FeSi₂ crystal is not uniformly formed with layered structure.

According to the phase diagram of Si and Fe, β -FeSi₂ is thermodynamically stable below 937°C ¹²⁾. In addition, β -FeSi₂ is dissolved into α -FeSi₂ or Fe-rich FeSi phases above temperatures of about 950°C ¹³⁾. Omae *et al.* found that the as-implanted sample at high fluence of 4×10^{17} cm⁻² showed a layered ϵ -FeSi and β -FeSi₂ structures. Postannealing at 600°C transformed the ϵ -FeSi into the β -FeSi₂ structure¹⁴⁾. It is consistent with our result that higher dosed samples seem to form β -FeSi₂ structure by low temperatures annealing. Rajaesh *et al.* previously reported the β -FeSi₂ formation by ion beam synthesis at RT followed by annealing at 900°C ¹⁵⁾. They found that a fluence of 1×10^{16} cm⁻² was enough to form β -FeSi₂ in Si and the annealing temperature should have been 900°C

or below. They also mentioned that higher dosages increased defect concentrations and alpha phase structure.

We have clearly found high-quality β -FeSi₂ in Raman spectra even at high temperatures annealing ($\sim 1000^\circ\text{C}$) for low dosed samples. It should be noted that high-dose implantation of Fe produces a lot of defects near the surface. The induced defects could promote diffusion of Fe and structural transition from β -FeSi₂ to α -FeSi₂ even at low temperatures annealing.

Conclusions

In this paper, we clarified the relation between ion-fluence and postannealing temperatures in synthesizing the β -FeSi₂ structure. The specimen were prepared by Fe ion implantation at 50 keV energy into Si(001) substrate at various fluences of 1, 2, 5 and 10×10^{16} ions/cm² at RT, followed by annealing at 900, 950 and 1000°C for 1 h in Ar atmosphere. The depth profiles of each element and the crystal structure of products were quantitatively analyzed by RBS and MRS. According to the RBS results for as-implanted samples, Fe atoms are found around the depth expected in TRIM simulation. Raman peaks derived from β -FeSi₂ structure are not clearly observed. The implanted Fe atoms are diffused to the surface area after annealed at 900°C for 1 h. Remarkable Raman peaks are observed in all samples with different fluences. The elemental compositions of Fe after annealed at 950 and 1000°C are dramatically changed and most Fe atoms are diffused in deeper layers of the Si substrate. Raman signals for β -FeSi₂ are found to be much weaker as increasing ion fluences and postannealing temperatures. We finally conclude that low dose implantation around 2×10^{16} cm⁻² followed by annealing at low temperatures of around 900°C should be effective for forming β -FeSi₂ crystal.

Acknowledgement

The authors would like to express his thanks to Mr. Saito Y. for his help on maintenance of experimental apparatuses and many supports of experiments. We also would like to acknowledge Prof. Mizuno T. for his corporation in using Raman spectroscopy. This research was supported by a grant from

Reserch Institute for Integrated Science. Kanagawa University (RIIS201410).

References

- 1) Borisenko VE (2000) *Semiconducting Silicides*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- 2) Migas DB and Miglio L (2000) Band-gap modification of β -FeSi₂ with lattice distortions corresponding to the epitaxial relationships on Si(111). *Phys. Rev. B* **62**: 11063-11070.
- 3) Miglio L, Meregalli V and Jepsen O (1999) Strain dependent gap nature of epitaxial β -FeSi₂ in silicon by first principles calculations. *Appl. Phys. Lett.* **75**: 385-387.
- 4) Ziegler JF, Biersack JI and Littmark U (1985) *The Stopping and Ranges of Ions in Solids*. Pergamon press, New York.
- 5) Birdwell AG, Glosser R, Leong DN and Homewood KP (2001) Raman investigation of ion beam synthesized β -FeSi₂. *J. Appl. Phys.* **89**: 965-971.
- 6) Kido Y and Koshikawa T (1990) Ion scattering analysis programs for studying surface and interface structures. *J. Appl. Phys.* **67**: 187.
- 7) Saunders PA and Ziegler JF (1983) Interactive computer analysis of nuclear backscattering spectra. *Nucl. Instrum. Method* **218**: 67-74.
- 8) Doolittle LR (1985) Algorithms for the rapid simulation of Rutherford backscattering spectra. *Nucl. Instrum. Method B* **9**: 344-351.
- 9) Abe T, Itoh T, Hayamizu Y, Sunagawa K, Yokota S and Yamagashi H (1990) *Defect Control in Semiconductors*. Elsevier Science Publishers, North Holland.
- 10) Mur P, Pisch A, Chatillon C, Tarnowka T and Semeria MN (2001) Use of thermodynamical simulation to understand silicon/metal interactions and avoid metallic contamination during silicon wafer annealing. In: *Crystalline Defects and Contamination: Their Impact and Control in Device Manufacturing III. Proceedings of the Satellite Symposium to ESSDERC 2001*, pp. 282-293.
- 11) Arabagatte RD (1999) Diffusion and segregation properties of iron in silicon dioxide. *Ph. D. theses, University of South Florida*, USA.
- 12) Schlesinger ME (1990) Thermodynamics of siliid transition-metal silicides. *Chem. Rev.* **90**: 607-628.
- 13) Gao Y, Chong YT, Chow CF, Wong SP, Homewood KP and Li Q (2007) Post-annealing effect on the microstructure and photoluminescence properties of the ion beam synthesized FeSi₂ precipitates in Si. *Nucl. Instrum. Method B* **259**: 817-874.
- 14) Omae K, Bae I-T, Naito M, Ishimaru M, Hirotsu Y, Valdez JA and Sichafus KE (2006) Structural evolution in Fe ion implanted Si upon thermal annealing. *Nucl. Instrum. Method B* **250**: 300-302.
- 14) Rajesh PV, Pati SP, Krishna JBM, Ghosh B and Das D (2012) Formation of β -FeSi₂ by ion implantation of 90 keV Fe¹⁰⁺ ions on N-type silicon. *Solid State Physics* **1447**: 1051-1052.

■原 著■

計算物理学と関数型プログラミング — Java 8 新仕様の物理学への応用と並行計算の可能性 —

川東 健^{1,2}

Computational Physics and Functional Programming - Applicability of a New Specification of Java 8 to Physics and Its Potential for Concurrent Calculation -

Ken Kawahigashi^{1,2}

¹ Department of Mathematics and Physics, Kanagawa University, Hiratsuka city, Kanagawa 259-1293, Japan

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

Abstract: We report the applicability of new Java 8, with its new functional programming and lambda expression, to computational physics. Functional programming is an important issue of Java 8 with its newly added specification, and it makes it easy to write concurrent programs by all non-professional programmers, like physicists. We show the typical codes using functional programming and outline the differences from previous imperative programming. We also compare the execution time for parallel and non-parallel stream programs.

Keywords: computational physics, functional programming, concurrent programming

序論

計算物理学は物理学の諸分野の中でも物理的対象を特定しない特異な分野である。一般的には素粒子物理学、統計物理学、天体力学、量子力学、カオス・複雑系など多岐にわたる対象を、コンピューターを用いて解析やシミュレーションを行う分野であるというのが共通の認識であろう。これらの対象において共通するのは、数学的に厳密な解を得ることが難しい方程式を解いたり数値積分などの数値計算を行ったりすることと、それらに伴う大規模データを取り扱うことであろう。大規模データを扱うプログラムの大半を占めるのが“繰り返し処理”である。

多くのプログラミング言語では“if”文のような条件分岐や“for”文のような繰り返しといった制御構造を持っており、計算物理学におけるプログラム実行時間ベースでは90%以上が主に反復計算に費やされることを考えると、分散処理や並列処理を行い可能な限り処理時間を短くする高速化は必須と考えられる。分散や並列といった処理は、一般的にはハードウェアベースないしライブラリーベースで行われるが、そのプログラミングには特有の難しさがあり、各言語やライブラリーの個別にやり方が異なっ

ていることが高速化への高い壁となっているといえる。

本論文では、Java言語に新たに追加された“関数型プログラミング”を支援する新仕様を応用して、従来より容易にプログラミングの並行化を行えることを示し、実際に並行化の効果が十分得られることを報告する。

方法と結果

関数型プログラミングと Java 8

2014年4月にリリースされたJava Standard Edition 8は従来のJava言語を大きく変える可能性があるいくつかの機能を新たに実装している。その中でも特筆すべき機能は、関数型プログラミングへの対応である。Stream APIと呼ばれる一群のAPIはその核心部分であり、従来細心の注意を持って行われるべきプログラムの並行化を、安全かつ簡単に実装できる可能性を秘めている。物理学計算に含まれるいくつかの典型的なパターン（その多くは条件分岐や繰り返しなどの制御構造である）において、それらをStream APIを用いて記述し、また並列化をどのよ

うに行えば良いのかについて解説を行っていく^{1,2)}。

関数型プログラミングとは

関数型プログラミングという考え方自体は歴史的にそれほど新しいものではなく、1960年代のLISP言語が最初の関数型言語と言われている。

ここでいう「関数」という言葉について、概念をはっきりさせておこう。プログラミングにおいて「関数」という言葉は2種類の意味がある。一つは従来の命令型プログラミング（特にC言語）におけるサブルーチンの別名としての「関数」、そしてもう一つは数学的な意味での「関数」、すなわち入力に対して何らかの出力を返す写像の意味である。

関数型プログラミングでの「関数」とは後者のことであり、特に「副作用」を伴わない関数を「純粋関数」という。ここでいう「副作用」とは関数の外で定義された変数を関数内で変更したり、外部デバイスとの入出力を関数内で行うような作用である。副作用を伴わない純粋関数では外部変数は読み込み専用（不変性）であり、結果は関数内で新たに生成されたオブジェクトを介して返される。この条件を「参照透過性」と呼ぶ。関数内で不変であることは、Javaの場合、引数を定数参照（final キーワードで装飾）することで保障されるが、そうでなくても不変であることが明白であれば純粋関数とみなされる。

関数型プログラミングとは、このような純粋関数のみを用いて副作用（入出力などしかたないものは存在するが）を極力抑制していくプログラミングスタイルである。そこでは、プログラムは宣言的に記述された文（ifやforなど）より式（JavaやCでは” ;”で終わる）を積極的に使っていく。また関数を引数に取るような高階関数も多用されて簡潔な記述がなされる。この機能を実現するためにJavaでは関数をオブジェクト化するための新たなAPI群が追加された²⁾。

実例を見ていこう。コード1aはjava.util.Random乱数発生ユーティリティを使って[0, 1)の1様乱数を10000個発生させ、そのうち0.7未満の乱数の個数をカウントする従来のコードである。ここでは繰り返しのfor文や条件分岐のif文が普通に使われている。

コード1bはJavaのStream APIを使って、同じ結果をもたらすものを関数型プログラミングで記述したものである。random.doubles(10000)は乱数発生ユーティリティRandomから10000個の1様乱数をストリームとして取り出す。一般的にはコンテナに対してstream()メソッドを呼び出すことでストリームを生成できる。

次の.filter(r -> r < 0.7)はそのストリームのうち、0.7未満の乱数をフィルターして新たなストリームを生成する。

r -> r < 0.7はJava 8の新機能であるラムダ式であり、ストリーム中のフィルタリング条件を設定する関数オブジェクトに相当する。

そして、最後の.count()で0.7未満の乱数のストリームの個数を求めることができる。このコード例でわかるように、関数型プログラミングでは、基本的に条件分岐文や繰り返し処理文が使われず、宣言的な関数呼び出しのみで記述される。

コード1a

```
long count = 0;
for (int i = 0; i < 10000; i++) {
    double r = random.nextDouble();
    if (r < 0.7) {
        count++;
    }
}
```

コード1b

```
long count = random.doubles(10000)
    .filter(r -> r < 0.7)
    .count();
```

関数型プログラミングと並行化

前節で述べた関数型プログラミングは繰り返し文が含まれていない。このように宣言的に記述されたプログラムは純粋性を保った関数内部での（言い換えると外から見えない）反復のみを含むため、些細な変更のみで容易に並行化することができる。以下のコード例では、従来の命令型記述（コード2a）、関数型記述（コード2b）及び並行化された関数型記述（コード2c）を繰り返し実行し、平均所要時間を計測してみた。

このコード例ではセル・オートマトン³⁾のすべてのサイトの近傍を示すインデックスの組をリストとして作るコードである。セル・オートマトンでは格子状に並んだ格子点（サイト）がその周囲のサイト（近傍）と相互作用して、次のタイムステップにおけるサイトの状態を決定するというモデルである。コード2aと2bでは命令型と関数型の違いがあるとはいえ、基本的には逐次実行される点では同じである。コード2cが2bと異なるのは、.parallel()が挿入されているか否かである。java.util.stream.Streamクラスのparallel()は、ストリームの並行化を行うメソッドであり、この呼び出し以降の操作がすべて並行

コード2a

```
List<NeighborhoodIndices> list
= new ArrayList<>();
for (int k = 0; k < rows * columns; k++)
// インデックスkの上下左右のサイト (近傍) の
//インデックスを組にしてリストに追加
list.add(new NeighborhoodIndices(k));
}
```

コード 2b

```
List<NeighborhoodIndices> list
= IntStream.range(0, rows * columns)
    .boxed()
    .map(NeighborhoodIndices::new)
    .collect(Collectors.toList());
// ストリーム中の整数に対応する近傍サイトの
// インデックスを新たにストリームとして生成し
// さらにそのストリームを近傍サイトの
// インデックスのリストに変換
```

コード 2c

```
List<NeighborhoodIndices> list
= IntStream.range(0, rows * columns)
    .boxed()
    .parallel()
    .map(NeighborhoodIndices::new)
    .collect(Collectors.toList());
// ストリーム中の整数に対応する近傍の
// インデックスを新たに並行化ストリームとして
// 生成し、さらにそのストリームを近傍サイトの
// インデックスのリストに変換
```

化される。

実際に 1000 × 1000 の格子のノイマン近傍サイトのインデックスをすべてリストとして生成するコードを 1000 回実行し、実行時間の平均値を測定した (表 1)。測定は上記コード 2a-c の前後に `java.lang.System.currentTimeMillis()` を呼び出してその差を取ったものである。

結果は、コード 2a と 2b では大きな違いがないことから、関数型の内部ループには明らかなオーバーヘッドが存在しないことがわかる。それに対して、並行化されたコード 2c は明らかに 2 倍近く高速化されていることがわかる。

今回実験に使用した CPU は 4 コアで構成されているが、並行化によって逐次実行の 4 倍速くなっているわけではない。理由としては、繰り返し計算部

分のマルチスレッド化に伴うオーバーヘッドがそれなりあることと、Java 仮想マシン自体がすでにマルチコアを活用しており、逐次実行であってもそれなりの並行化がすでになされていることが考えられる。しかしながら、明らかに有意な高速化がなされている以上、Stream API の並行化機能を使わない理由はないのではないだろうか。

表1 実行結果

- ・非ストリーム(コード2a)
平均実行時間: 68.676 ms (1000回実行)
- ・逐次実行ストリーム (コード2b)
平均実行時間: 63.87 ms (1000回実行)
- ・並行ストリーム(コード2c)
平均実行時間: 36.973 ms (1000回実行)

表2 実行環境

機種名: MacBook Pro
 プロセッサ名: Intel Core i7
 プロセッサ速度: 2.6 GHz
 プロセッサの個数: 1
 コアの総数: 4
 二次キャッシュ (コア単位) : 256 KB
 三次キャッシュ: 6 MB
 メモリ: 16 GB

討論

今回、われわれは Java SE 8 に新たに加わった関数型プログラミング、特にその実装である Stream API が、大規模データを扱う物理計算において、その実行時間の大半を占める繰り返し計算を並行化し、明確な高速化を容易にもたらすことができることを示した。

その手法はマルチスレッドプログラミングと比較して、極めて単純かつ容易であり、十分な効果が得られることがわかる。大規模データの反復処理を行う数値計算やシミュレーションにおいて数倍の高速化は十分意義があり、今後の計算物理学におけるプログラミングの簡易化かつ高速化に恩恵をもたらすと考える。

今後の展望としては、川東が開発したセル・オートマトン用 Java フレームワーク (CAFramework[3]) への応用や計算物理学分野で汎用的な並行計算フレームワークの新たな開発を考えていきたい。CAFramework はすでに並行計算を取り入れある程

度実用的な高速化が行われているが、複雑な `java.util.concurrent` フレームワークを用いているため、可読性及び拡張性及びメンテナンス面でより容易な関数型プログラミングに切り替えることが望ましいと考える。

また Stream API は map/reduce 処理に対応しており、将来的には複数のコンピュータ群による MapReduce⁴⁾ フレームワークやその先の Google Cloud Dataflow フレームワークを応用したクラウドコンピューティングモデルへの拡張も視野に入ると思われ、計算物理学においても大規模行列計算等に備えてフレームワークを整備しておくことが望まれる。

文献

- 1) Oracle Inc. (2014) *Java(tm) Platform, Standard Edition 8 API 仕様*. <http://docs.oracle.com/javase/8/docs/api/index.html>
- 2) Subramaniam V (2014) *Functional Programming in Java*. O'Reilly, Japan.
- 3) Kawahigashi K (2010) *Java Framework for Cellular Automata "CAFramework"*, <http://github.com/kklab/CAFramework>
- 4) Dean J and Ghemawat S (2004) *MapReduce: Simplified Data Processing on Large Clusters*, Google. <http://static.googleusercontent.com/media/research.google.com/ja//archive/mapreduce-osdi04.pdf>

■原 著■

PHASE を用いた二次元 Si のバンド計算と実験比較

青木 孝^{1,2}

The comparison between PHASE band calculation and PL (photo luminescence) Measurements in two-eimensional Si layers

Takashi Aoki^{1, 2}

¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: ul7aok@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Measurements of PL (photo luminescence) in two-dimensional Si layers were simulated by first-principles calculation : PHASE. It was noted that the results of PHASE calculations was consistent with measurements of PL.

Keywords: two-dimensional Si PHASE band structure calculation Photo Luminescence

序論

励起光の 532nm レーザー (2.3eV) による二次元 Si(2D-Si) の PL(photo luminescence) 発光実験では、(100)Si、(110)Si とともに Bulk-Si 構造では PL 発光しないが、(100)Si のみ 1nm 程度以下に薄膜化すると PL 発光することが検証されている¹⁾。このとき 2D-Si は、SOI 基板を熱酸化することにより薄膜化して実現する。ここで、Si 膜厚を T_{Si} (nm) として、(100)Si では a_0 を 0.543nm、(110)Si では a_0 を $0.543 \times \sqrt{2}$ nm として、Si 層の数: N_L を次式で定義して、 $N_L=4$ は、NL4 等と表記する。

$$(0.1) \quad N_L = \frac{T_{Si}}{\frac{a_0}{4}} + 1$$

この N_L を使い、Table 1 に、(100)Si 薄膜における PL 発光実験で測定した、ピークフォトンエネルギー: E_P を示す¹⁾。

Table 1. (100)Si peak photon energy: E_P for T_{Si}

T_{Si} (nm)	0.3	0.5	0.8	1.0
E_P (eV)	1.775	1.73	1.65	1.60
N_L	2.8	4.7	6.9	8.4

Table 1 の発光ピークフォトンエネルギー: E_P は、バンドギャップを表わし、発光したことにより、

(100)Si においてのみ、薄膜化によって 3D-Si の間接遷移型から直接遷移型のバンド構造に変調したと考えられる。さらに、PL 発光実験から、膜厚 T_{Si} が 0.5nm の (100)Si 薄膜の表面に付いた、120nm 程度の熱酸化による SiO_2 を除去した後の PL 発光ピークフォトンエネルギー: E_P は、1.73eV から 1.9eV に増加することが分かった。その後、自然酸化膜の 10nm 程度が付いた後には、PL 発光ピークフォトンエネルギーが 1.8eV となり 5% 下がることも分かった。この結果は、表面酸化膜によって、Si 薄膜に熱応力が生じバンド構造が変調し、バンドギャップが 8% 程度小さくなったためと考えられる。Table 2 には、表面酸化膜の膜厚を T_{SiO_2} として、PL 発光実験結果をまとめた。

Table 2. (100)Si E_P for T_{SiO_2} at $T_{Si}=0.5$ nm

T_{SiO_2} (nm)	120	10	0
E_P (eV)	1.73	1.8	1.9

文献²⁾によれば、 $N_L=5$ (NL5)、 $T_{Si}=0.54$ nm の (100)Si 薄膜を、真空層を介した周期スラブモデルにより実現し、その際の終端方法について、H 終端、 β -cristobalite SiO_2 +H 終端、 α -quartz SiO_2 +H 終端の 3 種類に変えた場合の、第一原理バンド構造計

算結果の違いを論じており、H 終端よりも、現実の SOI 基板に近い SiO_2 を介した H 終端の方がバンドギャップ： E_P が下がることを示す。

本報告は、面方位 (100),(110)2D-Si 薄膜の、膜厚によるバンド構造の変調において、PHASE による第一原理バンド構造計算結果と PL 発光実験の測定結果が、定性的に一致することを確認したので報告する。その PHASE 計算の際、真空層を作るための表面 Si と単純な H 終端との間に、酸素原子 O を 1 つ介す、簡易な OH 終端モデルでも、その効果でバンドギャップ： E_P が下がり、定量的にも PL 発光実験と近づく結果になることを確認した。

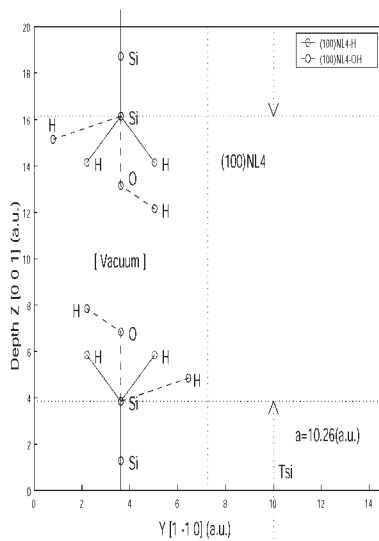


Fig.1. Primitive unit of (100)NL4 Slab model.

実際の Si 薄膜は、 SiO_2 酸化膜 (BOX) の上に、Si 薄膜層を形成し、その上に熱酸化による表面酸化膜が付く構造になる。PHASE において作成した、O 原子を介す薄膜 Si の (100)NL4(:Si 原子は 4 層) の簡易なモデルを、Fig.1 に示す。通常の 2 つの H 終端に対して、破線のように、片側は H, もう片側は OH 終端として初期配置する。Fig.1 では、縦軸の薄膜方向 Z 軸は $[0 0 1]$ 方向、横軸は $[1 -1 0]$ 方向としてある。座標軸の単位は、(a.u.) で示し、Si 原子の格子定数 a は $10.26a.u.$ とした。Fig.1 のように薄膜を模した、真空層を介した周期スラブモデルでは、膜厚 Z 方向の基本格子長を、格子定数 a (例えば $10.26a.u.$) より大きく $20a.u.$ 等に設定し、終端を H 等で切り、真空層を作る。膜厚 Z 方向の原点から正負に伸びた Si 層の幅が膜厚 T_{Si} となる。この真空層に対面した両側の終端の仕方が、2D-Si 薄膜のバンド構造計算結果に影響を与える。このとき真空層の両対面を H 終端 (2H) したものを H 終端モデル、同じく両対面を OH 終端 (H と OH) したものを 2OH

終端モデル、また片側を H 終端、もう片側を OH 終端したものを 1OH 終端モデルと呼ぶことにする。

一方、真空層に面する終端に O 原子を介す薄膜 Si の (110)NL2(:Si 原子は 2 層) は、Fig.2 の破線のように、通常の H 終端に対して、OH 終端として初期配置する。Fig.2 では、縦軸の薄膜方向 Z 軸は $[1 1 0]$ 方向、横軸の Y 軸は $[1 -1 0]$ 方向としてあり、Z 軸の両端に真空層がくるように表示した。Fig.1 の (100)Si の薄膜方向 Z 軸 $[0 0 1]$ は、(110)Si の X 軸 $[0 0 1]$ と対応する。

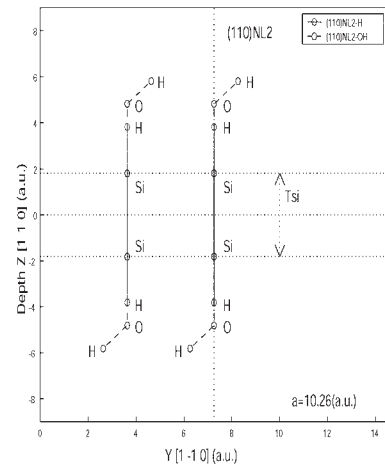


Fig.2. Primitive unit of (110)NL2 Slab model.

方法

(100) 基本格子の折り返しの解析

ブラベ格子として、Bulk-Si を PHASE 等でバンド計算すれば、理論と同一のバンド構造を得る。しかし、その後の薄膜計算のために、unit cell を基本格子として、例えば (100)NL4-Bulk-Si モデル ((100)NL4 の周期モデル) でバンド計算すると、Si 原子の重なりが冗長性を生み、基本逆格子上的点に、ブラベ逆格子上的複数の点が縮退して、折り返しという、バンド構造に見かけ上の余計な (物理的に無意味な) バンドが現れる。この折り返しは、第一原理バンド計算の一般的な問題点である。そして、この見かけのバンドは、薄膜化しても残った上で、さらにバンド構造に薄膜化の影響が加わる。したがって、薄膜のバンド構造を調べる場合には、その所望の膜厚に対応する、多層の冗長性を持った Bulk-Si における、折り返しによる見かけのバンド構造の出方を予め解析しておき、その知見により、実際の薄膜時において、真のバンド構造を見極める必要がある。

Fig.3 は、横軸に波数 k を取り、(100)NL4-Bulk-Si の Γ 点から X 点へのバンド図が示してある。価電子帯の一番高いエネルギーを 0 とし、伝導帯だけ

示す。縦軸のエネルギー値 (eV) は、バンドギャップを表わすことになる。(100)NL4-Bulk-Si は、Fig.1 の H(あるいは OH) 終端を取り除き、PHASE で周期解として計算したものである。Fig.3 には、Z 方向 (その後の薄膜方向) の Si 原子の冗長性から起こる折り返しのための見かけのバンド (破線) が現れ、正しい Γ 点バンド下に、見かけの無意味な Γ 点バンドギャップが現れてしまう。正しい Γ 点バンドギャップが隠れるので、これを見極める必要がある。

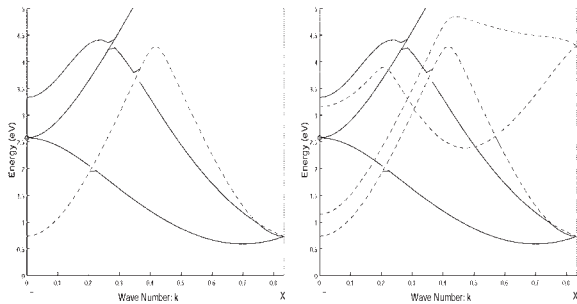


Fig.3. (100)NL4-Bulk-Si. Fig.4. (100)NL8-Bulk-Si.

また、その後の薄膜 (100)NL8 の解析のために、あえて多層化して冗長な (100)NL8-Bulk-Si を作り、PHASE で計算したバンド図を Fig.4 に示す。(100)NL8-Bulk-Si は、(100)NL4-Bulk-Si を膜厚 Z 方向に 2 つ重ね、基本格子に Si:8 層にした周期モデルとして作る。 Γ 点に、Fig.3 にもある本来の X 点のバンドが薄膜 Z 方向に折り返した見かけのバンドに加え、その見かけのバンドと正しい Γ 点との間に、Z 方向のさらなる多層化による冗長な見かけのバンドが、さらに 1 本加わることが分かる (Fig.4 の破線)。

同様に、あえて (100)Bulk-Si モデルを、Si 原子 4 層ずつ多層化していくと、1 層を多層化するごとに、正しい Γ 点の下に、1 本ずつ見かけのバンドが増え、正しい Γ 点を隠すという知見を得る。この (100)Bulk-Si における、薄膜 Z 方向の折り返しによる見かけのバンドは、薄膜化しても対応する膜厚で同様に現れる。

Table 3. Comparison of band gap (Γ, X) for experiments and PHASE

	3D-Si	PHASE (100)NL4-Bulk
Γ (eV)	3.4	2.6
X (eV)	1.1	0.7

これら見かけのバンドを考慮した、(100)NL4-Bulk-Si における Γ 点および X 点のバンドギャップの PHASE 計算結果は、3D-Si の実験結果と Table 3 のように異なり、計算値が 3 割程度小さくなる。これ

は第一原理計算の一般的な問題点である。したがって、薄膜化した 2D-Si の PL 発光実験 (ピークフォトンエネルギー) と、PHASE バンド計算結果 (バンドギャップ) を比較する場合には、次式のように、各 Γ 点からの変化量を使う。

$$(0.2) \text{ [PL 発光ピークフォトンエネルギー]} - 1.1(\text{eV})$$

$$(0.3) \text{ [PHASE バンドギャップ計算値]} - 0.7(\text{eV})$$

(110)NL2-Bulk-Si における、 Γ 点および X 点バンドギャップの PHASE 計算値も、(100)NL4-Bulk-Si と同値である。

(110) 基本格子の折り返しの解析

一方、(110)Si では、 $\Gamma - X$ 間のバンド図は、(110)NL2-Bulk-Si においては Fig.5 となり、多層化した (110)NL4-Bulk-Si においては Fig.6 となる。

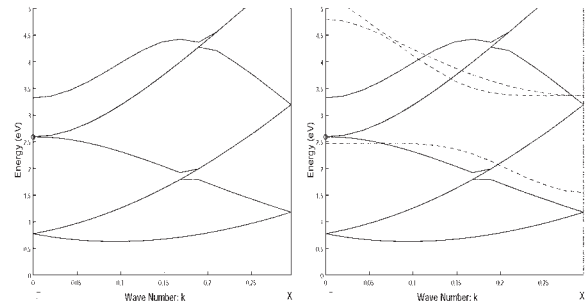


Fig.5. (110)NL2-Bulk-Si. Fig.6. (110)NL4-Bulk-Si.

(110)Si では、膜厚方向 $[1\ 1\ 0]$ を Z 軸として、X 方向 $[0\ 0\ 1]$ に Si 原子が重なるので、X 方向に冗長性による折り返しがでる。(100)Si の Fig.3 を横軸: $\Gamma - X$ 間の半分の所で折り返した図となる。薄膜 Z 方向には、Si 原子の冗長性はないので、Z 方向の折り返し (Fig.3 の破線) はない。正しい Γ 点の下に、X 方向に折り返された X 点に由来する見かけのバンドギャップが現れる。その後の薄膜 Z 方向にさらに多層化した、(110)NL4-Bulk-Si (Fig.6) には、薄膜 Z 方向の折り返しも出るが (Fig.6 の破線)、 Γ 点上の正しい Γ 点と折り返しによる見かけの X 点の間に、正しい Γ 点を見誤る、(100)Si の場合のような問題となる見かけのバンドは現れない。このような Bulk-Si での折り返し (見かけのバンド) の知見を参考に、薄膜化した 2D-Si の正しい Γ 点および X 点のバンドギャップを見極める。

結果と討論

(100) 薄膜 2D-Si

(100)NL4 薄膜の PHASE による、 Γ 点 - X 点のバンド計算結果を Fig.7 に示す。このバンド図には、薄膜 Z 方向の折り返しは現れないことが、分かっている。したがって、 Γ 点 2.07(eV)、X 点 2.53(eV) となり、直接遷移型のバンド図となる。

Fig.8 は、(100)NL20 の Fig.7 同様のバンド図である。この図に、Fig.3 : (100)NL4-Bulk-Si のバンド図を赤 o 点で重ねて示してある。(100)NL20 とともに、Bulk バンドに近づくが、(100)NL8-Bulk-Si の Fig.4 のように、正しい Γ 点の下に、薄膜 Z 方向に折り返された X 点に由来する見かけのバンドが現れ、NL20 の場合には 7 本に増える。

Fig.9 は、これらの知見を使い、NL2 から NL20 (膜厚 $T_{Si} = 2.58\text{nm}$) までの、PHASE による H 終端モデルにおけるバンド計算の結果から、 Γ 点と X 点のバンドギャップを見極め、その膜厚依存をグラフ化したものである。H 終端モデルの PHASE の計算では、NL7 以上では間接遷移だったバンド構造が、NL7 より薄膜では直接遷移のバンド構造に変化することが判明した。これは、膜厚 1nm 以下で PL 発光する実験結果と合致している。

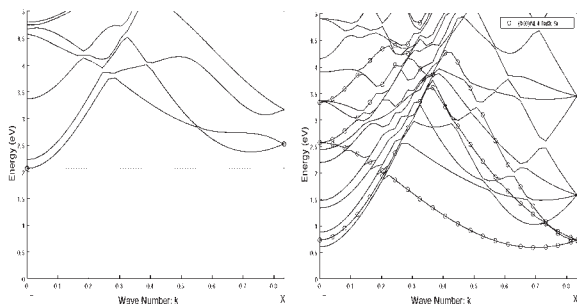


Fig.7. (100)NL4-Si.

Fig.8. (100)NL20-Si.

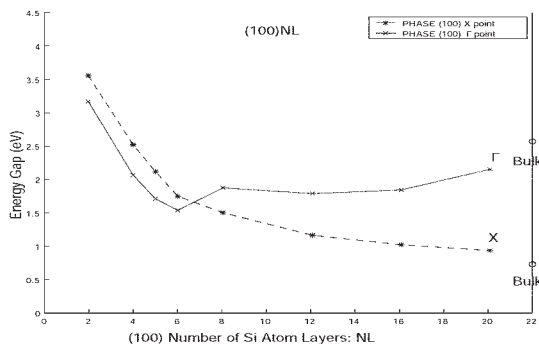


Fig.9. Dependence of band gap for (100)NL.

(110) 薄膜 2D-Si

Fig.10 は、(110)2D-Si においても、NL2 から NL20 (膜厚 $T_{Si} = 3.65\text{nm}$) までの、PHASE による H 終端モデルにおけるバンド計算の結果から、 Γ 点と X 点のバンドギャップを見極め、その膜厚依存をグラフ化したものである。(110)2D-Si では、(100)2D-Si と異なり、膜厚が変化しても間接遷移のバンド構造のままであることが判明した。また、両端を OH 終端した 2OH 終端モデルでバンド計算すると、NL4 より薄膜においてバンドギャップは変化するが、間接遷移のバンド構造は変わらない。

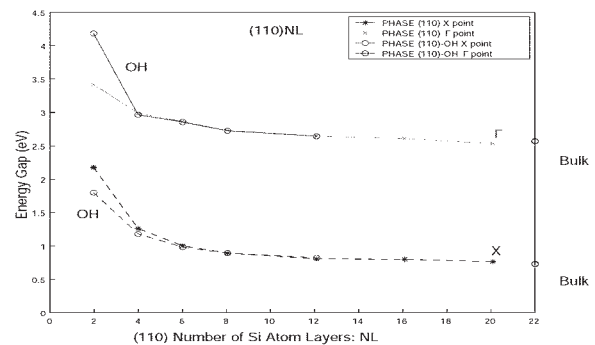


Fig.10. Dependence of band gap for (110)NL.

計算と実験値の比較および OH 終端の効果

PHASE 計算値と実験値にバンド値の差があるために、前述の式 (0.2)(0.3) のように、それぞれの X 点のバンドギャップからの変動で比較する。(100)2D-Si において、PHASE 計算値は、Fig.9 の X 点と Γ 点の小さい方のバンドギャップを使う。

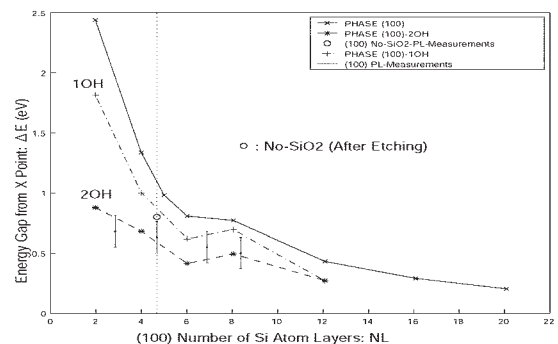


Fig.11. Depend of delta band gap for (100)NL.

Fig.11 において、実線は PHASE の H 終端モデルの結果である。赤点の誤差棒は、表面に 100(nm) 程度の SiO_2 酸化膜をもつ、PL 発光実験値を示す。H 終端モデルは、NL < 4 で実験値と差が広がるが、両端を OH 終端にした 2OH モデル (破線) にすると、バンドギャップが下がり、 SiO_2 表面をもつ実験値と合致してくる。

また、Fig.11 において、膜厚 0.5nm の 2D-Si をエッチングして表面の SiO_2 を除いた試料の PL 発光エネルギーを、○印で示してある。この実験値(○印)は、片側だけを OH 終端にした 1OH モデルの計算値に近づく。これらのことは、表面酸化膜によって、Si 薄膜にストレスが生じバンド変調が起こり、バンドギャップが小さくなることを示すと同時に、PHASE による簡易的な OH 終端モデルが、定性的に実験値と良く合致する計算値を出力することを示す。

(100)NL4 において、Fig.7 の Γ 点 - X 点間のバンド構造が、1OH と 2OH 終端モデルにおいてどう変化するかを、それぞれ Fig.12(1OH), Fig.13(2OH) に示す。PHASE の周期スラブモデルにおいて、2OH と 1OH モデルでは、終端の違いによって、真空層の両端 (Si 層の界面) の相互作用が変わる。OH 終端では、Fig.12, Fig.13 のように、Si 原子 (H 終端) のバンドの下に、O 原子によるバンド (赤の破線) が、追加される。2OH モデルの方が、1OH モデルよりバンドギャップは小さくなる。

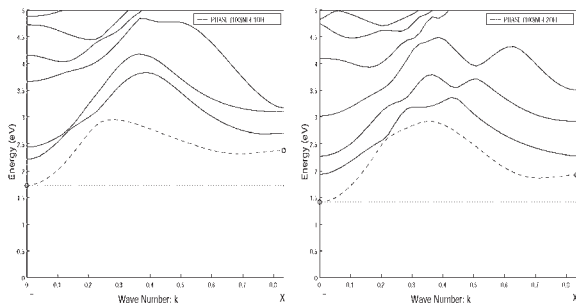


Fig.12. (100)NL4-1OH. Fig.13. (100)NL4-2OH.

まとめ

(100)2D-Si において、膜厚 1nm 以下で PL 発光する実験結果と、H 終端モデルの PHASE バンド計算結果は、定性的に合致していることが判明した。(110)2D-Si では、膜厚 1nm 以下に薄膜にしても、発光しないバンド構造のままであることも計算で合致した。

さらに、膜厚 T_{Si} 0.5nm の試料において、表面酸化膜 SiO_2 を取り除いた 2D-Si の PL 発光エネルギーが、熱応力ストレスが除去されるために 8% 程度大きくなることが分かった。この実験結果は、H 終端の片側を OH 終端にした、すなわち周期スラブモデルの真空層を H 終端と OH 終端で構成する、簡易な 1OH モデルでも、良く合う計算結果を再現することができた。

もとの表面酸化膜 SiO_2 を有する薄膜における PL 発光実験の結果においては、両側を OH 終端にした簡易な 2OH モデルにより、良く合う計算結果を再現できた。

また、(110)2D-Si では、H 終端や OH 終端のモデルの違いによるバンド計算値の差は小さいことも分かった。(100)2D-Si においても、NL12 程度の膜厚になれば、終端の影響は少なくなり、H 終端や OH 終端のモデルの違いによるバンド計算値の差は小さくなる。

謝辞

本研究は、水野智久教授 (神奈川大学) のご指導の元で行っています。星野靖特別助教 (神奈川大学) には、第一原理計算等について貴重なご意見をいただきました。ここに感謝いたします。

文献

- 1) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on surface-orientation/ Strain dependence of phonon confinement effects and band structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **52** (04CC13): 1-8.
- 2) Tsuchiya H, Ando H, Sawamoto S, Maegawa T, Hara T, Yao H and Ogawa M (2010) Comparisons of performance potentials of silicon nanowire and graphene nanoribbon MOSFETs considering first-principles band structure effects. *IEEE Trans. on Electron Devices.* **57**: 406-414.
- 3) 山本武範, 濱田智之, 山崎隆弘, 岡本政邦, 大野隆央, 宇田毅 (2004) *第一原理シミュレータ入門*. アドバンスソフト, 東京.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

若い中質量星周りの原始惑星系円盤の中間赤外撮像

本田充彦^{1,2,14} Koen Maaskant^{3,4} 岡本美子⁵ 片坐宏一⁶ 山下卓也⁷ 宮田隆志⁸
酒向重行⁸ 藤吉拓哉⁹ 左近 樹¹⁰ 藤原英明⁹ 上塚貴史⁸ Gijs D. Mulders¹¹
Enrique Lopez-Rodriguez¹² Christopher Packham¹² 井上昭雄¹³ 尾中 敬¹⁰

Mid-Infrared Imaging of Protoplanetary Disks around Young Intermediate-Mass Star

Mitsuhiko Honda^{1,2,14}, Koen Maaskant^{3,4}, Yoshiko K. Okamoto⁵, Hirokazu Kataza⁶,
Takuya Yamashita⁷, Takashi Miyata⁸, Shigeyuki Sako⁸, Takuya Fujiyoshi⁹,
Itsuki Sakon¹⁰, Hideaki Fujiwara⁹, Takafumi Kamizuka⁸, Gijs D. Mulders¹¹,
Enrique Lopez-Rodriguez¹², Christopher Packham¹², Akio K. Inoue¹³
and Takashi Onaka¹⁰

¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

³ Leiden Observatory, Leiden University, PO Box 9513, 2300 RA Leiden, The Netherlands

⁴ Astronomical Institute Anton Pannekoek, University of Amsterdam, P.O. Box 94249, 1090 GE Amsterdam, The Netherlands

⁵ Institute of Astrophysics and Planetary Sciences, Faculty of Science, Ibaraki University, Mito City, Ibaraki 310-8512, Japan

⁶ Department of Infrared Astrophysics, Institute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency, Kanagawa 229-8510, Japan

⁷ National Astronomical Observatory of Japan, Mitaka City, Tokyo 181-8588, Japan

⁸ Institute of Astronomy, School of Science, University of Tokyo, Mitaka, Tokyo 181-0015, Japan

⁹ Subaru Telescope, 650 North A'ohoku Place, Hilo, Hawaii 96720, U.S.A.

¹⁰ Department of Astronomy, School of Science, University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

¹¹ Lunar and Planetary Laboratory, The University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

¹² Department of Physics & Astronomy, University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX 78249, USA

¹³ College of General Education, Osaka Sangyo Univ., Daito, Osaka 574-8530, Japan

¹⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: hondamt@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We imaged circumstellar disks around 22 Herbig Ae/Be stars at 25 μm using Subaru/COMICS and Gemini/T-ReCS. Our sample consisted of 11 group I (flaring disk) and group II (flat disk) sources. We found that group I sources tended to show more extended emission than group II sources. Previous studies showed that the continuous disk is hard to resolve with 8-meter-class telescopes in the Q-band due to the strong emissions from the unresolved innermost region of the disk. This indicates that Q-band resolution sources requires a hole or gap in the disk material distribution to suppress the contribution from the innermost region of the disk. As many group I sources are resolved at 25 μm , we suggest that many, not all, group I Herbig Ae/Be disks have a hole or gap and are (pre-)transitional disks. On the other hand, the unresolved nature of many group II sources at 25 μm supports the suggestion that group II disks have a continuous, flat disk geometry. It has been inferred that group I disks may evolve into group II through the settling of dust grains at the mid-plane of the proto-planetary disk. However, considering growing evidence of the presence of a hole or gaps in the disk of group I sources, such an evolutionary scenario is unlikely. The difference between groups I and II may reflect different evolutionary pathways of protoplanetary disks..

Keywords: circumstellar matter, protoplanetary disk, planet formation

序論

近年の多数の太陽系外惑星の発見は惑星系の多様性を明らかにした¹。しかしながら、その多様性の起源は未解明であるため、惑星が形成されると考えられている原始惑星系円盤の進化の観測的研究が不可欠である。

近年、T Tauri 型星のような低質量星まわりの原始惑星系円盤研究では、遷移円盤 (transitional disk) とよばれる原始惑星系円盤の研究が注目を集めている。遷移円盤とは、スペクトルエネルギー分布 (SED) において近・中間赤外線放射が弱い天体であり、円盤の内側領域にギャップや穴が開いている天体であると考えられている^{2,3)}。始原的な円盤においてはそのようなギャップや穴は開いていないので、そのようなギャップや穴は惑星形成によって形成されたと考えられ、したがって始原的な円盤から惑星系へと進化の途上にある円盤であると考えられている。

一方、中質量星まわりの原始惑星系円盤を持つ星である Herbig Ae/Be 型星も、惑星形成過程が調べられているが、T Tauri 型星の分類手法とは異なる分類がなされてきた。Meeus らは SED 解析から、以下のように Herbig Ae/Be 型星を 2 つに分類した。中間～遠赤外にかけて単一のべき関数でフィットできる天体を group II とし、べき関数に加えて低温の黒体放射成分を持つ天体を group I と分類したのである⁴⁾。そして、group I の原始惑星系円盤は外側に向かってスケールハイトが強くなる flaring disk である一方で、group II の円盤は幾何学的に薄いフラットな円盤であると解釈・提案したのである。このような SED 分類に対して、円盤進化の観点からいくつかのシナリオが提案された。Dullemond と Dominik は、group I の円盤はより始原的な円盤であり、ダスト成長と赤道面への沈殿が進行することで、group II のようなフラットな円盤に進化すると主張した^{5,6)}。Marinas らは波長 12 μm および 18 μm において、Herbig Ae/Be 型星の撮像サーベイを行い、group I 円盤からの熱放射が group II 円盤よりも広がっているという傾向を見出し、Meeus らの円盤構造の解釈を支持した⁷⁾。

その後、様々な波長での高空間分解能観測が進み、円盤のギャップや穴が直接分解して捉えられるようになってきた。特に 2000 年代後半になってから、group I 円盤にギャップや穴が次々と報告された⁸⁻²²⁾。それを踏まえて、近年我々は Herbig Ae/Be 型星の group I 天体は、従来提案されていたような単純な flaring disk ではなく、円盤内側領域にギャップや穴が形成された、いわゆる遷移円盤に相当するのではないかと提案した^{17,22)}。このように解

析すると、中質量星の分類と低質量星の円盤分類を統一的にとらえることができる。そして、group II 円盤にはそのようなギャップや穴の検出報告がないことから、以前の group I から group II へと進化するシナリオは考えづらく、むしろ低質量星の円盤進化で提唱されている、フラット円盤と遷移円盤は異なる円盤進化状態を見ていると解釈するシナリオ²³⁾の方が合致しているのではないかと主張した。

本論文では、北半球にあるハワイマウナケア山山頂にある 8.2-m すばる望遠鏡と、南半球にある 8.1-m Gemini 望遠鏡を用いて、近傍 200 pc 程度にある Herbig Ae/Be 型星 22 天体を波長 24.5 μm で高解像度撮像サーベイをした結果について報告する。波長 24.5 μm では、短波長に比べて点源広がり関数 (PSF; point spread function) が比較的安定しているため、微妙な広がりを議論することが可能である。また、より低温の絶対温度 $\sim 100\text{K}$ 程度の領域からの熱放射をトレースするため、円盤の広がり検出が期待できる。

方法

観測とデータ解析

Subaru/COMICS 観測データ

我々は 8.2 m すばる望遠鏡に搭載した中間赤外線撮像分光装 COMICS (Cooled Mid-Infrared Camera and Spectrometer)^{24,25,26)} を用いて Herbig Ae/Be 型星の撮像観測を行った。観測には Q24.5 フィルタ (中心波長 $\lambda_c=24.5 \mu\text{m}$, 波長幅 $\Delta\lambda=0.8 \mu\text{m}$) と、一部の天体には Q18.8 フィルタ (中心波長 $\lambda_c=18.8 \mu\text{m}$, 波長幅 $\Delta\lambda=0.8 \mu\text{m}$) も用いた。チョッピング観測を行い、ふり幅は 10", 周波数は 0.45 Hz であった。ピクセルスケールは 0.130" / pix である。目標天体前後に校正のための PSF 参照星の観測も行っている。観測緒言は表 1 にまとめてある。

データ解析には shift-and-add 法を用いた。撮像データは、0.983 秒短時間露出の非常に多数の (100 ~ 1000 枚) 観測画像から成る。まず、チョッピング差引を行い、背景光および暗電流の除去を行う。天体は 0.983 秒の短い積分時間でも認識できる明るさで検出されているので、天体像に対してガウシアンフィッティングを行いピーク位置と FWHM (半値全幅) を計測する。そして、ピーク位置座標が一致するように 1 枚 1 枚画像の移動を行った後に、画像を足し合わせる。その際に、計測した FWHM が平均値から $\pm 1 \sigma$ の範囲外の画像データは質の悪いデータとみなし、最終画像の足し合わせから除外した。

Gemini/T-ReCS 観測データ

南天の天体に関しては、南半球のチリ共和国にある 8.1-m Gemini South telescope に搭載されている T-ReCS を用いた²⁷⁾。T-ReCS は COMICS と同じく Raytheon 社製の 320 × 240 画素の Si:As IBC array を用いており、ピクセルスケールは 0.08633 ±

0.00013" / 画素、最終的な視野は 27.6" × 20.7" である。観測には Qb フィルタ (中心波長 $\lambda_c = 24.56 \mu\text{m}$ 、波長幅 $\Delta\lambda = 0.94 \mu\text{m}$) を用いた。観測緒言はやはり表 1 にまとめてある。観測は通常の chop-nod 法で行なわれた。チョッピングのふり幅は 15"、方向は方位角 45 度であり、40 秒毎にノッディングを

表 1. Subaru/COMICS および Gemini/T-ReCS 観測緒言

Subaru/COMICS Q24.5 imaging				Subaru/COMICS Q18.8 imaging			Gemini/T-ReCS Qb imaging		
Object	Date	sec.	PSF	Date	sec.	PSF	Date	sec.	PSF
Elias3-1	Jul 11, 2004, Jul 12, 2004	399	β And
HD100546	Jun 27, 2011	638	γ Cru
HD135344B	Jun 14, 2011	1361	α Cen A
HD139614	Jul 11, 2004	101	δ Oph	Jul 23, 2011	638	α Tra
HD169142	Jul 22, 2011	638	η Sgr
HD179218	Jul 11, 2004	99	α Her
HD36112	Dec 14, 2005, Jan 26, 2011	3297	α Tau	Jan 26, 2011	438	α Tau
HD97048	Jun 28, 2011	638	γ Cru
RCrA	Jul 11, 2004	100	δ Oph	Jul 12, 2004	40	α Her	Jun 28, 2011	203	η Sgr
TCrA	Jul 11, 2004	312	α Her	Jul 12, 2004	175	α Her	Jul 21, 2011	638	η Sgr
51 Oph	Jul 11, 2004	237	δ Oph	Jul 21, 2011	638	η Sgr
AK Sco	Jul 22, 2011	638	η Sgr
CQTau	Dec 15, 2005	553	α Tau	Dec 15, 2005	541	α Tau
HD142666	Jul 11, 2004	148	δ Oph	Jul 21, 2011	638	η Sgr
HD144432	Jul 11, 2004	193	δ Oph	Jul 24, 2011	638	δ Oph
HD150193	Jul 12, 2004	168	α Her	Jul 27, 2011	638	η Sgr
HD163296	Jul 11, 2004, Jul 12, 2004	557	δ Oph	Jun 28, 2011	638	η Sgr
HD31648	Dec 14, 2005	1510	α Tau	Dec 15, 2005	578	α Tau
HD35187	Dec 14, 2005, Dec 16, 2005	1580	α Tau
HR5999	Jul 24, 2011	638	α Tra
KK Oph	Jul 21, 2011	638	η Sgr

表 2. FWHM 計測結果と空間分解の可否

Subaru/COMICS Q24.5 imaging				Subaru/COMICS Q18.8 imaging			Gemini/T-ReCS Qb imaging		
Object	$\Phi_{d,target}(\text{"})$	$\Phi_{d,PSF}(\text{"})$?	$\Phi_{d,target}(\text{"})$	$\Phi_{d,PSF}(\text{"})$?	$\Phi_{d,target}(\text{"})$	$\Phi_{d,PSF}(\text{"})$?
Elias3-1	0.672±0.012	0.634±0.003	Y
HD100546	0.788±0.006	0.716±0.008	Y
HD135344B	0.804±0.008	0.721±0.004	Y
HD139614	0.643±0.031	0.633±0.011	N	0.711±0.005	0.710±0.007	N
HD169142	0.759±0.014	0.692±0.007	Y
HD179218	0.637±0.009	0.645±0.004	N
HD36112	0.751±0.009	0.649±0.003	Y	0.559±0.017	0.526±0.027	N
HD97048	0.788±0.014	0.714±0.005	Y
RCrA	0.687±0.016	0.629±0.020	Y	0.547±0.011	0.489±0.008	Y	0.771±0.028	0.704±0.011	Y
TCrA	0.748±0.013	0.634±0.002	Y	0.586±0.026	0.489±0.004	Y	0.806±0.023	0.732±0.003	Y
51 Oph	0.663±0.037	0.626±0.006	N	0.730±0.012	0.721±0.007	N
AK Sco	0.695±0.024	0.692±0.005	N
CQTau	0.687±0.023	0.627±0.004	Y	0.519±0.005	0.501±0.011	Y?
HD142666	0.710±0.063	0.637±0.008	N	0.741±0.008	0.714±0.005	Y
HD144432	0.652±0.031	0.639±0.006	N	0.691±0.014	0.690±0.005	N
HD150193	0.728±0.081	0.641±0.002	N	0.696±0.008	0.700±0.007	N
HD163296	0.649±0.011	0.632±0.003	Y?	0.705±0.008	0.711±0.006	N
HD31648	0.677±0.013	0.646±0.006	Y	0.503±0.007	0.493±0.007	N
HD35187	0.689±0.010	0.649±0.002	Y
HR5999	0.709±0.009	0.728±0.012	N
KK Oph	0.721±0.012	0.722±0.007	N

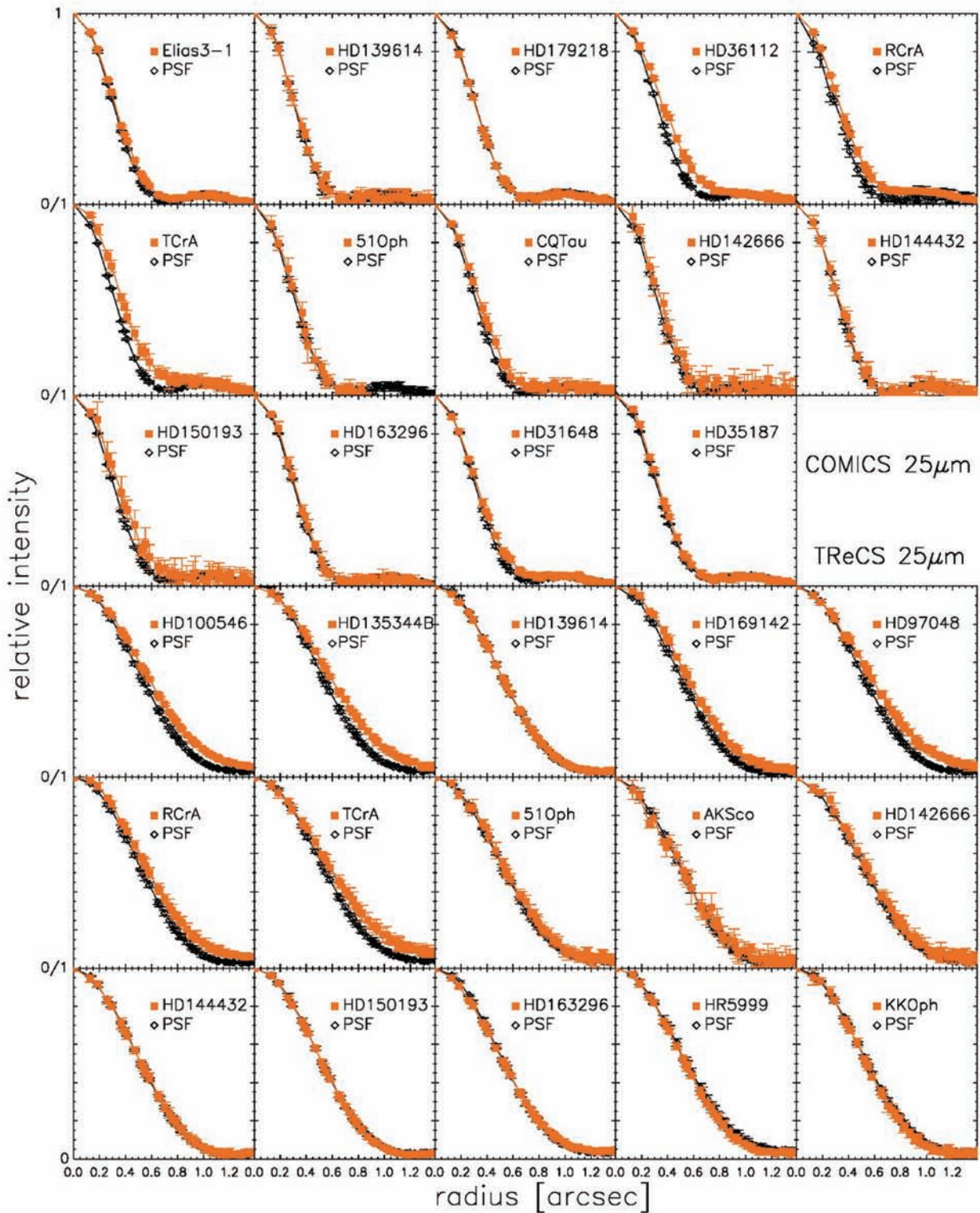


図 1. ピークで規格化した天体と PSF の半径プロファイル (波長 25 μ m). 上 3 段が Subaru/COMICS, 下 3 段が Gemini/T-ReCS による観測結果である.

行っている。標準星は目標天体の観測直前または直後に行っている。データ解析には Gemini IRAF package を用い、チョッピングおよびノッディング差引を行っている。

OMICS の Q24.5 フィルタ、および T-ReCS の Qb

フィルタは、特性に若干の違いはあるが、おおむね波長 25 μ m であるので、本論文では今後区別せずにどちらも波長 25 μ m 撮像観測として取り扱う。

表 3. 観測サンプルの各種パラメータ

Object	Distance(pc)	$L_*(L_\odot)$	Ref.	$\Phi_i(^{\circ})$	$\Phi_i(\text{AU})$	Group	Ref.	[30/13.5]	Ref.
AB Aur	139.3	33.0	31	0.50±0.05	70.2±6.91	I	30	4.5	a
Elias3-1	160	0.7	28	0.22±0.04	35.5±6.1	I	29	2.3	e
HD100546	96.9	22.7	31	0.33±0.02	31.7±2.3	I	30	3.5	a
HD135344B	142	8.1	31	0.36±0.02	50.6±2.7	I	30	10.9	a
HD139614	140	7.6	31	0.04±0.17	5.3±24.0	I	30	4.2	a
HD169142	145	9.4	31	0.31±0.04	45.1±5.4	I	30	7.8	a
HD179218	240	100.0	28	<0.12	<28.81	I	30	2.4	a
HD36112	279.3	33.7	31	0.38±0.02	105.6±5.5	I	30	4.1	a
HD97048	158.5	30.7	31	0.33±0.03	52.8±5.5	I	30	5.9	a
RCrA	130	0.6	28	0.31±0.07	40.9±9.5	I	29	2.1	e
TCrA	130	0.7	28	0.34±0.06	43.8±7.2	I	30	5	a
51 Oph	124.4	4.285	31	0.11±0.09	13.7±11.4	II	30	0.59	a
AK Sco	150	8.9	28	0.06±0.27	9.6±40.1	II	30	3.3	a
CQTau	113	3.4	31	0.28±0.06	31.5±6.4	II	31	4.1	e
HD142666	145	13.5	31	0.20±0.04	28.7±5.3	II	30	1.53	a
HD144432	145	10.2	28	0.05±0.23	6.6±33.5	II	30	1.82	a
HD150193	216.5	48.7	31	<0.17	<37.3	II	30	1.42	a
HD163296	118	33.1	31	<0.16	<19.2	II	30	2	a
HD31648	137	13.7	31	0.20±0.05	27.3±6.3	II	30	1.19	a
HD35187	114.2	17.4	31	0.23±0.03	26.5±3.4	II	30	2.1	a
HR5999	210	87.1	28	<0.11	<23.6	II	30	0.96	a
KK Oph	260	13.7	31	<0.23	<58.9	II	30	1.04	a

結果

観測された画像はほぼ円形で、方位角方向の変化は顕著でなかったため、半径方向分布のみを議論する。まず、方位角方向に関して平均化して、波長 $25\mu\text{m}$ 輝度の半径方向プロファイルを目標天体および PSF 参照星それぞれ作成した。そのプロファイルを一緒にプロットしたものが図 1 である。その後、FWHM を計測した。本論文ではこれを direct FWHM Φ_d と呼ぶ。目標天体と PSF 参照星それぞれについて計測したので、それぞれ $\Phi_{d,\text{target}}$ 、 $\Phi_{d,\text{PSF}}$ と表記する。この結果を表 2 にまとめている。

目標天体の半径方向輝度プロファイルは、PSF 参照星とほぼ同じか、わずかに広がっている程度であることが分かる。観測結果は真の輝度分布と装置 PSF との畳み込みであるので、何らかの便宜的な方法で真の輝度分布の広がり具合を定量化したい。そこで我々は、Marinas ら⁷⁾の先行研究に倣い、輝度プロファイルが目標天体および PSF 参照星ともにガウシアンであると近似し、真の輝度分布もガウシアンであると仮定した。ガウシアン同士の畳み込みは、やはりガウシアンであることから、真の輝度分布のガウシアン FWHM Φ_i は以下のように導出できる。

$$\Phi_i = \sqrt{\Phi_{d,\text{target}}^2 - \Phi_{d,\text{PSF}}^2}$$

我々はこの真の輝度分布の FWHM Φ_i を、円盤

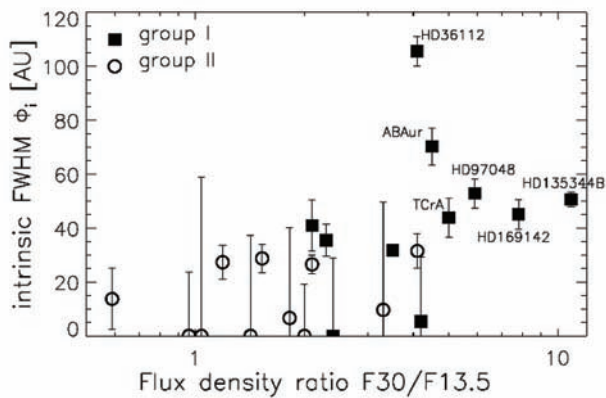
放射の広がり of 便宜的指標として用いる。求められた値は表 3 にまとめてある。目標天体のうち 8 天体は COMICS と T-ReCS の両方で観測されているが、 Φ_i の値は誤差の範囲内で一致した。より保守的に議論を進めるため、より厳しい広がり of 制限が得られた結果の方を今後の議論では用いる。

討論

広がり of 傾向について

天体によって円盤放射の広がり Φ_i には差異が見受けられることが分かる。この差異の要因をさぐるため、天体の様々な物理パラメータとの相関を探る。まず、円盤放射の広がり Φ_i を天体までの距離を用いて物理的な距離に変換した。そして、中心星光度、Meeus *et al.* (2001) の SED 分類、中間赤外線での“色”に相当する波長 $13.5\mu\text{m}$ と $30\mu\text{m}$ での flux density 比（以下“中間赤外カラー”と呼ぶ）を文献から求めた²⁸⁻³¹⁾。また、今回の観測リストには含まれていないが、すでに出版した我々の先行研究に含まれている天体 AB Aur もこのリストに追加した⁹⁾。これらの諸量をまとめたのが表 3 である。

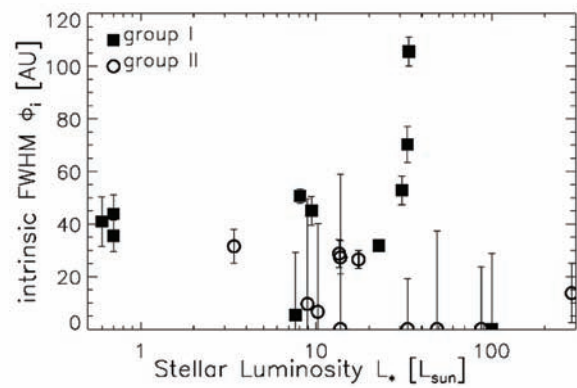
まず、全体的に group I 天体のほうが group II 天体よりも円盤が広がっているソースが多いことが分かる。具体的には、group I では 11 天体中 9 天体 (82%) が有意に空間分解されているのに対し、group II では 11 天体中 4 天体 (36%) しか空間分解できていない。この結果は、より短波長の波長

図 2. 円盤放射の広がり Φ_i と中心星光度の関係。

12 μm と 18 μm で行なった Marinas et al. (2011) の先行研究での傾向と定性的に合致している。本研究では波長 25 μm においても、そのような傾向を確認した初めての結果である。

次に、この傾向についてさらに調べるため、円盤放射の広がり Φ_i と中心星光度とをプロットしたものが図 2 である。単純に中心星光度が大きい天体ほど、熱放射である円盤放射の広がり Φ_i が広がっていると予想されるが、予想に反しあまりきれいな傾向は見られなかった。いくつかのソースは中心星光度が $40L_{\odot}$ 以上であるにも関わらず、我々は空間分解できていない。

一方で、円盤放射の広がり Φ_i と中間赤外線カラーとをプロットしたものが図 3 である。円盤放射の広がり Φ_i が 40 AU 以上の天体は、中間赤外線カラーが赤い group I ソースであるという傾向がはっきり見て取れる。具体的には中間赤外線カラー [30/13.5] が 4.2 以上である。中間赤外線カラーがそれ以下の場合、group I ソースでも広がりがそれほどでもないか、分解できない程度にしか広がっていない。さらに、今回のサンプルには含めていないが、先行研究で非常に広がった構造を持つ天体の中間赤外線カラーも、みな 4.2 以上である。具体的には HD142527⁽¹¹⁾、Oph IRS48⁽¹⁸⁾、HD141569^(32,33) であるが、それぞれ 5, 10.4, 6.8 と 4.2 よりも大きく、非常に赤いソースであることが分かる。以上のことから、我々は中間赤外線カラーが 4.2 以上の赤い Herbig Ae/Be 型星はすべて (より) 広がった円盤熱放射を示すことが分かった。一般的に、group I 天体は group II 天体よりも赤いスペクトルを示すことが知られている。よって定性的には、先ほど示した group I 天体のほうが group II 天体よりも広がった放射を示すという傾向とも合致している。

図 3. 円盤放射の広がり Φ_i と中間赤外線カラーの関係。

中間赤外で赤い円盤の広がった放射の起源

中間赤外線赤い円盤ほど、中間赤外線赤い円盤より広がった熱放射が観測される原因について、すでに我々を含むいくつかのグループで議論されている^(9,17,22)。我々の先行研究において、group I 天体で観測される広がった円盤放射は、通常の内側まで詰まった連続的な円盤では説明が非常に難しいことを示した^(9,17,22)。というのは、星近傍まで詰まった連続的な円盤では、半径 10 AU 以下 (150pc 先では 0.07" 以下に相当) の非常にコンパクトな領域からの熱放射が卓越する。これを 8 m 望遠鏡で観測する状況を考えると、波長 25 μm での空間分解能はこの 10 倍である約 0.7" であるため、そのようなコンパクトな円盤熱放射はほぼ分解できないか、辛うじて分解できる程度である。我々のサンプル中の分解できなかったソースは、ほぼこの状況に相当していると考えられる。一方で、我々はかなりの数の group I 天体を実際に空間分解できている。よって、これらの空間分解できた天体に関しては、内側まで詰まった連続的な円盤という解釈はできないことを意味する。

これらの空間分解できた group I 天体の円盤の最も自然な説明は、円盤中心部分でダストがなくなり、穴やギャップができていたりする不連続な円盤である。よって、中心部分の比較的高温のダスト放射の成分が弱くなり、group I 天体の定義でもある SED に見られる低温黒体放射成分の存在が際立つのである。言い換えれば、穴やギャップが開いた円盤を考えることで、今回の観測と SED の両方を同時に説明することが可能である。

本研究では、中間赤外線カラーが赤い ([30/13.5] 比が大きい) 天体ほど、円盤熱放射の広がりが大きい傾向が見られたが、これも上記の描像を受け入れるとよく説明できる。円盤内側に穴が開くと、円盤の内壁がより外側になる。この内壁からの放射は、

中間赤外線熱放射の非常に強いソースとなるため、円盤熱放射の広がりを規定する。内壁の位置が遠くなるほど円盤は広がって観測されるが、同時に単位面積あたりの中心星からの放射エネルギーが減少するためダスト平衡温度は低下する。ダスト平衡温度が低下するほど、中間赤外線カラーは赤くなる。つまり、円盤に大きな穴が開いているほど、円盤は広がって観測され、同時により中間赤外線カラーは赤くなるのである。

実際によく分解できたソースの閾値である、中間赤外線カラー [30/13.5] が 4.2 以上の場合を考える。このカラーから示唆される黒体放射温度は 155 K となる。中心星光度がサンプルの典型値である 30 L_☉ である場合、黒体ダスト平衡温度が 155 K となる距離は半径 18 AU、直径で 36 AU となる。つまり 36 AU の穴を持つ円盤である。このような円盤が今回のサンプルの典型的な距離 150 pc にあるとすると、その円盤内壁からの放射は 0.24" の直径を持つリング放射として観測される。これは 8 m 望遠鏡で分解できるサイズとなり、今回の観測結果とも整合する。

Group I Herbig Ae/Be 円盤は遷移円盤である

我々は、中間赤外撮像観測および SED 同時に説明する解として、group I Herbig Ae/Be 型星の円盤は、円盤中心領域が散逸した遷移円盤であると提案する。このことは、近年の近赤外や電波干渉計での高分解能観測結果と完全に符合する。

遷移円盤という概念は、もともとはより低質量の若い星である T Tauri 型星の円盤のグループの一つとして提案されたものである^{2,3)}。初期原始惑星系円盤は中心領域までガス・ダストで満たされた構造を持つと考えられているため、遷移円盤はガス・ダストが惑星系形成に伴って集積・散逸していく進化途上の段階にある円盤であると考えられている。今回、中質量の若い星である Herbig Ae/Be 型星の分類手法と、低質量の若い星である T Tauri 型星の分類手法との類似性を指摘することで、少なくとも小～中質量星に関しては、似たような円盤進化をたどることが示唆される。また、これまで一部の研究グループが示唆してきた、group I から group II へと進化するというシナリオは再考されるべきであろう。なぜならば、group II 円盤は中心部に穴が開いていない、連続的な円盤であるからである。もし group I から group II へと進化するのであれば、一度空いた大規模な穴がガス・ダストで再び満たされるということになる。このようなことが起こることは、円盤においては考えにくい。

考えられる進化シナリオは、group I と group II は、異なる進化経路を見ているという解釈である。初期の円盤は内側までガス・ダストの詰まった円盤であるとする、例えば木星質量程度の惑星が重力不安定等で早期に (~1Myr 以下) 形成しギャップを形成したのが group I 円盤。一方で重力不安定が起らず、コア集積により比較的時間をかけて (~1Myr 以上) 惑星が形成中で、まだ木星質量の惑星が形成していない円盤が group II 円盤であるとするシナリオである^{9,22)}。同様のシナリオは T Tauri 型星にも提唱されており²³⁾、やはり円盤進化シナリオの類似性が示唆される。

謝辞

本研究は 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201406) を受けて行いました。所長並びに所員の皆様のご支援に深謝いたします。また、すばる望遠鏡を運営する国立天文台および多くの観測所スタッフにも感謝いたします。本研究は科学研究費 (若手研究 B: 21740141) からサポートを受けました。

文献

- 1) Marois C, Macintosh B, Barman T, Zuckerman B, Song I, Patience J, Lafrenière D and Doyon R (2008) Direct imaging of multiple planets orbiting the star HR 8799. *Science* **322**: 5906-1348.
- 2) Strom KM, Strom SE, Edwards S, Cabrit S and Skrutskie MF (1989) Circumstellar material associated with solar-type pre-main-sequence stars - A possible constraint on the timescale for planet building. *Astronomical J.* **97**: 1451-1470.
- 3) Espaillat C, Calvet N, D'Alessio P, Hernández J, Qi C, Hartmann L, Furlan E and Watson DM (2007) *The Astrophysical Journal* **670**: L135-L138
- 4) Meeus G, Waters LBFM, Bouwman J, van den Ancker ME, Waelkens C and Malfait K (2001) ISO spectroscopy of circumstellar dust in 14 Herbig Ae/Be systems: Towards an understanding of dust processing. *Astronomy and Astrophysics* **365**: 476-490.
- 5) Dullemond CP and Dominik C (2004) Flaring vs. self-shadowed disks: The SEDs of Herbig Ae/Be stars. *Astronomy and Astrophysics* **417**: 159-168.
- 6) Dullemond CP and Dominik C (2004) The effect of dust settling on the appearance of protoplanetary disks. *Astronomy and Astrophysics* **421**: 1075-1086.
- 7) Mariñas N, Telesco CM, Fisher RS and Packham C (2011) High-resolution mid-infrared imaging of the circumstellar disks of Herbig Ae/Be stars. *Astrophysical Journal* **737**: 57-75.
- 8) Lin SY, Ohashi N, Lim J, Ho PTP, Fukagawa M and Tamura M (2006) Possible molecular spiral arms in the protoplanetary disk of AB Aurigae.

- Astrophysical J.* **645**: 1297-1304.
- 9) Honda M, Inoue AK, Okamoto YK, Kataza H, Fukagawa M, Yamashita T, Fujiyoshi T, Tamura M, Hashimoto J, Miyata T, Sako S, Sakon I, Fujiwara H, Kamizuka T and Onaka T (2010) Pre-transitional disk nature of the AB Aur disk. *Astrophysical J.* **718**: L199-L203.
 - 10) Fukagawa M, Tamura M, Itoh Y, Kudo T, Imaeda Y, Oasa Y, Hayashi SS and Hayashi M (2006) Near-infrared images of protoplanetary disk surrounding HD 142527. *Astrophysical J.* **636**: L153-L156.
 - 11) Fujiwara H, Honda M, Kataza H, Yamashita T, Onaka T, Fukagawa M, Okamoto YK, Miyata T, Sako S, Fujiyoshi T and Sakon I (2006) The asymmetric thermal emission of the protoplanetary disk surrounding HD 142527 seen by Subaru/COMICS. *Astrophysical J.* **644**: L133-L136.
 - 12) Verhoeff AP, Min M, Pantin E, Waters LBFM, Tielens AGGM, Honda M, Fujiwara H, Bouwman J, van Boekel R, Dougherty SM, de Koter A, Dominik C and Mulders GD (2011) The complex circumstellar environment of HD 142527. *Astronomy and Astrophysics* **528**: A91.
 - 13) Brown JM, Blake GA, Qi C, Dullemond CP, Wilner DJ and Williams JP (2009) Evidence for dust clearing through resolved submillimeter imaging. *Astrophysical J.* **704**: 496-502.
 - 14) Grady CA, Schneider G, Sitko ML, Williger GM, Hamaguchi K, Brittain SD, Ablordeppey K, Apai D, Beerman L, Carpenter WJ, Collins KA, Fukagawa M, Hammel HB, Henning T, Hines D, Kimes R, Lynch DK, Ménard F, Pearson R, Russell RW, Silverstone M, Smith PS, Troutman M, Wilner D, Woodgate B and Clampin M (2009) Revealing the structure of a pre-transitional disk: The case of the Herbig F star SAO 206462 (HD 135344B). *Astrophysical J.* **699**: 1822-1842.
 - 15) Isella A, Natta A, Wilner D, Carpenter JM and Testi L (2010) Millimeter imaging of MWC 758: Probing the disk structure and kinematics. *Astrophysical J.* **725**: 1735-1741.
 - 16) Grady CA, Schneider G, Hamaguchi K, Sitko ML, Carpenter WJ, Hines D, Collins KA, Williger GM, Woodgate BE, Henning Th, Ménard F, Wilner D, Petre R, Palunas P, Quirrenbach A, Nuth JA III, Silverstone MD and Kim JS (2007) The disk and environment of a Young Vega Analog: HD 169142. *Astrophysical J.* **665**: 1391-1406.
 - 17) Honda M, Maaskant K, Okamoto YK, Kataza H, Fukagawa M, Waters LBFM, Dominik C, Tielens AGGM, Mulders GD, Min M, Yamashita T, Fujiyoshi T, Miyata T, Sako S, Sakon I, Fujiwara H and Onaka T (2012) Mid-infrared imaging of the transitional disk of HD 169142: Measuring the size of the gap. *Astrophysical J.* **752**: 143.
 - 18) Geers VC, Pontoppidan KM, van Dishoeck EF, Dullemond CP, Augereau JC, Merín B, Oliveira I and Pel JW (2007) Spatial separation of small and large grains in the transitional disk around the young star IRS 48. *Astronomy and Astrophysics* **469**: L35-L38.
 - 19) Bouwman J, de Koter A, Dominik C and Waters LBFM (2003) The origin of crystalline silicates in the Herbig Be star HD 100546 and in comet Hale-Bopp. *Astronomy and Astrophysics* **401**: 577-592.
 - 20) Benisty M, Tatulli E, Ménard F and Swain MR (2010) The complex structure of the disk around HD 100546. The inner few astronomical units. *Astronomy and Astrophysics* **511**: A75.
 - 21) Matter A, Labadie L, Kreplin A, Lopez B, Wolf S, Weigelt G, Ertel S, Pott JU and Danchi WC (2014) Evidence of a discontinuous disk structure around the Herbig Ae star HD 139614. *Astronomy and Astrophysics* **561**: A26.
 - 22) Maaskant KM, Honda M, Waters LBFM, Tielens AGGM, Dominik C, Min M, Verhoeff A, Meeus G and van den Ancker ME (2013) Identifying gaps in flaring Herbig Ae/Be disks using spatially resolved mid-infrared imaging. Are all group I disks transitional? *Astronomy and Astrophysics* **555**: A64.
 - 23) Currie T (2010) The morphologies and lifetimes of transitional protoplanetary disks, *arXiv*. **1002**: 1715.
 - 24) Kataza H, Okamoto Y, Takubo S, Onaka T, Sako S, Nakamura K, Miyata T and Yamashita T (2000) COMICS: the cooled mid-infrared camera and spectrometer for the Subaru telescope. *Proc. SPIE* **4008**: 1144-1152.
 - 25) Okamoto YK, Kataza H, Yamashita T, Miyata T, Sako S, Takubo S, Honda M and Onaka T (2003) Improved performances and capabilities of the cooled mid-infrared camera and spectrometer (COMICS) for the Subaru Telescope *Proc. SPIE* **4841**: 169-180.
 - 26) Sako S, Okamoto YK, Kataza H, Miyata T, Takubo S, Honda M, Fujiyoshi T, Onaka T and Yamashita T (2003) Improvements in operating the raytheon 320×240 pixel Si:As impurity band conduction mid-infrared array. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific* **115**: 1407-1418.
 - 27) Telesco CM, Pina RK, Hanna KT, Julian JA, Hon DB and Kisko TM (1998) GatirCam: Gemini mid-infrared imager. *Proc. SPIE* **3354**: 534
 - 28) Acke B, van den Ancker ME, Dullemond CP, van Boekel R and Waters LBFM (2004) Correlation between grain growth and disk geometry in Herbig Ae/Be systems. *Astronomy and Astrophysics* **422**: 621-626.
 - 29) Acke B and van den Ancker ME (2006) A survey for nanodiamond features in the 3 micron spectra of Herbig Ae/Be stars. *Astronomy and Astrophysics* **457**: 171-181.
 - 30) Acke B, Bouwman J, Juhász A, Henning T, van den Ancker ME, Meeus G, Tielens AGGM and Waters LBFM (2010) Spitzer's view on aromatic and aliphatic hydrocarbon emission in Herbig Ae stars *Astrophysical J.* **718**: 558-574.
 - 31) Meeus G, Montesinos B, Mendigutía I, Kamp I, Thi WF, Eiroa C, Grady CA, Mathews G, Sandell G, Martin-Zaïdi C, Brittain S, Dent WRF, Howard C, Ménard F, Pinte C, Roberge A, Vandenbussche B and Williams JP (2012) Observations of Herbig Ae/Be stars with Herschel/PACS. The atomic and molecular contents of their protoplanetary discs. *Astronomy and Astrophysics* **544**: A78.

- 32) Fisher RS, Telesco CM, Piña RK, Knacke RF and Wyatt MC (2000) Detection of extended thermal infrared emission around the Vega-like source HD 141569. *Astrophysical J.* **532**: L141-L144.
- 33) Marsh KA, Silverstone MD, Becklin EE, Koerner DW, Werner MW, Weinberger AJ and Ressler ME (2002) Mid-infrared images of the Debris Disk around HD 141569. *Astrophysical J.* **573**: 425-430.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

二次元半導体デバイスの研究

水野智久^{1,3} 前田辰郎² 多田哲也² 青木 孝¹

Experimental Study on Two-Dimensional Si Device

Tomohisa Mizuno^{1,3}, Tatsuro Maeda², Tetsuya Tada² and Takashi Aoki¹

¹ Department of Mathematics and Physics, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan.

² National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Tsukuba, Ibaraki 305-8568, Japan.

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

Abstract: We experimentally studied the influence of dopant atoms and surface oxide stress on the physical properties of two-dimensional Si (2D-Si) using UV-Raman spectroscopy and a photoluminescence (PL) method. The PL method showed that the bandgap E_G of n^+/p^+ 2D-Si strongly depends on the impurity dopant density N , which is caused by the E_G narrowing effects. However, the N dependence of E_G of n^+ 2D-Si is about one third of that of n^+ 3D-Si, which is probably attributable to the impurity band modulation in 2D-Si. On the other hand, UV-Raman results showed that a tensile strain of 2D-Si, applied by the expansion coefficient difference between 2D-Si and surface oxide, can be relaxed by decreasing the surface oxide thickness T_{OX} . As a result, E_G of 2D-Si rapidly increases with decreasing T_{OX} . This strain dependence of E_G of 2D-Si is much larger than that of 3D-Si, which is not physically understood at present.

Keywords: 2D-Si, phonon confinement, uncertainty principle, Raman spectroscopy, band structure modulation, photoluminescence, impurity dopant, strain, oxide, CMOS, SOI

序論

2次元 Si (2D-Si) 構造は、極微細 SOI (silicon-on-insulator)、FinFET1) などの CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) 素子、及び Si 光素子¹⁾ に広く応用されている。CMOS における短チャネル効果抑制や、光素子における光ルミネッセンス (PL) を増大するには、2D-Si 層厚 T_s を薄膜化し続ける必要がある。また、高速 CMOS 素子実現には、(110) 面 CMOS や歪み Si 構造などの研究も進められている²⁾。

2D-Si 層においては、電子の量子力学的閉じ込め効果により、電子移動度劣化の議論がされている³⁾。更に、2D-Si を含めた低次元 Si においては、バンド構造が変調され、バンドギャップの増大も報告されている⁴⁾。

一方、低次元 Si 構造 (Si ナノワイヤー、Si ドットなど) においては、量子的な閉じ込め効果による第一次近似以外のフォノンも活性化される⁵⁾。その結果、半導体素子におけるキャリアのフォノン散乱

確率が増えキャリア速度の劣化も予想されている⁵⁾。

以上のように、2D-Si を含めた低次元 Si 研究は、微細素子実現のための実用的な目的のみならず、種々の量子的閉じ込め効果の実証という物性研究にとっても非常に重要である。我々は 2D-Si における量子閉じ込め効果を Raman 分光及び PL 法により実験的に実証してきた⁶⁻¹⁰⁾。

本稿では、新たに 2D-Si 物性への不純物原子¹¹⁾、及び表面酸化膜応力¹²⁾の影響を検討したので報告する。また、2D-Si の応力は UV-Raman 分光法を用い、バンド構造の変調効果は PL 評価を用いた。

材料と方法

2D-Si の形成

SOI 素子においては、 $T_s=L_{EFF}/3$ (L_{EFF} は素子のチャネル長) に従って薄膜化するだけで短チャネル効果を抑制でき、その結果、SOI 素子は将来素子としても非常に有望と言われている²⁾。しかし、 T_s の薄

膜化を続けると Si 格子定数程度まで薄膜化が進み、SOI は 2D-Si 構造となり、現在の 3D-Si とは物性が異なってくる³⁻¹⁰。従って、将来素子の特性を予測するには、本研究のような 2D-Si 構造の物性を解明する必要がある。

(100) 真性 2D-Si (2D i-Si) は、膜厚 55nm の (100)SOI 基板を酸化法による薄膜化工程により作製した⁷。また、 n^+ 及び p^+ 2D-Si は、リン及びホウ素の SiO_2/Si 界面での偏析係数の大きな違い (リンは約 10、ホウ素は約 0.1) を考慮して、それぞれ膜厚 55nm、及び 10nm の (100)SOI 基板へのリン (ドーズ量は 1.5×10^{13} から $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$) 及びホウ素 (ドーズ量は 3×10^{15} から $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$) イオンを注入し、その後の酸化法による薄膜化工程により作製した¹¹。 T_s 値は酸化時間により制御し、反射率スペクトル法により求めた⁶。全ての構造は、2D-Si 層断面の TEM 像より、均一且つ良好な結晶性を確認した。

フォノン特性は波長 325nm レーザー光を用いた Raman 分光により評価した。また、バンド構造は、エネルギー 2.33eV の励起レーザーを用いた PL 法により解析した。

図 1 は、膜厚 0.5nm の 2D- n^+ 層の断面 TEM 像である。図 1a より均一な膜厚の 2D- n^+ 層であることがわかり、図 1b より n^+ 層は単位胞の膜厚 0.54nm を実現し、かつ良好な格子スポットより結晶性が良いことが判明した。このように、高濃度のドープト

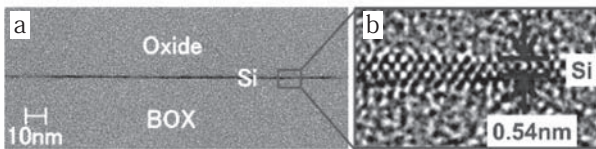


図 1. n^+ 2D-Si の広域 (a)、及び高倍の断面 TEM 写真 (b)。

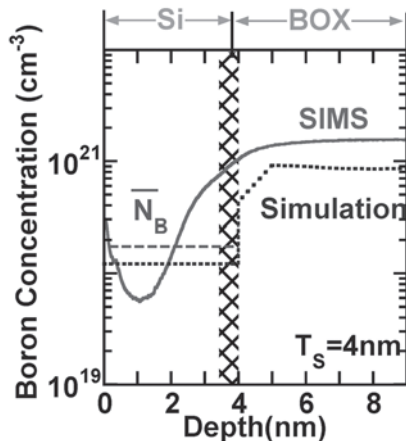


図 2. $1 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$ のホウ素イオン注入後、4nm まで薄膜化した Si 層の SIMS 分析によるホウ素濃度分布 (実線)、及びシミュレーション結果 (破線)。

を行っても、2D 化は可能である。

一方、酸化とともに減少した Si 層中のホウ素濃度の SIMS 分析結果を図 2 に示す。ホウ素は酸化膜中に拡散して Si 中の濃度は低下し、ほぼシミュレーション結果に一致している (数 10% の精度)。従って、本研究においては、不純物イオン注入、及び Si 酸化後の不純物濃度はシミュレーションにより見積もった。

結果及び討論

不純物原子による 2D-Si バンド構造の変調

図 3 に、PL スペクトルの不純物濃度依存性を示す。 n^+ 、 p^+ とも不純物濃度の増大とともに、PL 強度が低下しているのがわかる。更に、 E_G (PL 強度ピーク時の光エネルギー) は、不純物濃度の増大とともに低下していて、バンド構造自体の変調に不純物が影響していることも判明した。

更に、図 4 に E_G の不純物濃度依存性をまとめたものを示す。 n^+ 、 p^+ とも明確に E_G の低下がわかる。その不純物濃度 N 依存性は、

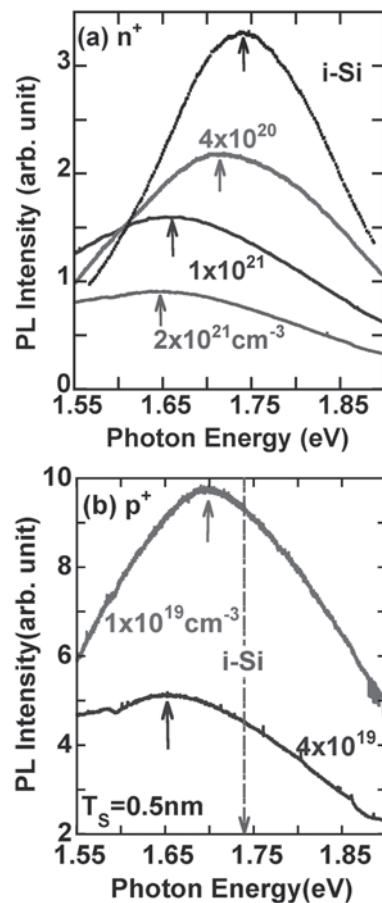


図 3. ドープト 2D-Si の PL スペクトルの不純物濃度依存性. n^+ (a)、 p^+ (b)。

$$E_G(N) = E_0 + E_1 \exp(-N/N_0), \quad (1)$$

と書け、フィットパラメータは、 n^+ の場合は、 $E_0 = 1.67\text{eV}$; $E_1 = 62.0\text{meV}$; $N_0 = 5.08 \times 10^{20}\text{cm}^{-3}$ 、 p^+ の場合は、 $E_0 = 1.68\text{eV}$; $E_1 = 53.4\text{meV}$; $N_0 = 1.09 \times 10^{19}\text{cm}^{-3}$ となる。従って、 E_0 と E_1 には n^+ と p^+ に差はないが、 N_0 は両者で約 50 倍も差がある。このように E_G の不純物濃度依存性には、 n^+ と p^+ に大きな差が生じている。図 4c に示す E_G の減少 δE_G は、 E_G ナローイング効果と考えられる。

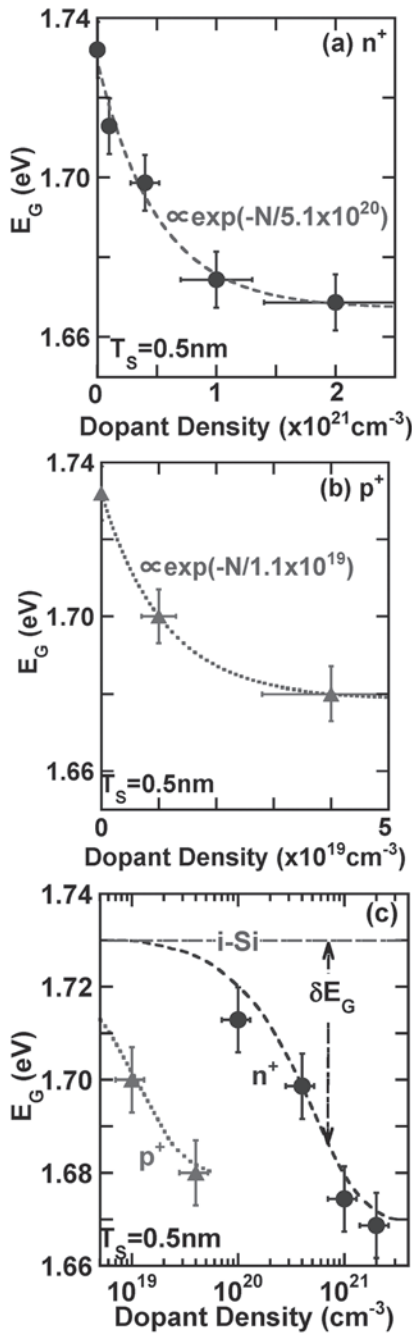


図 4. ドープド 2D-Si の E_G の不純物濃度依存性. a. n^+ の実験結果. b. p^+ の実験結果. c. 不純物広域濃度における n^+ (丸) 及び p^+ (三角) の実験結果. 破線は式 (1).

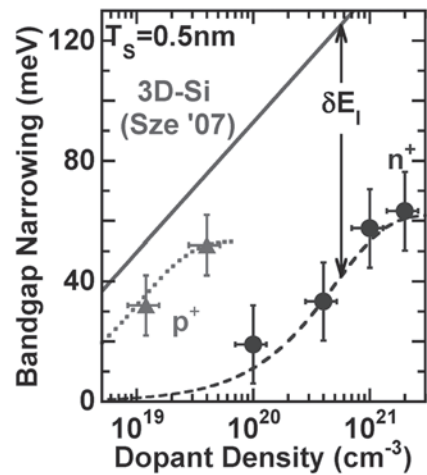


図 5. ドープド 2D-Si の E_G ナローイング効果. n^+ (丸), p^+ (三角) 及び 3D-Si (実線)¹³⁾. 破線は式 (1).

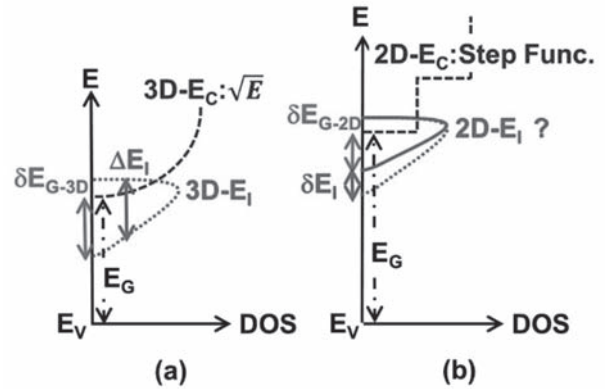


図 6. 状態密度 (DOS) を用いたバンド構造における E_G ナローイング効果の 3D(a) 及び 2D-Si(b) での物理機構モデル.

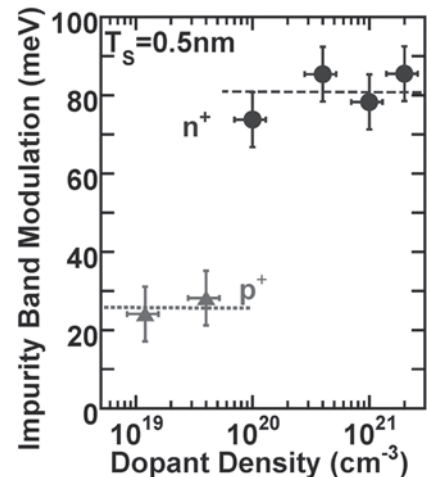


図 7. 不純物準位変調 δE_I の不純物濃度依存性. n^+ (丸), p^+ (三角).

図 5 は、 δE_G の不純物濃度依存性である。3D-Si と比較して¹³⁾、2D-Si、特に n^+ 2D-Si の δE_G が小さく、ほぼ 1/3 になっていることがわかる。これは図 6 に示す不純物バンド構造¹⁴⁾ によって説明される。

Si 中のドナー及びアクセプター不純物は Si バンドギャップ中にそれぞれ準位を形成する。図 6a に示す状態密度 (DOS) を用いた 3D-Si バンド構造のように、更に不純物濃度が増加すると、不純物準位付近に不純物バンド E_I を形成するようになる。その結果、 E_I のエネルギー幅 ΔE_I だけ E_G が低下する。これが 3D-Si における δE_G の物理機構である。一方、図 6b に示す 2D-Si においては、電子閉じ込め効果により DOS 分布が $E^{1/2}$ から階段状関数に変化し E_G が増大するが、2D-Si では ΔE_I 自体も δE_I だけ変調されて 2D-Si の δE_G ; δE_{G-2D} は低下する。

即ち、

$$\delta E_{G-2D} = \delta E_{G-3D} - \delta E_I \quad (2)$$

式 (2) を用いて、実験的に δE_I を求めることができ、その結果を図 7 に示す。 δE_I は n^+ 、 p^+ とともに不純物濃度によらず一定である。しかし、 n^+ の δE_I は p^+ の約 3 倍あり、 δE_I の物理機構は p^+ と大いに違うことがわかるが、その詳細は不明である。

以上のドープト 2D-Si の結果を用いて、将来素子の pn 接合特性の議論を行う。図 8a は、2D-Si を用いた SOI 素子断面とその E_G 分布を示している。ゲート直下は短チャネル効果抑制のため、ソース/ドレイン拡散層も含めて 2D-Si であるが、ゲート側面側のソース/ドレイン拡散層は寄生抵抗低減化のため 3D-Si である。その結果、ソースからドレインまで 3 つの異なる E_G を持つヘテロ構造となっている。式 (2) より、pn 接合のエネルギー障壁 V_{BI} は、

$$V_{BI}(N) \equiv \frac{E_{G2} + \delta E_{G2}}{2q} = \frac{E_{G2} + E_I(a \cdot \exp(N/N_0))}{2q}, \quad (3)$$

一方、旧来の 3D-Si では¹³⁾

$$V_{BI}(N) \equiv \frac{E_{G3} + \delta E_{G3}}{2q} = \frac{E_{G3} + 18.7 \ln(N/7 \times 10^{17})}{2q}, \quad (4)$$

式 (3)、(4) の計算結果を図 8b に示す。2D-Si の V_{BI} は、3D-Si と比較して約 0.3V 大きいのが、 δE_G が小さいため、不純物濃度依存性が抑制されている。また、 n^+ の場合の V_{BI} と、 p^+ の V_{BI} では、その不純物濃度依存性に違いが生じる。

よって、将来低下すると予想される低い電源電圧下では、2D-Si の pn 接合での大きな V_{BI} が問題となる。

酸化膜応力の 2D-Si バンド変調効果への影響

酸化膜と Si の線膨張率には大きな差があり、前者は後者の約 1/5 である¹²⁾。その結果、2D-Si 作成時の酸化後の降温下では、表面及び埋め込み酸化膜に挟まれた Si の格子定数は室温より大きいままで、引っ張り歪が導入される。

本研究においては、図 9 に示すように 5% の希釈 HF 液により表面酸化膜 T_{ox} の薄膜化により Si 歪の

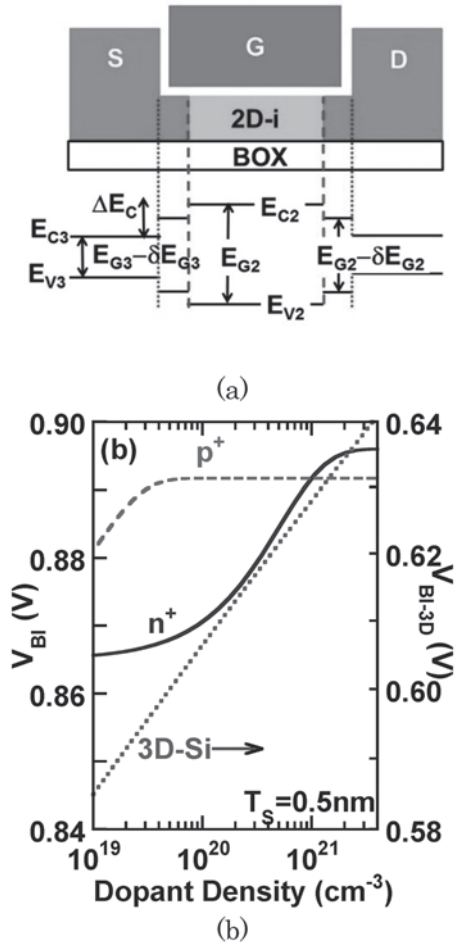


図 8. 2D-Si における pn 接合のエネルギー障壁のモデル計算. a. MOSFET 断面、及び E_G 分布模式図. b. 2D (左縦軸) 及び 3D-Si (右縦軸) におけるエネルギー障壁の不純物濃度依存性. n^+ (実線), p^+ (破線), 及び 3D-Si (点線).

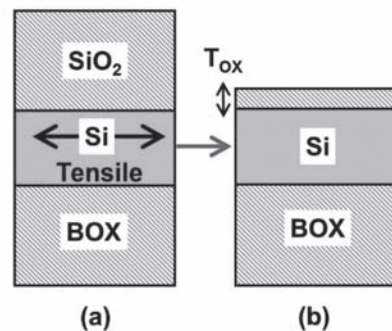


図 9. 表面酸化膜による引っ張り歪の導入 (a) と表面酸化膜のエッチングによる歪緩和 (b).

緩和を行い、2D-Si 物性の変調効果の評価を行った。

図 10a は、Si 歪の T_s 依存性のシミュレーション結果である。予想通り、 T_s 減少とともに歪増大が確認できる。更に、図 10b は、UV-Raman 分光法による 0.5nm の 2D-Si 歪の T_{ox} 依存性の実験結果である。 T_{ox} 減少とともに応力層としての酸化膜の影響が減少して、Si 歪 ϵ の緩和が実現できている。その結果、次式のように ϵ は T_{ox} 関数で表される。

$$\epsilon = 0.071 \ln(T_{ox} + 6.5) \quad (5)$$

ここで、 $T_{ox}=0$ 限界においても、 $\epsilon = 0.13\%$ であり、これは、貼り合わせ SOI 基板作成時の残留歪と思われる。

また、図 11a は、0.5nm の 2D-Si の PL スペクトルの T_{ox} 依存性の実験結果である。 T_{ox} 減少とともに、 E_G が増大していて、更に図 11b よりそれは明白である。一方、PL 強度自体に T_{ox} 依存性は無い。

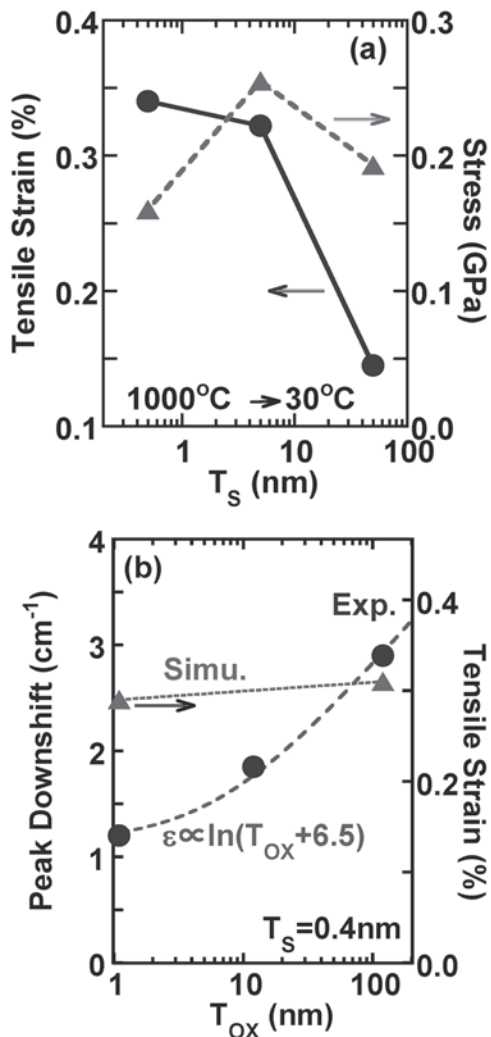


図 10 a. 引っ張り歪の Si 膜厚依存性のシミュレーション結果 (実線)。ただし、 $T_{ox}=120$ nm, $T_{BOX}=145$ nm. b. 0.5nm2D-Si のラマン分光法による引っ張り歪の表面酸化膜厚依存性の実験結果 (●)。破線は式 (6)。

ここで、図 10 と 11 から、 E_G の ϵ 依存性を求め、その結果を図 12 に示す。これには、歪が大きな 0.7% の歪 2D-Si の結果も追加してある。図 12 の E_G の ϵ 依存性は次式で良く表されるのがわかる。

$$E_G(\epsilon) = E_0 + E_1 \exp(-\epsilon / \epsilon_0) \quad (6)$$

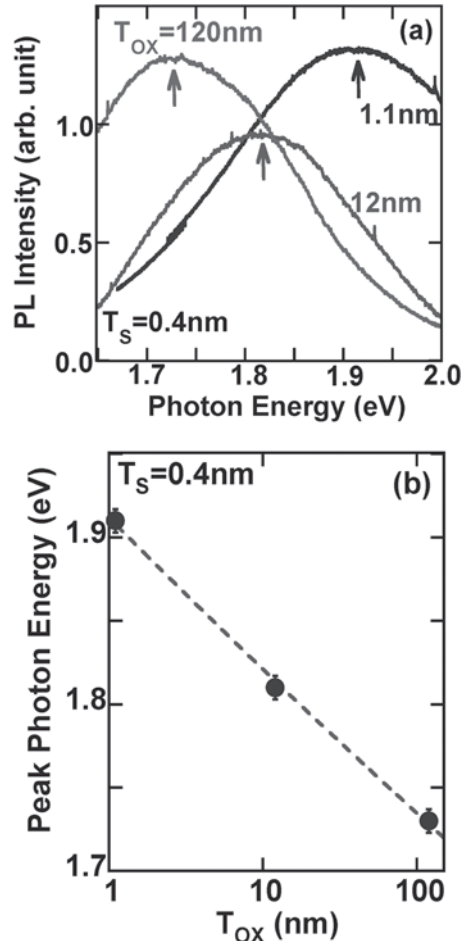


図 11. PL スペクトルの表面酸化膜厚依存性 (a) と E_G の表面酸化膜厚依存性 (b)。

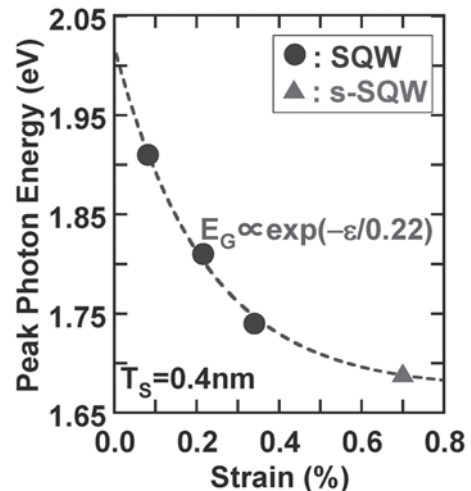


図 12. E_G の歪依存性 (●、▲)。破線は式 (6)。

ここで、フィティングパラメータ E_0 、 E_1 、及び ϵ_0 は、それぞれ 1.67eV、0.346eV、及び 0.22% である。式 (6) より、無歪状態での 2D-Si の E_G を求めることができ、その結果、2.02eV である。完全緩和した 2D-Si は、0.33% 歪んだ 2D-Si より、約 0.3eV も E_G が大きいことがわかる。これは、歪によるバンド構造調効果 (E_G ナローイング効果; $\Delta E_G(\epsilon) \equiv E_G(\epsilon) - (E_0 + E_1)$) によるもの、 ΔE_G は式 (6) より簡単に求められる。一方、3D-Si における ΔE_G はサブバンド構造のエネルギー準位の縮退が解けて分離することに起因している¹⁵⁾。

図 13 に 2D 及び 3D-Si における ΔE_G の比較を示す。2D-Si の ΔE_G は、3D-Si の数倍大きく、歪み依存性が非常に大きいことがわかる。従って、2D-Si の Δ

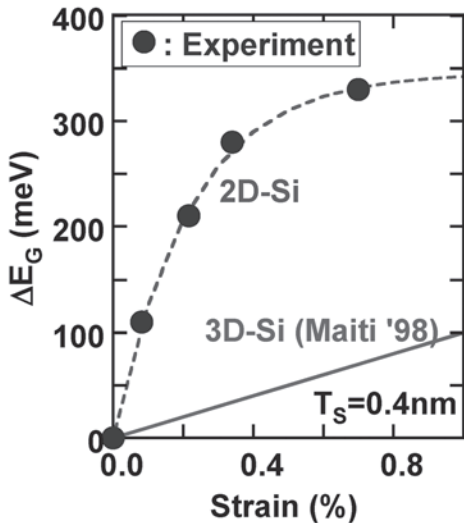


図 13. ΔE_G の歪依存性. 黒丸は 2D-Si の実験結果, 実線は 3D-Si の計算結果 ($\equiv 100 \epsilon$)¹⁵⁾. 破線は式 (7) より求められる。

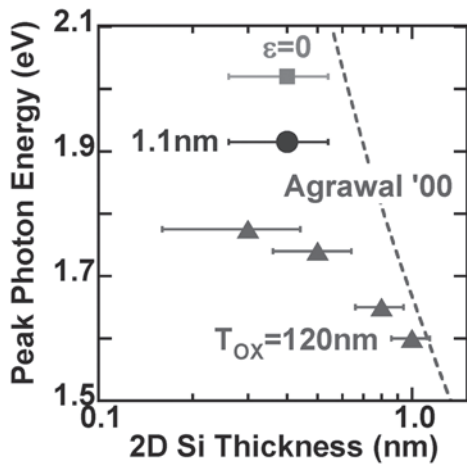


図 14. E_G の 2D-Si 膜厚依存性. 三角, 丸, 及び四角は、それぞれ、酸化膜厚 120nm, 酸化膜厚 1.1nm, 及び無歪の実験結果. 破線は理論曲線⁴⁾。

E_G の起因は、3D-Si と違っている可能性があるが、現在においては不明である。

更に図 14 は E_G の T_s 依存性である。 $T_{ox}=120nm$ の実験値は 0.8nm 以下では飽和傾向であり、理論値 (歪みを無考慮) とは T_s の減少とともに大きくずれてくる。一方、 $T_s = 0.4nm$ における $T_{ox}=1nm$ の実験値、及び歪みの完全緩和における予想値は、更に大きな E_G 値を示し、特に後者の値はほぼ理論値と一致する。このように、歪み無考慮の第一原理計算値は、歪みの完全緩和の E_G 値を良く説明できることが判明し、PL 法による E_G 値評価は妥当であることが確認できた。

結論

2D-Si 物性へのドナー及びアクセプター不純物原子、及び表面酸化膜応力の影響を実験的に研究した。

不純物原子の高濃度化とともに、2D-Si の E_G 低下のナローイング効果を 3D-Si 同様に確認できた。しかし、 n^+2D-Si のナローイング効果は、3D-Si の 1/3 程度しかないことが判明した。これは、2D-Si における不純物バンドが変調し、不純物バンド幅が縮小したためと思われる。

一方、酸化膜と Si の膨張率の違いにより、Si 酸化後の降温時に Si には引っ張り歪が発生することを Raman 分光で明らかにした。その結果、表面酸化膜厚 T_{ox} に依存した 2D-Si の E_G を PL 法により確認した。その結果、 T_{ox} の減少にともなう 2D-Si の歪の緩和により、 E_G の増大効果を明確にした。しかも、2D-Si の E_G の歪依存性は、3D-Si の場合の数倍にも達することも確認できた。しかし、その物理機構の解明は今後の課題である。

謝辞

イオン注入に関して、理学部の中田穰治教授及び星野靖特別助教に感謝いたします。本研究の一部は、総合理学研究所共同研究助成金 (RIIS201401)、及び科研費 (24560422) の援助を受けた。

文献

- 1) Saito S, Sakuma N, Suwa Y, Arimoto H, Hisamoto D, Uchiyama H, Yamamoto J, Sakamizu T, Mine T, Kimura S, Sugawara T, Aoki M, and Onai T (2008) Observation of optical gain in ultra-thin silicon resonant cavity light-emitting diode. In: *IEDM Tech. Dig.* Paper 19.5, pp.1-4.
- 2) Nazarov A, Colinge JP, Balestra F, Raskin JP, Garmiz F and Lysenko V. S. (2011) *Semiconductor-On-Insulator Materials for Nanoelectronics Applications*. Springer, Berlin.
- 3) Uchida K, Koga J and Takagi S (2007) Experiment-

- tal study on electron mobility in ultrathin-body silicon-on-insulator metal-oxide-semiconductor field-effect transistors. *J. Appl. Phys.* **102**:1-8 (074510).
- 4) Agrawal BK and Agrawal S (2000) First-principles study of one-dimensional quantum-confined H-passivated ultrathin Si films. *Appl. Phys. Lett.* **77**:3039-3041.
 - 5) Kumar V (2008) *Nanosilicon*. Elsevier, Amsterdam.
 - 6) Mizuno T, Tobe K, Maruyama Y and Sameshima T (2012) Experimental study of silicon monolayers for future extremely thin silicon-on-insulator devices: phonon/band structures modulation due to quantum confinement effects. *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**:1-8 (02BC03).
 - 7) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on surface-orientation/strain dependence of phonon confinement effects and band structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **52**:1-8 (04CC13).
 - 8) 水野智久, 青木 孝, 鮫島俊之 (2013) 低次元シリコン半導体構造の研究, *神奈川大学理学誌* **24**:17-24.
 - 9) Mizuno T, Nagata Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Crystal direction dependence of quantum confinement effects of two-dimensional Si layers fabricated on silicon-on-quartz substrates: modulation of phonon spectra and energy-band structures. In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**:1-6 (04EC08).
 - 10) Mizuno T, Nakahara Y, Nagata Y, Suzuki Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Quantum confinement effects in doped two-dimensional Si layers: novel device design for two-dimensional pn-junction structures, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**:1-7(4EC09).
 - 11) Mizuno T, Nagamine Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Sameshima T (2015) Impurity doping effects on impurity band structure modulation in two dimensional n+ and p+ Si layers for future CMOS. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**:1-6 (04DC05).
 - 12) Mizuno T, Suzuki Y, Nagamine Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Maeda T (2015) Surface-oxide stress induced band-structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**:1-6 (04DC02).
 - 13) Sze SM and Ng KK (2006) *Physics of Semiconductor Devices*. Wiley, New York.
 - 14) Lee DS and Fossum JG (1983) Energy-band distortion in highly doped silicon. *IEEE Trans. Electron Devices.* **30**:626-634.
 - 15) Maiti CK, Bera LK and Chattopadhyay S (1998) Strained-Si heterostructure field effect transistors. *Semicond. Sci. Technol.* **13**:1225-1246.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

Q&A コミュニティに注目したブラウジング行動に基づく 検索満足度の予測分析

韓 浩^{1,2,4} 郭 俊霞³ 中山 堯^{1,2}

Prediction of Query Satisfaction Based on
CQA-Oriented Browsing Behaviors

Hao Han^{1,2,4}, Junxia Guo³ and Takashi Nakayama^{1,2}

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

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

³ College of Information Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, China

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

Abstract: Browsing satisfaction with community-based websites has been studied mainly based on webpage content. In this paper, we exploratorily analyzed the factors affecting the browsing behaviors of client users to predict the query satisfaction level in a Community-based Question Answering (CQA) website. The results revealed that different categories of information are affected by different factors, and suggest that considering the factors affecting browsing behaviors could improve the accuracy of predicting query satisfaction.

Keywords: web browsing behavior, community-based question answering, query satisfaction

序論

一般的な検索エンジンとは異なり、コミュニティベースのウェブサイトは柔軟な内部の検索機能（サイト特定検索エンジン）を提供することで、特定の検索により有効に対応できる可能性がある。しかし、ユーザの検索要望を満足させることができない不適切なクエリ結果が得られることも稀ではない。なお、有効性が低い理由は、必ずしも明白ではない¹⁾。

内容の質およびクエリ関連性は、コミュニティベースのウェブサイトの検索メカニズムにおける重要な側面である。ここでは、コミュニティベースの質問と回答（CQA）データおよびブラウジングログの解析について注目する。Yahoo！Japan 知恵袋などの CQA ウェブサイトは、明確に構造化され、同様のレコードフォーマットを使用しており、ウェブページの内容の質の研究に使用することが可能である。さらに、クライアントユーザのブラウジング行動は、CQA ウェブサイトの検索機能を最適化するためのコンテキストに注目した情報を提供する可能性がある。ウェブブラウジングログと呼ばれるクライアント側ウェブログは、ウェブページアクセスおよび情報検

索などの一連の連続したレコードから構成される。

本論文では、CQA データとブラウジングログの統合に基づくクエリ満足度モデルフレームワークを提示する。クエリ満足度レベルを探索的に解析し、CQA データおよびブラウジングログから抽出された多様な特徴の調査に基づき、ユーザのクエリ満足度を予測するための新たなコンテキストに注目したアプローチを開発する。

本論文の以降の構成は次の通りである。「データセット」では、ユーザのブラウジング行動のデータセットについて紹介する。「満足度レベルの要素」では、クエリの満足度レベルの評価に使用する素性を詳細に示す。Yahoo！知恵袋のいくつかのカテゴリにおける満足度レベルの包括的な実験的解析を実施し、低満足度レベルまたは不満の主な理由を「実験および解析」に記載する。「関連研究」では、関連研究について述べる。最後に、「結論」において、本論文の結論と今後の研究について述べる。

方法

データセット

データセットには、ネット閲覧データおよびYahoo!知恵袋データを使用する。ネット閲覧データは、ウェブページアクセスのブラウジングログであり、研究調査目的で収集して提供されている。これには、様々な地域からの年齢、性別、教育、婚姻、職業、収入の異なる24,498名のパネルユーザによる81,168,263件のウェブページアクセスレコードが含まれる。パネルユーザの個人情報を守るため、URLに含まれるユーザ名やIDパラメータなどの個人情報は事前に削除されている。各レコードには、パネルユーザのID、アクセス時間、滞在時間(秒単位)、アクセスURLおよびリファラURL(存在する場合)が含まれる。リファラURLは、ユーザが直前にアクセスしていたウェブリソースであり、現在のURLがエントリログに記録されているリソースである。リファラURLは、ログ内の連続的なイベントのストリームを追跡するために使用される。

ブラウジングログは、各ユーザで独立しているため、データをパネルユーザIDごとに分け、アクセス時刻でソートした。これらの連続レコードがツリー構造にマップ可能であれば、各ユーザのブラウジングログは、複数ツリーから構成されるか、フォレスト構造を有する。フォレスト構造では、各ブラウジングレコードはノードとなる。その後、クエリプロセスに関連するレコードをフィルタし、リファラURLとアクセスURLをマッチングさせ、セッション特性²⁾ごとに独立したクエリプロセス/セッションに分離する。

実験対象のCQAウェブサイトとしてはYahoo!知恵袋を利用した。データ処理後、120,182件のYahoo!知恵袋に関連したクエリプロセスが得られた。XPathパターンに基づく抽出方法を使用してYahoo!知恵袋ウェブページからテキストコンテンツと非テキストコンテンツを抽出した。テキストコンテンツには、掲載された質問と回答のテキストなどのウェブページの主テキスト部が含まれる。非テキストコンテンツには、テキストの長さ(単語数)および回答者のグレードなどの関連統計データが含まれる。

満足度レベルの要素

ユーザのクエリ満足度レベルの評価は、分類タスクの一種とみなすことができる。したがって、満足度レベルの予測フレームワークの確立には、機械学習の手法を使用する。これらの方法を利用する上で最も重要な手順の1つは、評価および予測に使用する

ために最も効果的なフィーチャー(特徴要素)を選択することである。ユーザのブラウジングログおよび関連CQAウェブページの解析に基づき、フィーチャーを、CQAページ非テキストに関連するフィーチャー、クエリに関連するフィーチャー、およびユーザブラウジング行動に関連するフィーチャーの3つのカテゴリに分類する。

Yahoo!知恵袋ウェブページは、掲載された質問、回答、ユーザ関連情報(例:グレード)、回答投票情報、回答評価などを含め、同じデータ構造を使用している。CQAデータについて実施した手動解析および既存研究に基づき、表1に示す通り、知恵袋ウェブページの非テキストコンテンツを示す12のフィーチャーを選択する。

上述の分離したクエリプロセスの解析に基づき、「クエリキーワードと質問およびベストアンサーのテキストの関連度」、「クエリキーワードと質問のテキストの関連度」、「クエリキーワードと質問のタイトルの関連度」および「クエリキーワードの長さ(助詞を除くクエリキーワードの単語数)」の4つのクエリに関連するフィーチャーが選択された。これらの関連度(関連性の値)は、日本語形態素解析器Juman¹に基づくTF-IDFによって算出される。あるYahoo!知恵袋ウェブページにおいては頻繁に現れ、他ウェブページにおいてはまれにしか現れない単語には、より高いTF-IDF値が付与される。

表1. 知恵袋ウェブページの非テキスト特徴

名 称	型
質問の長さ(質問テキストの単語数)	整数
ベストアンサーの長さ(ベストアンサーのテキストの単語数)	整数
回答の平均的な長さ(質問に対する回答の平均単語数)	浮動小数点数
ベストアンサー回答者のグレード(ベストアンサーに指定された回答者のユーザグレード)	列挙型(0-7)
回答者平均グレード(回答者の平均ユーザグレード)	列挙型(0-7)
最高グレード回答(グレードが最高であった回答)	列挙型(0-7)
お礼のコメントの有無(質問者が回答/回答者にコメントしているか否か)	はい/いいえ
役に立ったと評価された回数(「ナイス!」ボタンがクリックされた回数)	整数
評価(質問者の評価)	列挙型(0-5)
回答数(回答の数)	整数
閲覧者数(ウェブページ閲覧者の数)	整数
掲載からベストアンサーが得られるまでの期間(回答の掲載からベストアンサーまでの日数)	浮動小数点数

¹ <http://nlp.ist.i.kyoto-u.ac.jp/EN/index.php?JUMAN>

さらに、同様に、表 2 に示す通り、ユーザブラウジング行動の 7 つのフィーチャーを選択する。ここでは、ユーザがウェブページの情報を深く読んでいるか（関心の程度）を反映するブラウジング速度の測定に「ウェブページ平均滞在時間」を使用する。これらのフィーチャーは、ユーザの活動を様々な観点から反映する。

表 2. ユーザブラウジング行動の特徴

名 称	型
ウェブページ平均滞在時間 滞在時間 (秒) $\frac{\text{質問の長さ} + \text{回答の長さ}}{\text{質問の長さ} + \text{回答の長さ}}$	浮動小数点数
ウェブページにおいてクリックされた 推奨リンク (推奨ウェブページへのリ ンクのクリックの有無)	イエス/ノー
回答においてクリックされたリンク (回答に埋め込まれたリンクのクリッ クの有無)	イエス/ノー/ナル
クエリの最後か (クエリプロセスが終 了するか)	イエス/ノー
同一または同様クエリの実行 (類似ま たは同一クエリキーワードによる他の クエリの要求の有無)	イエス/ノー
合計ブラウジングページ数 (クエリプ ロセスにおいて閲覧されたウェブペ ージ総数)	整数
ユーザ検索エンジンクエリ回数 (ク エリプロセスにおいて検索エンジンに 送信された要求の数)	整数

結果と討論

クエリに対するユーザの満足度を予測するためには、満足度スコアの付与されたトレーニングデータが必要である。主観性を避けるため、複数チェックのメカニズムが使用された。3名の評価者は、それぞれ、以下の質問について、1,500件のレコードにスコアの付与を行った。3名の評価者における一致度の測定には Fleiss の Kappa 係数³⁾が使用された。

- 「このページの情報の良さについてどう思うか？ (良い、普通、良くない、分からない)。」この質問では、このウェブページの回答が質問者にとって特定のレベルで役立つかを検討する。
- 「検索キーワードとこのページの質問およびベストアンサーとの関連性のレベルは？ (良く一致している、ある程度一致している、一致していない、分からない)。」この質問は、ウェブページに対する不満が関連性の低さに起因するかを学習するために使用する。
- 「このウェブページの情報は古くないか？」この質問は、クエリ実行時点で古く、使えない情報を特定するために設計されている。
- 「このウェブページがクエリプロセスにおいてユーザを満足させたと思うか？ (満足させる、あ

る程度満足させる、あまり満足させない、満足させない、分からない)。」

質問 4 において「分からない」と評価されたレコードの除外後、その後の解析および実験のために残された有効なレコードは 1,486 件である。Fleiss の Kappa 係数の値は 0.25 であり、評価者間における「まずまずの一致」と判断される [3]。評価された結果の一貫性を考慮し、4 クラス分類問題を 2 クラス分類問題に変換し、「ある程度満足させる」を「満足させる」へ、そして「あまり満足させない」を「満足させない」へ統合する。その後、Fleiss の Kappa 係数の値は 0.477 となり、「中等度の一致」と判断される。これは、2 クラス分類の評価された結果が一貫性および信頼性を反映することを示す。

機械学習アルゴリズムは、特定の問題により適している傾向がある。たとえば、ナイーブベイズは特徴間における強い独立性を仮定し、アダブーストはノイズが多いデータおよびアウトライヤーに対する感度が高い。したがって、本実験では Weka²⁾ を利用し、「満足度レベルの要素」において説明されるフィーチャーについて C4.5、SVM (サポートベクターマシニング)、ナイーブベイズ、ロジスティックおよびアダブーストを使用する。ここでは、ユーザブラウジング行動の特徴の影響および有効性を検討するため、複数のフィーチャーのセットを使用する。ユーザブラウジング行動のフィーチャーなしでの結果を表 3 に示す。ユーザブラウジング行動のフィーチャーありでの結果を表 4 に示す。これらの結果は、とくに、C4.5 およびアダブーストモデルにおけるユーザブラウジング行動のフィーチャーの重要性を明確に示す。

表 3. ユーザブラウジング行動のフィーチャーなしでの分類結果

方法	精度	再現率	F 値	ROC 領域
C4.5	0.555	0.578	0.565	0.617
SVM	0.577	0.598	0.583	0.627
ナイーブベイズ	0.6	0.623	0.606	0.687
ロジスティック	0.556	0.555	0.555	0.635
アダブースト	0.552	0.6	0.57	0.652

表 4. ユーザブラウジング行動のフィーチャーありでの分類結果

方法	精度	再現率	F 値	ROC 領域
C4.5	0.776	0.835	0.803	0.858
SVM	0.729	0.745	0.727	0.764
ナイーブベイズ	0.702	0.743	0.721	0.849
ロジスティック	0.697	0.685	0.691	0.782
アダブースト	0.784	0.845	0.811	0.834

²⁾ <http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>

CQA ウェブサイトでは、質問はいくつかのカテゴリに分類されており、Yahoo!知恵袋には16個の主要なカテゴリがある。各カテゴリには、情報の質に影響し、クエリプロセスに対する満足度レベルに差を生じさせる異なる特性がある。クエリプロセスでは246,559個のYahoo!知恵袋ウェブページが特定された。表5に示す通り、カテゴリによって満足度が異なることがわかる。満足度は、「インターネット、PCと家電」カテゴリで最も高く、「ニュース、政治、国際情勢」で最も低い。カテゴリによって特性、ユーザグループ、そして、時間感度が異なるため、他カテゴリの満足度は30%～40%程度である。

表5. Yahoo!知恵袋カテゴリにおける満足度

カテゴリ	数	パーセント	カテゴリ	数	パーセント
エンターテインメントと趣味	58846	35.3	職業とキャリア	9343	37.5
暮らしと生活ガイド	27128	35.8	地域、旅行、お出かけ	9654	35.8
健康、美容とファッション	25125	38.3	ビジネス、経済とお金	9397	36.7
インターネット、PCと家電	22205	40.4	マナー、冠婚葬祭	4450	37.1
スポーツ、アウトドア、車	15731	33.3	Yahoo! JAPAN	3563	33.6
生き方と恋愛、人間関係の悩み	20988	30.1	ニュース、政治、国際情勢	4521	22.4
子育てと学校	14886	34.2	コンピュータテクノロジー	660	36.8
教養と学問、サイエンス	13892	31.6	その他	6098	35.6

注:「数」=ウェブページの数、「パーセント」=満足したユーザの割合。

関連研究

ランキングは、検索エンジンのコア検索機能を構成し、通常、クエリに対する応答として、上位コンテンツ項目のリストを提供する。CQAのコンテキストでは、ランキングは、カテゴリや公開時期などの関連性以外の要素を考慮しなければならない。異なる基準を使用した異なるランキングを組み合わせるアプローチが特に注目される。Chelaruらは、感情分類器に基づき、クエリ推薦のためのクエリおよびトレンド解析（検索エンジンのユーザにおいて肯定的および否定的見解につながる未知のトピックの特定）における感情を検出および解析した⁴⁾。

より最近では、検索インタフェースおよびコンテンツに関するクエリ行動を理解するためにクエリログ解析が実施されている。本試験では、セッション特性の解析などの同様の方法を使用する²⁾。Kumarらは、Yahoo!システムからのログを使用した検索およびツールバーデータに関する大規模なユーザ行動試験を実施し、コンテンツおよび検索に基づくブラウジングページ閲覧の分類を提案した。そして、ペ

ージ閲覧の約半数がコンテンツカテゴリであり、1/3がコミュニケーションカテゴリであることを示した⁵⁾。Chengらは、ページ閲覧の主な種類を特徴付けるためにユーザ試験を実施し、ブラウジング行動を考慮することでユーザの検索目的を予測する方法を提示した。そして、ツールバーデータを使用したクエリの順位付けに機械学習アプローチを使用した⁶⁾。Aikawaらは、Yahoo!知恵袋を対象とした実験に基づき、主観的/客観的質問分類タスクを定義したが、これには、n-グラムまたは最大反復特徴によるナイーブベイズを使用した⁷⁾。

しかし、ユーザの検索エンジンに対する満足度、そして、検索エンジンの使用において遭遇する困難について理解するための研究はほとんど行われていない。このため、検索エンジンに対するコンテキストに注目したクエリ満足度の詳細な解析が必要であると考える。

結論

本論文では、ブラウジング行動フィーチャーの有効性の解析に基づくYahoo!知恵袋のクエリ満足度レベルの探索的予測手法を提示し、24,498名のパネルユーザによって実行された120,182件のクエリプロセスのデータセットに基づく実験を介して様々なカテゴリの満足度を示した。また、これらの差に関する潜在的な理由について説明し、予測結果に基づくフィーチャーの有意性について検討した。

今後は、時間に影響される要素の詳細解析を実施したいと考えている。検索エンジンを時間要素に注目して最適化するため、ウェブ情報の「賞味期限」の値を算出することなどが研究予定である。

謝辞

本研究は、2014年度総合理学研究所共同研究の研究助成(RIIS201408)を受けて行いました。厚く御礼申し上げます。また、実験に協力頂いた関係各位に感謝します。

文献

- 1) Ohshima H, Jatowt A, Oyama S, Nakamura S and Tanaka K (2009) Towards improving web search: A large-scale exploratory study of selected aspects of user search behavior. In: *Proceedings of the 10th International Conference on Web Information Systems Engineering*. pp.379-386.
- 2) Guo J, Gao C, Xu N, Lu G and Han H (2013) Analyzing query trails and satisfaction based on browsing behaviors. In: *Proceedings of the 10th Web Information System and Application Conference*. pp.107-112.

- 3) Sim J and Wright CC (2005) The Kappa statistic in reliability studies: Use, interpretation, and sample size requirements. *Physical Therapy* **85**: 257-268.
- 4) Chelaru S, Altingovde IS, Siersdorfer S and Nejd W (2013) Analyzing, detecting, and exploiting sentiment in web queries. *ACM Transactions on the Web* **8**: 6.
- 5) Kumar R and Tomkins A (2010) A characterization of online browsing behavior. In: *Proceedings of the 19th International Conference on World Wide Web*. pp.561-570.
- 6) Cheng Z, Gao B and Liu T-Y (2010) Actively predicting diverse search intent from user browsing behaviors. In: *Proceedings of the 19th International Conference on World Wide Web*. pp.221-230.
- 7) Aikawa N, Sakai T and Yamana H (2011) Community QA question classification: Is the asker Looking for subjective answers or not? *IPSJ Transactions on Databases* **4**: 1-9.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ヒスチジンを中心とした塩基性アミノ酸を配位子とする ポリマー性銀 (I) 錯体の合成、構造解析及び抗菌活性

力石紀子¹ 野宮健司^{1,2} 松永 諭¹ 両角宗一郎¹ 高山晃彦¹
高木由貴¹ 井上ちさと¹ 柳田貢助¹ 吉川理絵¹

Synthesis, Structure and Antimicrobial Activity of Silver(I) Coordination
Polymers with Histidine and Other Basic Amino Acid Ligands

Noriko Chikaraishi Kasuga¹, Kenji Nomiya^{1,2}, Satoshi Matsunaga¹,
Soichiro Morozumi¹, Akihiko Takayama¹, Yoshitaka Takagi¹, Chisato Inoue¹,
Kousuke Yanagita¹ and Rie Yoshikawa¹

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

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

Abstract: The coordination environment of Ag⁺, i.e., not only the atom coordinated with the silver(I) ion, but also the structure around the silver(I) ion and the ease of ligand replacement, plays an important role in the antimicrobial activities of silver(I) complexes. Water-soluble neutral and anionic silver(I) complexes with histidine (*D*-1, *L*-1 and *L*-4) and water-insoluble ones (*D*-2, *L*-2 and *DL*-3) were prepared depending on the reaction conditions, including the reaction time and pH. They exhibited a wide spectrum of effective antimicrobial activities against both Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) bacteria as well as yeasts (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*). Various structures of silver(I) complexes with basic amino acids suggest that histidine as well as arginine and lysine residues can uptake silver(I) ion in peptides and proteins and transfer metal ions outside the cell depending on local proton concentrations in the cell.

Keywords: Silver(I) complexes, basic amino acid, histidine, antimicrobial activity, EXAFS, ESI-MS

序論

金属イオンは生体内で様々な重要な役割を果たしているとともに、医薬品やMRI造影剤などの病態診断として重要な無機化合物や金属錯体も数多く存在する^{1,2)}。

生理活性を示す無機化合物として、無機系抗菌剤の一群がある。やけど、褥瘡、皮膚潰瘍の外用感染治療薬として、銀化合物を含む塗り薬がある（スルフジアジン銀 (I) (silver sulfadiazine) (Fig. 1))。

無機系抗菌剤の一般的な特徴として、広範な抗菌スペクトルを示すこと、古くから用いられているため安全性が高いとされていること、有機抗菌剤より熱に安定であることが挙げられる。

無機抗菌性化合物の応用分野は、水処理、家庭用

品への抗菌性付加、繊維製品の抗菌、防臭加工、生活資材、機械・器具、土建・塗料と広い。無機抗菌性化合物は、1) 光触媒機能を持つ酸化チタン及び2) ケイ酸塩、リン酸塩に銀、銅、亜鉛イオンを担持させたものに大別されている³⁾。

我々は、これまで無機系抗菌剤の中で、広い抗菌

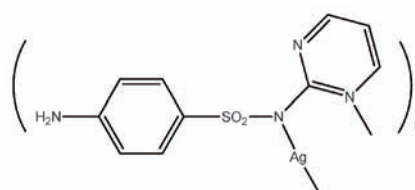


Fig. 1. Silver sulfadiazine.

スペクトルを持つ銀(I)錯体に着目してきた。銀(I)イオンは膜結合型酵素のチオール基と銀(I)イオンが結合し、それらの酵素に影響すると言われているが、詳細は明らかになっていない⁴⁾。銀(I)イオンに有機化合物が配位した銀(I)錯体の抗菌作用については、さらに不明である。そこで、高純度の新規銀(I)錯体を合成し、分子構造決定後、実用的に抗菌作用が望まれているバクテリア (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*)、酵母 (*C. albicans*, *S. cerevisiae*)、カビ (*A. brasiliensis (niger)*, *P. citrinum*) を選んで、それらの抗菌活性評価を最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC $\mu\text{g/mL}$) により行ってきた。供与原子 (O, N, P, S) ごとに銀(I)錯体を分類し、配位子の交換しやすさと抗菌活性の相関を調べてきたところ、配位子交換性が高い Ag-N, Ag-O 結合性の銀(I)錯体が、Ag-S, Ag-P 結合性銀(I)錯体よりも抗菌スペクトルが広く、優れた抗菌活性を示す⁵⁾。

以上から、タンパク質を構成する α アミノ酸を配位子とする銀(I)錯体は関心が持たれるが、これまで光に不安定な銀(I)錯体が多く、単離が難しいとされてきた。原料の銀塩として酸化銀を用いることにより、いくつかのホモレプティックな中性の銀(I)アミノ酸錯体 ($\infty\{[\text{Ag}(\text{DL-Hasp})]_2\} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ アスパラギン酸 (H_2asp)、 $\infty\{[\text{Ag}(\text{L-asn})]\}$ アスパラギン (Hasn) を単離し、報告してきた^{5), 6)}。S 原子を含まない中性、酸性のアミノ酸銀(I)錯体は、 α 炭素のアミノ基、カルボキシル基と、酸性官能基の供与原子が銀(I)イオンに配位する。銀(I)イオンに配位するのは窒素原子と酸素原子であるが、配位様式は4種類ある。i) 2つの Ag...Ag を2つの COO^- が架橋する様式、ii) Ag に2つの供与原子が O-Ag-O, N-Ag-N で連結する直線2配位と、iii) Ag に2つの供与原子が O-Ag-N で連結する直線2配位、iv) 窒素原子のみで連結する直線2配位である (Fig. 2)。

α アミノ酸の中で、側鎖、置換基 R が、イミダズリルメチル基、3-グアニジノプロピル基、4-アミノブチル基を持つヒスチジン、アルギニン、リシンは、塩基性アミノ酸に分類される。塩基性アミノ酸を配位子とした銀(I)錯体は、pH により塩基性官能基がアニオン、中性、カチオンすべての状態をとることが可能であることから、中性、酸性のアミノ酸配位子からなる銀(I)錯体より多様な結合様式を持つ銀(I)錯体が形成されることが予想される。今回はそのような配位子としてヒスチジン (Fig. 3)⁷⁾ に着目し、条件により多様なヒスチジン銀(I)錯体が形成されることを明らかにし、抗菌活性試験結果とともに報告する。また関連のあるアルギニン銀(I)錯体について

も分子構造、抗菌活性について触れる。

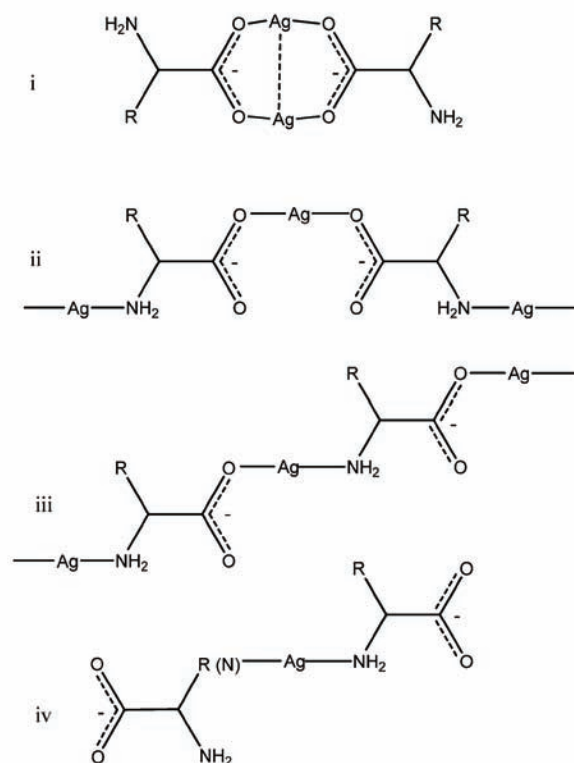


Fig. 2. Classification of silver (I) complexes with amino acid ligands with N and O donor atoms and without an S atom.

材料と方法

材料

Ag_2O 、 AgNO_3 、ヒスチジン (H_2his)、アルギニン (Harg)、リシン (Hlys)、 EtOH 、 D_2O は市販品をそのまま用いた。

水溶性 *D*-または *L*-ヒスチジン銀(I)錯体 $\infty\{[\text{Ag}(\text{D-Hhis}) \cdot 0.2\text{EtOH}]_2\}$ (*D*-1)、 $\infty\{[\text{Ag}(\text{L-Hhis}) \cdot 0.2\text{EtOH}]_2\}$ (*L*-1)、水に不溶性 *D*-または *L*-ヒスチジン銀(I)錯体 $\infty\{[\text{Ag}(\text{D-Hhis})]\}$ (*D*-2)、 $\infty\{[\text{Ag}(\text{L-Hhis})]\}$ (*L*-2)、水に不溶性 *DL*-ヒスチジン銀(I)錯体 $\infty\{[\text{Ag}_2(\text{D-Hhis})(\text{L-Hhis})]_2\}$ (*DL*-3)、粘性の $\infty\{\text{Na}[\text{Ag}_3(\text{L-Hhis})_2]\}$ (*L*-4) はスキーム (Fig. 4) に従って合成した。

アルギニン銀(I)錯体は硝酸銀とアルギニンを水中

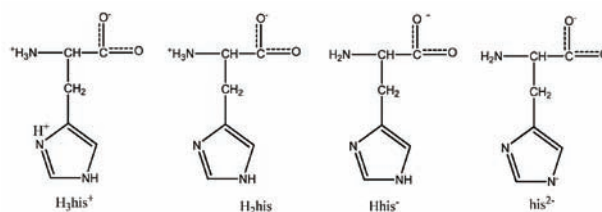


Fig. 3. Various structures of histidine (H_2his).

で1:1のモル比で反応させpHを調整後、有機溶媒に沈殿させて得た。

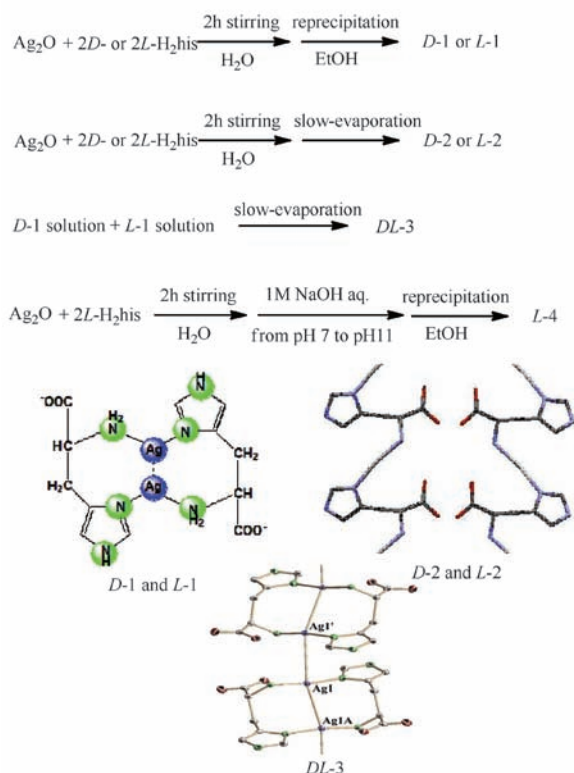


Fig. 4. Synthetic diagram of silver(I) complexes with histidine ligand.

測定方法

CHN 元素分析は Perkin-Elmer PE2400series II CHNS/O を用いた。熱分析データ (TG/DTA) は Rigaku Thermo Plus 2 TG 8120 を使用し、30 °C から 500 °C まで 1 分間に 4 °C 温度上昇させながら測定した。赤外吸収スペクトルは日本分光 FT-IR 4100 で測定した。¹H, ¹³C NMR スペクトルは日本電子 ECP300 または ECP500NMR 装置で DSS を内部標準として測定した。単結晶 X 線構造解析は Bruker SMART APEX CCD または Rigaku Saturn CCD 回折計と解析ソフトウェア SHELX-TL または Yadokari-XG2009 を使用した。ESI-MS および ESI-MS スペクトルは日本電子 JMS-T100LC で測定した。粘度計は東機産業の TVC-5 粘度計を用いた。XANES と EXAFS 測定は東レリサーチセンターに依頼した。

バクテリア (グラム陰性菌の大腸菌 (*E. coli*), 緑膿菌 (*P. aeruginosa*)) グラム陽性菌の枯草菌 (*B. subtilis*), 黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の 4 種類)、酵母 (*C. albicans*, *S. cerevisiae* の 2 種類)、カビ (*A. brasiliensis*, *P. citrinum* の 2 種類) に対する最少発育阻止濃度 (MIC, $\mu\text{g/mL}$ または mmol/L) 測定は秦

野食品安全センターに依頼した⁸⁾。

結果

中性のヒスチジン銀 (I) 錯体 L-1, D-1, D-2, L-2, DL-3

中性のヒスチジン銀 (I) 錯体は、いずれもイミダゾール環とアミノ基の窒素原子が銀イオンに配位した type IV の配位様式をとっていた。副生成物は水以外なく、粉体では銀 (I) 錯体はほぼ定量的に得られる。結晶化しても 50% ほどの収率で単結晶が生成した。D-1 と L-1 を混合すると DL-3 が生成したことから、水溶液中で Ag-N 結合は交換可能であることが示された⁹⁾。

アニオン性のヒスチジン銀 (I) 錯体 L-4

L-1 の水溶液は pH が 7 (中性付近) であるが、1M NaOH 水溶液を加え、アルカリ性になると粘性がでてきた。エタノールに再沈殿するとナトリウムを含む吸湿性の粉体が得られた。粉末 X 線回折装置ではシグナルが現れなかったことから、アモルファスな物質であり、元素分析、ESI-MS (Fig. 5) の結果から $\text{Na}^+ : \text{Ag}^+ : \text{his}^2 = 1 : 3 : 2$ の組成であることが示された。他のアルカリ金属塩 (Li, K, Cs 塩) の調製も行ったが、ナトリウム塩の純度が一番高かったので、ナトリウム塩のキャラクタリゼーションを行った¹⁰⁾。

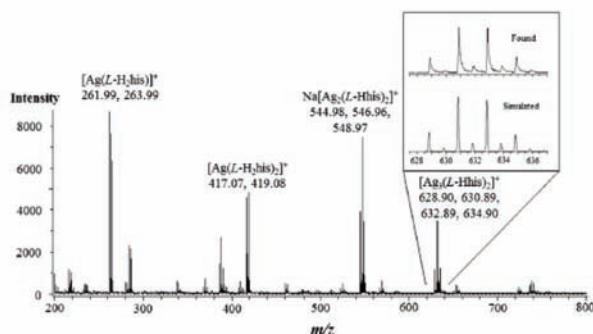


Fig. 5. Positive-ion ESI-MS of an aqueous solution of L-4.¹⁰⁾

討論

アニオン性のヒスチジン銀 (I) 錯体 L-4 の構造

元素分析や MS より銀 (I) の 3 核錯体であること、また XRD の結果から L-4 はアモルファスであることがわかった。構造に関する情報は NMR と EXAFS, EXAFS (Fig. 6) から得た。それらの結果からアニオン性ヒスチジン銀 (I) 錯体は、Ag-Ag 結合を含むポリマーであることが示唆された。配位供与原子はヒスチジンの窒素原子と水分子の酸素原子が考えられ、溶液の濃度、アルカリ金属イオンの濃度により Fig.

7のいずれか、または2つの構造が混在していると推定される。

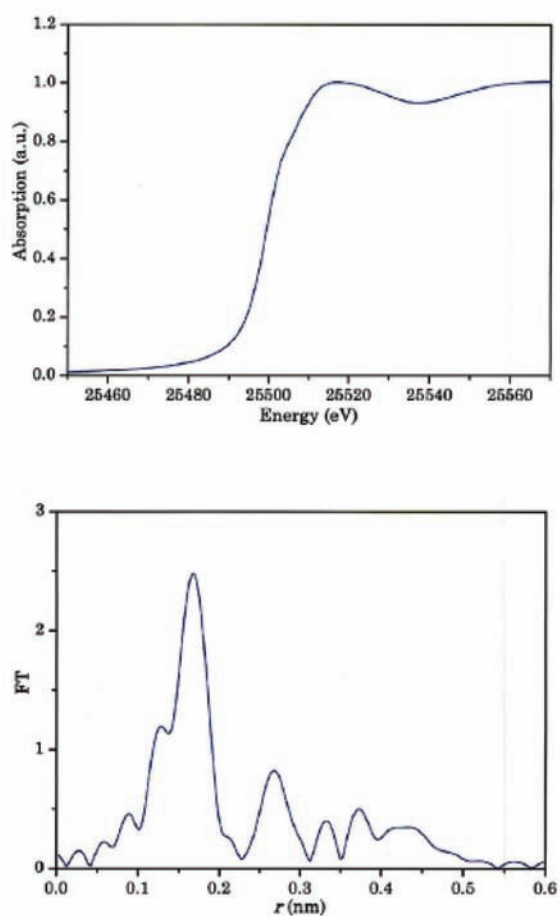


Fig. 6. The Ag K-edge X-ray absorption spectrum (above) and radial distribution function (below) of L-4.¹⁰

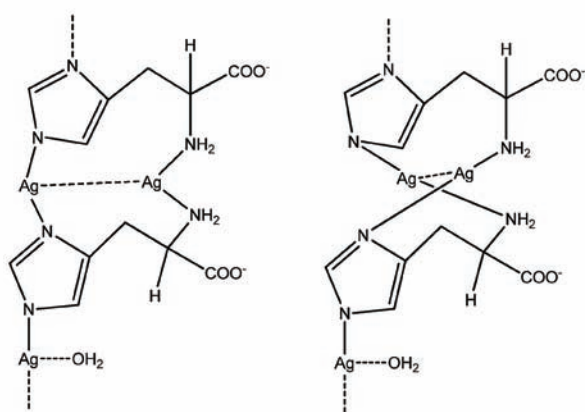


Fig. 7. Plausible structures of L-4.

長らく銀イオンに耐性を持つ細菌は知られていなかったが、最近銀イオンに耐性を持つ細菌が報告された。その耐性メカニズムの一つに、SiiE の (a periplasmic silver-binding protein) が挙げられており、そのモデル化合物として Fromm らは

2種類のカチオン性ヒスチジン銀(I) 錯体を報告している (Fig. 8)。彼らは SiiE 中のヒスチジン残基が銀(I) イオンなどの重金属イオンに中性条件で配位し、細胞中の局所 pH 環境の変化によりそれらのイオン放出に参与している可能性を示した (Fig. 9)¹¹。

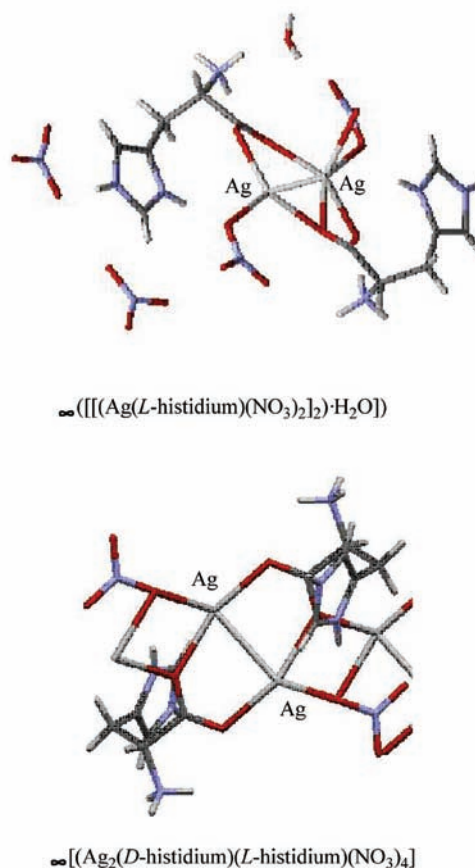


Fig. 8. Two cationic silver(I) complexes with histidine ligands¹¹.

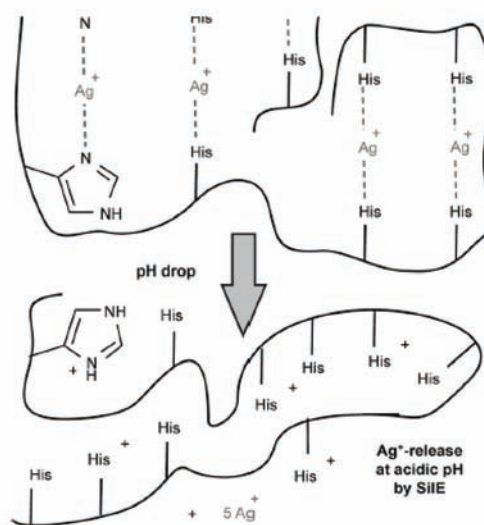


Fig. 9. Proposed mode of action of SiiE by Fromm *et al.*¹¹

L-4を得た我々は、中性条件下に加えて、アニオン性条件下でも銀(I)イオンがペプチド、タンパク質のヒスチジン残基に取り込まれることを示した。塩基性アミノ酸であるアルギニンやリシンについても硝酸銀と反応させると、反応時のpHに依存して中性、カチオン性の銀(I)錯体を得られることもわかった。アルギニン銀(I)錯体の例をFig. 10に示す¹²⁾。耐性たんぱく質中で、ヒスチジン以外にアルギニン残基やリシン残基、またはそれらの組み合わせが金属イオン輸送等に関与している可能性がある。

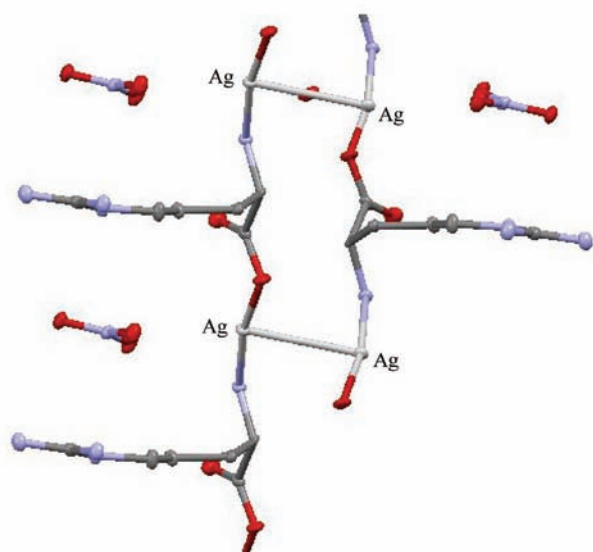


Fig. 10. Crystal structure of $\infty \{[Ag(L-Harg)](NO_3)_2 \cdot H_2O\}^{12)}$.

ヒスチジン銀(I)錯体の抗菌活性

グラム陽性菌の枯草菌 (*B. subtilis*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、グラム陰性菌の大腸菌 (*E. coli*)、緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、酵母 (*C. albicans*, *S. cerevisiae*)、カビ (*A. brasiliensis*, *P. citrinum*) に対する、各ヒスチジン銀(I)錯体の抗菌活性をMICにより評価した。結果をTable 1に示す。ヒスチジン、L-1, L-4は水溶液を菌液に加え、水に不溶のL-2, DL-3は懸濁液を菌液に加えて、最小発育阻止濃度を決めた。

Ag-N及びAg-O結合性銀(I)錯体としていずれも広いスペクトルの抗菌活性が見られた。水溶性銀(I)錯体L-1, L-4、不溶性のL-2, DL-3ともにグラム陽性、陰性菌、さらに酵母、カビに抗菌作用を示すことがわかる。水溶性の錯体はバクテリアに対する抗菌活性が不溶性の銀(I)錯体より強めであった。アルギニン銀(I)、リシン銀(I)錯体にもバクテリアに対する抗菌活性があった。チオール残基は銀イオンとの結合が強く放出が難しい。しかし塩基性アミノ酸ではAg-N結合が配位子交換やプロトネーション可能であるため、輸送蛋白中に含まれる残基として適していると考えられる。

以上、ヒスチジンに加えアルギニン、リシンといった塩基性アミノ酸およびそれらの残基が銀(I)イオン耐性タンパク質に関与する可能性を示した。

Table 1. Antimicrobial activities of silver complexes with histidine ligand and related complexes evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC; $\mu\text{g mL}^{-1}$)

	L-H ₂ his ⁸	L-1 ⁸	L-2 ⁸	DL-3 ⁹	L-4 ⁹	$\infty \{[Ag(L-Harg)](NO_3)_2 \cdot H_2O\}^{12)}$	$\infty \{[Ag(L-Hlys)](NO_3)\}$
<i>Escherichia coli</i>	>1000	15.7	125	125	31.3	125	15.7
<i>Bacillus subtilis</i>	>1000	62.5	250	125	31.3	125	15.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	62.5	250	31.3	62.5	125	31.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000	15.7	250	125	15.7	62.5	7.9
<i>Candida albicans</i>	>1000	15.7	125	125	500	>1000	7.9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>1000	15.7	125	31.3	62.5	125	15.7
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i>	>1000	125	250	250	250	>1000	125
<i>Penicillium citrinum</i>	>1000	500	250	1000	1000	>1000	>1000

謝辞

この研究は神奈川県総合化学研究所共同研究助成「塩基性アミノ酸（アルギニン、リシン）を配位子とするポリマー性銀(I)錯体の合成、構造解析及び抗菌活性」(RIIS201403)の援助を受けて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Mjos KD and Orvig C (2014) Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry *Chem. Rev.* **114**: 4540-4563.
- 2) 梶本哲也 (2008) クスリの化学 (31). *化学と教育* **56**: 518-519.
- 3) 特許庁 (2001) 抗菌性化合物とその応用.
- 4) Yamanaka M, Matsui N, Hara K and Kudo J (2006) Ag⁺ イオンによる抗菌防臭コート技術. *シャープ技報* **94**: 30-34.
- 5) Nomiya K, Kasuga NC and Takayama A (2014) Synthesis, structure and antimicrobial activities of polymeric and nonpolymeric silver and other metal complexes. In: *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity From Synthesis to Applications*. Muñoz-Bonilla A, Cerrada M and Fernández-García M, eds., RSC, Cambridge, UK. pp. 156-207.
- 6) Nomiya K and Yokoyama H (2002) Synthesis, crystal structures and antimicrobial activities of polymeric silver(I) complexes with three amino acids *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**: 2483-2490.
- 7) Li S and Hong M (2011) Protonation, tautomerization, and rotameric structure of histidine: A comprehensive study of magic-angle-spinning solid-state NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 1534-1544.
- 8) 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(His)]_n and {(Ag(Hpyrrld))₂}_n in the solid state. *Inorg. Chem.* **39**: 3301-3311.
- 9) Kasuga NC, Takagi Y, Tsuruta S, Kuwana W, Yoshikawa R and Nomiya K (2011) Synthesis, structure and antimicrobial activities of meso silver(I) histidine [Ag₂(*D*-his)(*L*-his)]_n (H₂his=histidine) showing different self-assembly from those of chiral silver(I) histidines. *Inorg. Chem. Acta* **368**: 44-48.
- 10) Takayama A, Takagi Y, Yanagita K, Inoue C, Yoshikawa R, Kasuga NC and Nomiya K (2014) Synthesis, characterization and antimicrobial activities of sodium salt of *L*-histidinatoargentate(I) derived from the pH 11 solution. *Polyhedron* **80**:151-156.
- 11) Mirolo L, Schmidt T, Eckhardt S, Meuwly M and Fromm KM (2013) pH-Dependent coordination of AgI ions by histidine: Experiment, theory and a model for SilE. *Chem. Eur. J.* **19**: 1754-1761.
- 12) Takayama A, Yoshikawa R, Iyoku S, Kasuga CN and Nomiya K (2013) Synthesis, structure and antimicrobial activity of *L*-argininesilver(1⁺) nitrate. *Polyhedron* **52**: 844-847.

■原 著■

オジギソウの振動傾性反応に伴う小葉枕細胞の 微細構造変化と細胞内イオン動態

青木 唯¹ 丸茂 幸¹ 西方秀之¹ 小塚麻衣子²
深田麻希² 小浦七美² 早津 学^{2,3} 鈴木季直^{1,2,3,4}

Ultrastructural Changes and Intracellular Ion Movements in Tertiary
Pulvinus Cells during the Seismonastic Response of *Mimosa pudica* L.

Yui Aoki¹, Sachi Marumo¹, Hideyuki Nishikata¹, Maiko Kozuka²,
Maki Fukada², Nanami Koura², Manabu Hayatsu^{2,3} and Suechika Suzuki^{1,2,3,4}

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

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

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

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

Abstract: To examine the mechanism regulating tertiary pulvinar motor cells in the seismonastic response of *Mimosa pudica* L., light and electron microscope studies on the structural change of those tissues and cells and the movement of K, Ca, and other ions during leaflet closure were carried out. Light microscopic observation and the measurement of cell volume changes using the montage method revealed that abaxial parenchymatous cells in the tertiary pulvini were markedly swollen during leaflet closure, in contrast to the inverse volume change of adaxial parenchymatous cells, indicating that those are the motor cells. Concomitant with the cell volume change, in the adaxial region, epidermal folding and the shrinkage of intercellular spaces were caused during leaflet closure. On the other hand, similar structural changes were found in the abaxial region in the leaflet opening state. The epidermal and parenchymatous cells of tertiary pulvini contained large central vacuoles, in which electron-dense materials, probably including tannin as demonstrated by FeSO₄ cytochemistry, were located along the inner surface of the tonoplast. The electron-dense material changed form from a large globule to a small grain or an amorphous shape in the adaxial cells during leaflet closure. At the same time, an inverse change of electron-dense materials occurred in the abaxial cells. A cytochemical study using potassium pyroantimonate (PA) indicated that, in the abaxial motor cells, PA precipitates containing Ca were located along the inner surface of tonoplast in the leaflet opening state, while they were diffusely distributed in the vacuolar lumen during leaflet closure. This result suggests that Ca ions play a significant role in initiating the volume change of motor cells. Quantitative X-ray microanalysis of cryosections showed that, during leaflet closure, the concentrations of Ca, K, and Cl increased significantly in the vacuolar electron-dense material, vacuolar lumen, and cell walls in the abaxial cells, while the concentrations of Ca and K decreased only in the vacuolar electron-dense material in the adaxial cells. In the tertiary pulvini, Ca and K ions released from the vacuolar electron-dense material in the adaxial cells may cause the Ca, K, and water movement to the abaxial region, and eventually turgor movement by the swelling of abaxial motor cells.

Keywords: seismonastic leaflet closure, *Mimosa* tertiary pulvinus, tannin, calcium, potassium, pyroantimonate cytochemistry, quantitative X-ray microanalysis, cryosections

序論

オジギソウ *Mimosa pudica* L. は、振動や接触、切断などの機械的な刺激の他、酸や熱による刺激により瞬間的に小葉を閉じ、羽状葉と葉全体を下垂させる振動傾性反応を示す。オジギソウの葉は典型的な複葉であり、葉は対生する多数の小葉からなる二対の羽状葉からなり、小葉、羽状葉、複葉の各葉柄基部にはそれぞれ小葉枕、副葉枕、主葉枕と呼ばれる膨大部がある。振動傾性反応における小葉の閉合や羽状葉および複葉全体の下垂は、それぞれの葉枕が運動部位となり、葉枕において、維管束を挟んだ向軸側と背軸側の運動細胞群の急激な膨圧変化によって引き起こされるためと考えられている。主葉枕による複葉全体の下垂運動は、刺激受容部における局所的な活動電位の発生とその電位変化の葉柄基部葉枕への伝導とそれに続く葉枕背軸側から向軸側へのカリウム (K) イオンと水の移動による向軸側の膨張によって引き起こされると説明されている¹⁻⁴⁾。この時ホルモン様物質のターゴリンが組織間で移動し、膨圧変化に関与しているとする考え⁵⁾も提唱されている。

主葉枕を構成する運動細胞の液胞膜には、水の流入に関わる K イオンチャネル⁶⁾、aquaporin や H⁺-ATPase などの膜蛋白質が局在し⁷⁾、K イオンチャネルの開口にはカルシウム (Ca) イオンが関与している可能性が示唆されている^{7,8)}。一方、形態学的には、膨圧変化に伴い葉枕の運動細胞内のタンニン⁹⁾を多量に含んだタンニン液胞が顕著に変形することが知られており、各種イオンや水の移動に関与している可能性が示唆されている⁹⁾。一般に、タンニンは各種金属イオンを良く結合し、アリザリンレッドを用いた細胞化学により、オジギソウ主葉枕では、応答時、タンニンに結合していた各種元素が液胞内にイオンとして遊離されることが報告されている⁹⁾。多くの動植物で、Ca イオンは生理機能の調節因子として重要な役割を果たしており、筋肉での収縮のトリガーとしての調節機能は良く知られている¹⁰⁾。オジギソウにおいて傾性反応の起動力となっている膨圧変化の調節に Ca イオンがどのように関わっているかを検討することは、運動機構の解明に重要と考えられる。

オジギソウの葉への接触や植物全体への加振動によって最初に反応するのは羽状葉を構成する小葉である。常態で水平に開いている小葉は、刺激されると即座に対となる小葉どうしを閉合する。この時、小葉柄基部の小葉枕が運動を引き起こしており、その起動力は主葉枕との類似性から、小葉枕背軸面の膨大化によるものと考えられている。しかし、この

ことも含め、実際に小葉の閉合にどのような機構が働いているかについての詳細な研究は殆どなされていない。本研究では、小葉閉合に伴う小葉枕運動細胞の膨圧変化の実態を解明し、その時に生ずる運動細胞の微細構造変化と各種イオンの動的変化を検出することを試みた。前述したように、主葉枕の運動細胞で生ずるイオン動態にはタンニン液胞が関与している⁹⁾。このことから、まず対象となる小葉枕においても同様にタンニンが存在するか否かについて硫酸鉄 (FeSO₄) を用いた細胞化学を行った。次に、小葉が開いたままの状態を維持させて化学固定できる適切な麻酔条件を検討した。さらに、小葉枕運動細胞の特定化と膨圧変化の検出のため、光学顕微鏡により組織変形の観察 (外形輪郭距離の測定) と運動細胞の断面積測定を行ない、電子顕微鏡により、小葉閉合時の運動細胞の微細構造変化を観察した。

ピロアンチモン酸 (PA) 法¹¹⁻¹⁴⁾ は細胞内の Ca 局在や動的移動を検出するための有効な電子顕微鏡細胞化学である。小葉閉合に伴う小葉枕運動細胞内の Ca 動態を観察するために PA 法により小葉展開時と閉合時の背軸側運動細胞を観察した。また、急速凍結された試料から作製される凍結超薄切片を凍結乾燥し、X 線マイクロアナリシスにより定量的に元素の局在や分布を調べる凍結切片 - 元素分析法¹³⁻¹⁷⁾ を用い、小葉閉合に伴う運動細胞内の各種イオン動態について解析した。

材料と方法

材料

高さ 20 cm 以上に成長し、明確な振動傾性反応を示すオジギソウ (Fig. 1) を材料とした。一部は園芸品店から購入したオジギソウを用いたが、殆どものは種子から育成した。種子 (株式会社サカタのタネ) をおおよそ 60°C のお湯に 20 分浸して春化处理し、シャーレの底部に敷いた十分に湿らせた脱脂綿上に播種した。根が出るまで暗所に置き、発根、発芽後、種子を鉢内の土壌中に深さ 1 ~ 2 cm の穴を掘って植えた。温室 (約 26°C) 内で約 3 ヶ月育成した。実験には、羽状葉に小葉が 10 対 (20 枚) 以上ついているものを選び、羽状葉先端から 2 対目の小葉枕のみを対象試料とした。

タンニン検出のための光学顕微鏡細胞化学

オジギソウの主葉枕と同様に、小葉枕の運動細胞の中にもタンニンが含まれており、振動傾性反応に関与していることが示唆されている¹⁸⁾。葉枕内のどこにタンニンが局在しているかを調べるために、タンニンと結合すると黒く発色する硫酸鉄 (FeSO₄) を

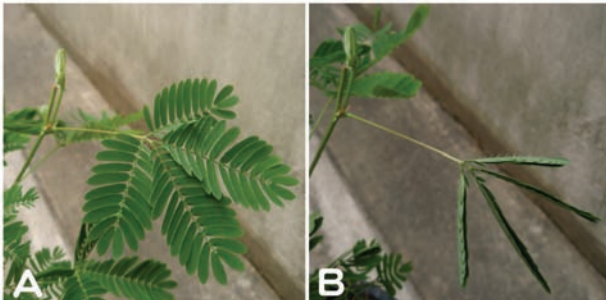


Fig.1. Seismonastic response of a mimosa. A. Leaflet opening state. A compound leaf indicates 4 pinnate leaves composed of about 10 pairs of opening leaflets. B. Leaflet closing state. By stimulation of needle attaching to the pinnate apex, the leaflet closure occurs. Pinnate and compound leaves bend down at the respective (secondary and primary) pulvinus.

用いて細胞化学を行った。2% FeSO_4 溶液を Ruzin の方法¹⁹⁾に従って調整した。オジギソウの小葉枕を閉状態の新鮮な羽状葉から切り出し、徒手切片法で薄切した。切片をスライドガラスに載せ、2% FeSO_4 溶液を滴下した後カバーガラスをかけた。その後も適時 2% FeSO_4 溶液を添加し、約 2 時間染色した。切片作製直後の無染色切片と 2 時間染色した後の切片をそれぞれ光学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察し、CCD カメラ (Pixera 600DL-CU) で撮影した。

植物の麻酔

始めに、正常に反応する小葉の小葉枕を、小葉が確実に開いたままで化学固定できるような麻酔法を検討する実験を行った。

主葉枕を含む複葉全体、主葉枕を含まない複葉全体、複葉を含まない羽状葉片をそれぞれ植物本体から切り離し、切り口を試料瓶内の水に浸けたものを明所に静置した場合、小葉に刺激反応性が回復するか否かについて調べた (Fig. 2)。結果の項で述べるように、副葉枕を含まない羽状葉のみでも、刺激反応性は回復することが判明したので、これを対象試料として麻酔法についての実験を行った。

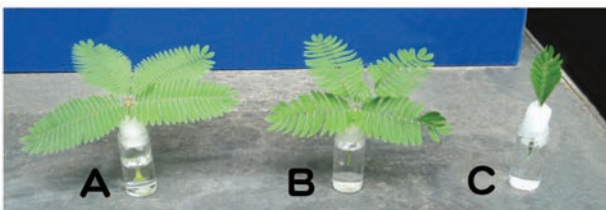


Fig.2. Dissected samples for recovery test after the anesthesia by diethyl ether. A. Compound leaf including the primary pulvinus. B. Compound leaf without the primary pulvinus. C. A part of pinnate leaf including only the tertiary pulvinus. All samples show the complete recovery and leaflet opening.

オジギソウ本体から切り離す前の羽状葉の小葉に接触刺激を与え、振動傾性反応を示すことを確認した後、羽状葉の先端から 2 つ目の小葉対の小葉枕が残るようにそれより下方で切断し (Fig. 3A)、10 ml 容量の試料瓶の底に置いた含水脱脂綿内に刺して動かないように固定し (Fig. 3B)、羽片を試料瓶ごと円柱のガラスケース (直径 9.5 cm, 高さ 15 cm) に入れ、日光に当てて刺激前の状態まで回復させた。回復して小葉が開いた後、試料に振動を与えないようガラスケースを丁寧にドラフト内に移し、ガラスケース内に 3 ml のジエチルエーテルを含ませた脱脂綿入りの別の試料瓶を入れて蓋をし、密閉状態にした (Fig. 3C)。揮発したジエチルエーテルに約 15 分間暴露した羽状葉片に針で接触刺激を与え、閉合反応を示さないことを確認した後、2% 四酸化オスミウム溶液を試料瓶の中に試料が浸かるように加えて試料瓶の蓋をし、約 10 分と 20 分間それぞれ放置した。その後、試料を約 10 分間蒸留水で洗浄した。閉状態の試料も開状態の試料と同様の方法で作製した。

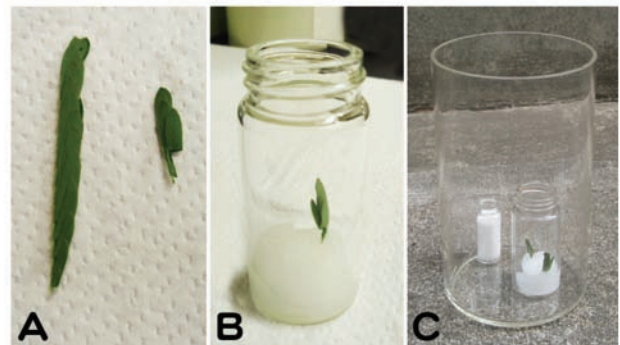


Fig.3. Anesthesia of a part of pinnate leaf. A. Small piece including 2 pairs of leaflets (right side) cut off from the apex of dissected pinnate leaf (left side). B. Leaflet piece inserted into water filling absorbent cotton put on the bottom of a small vial. C. Anestheizing the leaflet piece in a deep glass bottle. The leaflet piece in the vial (B) is exposed to diethyl ether gas evaporated from the another small vial put on the bottom of the same glass bottle.

顕微鏡試料作製

ジエチルエーテルで麻酔されることにより、小葉が開状態と閉状態に維持されているそれぞれの小葉枕試料を、リン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した 6% グルタルアルデヒド溶液で前固定 (4°C, 約 24 時間) し、リン酸緩衝液 (10 分 × 2) で洗浄した後、蒸留水で希釈した 2% 四酸化オスミウム (OsO_4) 溶液で後固定 (4°C, 約 24 時間) した。固定試料は、アセトン系で脱水し、Epoxy 樹脂 (Quetol 812 系) に包埋し、熱重合させて樹脂ブロックを作製した。

光学顕微鏡による組織切片観察

作製した樹脂包埋試料ブロックから、ウルトラミクロトーム (Reichert-Ultracut N) で、およそ $0.9 \mu\text{m}$ の厚さの切片を作製し、カバーガラスに乗せて乾燥させ、トルイジンブルーで加温染色し、光学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察し、適時切片像を CCD カメラ (Pixera 600DL-CU) で撮影した。

小葉枕の外形輪郭距離の測定

小葉の展開時と閉合時には小葉枕部分で伸展と屈曲が生じ、表面では褶曲が発生する可能性がある。褶曲の有無と、有る場合にはその程度の大きさを定量的に測定できれば、葉枕における組織レベルでの変形を明確にすることができる。そこで、小葉が開いている時と閉じている時の小葉枕横断切片の光学顕微鏡像を対象に、葉軸と平行な仮想直線 $0.5 \mu\text{m}$ ごとの向軸面と背軸面の表皮の長さ (外形輪郭の距離) を画像処理ソフト Image J を用いて測定した。小葉開状態と閉状態の小葉枕の向軸面と背軸面とで、外形輪郭の距離に有意の差があるかどうかについては t-検定を行った。

小葉枕運動細胞の容積測定

小葉の開閉に伴う小葉枕細胞内の膨圧変化を検出するため、開閉それぞれの状態における小葉枕の光学顕微鏡切片像を対象に、細胞容積変化を評価できるモンタージュ法²⁰⁻²³⁾を適用し、向軸側と背軸側の表皮細胞および表皮下層 2 層目までの細胞の断面積を画像処理ソフト Image J を用いて測定した。測定値間の有意差の有無について t-検定を行った。

電子顕微鏡による微細構造観察

光学顕微鏡観察用切片の作製に用いた樹脂包埋試料ブロックから、ウルトラミクロトームでおよそ 70 nm の厚さの超薄切片を作製し、コロジオン膜を張り、カーボン蒸着した Cu-150 メッシュに載せて乾燥させた。乾燥後、酢酸ウランとクエン酸鉛でそれぞれ 10 分間染色し、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) で観察した。

ピロアンチモン酸細胞化学

小葉閉合時の小葉枕運動細胞内 Ca 動態を解析するために、ピロアンチモン酸 (PA) 法¹¹⁻¹⁴⁾を用いた細胞化学を行った。展開時と閉合時のオジギソウの小葉を 2% のピロアンチモン酸カリを含む 2% OsO_4 液に 4°C 下で 24 時間浸して固定した。固定試料をエタノール系列とプロピレンオキシドで脱水し、エポキシ樹脂に包埋し、熱重合させた。ウルトラミク

ロトーム (Reichert Ultracut N) を用い、葉軸と平行する面で小葉枕が縦断されるように薄切し、厚さ $0.8 \mu\text{m}$ の切片を作製した。切片をカバーガラスに載せ、トルイジンブルーで加温染色して光学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察した。同じブロックから厚さ $70 - 80 \text{ nm}$ の超薄切片を作製し、コロジオン膜を張り、カーボン蒸着を施した Cu-150 メッシュに載物した。無染色の切片および酢酸ウランやクエン酸鉛で染色した切片を透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX) で観察した。

電顕下で細胞内に観察される PA 沈澱が確かに Ca を含むことを証明するための元素分析用に、同じ試料ブロックから厚さ約 200 nm の超薄切片を作製し、コロジオン膜を張り、カーボン蒸着を施した Ni-15 メッシュに載せて乾燥させた後、切片上にさらにカーボン蒸着を施した。メッシュをベリリウム (Be) チップ装着試料ホルダーに装填し、エネルギー分散型 X 線検出器 (JEOL EX-14033 JTP) を装着した透過型分析電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) で PA 沈澱の元素分析を行った。

加圧凍結

凍結切片を対象とする定量的 X 線マイクロアナリシス (凍結切片 - 元素分析) を行うために、急速加圧凍結法により試料を凍結した。小葉が開いている時と閉じている時の試料凍結は、化学固定の項で行ったのと同じ麻酔を施してから行なった。小葉枕部分を切り出し、高圧凍結装置 (Leica EM-PACT) 用の直径約 2.5 mm 、高さ 1.0 mm の円盤状の凍結キャリアの上面中央に掘削されている内径 1.2 mm 、深さ 0.2 mm の試料装填孔内に向軸面もしくは背軸面が上になるよう装填して加圧凍結した。凍結された試料は、予め液体窒素で冷却したアルミ製の専用コンテナに収納し、凍結切片の作製まで液体窒素中に保存した。

凍結切片の作製と凍結乾燥

凍結切片・元素分析法のため、クライオチャンバー内を -145°C 、ガラスナイフを -140°C 、試料回転移動軸を -140°C に冷却したクライオミクロトーム (Leica Ultracut UCT/EM FCS) で凍結試料から、厚さ約 200 nm の凍結超薄切片を作製し、カーボン蒸着で補強したコロジオン支持膜を張った冷却 Ni-200 メッシュに載物した。同仕様のもう一枚の冷却 Ni-200 メッシュを支持膜が向かい合うように重ねて圧着し、専用の冷却コンテナに収納した。温度変化プログラミング設定が可能な凍結乾燥装置 (VFD-300S) に冷却コンテナを装填し、高真空条件下で -110°C 以下から 30°C まで 10 時間かけて徐々に温度を上げるこ

とにより凍結乾燥させた。凍結乾燥後、元素分析を行うまで、切片は室温でデシケーター内に保存した。

凍結切片の定量的 X 線マイクロアナリシス

凍結乾燥した超薄切片をクライオトランスファーホルダー (Gatan model 626DH) の Be 製チップ内に装填し、エネルギー分散型 X 線検出器 (JEOL EX-14033JTP) を装着した透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) の鏡筒内に挿入して切片観察と元素分析を行った。元素分析を行う時には、クライオトランスファーホルダーを液体窒素で -130°C に冷却した。一方、試料汚染防止のため、電子顕微鏡本体のコールドトラップも液体窒素で冷却した。また、定量的 X 線マイクロアナリシスを行うために、分析時の観察倍率を 15,000 倍、加速電圧 80 kV、試料ホルダー傾斜角度を X 線検出器に向けて水平位から 15° にし、ビームスポットサイズを 4 にしてビーム直径をおよそ $0.1\ \mu\text{m}$ に収束させた。切片内の分析対象領域に収束電子線を 200 秒間照射し、発生した X 線を検出器で検出した。

得られた X 線スペクトルの各ピーク値に基づいて、分析領域に含まれる元素の定性を行った²⁴⁾。また、X 線スペクトル解析ソフト (NORAN System SIX) を用いて、特性 X 線のピークスペクトルから半値幅を基準にした X 線強度 (P_x) と、連続 X 線由来のバ

ックグラウンドのうち $4.5\sim 5.5\ \text{keV}$ の X 線強度 (B_x) をカウントし、各ピークスペクトルの特性 X 線強度と連続 X 線強度の比 (所謂 P/B 比) を求めた。 P/B 比の値と用いた装置で既に決定されているウエイトファクター^{13, 14, 17, 25)}を定量的ための計算式^{15, 24)}に代入して各元素の濃度 (mmol/kg dry wt.) を計算した。

結果

光学顕微鏡によるタンニンの細胞化学

Fig. 4 は、オジギソウの小葉枕を小葉の主脈走行に沿って徒手切片法により縦断した切片の FeSO_4 処理前後の光学顕微鏡像である。両図 (Fig. 4A, B) とも、左下部には、横断された羽状葉の主脈が、中央部には縦断された小葉枕が示されている。小葉枕の中央には維管束が走行し、左側が向軸側、右側が背軸側である。 FeSO_4 溶液で 2 時間処理された小葉枕では、随所で、細胞内に黒もしくは青黒く染色された多数の粒状構造が見られ (Fig. 4B)、これらがタンニンからなることを示した。小葉枕におけるこの染色されたタンニン粒の分布密度は、背軸側よりも向軸側でより高かった。 FeSO_4 処理前の切片では、細胞内に多数の赤褐色の粒が観察されたが、これらの粒粒はタンニンであると考えられる。

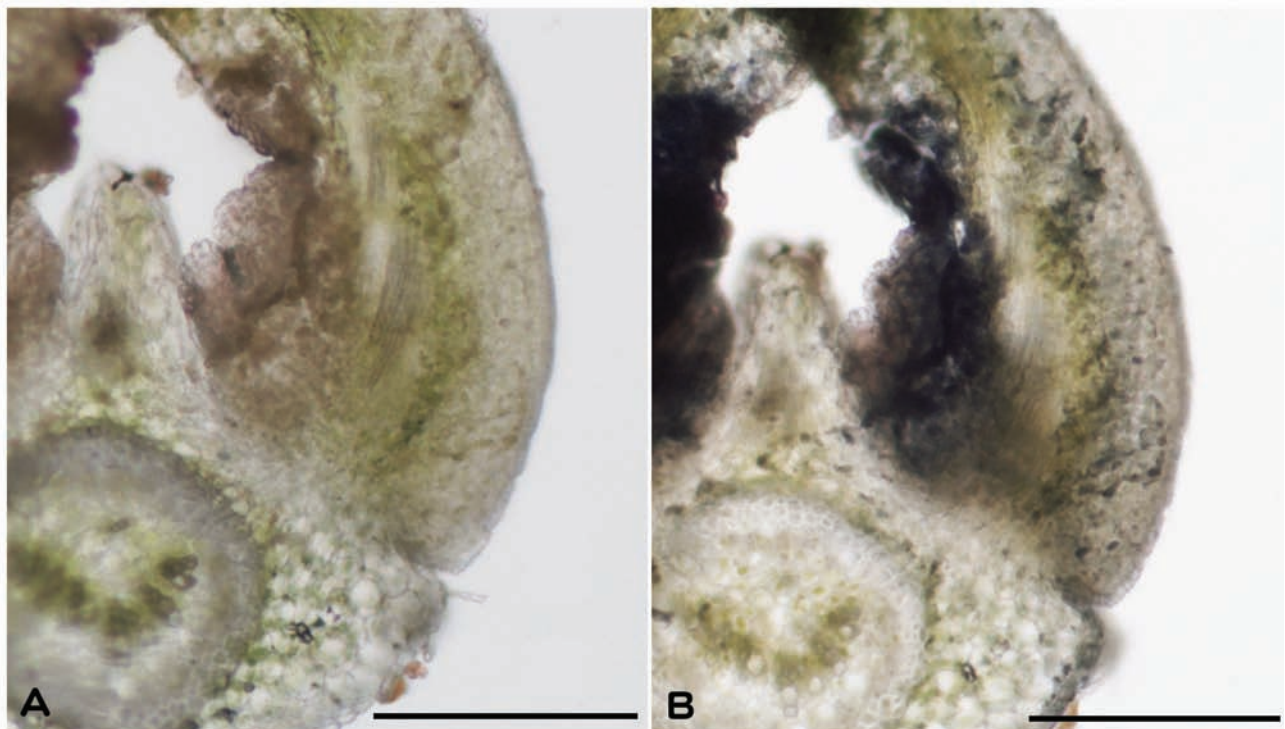


Fig. 4. Light microscope images of mimosa tertiary pulvini, cut longitudinally along the leaflet main vein, during the leaflet closure. A. Cross-sectional view before cytochemical FeSO_4 staining. B. Cross-sectional view after 2 hr from cytochemical FeSO_4 staining, showing numerous grains well stained with FeSO_4 in parenchyma cells of the tertiary pulvinus. In A and B, the main vein of pinnate leaf is shown at the left bottom. Scale bar, 0.1 mm (A, B).

試料摘出後の小葉振動傾性反応

植物から切り取ってもなお小葉に振動傾性反応を留めるための最小規模の試料摘出として複葉のどの部分で切り取るべきかを判定する実験を行った。Fig.2のように、主葉枕下部、副葉枕下部、副葉枕を含まない羽状葉上部のそれぞれで植物から切り離した。それぞれの切り口を水中に入れて明所に静置すると、いずれも、およそ30分で小葉は水平位に開いた状態となり、小葉の振動傾性反応は回復した。羽状葉のかなり上部で切り取り、小葉が数対しかない状態でも同じ結果が得られたので、麻酔実験には、この状態の羽状葉片 (Fig. 3b) を用いることにした。

光学顕微鏡による小葉枕組織の観察

Fig. 5は、樹脂包埋試料を約 $0.9 \mu\text{m}$ の厚さに薄切して、トルイジンブルー染色液で染色したオジギソウ小葉枕の縦断切片の光学顕微鏡像である。それぞれの写真の左下には、葉軸があり、写真中央には小葉枕が示されている。小葉枕の中央にある細長い細胞群は維管束である。小葉開状態の向軸側表面 (Fig. 5A、左上側) では広い間隔の緩やかな褶曲が見られるのに対し、小葉閉状態の向軸側 (Fig. 5B、左側)

では、褶曲は、間隔が狭く、深く切れ込んでいた。一方、葉枕の背軸側表面の褶曲は、小葉開状態では、間隔が狭く鋭い切れ込みになっていたのに対し、小葉閉状態では、間隔は広く、切れ込みも緩やかであった。また、小葉枕細胞には、 FeSO_4 による細胞化学によりタンニンからなることが明らかにされた球状塊が多数含まれており、それらは特に向軸側で多く見られた。

小葉閉合に伴う小葉枕外形輪郭距離の変化

前項で述べたように小葉の閉合に伴い、葉枕の表面の褶曲状態は、向軸側と背軸側とで鏡像関係を示すように変化していた。この変化を定量的に理解するために、褶曲を無視した単純表面の単位長さ ($0.5 \mu\text{m}$) あたりの褶曲を含む外形輪郭距離を測定した。Table 1は、測定された数値の平均と標準偏差および t -検定結果を示している。小葉閉合に伴い外形輪郭距離は、向軸側で $81.2 \pm 10.9 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準偏差, $n=10$) から $135.6 \pm 36.8 \mu\text{m}$ ($n=6$) と増加し、小葉が内側に屈曲することにより表面の凹凸が著しく増強されたことを示した。一方、背軸側は $90.3 \pm 12.7 \mu\text{m}$ ($n=9$) から $66.7 \pm 5.7 \mu\text{m}$ ($n=14$) へと

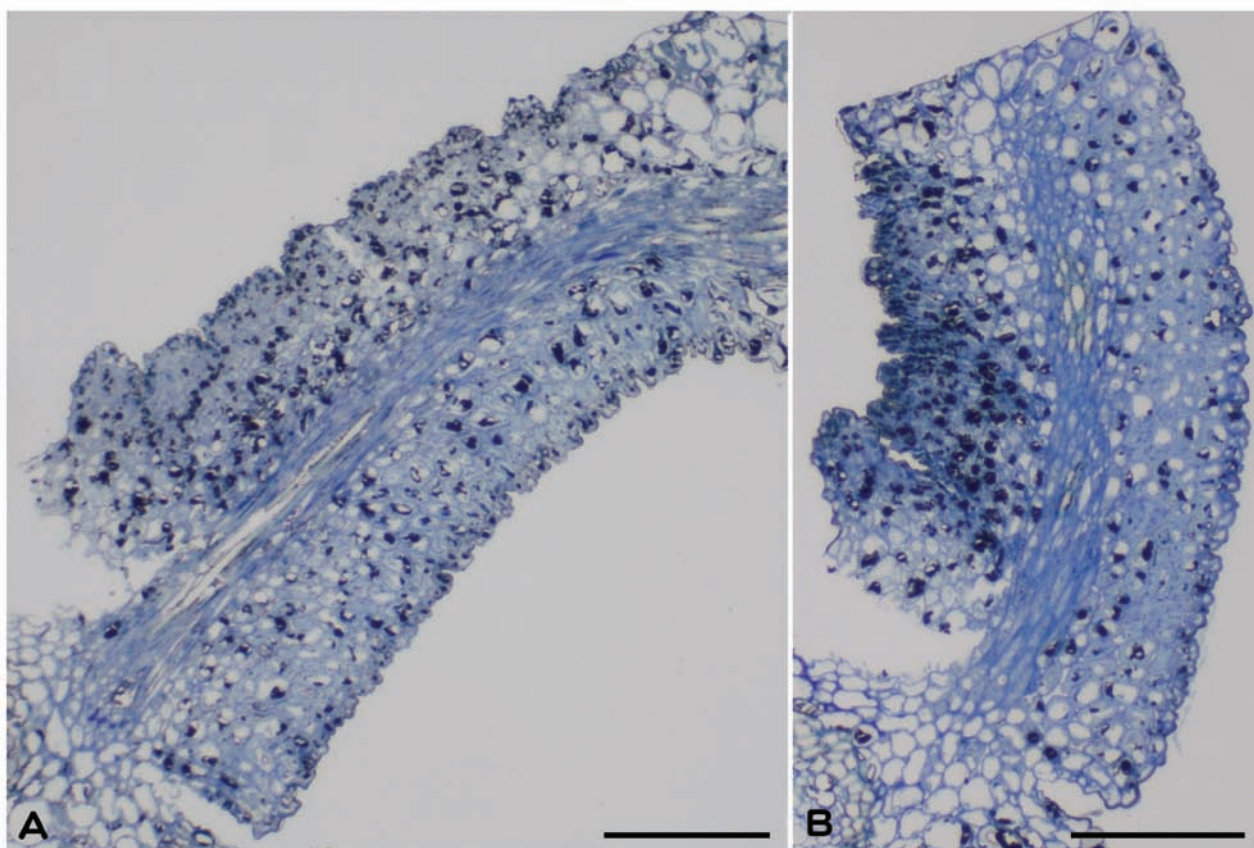


Fig. 5. Light microscope images of mimosa tertiary pulvini, cut longitudinally along the leaflet main vein. A. Cross-sectional view in leaflet opening state. Adaxial side is upper left, and abaxial side is lower right. B. Cross-sectional view in leaflet closing state. Adaxial side is left, and abaxial side is right. Scale bar, 0.1 mm (A, B).

Table 1. Contour distances* along the folding surface of tertiary pulvinus in leaflet opening and closing states

Pulvinus	Leaflet opening (μm)	Leaflet closing (μm)	Level of significance
Adaxial side	81.2 \pm 10.9 (n = 10)	135.6 \pm 36.8 (n = 6)	< 0.001
Adaxial side	90.3 \pm 12.7 (n = 9)	66.7 \pm 5.7 (n = 14)	< 0.001

* Contour distance was measured as a real distance per unit length (0.5 mm) in a straight line on the pulvini surface.

Values are mean \pm SD.

減少し、小葉枕表面が伸展されたことを示した。また、表の結果は、小葉閉合時の小葉枕の屈曲に伴う向軸表面の圧縮率は約 60%、背軸表面の伸展率は約 140%、小葉枕展開に伴う向軸表面の伸展率は約 170%、背軸表面の圧縮率は約 74%であることを示している。次項で述べるように、小葉閉合時にはその要因として運動細胞の容積変化が生じているが、組織レベルでの葉枕の変形も、小葉の閉合に重要な要素として関わっていることが示された。

小葉枕細胞の断面積測定

小葉開閉時に、小葉枕の各細胞がどのように変化し、振動傾性反応ではどの細胞群が最も小葉の閉合運動に寄与しているかということを確認するために、小葉が開と閉の状態にある小葉枕の向軸側と背軸側の表皮および表皮下 2 層の細胞について切片像を対象に細胞の断面積測定を行った。

オジギソウ小葉が開と閉の状態にある時の小葉枕向軸側と背軸側のそれぞれの表皮を第 1 層目 (I 層) とし、表面直下の細胞層を第 2 層目 (II 層)、それより更に内側の細胞層を第 3 層目 (III 層) と定義し、層ごとに含まれる細胞の断面積をモンタージュ法により測定した。測定値をそれぞれの層ごとに、縦軸を例数 (細胞数)、横軸を階級幅 $20 \mu\text{m}^2$ とした細胞断面積の度数分布グラフを作成した (Fig. 6, 7)。Table 2 は、それぞれの細胞層ごとの細胞断面積の平均値と標準偏差と小葉開閉両状態間の測定値についての t-検定結果を示している。

向軸側： 小葉開状態の小葉枕向軸側の I 層 (表皮) の細胞群で測定された細胞断面積の度数分布グラフは、分散が小さく、平均値付近にピークが認められた (Fig. 6A)。平均値 \pm 標準偏差 (\pm SD) は、 $79.1 \pm 35.1 \mu\text{m}^2$ (n = 210) であった。一方、小葉が閉状態の時の小葉枕向軸側の I 層 (表皮) 細胞群でも細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 6B) における分散は小さかったが、細胞断

面積の平均値 (\pm SD) は $58.4 \pm 26.4 \mu\text{m}^2$ (n = 203) であり、t-検定結果が示すように明らかに小葉が開いている時よりも小さかった。小葉開状態の小葉枕向軸側第 II 層の細胞群の細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 6C) では、表皮よりも細胞の大きさが多様であり、それを反映して分散も大きくなっていた。細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $97.9 \pm 52.5 \mu\text{m}^2$ (n = 209) であり、表皮細胞よりもやや大きいことが示された。小葉閉状態の小葉枕向軸側 II 層では、極端に大きな細胞はなく、全体的に小さい細胞が多く存在したため、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 6D) における分散は小葉が開いている時よりも小さく、細胞断面積の平均値 (\pm SD) も $55.9 \pm 38.5 \mu\text{m}^2$ (n = 210) であり、開状態のものより有意に小さかった。なお、その平均値は表皮細胞のそれと殆ど差はなく、むしろやや小さかった。小葉開状態の小葉枕向軸側 III 層の細胞群では、極端に大きな細胞が見られ、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 6E) における分散は II 層よりやや大きくなった。細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $124.5 \pm 58.8 \mu\text{m}^2$ (n = 198) であった。一方、小葉閉状態の小葉枕向軸側 III 層には、かなり大きな細胞が含まれていたが (Fig. 6F)、その数は少なく、細胞断面積の平均値 (\pm SD) は $78.5 \pm 49.5 \mu\text{m}^2$ (n = 205) であった。この値は小葉が閉じている時の小葉枕向軸側の I 層と II 層の細胞よりは大きかったが、小葉が開いている時の同じ層の値とは顕著に異なり、有意に小さかった。これらの結果は、小葉が閉じている時には小葉枕の向軸側 I ~ III 層の全てにおいて、それらの細胞は小葉が開いている時よりも小さく、膨圧が減少していることを示唆していた。

背軸側： 小葉開状態の小葉枕背軸側 III 層では、ごく少数の大きな細胞が見られたので、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 7A) における分散はやや大きくなっているが、全体的に細胞は小さく、その平均値 (\pm SD) は $79.7 \pm 43.9 \mu\text{m}^2$ (n = 200) であった。一方、小葉閉状態の小葉枕背軸側 III 層では、大きな細胞が多く見られ、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 7B) は、分散は大きい明瞭な正規分布を示した。その細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $113.8 \pm 46.5 \mu\text{m}^2$ (n = 200) であり、小葉開状態の背軸側 III 層とは有意に異なり、細胞の大きさは著しく大きかった。小葉開状態の小葉枕背軸側 II 層には極端に大きな細胞はなく、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 7C) では、平均値付近をピークとする正規分布様分布が認められた。細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $69.2 \pm 33.6 \mu\text{m}^2$ (n = 201) であった。小葉閉状態の小葉枕背軸側 II 層にも極端に大きな細胞はなく、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig.

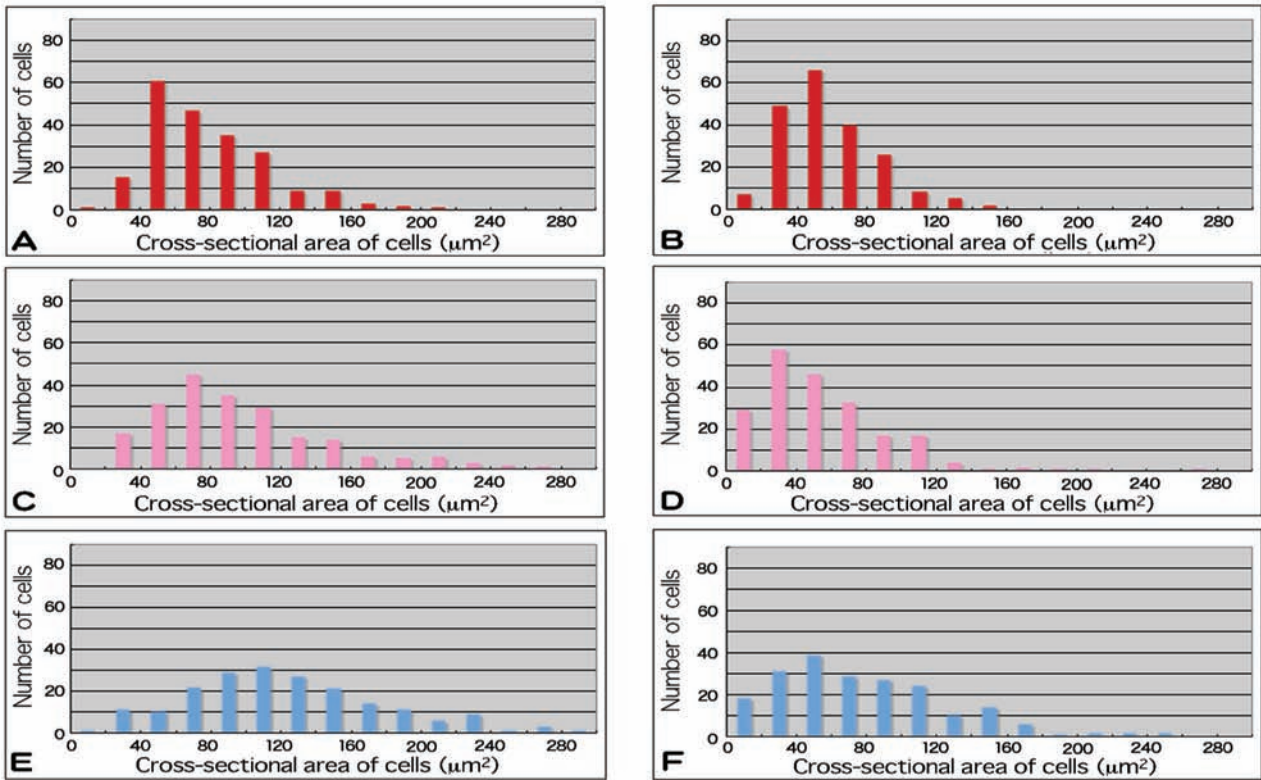


Fig. 6. Histograms showing distribution of cross-sectional area of adaxial tertiary pulvinal cells in leaflet opening state (left column) and leaflet closing state (right column). A-B. The 1st (I) epidermal cell layer in opening state (A) and closing state (B). C-D. The 2nd (II) cell layer under the epidermis in opening state (C) and closing state (D). E-F. The 3rd (III) cell layer under the epidermis in opening state (E) and closing state (F).

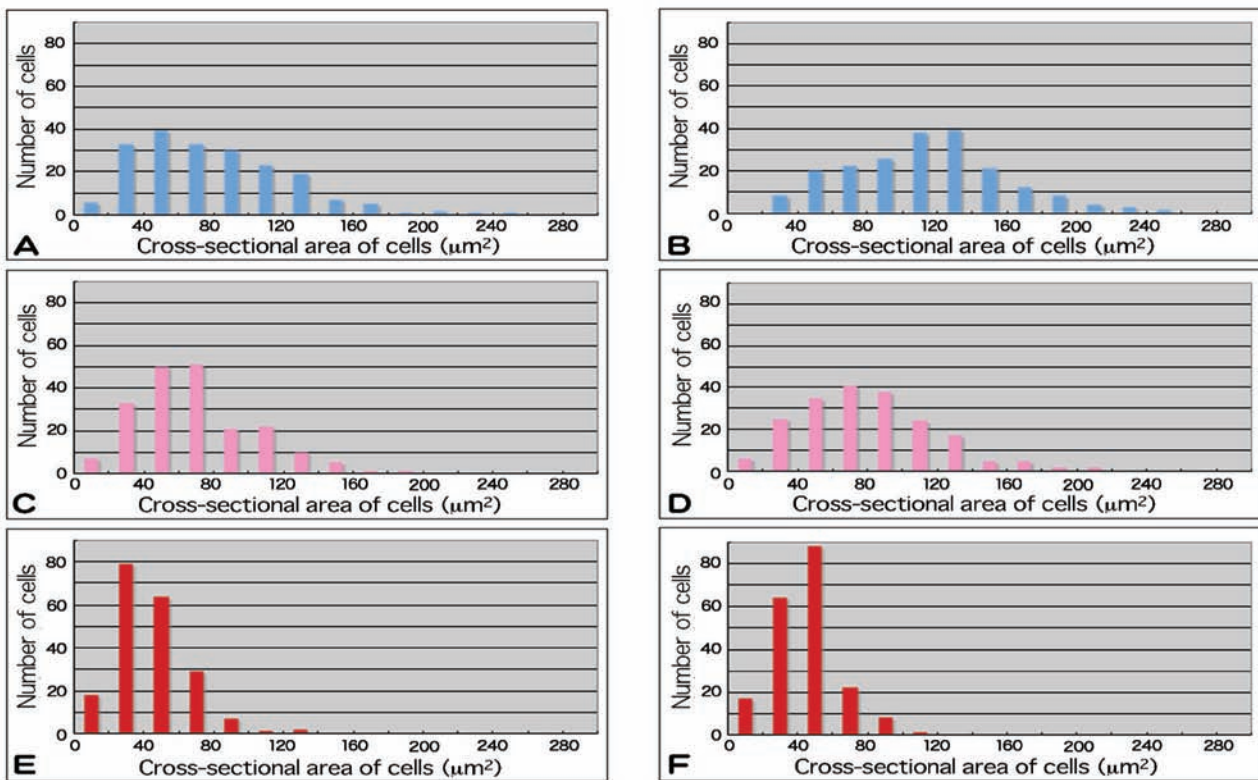


Fig. 7. Histograms showing distribution of cross-sectional area of abaxial tertiary pulvinal cells in leaflet opening state (left column) and leaflet closing state (right column). A-B. The 3rd (III) cell layer under the epidermis in opening state (A) and closing state (B). C-D. The 2nd (II) cell layer under the epidermis in opening state (C) and closing state (D). E-F. The 1st (I) epidermal cell layer in opening state (E) and closing state (F).

Table 2. Cross-sectional areas of tertiary pulvinar cells in leaflet opening and closing states

Cell layers	Leaflet opening state (μm^2)	Leaflet closing state (μm^2)	Level of significance
Adaxial I	79.1 \pm 35.1 (n = 210)	58.4 \pm 26.4 (n = 203)	< 0.001
Adaxial II	97.9 \pm 52.5 (n = 209)	55.9 \pm 38.5 (n = 210)	< 0.001
Adaxial III	124.5 \pm 58.8 (n = 198)	78.5 \pm 49.5 (n = 205)	< 0.001
Abaxial III	79.7 \pm 43.9 (n = 200)	113.8 \pm 46.5 (n = 200)	< 0.001
Abaxial II	69.2 \pm 33.6 (n = 201)	80.3 \pm 39.3 (n = 200)	< 0.01
Abaxial I	43.9 \pm 21.0 (n = 200)	43.8 \pm 18.1 (n = 203)	> 0.05

Values are mean \pm SD.

7D) は正規分布を示した。細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $80.3 \pm 39.3 \mu\text{m}^2$ (n = 200) であり、細胞は有意に異なり、顕著に大きいことが示された。小葉開状態の小葉枕背軸側の I 層 (表皮) では大きな細胞は見られず、殆どの細胞は小さく、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 7E) の分散は小さかった。細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $43.9 \pm 21.0 \mu\text{m}^2$ (n = 200) であった。小葉閉状態の小葉枕背軸側の I 層 (表皮) では、開状態と同様に小さな細胞が多く、細胞断面積の度数分布グラフ (Fig. 7F) も分散が小さく、ほぼ正規分布を示した。細胞断面積の平均値 (\pm SD) は、 $43.8 \pm 18.1 \mu\text{m}^2$ (n = 203) であり、小葉が開いている時の I 層とほぼ等しい値を示した。これにより、小葉閉合時には、背軸側の表皮では、細胞の膨圧変化は殆ど生じていないことが示唆された。しかし、II 層と III 層の細胞は有意に大きくなっており、膨圧が増大していることが示唆された。

電子顕微鏡による小葉枕細胞の微細構造観察

小葉が開と閉の状態にある時の小葉枕向軸側および背軸側の組織および細胞についての電子顕微鏡観察を行った (Fig. 8)。小葉枕 I、II、III 層の細胞は、直径 10~20 μm の球状又は長楕円体状で、その中央には大小の球状又は不定形のタンニン粒を含む大きな液胞が観察された。細胞質基質に含まれる色素体は、表皮細胞では、原色素体か内膜系が未発達な小さな色素体であったが、II 層や III 層の細胞では、デンプン粒を含むかなり大きな葉緑体であった。小葉枕向軸側の表面は、小葉が開いている状態では光学顕微鏡で観察されたように、凹凸が緩やかで、凹部の陥入は表面レベルより 10 μm 以内と浅く、椀状であった (Fig. 8A) が、小葉閉状態では、凹部は表面レベルより 20 μm 以上も深く鋭く陥入していた (Fig. 8B)。細胞の断面積測定結果では、小葉閉合に伴い、表皮細胞は、小さくなる傾向が示されたが、その変化は電子顕微鏡下では顕著でなかった。しかし、小葉閉合前にはほぼ球状であった表皮細胞は、表面に対して垂直方向に伸びたような楕円体状に変形

しているような傾向が認められた。また小葉閉合前に見られた多数の小さな球状のタンニン粒は閉合に伴い著しく減少しているように思われた。小葉が開いた時の小葉枕向軸側の II および III 層の細胞でも、同じような形状の変化とそれらに含まれるタンニン粒の不定形化や縮小と数の減少が認められた。また、小葉開状態では、細胞間隙はかなり顕著に観察されていたが、小葉閉状態では殆ど見られなかった。

一方、小葉枕背軸側の表面は、小葉開状態では、向軸側とは対照的に、小刻みで深い陥入が多く形成されていた (Fig. 8C) が、小葉閉状態では、凹凸は浅くて緩やかであり (Fig. 8D)、光学顕微鏡の観察結果とよく一致した。この表面形状の変化は、向軸側で見られたことと鏡像的相関を示していた。小葉開閉に伴う小葉枕向軸側表面での圧縮率が約 60%、背軸側での圧縮率が約 74% であった光学顕微鏡観察結果 (Table 1) と一致するように、小葉開状態の背軸面表皮の陥入の深さとピッチは、小葉閉状態の向軸面表皮のそれと比べると、あまり大規模なものではなかった (Fig. 8C)。小葉の閉合に伴う小葉枕の表皮細胞層、II 層、III 層の細胞の形状変化、それらに含まれるタンニン粒の形状変化、細胞間隙の変化はいずれも、向軸側細胞で見られた変化とは逆の変化を示し、鏡像的相関現象として生じていることが明らかとなった。なお、小葉枕の組織および細胞の観察で鏡像的相関を示さなかった唯一の構造的特徴は向軸側と背軸側の細胞壁の厚さであった。小葉の開閉に関わりなく、背軸側の I ~ III 層をなす細胞の細胞壁は常に数倍以上の厚さを有していた (Fig. 8)。また、表皮を覆うクチクラ層も、向軸側より背軸側で圧倒的に厚くなっていることが認められた。

ピロアンチモン酸法による Ca 動態観察

Fig. 9 はピロアンチモン酸法により、開および閉状態で固定した幼植物第一葉の小葉の小葉枕背軸側表皮下細胞の電子顕微鏡像を示している。小葉開状態の細胞 (Fig. 9A) では、高電子密度のピロアンチモン酸の沈澱はその殆どが液胞膜の内表面に局在し、

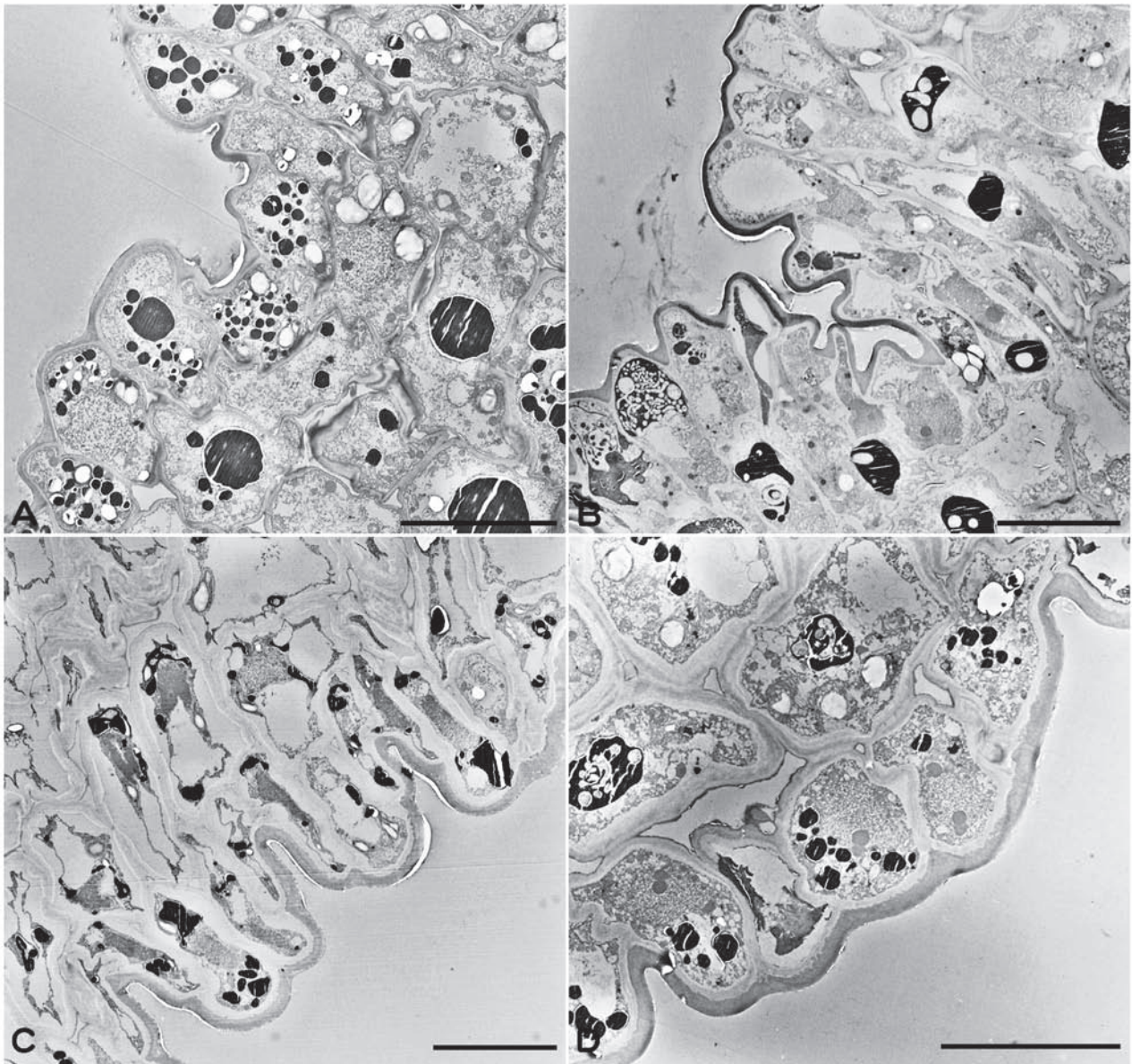


Fig. 8. Electron microscope images of mimosa tertiary pulvini, cut along the leaflet axis. A. Cross-sectional view of adaxial side in leaflet opening state. Epidermis is shown in upper left. B. Cross-sectional view of adaxial side in leaflet closing state. Epidermis is shown in upper left. C. Cross-sectional view of abaxial side in leaflet opening state. Epidermis is shown in lower right. D. Cross-sectional view of abaxial side in leaflet closing state. Epidermis is shown in lower right. Note the mirror image correlation between A and D, or B and C, on the structural features of cells and the shape of tannin grain in vacuole. Scale bar, 10 μ m (A-D).

液胞中央部や細胞質基質などでは観察されなかった。一方、小葉閉状態の細胞 (Fig. 9B) では、ピロアンチモン酸の沈澱は液胞内腔の中央部全体に広く分散分布していた。

ピロアンチモン酸は生体内でCa以外の様々な陽イオンとも反応して沈澱を生じることが知られている^{11, 12)}。このため、細胞の液胞内で見られた沈澱がCaを含むか否かを明らかにする常法¹¹⁾に従ってX線マイクロアナリシスを行った。Fig. 10は小葉閉状態で固定したオジギソウ小葉枕の背軸側細胞の液胞内腔内に見られるピロアンチモン酸沈澱に電子線を集

束照射して得られたX線スペクトルである。0 keVから9 keVのエネルギー範囲でBe-K α 線 (110 eV)、C-K α 線 (200 eV)、O-K α 線 (440 eV)、Os-M α 線 (1,914 eV)、Cl-K α 線 (2,621 eV)、Ni-L α 線 (7,280 eV)のスペクトルピークとともにSb-L α 線のピークエネルギー値である3,600 eV付近の3,620 eVに顕著なスペクトルピークが見られた。これらのスペクトルピークのうち、BeのX線はメッシュホルダーに由来し、CおよびOは細胞内有機化合物、Osは固定液、Clは樹脂、NiのX線は切片を載物したメッシュにそれぞれ由来すると考えられる。ピロアンチモン酸法

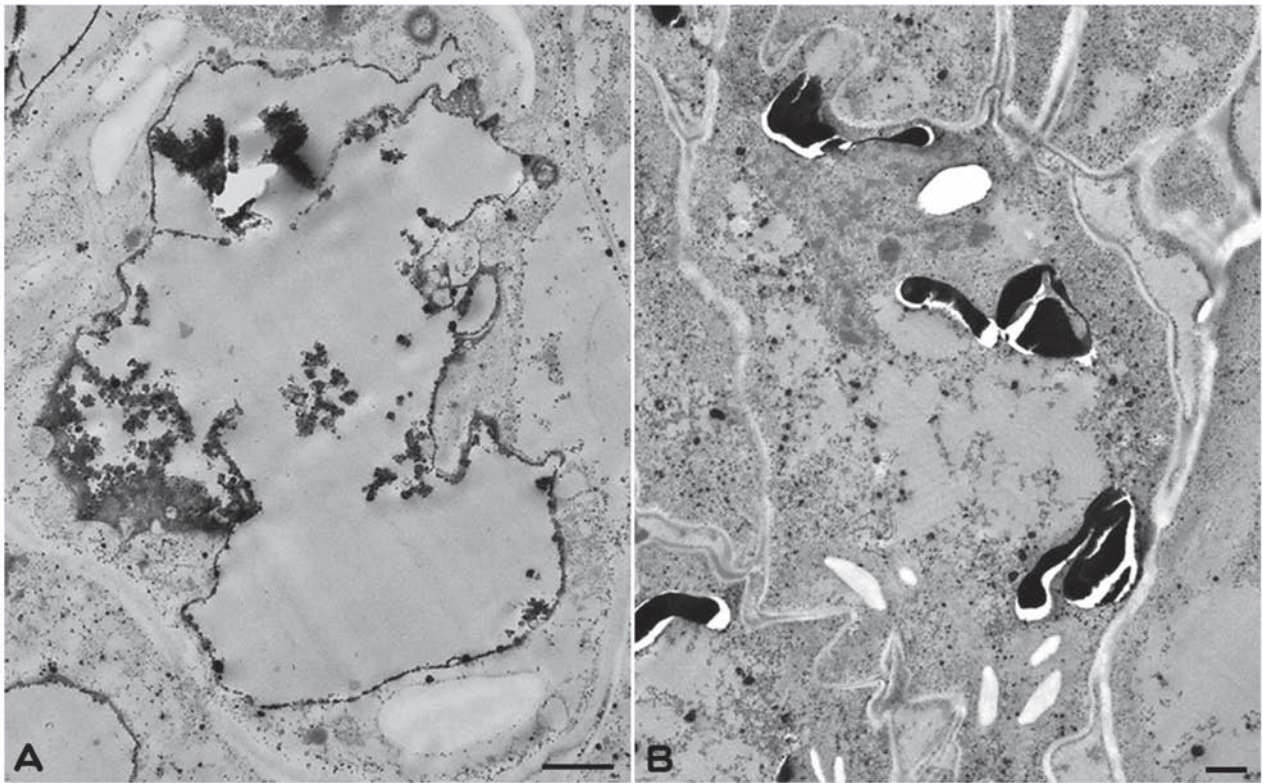


Fig. 9. Intracellular localization of electron-opaque pyroantimonate (PA) precipitates in abaxial cells of mimosa tertiary pulvinus, fixed in 2% OsO₄ solution containing 2% potassium pyroantimonate. A. Cross-section of the pulvinar cell in leaflet opening state, showing the localization of PA precipitates along the inner surface of tonoplast. B. Cross-section of the pulvinar cell in leaflet closing state, showing the diffuse distribution of PA precipitates in the central region of vacuolar lumen. Scal bar, 1 μm (A, B).

で観察される PA 沈澱の X 線マイクロアナリシスでは、3,610 ~ 40 eV のスペクトルピークは 3,600 eV のピークエネルギー値を持つ Sb-L α 線のスペクトルと 3,690 eV のピークエネルギー値を持つ Ca-K α 線のスペクトルが重なって生じる複合スペクトルと考えられており¹¹⁾、従って、小葉枕細胞内に局在していた沈澱は Ca を含む PA 沈澱と考えられる。複合スペクトルピークの高エネルギー側には、3,840 eV と 4,100 eV をピークエネルギー値とする Sb-L β_1 線と Sb-L β_2 線のスペクトルピークが観察された。同様に、小葉開状態で固定したオジギソウ小葉枕細胞で見られた PA 沈澱を任意に選び、X 線マイクロアナリシスを行ったが、すべての分析で同じ結果が得られた。

凍結切片の元素分析

Fig. 11 は、小葉が開状態と閉状態にある時の小葉枕向軸側の凍結試料から作製した凍結超薄切片で観察された細胞を示している。凍結切片では、含水量の高い液胞内で細かいアイスダメージが生じた徴候が認められたが、細胞質全体は概ね滑らかで、凍結は良好であったことを示した。小葉開状態では小葉枕細胞 (Fig. 11A) は、その内部に大小様々な高電子

密度のタンニン粒を多く含んでいた。また、タンニン粒の付近にはやや電子密度が高い滑らかな灰色の粒状体が含まれていたが、化学固定樹脂包埋試料の電子顕微鏡像をもとに考察し、これらは葉緑体に含まれているデンプン粒と判定された。細胞中央には、

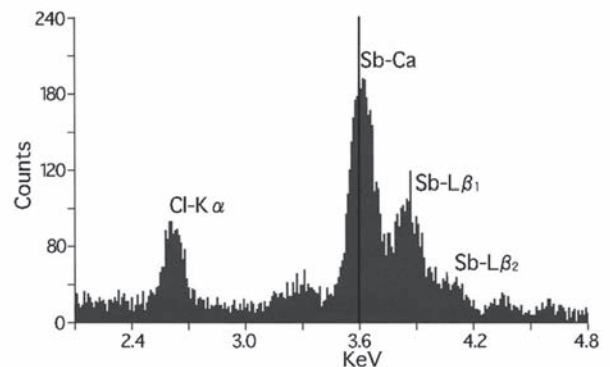


Fig. 10. X-ray spectrum of the pyroantimonate precipitate found in abaxial cells of mimosa tertiary pulvinus, enlarged around the combined peak of Sb-Ca (at 3,640 eV). Vertical line in the center of spectrum indicates the position of Sb-L α emission at 3,600 eV. The other labels indicate spectral peaks of respective element-line emission. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV.

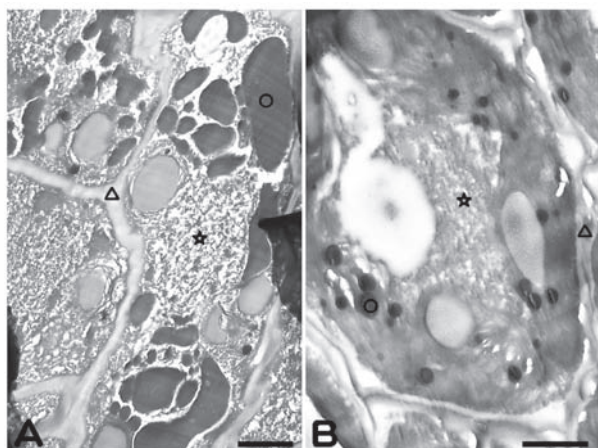


Fig. 11. Cryosection images of the adaxial region in mimosa tertiary pulvinus. A. Adaxial cells of pulvinus frozen in leaflet opening state. B. Adaxial cells of pulvinus frozen in leaflet closing state. In A and B, symbols indicate analyzed positions; tannin grain (○), vacuolar lumen (☆), and cell wall (△). Scale bar, 1 μm (A, B).

分散分布した小粒で占められている液胞が見られた。一方、小葉閉状態の小葉枕細胞 (Fig. 11B) では、中央部は液胞により占められていたが、それに含まれるタンニン粒は小さく、数も少なかった。細胞壁に沿って大きなデンプン粒を含む葉緑体が見られた。

Fig. 12 は、小葉が開状態と閉状態の時の小葉枕背軸側の凍結試料から作製した凍結超薄切片の電子顕微鏡像である。細胞壁や細胞質の一部にアイスダメージによる基質欠損が認められるが、殆どの部分で基質は残されており、凍結は良好である。小葉が開いている状態 (Fig. 12A) では、タンニン粒は小さく液胞内に分散しており、葉緑体のデンプン粒が見られた。小葉が閉じた状態 (Fig. 12B) では、細胞中央は大きな液胞に占められており、その中に、高電子密度のタンニン粒が含まれていた。また葉緑体内にはデンプン粒が散在していた。

オジギソウ小葉の閉合に伴う、小葉枕運動細胞内の各種イオン動態を調べるために、これらの凍結超薄切片を対象に、タンニン粒、液胞および細胞壁の X 線マイクロアナリシスを行った (Fig. 11, 12; ○, ☆, △各標識部)。運動細胞の分析で得られたエネルギー範囲 0 keV から 10 keV の X 線スペクトルでは、低エネルギー領域から順に、Be-K α 線 (109 eV)、C-K α 線 (200 eV)、O-K α 線 (440 eV)、Ni-L α 線 (851 eV)、K-K α 線 (3,312 eV)、Ca-K α 線 (3,690 eV)、Fe-K α 線 (6,398 eV)、Ni-K α 線 (7,280 eV)、Ni-K β 線 (8,260 eV) などのスペクトルピークが観察された。スペクトルピークの存在によって提示される元素のうち、オスミウム (Os) は仮固定で用いた四酸化オスミウムに由来すると考えられるので解析対象から

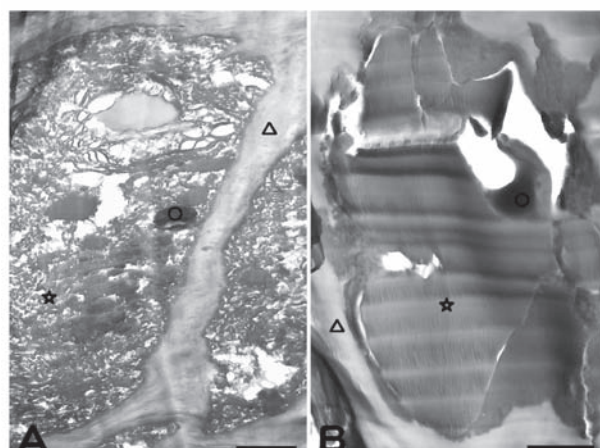


Fig. 12. Cryosection images of the abaxial region in mimosa tertiary pulvinus. A. Abaxial cells of pulvinus frozen in leaflet opening state. B. Abaxial cells of pulvinus frozen in leaflet closing state. In A and B, symbols indicate analyzed positions; tannin grain (○), vacuolar lumen (☆), and cell wall (△). Scale bar, 1 μm (A, B).

除外した。C、O は、普遍的に存在するのでその局在の特定は困難であり、解析対象から除外した。Si は、電子顕微鏡の真空排気系で必ず使用される物質の構成元素であり、Fe は、顕微鏡本体の素材であることから、装置からの混入は無視できず、試料由来の元素として特定できないため解析対象外とした。また、Be は試料ホルダーの Ni-グリッド装填部の素材であり、Ni は凍結切片載物のグリッドの素材であるのでともに解析対象外とした。

Fig. 13 と Fig. 14 は、小葉開状態と閉状態の向軸側と背軸側の小葉枕運動細胞内タンニン粒、液胞および細胞壁をそれぞれ元素分析して得られた典型的な X 線スペクトルを 1 例ずつ示したものである。また、Table 3 は、これらの元素分析で得られた X 線スペクトルをもとに定量計算されたそれぞれの分析部位における Ca、K、Cl の元素濃度を示している。

向軸側 (Fig. 13) では、タンニンは小葉開状態でのみ明確で大きな顆粒状を示すが、この部位の X 線スペクトルでは、顕著な K-K α 線と Ca-K α 線のスペクトルピークが見られ (Fig. 13A, D)、元素濃度は高かった (Table 1)。一方、小葉閉状態ではタンニンは不定形であり、検出された K-K α 線と Ca-K α 線のスペクトルピークは小さく (Fig. 12D)、そこでの Ca や K の濃度は激減していた (Table 3)。液胞内腔部の元素分析では、小葉の開閉両状態では、それぞれ有意と認めうる小さな K-K α 線と Ca-K α 線のスペクトルピークが検出された (Fig. 13B, E)。定量計算の結果、小葉閉状態では Ca 濃度は増加し、K 濃度はやや減少していた (Table 3)。一方、小葉閉状態では Cl-K α 線のスペクトルピークが検出され (Fig.

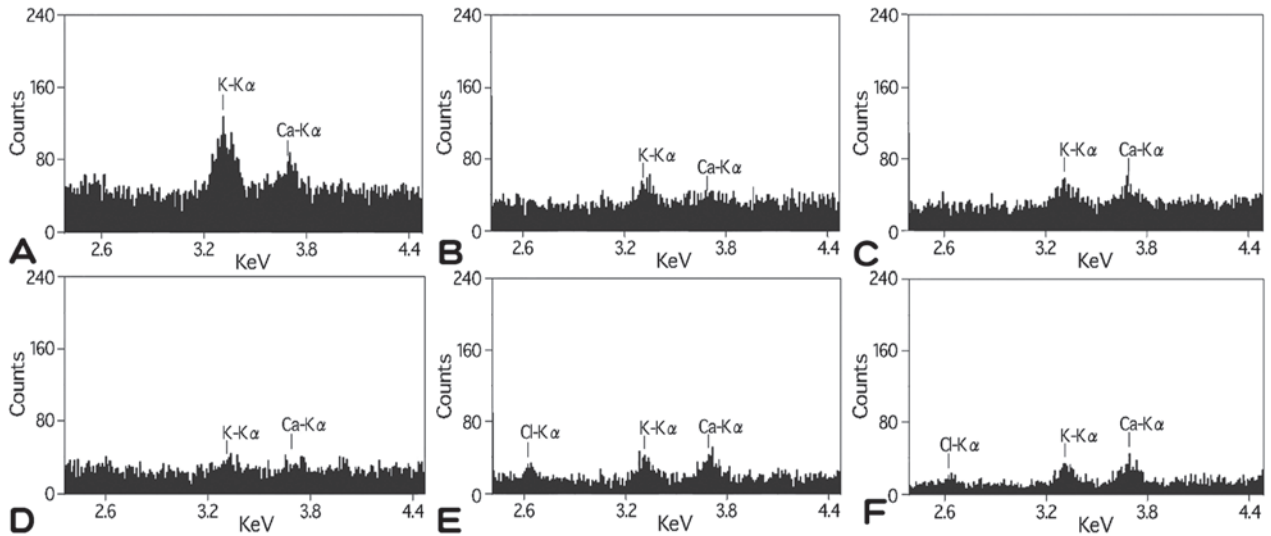


Fig. 13. X-ray spectra obtained from various positions of cells in the adaxial region of mimosa tertiary pulvinus. A-C. Spectra from tannin grain (A), vacuole (B) and cell wall (C), in leaflet opening state. D-F. Spectra from tannin grain (D), vacuole (E) and cell wall (F), in leaflet closing state. Labels indicate spectral peaks of respective element-line emission. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV (range; 2.4~4.5 keV).

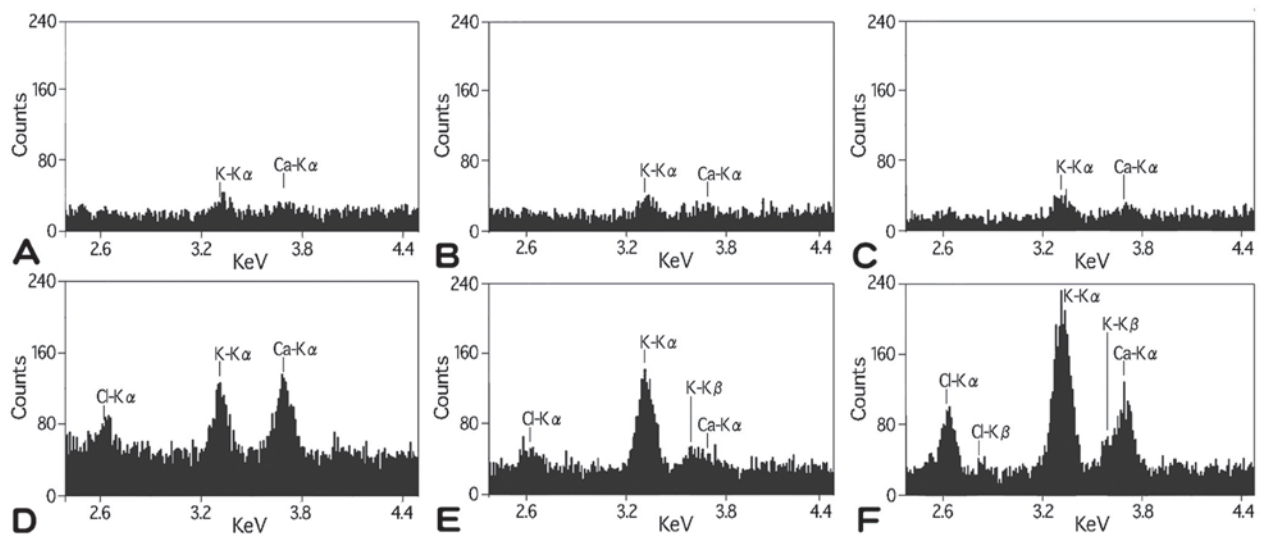


Fig. 14. X-ray spectra obtained from various positions of cells in the abaxial region of mimosa tertiary pulvinus. A-C. Spectra from tannin grain (A), vacuole (B) and cell wall (C), in leaflet opening state. D-F. Spectra from tannin grain (D), vacuole (E) and cell wall (F), in leaflet closing state. Labels indicate spectral peaks of respective element-line emission. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa shows the X-ray energy in keV (range; 2.4~4.5 keV).

Table 3. Concentrations of various elements in the tannin grain, the vacuole and the cell wall of pulvinus cells in leaflet opening and closing states

Pulvinus	Element	Concentration (mmol/kg dry wt.)					
		Tannin Grain		Vacuole		Cell wall	
		Open (6)	Close (4)	Open (6)	Close (4)	Open (7)	Close (5)
Adaxial cell	Ca	262.73	92.99	101.90	174.52	359.59	525.23
	K	950.74	177.91	297.65	257.20	677.20	498.49
	Cl	6.31	49.20	63.36	125.30	77.06	206.03
Abaxial cell	Ca	134.30	321.82	111.64	244.34	133.77	558.99
	K	565.64	713.77	226.17	916.92	296.36	1414.54
	Cl	9.99	236.59	25.95	304.94	65.30	501.05

Values are mean of examples. Exsample numbers of X-ray microanalyses are indicated in parenthesis.

13E)、液胞内で濃度が増加していることが示唆された (Table 3)。細胞壁では、液胞の場合と同様に小さいが明瞭な K-K α 線と Ca-K α 線のスペクトルピークが認められた (Fig. 13C, F)。定量計算結果では、小葉の閉合に伴い、Ca は増加し、K は減少することが示唆された。液胞の場合と同様に、小葉閉合時には細胞壁でも Cl-K α 線が検出され (Fig. 13F)、Cl 濃度も増加していた (Table 3)。

背軸側 (Fig. 14) では、向軸側とは逆相関的に、タンニン是小葉閉状態で大なる顆粒状を示し、開状態の分析で得られる小さな K-K α 線と Ca-K α 線のスペクトルピーク (Fig. 14A) よりはるかに大きいピークが検出された (Fig. 14D)。また、開状態では検出されなかった Cl-K α 線のスペクトルピークが検出された。定量計算でも、これらの元素濃度は、小葉閉合に伴い顕著に増加していた (Table 3)。液胞の元素分析結果も同じ傾向を示し (Fig. 14B, E)、特に K 濃度の増加が顕著であった (Table 3)。さらに、細胞壁の分析結果も同じ傾向を示し、小葉閉状態では、開状態よりも明瞭で大きな K-K α 線、K-K β 線、Ca-K α 線、Ca-K β 線、Cl-K α 線、Cl-K β 線が認められ (Fig. 14F)、濃度も開状態と比べて、K と Ca は 4~5 倍、Cl はおよそ 8 倍に増加していた (Table 3)。

小葉の閉合に伴い、小葉枕の向軸側と背軸側とでは、表面形状の変化、細胞形状の変化、細胞断面積 (または容積) の変化、液胞内のタンニン粒の形状変化などが鏡像的相関を示して生じていたが、細胞各部の K と Ca の濃度変化も同じ相関を示した。Cl 濃度の変化はやや変則的に思われたが、概ね K の濃度変化と同じ傾向であった。

討論

従来、オジギソウ主葉枕の麻醉には、エーテル麻醉や低温麻醉が用いられていた^{26, 27)} が、小葉枕の場合、同じ方法では固定中に小葉閉合が生じてしまい、開状態の固定試料を作製することは極めて困難であった。しかし、今回、エーテル麻醉後に四酸化オスミウム溶液で仮固定する方法を導入することにより、本固定中に小葉が殆ど閉じることはなくなったことから、この方法は、本研究のような目的で電子顕微鏡試料を化学固定したり、凍結したりするための適切な麻醉処理法であると考えられる。

小葉の閉合は、小葉枕における小葉向軸側への屈曲によって達成される。主葉枕による複葉の垂下では、屈曲の一つの要因は、主葉枕細胞の膨圧変化による変形であるとされている²⁻⁴⁾ が、結果的には屈曲に伴い、葉枕の表面形状も変化する。本研究における小葉枕外形輪郭距離の測定は、就眠運動に伴うネ

ムノキの葉枕表面変化²⁸⁾と同様に、オジギソウでも、小葉枕表面に褶曲が生じ、それは、小葉の開閉にあわせて、それぞれ背軸側と向軸側で増強されることを示した。小葉閉合時には、小葉枕の向軸側表面は葉軸方向に小葉展開時のおよそ 60% になるまで折り畳まれた。一方、小葉展開時には、小葉枕の背軸側表面は葉軸方向に閉合時のおよそ 74% になるまで褶曲が増強された (表 1)。明らかに、褶曲は、小葉の閉合に伴う運動細胞の膨潤や縮小の結果として生じていると考えられる。

小葉の閉合運動に寄与する運動細胞の特定化のために、小葉枕表皮および表皮下 2 層細胞の断面積が測定された。その結果、小葉の閉合に伴い、大きな断面積変化を示したのは、向軸側では II 層と III 層の細胞群で、それぞれ、元の大きさの 57% と 62% にまで小さくなっていた。一方、背軸側では III 層の細胞群の断面積変化が顕著で、元の大きさの 143% にまで大きくなっていた。II 層の細胞群も変化率は小さいが大きさを増していた。これらの断面積変化は容積変化を反映しており^{22, 23)}、振動傾性反応時には、向軸側 II および III 層などの細胞では水流出による膨圧減少、背軸側 II および III 層などの細胞では水流入による膨圧増大が生じていることを示す。主葉枕で明らかにされている⁴⁾ ように、向軸側の細胞から流出した水は背軸側に移送され、背軸側の細胞内に流入すると考えられる。表皮細胞は、小葉閉合時でも背軸側では容積変化を示さなかったが、向軸側では明らかに縮小しており、これらの細胞からも水が流出していると考えられる。なお、背軸側表皮細胞は細胞壁が厚く、表面のクチクラ層も厚い (Fig. 8) ので、向軸側表皮細胞より柔軟性に乏しく、変化しにくくなっている可能性がある。この考えは、小葉枕外形輪郭距離の測定で小葉の開閉に伴う距離変化が向軸側の方でより大きかったことから支持される。

FeSO₄ を用いた細胞化学は、Visnovits ら¹⁹⁾ の結果とよく一致し、小葉枕の細胞に含まれている赤褐色の小粒の主成分がタンニンであることを示した。光学顕微鏡で観察されたこれらの小粒は、樹脂包埋切片の電子顕微鏡像と比較検討すると、吸水して膨らんだ運動細胞液胞内の高電子密度の大きな顆粒と対応する。従来、類似の粒はタンニン液胞と称されている²⁹⁾ が、今回の電子顕微鏡観察では、それを取り囲む生体膜を確認することはできなかったのでタンニン液胞と同定することはできなかった。しかし、液胞内にあるタンニンを主成分とする粒状物体であることは確かである。

主葉枕では、葉柄下垂時に膨圧が低下した細胞で大きな球状であったタンニン液胞が小さな多数の粒

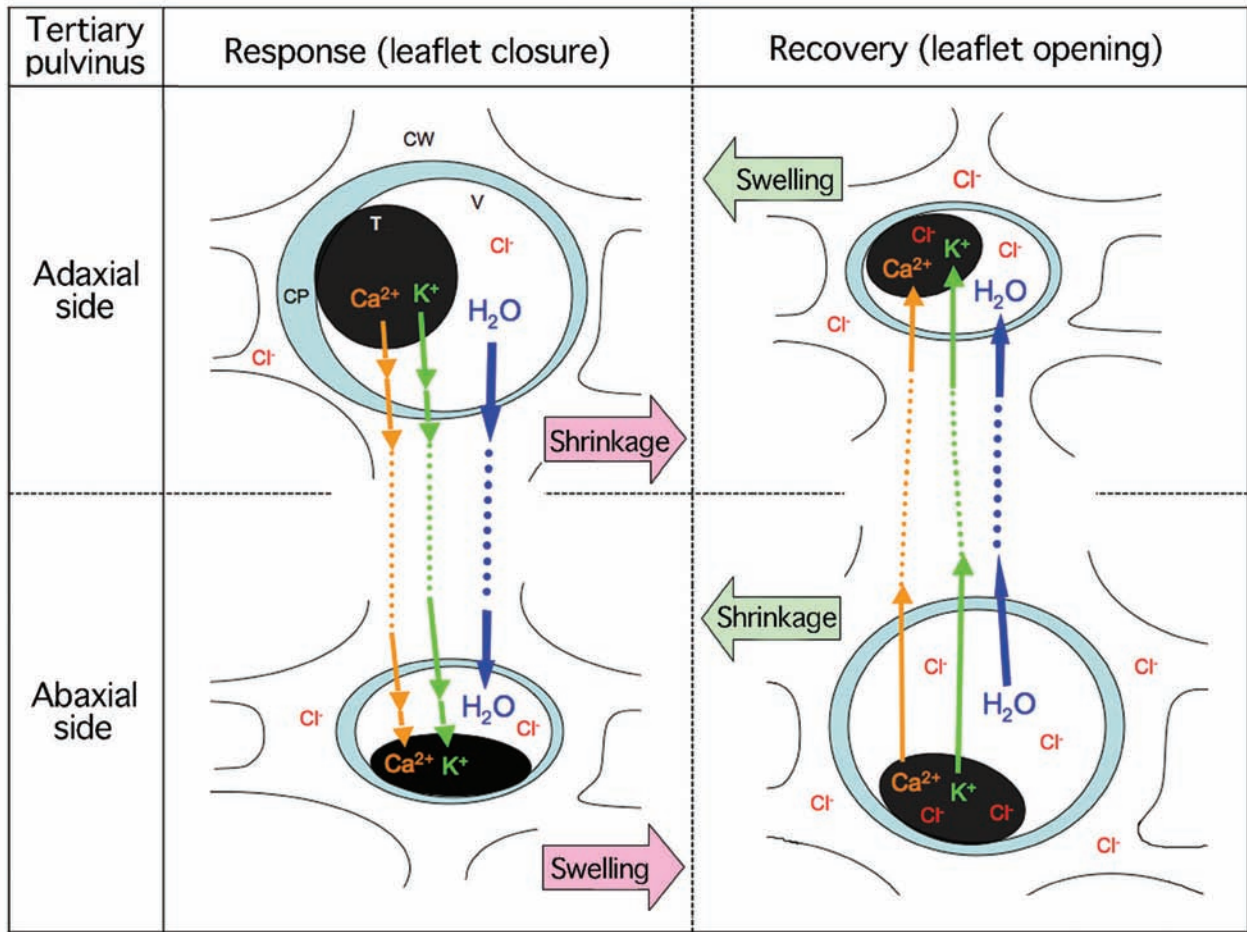


Fig. 15. Diagram showing the movement of Ca^{2+} , K^{+} and water during the leaflet closure and the leaflet opening in *Mimosa* seismonastic response and its recovery. Possible apoplastic translocation of ions and water between adaxial and abaxial sides in pulvinus is also shown. As a result of ions and water movement in leaflet closure, shrinkage is caused in adaxial cells and swelling is caused in abaxial cells. Conversely, in leaflet opening, shrinkage is caused in abaxial cells and swelling is caused in adaxial cells. Ca^{2+} translocation is possibly significant to regulate the movement of K^{+} and water. T: tannin grain. V: vacuole. CP: cytoplasmic matrix. CW: cell wall.

に変形することが報告されている⁷⁾。今回の電子顕微鏡観察では、小葉の開閉に伴い細胞断面積が増大する小葉枕細胞では大きなタンニン粒が出現し、細胞断面積が減少する小葉枕細胞では大きなタンニン粒は消失し、小粒化（もしくは帯状化）が生じていた。このことから、小葉枕でも、細胞の膨圧増減、すなわち水の流出入にタンニン粒は重要な役割を果たしていると考えられる。

PAを用いた電子顕微鏡細胞化学は、背軸側小葉枕細胞内のCa分布が小葉の開閉に伴い変化することを示した (Fig. 9)。観察されたPAの沈澱は全てCaを含むことがX線マイクロアナリシスで示された (Fig. 10) ので、その分布はCaの分布そのものを示すと考えることができる¹¹⁾。小葉開状態では、PAの沈澱は、液胞膜内表面に沿って扁平に広がったタンニン粒に局在し、小葉閉状態では、液胞内腔内に分散分布していた。この結果は、アリザリンレッドを

用いた光学顕微鏡による細胞化学で明らかにされている主葉枕の運動細胞内で生じる刺激応答前後の液胞内Ca動態⁸⁾とよく一致する。また、このPA沈澱の分布およびその変化は、PA法によって明らかにされている平滑筋の弛緩時と収縮時のCa分布とその変化¹¹⁾にそれぞれ対応して良く似ている。平滑筋で筋収縮時にPA沈澱が筋形質内に広く分散分布している状況は、弛緩時に筋形質膜などに局在していたCaが活性化Caとして遊離される状況を反映していると説明されており¹¹⁾、小葉展開時に、恐らく貯蔵部位となっているタンニン構造に局在しているCaが、小葉閉合時にそこから液胞内腔内に遊離される可能性がある。

オジギソウ主葉枕での細胞内外への水の移動は、Kイオンチャネルを通るKイオンの移動に伴って生ずると考えられている^{6,7)}。また、Kイオンチャネルの開口にはCaイオンがトリガーとして関与して

いる可能性^{30, 31)}も指摘されている。凍結切片の元素分析結果は、小葉閉合時に、Kは小葉枕の向軸側ではタンニン粒、液胞内、細胞壁のいずれにおいても減少し、背軸側ではそれらのいずれにおいても増加することを示した。このK濃度変化は小葉枕内のKイオンの移動を反映していると考えられる。すなわち、Kイオンは向軸側の細胞でタンニン粒から遊離し、液胞内を通過して細胞質基質から細胞外へと流出し、細胞壁内を移動して背軸側細胞へと至り、細胞内に流入して液胞内でタンニン粒と結合するものと思われる。これは、細胞の容積変化から想定される水の移動と一致する。主葉枕では、Caはタンニンと結合して貯蔵されていることが知られている³²⁾。Caは、小葉閉合時に、小葉枕の向軸側の細胞内のタンニン粒でのみ減少しているが、液胞内、細胞壁、背軸側の細胞壁、液胞内、タンニン粒といずれも増加していることから、最初にタンニン粒で遊離されたCaイオンがKイオンと同じ経路で、Kイオンに先行して移動している可能性がある。また、向軸側細胞でのタンニン粒における顕著な減少は、液胞からのKイオン流出を促進する現象を反映しているかも知れない。Clの濃度変化は変則的で、その解釈は容易ではないが、殆どの部分で増加しているため、主葉枕で報告されている^{2, 6, 7)}ように、Clイオンは電荷のバランスをとるようにKイオンとともに移動しているのかも知れない。Cl濃度変化についての詳細な検討は今後の課題として残された。

Fig. 15は、元素分析結果から、小葉閉合時に小葉枕の各細胞に局在するCa、KおよびClの各元素が、イオンとして水とともにどのように移動するかをまとめたものである。結論として、オジギソウでは、刺激受容後、小葉枕向軸側運動細胞内のタンニン粒に局在するCaやKが液胞内に遊離され、その結果、遊離Caイオンが、液胞膜のKチャンネルを開き、液胞内のKイオンが細胞質基質を経て細胞外に流出し、それに伴って水やCaイオンとともに背軸側運動細胞内へと移動して膨圧を増大させ、小葉枕を屈曲させることにより小葉を閉合させると考えられる。およそ30分で背軸側のタンニン粒に結合したCaやKは、再び液胞内にイオンとして遊離され、順次水とともに流出し、細胞壁を通過して向軸側へと移動し、その部位の運動細胞内に流入し、細胞を膨潤させることにより小葉枕の屈曲が解消され、小葉が展開されて回復状態が再現されると考えられる。

文献

1) Abe T and Oda K (1976) Resting and action potentials of excitable cells in the main pulvinus of *Mimosa*

- pubica*. *Plant Cell Physiol.* **17**:1343-1346.
- 2) Abe T (1981) Chloride ion efflux during an action potential in the main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Bot. Mag. Tokyo* **94**: 379-383.
- 3) Allen RD (1969) Mechanism of the seismonastic reaction in *Mimosa pudica*. *Plant Physiol.* **44**:1101-1107.
- 4) Tamiya T, Miyazaki T, Ishikawa H, Iriguchi N, Maki T, Matsumoto JJ and Tsuchiya T (1988) Movement of water in conjunction with plant movement visualized by NMR imaging. *J. Biochem.* **104**: 5-8.
- 5) Kallas P, Meier-Augenstein W and Schildknecht H (1990) The structure-activity relationship of the turgorin PLMF 1 in the sensitive plant *Mimosa pudica* L.: *in vitro* binding of [¹⁴C-Carboxyl]-PLMF 1 to plasma membrane fractions from *Mimosa* leaves and bioassays with PLMF 1-isomeric compounds. *J. Plant Physiol.* **136**: 225-230.
- 6) Moran N (1990) The role of ion channels in osmotic volume changes in *Samanea* motor cells analyzed by patch-clamp methods. In: *The Pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement*. Satter RL, Gorton and Vogelmann T, eds., The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. pp.101-129.
- 7) Fleurat-Lessard P, Frangne N, Maeshima M, Ratajczak R, Bonnemain JL and Martinoia E (1997) Increased expression of vacuolar aquaporin and H⁺-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **114**:827-834.
- 8) Toriyama H and Jaffe MJ (1972) Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol.* **49**: 72-81.
- 9) Fleurat-Lessard P (1988) Structural and ultrastructural features of cortical cells in motor organs of sensitive plants. *Biol. Rev.* **63**: 1-22.
- 10) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **18**: 123-183.
- 11) 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.
- 12) Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryosections. *Histochemistry* **92**:95-101.
- 13) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 14) Hayatsu M, Ono M, Hamamoto C and Suzuki S (2012) Cytochemical and electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intracellular calcium in columella cells of soybean roots under simulated microgravity. *J. Electron Microsc.* **61**: 57-69.
- 15) Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**: 317-339.
- 16) Suzuki S (1989) Methods of elemental analysis for

- biological specimens using an electron microscope. *J. Microorganism* **5**: 34-44.
- 17) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocations during the contraction-relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**: 1093-1099.
 - 18) Visnovitz T, Világi I, Varró P and Kristóf Z (2007) Mechanoreceptor cells on the tertiary pulvini of *Mimosa pudica* L. *Plant Signal. Behav.* **2**: 462-466.
 - 19) Ruzin SE (1999) Histochemistry and cytochemistry. In: *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York. pp.145-176.
 - 20) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
 - 21) Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.* **52**:690-718.
 - 22) 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.
 - 23) Kinami M and Suzuki S (2006) Structural analysis of dyadic contacts in the longitudinal body wall muscle of mollusk *Dolabella auricularia*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
 - 24) Hall TA (1971) The microprobe assay of chemical elements. In: *Physical Techniques in Biological research*, Oster G, ed., Academic Press, New York. pp157-275.
 - 25) Hamamoto C, Sato Y, Watanabe E, Hayatsu M and Suzuki S (2006) Development of mini-cup type of energy dispersivespectroscopy detector for TEM and its applications to biological studies. In: *Proceedings of 16th International Microscopy Congress Vol.1. Biological and Medecal science*. Ichinose H and Sasaki T, eds., Publication Committee of IMC16, Sapporo. p.124.
 - 26) Toriyama H and Sato S (1968) Electron Microscope observation of the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Proc. Japan Acad.*, **44**:702-706.
 - 27) Kanzawa N, Hoshino Y, Chiba M, Hoshino D, Kobayashi H, Kamasawa N, Kishi Y, Osumi M, Sameshima M and Tsuchiya T (2006) Change in the actin cytoskeleton during seismonastic movement of *Mimosa pudica*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 531-539.
 - 28) Toriyama H (1953) Observational and experimental studies of sensitive plants I. The structure of parenchymatous cells of pulvinus. *Cytologia* **18**; 283-292.
 - 29) Galston A (1994) *Life Processes of Plants*. Scientific American Library, New York.
 - 30) Satter RL and Galston AW (1981) Mechanisms of control of leaf movement. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**:83-110.
 - 31) Cote G (1995) Signal transduction and leaf movement. *Plant Physiol.* **109**: 722-734.
 - 32) Hollins DL and Jaffe MJ (1997) On the role of tannin vacuoles in several nastic leaf responses. *Protoplasma* **199**: 215-222.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

断片化した珪藻類全ゲノム DNA からの 高品質 DNA の精製

鈴木祥弘^{1,2,3} 金沢謙一¹ 森本貴之² 米澤直樹² 中山 堯²

Purification of High Quality DNA from the
Fragmented Total Genome of a Diatom Species

Yoshihiro Suzuki^{1,2,3}, Ken'ichi Kanazawa¹, Takayuki Morimoto²,
Naoki Yonezawa² and Takashi Nakayama

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

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail:r201170216pp@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The Preparation of total genome DNA is essential for genomic analysis with next-generation DNA sequencers (NGS). However the DNA of a psychrophilic diatom species, *Thalassiosilla nordansioeldii*, was difficult to fragmented during purifications. The fragmentation occurred during purification with some different protocols, such as the phenol-chloroform, affinity column, and benzyl chloride methods. These results suggest that the fragmentation of diatom DNA could not be avoided. Therefore longer DNA was collected from the fragmented DNA for NGS.

Keywords: diatoms, genome, next-generation sequencer, psychrophilic, thalassiosilla nordansioeldii

序論

次世代シーケンシング (NGS) は、各生物種に固有の全 DNA 塩基配列 (ゲノム) の解読に用いられ、多くの成果をあげてきた。近年になり、NSG の適用範囲は、トランスクリプトーム解析に用いられる RNA-seq や CAGE に加え、miRNA や siRNA などの small RNA 解析に用いられる small RNA-seq などへと広がっており、NGS は生命現象の解析道具として、幅広く使われるようになってきている。自然環境中の生物群集から抽出された DNA を材料として、群集組成の推定や動態の解析を行うメタゲノムまで考慮すれば、その適用範囲は実験生物から生態系まで、生物学の全ての分野へと広がりを見せている。様々な原理や規模の分析装置の普及とそれをサポートする機器の開発も進み、NGS の利用環境は飛躍的に向上した。しかし、天然の生物種で新規にゲノムを解読する de novo シーケンスは依然として容易ではない。アッセムブリーの際に参照する既知の配列のない de novo アッセムブリーには、より多くの配列の読み取り (coverage) が必要であること

は言うまでもない。これに加えて、多くの天然生物種では遺伝子構成が 2n でヘテロであることも解読を難しくしている。さらに、天然の生物種では実験生物で確立されている生理・生化学的手法がそのままでは適用できず、培養や DNA 精製が難しいものもある。こうした生物群の一つに珪藻類がある。珪藻類は海洋の主要な一次生産者であるがゲノム解読は進んでおらず、2014 年 4 月現在で、ゲノムが解読された種は中心目と羽状目でそれぞれ 1 種に過ぎない^{1,2)}。本研究では、ゲノム解読の対象として冬季オホーツク海のプランクトン藻類群集から単離した低温珪藻種に着目した。本種のゲノム DNA は精製の際に容易に切断されてしまい、次世代シーケンサーの解析に必要な高分子の DNA を大量に得ることが困難であった。先行研究で、原理の異なる 3 つの DNA 精製法について、細胞破碎、蛋白質の変性、DNA の共雑物からの精製の 3 段階について精製中の DNA 分子の劣化を検討した。これにより、珪藻類培養株から夾雑物の少ない DNA を精製方法が確立を

できた。しかし、こうして精製された DNA 試料には多くの断片化された DNA が含まれていた。これは珪藻類の持つガラス質の細胞壁が、抽出の際にゲノム DNA を断片化するためであることが予想されている。断片化した DNA を含む試料は NGS を用いて塩基配列を決定する際に、塩基配列決定の効率を著しく低下させる。NSG を用いて珪藻種のゲノム塩基配列を決定するためには、断片化の少ない高品質の DNA 試料が不可欠である。本研究では、*de novo* シークエンスを行うため、断片化 DNA を極力取り除いた一定長以上の DNA (無傷 DNA と呼ぶ) を全 DNA 試料から精製することを目指した。

材料と方法

低温珪藻類の単離と培養

2012 年 3 月、北海道サロマ湖においてプランクトン藻類の単離を行った。潮汐により結氷の無かった第二湖口付近の海面から表層水をバケツで採水し、プランクトンネットで 200 倍に濃縮してプランクトン藻類試料とした。プランクトン藻類試料を濾過海水で希釈した後、氷冷した時計皿に微細藻類試料を移し、水温を 0℃ に保ちながら双眼実体顕微鏡で検鏡した。細胞内に明瞭な葉緑体が認められ、コロニー当たりの細胞数が多く盛んに増殖していると推定できる個体を選び、先を細くしたパスツールピペットで 1 個体ずつ取り出した。これを f/10 培地 (Guillard) 各 1 mL の入った 24 ウェルプレート (Apogent Discoveries 社) に移して、50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の青色蛍光灯 (カリビアンブルー; スドー) の下、0℃ で 5~6 日培養した。プレートで増殖した微細藻類を 10 mL の f/10 培地の入った試験管に移し、同じ条件で培養を続けて培養株とした。培養株のうち試料中で優占していた珪藻種 *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve を実験に用いた。まず、単離株を f/2 培地 (Guillard) 100 mL に移植し、同じ条件で培養を続けた。細胞数が十分に増加した後、培養細胞を含む培地 50 mL を f/2 培地 (Guillard) 1500 mL に移植した。細胞数が十分に増加し増殖が停止する前に、光学顕微鏡で細胞の状態を確認して細胞を集めた。細胞は 0℃、2000 g で 10 分間遠心分離してペレットとして回収した。ペレットは等量の培地で懸濁した後、200 μL ずつ分注した。分注後、0℃、2000 g で 3 分間遠心分離してペレット試料を得た。必要に応じて試料を液体窒素で凍結させ、-81℃ で保存した。

全 DNA の調整

試料から全 DNA を抽出した。精製にはフェノール・

クロロホルム法と DNA 吸着カラム法を用いた。いずれの方法も (1) 細胞の破碎、(2) 蛋白質の変性、(3) DNA の精製、の 3 つに分けられる過程が含まれていた (図 1)。フェノール・クロロホルム法³⁾では 200℃ で 24 時間乾熱滅菌した乳鉢で藻類の細胞を破碎した。破碎処理中に細胞が融解しないように乳鉢と乳棒は液体窒素で冷却し低温を保った。SDS を含む緩衝液中で蛋白質分解酵素 (proteinase K) と RNA 分解酵素 (RNase A) を用いて蛋白質と RNA を分解し、さらに、中性フェノールで試料を処理して蛋白質を変性させた。変性した蛋白質を遠心処理で除いた後、水相の DNA を 100% エタノールで沈殿させた。これを 70% エタノールで洗浄後、緩衝液に溶解して DNA を精製した。DNA 吸着カラム法には、DNeasy (Qiagen CO., LTD) を用いた⁴⁾。この方法でも通常のプロトコルでは乳鉢を用いて細胞を破碎するが、本研究では遠心管中の凍結試料に抽出緩衝液を直接加えて、穏和に破碎する方法を用いた。その後、蛋白質変性剤と RNase A を含む抽出緩衝液で RNA と蛋白質を分解・変性し、その多くを遠心処理により沈殿させた。共雑物を含む DNA は、DNA 吸着カラムを通過させ、DNA のみをカラムに残した。カラムを洗浄緩衝液で洗浄して、残った共雑物を除いた後、溶出緩衝液を用いて DNA を溶出して精製した。

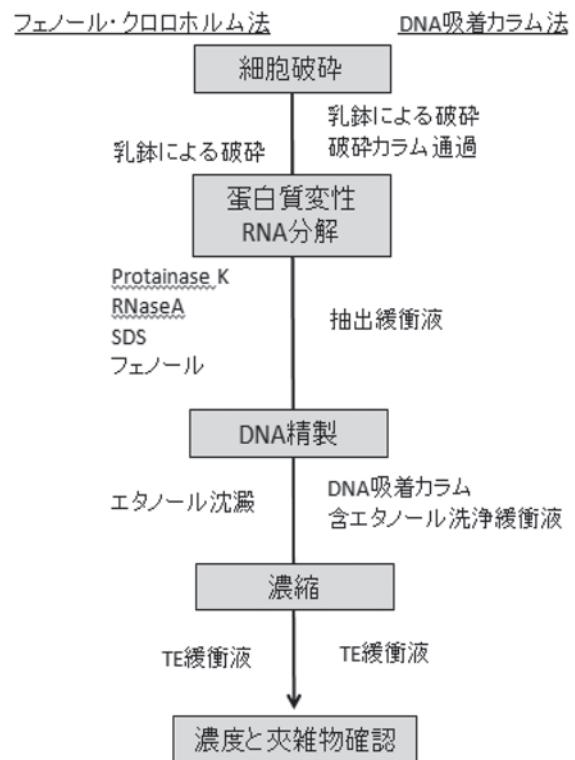


図 1. 全 DNA 抽出法の概略。フェノール・クロロホルム法, DNA 吸着カラム法は同様の過程を経て抽出される。

精製された全 DNA の定量と質の検証

精製されたゲノム DNA の濃度と共雑物の過多の検証は、分光光度計を用いて、波長 200-300nm の範囲で吸収スペクトルを測定し検討した。A260/A280 の値を蛋白質の混入の指標として求めた。また、A260 から濃度を求めた³⁾。

無傷 DNA の精製

断片化した DNA から無傷 DNA を生成するために、0.7%の低融点アガロースゲル (Agarose L、ニッポン・ジーン) を含む TAE 緩衝液中で電気泳動し、最も泳動距離の短い高分子部分を切り出した。切り出したアガロースゲルからの DNA 抽出には Get pure DNA kit – Agarose (同仁化学) を用いた。Gel lysis buffer でゲルを溶解後、Precipitation solution でゲルだけを沈殿させた後、Co-precipitation solution で、上澄中の DNA を沈殿、回収した。

結果と考察

フェノール・クロロホルム法で、破碎後の細胞にフェノールを作用させて蛋白質を凝集させ遠心分離すると、蛋白質と共に大量の粘液物質が沈殿した。この際に分離した水相からエタノール沈澱法で DNA の精製を試みたが、沈澱は生じず DNA は回収できなかった。破碎した試料を大量の緩衝液で希釈して粘液物質を希釈し、その影響を抑えて精製を行うと、吸収スペクトルには蛋白質の吸収とともに僅かに DNA の吸収と思われるピークが認められた。これらの結果は、蛋白質の分離の際に生じた粘液物質を含む沈澱とともに DNA が沈殿してしまい、精製が難しいことを示唆している。条件を変化させて繰り返し精製を行ったが、十分な量の DNA を生成することはできなかった。

DNA 吸着カラムを用いた方法でも、細胞を破碎して蛋白質などを変性して沈殿させることで、DNA を分離する。この最初の段階では、DNA 吸着カラム法でも同様に粘液物質が沈殿した。しかし、カラムに DNA を吸着させることを前提とするこの方法では、破碎細胞に数倍の溶解緩衝液を用いる。破碎細胞と溶解緩衝液の量比を変え、通常のプロトコール以上に細胞を希釈した状態で精製を開始することで、DNA の収率を上げ、150mg の細胞ペレットから、約 10 μ g の DNA が精製できた。NSG での DNA-seq には、通常 0.1 ~ 1.0 μ g の DNA が必要であり、量的には問題の無い DNA が 150mg の細胞ペレットから精製できることが明らかになった。乳鉢を用いずに、遠心管中で細胞を破碎する方法でも、同様の収率で DNA を得ることが出来た。また、カラ

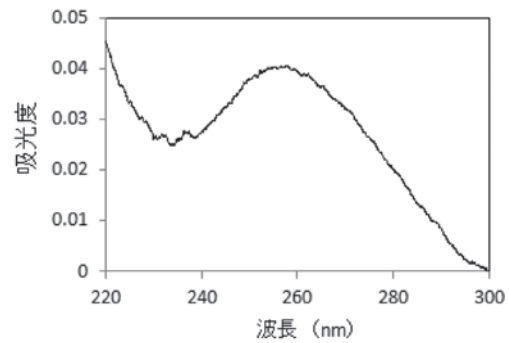


図 2. DNA 吸着カラム法で精製された全 DNA 試料の吸収スペクトル. 生重量 150mg の藻体から精製された DNA を TA 緩衝液 200 μ l に溶出、純水で 50 倍に希釈して測定した。

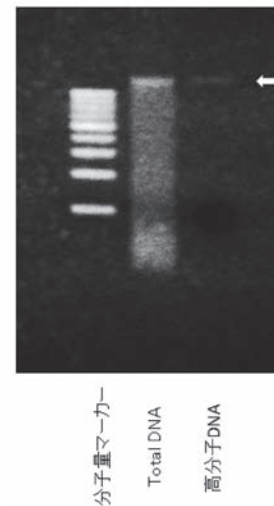


図 3. DNA 試料の電気泳動像. 0.7% アガロースで試料を電気泳動し、SYBR Green で染色した. 左:分子量マーカーは 0.5Kbp のラダーで下から 500, 1000, 1500, 2000bp を示す. 中: DNA 吸着カラム法で精製された全 DNA. 右: 高分子部分を切り出して回収した DNA (白矢印部分)。

ムを用いて精製された DNA 試料の吸収スペクトルの A260/A280 は常に 1.8 以上であり、夾雑物の混入が僅かであることを示していた (図 2)。このため、以降の実験では DNA 吸着カラム法で得られた DNA 試料を用いた。

夾雑物の混入がないことと同様に、DNA が断片化していないことも、試料を次世代シーケンサに供する際に重要である。DNA 吸着カラム法で得られた DNA 試料を電気泳動したところ、断片化した成分を多く含んでいることが明らかになった (図 3)。RNase A を用いて RNA の完全に分解していることから、断片は DNA であると考えられる。乳鉢を用いた細胞破碎を行わず、遠心管中で穏和に細胞破碎した DNA 試料にも、先行研究でおこなった塩化ベンジル法の DNA 試料にも断片化した DNA が含ま

れることから、乳鉢の使用やカラム操作などの物理的操作が断片化の原因であるとは考えにくい。これらの試料に共通する要因は藻類それ自体であると考えられる。他の生物と比べて、珪藻類に特徴的な要因は珪酸ガラス質の細胞壁である。このため、珪藻の細胞壁は DNA 断片化の原因候補の一つとしてあげることが出来る。また、藻類それ自体が原因であるならば、珪藻類からのゲノム DNA の精製で断片化を避けることは難しいと考えられる。

本研究では、電気泳動像の最も上部に認められる高分子 DNA に多くの断片化されていない DNA が含まれていることに着目し、断片化した DNA 試料からできる限り高分子の試料を作成することを試みた。このため、吸着カラム法で DNA を準備し、アガロース電気泳動のバンドから DNA を回収することを試みた。

0.7%の低融点アガロースゲルと Get pure DNA kit を用いることで、一定量の高分子 DNA を回収することに成功した (図 3)。こうして得られた DNA 試料を用いて、今後、NSG による検証を行う予定である。

謝辞

本研究は神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201402) により行われた。毎週行われた共同研究会合の準備にご協力いただいた神奈川大学理学部生物科学科集団生物第 4 研究室の大学院生の皆さんには、深くお礼申し上げます。

文献

- 1) Bowler C *et al.* (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**:239-244.
- 2) Armbrust EV *et al.* (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306** :79-86.
- 3) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- 4) Qiagen DNeasy CO.,LTD. (2000) *Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit Handbook*. http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1015107hbdny_0800ww.pdf

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

イソスジエビのインスリン様造雄腺因子の血中動態解析に向けた高感度測定系の確立

大平 剛^{1,2,4} 埼玉瑞帆¹ 鈴木竜太¹ 鶴岡慎哉¹ 片山秀和³ 泉 進^{1,2}

Development of a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for an Insulin-Like Androgenic Gland Factor of the Pacific Grass Shrimp *Palaemon Pacificus*

Tsuyoshi Ohira^{1,2,4}, Mizuho Saitama¹, Ryuta Suzuki¹, Shinya Tsuruoka¹, Hidekazu Katayama³ and Susumu Izumi^{1,2}

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

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

³ Department of Applied Biochemistry, Institute of Glycoscience, Tokai University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1292, Japan

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

Abstract: The male secondary sex characteristics of crustaceans are controlled by an androgenic gland hormone (AGH), which is specifically synthesized in and secreted from the androgenic glands (AGs) attached to the male reproductive organ. AGH has been purified from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* for the first time, and its chemical structure has been determined. Recently, insulin-like androgenic gland factor (IAG) was cloned from some decapod crustaceans. IAG shows sequence similarity to isopod AGHs, and has been suggested to be decapod AGH, although no direct evidence for the function of IAG has been reported. In order to elucidate the function of IAG, it is very important to analyze hemolymph levels of IAG during sex differentiation in decapod crustaceans. Therefore, in this study, we developed a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IAG of the Pacific grass shrimp *Palaemon pacificus*. A synthetic *P. pacificus* IAG B-chain was conjugated to key-hole limpet hemocyanin and injected into rabbits, and an antiserum against *P. pacificus* IAG was subsequently obtained. The synthetic *P. pacificus* IAG B-chain was labeled with horse radish peroxidase. Using the antiserum and labeled synthetic peptide, an ELISA system for *P. pacificus* IAG was developed. The sensitivity of the assay was 80 fmol/mL. The AG extract from *P. pacificus* produced a displacement curve which was almost parallel to that of the *P. pacificus* standard. The total amount of *P. pacificus* IAG in the AG was 32 fmol. This is the first report on the IAG content in the AG.

Keywords: androgenic gland hormone, androgenic gland, insulin-like androgenic gland factor, decapod crustacean, *Palaemon pacificus*

序論

無脊椎動物の性決定や性分化機構の研究は、昆虫と甲殻類を用いて行われてきた。甲殻類では内分泌的な性分化の制御機構が働いていることが明らかになっている。甲殻類の性分化に重要なのが雄にのみ存在する造雄腺 (Androgenic gland, AG) という内分

泌器官である。端脚目のオオハマトビムシ *Orchestia gammarella* を実験動物に用いた AG の移植、除去実験により、AG は雄の一次性徴、二次性徴を促進させる組織であることがわかった¹⁾。その後、雄性性徴の発達を促したのは、AG から分泌される造雄腺ホルモン (Androgenic gland hormone, AGH) の

作用によることが明らかにされた。AGH はオカダンゴムシから性転換活性を有する画分として初めて単離、精製され、一次構造が明らかにされた²⁾。AGH は B 鎖と A 鎖が 2 対のジスルフィド結合で架橋され、さらに B 鎖および A 鎖内にそれぞれ 1 対ずつジスルフィド結合が存在し、A 鎖にはアスパラギン結合型糖鎖が付加していた。この構造の特徴から、オカダンゴムシ AGH はインスリンスーパーファミリーに属すると考えられた。これと同時期に、オカダンゴムシ AGH の前駆体をコードする cDNA がクローニングされ、AGH 前駆体はシグナルペプチド、B 鎖、C ペプチド、A 鎖から構成されていることが明らかにされた³⁾。

十脚目甲殻類においても、AGH の探索が進められてきた。テナガエビ科のオニテナガエビとミナミザリガニ科の *Cherax quadricarinatus* から、AG で特異的に発現する遺伝子が Expressed sequence tag (EST) 解析により単離された^{4,5)}。それらの遺伝子は、シグナルペプチド、B 鎖、C ペプチド、A 鎖からなるポリペプチドをコードしていた。またインスリンスーパーファミリーで保存された 6 つのシステイン残基を持つことから、インスリン様雄腺因子 (Insulin-like androgenic gland factor, IAG) と名付けられた。これら十脚目の IAG は構造的な特徴、および AG で特異的に発現していることから、十脚目の AGH の有力候補であると考えられている。しかし、十脚目の IAG は等脚目の AGH と相同性をほとんど示さず、また十脚目種間でも高い相同性はなかった。そのため、IAG が十脚目の AGH であるかは未だ不確定なままである。

本研究を開始した当初、イソスジエビ IAG をコードする cDNA が既に単離されており、イソスジエビ IAG には糖鎖の付加配列が存在しないという、他には例がない特徴を有していた⁶⁾。また、テナガエビ科のイソスジエビは年間を通じて野外採集が可能であることから、ホルモンの周年変動を調べるための実験材料として適している。IAG の生体内での機能を解明するためには血中濃度を測定することは極めて重要である。そこで、本研究では ELISA 法を用いてイソスジエビ IAG 測定系を確立することを目的とした。

材料と方法

実験動物

実験で使用したイソスジエビ *Palaemon pacificus* は神奈川県真鶴町真鶴マリーナ近くの潮だまりで採集した天然個体を用いた。

抗イソスジエビ IAG 抗体の作成

イソスジエビ IAG B 鎖の 13 から 39 残基目までの 27 アミノ酸からなるペプチドを化学合成した (図 1)。それをカサ貝のヘモシアニンに結合させたものを抗原とした。抗原をフロイント完全アジュバント (Difco Laboratories, USA) と混合し乳濁化させ、ウサギの皮内に注射した。2 回目以降 (4 週間後および 5 週間後) はフロイント不完全アジュバント (Difco Laboratories) と混合し乳濁化させ、ウサギの皮内に注射した。注射は合計 3 回行った。最後の注射より 1 週間後に全採血を行った。血液を 37°C で一晩静置した後、遠心分離により血清と血餅に分けた。得られた血清を抗イソスジエビ IAG 抗体として、以降の実験で使用した。

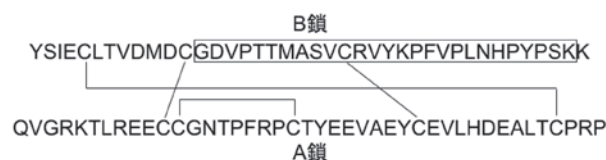


図 1. イソスジエビの Insulin-like androgenic gland factor (IAG). 図中の線はジスルフィド結合を、ボックスは本研究で化学合成した部分を示している。

抗イソスジエビ IAG 抗体を用いた酵素免疫測定系の確立

マイクロタイタープレートに抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Sigma) を 4°C で 2 昼夜固相化し、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) / 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて 4°C で一晩ブロッッキング反応を行った。固相化したプレートはトリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄し、風乾させ使用まで 4°C で保存した。上述した化学合成イソスジエビ IAG B 鎖を Peroxidase で標識し、これを標識抗原とした。標識を行わなかったものを未標識抗原とした。未標識抗原 (20 pmol/mL ~ 20 fmol/mL)、標識抗原、抗イソスジエビ IAG B 鎖抗体の順に 50 μL ずつプレートに分注し、4°C で一晩反応させた。プレートを 0.05% Tween 20 を含む TBS で洗浄した後、発色基質の SureBlue Reserve (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) を分注して室温で 30 分間反応させた。Stop Solution (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) を加え、プレートリーダーを用いて波長 450 nm の吸光度を測定し検量線を作製した。

造雄腺中のイソスジエビ IAG の定量

イソスジエビの雄 10 尾から造雄腺を含む雄性生殖器官を摘出し、フッ化フェニルメチルスルホニルを含むホウ酸緩衝液 200 μL を加えてホモゲナイズし蛋

白質抽出を行った。その抽出物を原液、2倍、5倍、10倍、100倍希釈した溶液（ホウ酸緩衝液で希釈）を調整した。それら溶液中のイソスジェビ IAG 量を、前述した酵素免疫測定系で定量した。

結果と考察

図2にイソスジェビ IAG 測定系の検量線を示す。本測定系の検出限界は 80 fmol/mL であった。イソスジェビ造雄腺のタンパク質抽出物の希釈曲線は、検量線に対して平行であり、抽出物中の IAG を測定可能であると考えられた。得られた結果からイソスジェビ造雄腺中の IAG 量を計算したところ、造雄腺 1 個あたり 32 fmol のイソスジェビ IAG が含まれていることが明らかとなった。今後、本測定系を用いることで、造雄腺中の IAG 量の変動を調べることができるようになった。

一方、この測定系を使って血リンパ中に含まれるイソスジェビ IAG を定量することは難しいと考えられた。イソスジェビは体長が僅か数センチメートルの小型のエビであり、採血が難しい。さらに、1尾からとれる血リンパは約 5 μ L とごく僅かである。これらのことが、血リンパ中の IAG 量を測定することを困難にしている。また、血リンパ中の IAG 量は未だに調べられていないが、他のホルモンの例（アメリカザリガニの脱皮抑制ホルモン）を見ると、甲殻類のホルモンは血リンパ中には 1 から 6 fmol/mL ぐ

らひの僅かな量しか存在しないことが示されている⁷⁾。これらのことを考慮すると、イソスジェビ IAG の検出限界を 100 倍程度上げる必要があると思われる。

これまでに、血リンパ中のごく僅かなホルモン量を定量するための高感度測定系が幾つか確立されている。上述したアメリカザリガニの脱皮抑制ホルモンの測定系では、時間分解蛍光免疫測定法という手法を用いることで、検出限界が 0.2 fmol/mL という高感度化を実現している⁷⁾。また、ミドリガニの血糖上昇ホルモンと脱皮抑制ホルモンの測定系では、放射免疫測定法という手法を用いており、両測定系とも検出限界は 0.5 fmol/チューブである⁸⁾。今後、これらの測定系を参考にしつつ、さらに改良を加え、血リンパ中のイソスジェビ IAG 濃度を測定可能な系を確立していきたいと考えている。イソスジェビ IAG の測定系が確立できれば、血中 IAG の季節変動、性分化や性成熟に伴う変動を明らかにすることができる。これらのデータは十脚目 IAG の研究を大きく進展させるものであり、十脚目の性分化制御機構を解明するうえでとても重要なものとなる。

謝辞

本研究は 2014 年度の神奈川大学総合理学研究所共同研究の助成金 (RIIS201409) を受けて行われました。ここに謝意を表します。

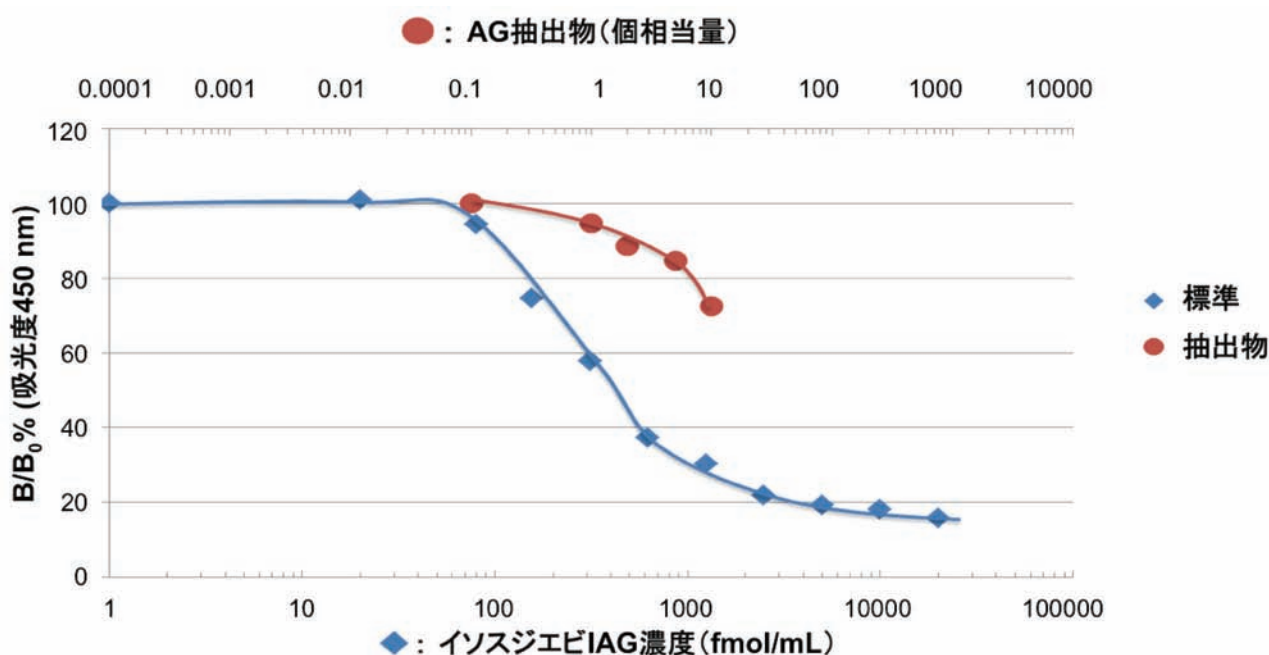


図2. イソスジェビ Insulin-like androgenic gland factor (IAG) の測定系. 1 fmol/mL の標準物質（化学合成したイソスジェビ IAG）をウェルに加えたときの波長 450 nm の吸光度を B_0 とし、標準物質（青線）およびイソスジェビ造雄腺のタンパク質抽出物（赤線）をウェルに加えたときの波長 450 nm の吸光度を B とし、 $B/B_0\%$ の値をグラフにプロットした。

文献

- 1) Charniaux-Cotton H (1954) Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires mâles. *C. R. Acad. Sci. Paris* **239**:780-782.
- 2) Martin G, Sorokine O, Moniatte M, Bulet P, Hetru C and Van Dorsselaer A (1999) The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*. *Eur. J. Biochem.* **262**:727-736.
- 3) Okuno A, Hasegawa Y, Ohira T, Katakura Y and Nagasawa H (1999) Characterization and cDNA cloning of androgenic gland hormone of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**:419-423.
- 4) Manor R, Weil S, Oren S, Glazer L, Aflalo ED, Ventura T, Chalifa-Caspi V, Lapidot M and Sagi A (2007) Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**:326-336.
- 5) Ventura T, Manor R, Aflalo ED, Weil S, Raviv S, Glazer L and Sagi A (2009) Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**:1278-1286.
- 6) Banzai K, Isizaka N, Asahina K, Suitoh K, Izumi S and Ohira T (2011) Molecular cloning of a cDNA encoding insulin-like androgenic gland factor from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* and analysis of its expression. *Fish. Sci.* **77**:329-335.
- 7) Nakatsuji T and Sonobe H (2004) Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**:358-364.
- 8) Chung JS and Webster SG (2005) Dynamics of *in vivo* release of molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinol.* **146**:5545-5551.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

FIB-SEM を用いたシロイヌナズナの雄性配偶体の 形成過程の解析

安積良隆^{1,3,4} 松島英輝²

Analysis of Developmental Process of *Arabidopsis*
Male Gametophyte Using FIB-SEM

Yoshitaka Azumi^{1,3,4} and Hideki Matsushima²

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

² IB Application Group, IB Business Unit, JEOL Ltd., Akishima City, Tokyo 196-8558, Japan

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

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

Abstract: In contrast to animal lifecycles, those of plants show the alternation of two generations, that is, a diploid sporophyte generation and haploid gametophyte generation. Male and female gametophytes, which respectively produce male and female gametes, are essential for plant sexual reproduction. The male gametophyte pollen develops in anthers interacting with surrounding tapetum cells, which have been considered to provide materials and energy to developing pollen grains for their growth. We analyzed *Arabidopsis* pollen developmental processes using the recently exploited focused ion beam-scanning electron microscope (FIB-SEM). Our research is still detemining appropriate conditions for fixation and staining methods, but we have obtained several series of anther sections, which revealed intracellular structures of and intercellular associations between pollen and tapetum cells.

Keywords: focused ion beam-scanning electron microscope (FIB-SEM), arabidopsis thaliana, male gametophyte developmen

序論

植物は動物と違い、その生活環の中に $2n$ の孢子体世代と n の配偶体世代の間の世代交代が存在する^{1,2)}。被子植物では花粉と胚のうが雄性と雌性の配偶体に相当する。花粉は葯の中に形成された花粉母細胞が減数分裂を行って生じる花粉小孢子が発達したものである³⁾。また、胚のうは雌蕊の子房の側壁に形成される胚珠の中の胚嚢母細胞が減数分裂して生まれた胚嚢細胞が発達したものである⁴⁾。花粉母細胞と胚嚢母細胞の減数分裂には、それぞれ前期、中期、後期、終期からなる第一分裂と第二分裂があり、1つの母細胞から4つの細胞が形成される⁵⁾。花粉母細胞から生じる4つの小孢子は、その後どれも同じように発達するが、胚嚢母細胞から生じた4つの細胞は1つだけが発達し、残りの3つの細胞は退化する^{3,4)}。一般に減数分裂の第一分裂前期には核膜が分散し、染色体は凝縮を開始する。この間に相同染色

体同士が対合し、組換えが起こる。その後さらに凝縮して中期には二価染色体として赤道面に整列する。後期になると相同染色体同士は分離し、別々の極へと移動して、終期になると染色体は脱凝縮し、核が再形成される。シロイヌナズナなどの双子葉植物では、第一分裂後には細胞質分裂は起こらず、1つの細胞の中で第二分裂が進行する。第二分裂前期では再び、染色体は凝縮し、中期には2つの紡錘体が形成され、その赤道面に染色体が整列する。後期には姉妹染色体が分離し、終期になると4つの核が形成される。その後、細胞質分裂が起こり、4つの細胞が生まれるが、花粉母細胞の場合、4つの細胞を取り囲む細胞壁が破られ、細胞が分離するまでは花粉四分子と呼ばれる。花粉母細胞の減数分裂に関しては多くの変異体が単離されており^{6,7)}、この過程には多くの減数分裂に特異的な遺伝子の発現が必要であ

ることが知られている^{8,9)}。花粉四分子が分離して生じた花粉小胞子はその後、発達して花粉と呼ばれるようになるが、その間に細胞分裂を行い花粉管細胞と雄原細胞となり、雄原細胞は花粉管細胞の中に取り込まれる。雄原細胞はさらに分裂して、精細胞となる。

花粉母細胞が減数分裂を行い、花粉小胞子を花粉へと発達する過程では、これを取り囲むタペート細胞の働きが重要である¹⁰⁾。タペート細胞からは、花粉の成長や細胞壁の合成などに必要な物質やエネルギーなどが供給されているものと考えられている。タペート細胞の分化に異常が生じた変異体では、正常な花粉は形成されない。これまでに花粉母細胞を培養する条件は確立されておらず、花粉母細胞の培養にはかなり複雑な条件が必要と予想される。これはタペート細胞あるいは維管束の篩管・導管を通じて他の細胞から何らかの栄養や植物ホルモンなどが供給されているためではないかと考えられる。

本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナを材料として用いた。シロイヌナズナは非常に多くの研究者に研究材料として採用されており、すでにゲノムの全塩基配列は高等生物では最初に決定されており¹¹⁾、多くの詳細な観察が行われ¹²⁾、様々な研究手法も確立されている¹³⁾。解析器機としては、近年、精度が著しく向上し、様々な分野で利用されている¹⁴⁾ FIB-SEM (focused ion beam-scanning electron microscope) を利用することにした。この方法では樹脂包埋した試料の表面を走査型顕微鏡によって観察した後、その表面を集束イオンビームで一定の厚さ削り、またその表面を観察するという作業を繰り返す。30 nm 程度の厚さで掘り進めることが可能で、共焦点走査型レーザー顕微鏡などの光学顕微鏡から得られる光学切片よりも鮮明な画像が得られる。取得した連続 SEM 画像から立体構造を構築することもできる。この装置を用いて、雄性配偶体が形成される花粉母細胞の減数分裂の過程の解析を行った。

材料と方法

シロイヌナズナの葯試料の準備

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) の Landsberg *erecta* 株を、神奈川大学湘南ひらつかキャンパス植物育成実験棟内で、14 時間明期 10 時間暗期の光周期の下、24°C で栽培した。播種後 5 ~ 6 週間の、花芽を盛んに形成する時期の花序を固定液 (6% glutaraldehyde, 1xPBS, 0.05% TritonX-100) に摘み取り、室温で 2 時間固定した。1xPBS 溶液で洗浄後、4°C で保存した。シャーレの中で、それぞれの花序の蕾を別々に分け、蕾ごとに雄蕊を 1 本ずつ

取って、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) で染色して、減数分裂期のステージを同定した。必要な時期の蕾の残りの雄蕊を 1% poly-L-lysine で処理したスライドガラス上に取り出し、葯を破壊し花粉母細胞をスライドガラスに付着させた。DAPI を滴下し、蛍光顕微鏡 (オリンパス) で細胞の付着状況を確認した後、切断したファルコンチューブをアロンアルファでスライドガラスに接着させ、囲みを作った。2% Osmium Tetroxide を囲みの中に滴下し、室温 1 時間の固定を行った。1xPBS で洗浄後、Uranyl Acetate で 40 分間、Lead Citrate で 8 分間の染色を行った。アセトンを用いて段階的に脱水した後、Quetol 812 エポキシ樹脂を流し込み、包埋した。40°C 24 時間、60°C 48 時間、保温することで樹脂を重合させた。

試料の電子顕微鏡観察

スライドガラスからファルコンチューブ入りの樹脂を取り外し、ファルコンチューブを切断して樹脂を取り出した。蛍光顕微鏡下で細胞の位置を確認しながら、トリミングを行った。試料の観察は日本電子社製の複合ビーム加工観察装置 JIB-4601F を用いて行った。図は得られた連続 SEM 画像をもとに Photoshop (Adobe) を用いて作成した。

結果

JIB-4601F (日本電子) はイオンビームを照射することによって樹脂中の試料を徐々に切除し、現れた断面をその度、SEM 観察することのできる装置である。本研究ではこの装置を利用して、葯あるいは花粉母細胞塊を含む樹脂に対して約 32 nm の深さの掘削を繰り返し、葯を構成する細胞と、雄性配偶体へと発達中の花粉母細胞の内部構造を解析した。取得した画像データにはイオンビームの跡が見られたが、大きな支障とはならず、概ね良好な画像が得られた。

減数分裂期の花粉母細胞

シロイヌナズナの葯を poly-L-lysine 処理したスライドガラス上で破壊した際に、葯から放出されスライドガラスに貼りついた 7 個の減数分裂期の花粉母細胞の塊りについて観察を行った。全体で 397 枚の画像が取得でき、4 個の細胞については、全体を網羅する画像を得ることに成功した。どの細胞もお互いに密着して、球状ではなく、かなりいびつな形をしているのがわかった。図 1 はその 1 つの細胞に関する画像で、61 枚目から 201 枚目までを 10 枚おきに示したものである。A が削り始めの断面で、中央の細胞が見え始めたところである。B、C と進むにつれ、

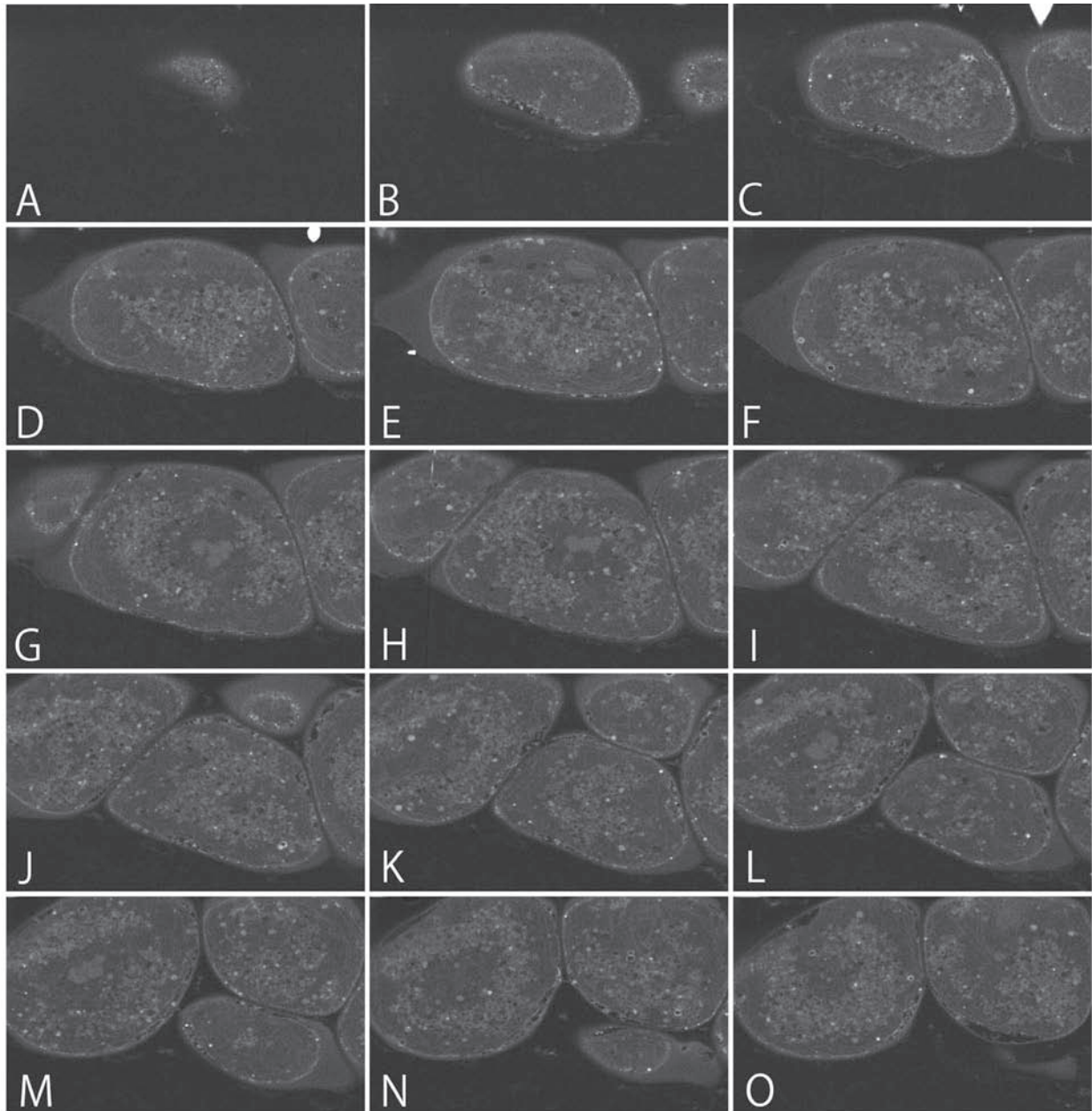


図 1. シロイヌナズナの減数第一分裂中期の花粉母細胞の FIB-SEM 画像。7 個の花粉母細胞の塊りを撮影した 397 枚の画像データセットの中から、中央の細胞をとらえた 61 枚目から 201 枚目の画像を 10 枚おきに示したものである。それぞれの Z 軸方向の間隔は $0.32 \mu\text{m}$ である。

奥へ削っていったもので、中央の細胞がだんだんと大きくなっていく。最後の O の断面では中央の細胞はもう見られない。染色体の様子から減数第一分裂中期の細胞と判断される。図 2 は核領域のみを切り出して、拡大表示したものである。ほぼ極方向から捉えているものと考えられ、図 2R, S 付近が赤道面で 5 つの二価染色体が観察される。この時期、核膜は構造を保持していないが、明らかに核領域と細胞質領域の違いが見てとれる。細胞質領域には無数の小胞が存在するが、核領域には見られない。そのかわり、核領域にはほとんどころに線状の構造が見られる。これは紡錘体を形成している微小管が観察さ

れているものと考えられる。この小胞は細胞膜のすぐ内側の細胞表層にはあまり見られない。細胞表層には再び線状の構造が見られる。これも微小管であるが、表層微小管と呼ばれるものであると考えられる。このように減数第一分裂中期の細胞では、小胞の希薄な表層領域、小胞が濃密な核周辺領域、また小胞の希薄な核領域という具合に、3 つの領域に分けられることが判明した。細胞の外側の細胞壁はほとんど発達していない。周りの細胞も減数第一分裂中期であると判断され、一つの葯内の花粉母細胞の細胞分裂の進行はかなり同調していることが分かる。

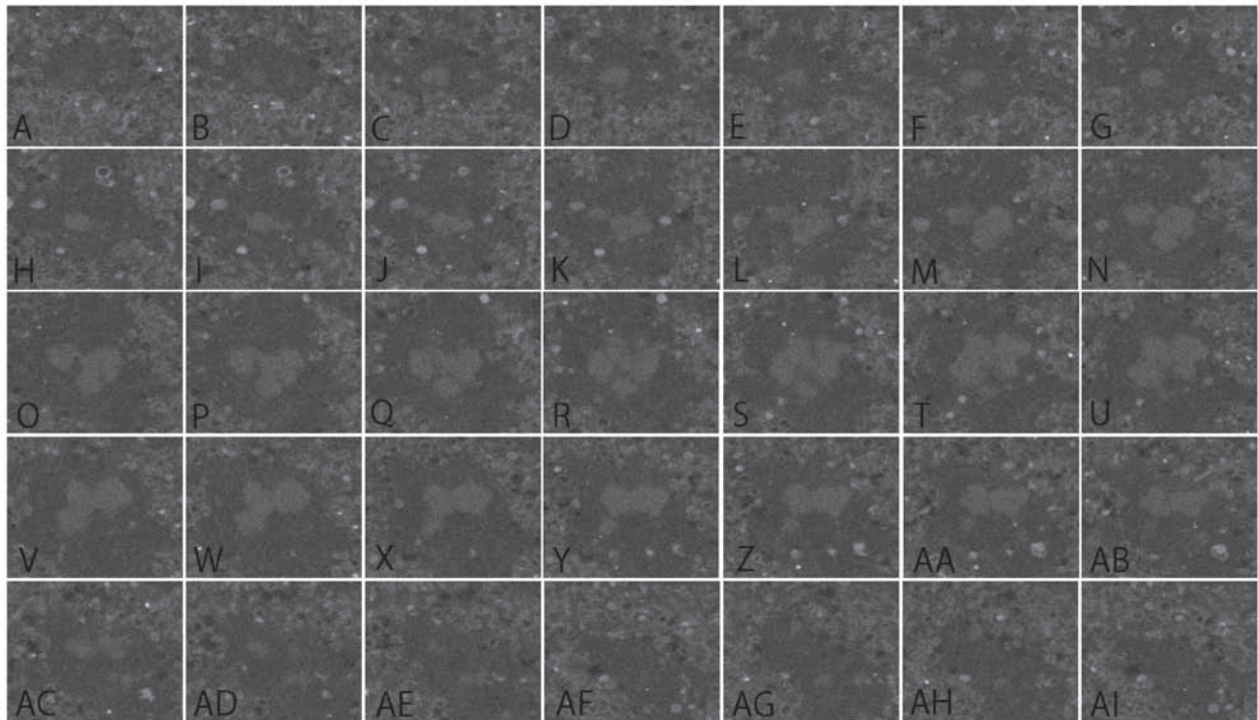


図 2. 染色体領域の拡大図. 図 1 と同じ画像データセットの 105 枚目から 139 枚目の 35 枚から、核領域を切り出したものである. それぞれの Z 軸方向の間隔は 32 μm である.

四分子期の花粉母細胞

葯は一番外側に表皮細胞、その内側に数層の中間層細胞があって、さらにその内側のタペート細胞があり、それが花粉母細胞を取り囲んでいる。花粉あるいは花粉母細胞の発達には、これらを取り囲むタペート細胞の働きが重要であることが知られている。葯全体について 946 の画像を取得し、図 3 は 301 枚目から 651 枚目までを 25 枚おきに示したものである。そこには減数分裂を終了しようとしている四分子期の花粉母細胞とその外側の細胞がとらえられていた。表皮細胞やすぐその内側の中間層細胞には大きく成長し澱粉を貯めた葉緑体と大きな液胞が見られる。これらの細胞では光合成が盛んに行われているものと考えられる。内側の中間層細胞は変形し非常に薄くなっており、葉緑体は観察されず、光合成はほとんど行われていないと予想される。花粉母細胞のすぐ外側のタペート細胞にも発達した葉緑体は観察されず、液胞の占める体積は比較的小さい。この時期のタペート細胞は細胞分裂を行わず、核分裂のみを行い多核し、シロイヌナズナの場合、最終的に 4 核になる。表皮細胞、中間層細胞、タペート細胞は互いに密着しているが、花粉母細胞は花粉母細胞同士あるいはタペート細胞と直接接していない部分が見られた。図 3H などを見ると、タペート細胞間には大きな原形質連絡があるのがわかる。花粉母細胞の減数分裂は完了しており、四分子は別々の細

胞膜に囲まれている。しかし、まだ四分子はカロースと呼ばれる物質に包含され、1 つにまとまっている。カロース層が崩壊し、別々に分けられると花粉小胞子となり、雄性配偶体の最初の細胞となる。四分子内では核膜が形成されており、細胞質には多くの小胞が見られる。しかし、小胞体やゴルジ体は発達していない。色素体、ミトコンドリアなどの判別は困難であった。四分子のカロース層の表面に何かが付着しているが観察される。カロース層の周りにも何かの物質が存在するのがわかるが、その正体は不明である。

討論

本研究で、花粉母細胞の減数分裂期の 2 つのステージについて多くの知見を得ることができた。減数第一分裂中期の細胞を解析してみると、赤道面付近に相同染色体同士が結合した二価染色体が集合している様子が見られた。画像データより、核の占める領域は比較的小さく、10%未満であると推測される。核の外側にある小胞は、核膜が分散してできた小胞や、核がないために分散した小胞体やゴルジ体などではないかと考えられる。第一分裂中期の花粉母細胞で見られる小胞は核膜や小胞体膜やゴルジ体膜が一時的に分散してできたものと思われる。四分子期の花粉母細胞にも小胞が多数みられるが、これはこれから細胞壁を発達させる時期なので、これから小

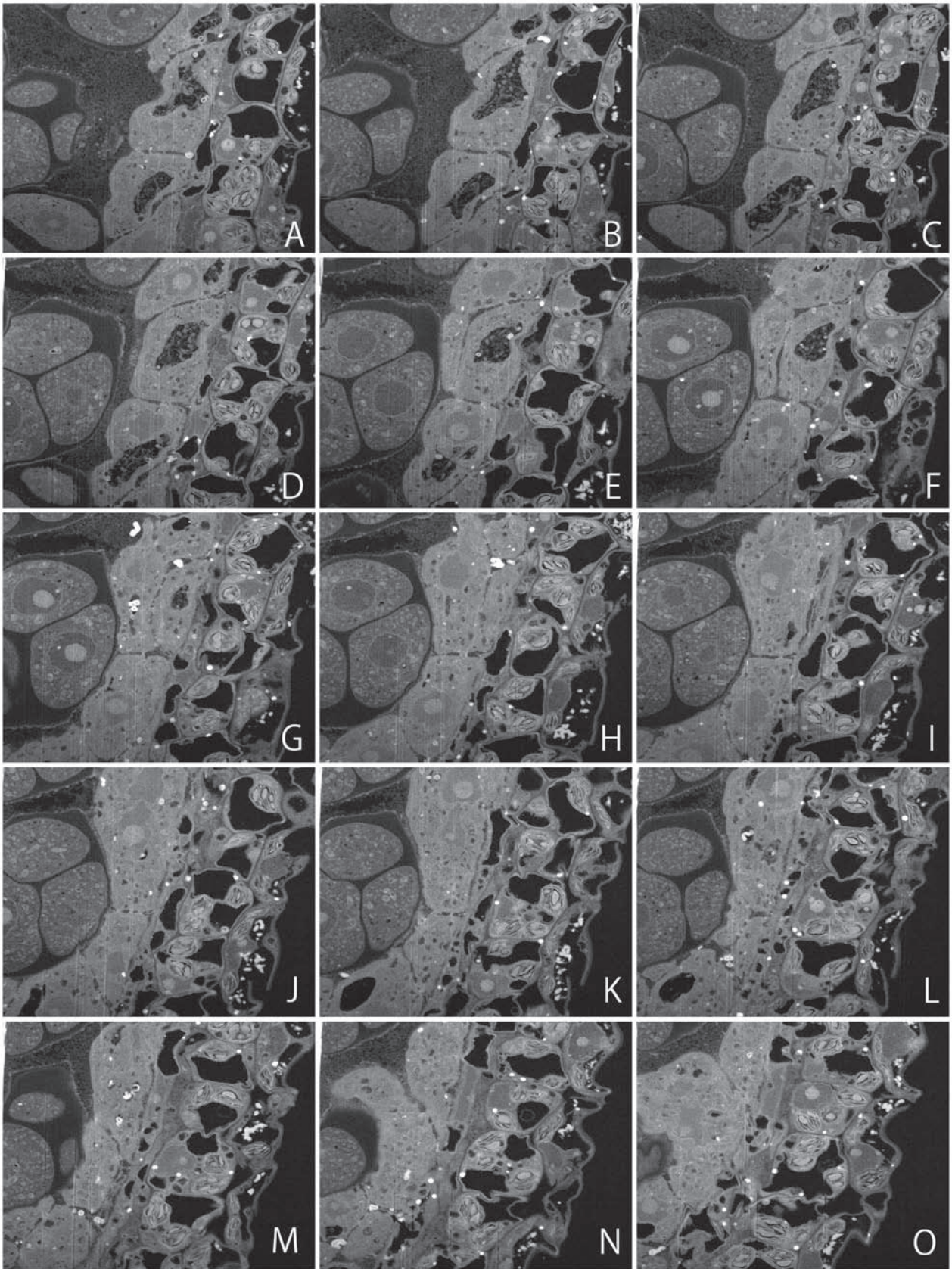


図 3. 花粉四分子期の葯の縦断面 SEM 画像. 葯をとらえた 946 枚の画像データセットの 301 枚目から 651 枚目までを 25 枚おきに示したものである. Z 軸方向の間隔は $0.8 \mu\text{m}$ である.

胞体やゴルジ体を発達させるもととなる小胞か、あるいは合成された細胞壁の材料を運ぶ小胞である可能性が考えられる。四分子期の細胞では微小管束は観察されなかった。減数第二分裂終期後の細胞質分裂が終わったところで、微小管を形成するチューブリンは脱重合しているものと思われる。これらのことから、花粉母細胞の細胞内では核膜、小胞体膜、ゴルジ体膜などの内膜系や細胞骨格が、活発に分散・凝集あるいは重合・脱重合を行っていることがわかる。今後、FIB-SEMを用いて減数分裂期の様々なステージの詳細な細胞全体像が得られれば、雄性配偶体へと発達する花粉母細胞の中で起こっている現象がより良く理解されるようになるものと考えられる。

謝辞

本研究は2014年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成の助成金(RIIS201407)を受けて行われました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Bhojwani S S and Bhatnagar S P (1995) 植物の発生学. 足立泰二, 丸橋亘訳, 講談社, 東京.
- 2) Taiz L, Zeiger E, Moller I M and Murphy A (2015) *Plant Physiology and Development Sixth edition*. Sinauer Associates, Inc, Massachusetts, USA.
- 3) Chevalier D, Sieber P and Schneitz K (2002) The genetic and molecular control of ovule development. In: *Plant Reproduction, Annual Plant Reviews, Vol. 6*. O'Neill D. and Roberts JA, eds., CRC Press, USA. pp.61-85.
- 4) Twell D (2003) The developmental biology of pollen. In: *Plant Reproduction, Annual Plant Reviews, Vol. 6*. O'Neill D and Roberts JA, eds., CRC Press, USA. pp.86-154.
- 5) 堀田康雄 (1988) 減数分裂と遺伝子組み換え. 東京大学出版, 東京.
- 6) Azumi Y, Liu D H, Zhao D Z, Li W X, Wang G F, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J* **21**: 3081-3095.
- 7) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**: 206-216.
- 8) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. 神奈川大学総合理学研究所年報 2003. pp.41-80.
- 9) Ge X, Chang F and Ma H (2010) Signaling and transcriptional control of reproductive development in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **20**: 988-997.
- 10) Zhao DZ, Wang GF, Speal B and Ma H (2002) The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the Arabidopsis anther. *Genes Dev.* **16**: 2021-2031.
- 11) Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815.
- 12) Azumi, Y (2014) Meiotic chromosomes of *Arabidopsis thaliana* pollen mother cells. In: *Atlas of Plant Cell Structure*. Noguchi T *et al.*, eds., Springer Japan, Tokyo.
- 13) Martinez-Zapater JM and Salinas J (1998) *ARABIDOPSIS PROTOCOLS*. Humana Press, New Jersey, USA.
- 14) Sonomura T, Furuta T, Nakatani I, Yamamoto Y, Uezai T, Matsuda W, Iwai H, Yamanaka A, Uemura M and Kaneko T (2013) Correlative analysis of immunoreactivity in confocal laser-scanning microscopy and scanning electron microscopy with focused ion beam milling. *Frontiers of Neutral Circuits* **7** (doi: 10.3389/fncir.2013.00026)

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ウミホタル類の体色と色素の進化

若山典央^{1,4} 中井静子² 金沢謙一³

Evolution of Body-Colour and Pigmentation in Cypridinidae

Norio Wakayama^{1,4}, Shizuko Nakai² and Ken'ichi Kanazawa³

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

² Department of Marine Science and Resources, College of Bioresource Sciences, Nihon University Fujisawa City, Kanagawa 252-0880, Japan

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt120120xc@jindai.j

Abstract: Characteristics related to body colour of myodocopid ostracods were classified and examined. Two new characteristics were found: a structural colour on spermaducts and a carapace colour change. Many cypridinid species possess a blue colour in spermaducts. This is probably related to a copulation display or mate recognition. The carapace colour change was observed in *Codonocera* sp.. It was caused by regulating chromatophores. Additionally, pigments observed in digestive organs were classified into three groups: a typical dark-brown pigment and two kinds of colourful pigment. The latter pigments are expressed in two different lineages, respectively. Finally, relationships between the characteristics mentioned above and phylogeny are discussed.

Keywords: myodocopa, ostracoda, cypridinidae, colour change, chromatophore

序論

生物が体のカラーリングにより外部に出力する情報を抑制あるいは促進している事がある。繁殖可能のシグナルとなる婚姻色、カウンターシェーディングやカウンターイルミネーションにより陰影を打ち消して捕食者による認識を避けるなど生物が示す色彩とそのパターンには様々な機能がみられる事が知られている。汎甲殻類の介形虫に属するミオドコーパ類はウミホタルを含む事でよく知られ、よく発達した複眼と中央眼^{1,2)}により光に対して強く反応する。また光学信号を用いて個体間の情報伝達を行うことが知られており、種ごとに異なるパターンを持つ生物発光による求愛³⁾が配偶者認識に用いられている⁴⁾、生物発光を持たない種が構造色を備えた器官である iridescent fan を用いて求愛を行う⁵⁾、構造色を示し生物発光を補助すると考えられている反射性小器官が存在する⁶⁾など、光学情報を発信する面については様々な研究が行われている。しかし、着目されているのは能動的に繁殖に用いられる光学信号のみであり「静かな」光学信号と言える体色につ

いては種記載における記述が見出されるのみである。ミオドコーパ類においても体色に関わる様々な形質があり、種によっては体色バリエーションが存在するなど注目し得る形質が散見されるが、体色とその意味性についてはいまだ十分な検討がなされていないとは言い難い。

この研究では、ミオドコーパ類における体色の進化とその意味性を探る糸口を見出すべく、その一部を整理し、進化経路を求めた。

材料と方法

採集と維持

使用したミオドコーパ類はベイトトラップ、プランクトンネット、ドレッジにより 1998-2014 年の間に採集されたものを用いた。得られた個体の一部は 69.9 mg/L ペニシリン G カリウム塩含有濾過滅菌海水中で飼育、18°C インキュベータ内で維持⁷⁾ という条件下で飼育された。

固定、保存

採集された個体の一部は 70% EtOH で固定され、冷蔵あるいは冷凍保存されて形態観察および色彩関連形質の観察に用いられた。

色彩関連形質の確認

ミオドコーパの付属肢や軟体部は概ね透明であることから、色素が含まれる部位を実体顕微鏡下で確認した。それぞれの形質の詳細は生体の解剖あるいは固定標本をグリセロールで透徹しての解剖により観察された。各形質は最低 3 個体を用いて調べられた。

体色変化に関する実験

Paravargula maculosa および *Codonocera* sp.B の体色変化の要因を探るため、生体を 4°C と 18°C の環境に交互におき水温変化を与え、また明暗の環境に交互におき変化をみた。

系統解析

系統的関係が未知であった 3 種 (*Heterodesmus* sp., *Codonocera* sp.A および sp.B) について、ミトコンドリア DNA の 16Sr 領域約 860 塩基について配列を求めた。増幅用のプライマとして 16Sbru (5'-cggtctgaactcagatcatgt-3') および 16SL (5'-tttgacctttgtatcaggg-3') を用い OneTaq (New England Biolabs) により PCR を行った。アニーリング温度は 50°C とした。配列決定は ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザにより行った。得られた配列はアライメント後、ギャップ部分を除いた 800 塩基を系統推定に用いた。他の種については過去に 16Sr 領域を使用した系統解析⁸⁾ で用いられた配列データを用い、MEGA6.06⁹⁾ により系統推定を行った。系統樹は NJ 法と最尤法 (Kimura 2-parameter method) により求められ、アウトグループとして科の異なる *Parasterope* sp. および *Cylindroleberis* sp. を用いて系統樹の根を決定した。

結果

ミオドコーパの色彩関連形質は後述のとおり、6 種類に大別できる。これらの形質の有無と特性について以下に記す。

複眼、中央眼の色素

全ての種で複眼および中央眼に濃茶色色素が見られた。この色素は EtOH 固定によって失われることはない。また、中央眼には金属光沢様の構造色がみられ、この構造色は EtOH 固定により失われた。

付属肢、軟体部にみられる色素

Vargula hilgendorffii, *Vargula* sp.A を除いた全ての種において、付属肢や上唇部などに色素がみられた。この色素は EtOH 固定によって失われることはなく、ほとんどの種では濃茶色の色素であったが、*Codonocera* 2 種では後述する背甲の色素胞と同様の色彩、形状であった。

反射性小器官の構造色

Vargula hilgendorffii および *Vargula* sp.A で消化器官の末端部に中央眼と類似した金属光沢様の構造色を示す反射性小器官がみられた。この構造色は

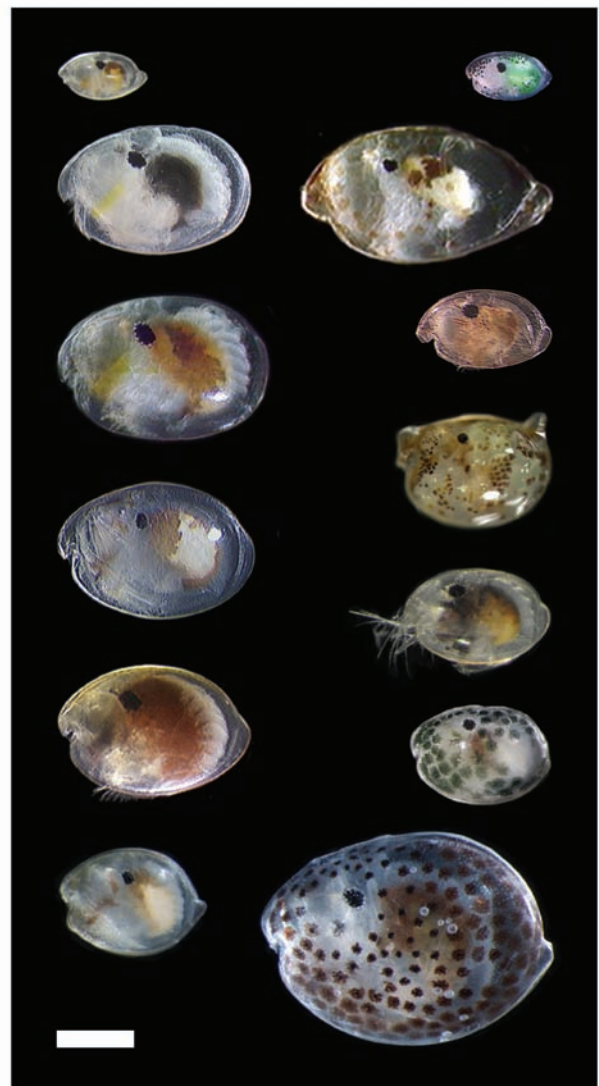


図 1. 使用したミオドコーパ。体色や模様は種ごとに様々である。左列上より *Cypridina noctiluca*, *Vargula hilgendorffii*, *Vargula* sp.A, *Vargula* sp.B, *Vargula* sp.C, *Cypridinodes* sp.. 右列上より *Melavargula japonica*, *Paravargula maculosa*, *Skogsbergia abei*, *Heterodesmus* sp. (♀), *Paradoloria pellucida*, *Codonocera* sp.A (性別不明), *Codonocera* sp.B (♀). 全て左が前方。スケールバーは 1 mm. 性別の注記のないものは全て♂。

EtOH 固定により失われた。

輸精管の構造色

Melavargula japonica、*Skogsbergia abei*、*Cypridina noctiluca* を除いた 7 種において、輸精管の一部に青色の輝きを呈する領域が見出された (図 2A, B)。*Codonocera* 2 種および *Heterodesmus* sp. については♂の形質を確認できていない事からこの形質の有無は不明である。輸精管の該当部分には色素は見られない。また、透過光による観察では見出す事ができず、特定角度からの入射により青色を呈する。この色彩は EtOH 固定により失われ、固定後にグリセロールで透徹した場合にも見出す事はできなかった。同一地点で採集された同種の個体であっても、採集した時期によってこれが強く見られるものとそうでないもの、みられないものがあった。

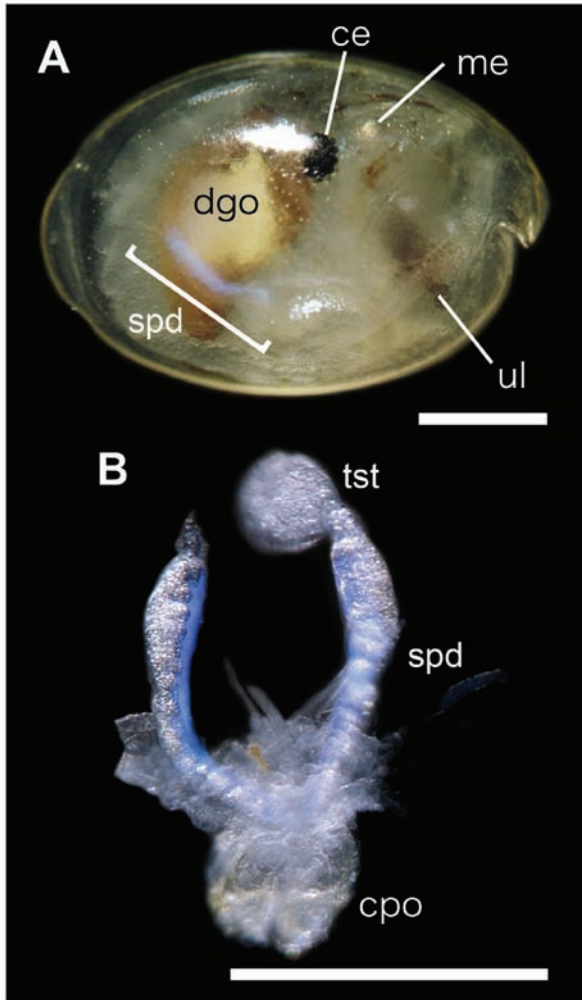


図 2. 輸精管の構造色. A. *Vargula* sp.B の♂. 複眼の色素, 中央眼の構造色, 付属肢と上唇の色素, 消化器官の斑状の色素分布, 輸精管の構造色が確認できる. B. *Vargula* sp.B の雄性生殖器. 輸精管の一部が青色の構造色を示す. ce: 複眼, me: 中央眼, ul: 上唇, dgo: 消化器官, spd: 輸精管, tst: 精巣, cpo: 交接器. スケールバーは 1 mm.

背甲の色素胞

Melavargula japonica、*Paravargula maculosa*、*Skogsbergia abei*、*Heterodesmus* sp.、*Codonocera* sp.A、*Codonocera* sp.B において、全身を包む背甲に色素胞がみられた。全ての種で色素胞は背甲を裏打ちする細胞層に含まれるものであった。色素胞の色彩、分布、密度およびサイズはそれぞれの種で異なっていたが、全ての種で複眼の近辺ではみられなかった。分布範囲の狭い *Melavargula japonica*、*Skogsbergia abei* では背甲の上前部で密に、両側面で疎に分布しており、*Codonocera* 2 種のように広いものでは複眼の周囲を除いて背甲全体に分布していた。*Cypridinodes* sp. において背甲の前上部がやや黄色を帯びていたが、これは背甲のキチン質の肥厚部が着色されているものであり色素胞とみられる構造はみられなかった。

Codonocera sp.B の体色変化

飼育下の *Codonocera* sp.B が体色を変化させる様子が観察された (図 3A, B)。体色変化は色素胞の拡大あるいは縮小により生じていた。長時間の安静 (給餌

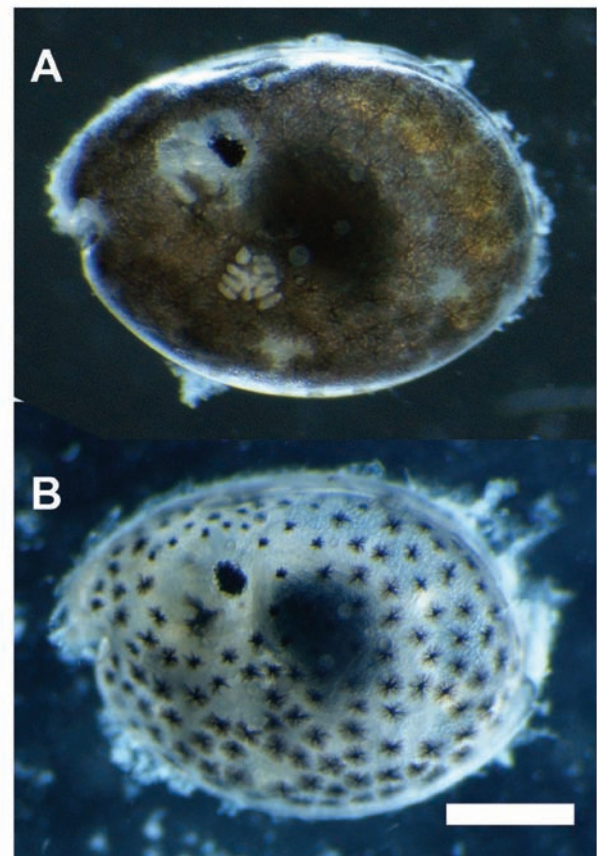


図 3. *Codonocera* sp.B の体色変化. A. 背甲の色素胞が拡散し体色が濃茶色を呈しているが、複眼周辺のみ透明性が確保されている. B. 色素胞が収縮し、背甲の透明度が上がっている. A, B は同一個体. スケールバーは 1 mm.

と給餌の間の2-3日間)後に変化が見出され、短時間での変化がみられなかった事から変化速度などは不明である。*Paravargula maculosa*を含めた2種を用いた実験では、水温および照明状態の変化と一致した体色変化はみられなかった。

消化器官表面および卵黄顆粒の色素

多くの種において濃茶色の色素が消化器官(図2A dgo)の表面部分に存在した。図1, 2Aおよび4に明らかな様に、斑状に色素のみられない部分がある、逆に斑状に色素がみられるなど、色素の状態は種と個体によって様々であった。この色素はEtOH固定によって失われることはない。一部の種では濃茶色色素に変わり、淡緑、青緑、黄色、橙色、朱色等の鮮やかな色彩がみられた。こちらはEtOH固定により容易に失われる。図5に示すグループαでは*Skogsbergia abei*を除き、消化器官の鮮やかな色彩と♀が育房に持つ卵黄顆粒の色彩が類似していた。カラーバリエーションが見られる*Skogsbergia abei*では、母個体の消化器官と卵黄顆粒、そして幼体の消化器官の色彩が一致している様であった(図4)。グループβでは鮮やかな色彩を持つ種(*Cypridina noctiluca*、*Vargula* sp.A)であっても卵黄顆粒は近縁他種と同様の淡橙色〜淡茶色であった。

系統解析

NJ法と最尤法で、同様の樹形が得られた(図5)。

討論

ミオドコーパ類では、眼や付属肢にみられる濃茶色色素を基本として各グループごとに特徴的な色彩関連形質を追加獲得している様である。ミオドコーパの個体の色彩的な外観に大きく影響するとみられる3つの形質について特に論ずる。

輸精管の構造色

この形質はすでに記載されている種を含む7/10種で見出され、稀な形質でも、見出しがたい形質でもないと思われる。しかしながらこれまでの分類、記載において記述を見出す事ができない。この形質が持つ色彩が固定によって失われる事から、固定標本を用い、解剖して各器官をスライド封入した後に観察が行われる従来の分類学的研究において見出される事がなかったのではないかと推測される。この形質の発する色彩は明瞭に青色であるが、組織内に色素を見出す事ができない点と照明状態により発する光の強度が変化することから、なんらかの構造色により

発現している色彩であると考えられる。この形質の視認性は高く、背甲の厚い種でも容易に見出す事ができる(図2A)。また、この青色はミオドコーパ類で求愛に用いられ、視物質の吸収ピークとなる460 nm付近¹⁰に合致している事からオスの性成熟や求愛に関するアピールにおいてなんらかの役割を果たしている事が示唆される。採集時期によってこの形質が目立ちにくい事から、繁殖期に合わせた消長が存在すると推測される。今回は確認されたサンプルの中での有無を記しているが、今後の継続的な研究によって、より多くの種でこの形質が見出されると予測される。形質の消長があるとみられる事から、今回この形質がみられないとした種について形質の有無判定に疑問が残る。そのため進化経路の追跡は行っていないが、相同とみられる形質がほとんどの種でみられた事から、Cypridinidae全体で共有されている古い形質である可能性が高い。iridescent fanの構造色を用いた求愛はミオドコーパの系統で最も古くから用いられている求愛手段であり、他の科とCypridinidaeの分岐においてこの形質が失われ、ごく一部の属で再度同様の形質が獲得された⁹⁾と考えられている。Cypridinidaeにおいてはiridescent fanの構造色による求愛が輸精管の構造色に取って代わられた、あるいは失われたiridescent fanに代わるアピール手段として輸精管の構造色が獲得された可能性がある。

消化器官と卵黄顆粒の色素

消化管は軟体部の他の部分とは異なり、全ての種で不透明であり色素が含まれていたが、それぞれの種を特徴づけている色素には違いがみられた。グループαでは*Paradoloria pellucida*でのみ卵黄顆粒の色

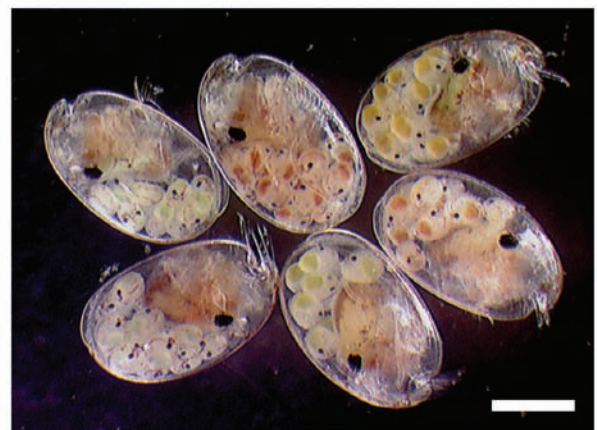


図4. *Skogsbergia abei*のカラーバリエーション。消化器官と卵黄顆粒に見られる異なる鮮やかな色彩は濃茶色色素とは明瞭に異なっている。図中の胚は卵黄顆粒を残しているが、幼体の消化器官の色彩は卵黄顆粒と同じ色になる。スケールバーは1 mm。

彩が淡橙～淡茶色を呈していたが、同グループの他の種の卵黄顆粒は淡緑～緑色を帯びているものが多く、特に *Skogsbergia abei* においては個体によって色彩が異なり、赤～橙～黄～緑と広い範囲に渡るカラーバリエーションがみられた (図 4)。この種において、カラーバリエーションの頻度差などは現在のところ定量化されていないが、どの個体群であつてもいずれかの色域が突出して多いという事はない様である。この事からは、消化器官のカラーバリエーションは個体の適応度に及ぼす影響はあつても大きくはないと推測できる。グループ β では *Cypridina noctiluca* と *Vargula sp.A* の消化器官で鮮やかな朱色～赤茶色の色素がみられ、また *Vargula sp.C* の消化器官が赤茶色～茶色であつたが、同グループの他の種は全て濃茶色であつた。グループ α とは異なり、グループ β では卵黄顆粒や胚には消化器官の色素が反映されていないとみられる。この色素の挙動の差は濃茶色でない鮮やかな色素がグループ α、β でそれぞれ独立に獲得された可能性を示唆するが、今後の検討が必要である。

色素胞の起源と進化

Cypridinodes sp. において、色素胞が見られる種のうち *Codonocera* 属を除いた 4 種において色素胞の密度が高い背甲前上部に淡黄色の着色が見られたが、これは色素胞とは組織的に明確に異なっていた事から同様の形質ではないと考えられる。これを除

いた 6 種について、形質を系統樹上にプロットして進化経路を推定したものが図 5 である。推定される進化経路の内、形質の変化回数が最も少ない 2 回となるものは図 5 A、B の 2 種類となる。図 5A に示す進化経路ではグループ α と他のグループの分岐 a において色素胞が獲得され、後に分岐 b において *Paradoloria pellucida* でのみ失われたと判断される。図 5B に示す進化経路では分岐 c、d の 2 回にわたり同様の色素胞が独立に獲得されたと判断される。今回、*Codonocera* 属の色素胞には他種と違い付属肢にも分布する、背甲上での分布範囲が広いなどの相違点が見られたが、明確な組織的差異は見られなかった。図 1 右列に示す通り、色素胞を持つものを含むクレード (グループ α) における色素胞の分布範囲はまちまちであるが、*Codonocera* 2 種で顕著に広く、逆に *Paradoloria pellucida* では色素胞が全く見られない。この種はその名の通り高い透明度が特徴であり、上唇と消化器官を除いては非常に透明な質感を示す。これらから、*Paradoloria pellucida* は捕食圧等の理由によりより透明感を増す様な変化があつた生物であり、それ故に背甲の色素胞もみられないのではないかと思われる。逆に *Codonocera* 属ではなんらかの理由により色素胞が発達し、全身を覆うまでになっている。この *Codonocera* 属の特徴を考える上で重要な観察が体色変化である。今回、水温変化や明暗の変化に対して速やかに変化している様子はみられず、体色変化がどの様な条件で生じている

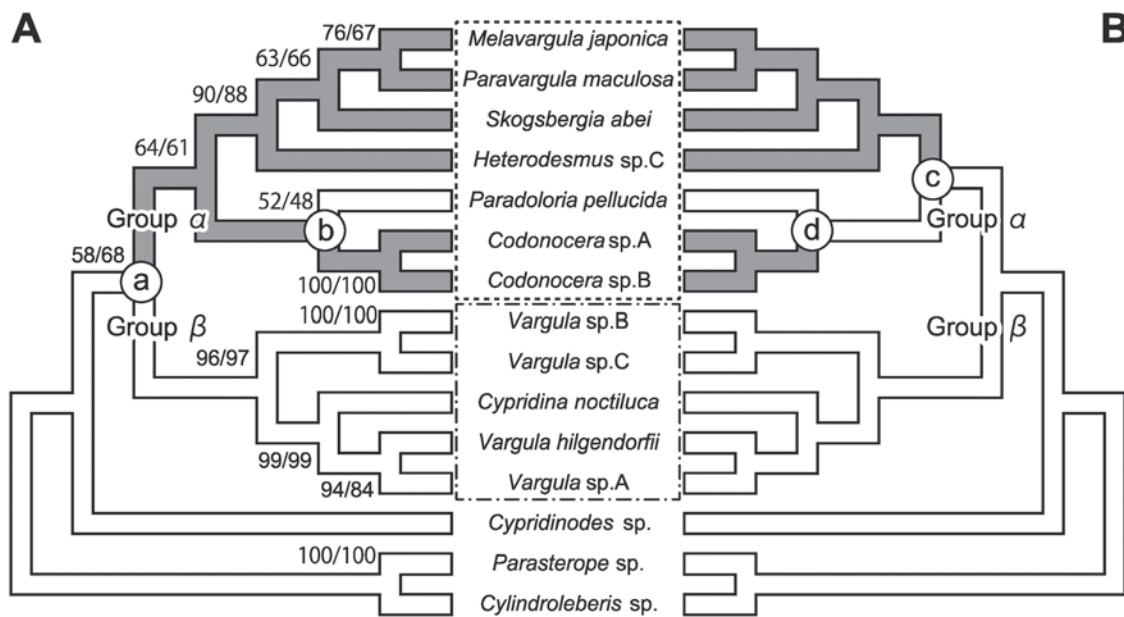


図 5. 系統樹と色素胞の進化経路の追跡. A. 考えられる進化経路その 1. B. 考えられる進化経路 2. NJ 法と最尤法で同様の樹形を示した事から、両系統樹を一つにまとめて記している。樹形各分岐のブートストラップ値は図中に NJ / ML とし記している。系統樹上のグレー部分が背甲の色素胞を示す種、およびその進化経路を示している。白抜き部分は背甲の色素胞を持たない種、およびその進化経路を示している。点線で囲まれた OTU を含むクレードをグループ α、一点破線で囲まれた OTU を含むクレードをグループ β としている。

のかは明確にできてはいないものの、体色を変化させる事により背甲の光透過性を任意に変化させ、外界からの光の反射や透過を調節する事ができると考えられる。もちろん現時点で体色変化が機能的であり *Codonocera* 属が生きて行く上で有用であると断言する事はできないが、体色変化により動的なカムフラージュを行っている可能性が考えられる。

謝辞

本研究は 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201405) を受けて行った。お茶の水女子大学湾岸生物教育研究センターの清本正人准教授にはミオドコーパのサンプル収集にご協力頂いた。ご厚情に深く感謝致します。

文献

- 1) Huvad AL (1990) The ultrastructure of the compound eye of two species of marine ostracodes (Crustacea: Ostracoda: Cypridinidae). *Acta Zoo.* **71**: 217–223.
- 2) Huvad AL (1990) Ultrastructural study of the naupliar eye of the ostracode *Vargula graminicola* (Crustacea, Ostracoda). *Zoomorphology* **110**: 47–51.
- 3) Morin JG (1985) Fireflies of the sea – Luminescent signaling in marine ostracode crustaceans. *Fla. Entomol.* **69**: 105–121.
- 4) Morin JG and Cohen AC (1991) Bioluminescent displays, courtship, and reproduction in ostracodes. In: *Crustacean Sexual Biology*. Bauer R and Martin J, eds., Columbia University Press, New York. pp 1–16.
- 5) Parker AR (1997) Mating in myodocopina (Crustacea: Ostracoda): Results from video recordings of a highly iridescent cypridinid. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **77**: 1223–1226.
- 6) Abe K, Ono T, Yamada K, Yamamura, N and Ikuta K (2000) Multifunctions of the upper lip and a ventral reflecting organ in a bioluminescent ostracod *Vargula hilgendorffii* (Müller, 1890). *Hydrobiologia* **419**: 73–82.
- 7) 若山典央, 金沢謙一 (2014) ウミホタル類の環境耐性の解明と至適飼育環境の構築研究. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**: 117–124.
- 8) Wakayama N and Abe K (2006) The evolutionary pathway of light emission in myodocopid Ostracoda. *Biol. J. Linn. Soc.* **87**: 449–455.
- 9) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729.
- 10) Huvad AL (1993) Analysis of visual pigment absorbance and luminescence emission spectra in marine ostracodes. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **104**: 333–338.

■原 著■ 2014 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模川河口域プランクトン生物量の周年変化

野木大輝¹ 平賀義路² 金澤謙一^{1,2} 西本右子^{3,4} 武井尊也³ 鈴木祥弘^{1,2,5}

Annual Changes of Chlorophyll *a* Concentration in the Estuary
of the Sagami River.

Daiki Nogi¹, Yoshimichi Hiraga², Ken'ichi Kanazawa^{1,2} Yuko Nishimoto^{3,4}
Takaya Takei³ and Yoshihiro Suzuki^{1,2,5}

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

² Department of Biological Science, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

⁴ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail:r201170216pp@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The distribution of phytoplankton in the estuary of the Sagami River was determined for 5 years in relation to the stratification of sea water-body estimated by several environmental factors. Vertical mixing of the water-body in winter ended and stratification began at the end of February. During this period, chlorophyll *a* concentrations increased in a layer less than 50-m depth, where phytoplankton could bloom with nutrients from deep layer. Two layers above and below a 30-m depth were found in summer. A higher concentration of chlorophyll *a* and low salinity were often found at the top of the upper layer, where phytoplankton could bloom with sufficient sunlight and nutrients from the river. Phytoplankton may sink to the bottom of the upper layer, leading to higher concentrations of the chlorophyll *a* layer. Vertical mixing began at the end of September and the chlorophyll *a* concentration decreased. Lower concentrations were maintained in winter.

Primary productions in this area were limited by the low light intensity due to deep vertical mixing in winter, although they were not limited by lower nutrients due to stratification in summer.

Keywords: phytoplankton, biomass, stratification, vertical mixing, sagami river

序論

相模湾は伊豆半島から三浦半島を経て房総半島に至る太平洋にむかって開かれた湾である。日本海溝から湾内に延びる相模トラフは水深 1000 m に達し、その周辺に形成された海丘や海底谷とともに、特徴的な海底地形を形成している。この相模湾の中央付近に位置する平塚市沖合の海域には、周辺の隆起海岸段丘地形とともに、平塚海底谷と呼ばれる特異な海底地形が存在する¹⁾。これに加え、湾沖合の黒潮や相模川からの淡水流入があり²⁾、潮汐によっても環境は複雑に変動している。この複雑な変動は海域の成層構造を変動させており、海洋表水層での植物

プランクトンの光合成・一次生産や、それに支えられた海域の生態系を特徴づけていると考えられる³⁾。この海域の生態系の特徴を検討するため、潮汐にともなう日変動⁴⁾や、河川流量の変化^{2),5)}と対応付けて、成層構造やそれに対する植物プランクトンの対応が調べられてきた⁶⁾。しかし、一日から一年以内の測定を比較したこれらの結果から示された海域の特徴は、単発的に生じた一度限りの現象から推定された特徴であることが否定できない。海域の普遍的な特徴を明らかにするためには、長期間の調査を行い、その結果を相互に比較することが不可欠である。

本研究では2011年から2014年にかけて行われた調査で測定回数の少なかった季節について重点的に調査を実施し、不足する測定を補った。過去の結果と本年度の結果を合わせて比較することで、一年を通じた成層構造の変化を把握することを目指した。さらに、多年にわたる結果からこの海域の普遍的な特徴を明らかにすることを目指した。

材料と方法

環境要因と植物プランクトン生物量の測定

各地点で調査船舷側より、直読式総合水質計(AAQ126, JFEアドバンテック株式会社)を垂下して、観測海域の各地点で電気伝導度、温度、圧力に加えて、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力は、測定器付属のソフトウェアにより塩濃度(‰)と水深(m)に換算した。海水密度の指標(σ)は、塩濃度と温度、圧力から算出した海水密度(kg m^{-3})より1000を引いて求めた。同時に採水した海水中のクロロフィル濃度を求め⁷⁾、機器の蛍光強度をこの値で較正してクロロフィル濃度($\mu\text{g l}^{-1}$)に換算した。全地球測位システム(GPS)端末(FG-530, EMPEX社)を用いて、測定期間中の時刻と緯度、経度を記録し、測定を行った時刻から観測点を算出した。測定点の平面上の位置より河口からの距離を求め、各測定値の鉛直分布を入力することで、ソフトウェア(Gsharp, dlp社)により海洋断面上の各要因の分布を図表化した。

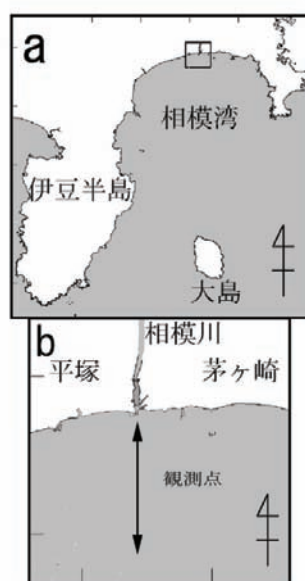


図1. 観測海域. a. 相模湾全景 図中の四角形は図bの位置を示す. b. 調査海域 図中の南北2.5 kmの直線に沿って観測を行った。

観測期間と観測地点

相模川河口から沖合に向かって南北方向に2.5 kmの範囲の海域で観測を行った(図1)。潮位変動の影響を考慮するため、潮位の変動の小さい小潮の前後を観測期間に選んだ。成層構造と各要因の分布に加え、調査船の超音波測深装置により、調査地点の水深を求めた。

結果

概況

2011年から2015年の期間に河口付近から沖合2500 mまでの南北方向の測定線に沿って調査を行った。悪天候が続くことの多かった1月と6月には5年の間、測定を実施する機会がなかったが、その他の月には、最低1回の測定を行うことができた。2月、3月、4月、5月にそれぞれ3回、2回、1回、2回の測定を実施し、7月、8月、9月、10月、11月、12月にそれぞれ1回、2回、1回、2回、2回、3回の測定を実施した。5年間の相模川河口域の調査回数は19回に上った。相模川河口付近の水深は地点により異なり、また、同じ地点でも測定日により変化した。河口より500 mの範囲の様々な地点で5 m以下の水深となったため、調査船が侵入できる最浅の水深の地点まで測深しながら近づき、その地点から測定を始めた。河口から離れるに従って水深は増し、沖合1500 m以上で水深は50 mを超え、2500 m付近では水深は100 m以上となった。また、この海域の水深は東西方向の位置がわずかに異なるだけで大きく変化した。このために図中での海底を示す白抜きの部分は測定ごとに異なる結果となった(図2,3,4)。複雑な海底地形と、その変化にも関わらず、水深と対応付けて測定された水温と塩濃度の測定結果は、測定年に依らずほぼ同様の周年変化を示した。

温度

この期間に測定された最低水温は14°Cで2012年と2015年の2月に認められた。3月には15°C、4月には17°C、5月には18-19°Cに上昇し、7月には25-26°C、8月には26-27°Cとなった。最高水温は28°Cで、2012年に測定された。9月以降、水温は再び低下を始め、9月に24-25°C、10月に22-23°C、11月に20-21°Cとなり、12月には17°Cまで低下した。この海域の水温は表層付近で最も大きく変動したが、その範囲は14°Cから27°Cであり、変動幅は15°C以内であることが明らかになった。冬季を中心とした2-4月と10-12月は、表層で水温がやや低く深層で水温が高い傾向が認められた。一方、夏季の7-9月は表層5 m以浅で水温が高く、深層で低くなった。

これ以外の期間には水深による水温の変化は小さかった。一年を通して、表層から水深 50m までの水深で同時に測定された水温の温度差は最大で 10°C に過ぎなかった。

塩濃度

塩濃度は 31-35‰ の範囲で変動した。水深 50m 付近の塩濃度はほとんどの期間 34‰ であったのに対し、表層の塩濃度は 31-33‰ の範囲で大きく変動した。塩濃度の変化は水深 50m 近くまで認められ、外洋の海水濃度より低い濃度で変化していることが示された。特に相模川河口付近では顕著な塩濃度の低下が認められた。また、河口での塩濃度の低下は、多くの場合水温の変化と対応していた。このような河口域の塩濃度の低下と水温の変化は、相模川からの淡水の流入によるものと推察される。さらに、2-3 月と 12 月には、河口から 1000m 以上沖合に向かって、表層 3m 未満の水深で塩濃度と水温の低い層が認め

られた。表層が冬季の低い気温により冷却されたものと推察される。河川水による低塩濃度の水塊であったため、密度が高くなる低水温にも関わらず表層から沈降せずに、著しい温度の低下が生じたものと考えられる。

密度

測定された、海面から水深 50m までの水温、塩濃度と圧力の測定結果に基づいて海水密度の指標である σ を求めた。求めた海水密度から、この範囲の海水密度の分布を求めて水塊の鉛直断面上に表示した(図 2)。鉛直断面図には、各測定地点で測定した水深に基づいた 50m 以浅の海底も表示した。水温、塩濃度と水深(圧力)から計算された密度の指標 σ は表層で低く水深とともに高くなる。本研究で測定されたこの海域の σ は 25.0-26.1 kg m^{-3} の範囲で、水温の低下した 12 月と 2 月には、表層を除く水深 50m までの全層で 25.7 kg m^{-3} 以上の高い値が認められた。

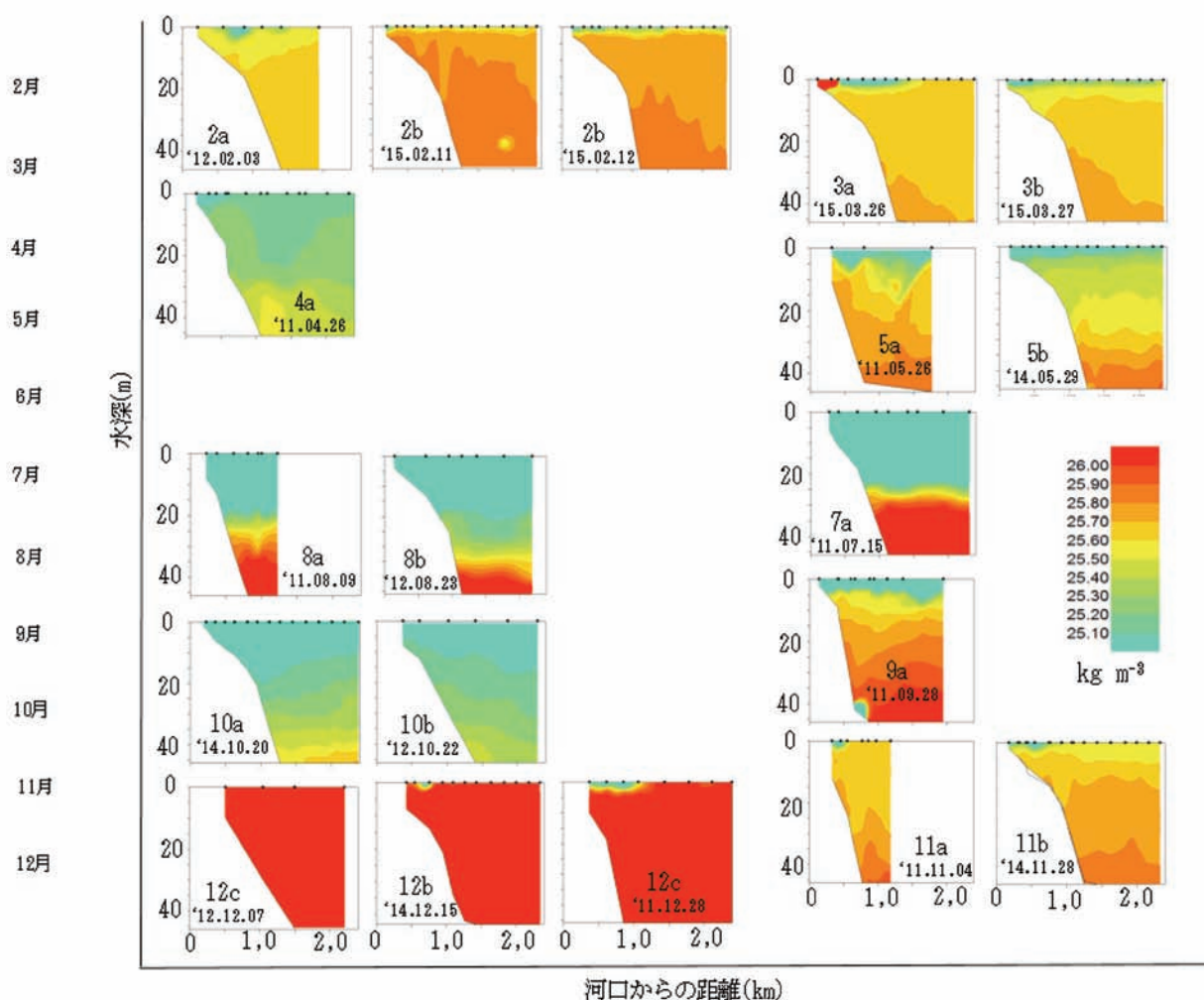


図 2. 相模川河口域の海水密度の年変化。2011 から 2015 年に河口から 2500m の範囲で測定した結果を月順に表示した。縦軸は推進、横軸は河口からの距離を、各図株の白色部分は海底、上部の黒四角 (■) は観測地点を表している。

2月中旬にはわずかながら密度勾配が認められ(図2-2b,2c)、表層での海水の冷却に伴う鉛直混合が弱まりだすことが推定された。この後、気温が上昇する3-5月の期間には、表層から水深50mにかけて、 $25.0\text{-}25.7\text{ kg m}^{-3}$ の緩やかな密度勾配が形成された(図2-3a,3b,5b)。この層の塩濃度は50m以深の層の34‰より低く、流入した淡水が潮汐や波浪などにより攪拌されて生じたと推察される。塩濃度の低い海水層が大气に温められたために、緩やかな密度勾配が生じたものと考えられる。密度勾配は非常に緩やかであり、何らかの原因で容易に乱されると推定された。実際、この期間には水平方向に大きく乱れた σ の分布も認められた(図2-4a,5a)。これらの結果は、3-5月の期間に水深50m以浅の範囲で水平や鉛直方向の混合が容易に生じうることを強く示唆していた。水温がさらに上昇する7-8月の期間には、表層から水深20-30mの範囲で、 25.1 kg m^{-3} 以下の均一で低密度の水塊が形成され、それ以深の高密度の水塊と明瞭に区別された(図2-7a,8a,8b)。測定年によらず

この期間を通して認められた明瞭な二層分化は、上層の水塊と下層の水塊が容易に混合しないことを示唆していた。9-10月には、表層から水深50mにかけて再び密度勾配が形成される(図2-9a,10a,10b)。これは気温の低下した大気に、表層の海水が冷却されて密度が上昇し、夏季に形成された上層の水塊が下層の水塊と混合したためと考えられる。11-12月に、水温の低下と混合が進むと水深50mまで全ての水塊の温度が低下し、全体が高い密度の水塊となる(図2-11a,12a,12b,12c)。このように本研究の測定海域では、冬季に50m以深までの鉛直混合、春秋に密度勾配を伴う混合の低下、夏季の成層と水塊の2分化が認められた。さらに、相模川からの淡水の流入は、この変化をより複雑なものとしていた。淡水は河口付近の表層に特に塩濃度の低い水塊を形成していた。50m以深まで鉛直混合生じる冬季以外の季節には、鉛直混合が生じる範囲の水層の塩濃度を低下させて低密度の水塊を形成した。

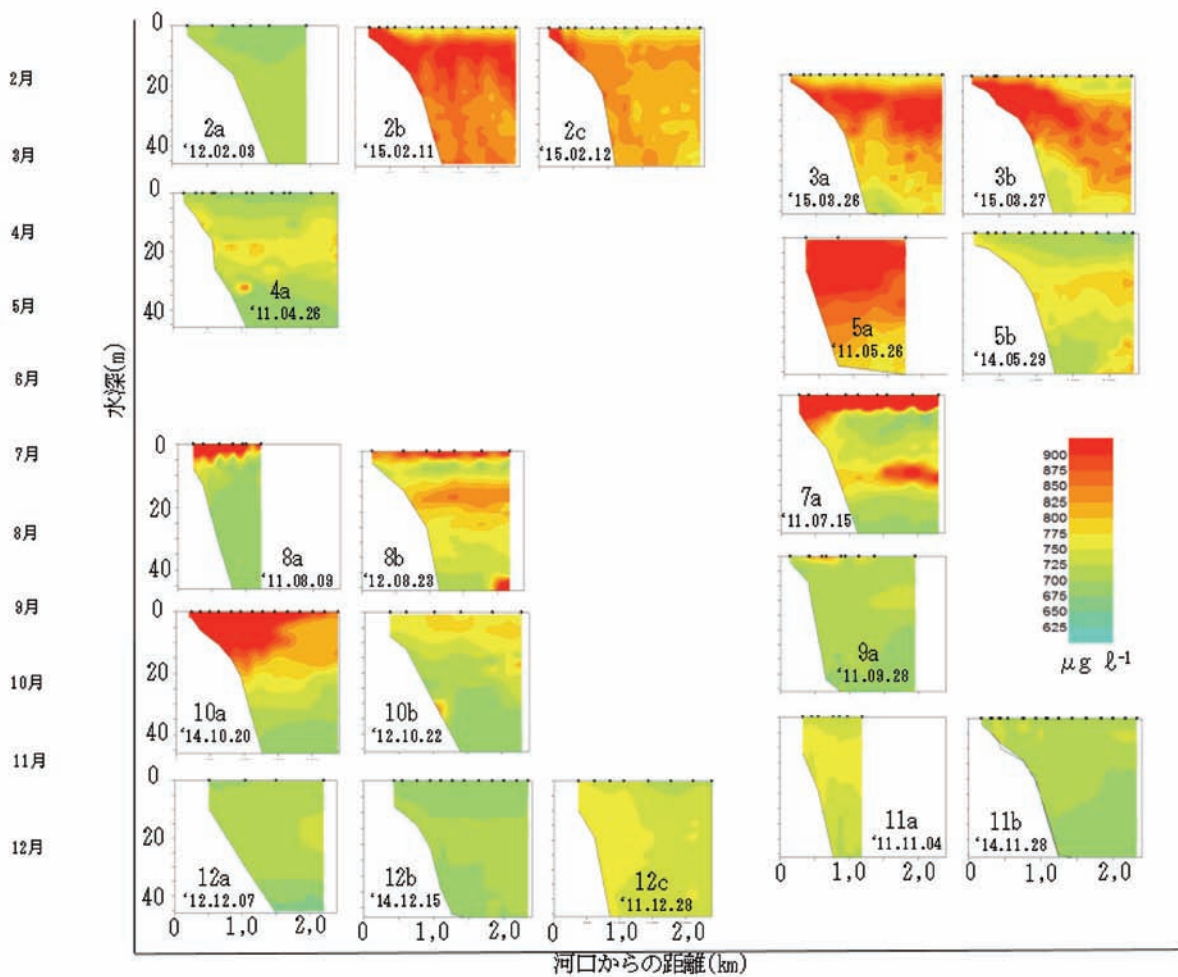


図3. 相模川河口域のクロロフィル濃度の年変化. 2011年から2015年に河口から2500mの範囲で測定した結果を月順に表示した. 縦軸は推進, 横軸は河口からの距離を, 各図株の白色部分は海底, 上部の黒四角(■)は観測地点を表している.

クロロフィル a 濃度

クロロフィル a 濃度は、一年間を通して $700 \mu\text{g m}^{-3}$ 以上の値が維持されていた。本研究の測定結果はこの海域の高い生産性を示していた。さらにクロロフィル a 濃度は測定時期により劇的に変化した (図 3)。表層から水深 50m 以深までの鉛直混合が弱まり出した 2 月中旬 (図 2-2b,2c) に、クロロフィル a 濃度が急速に上昇し、3 月まで高い値が維持された (図 3-2b,2c,3a,3b)。成層が始まる 4-5 月には、濃度が低下するものの、20-25m の水深を中心にクロロフィル a 濃度の高い層が維持された (図 3-4a,5b)。さらに、水塊の成層が乱れる場合には (図 2-5a)、50m 以浅の水界全体で高いクロロフィル a 濃度が認められた (図 3-5a)。夏季に成層し、水塊が 2 分化する期間には (図 2-7a,8a,8b)、クロロフィル a 濃度の上昇が表層に認められた (図 3-8a)。さらに加えて 20-30m を中心とする層にもピークが認められる場合があった (図 3-7a,8b)。これら中間層のピークは表層のブルームが沈降して生じたものと考えられることができるが、成因の特定にはプランクトン種組成や光合成系の解析などさらなる解析が必要である。2011 年 7 月 15 日の測定では、他の測定で認められたクロロ

フィル a 濃度の 2 倍に達する $3800 \mu\text{g m}^{-3}$ の高い濃度が水深 5m 以浅の表層に認められた。より高いクロロフィル a 濃度を表示するスケールで図を作成し、春季ブルームが認められる 2015 年 2 月 11 日の結果と比較すると、その差が明瞭に認められる (図 4-a,e)。高いクロロフィル a 濃度の分布は 33.5‰ の低い塩濃度と 27°C の高い温度の水塊の分布と一致していた (図 4)。塩濃度からこの水塊が相模川由来の淡水の影響を受けたものであることは明らかであり (図 4d,h)、河川に由来する高い栄養塩を含んでいる可能性がある。また、低塩濃度と高温のために低い密度が維持されており (図 4f,g)、光量の十分な表層に水塊が維持されていることが予想される。このため、夏季に二分化された水層のさらに上部に形成された水塊は、光合成一次生産に有利な光と栄養塩の条件を備えており、何らかの藻類が急速に増殖したものと考えることが可能である。大気温度の低下に伴い鉛直混合が開始される 9-10 月には、表層での高いクロロフィル a 濃度は認められなくなるが、混合層全体にやや高い濃度のクロロフィル a が認められることがあった (図 3-10a,10b)。11 月から 2 月初旬にかけての冬季に、50m 以深まで鉛直混合が生じていると予想される期間の水塊のクロロフィル a 濃度は、他の季節に比べて低い値を示した。

考察

相模川河口域では、複雑な海底地形と、その時間的変化にも関わらず、水温と塩濃度の測定結果は、測定年に依らずほぼ同様の周年変化を示した。冬季に 50m 以深までの鉛直混合、春秋に密度勾配を伴う混合の低下、夏季の成層と水塊の 2 分化が認められた。多くの海洋では、冬季の深い鉛直混合は植物プランクトンの光合成に必要な光条件を悪化させ、夏季の成層は深層からの栄養塩の供給を悪化させるためにプランクトン生物量を低下させる⁹⁾。しかし、相模川からの淡水の流入は、この変化をより複雑なものとしていた。鉛直混合が弱い冬季以外の季節には、鉛直混合が生じる範囲の水層の塩濃度を低下させて、低密度の水塊を形成していた。この結果は、同時に、この範囲の水塊に陸上からの栄養塩の供給が行われていることを強く示唆している。多くの季節に $700 \mu\text{g m}^{-3}$ 以上の生物量が維持されているこの海域の高い生産性は、栄養塩の供給を示唆するこの結果とよく対応していた。さらに、淡水は河口付近や表層に、塩濃度の低い水塊を形成していた。外洋で、栄養塩の供給を停止してプランクトン生物量を低下させる成層が生じる時期にも、高密度で植物プランクトンが維持されることは、相模川からの栄

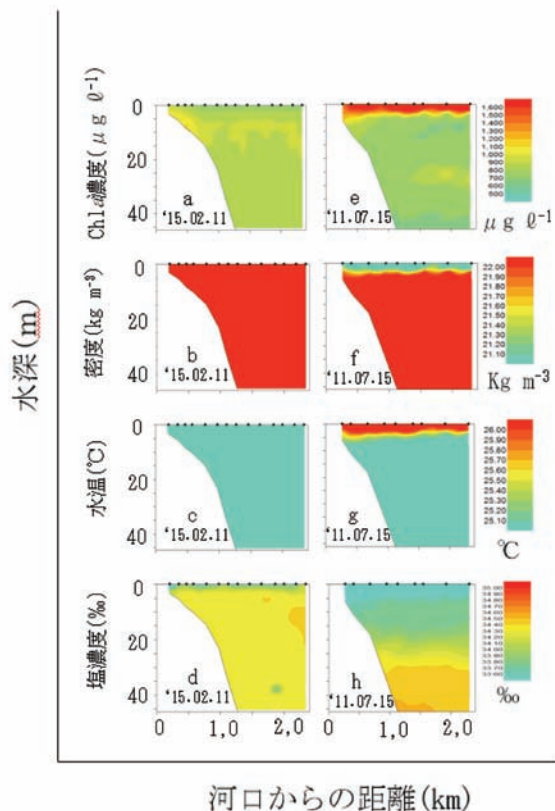


図 4. 春季と夏季の植物プランクトンのブルームの違い、クロロフィル a 濃度に密度、水温、塩濃度を対応付けて表した。クロロフィル a 濃度の範囲と密度の範囲を変更して違いを明瞭にした。

養供給により高い生産性が維持されていることを端的に示していた。一方で、深い鉛直混合により光環境が悪化する冬季に植物プランクトン量が低下することは、冬季の淡水流入による塩分成層の影響は、一次生産を維持するほどではないことも示していた。

謝辞

本研究は神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201404) により行われた。本研究では野外調査に、神奈川県平塚市漁業協同組合の伏黒哲司氏と栄宝丸船長の上谷きよし氏にご協力頂いた。厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 日本海洋学会編 (1985) *日本全国沿岸海洋誌*. 東海大学出版会, 東京.
- 2) 国土交通省 水文水質データベース (<http://www1.river.go.jp/>)
- 3) 平賀義路, 鈴木祥弘 (2013) 相模川河口域の植物プランクトン分布の季節変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **24**: 55-62.
- 4) 栗飯原海人, 平賀義路, 鈴木祥弘 (2014), 相模川河口域海況の日変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**: 111-116.
- 5) 平賀義路, 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2011) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**: 59-66.
- 6) 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2010) 相模川河口域の海況と植物プランクトンの分布. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **21**: 65-69.
- 7) PROTOCOLS FOR THE JOINT GLOBAL OCEAN FLUX STUDY (JGOFS) CORE MEASUREMENTS (1994UNESCO)
- 8) Carol ML and Timothy RP (1995) *Biological Oceanography: An Introduction (Open University Oceanography Series)*. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.

■研究交流報告■

第十回神奈川大学－国立台湾大学学術交流

加部義夫^{1,2}

Report of the 10th International Exchange Program
between Kanagawa University and National Taiwan University

Yoshio Kabe^{1,2}

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

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

はじめに

第10回神奈川大学化学科と国立台湾大学化学科の交際交流シンポジウムが今年2015年3月12日から15日にかけて開催された。毎年奇数回は本学で、偶数回は国立台湾で交互に開催されており、今年は国立台湾大学で開催された¹⁻³⁾。本学からは教員4名(理学部3名、工学部1名)と大学院生15名(理学部12名、工学部3名)が参加した。

台湾講義(2月26日(木))

国際交流に先立ち、経営学部の泉水先生から「台湾の地歴講話「台湾人」とは誰か?－美麗島の民族史」さらに理学部化学科の木原先生から「国立台湾大学について」の講義を受けることができた。

またこの講義ではじめて参加メンバーの顔合わせや海外旅行傷害保険の手続きが行われ、筆者は学生引率の責任者として旅行代理業者と連絡をとったり、初日の空港での集合時間と場所について、参加者全員にメールでの連絡をこのときから開始をはじめた。受け入れ側との連絡やおみげの手配については引き続き木原先生にお世話していただいた。

泉水先生の講義からは台湾が日清戦争、下関条約で日本の植民地になり、日中戦争終結後、蒋介石が共産党に敗退して中国本土に150万人の人々と移住したときに、あまり日本では知られていない台湾独立運動(二二八事件)が起きたことが紹介された。日本軍が去って国民党政府軍が侵入(狗去猪来)したとき、そのあまりの横暴に対して台湾人が蜂起し、これに対して政府軍が日本統治時代のエリート8千人を虐殺し鎮圧した。そして世界一長い戒厳令(1947年－1987年)が敷かれた。大陸から蒋介石と一緒に来たのが外省人(人口の15%)で元からいる本省人(客家人(15%)、福老人(70%))と区別するが、

現在では外省人のその2世、3世の世代と交替し、現在では中華民国政府と台湾省の二重行政も廃止されている。一つの文化と歴史を持つ台湾人の国家として歩んでいるとのが理解できた。一方木原先生からの講義では台北帝国大学が第7番目の帝国大学として、ソウル大学に続いて、神大と同じ1928年に設立された。後で国立台湾大学に名称変更されるが、当初、あえて国立台湾大学ではなかったのは植民地だったため、この点ソウル大学も同じ理由であることが知らされた。日本の植民地時代の台湾の発展に星新一(星製菓の設立者)や野副鉄男先生(台北帝国大教授で後に東北大学教授へ、ヒノキチオールの発見で文化勲章受章)が大きく貢献しているとのことだった。

実はかつて筆者は野副先生が東北大学を定年後に花王(株)の顧問として後進の指導にあたっているときにその講義を受講した。国立台湾大学に野副先生を顕彰する展示がされているとのことで、それを見学することを楽しみに参加した。さらに木原先生の講義では現在に国立台湾大学のもっとも優れた研



図1. 国立台湾大学化学系ロビーのシャンデリア。

究者として彭旭明 (Shie-Ming Peng) 教授が紹介され、台湾の総統からも表彰を受けているとのことだった。彼の合成した多核金属紐状錯体の分子モデルが化学科ロビーのシャンデリアとして飾られているとのことだった

台湾初日 (3月12日 (木))

羽田空港 8時35分発の JAL97 便を利用することになり、2時間前の6時半に空港ロビーに集合することになった。そこで参加者は羽田の近くのホテルで前泊したり、10分遅れて1番電車を乗り継いで来たり、はては前夜から羽田空港国際線3階出発ロビー (JALのFカウンター付近) に泊まるなどして工夫をして集いあった。以下に参加メンバーを挙げる。

加部義夫	理学部化学科教授
松永 諭	理学部化学科特別助教
安部 淳	理学部生物学科特別助教
南齋 勉	工学部物質生命助教
小西 翼	化学専攻博士後期課程2年 (山口研)
山本翔太	化学専攻博士後期課程2年 (山口研)
小堀彩夏	化学専攻博士前期課程2年 (木原研)
佐藤昂之	化学専攻博士前期課程2年 (加部研)
上田優一朗	化学専攻博士前期課程2年 (山口研)
町田巧太郎	化学専攻博士前期課程1年 (菅原研)
小林侑生	化学専攻博士前期課程1年 (菅原研)
山崎周哉	化学専攻博士前期課程1年 (山口研)
小林 剛	生物科学専攻博士後期課程2年 (金沢研)
佐藤 剛	生物科学専攻博士後期課程2年 (井上研)
松田貴大	生物科学専攻博士前期課程1年 (井上研)
花本 光	生物科学専攻博士前期課程1年 (井上研)
相馬大貴	応用化学専攻博士前期課程2年 (金研)
石川修平	応用化学専攻博士前期課程1年 (引地研)
窪澤弘樹	応用化学専攻博士前期課程1年 (金研)

事前にパスポートを提出して、団体のEチケットを購入していただいていたので、旅行代理店の方がパスポートを集めまとめて搭乗手続きを行い、その後荷物を預けるだけの簡単な手続きで済んだ。日本と1時間の時差のある台湾松山 (Songshan) 空港は当日小雨で、4時間弱のフライトで11時40分に無事到着した。入国手続きの書類を多く参加者が未記入のため、全員が税関を通過するのに時間がかかったが、荷物をとり到着ロビーに出てくると国立台湾大の詹益慈 (Yi-Tsu Chan) 先生と学生たちが迎えに来てくれていた。さっそく貸切バスに乗りランチボックスをいただきながら1日目の観光ツアーが開始された。

空港から約15分程度で台北市街に入り、最初に蒋介石を記念して建てられた中正記念堂を訪れた。正門と中庭は工事中であったが、八角形の屋根の記念堂の左右に配置されている橙色の国家音楽庁 (コンサートホール) と国家戯劇院 (劇場) は美しかった。記念堂では1時間ごとに行われる、蒋介石を守る衛兵の交代式を見ることができた。



図2. 国家音楽庁での集合写真。



図3. 中正記念堂へ向かう詹 (Chan) 先生と筆者。



図4. 中正記念堂での衛兵交代式。

その後国立台湾大学にバスで移動し、正門から入校しキャンパスのメインストリートに入るとヤシの木が目に入り、ここは南国なんだという印象を持った。広いキャンパスの外側には近代的な建物が中央部分には台北帝大時代の古い建物がよく保存されていて、どこか東大の本郷キャンパスとよく似ていた。国立台湾大学の歴史を展示している台大校史館もその一つの建物で以前は図書館だった建物で、中では日本のアニメをみて独学で日本語をマスターした女子学生さんがガイドをしてくださいました。



図 5. 国立台湾大学校史館での集合写真。

台大校史館をあとにし、宿泊先のホテルのハワード・シビルサービス・インターナショナルホテル（福華国際文教会館）にバスで移動した。参加者はチェックイン後しばし休憩し、夕方からふたたびバスで台北市街地にある居酒屋（小川台式居酒屋）に向かい歓迎の祝杯をあげた。そこでは台湾の家庭料理を魚にビールがサーバーでサービスされたが、臭豆腐とやらはどうしても臭くて食べられなかった。歓迎会后、先生達のグループとわかれ学生達が、台北 101 の高層ビルを訪ねるとのことで筆者も同行した。このビルは少なくとも 2004 年までは世界一高いビル



図 6. 台北 101 の近くの居酒屋にて。



図 7. 台北 101 のイルミネーション。

(508 m) で高速エレベーターで 91 階にある展望台から台北市街地が一望できる「箭の子」をイメージしたビルであった。夜遅い時間だったがたくさんの観光客でエレベーターの乗り降りに行列ができていた。展望台からは台北の夜景が美しく、いつもはスモッグで見えないにことが多いので珍しいとのことだった。台北 101 を後にホテルの帰路につき 1 日目を終了した。

台湾 2 日目 (3 月 13 日 (金))

2 日目も詹 (Chan) 先生と学生たちのガイドでに台北の郊外にある九份 (Jiufen) に終日エクスカーションに貸切バスで出かけた。九份 (Jiufen) はかつて金鉱の町として活況を極め、閉山後は古い街並みそのまま残る海沿いの街である。途中岬に流れ込む川がつくる滝や、かつて日本統治下に採掘された金鉱に附設する黄金博物館に立ち寄り見学した。そこで弁当をいただいたのち、バスは九份 (Jiufen) の古い街並みに到着し、しばらく狭い街路を散策した。



図 8. 九份 (Jiufen) の街並み。

道の両脇にはたくさん土産物屋が軒を並べ、途中急な石段が続くところに、アニメ「千と千尋の神隠し」の湯婆婆の屋敷のモデルになった茶屋があった。そこで神大の教員4人は、詹(Chan)先生から中国式のお茶を入れていただきしばし歓談した。聞くところによると詹(Chan)先生のおじいさんはお茶の栽培をしていたとのことでした。夕方台北市街に貸切バスでもどり、古いスタイルのレストラン(Lu-Kuwang Restaurnt 陸光小館)で夕食をとり、その後は学生たちと臨江街観光夜市に繰り出し屋台の食べ物に舌鼓をうった。宿泊先のホテルまでの帰路は路線バスを利用したが、その運転の粗さや二輪バイクやタクシーがスピードを出して行き来する光景に台湾の交通マナーの悪さに驚かされ無事2日目を終了した。



図9. 臨江街観光夜市にて。

台湾3日目(3月14日(土))

3日目にいよいよシンポジウムが開催されました。朝ホテルのロビーに集合し、2人の国立台湾大学の学生の案内で徒歩で国立台湾大学に向かった。すると5分も歩かないうちに広いキャンパスの端にたどり着いた。酔月湖の周辺を歩いてゆくとすぐに化学科棟に到着した。すでに詹(Chan)先生と学生たちが講演会場(Pan-Kuan Lecture Hall)とポスター会場の準備を済ませていた。そこに彭(Peng)先生が来られ、神大側から参加した筆者ならびに若手の先生3人に声をかけてくださり、一人ずつ彭(Peng)先生の合成した多核金属紐錯体の分子モデルが刻まれたキーホルダーをいただいた。シンポジウムに先立ち、化学系棟の玄関先にて、全員で記念撮影におさまり10時過ぎからシンポジウムが開始された。開会の辞では国立台湾大学理学院化学系主任の楊吉水(Jye-Shan Yang)主任があいさつされ、同じく国立台湾大学の李弘文(Hung-Wen Li)先生の座長で1つ目のセッションが開始された。最初の招待講



図10. 国立台湾大学化学系棟。

演を筆者がつとめ“ポリシラノールの化学”について、次に彭(Peng)先生の“多核金属紐状錯体”について招待講演がされた。続いて学生のポスター発表の中から2人がショートプレゼンテーションを行った。まず神大理学部化学科(山口研)の山本君が“ポリマーソーム”について、国立台湾大学化学系(詹(Chan)研)から梁顔鵬(Yen-Peng Liang)君が“ターピリジン超分子三角錯体”について講演した。お昼とポスターセッションが講演会場の外のホールに準備された。神大と国立台湾大学の大学院生達により33件のポスターが発表された。さすがに3日目ともなり、学生達も顔見知りとなり、わきあいあいの雰囲気の中で英語での有意義な研究討議が行われた。教員達には、お昼にランチボックスが用意され、別室にていただいていると、欧米からの客員教授として国立台湾大学に滞在している2人の先生と同席になった。ひとはKeinan教授で現在イスラエル化学会の会長で、筆者の講演でも質問をいただいた。抗体触媒の化学が専門とのことだった。もうひとり



図11. 講演をする彭(Peng)先生。



図 12. ポスター発表会場にて (1).

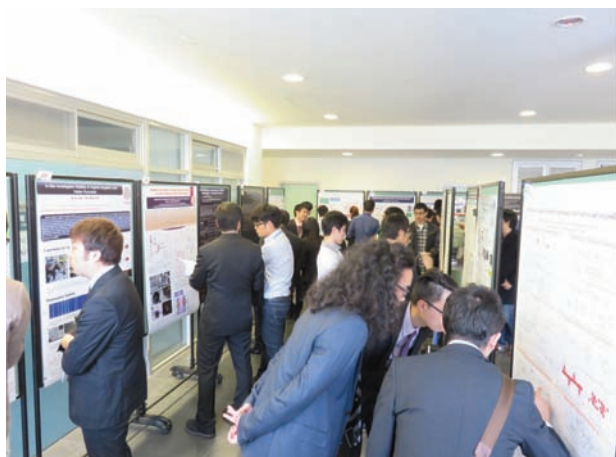


図 13. ポスター発表会場にて (2).

は Demchenko 教授でウクライナアカデミーの研究者で蛍光分析が専門だった。研究に関して国際的にオープンマインドな国立台湾大学の組織体制が羨ましかった。またこの間、彭 (Peng) 先生のご指名で、国立台湾大学ライフサイエンス系の女性研究者の丁照棟 (Chau-Ti Ting) 先生と一緒に化学系の展示室に案内していただいた。化学系で使われていた実験装置や、歴代の化学系の教授が写真とともに紹介されており、その中に野副鉄男先生の名前もありました。展示室を出たあとは大きな分子モデルのコレクションや化学系棟の屋上からキャンパスを一望したり、建物の階上にある教官の個室、大学院生の部屋、などを見学させていただき、どの部屋にもバルコニーがついて、とくに教員のラウンジには広いテラスが隣接しいつでもパーティーができるとのことでした。「国立なのにこんなに贅沢でいいのですか」との質問に「この建物は民間の資金で建てたので」との答えでした。

午後の 2 つ目のセッションは若手教員による招待

講演で、神大理学部化学科の松永先生が“ポルフィリン MOF”について、国立台湾大学化学系からは陳浩銘 (Hao-Ming Chen) 先生により“水の酸化触媒”についての講演があった。続いて神大工学部物質生命化学科からは南齊先生から”液・液界面における非平衡状態の運動“について講演があり多くの参加者の興味を引いた。コーヒープレイクをはさんで最後の 3 つ目のセッションでは国立台湾大学ライスサイエンス系の黄 (Wei-Pang Hung) 先生の座長で 2 件の招待講演があり、最初は神大理学部生物科学科の安部先生が”寄生蜂の雄雌の比率“について、台湾大学ライフサイエンス系 (黄 (Hung) 研) の丁 (Ting) 先生により“ショウジョウバエの単為生殖”について講演がされた。最後は学生のポスター発表の中から 2 人がショートとプレゼンテーションを行った。一人は神大理学部生物科学科 (井上研) の博士課程の佐藤君が“バクテリアからの光生物的水素発生”について、国立台湾大学ライフサイエンス系 (黄 (Hung) 研) の林宇謙 (Yu-Chuin Lin) 君が“ショウジョウバエの脂肪酸エロンガーゼ酵素の分子進化”について講演した。

シンポジウム閉会の辞として、理学院の劉緒宗 (Shiu-Tzung Liu) 院長が神大と国立台湾大学の国際交流の歴史について紹介された。劉 (Liu) 院長は以前神大にも来学されており、懐かしい顔の一人であった。シンポジウムも無事終了して大学の近くのレセプション会場 (E-YA-JI Restraunt 吃的地坊易牙居) に移動しようとする、ひとりの若い先生から声がかかった。陳平 (Richard P. Cheng) 先生であった陳 (Cheng) 先生は、詹 (Chan) 先生、もうひとりの陳浩銘 (Hao-Ming Chen) 先生とともに 3 人の若手教員のひとりであった。ヤシ並木通りを歩きながら詹 (Chan) 先生から伺うところによると、陳



図 14. 国立台湾大学ヤシ並木通り。

(Cheng) 先生の米国留学のボスは、筆者が若いころポストドクをしたMITの正宗悟先生の教え子で女性の教授とのことで、筆者もよく覚えている女子学生であった。いまさらながらに研究者の世界も狭いなとあらためて痛感させられた。レセプション会場は大学から数分の距離にあり、詹 (Chan) 先生の話では自分が学生のときから利用しているとのことでした。会場にはすでに彭 (Peng) 先生、Keinan 教授、Demchenko 教授、さらに以前神大に国際交流で来学された陳竹亭 (Jwu-Ting Chen) 先生や劉如熹 (Ru-Shi Liu) 先生も席につかれ、懐かしい先生方に再開するとともに中華料理を回転テーブルでいただきながら楽しいひと時を過ごすことができました。またこのとき日本から持参したお土産をわたし、先生方や学生にも喜んでいただけた。ホテルまで大学周辺街を徒歩で帰り大役の一日を終了した。



図 15. レセプションにて。

台湾最終日 (3月15日 (土))

最終4日目も午前中は貸切バスで故宮博物館の見学ツアーが予定されていた。故宮博物館は昨年NHKのTVで博物館の収蔵品の流転の歴史について紹介されており、台湾に行く機会があったら是非訪ねたい場所の1つでした⁴。貸切バスで宿舎のホテルを8時半に出発、30分ぐらいで台北郊外の故宮博物館に到着した。館内は多くの観光客でにぎわっていたが、詹 (Chan) 先生が日本語の話せるガイドさんを頼んでくださり、博物館の目玉の展示物である翡翠できた、翠玉白菜や肉形石を解説してくれた。歴代中国の皇帝がコレクションした収蔵品を中華民国政府が中国大陸から台湾に運んだものだが、その数の多さにすべてを見学することができなかつたのが心残りである。

その後台北市街地にあるレストラン (Ten Ren cha FOR TEA 天仁喫茶趣中山店) で昼食をとり、詹 (Chan) 先生と学生さんたちが、松山 (Songshan)

空港まで見送ってくれた。15時30分発のJAL98便に搭乗し3時間弱のフライトで羽田空港には7時15分ごろに無事到着した。参加者一同は空港で解散した。後日このとき台湾大学の学生がお土産にもたせてくれたパイナップルのお菓子がとてもおいしく、別に購入したパイナップルのお菓子のお土産もおいしいと好評だった。何からなにまでの配慮に感謝の4日間でした。

おわりに

出発までには化学科の木原先生にいろいろ準備していただき、台湾では国立台湾大学の詹 (Chan) 先生と学生さんたちにたいへんにお世話になりました。筆者が楽しみにしていた2つの事、一つは野副先生の展示、もう一つは故宮博物館の見学が今回両方とも実現しました。それにしても英語で教員と大学院生が研究について議論する大切さをあらためて感じました。筆者のポストドクのときのボスであるMITの正宗悟先生は、日本人から欧米人のポストドクに会話を切り替えるときに、よく「ちょっと待って」といって頭を切り替えていたのを思い出します。場面に応じて日本語を介さず英語が口からでてくるのが理想だと思います。久しぶりの海外出張で、昔身につけた英語ができたのには自分ながら驚いた4日間でもありました。いずれにしても英語でプレゼンしディスカッションし、日常の話題も語れる力が、大学院生にますます必要になると思います。その点でこの国際交流が今後継続発展し、その機会を広く大学院生に提供できることを強く希望します。付録として3月15日に開催されたシンポジウムのプログラムを添付します。

文献

- 1) 木原伸浩 (2009) 第四回神奈川大学-国立台湾大学学術交流国際会議. *神奈川大学理学誌* 20: 93-103.
- 2) 松原世明 (2011) 第六回神奈川大学-国立台湾大学学術交流の記. *神奈川大学理学誌* 22: 95-107.
- 3) 木原伸浩 (2013) 第八回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* 24: 135-139.
- 4) NHKスペシャルシリーズ 故宮第1回、第2回流転の至宝. NHK総合テレビ 2014年6月28日、29日放送

研究交流報告：付録

**2015 Exchange Symposium for
Kanagawa University-National Taiwan University**

**March 14 (Saturday), 2015, Pan-Kuan Lecture Hall
Department of Chemistry, National Taiwan University**

10:10~10:20 Group Photo Session

10:20~10:30 Welcome Address

Chair, Prof. Jye-Shane Yang, National Taiwan University, Chemistry

Session 1 - Chair: Prof. Hung-Wen Li, National Taiwan University, Chemistry

10:30~10:55 Prof. Kabe Yoshio, Kanagawa University, Chemistry

“3D Hydrogen-Bonding Network and Molecular Capsule of Organopolysilanol”

10:55~11:20 Prof. Shie-Ming Peng, National Taiwan University, Chemistry

“From Homonuclear Metal String Complexes to Heteronuclear Metal String Complexes”

11:20~11:30 Shota Yamamoto, Kanagawa University, Chemistry

“Formation of Photocleavable Polymersome and the Release of an Encapsulated Substance”

11:30~11:40 Yen-Peng Liang, National Taiwan University, Chemistry

“Supramolecular Terpyridine-Metal Triangles: Characterization, Stability Investigation, and Isomer Differentiation”

11:40~14:10 Lunch and Poster Sessions

Odd number poster: 12:30-13:20

Even number poster: 13:20-14:10

Session 2 - Chair: Prof. Yi-Tsu Chan, National Taiwan University, Chemistry

14:10~14:35 Prof. Matsunaga Satoshi, Kanagawa University, Chemistry

“Microporous Porphyrin-Based Metal Carboxylate Frameworks”

14:35~15:00 Prof. Hao Ming Chen, National Taiwan University, Chemistry

“Self-Adapting Layer Enabling Robust Single-Crystal Earth-Abundant Nanoparticles Catalyzing Oxygen Evolution”

15:00~15:25 Prof. Nanzai Ben, Kanagawa University, Material and Life Chemistry

“Spontaneous Motion Phenomena at Liquid-Liquid Interface in a State of Non-Equilibrium”

15:25~15:55 Coffee Break

Session 3 - Chair: Professor Wei-Pang Huang, National Taiwan University, Biochemical Science and Technology

- 15:55~16:20 Prof. Abe Jun**, Kanagawa University, Biological Sciences
“Evolution of Scandalous Sex Ratios in a Parasitoid Wasp”
- 16:20~16:45 Prof. Chau-Ti Ting**, National Taiwan University, Biochemical Science and Technology
“The Persistence of Facultative Parthenogenesis in *Drosophila albomicans*”
- 16:45~16:55 Takeshi Sato**, Kanagawa University, Biological Sciences
“Photobiological Hydrogen Production by Heterocyst-Forming Cyanobacteria and Purple Non-Sulfur Bacteria”
- 16:55~17:05 Yu-Chien Lin**, National Taiwan University, Biochemical Science and Technology
“Molecular Evolution and Expression of Fatty Acid Elongases in *Drosophila*”
- 17:05~17:15 Closing Remarks:**
Dean, Prof. Shih-Tzung Liu, National Taiwan University, Chemistry

Poster Sessions

Poster Session Notice:

1. All presenters should put up your posters during 3/14(Sat.) 9:30-10:00.
2. For odd number poster presenters, please stand by the poster during 12:30-1 3:20.
3. For even number poster presenters, please stand by the poster during 13:20-14:10

1. **Hung-Yi Wu** (NTU, Chemistry): Single-molecule study of how RecA displaces SSB from single-stranded DNA
2. **Kai-En Peng** (NTU, Chemistry): Symmetrical Non-Chelating Poly-N-Heterocyclic Carbenes
3. **Hikaru Hanamoto** (KU, Biological Sciences): Photobiological hydrogen production by purple bacteria and hydrogenase mutants of cyanobacteria under simulated outdoor conditions
4. **Shuheishi Ishikawa** (KU, Applied Chemistry): Effect of Sn addition on the conversion reaction of ethanol to the C4 compounds over Ru/A1203 catalyst
5. **Yun-Chiao Yao** (NTU, Chemistry): Structural effects of phosphorylation and glycosylation of serine and threonine
6. **Tsuyoshi Kobayashi** (KU, Biological Sciences): Morphogenesis and adaptive significance in echinoid post-larval development.
7. **Ching-Wei Tung** (NTU, Chemistry): Self-adapting layer inspiring robust electrocatalyst for oxygen evolution: An in-situ x-ray diffraction approach in liquid environment
8. **Bo-An Chen** (NTU, Chemistry): In-Situ Investigation stability of organic-inorganic Tin/Lead halide perovskite
9. **Sung-Fu Hung** (NTU, Chemistry): Enhancing plasmon Induced hot-carriers kinetics: gold-iridium oxide heterostructures extend plasmon damping
10. **Jun-Hao Fu**(NTU, Chemistry): Self-assembly and characterization of metallo-supramolecular ring-in-ring" structures
11. **Yin-Hsuan Lee** (NTU, Chemistry): Design and synthesis of stimuli-responsive supramolecular gels and cages via metal-coordination and host-guest association
12. **Yuki Kobayashi** (KU, Chemistry): Synthesis of phenylviologen-type molecular-wire with redox property
13. **Ayaka Kobori** (KU, Chemistry): Asymmetric reaction field based on the hydrogen bonding of the Imide group
14. **Tsubasa Konishi** (KU, Chemistry): Fabrication and characterization of organic field-effect transistors

using control of surface by the photoresponsive self-assembled monolayer

15. **Hiroki Kubosawa** (KU, Matenal and Life Chemistry): Synthesis and self-assembly of toothbrush-like copolymer with water-soluble side chains and thermoresponsive block

16. **Yen-Peng Liang** (NTU, Chemistry): Supramolecular terpyridine-metal traingles: characterization, stability investigation, and isomer differentiation

17. **Kotaro Machida** (KU, Chemistry): UV-sensitive vesicle-in-vesicle

18. **Chieh-Wei Chen** (NTU, Chemistry): Upconversion NaYF₄:Yb/Er hybrid gold nanoparticles for piasmon-enhanced photodynamic cancer therapy

19. **Takahiro Matsucla** (KU, biological sciences): Trial of alternative nitrogenase gene expression of different metal center in Nostoc PCC 7120

20. **Takeshi Sato** (KU, Biological Sciences): Photobiological hydrogen production by heterocyst-forming cyanobacteria and purple non-sulfur bacteria

21. **Chih-Jung Chen** (NTU, Chemistry): Plasmonic Ag particles-decorated p-type Si wire array as photocathode for water splitting

22. **Yi-Ting Tsai** (NTU, Chemistry): Improving highly-thermal-stability of nitridosilicate phosphors through A-cation disorder for white light-emitting diodes

23. **Takayuki Sato** (KU, Chemistry): Molecular capsule formed by polysilanol derivatives and encapsulation

24. **Daiki Soma** (KU): Study on synthesis of cross-linked polyamine gels and their hybridization

25. **Chiao-Ching Hsu** (NTU, Biochemical Science and Technology): The correlation between fluorescence intensity and target protein in 2A-coupled co-expression of different EGFPs and GMI-L6C

26. **Yuichiro Ueda** (KU, Chemistry): Preparation and photodegradation of self-assembled monolayers consisting of dendrons with 2-nitrobenzyl moiety

27. **Jia-Syuan Chen** (NTU, Ecology and Evolutionary Biology): Application of CRISPR/Cas9 system in non-model Drosophila

28. **Shu-Hui Yu** (NTU): How may climate warming affect a native Pieris butterfly, an invasive Pieris butterfly, and the pollination of their nectar plants across altitude?

29. **Ying-Jie Wang** (NTU, Ecology and Evolutionary Biology) : Warming impact on the population size and structure of a crop pest (soybean aphid) and its consequence for pest colonization

30. **Yu-Chien Lin** (NTU, Life Science): Molecular evolution and expression of fatty acid elongases in Drosophila

31. **Shuya Yamazaki** (KU, Chemistry): Synthesis and characterization of amphiphilic diblock copolymer using photodegradable heterobifunctional crosslinking reagent bearing alkyne protected by silyl group and maleimide

32. **Shota Yamamoto** (KU, Chemistry): Formation of photocleavable polymersome and the release of an encapsulated substance

33. **Po-Yi Wu** (NTU, Chemistry): Effect of citrulline side chain length on α -helix stability, β -sheet stability,

2014年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

所長	生物科学科	教授	鈴木季直
運営委員	数理・物理学科	教授	水野智久
	数理・物理学科	教授	伊藤 博
	情報科学科	教授	張 善俊
	情報科学科	教授	木下佳樹
	化学科	教授	木原伸浩
	化学科	教授	西本右子
	生物科学科	教授	小笠原強
	生物科学科	教授	金沢謙一

(2) 編集委員

委員長	生物科学科	教授	鈴木季直
編集委員	数理・物理学科	准教授	長澤倫康
	数理・物理学科	准教授	堀口正之
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	天野 力
	化学科	教授	加部義夫
	生物科学科	教授	井上和仁
	生物科学科	准教授	安積良隆

(3) 産官学委員

委員長	数理・物理学科	教授	水野智久
運営委員	数理・物理学科	准教授	加藤憲一
	数理・物理学科	准教授	堀口正之
	情報科学科	教授	桑原恒夫
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	堀 久男
	化学科	教授	山口和夫
	生物科学科	教授	鈴木季直
	生物科学科	教授	井上和仁

(4) 教育研究委員

委員長	生物科学科	教授	小笠原強
運営委員	数理・物理学科	准教授	長澤倫康
	数理・物理学科	准教授	木村 敬
	化学科	教授	西本右子

(5) 顧問・特別所員・客員教授・客員研究員

顧問	藤原鎮男、門屋 卓
特別所員	大石不二夫、紀 一誠、

齊藤光實、 杉谷嘉則、
羽鳥尹承、 松本正勝、
森 和亮

客員教授： 大場信義、 笹本浜子
客員研究員： 市川貴美子、 風間 真、
河合 忍、 岸 康人、
北島正治、 小林照幸、
齋藤保直、 齋藤礼弥、
坂本峻彦、 佐藤繭子、
鈴木健太郎、 盛 磊、
武山 誠、 谷村昌俊、
辻本和雄、 堤 一統
豊泉和枝、 鳥飼章子、
中川清子、 永島咲子、
中原早生、 平井 誠
牧野博昭、 森口草介、
八柳祐一、 湯浅能史、
米澤直記、 若山典央

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第40回湘南ハイテクセミナー

—機器分析入門—

種々の機器分析法の基礎を幅広く講義します。企業や公立機関の新人クラスの分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

演題・講師：

- 1) 「赤外分光」
高柳正夫(東京農工大学大学院 連合農学研究科)
- 2) 「分析総論」
杉谷嘉則(神奈川大学理学部化学科)
- 3) 「有機・高分子材料分析」
松尾大輔(株式会社 日東分析センター)
- 4) 「質量分析」
明石知子(横浜市立大学大学院 生命医科学研究科)
- 5) 「NMR分光」
天野 力(神奈川大学理学部化学科)
- 6) 「環境分析」
西本右子(神奈川大学理学部化学科)

日時：2014年6月5日(木)・6日(金)
 10時～16時40分
 会場：KUポースクエア
 (みなとみらいクイーンズタワー14階)
 主催：神奈川大学総合理学研究所
 後援：日本分析化学会関東支部

(2) 第41回湘南ハイテクセミナー

ー研究開発と分析技術ー

種々の機器分析法の基礎と応用を幅広く講義します。特に、優れた分析技術が研究・開発に対し、いかに重要な寄与をなし得るかという視点を重視します。企業や公立機関の分析担当者、あるいは開発部門で分析にも興味を持たれているような方を対象にします。

演題・講師：

- 1) 「研究・開発とNMR」
 嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 2) 「研究・開発と超微量分析」
 原口紘丞(名古屋大学名誉教授)
- 3) 「研究・開発と環境分析」
 古田直紀(中央大学理工学部)
- 4) 「研究・開発と赤外分光」
 由井宏治(東京理科大学理学部化学科)
- 5) 「研究・開発とX線を利用した分析」
 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」
 志賀雄之(株式会社 日産アーク)

日時：2014年12月4日(木)・5日(金)
 10時～16時40分
 会場：KUポースクエア
 (みなとみらいクイーンズタワー14階)
 主催：神奈川大学総合理学研究所
 後援：日本分析化学会関東支部

- (3) 第25回神奈川大学平塚シンポジウム
 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
 「太陽光活用を基盤とするグリーン/ライフイノベーション創出技術研究拠点の形成」
 ～第4回公開発表会～

日時：2015年3月14日(土)
 10時00分～16時40分
 会場：神奈川大学湘南ひらつかキャンパス
 (11号館サーカムホール)
 主催：神奈川大学理学部化学科・総合理学研究

所
 神奈川大学大学院理学研究科化学専攻・
 生物化学専攻
 神奈川大学大学院工学研究科応用化学専攻

共催：日本化学会
 神奈川大学天然医薬リード研究所
 神奈川大学光合成水素生産研究所
 研究代表者：川本達也 教授(神奈川大学)

演題・発表者：

- 1) 「Facile Synthesis and Photocatalytic Activity of Visible Light Driven Tin Oxide(Sn_3O_4) Semiconductor」
 A. John Jeevagan (神奈川大学)
- 2) 「Characterization of Mononuclear Non-heme Iron(III)-Superoxo Complex with Five Azoles Ligands Set」
 Frederic Odon (神奈川大学)
- 3) 「オルトメタル化金属 (M = Pd, Ni) 錯体を触媒として利用した水素製造」
 巖 寅男(神奈川大学)
- 4) 「カルボン酸架橋パラジウム(II)二核錯体を用いた水の光還元反応」
 北村匠磨(神奈川大学)
- 5) 「白金系金属間化合物の燃料電池用電極触媒および光触媒用助触媒への適用」
 郡司貴雄(神奈川大学)
- 6) 「種々の担持Ru金属触媒上での酢酸水溶液からの低温改質反応による水素生成」
 野澤寿章(神奈川大学)
- 7) 「線虫微小管結合蛋白質PTL-1の解析」
 橋友理香(神奈川大学)
- 8) 「カイコガChAT遺伝子の発現制御機構に関する研究」
 坂西剛太(神奈川大学)
- 9) 「Synthesis and molecular structure of dimeric, tri-titanium(IV)-substituted Dawson polyoxometalate bridged by two Cp^*Rh_2 + groups」
 松木悠介(神奈川大学)
- 10) 「低温触媒酸化プロセスを基盤とした空気質向上技術の開発」
 永長久寛(九州大学大学院)
- 11) 「光合成によるエネルギー変換の機能と制御を理解するために」
 久堀 徹(東工大学)
- 12) 「甲殻類の環境に応じた体色調節」

- 大平 剛 (神奈川大学)
 13) 「量子力学的手法と分子動力学法を組み合わせた化学反応の理論研究」
 松原世明 (神奈川大学)
 14) 「*De novo* カルボニルの捕捉を目指した CTID 型ジオキセタンの固相発光」
 渡辺信子 (神奈川大学)

(4) 第一回システムアシュランス研究会・
 第一回 DEOS 標準化部会講演会

- 演題・講師：
 1) 「DEOS 標準化への期待」
 所 眞理雄 (ソニー CSL)
 2) 「アシュランスケース記述事例報告」
 森口草介 (関西学院大学理工学研究科)
 3) 「DEOS 標準化動向」
 木下佳樹 (神奈川大学理学部情報科学科)

日 時：2014年7月18日(金)
 15時30分～17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：(社)ディペンダビリティ技術推進協会
 神奈川大学総合理学研究所
 神奈川大学プログラミング科学研究所
 報 告：

現在では我々の身の周りには情報システムが遍在し、それらは複雑大規模化し互いに繋がって稼働している。一つのシステムの信頼性を上げるだけでは安心を得られない。安心安全のためには標準化が必須であり、できるだけ多くのシステムの信頼性を上げる必要がある。そこで、今春システムアシュランス研究会を発足させた。今回は、講演会を DEOS 協会標準化部会と合同で開催することとした。所眞理雄 DEOS 協会理事長 (ソニー CSL) の講演、森口草介博士によるアシュランスケース事例報告、木下教授による標準化に関する報告があった。ISO/IEC や OMG 等の標準化動向の興味深い説明があった。

(報告者 奥野康二 2014. 7. 22)

(5) 講演会

演 題：「ヘムの電子状態とそのマテリアルへの応用」
 講演者：大胡恵樹 教授
 (帝京大学大学院教授)
 日 時：2014年8月1日(金)

16時00分～17時30分
 会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
 (6号館 228室)
 主 催：神奈川大学大学院理学研究科
 神奈川大学総合理学研究所

報 告：
 化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館228号室で開催した。鉄のポルフィリン化合物 (ヘム) を題材に、金属化合物の電子状態に関する基礎的な解説を含めて、最先端の研究成果まで、大学院生にもわかりやすくご講演いただいた。また、X線を用いた最新の研究手法についてもご紹介いただいた。多くの聴衆が興味をもったようである。

(報告者 川本達也 2014. 8. 7)

(6) 講演会

演 題：「Construction and Traveling Wave Ion-Mobility Spectrometry Analysis of Metallo-Supramolecular Architectures」

講演者：Chan Yi-Tsu (詹 益慈) 教授
 (国立台湾大学教授)

日 時：2014年8月29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
 (1号館 332室)
 主 催：神奈川大学大学院理学研究科
 神奈川大学総合理学研究所

報 告：
 化学専攻山口和夫が世話人となり、理学部授業科目「化学国際交流」の集中講義のため来日されていた詹 益慈先生に、以下のような最近の研究成果を紹介していただいた。ターピリジン配位子とする種々の金属イオンとの超分子構造を構築し、その超分子構造解析について、2次元 NMR とイオンモビリティ分離機能を搭載した電子スプレーイオン化質量分析を用いて行った。70分間の講演後、活発な質疑応答が20分間行われた。

(報告者 山口和夫 2014. 9. 17)

(7) 講演会

演 題：「分光器革命-分光器が化学を変えた」
 講演者：竹内敬人 教授
 (神奈川大学名誉教授)
 日 時：2014年9月3日(水)

16時50分～17時50分
 会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
 (6号館228室)
 主 催：神奈川県立理学部
 神奈川県立理学部

報 告：
 化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館228号室で開催した。紫外・可視スペクトル、赤外スペクトル、核磁気共鳴、さらにはX線結晶解析の発見・発展の経緯を貴重な写真を含めた豊富な資料に基づき、大学院生にもわかりやすくご講演いただいた。そして、化学の発展に際してそれら分光器の果たした役割の大きさを再認識するとともに、分光学の発展の歴史についても多くの聴衆が興味をもったようである。

(報告者 川本達也 2014.9.9)

(8) 講演会

演 題：「単純な含硫アミノ酸から多彩なキラル金属化合物を創る」

講演者：今野 巧 教授
 (大阪大学大学院理学部)

日 時：2014年10月15日(水)
 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
 (6号館228室)

主 催：神奈川県立理学部
 神奈川県立理学部

報 告：
 化学科の川本が世話人となり、上記講演会を開催した。錯体化学における優れた研究成果をご講演頂いた。特に、金属錯体そのものを配位子とみなした錯体配位子からなる集合体の特異な性質は最新の研究成果であり、多くの聴衆が興味をもったようである。

(報告者 川本達也 2014.10.22)

(9) 講演会

演 題：「緑色蛍光たんぱく質GFPの発見」

講演者：下村 脩 博士
 (名古屋大学特別教授、ノーベル化学賞受賞)

日 時：2014年10月25日(土)
 14時30分～16時00分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
 (11号館サーカムホール)

主 催：神奈川県立理学部

協 賛：神奈川県立理学部
 神奈川県立理学部

後 援：平塚市教育委員会
 神奈川県新聞社

報 告：
 化学科の上村教授が積極的に下村先生に働きかけて下さり、この講演会が実現した。

当日は、サーカムホールに用意した430席がほぼ埋まり、立ち見がでてホールが満員になった。上村教授の計らいで、高校生への出席を促すために、下村先生の『クラゲに学ぶ—ノーベル賞への道—』を先着30名に進呈することとした。この本を手渡す際に引き替えに、質問カードを渡した。

松本先生のご紹介の後、ノーベル賞の授賞記念講演と同様に、下村先生がパワーポイントでの講演に入る直前に会場を暗くして、先生ご自身がGFPの溶液に紫外線を当てられ、溶液の入った試験管が緑色に光ることを実演された。

講演の内容はほぼ上記の本に掛かっている内容と同じであったが、ご本人から直接お話しが聞けて聴衆に感動を与えた。60分を超えるご講演の後には、高校生からの質問に答えて頂き、講演会を終了した。

(報告者 日野晶也 2014.10.29)

(10) 講演会

演 題：「One-step extensions of subnormal 2-variable weighted shifts」

講演者：Sang Hoon Lee 教授
 (Chungnam National University)

日 時：2014年11月25日(火)
 9時20分～10時20分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
 (1号館257室)

主 催：神奈川県立理学部
 神奈川県立理学部

報 告：
 Weighted shift は作用素論研究には多くの示唆を与える重要な作用素である。2変数の weighted shift は解析が困難でこれまで研究が進まなかった。Sang Hoo Lee 教授は R. Curto 氏および J. Yoons 氏と共同でこの作用素の研究に取り組んでおられるが、彼らとの共同研究によって得られた k -hyponormality についての最近の研究成果を講演頂いた。

(報告者 長 宗雄 2014.12.8)

(11) 講演会

演 題：「Subnormal Toeplitz operators with matrix-valued symbols」

講演者：Woo Young Lee 教授
(Seoul National University)

日 時：2014年11月25日(火)
10時20分～11時20分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(1号館257室)

主 催：神奈川大学数理・物理学科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

作用素論研究の中心テーマの一つが Toeplitz operators に関する研究である。この問題に中心的に取り組んでおられ、世界的な研究業績をあげておられるのがソウル国立大学の Woo Young Lee 教授である。今回の講演では block の subnormality について研究の発端からその後の歴史を述べられてから、彼の最近の研究成果を講演頂いた。

(報告者 長 宗雄 2014.12.8)

(12) 講演会

演 題：「California Polytechnic State University」

講演者：Caixing Gu 教授
(California Polytechnic State University)

日 時：2014年11月25日(火)
11時20分～12時20分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(1号館257室)

主 催：神奈川大学数理・物理学科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

Agler によって研究が進められたヒルベルト空間からバナッハ空間への n -hypercontraction のモデルについて講演頂いた。この研究は Nagy-Foias, Rovnyak-de Branges のモデルの一般化であり Rota のモデルに共通点がある。今回の講演では Agler-Stankus によって研究が進められた m -isometry についての関連についても最近の研究成果を講演頂いた。

(報告者 長 宗雄 2014.12.8)

(13) 講演会

演 題：「A Spectral Theory for Completely Advertible Algebras」

講演者：Hugo Arizmendi 教授

(Universidad Nacional Autonoma de Mexico)

日 時：2014年11月25日(火)
13時00分～14時00分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(1号館257室)

主 催：神奈川大学数理・物理学科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

古典的な位相解析学で、解析学の基礎となる分野を研究されておられるのが Hugo Arizmendi 教授である。今回の講演では locally convex algebra のスペクトルとして基本的な G.R. Allan および W. Zelazko によるものを紹介し、 Q -algebra および advertibly complete algebra において pseudo- Q -ness はバナッハ代数において基本的な性質であることを示した最近の結果について講演頂いた。

(報告者 長 宗雄 2014.12.8)

(14) 講演会

演 題：「散乱法を用いた薬物送達用ナノ粒子の構造解析と薬理効果の相関」

講演者：櫻井和朗 教授(北九州市立大学)

日 時：2014年12月2日(火)
15時10分～16時40分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館305室)

主 催：神奈川大学理学研究科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

光散乱の場合、 $v\Delta\rho$ の項は溶液の屈折率の濃度依存性から独立に得られるため、散乱強度の絶対値からモル質量が精度良く求められる。一方、光の波長はナノ構造体の大きさと比較して長い形状因子からは慣性半径が求まるだけである。また、水溶液中からの光散乱では、光学精製が大きな課題となっている。他方、水溶液中からの X 線散乱では、光学精製の問題は少ないが、溶質への対イオン凝集などの効果があつて $\Delta\rho$ を正確に求めることができない。しかし、X 線の波長がナノ構造体の大きさより小さいため、形状因子からナノ構造体の詳細な構造解析が可能である。

演者らは、それぞれの方法の長所と短所を補うために、光散乱と X 線小角散乱を組み合わせることとした。具体的には、光散乱には

FFF (Field-Flow Fractionation) を用いて光学精製の問題を解決し、得られたモル質量を用いて、X線小角散乱の絶対値のデータを用いた解析を可能とした。講演では、DDSに用いられる高分子ミセルや多糖核酸複合体の溶液散乱に関して、演者らの最新の結果から話題が提供された。

(報告者 山口和夫 2014.12.9)

(15) 講演会

演題：「実用的な色素増感太陽電池の開発を目指して」

講演者：見附孝一郎 教授(城西大学)

日時：2014年12月16日(火)

13時30分～15時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(11号館第2会議室)

主催：神奈川大学理学部化学科

神奈川大学総合理学研究所

報告：

化学科の菅原が世話人となり、上記講演会を11号館第二会議室で開催した。見附教授の講演は、地球規模のエネルギー問題について概観した後、自らの研究例に触れつつ、太陽電池の太陽光の利用効率を向上させる取り組みについての解説があり、大変具体的でかつ、説得力のあるものであった。無機材料としては、酸化チタン薄膜の作製法、特に酸化チタンのナノ粒子の粒径制御についての重要性、有機材用としては、吸収端が長波長まで伸び、かつ電子輸送効率の高い色素の設計・合成法が紹介され、さらにファブリケーション法の工夫などを含め、総合的取り組みがいかにか大切であるかが強調された。講演が明快であったこともあり、講演中も含め活発な質疑応答があり、大変有意義な講演会であった。

(報告者 菅原 正 2014.12.24)

(16) 第二回システムアシュランス研究会・

第二回DEOS標準化部会講演会

演題・講師：

1) 「適合性評価の国際的な仕組み」

三井 清人(JQA日本品質保証機構)

2) 「アシュランスケース事例報告」

平井 誠(神奈川大学総合理学研究所)

3) 「IEC TC56 Dependability 活動報告」

木下佳樹(神奈川大学理学部情報科学科)

日時：2014年12月8日(木)

15時30分～18時00分

会場：KUポर्टスクエア

(みなとみらいクイーンズタワー 14階)

主催：(社)ディペンダビリティ技術推進協会

神奈川大学総合理学研究所

神奈川大学プログラミング科学研究所

報告：

第1回に引き続き、今回もDEOS標準化部会講演会と合同で開催した。

標準化と認証は表裏一体である。標準化を進める過程において、認証に思いを巡らせることは頗る重要である。そこで、適合性評価(認証、認定、試験など)の国際的な統合化活動でご活躍された三井清人JQA日本品質保証機構特別参加をお招きし、その全体像をご講演いただいた。短時間でその概要を駆け足でご説明いただいたが、適合性を評価する機関や人の重要性を改めて認識した。

平井誠客員研究員によるアシュランスケース事例報告、木下佳樹教授によるIEC62853オープンシステムディペンダビリティの国際標準化活動に関する報告も行われた。

(報告者 奥野康二 2014.12.22)

(17) 講演会

演題：「Kreïn space representation of submodules in Hardy spaces with several variables」

講演者：瀬戸道生(島根大学)

日時：2015年3月23日(月)

10時00分～11時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(11号館103室)

主催：神奈川大学理学部数理・物理学科

神奈川大学総合理学研究所

報告：

関数解析学と複素解析学の境界にある重要な問題であるハーディ空間におけるサブモジュールの表現について解説され、さらに彼の最近の重要な業績であるクレイン空間への不定値内積空間を経由した表現について講演されました。

(報告者 長 宗雄 2015.3.26)

(18) 講演会

演題：「Perturbation of m-isometries by nilpotent operators」

講演者：Vladimir Muller 教授

(チェコ科学アカデミー)
 日 時：2015年3月23日(月)
 11時00分～12時00分
 会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
 (11号館103室)
 主 催：神奈川大学理学部数理・物理学科
 神奈川大学総合理学研究所

報 告：

今回の講演では *m-isometric* 作用素に関する研究について講演頂きました。最初に、この作用素の基本性質を述べられました。そして有限次元のときは *m-isometric* 作用素(行列)はユニタリー行列とべき零行列の和となるので、この結果を一般の作用素に拡張した。初めにこの研究について述べられた。次に、この分解はバナッハ空間上の作用素については成立しないことを、例を挙げて解説されました。

(報告者 長 宗雄 2015.3.26)

(19) 平塚祭 特別参加企画

テーマ1：「モバイル走査電子顕微鏡で見たものをみよう」
 日 時：2014年10月25日(土)、26日(日)
 10時00分～16時00分
 会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
 (9号館107室：電子顕微鏡室)
 主 催：神奈川大学総合理学研究所
 共 催：神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター

テーマ2：「神大理学部の産官学連携へのアプローチ」
 日 時：2014年10月25日(土)、26日(日)
 10時00分～16時00分
 会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
 (6号館226室)
 主 催：神奈川大学総合理学研究所

3 産官学 活動実績

(1) 展示会

「BIO tech 2014」
 日 時：2014年5月14日(水)～16日(金)
 会 場：東京ビッグサイト
 出展者：神奈川大学理学部化学科
 教授 上村大輔
 テーマ：「細胞微小空間の動的制御を実現する光応答性材料」

出展者：光機能性材料研究所
 独立研究者 中西 淳
 テーマ：「細胞微小空間の動的制御を実現する光応答性材料」
 主 催：リードエグジビジョンジャパン(株)

(2) 展示会

「JASIS 2014 ～アジア最大級の分析・科学機器展」
 日 時：2014年9月3日(水)～5日(金)
 会 場：幕張メッセ
 出展者：神奈川大学理学部化学科
 教授 西本 右子
 テーマ：「“環境に優しい”から一歩進めて“環境を育てる”ための前処理、分析法、アプリケーション紹介、汎用分析機器を用いてできる水と天然物の力に注目した研究」
 主 催：一般財団法人日本分析機器工業会
 一般財団法人日本科学機器協会

(3) 展示会

「イノベーションジャパン2014」
 日 時：2014年9月11日(木)、12日(金)
 会 場：東京ビッグサイト
 出展者：神奈川大学理学部化学科
 教授 山口和夫
 テーマ：「光応答性高分子材料創製のための二官能性カップリング剤の開発」
 主 催：独立行政法人科学技術振興機構
 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構

(4) 展示会

「湘南ひらつかテクノフェア2014」
 日 時：2014年10月24日(木)～26日(土)
 会 場：ひらつかアリーナ
 出展者：理学部生物科学科
 教授 金沢謙一
 テーマ：「ウニ類の多様化と適応進化」
 「潮間帯のカサガイ類の防御行動」
 「相模湾平塚沖の貝類相」
 主 催：平塚商工会議所

(5) 展示会

「テクニカルショウ・ヨコハマ2015」
 日 時：2015年2月4日(水)～6日(金)
 会 場：パシフィコ横浜
 出展者：神奈川大学理学部情報科学科

教授 桑原恒夫

テーマ：「様々な業種で利用可能なシフト勤務計画作成システム」

主催：財団法人神奈川産業振興センター
社団法人横浜市工業会連合会
神奈川県、横浜市

(6) 特許（日本出願）

1) 「漢字複合語分割装置」

後藤智範、梅木定博

2) 「フッ素系有機化合物の分解方法、及びフッ素系有機化合物の分解装置」

堀 久男、加藤 昌明

3) 「含フッ素化合物、パターン形成用基板、光分解性カップリング剤、パターン形成方法、化合物、有機薄膜トランジスタ」

山口和夫、伊藤倫子

4) 「抗肥満薬」

上村大輔、川添嘉徳、丸 範人、山本啓太

5) 「含フッ素化合物、パターン形成用基板、光分解性カップリング剤、パターン形成方法、化合物、有機薄膜トランジスタ」

山口和夫、伊藤倫子

6) 「抗肥満剤」

上村大輔、川添嘉徳、小山智之

7) 「含フッ素組成物、パターン形成用基板、光分解性カップリング剤及びパターン形成方法」

山口和夫、川上雄介

8) 「N-スルフォニルインドール誘導体化合物およびその用途」

上村大輔、阿部孝宏、川添嘉徳、渡部多恵子、鈴木佑太郎、山田 薫

9) 「除去標的DNAの除去方法、DNAカセット、及び発現ベクター」

房田直記

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。本誌名称の略記は *Sci. J. Kanagawa Univ.* とし、和名は神奈川大学理学誌である。

2 掲載論文の種類

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

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

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

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

(1) 頁数

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

(2) 原稿用紙サイズ

A4版の用紙を用いる。本文および図表の占

める範囲 (紙面) は縦横 245 × 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字あけて、5語程度（英語）のKeywordsを付す。

文字は10Pを用い、見出し（Keywords:）はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文献の各項目の見出しは左揃えとする。

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で12P、本文は10Pとする。

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

2文字）あける。

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で10Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

番号は片括弧（閉じ括弧のみ）表示とする。

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

文字サイズは、項目の見出しは太字で12P、各文献は9Pとする。

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

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

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **16**: 9-17.
- 3) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 4) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I*. Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 5) Owada M (2011) Phylogeny and adaptation of endolithic bivalves in the Mytilidae. *D.Sc. thesis, Kanagawa University, Japan*.
- 6) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料の元素分析法. *微生物* **5**: 34-44.
- 7) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版, 東京.
- 8) 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.

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

(12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。

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

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図の説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

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

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

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

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

(14) 単位

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

(15) 作製見本

希望者には作製見本 (デジタルファイル) を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁 (報告書)

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

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

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

多人数による共同研究のうち、

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

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

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

5 原稿の体裁 (テクニカルノート)

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文 (原著および報告書) の規定に準じて原稿を作製する。

6 原稿の体裁 (教育論文)

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

研究論文 (原著および報告書) の規定に準じて原稿を作製する。

7 原稿の体裁 (研究交流報告)

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

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

8 投稿と略題名 (Running Title) 提出

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

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

9 投稿論文の審査

適時、レフリーによる校閲を行ない、採否や再投稿請求は編集委員会で決定する。

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

10 原稿の校正

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

11 投稿料

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

12 別刷

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

13 著作権等

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

Author Index

A

- Aoki, Takashi 青木 孝…………… 7, 33
 Aoki, Yui 青木 唯…………… 53
 Azumi, Yoshitaka 安積良隆…………… 79

F

- Fujiwara, Hideaki 藤原英明…………… 23
 Fujiyoshi, Takuya 藤吉拓哉…………… 23
 Fukada, Maki 深田麻希…………… 53

G

- Guo, Junxia 郭 俊霞…………… 41

H

- Han, Hao 韓 浩…………… 41
 Hashi, Yurika …………… 1
 Hayatsu, Manabu 早津 学…………… 53
 Hiraga, Yoshimichi 平賀義道…………… 91
 Honda, Mitsuhiko 本田充彦…………… 23
 Hoshino, Yasushi …………… 7

I

- Inoue, Akio K. 井上昭雄…………… 23
 Inoue, Chisato 井上ちさと…………… 47
 Izumi, Susumu 泉 進…………… 75

K

- Kabe, Yoshio 加部義夫…………… 97
 Kamizuka, Takafumi 上塚貴史…………… 23
 Kanazawa, Ken'ichi 金沢謙一…………… 71, 85, 91
 Kasuga, Noriko Chikaraishi 力石紀子…………… 47
 Katayama, Hidekazu 片山秀和…………… 75
 Kataza, Hirokazu 片坐宏一…………… 23
 Kawahigashi, Ken 川東 健…………… 13
 Kotani, Susumu …………… 1
 Koura, Nanami 小浦七美…………… 53
 Kozuka, Maiko 小塚麻衣子…………… 53

L

- Lopez-Rodriguez, Enrique …………… 23

M

- Maaskant, Koen …………… 23
 Maeda, Tatsuro 前田辰郎…………… 33
 Marumo, Sachi 丸茂 幸…………… 53
 Matsunaga, Satoshi 松永 諭…………… 47
 Matsushima, Hideki 松島英輝…………… 79
 Miyata, Takashi 宮田隆志…………… 23
 Mizuno, Tomohisa 水野智久…………… 33
 Morimoto, Takayuki 森本貴之…………… 71
 Morozumi, Soichiro 両角宗一郎…………… 47
 Mulders, Gijs D. …………… 23

N

- Nakai, Shizuko 中井静子…………… 85
 Nakata, Jyoji …………… 7
 Nakayama, Takashi 中山 堯…………… 41, 71
 Nishikata, Hideyuki 西方秀之…………… 53
 Nishimoto, Yuko 西本右子…………… 91
 Nogi, Daiki 野木大輝…………… 91
 Nomiya, Kenji 野宮健司…………… 47

O

- Ohira, Tsuyoshi 大平 剛…………… 75
 Okamoto, Yoshiko K. 岡本美子…………… 23
 Onaka, Takashi 尾中 敬…………… 23

P

- Packham, Christpher …………… 23

S

- Saitama, Mizuho 埼玉瑞帆…………… 75
 Sako, Shigeyuki 酒向重行…………… 23
 Sakon, Itsuki 左近 樹…………… 23
 Suzuki, Ryuta 鈴木竜太…………… 75
 Suzuki, Suechika 鈴木季直…………… 53
 Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘…………… 71, 91

T

Tada, Tetsuya	多田哲也	33
Takagi, Yoshitaka	高木由貴	47
Takayama, Akihiko	高山晃彦	47
Takei, Takaya	武井尊也	91
Tokuraku, Kiyotaka	1
Tsuruoka, Shinya	鶴岡慎哉	75

W

Wakayama, Norio	若山典央	85
-----------------	------	----

Y

Yachida, Gosuke	7
Yamashita, Takuya	山下卓也	23
Yanagita, Kousuke	柳田貢助	47
Yoneda, Tomoaki	7
Yonezawa, Naoki	米澤直樹	71
Yoshikawa, Rie	吉川理絵	47

編集後記

Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌) 第26巻を皆様のお手元にお届け致します。早いもので、本誌も、理学専門の科学誌として再出発してから既に10年を経ています。この間、神奈川大学理学部開設20周年にあたる2009年には、理学部全研究室の研究を紹介した特集号を発売しております。また、ここ数年は、巻を重ねるごとに論文数や頁数が増加する傾向を示し、次なる10年のより一層の発展に向けて大いなる弾みになると期待しております。第26巻は顕著な増頁にはなりませんでしたが、総合理学研究所の研究助成論文多数と自由投稿原著論文も掲載されております。本誌のような学内紀要の役割を持つ科学誌では毎年安定した規模で確実に出版されることも極めて重要なことであり、今回、これまでと同様の原著論文数からなる巻を發行できましたことは幸いです。

さて、これまでの本誌の編集について振り返りますと、書式や投稿規定の策定から始まり、その後の点検と改訂、論文範疇の追加、電子媒体化、なによりも各巻ごとの編集実務などなど、大変なことが続きました。しかし、昨今では、原稿書式が電子配信され、皆さんが注意深く書式に則り原稿を作成して下さるようになり、投稿論文の体裁を規定に沿うように整える編集作業もかなり容易になりましたので、

最早、実務的な面については何も問題はございません。10年を経て、なお気になることは論文の審査制度であります。一時は、編集委員会で制度について検討致しましたが、ある程度の自己責任において研究成果を埋もれさすことなく公表できる科学誌があることは所員にとって貴重であるとの判断から、今しばらくは現状維持を進めるということになりました。当初から、本誌が若手研究者や大学院生の研究発表の場となることも目標の一つでありましたが、「まずは原稿作成と論文発表に取り組んでみる」ということが比較的容易にできる現在の編集制度は、後進に対する教育的側面においても有意義に作用しているのではないかと思います。

私事につき誠に恐縮でございますが、私儀、愈々来春には定年退職を迎えることとなりました。長年にわたり本誌の發行にご協力頂きました所員の皆様へ心からお礼申し上げます。また、本誌立上げの段階から、あるいは数理・物理学科新設後に新たに加わり、編集委員としてご協力くださいました皆様方に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本誌のより一層の発展を心から祈願し、皆様のさらなるご協力、ご支援、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		Science Journal of Kanagawa University	
委員長		Editor-in-Chief	
鈴木季直	生物科学科	Suechika Suzuki	Department of Biological Sciences
委員		Editors	
安積良隆	生物科学科	Yoshitaka Azumi	Department of Biological Sciences
天野 力	化学科	Chikara Amano	Department of Chemistry
井上和仁	生物科学科	Kazuhito Inoue	Department of Biological Sciences
加部義夫	化学科	Yoshio Kabe	Department of Chemistry
桑原恒夫	情報科学科	Tsuneo Kuwabara	Department of Information Sciences
張 善俊	情報科学科	Shanjun Zhang	Department of Information Sciences
長澤倫康	数理・物理学科	Michiyasu Nagasawa	Department of Mathematics and Physics
堀口正之	数理・物理学科	Masayuki Horiguchi	Department of Mathematics and Physics

Science Journal of Kanagawa University Vol. 26 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2015年6月30日
編集者	Science Journal of Kanagawa University 編集委員会
発行者	神奈川大学総合理学研究所
発行所	〒259-1293 平塚市土屋 2946 Tel. 0463-59-4111 (内 2500) Fax. 0463-58-9684
印刷所	光和アドバンス株式会社

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