

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.28 2017

Number 1

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

原 著

Epitaxial Growth of Si on Hydrogen-Terminated Si(001) Surfaces Induced by Ion Beam Irradiation at 300°C Yasushi Hoshino, Kodai Inoue, Gosuke Yachida and Jyoji Nakata	1
Implementation of Chemical Structure Formula Online Editing System based on Flex Framework Ruiqiang Ma and Shanjun Zhang	9
Detecting Fall Events in Elderly Care Using Bidirectional EMG Sensor Hao Han	15
MeV 級イオン照射による新しい SOI 構造形成法の研究 — 超高真空中における電子衝撃 (EB) 加熱型蒸着法による非晶質 Si 層形成の検討 — 中田稔治、井上航大、谷地田剛介、栗田紳平、斎藤保直、村下 達、星野 靖	19
二次元 SiGe 及び SiC を用いた赤外 / 可視域 EL 素子の研究 水野智久、青木 孝、鮫島俊之	31
形式アシュランケース事例：メタノール ¹ H NMR 帰属評価結果の妥当性 — SDBS の帰属および帰属決定プロセスについてのアシュランケースの研究 — 渡邊 宏、木下佳樹、武山 誠、奥野康二	37
バクテリア、酵母、カビに対し広い抗菌活性スペクトルを示す新規貴金属ヘテロ環カルベン 錯体の合成、構造解析と抗菌機構の解明 力石紀子、野宮健司、松永 諭、両角宗一郎、黒瀬香織理	47
¹³ C 2D INADEQUATE NMR による穴あきフラーレンの構造解析 田中輝彦、高橋利和、深谷訓久、崔 準哲、加部義夫	53
アレロパシー活性のハイスループットバイオアッセイ法開発 — 画像解析を加えたプロトプラスト共培養法 — 笹本浜子、安積良隆、鈴木季直	63
自然環境から単離された珪藻類培養株の全 DNA 試料への次世代シーケンサーの試験的適用 鈴木祥弘、鈴木 英、金沢謙一、西本右子	71
クルマエビの成熟制御因子の探索 甲高彩華、城下菜那、馬久地みゆき、大平 剛	75
神奈川県下で採集された原生動物ミドリゾウリムシ (<i>Paramecium bursaria</i>) に関する研究 細谷浩史、濱生こずえ、加藤 薫、道羅英夫、小谷 享	79

高等植物の花粉母細胞のプロトプラスト化と染色体観察に関する研究 安積良隆、笹本浜子	85
インゲンマメの若い根におけるアポプラスト経由の溶質移動に関する組織学及び細胞化学的研究 早津 学、安積良隆、加藤純一、加藤真央、二見有紀、笹本浜子、鈴木季直	93
マダケのタケノコにおける道管の発達と水の通導 野島ひかる、温井里奈子、柏崎翔嘉、丸田恵美子、箸本春樹	99
ミトコンドリア 16SrRNA 領域を用いたキダリス類ウニの系統解析 若山典央、齋藤礼弥、金沢謙一	105
相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 4 流入河川水の元素濃度 新井 健、島川涼太、武井尊也、鈴木祥弘、金沢謙一、西本右子	109
教育論文	
研究成果の「流体力学」（教職課程の教科に関する科目）的解釈 逸見 学	113
研究交流報告	
第 12 回神奈川大学－国立台湾大学学術交流 木原伸浩	115
2016 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	121
Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	127
Author Index	131
編集後記	132

■ Full-Length Paper ■

Epitaxial Growth of Si on Hydrogen-Terminated Si(001) Surfaces Induced by Ion Beam Irradiation at 300°C

Yasushi Hoshino^{1,2}, Kodai Inoue¹, Gosuke Yachida¹ and Jyoji Nakata¹

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

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

Abstract: The ultrathin silicon-on-insulator (SOI) structure is a candidate for integrated high-performance and energy-saving electronic devices. Especially, SOI/bulk hybrid wafers comprising both the SOI region for logic circuits and Si bulk region for random access memories are expected to be a novel type of high-performance microprocess. We have investigated the synthesis of the SOI/bulk hybrid structure using the procedures of oxygen ion implantation and Si solid phase epitaxy. In this study, we investigated the novel homoepitaxial growth of Si on hydrogen-terminated Si(001) surfaces prepared by wet chemical processes followed by high-energy Ar ion irradiation, aiming at reducing the temperature in the synthesis process. Consequently, the epitaxial growth on the hydride Si surfaces was not realized by 180-keV Ar irradiation at 300°C, although that on the pristine Si surface has already confirmed. It was indicated that the superficial hydrogen atoms can act as a migration barrier of silicon in the crystallization process.

Keywords: ion beam induced epitaxial crystallization, silicon-on-insulator, hydride Si surface, electron bombardment evaporator

Introduction

Silicon-on-insulator (SOI) structure insulated by a buried oxide (BOX) layer from a Si substrate is recognized to be a candidate for highly integrated electronic devices with high performance and low energy consumption¹⁻³. Recently, some companies have supplied microprocessors fabricated on the SOI wafers. There are two methods to form the SOI substrates: one is SIMOX (Separation by IMplanted OXygen) and the other is wafer bonding⁴. In the SIMOX technique, the BOX layer is synthesized by high-dose (10^{17} - 10^{18} cm⁻²) oxygen ion implantation in a Si substrate followed by high-temperature annealing (>1300°C)⁵⁻⁸. At first, this process was supposed to be a powerful technique comparable to the wafer-bonding method; however, the SIMOX technique has been today replaced by the wafer bonding method as a general synthesis process for commercial products, because there are some difficulties in the SIMOX process to form electrically and structurally reliable SOI and BOX layers due to point defects

and dislocations induced by the high-fluence oxygen implantation followed by high-temperature annealing. On the other hand, laterally separated SOI fine structure as shown below, which is supposed to be a novel electronic device structure in next generation, cannot be readily synthesized by the wafer bonding method.

For the fabrication of ultrahigh performance devices with high speed communication between processors and memories, it is inevitable to form the SOI/bulk hybrid structures, as shown in Fig. 1, consisting of both SOI substrate region for logic circuits

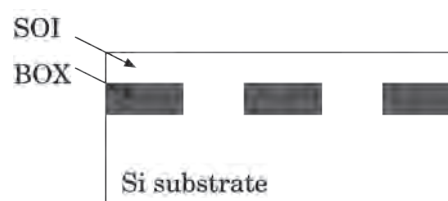


Fig. 1. Schematic image of SOI/bulk hybrid structure.

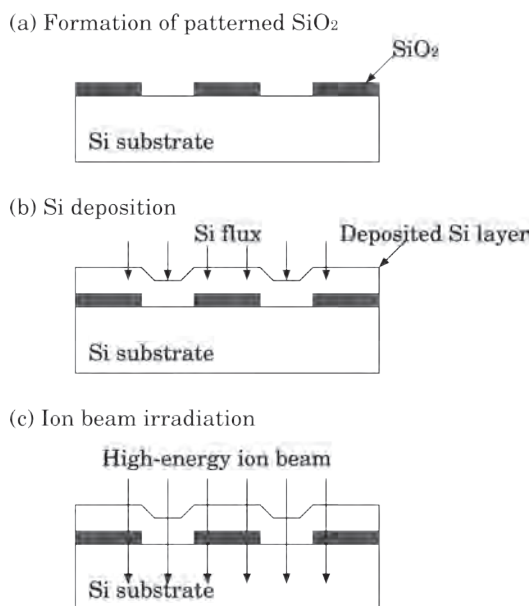


Fig. 2. Synthesis process of the SOI/bulk hybrid structure.

and neighboring Si bulk region for dynamic random access memories with a trench capacitor. Indeed, there have been some demonstrations using such a SOI/bulk hybrid structure by the SIMOX method so far⁹⁻¹³. However, defect-free patterned SOI/bulk structure has never been realized yet, because the oxygen implantation with high-fluences causes a huge stress in the Si substrate due to the volume swell; as a result, the Si epitaxy should be significantly disturbed. We thus suggest the novel process to synthesize the SOI structure that amorphous Si is deposited on the patterned SiO₂/Si(100) wafers followed by special recrystallization processes as schematically shown in Fig. 2¹⁴.

It is widely known that homoepitaxial Si layers can be easily obtained by Si deposition on a clean bare Si surface with a solid phase epitaxy from significantly low temperature at 150°C to typically around 400°C in ultrahigh vacuum (UHV) condition¹⁵⁻²⁰. In the cleaning process of the Si surface, the sample needs to be heated higher than 800°C (typically flashing above 1200°C) in UHV to eliminate native oxides and hydrocarbons covering the Si surface in advance. However, the patterned ultrathin SiO₂ layer, depicted in Fig. 2(a), can also be eventually evaporated from the surface by the pretreatment annealing at the high-temperatures (> 800°C). We thus chemically etched only the native oxides with sub-nm thick from the surface by rinsing in a hydro-fluoride (HF) acid with carefully

controlling the concentration so as to keep the patterned SiO₂ microstructure. The chemically prepared Si surface is known to be terminated by H atoms, and consists of mainly dihydride domains containing some monohydride structure²¹⁻²³. Such a hydrogen termination of dangling bonds makes the surface inert and thus prevents the surface from the adsorption of contaminations of water vapor, oxygen, and hydrocarbons even in atmospheric environment for several minutes²⁴⁻²⁶. The thermal stability of the hydrogen-adsorbed Si(001) surface was widely studied so far by X-ray photoelectron spectroscopy, thermal desorption spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and so on²⁷⁻³¹.

In the early studies, hydrogen coverage dependence of homoepitaxial quality on Si(001) surfaces was widely studied and the dihydride surface was found not to be favorable to homoepitaxy of Si compared to the monohydride surface due to the high activation energy of adatoms' migration^{15,16,18,20,32,33,35}. Karpenco *et al.* suggested the overall picture that both monohydride and dihydride on the Si surface hinder the Si adatom diffusion, which disrupts the layer-by-layer growth on the bare surface and builds up surface roughness which eventually leads to crystalline-amorphous transition¹⁷⁻²⁰.

In order to achieve the high quality Si homoepitaxy, the initial surface structure should be atomically controlled. In common knowledge, hydrogen desorption from the dihydride surface in UHV begins around 300°C, and the surface is changed into the monohydride (2×1) structure^{31, 36-38}. Furthermore, the hydrogen atom in the monohydride is desorbed at higher temperature of 500°C and the surface is gradually converted to the bare (2×1) reconstruction, though it takes long annealing time of several hours to completely eliminate hydrogen atoms from the surface³⁹⁻⁴¹.

As described above, the Si epitaxy on the hydride surfaces is more difficult than that on the bare Si surface. Besides, the epitaxy on the Si substrate having a patterned amorphous SiO₂ microstructure should be much more difficult by conventional annealing processes, because a lateral epitaxy on the patterned SiO₂ is necessary in addition to a vertical epitaxy from the Si substrate. Therefore, we assisted the crystallization by adopting the special method of ion-beam induced epitaxial crystallization

(IBIEC), which can effectively promote the crystallization of the amorphous layer by energy deposition from the incident projectiles⁴²⁻⁴⁸. In this study, we investigated the favorable surface terminations and the effective IBIEC condition in order to synthesize homoepitaxial layers.

Materials and Methods

We prepared two kinds of well-defined Si(001) surfaces: such as a bare Si(001)-(2×1) double domain surface and a hydrogen-terminated Si(001)-1×1 surface, in order to investigate the homoepitaxial growth condition. The bare Si(001)-(2×1) structure was synthesized by “Shiraki method”⁴⁹. In this process, we first prepared a SiO₂-terminated Si surface by a typical RCA treatment finished by the final oxidation sequence and immediately introduced it into an ultrahigh vacuum (UHV) chamber⁵⁰. The sample was prebaked at 550°C for ~ 5 h in UHV ambient to vaporize adsorbed contaminations (water vapor, oxygen, and hydrocarbons) and then elevated temperature over 850°C to eliminate the capped oxide. The surface showed the reconstructed double domain (2×1) structure, which is well known as one of the clean Si(001) surfaces.

In the other surface, we chemically prepared the sample by the RCA cleaning terminated by a diluted HF treatment. The chemically-prepared surface mainly consists of dihydride structure terminating the dangling bonds. The hydride Si surface is chemically stable against the adsorption of contaminations in atmospheric environment. In the present study, the chemically H-terminated surface was immediately introduced into a vacuum chamber and prebaked it at 300°C for 10 minute to desorb physisorbed contaminations. The reflection high-energy electron diffraction (RHEED) pattern showed the (1×1) structure. Si was then deposited on the bare and the H-terminated surfaces with a thickness of ~ 15 nm at the substrate temperature from 300 to 500 °C . The Si deposition was performed by an electron bombardment (EB) evaporator. The deposition rate was calibrated in advance by Rutherford backscattering spectrometry (RBS) and quantitatively estimated to be 0.5 nm/min. In order to heat the sample, we mounted the sample cut into 2×15 mm² size on another dummy Si piece with markedly low electric resistance (<100 Ω) and heated it by directly apply-

ing electric current. The sample temperature was monitored by a pyrometer.

The structures of the Si-deposited films were observed by RHEED and RBS. In the RHEED analysis, collimated 20-keV electrons were incident on the sample at a grazing angle of 2-3° and diffraction patterns were observed by a fluorescent screen. The diffraction pattern reflects the periodicity of the surface structure. In the RBS analysis, 2.56 MeV ¹⁰B²⁺ ions were incident on the sample and scattered ions were detected by a Si surface barrier solid state detector.

Results

Fig. 3 shows RHEED patterns observed for (a) the pristine Si(001)-(2×1) surface prepared by Shiraki method and the Si-deposited surfaces at the substrate temperatures of (b) 415°C and (c) 550°C .

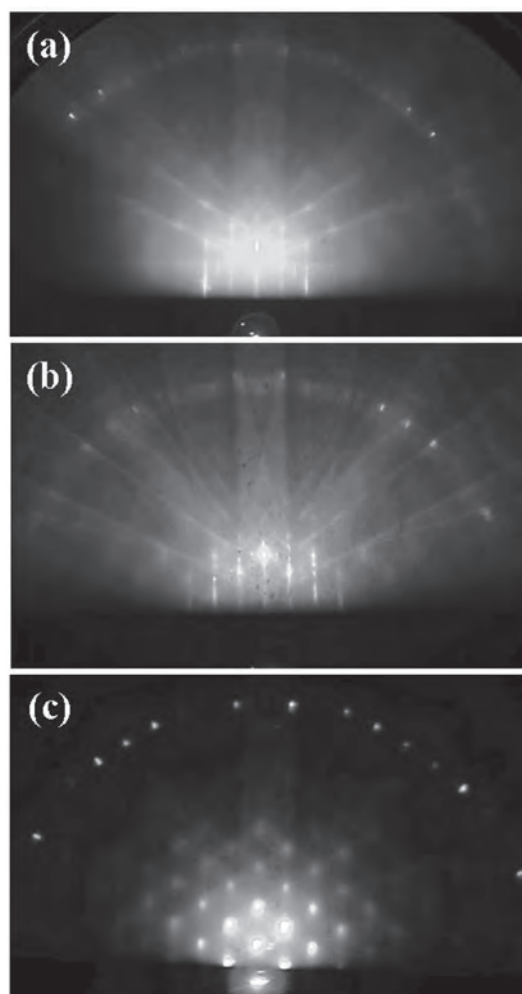


Fig. 3. RHEED patterns observed for (a) the bare Si(001)-(2×1) surface prepared by Shiraki method and the Si-deposited surfaces at the substrate temperatures of (b) 415°C and (c) 550°C .

We can clearly confirmed a double domain (2×1) pattern derived from the typical Si(001) clean surface in Fig. 3(a). A 2-dimensional single-crystalline pattern was observed for the as-deposited sample treated at 415°C (Fig. 3(b)), though the Si deposition at 450°C or higher showed 3-dimensional transmission pattern (Fig. 3(c)) due to the surface roughening. On the other hand, lower temperature deposition ($\leq 350^\circ\text{C}$) showed amorphous structure. Consequently, it is found that the homoepitaxy is realized by the Si-deposition at $\sim 415^\circ\text{C}$. Fig. 4 shows RBS spectra observed the [001]-aligned geometry for the sample in which the homoepitaxial Si was well synthesized at 415°C (red circles) and as-supplied Si(001) substrate for reference (black circles). The aligned spectrum clearly indicates the formation of a high-quality single-crystalline Si layer comparable to the as-supplied Si single crystal. We described above that the bare Si surface is more favorable to the homoepitaxy; however, high-temperature treatment more than 850°C should be avoided from the viewpoint of the epitaxy on the patterned SiO_2 substrate.

Next, we investigated the homoepitaxial condition of Si on the hydrogen-terminated surface prepared by wet HF dip. The RHEED patterns for the Si-deposited samples on two kinds of surfaces consisting of dihydride or monohydride at the substrate temperature lower than 500°C showed amorphous structure, which was different from the pristine Si case. The aligned RBS spectrum for the Si-deposited sample at 415°C on the HF-prepared Si(001) surface shown in Fig. 4 (green circles) also shows amorphous structure. These surfaces showed no

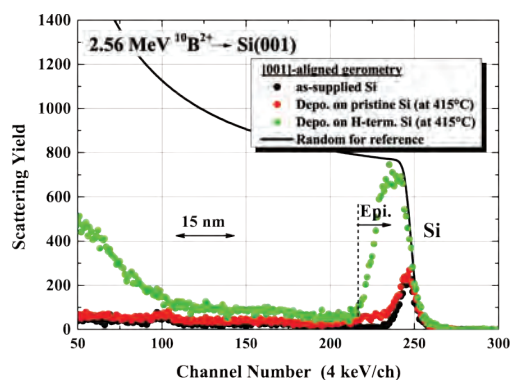


Fig. 4. RBS spectra observed at the [001]-aligned geometries for the samples on which the homoepitaxial Si was well synthesized at 415°C (red circles) and the amorphous Si was formed (green circles).

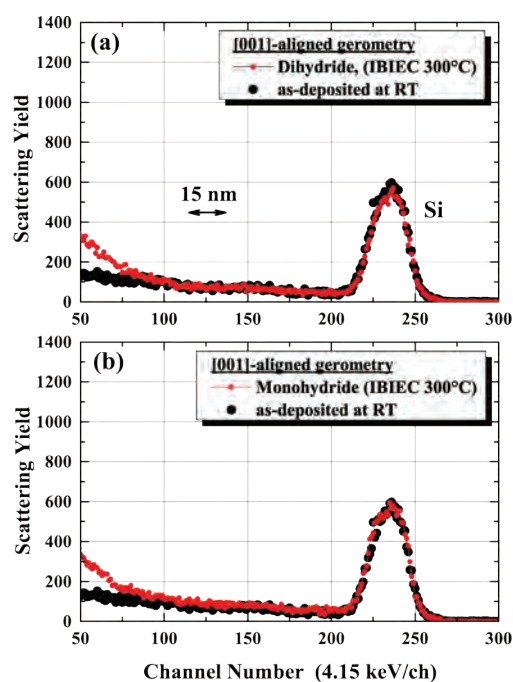


Fig. 5. RBS channeling spectra for the Si-deposited samples on the dihydride (a) and the monohydride (b) surfaces after the Ar irradiation at 300°C .

longer a uniform single crystalline layer by the conventional thermal annealing at 600°C . We thus investigated the condition for the recrystallization of the amorphous layer by IBIEC using 180 keV Ar ion irradiation with a fluence of 5×10^{15} ions cm^{-2} at the substrate temperatures of 300°C . We in advance estimated the regrowth rate of amorphous Si by 180 keV Ar bombardment to be 8 nm per 1×10^{15} ions cm^{-2} at 300°C . The dihydride surface was prepared by HF-dip and the other surface was obtained by elevating the sample temperature higher than 300°C . The surface is supposed to be changed and mainly comprised by monohydride termination due to the desorption of one of the hydrogen atoms³¹. Fig. 5 shows RBS channeling spectra for the Si-deposited samples on the dihydride (a) and the monohydride (b) surfaces after the Ar irradiation at 300°C . It is clearly found that the ion beam irradiation at 300°C was not sufficient to recrystallize the amorphous Si layer grown on hydrogen-terminated Si.

Discussion

As described in the above section, we succeeded in Si epitaxy at 400°C on the hydrogen-free clean Si surface. However, an amorphous Si layers was grown on both hydrogen-terminated Si surfaces of the dihy-

drude and the monohydride from 300 to 500°C temperatures, indicating that the surface hydrogen acts as a diffusion barrier for Si migration, though hydrogen atoms adsorbed on Si surface are well known as a good surfactant of Ge epitaxy on Si^{51, 52}. In the case of Si epitaxy, H is commonly used to assist in chemical vapor deposition (CVD) from gas-phase precursors at low temperatures by passivating the surface from contaminations. Furthermore, H may actually be beneficial for epitaxy, contributing to interface abruptness by reducing unfavorable nucleation, surface segregation and diffusion during the epitaxial process.

In the early studies, Eaglesham *et al.* succeeded in Si homoepitaxy on the HF-treated surfaces followed by prebaking at 200°C by molecular beam epitaxy (MBE) at 370°C¹⁶. They showed the importance of the prebaking treatment for a clean hydride termination because some contaminations still remain on the as-dipped surface and disturb the epitaxy. On the other hand, Meyerson *et al.* performed Si epitaxy on the HF-treated surfaces by CVD under UHV and also pointed out the importance of the initial surface condition²⁴. They reported that HF-treated surface consists of mainly monolayer (ML) Si hydride (~85%), fluoride (~10%), and oxygen or hydroxide (~5%), and absolutely no SiO₂ and C-related compounds was detected. Consequently, the homoepitaxy was successful in two distinct temperatures of 425–650°C and $\geq 750^\circ\text{C}$. Copel *et al.* quantified the H coverage on the Si(100) surface by elastic recoil detection by medium energy Li ions and performed Si epitaxy on sub-ML hydride surfaces at low temperatures (125–200°C)¹⁵. They also investigated the influence of H on the Si epitaxy, and found little effect on the epitaxy for H-coverage between 0.2 and 1 ML (1 ML = 6.78×10^{14} atoms cm⁻²). In the present case, homoepitaxy at 415°C, which is the best condition on the pristine Si(001)-(2×1) surface, was not observed on the HF-dipped Si(001) surface. It is indicated that the surface termination was not completely optimized for the required homoepitaxial condition. There might be some point defects or irregular adsorbate coordinations, acting as nucleation sites disturbed the crystallization.

In the IBIEC process, the energy released from primary ions to the lattice system during slow down process as well as many vacancy and interstitial

pairs generated around the ion track by successive elastic collisions significantly reduces the activation barrier for the recrystallization; as a result the epitaxial growth should be promoted even at low temperatures. However, the epitaxial growth on the hydride Si surfaces was not realized by the 180-keV Ar irradiation at 300°C in this study, though that on the pristine Si surface had been already confirmed^{42–48}. It is indicated that superficial hydrogen atoms can act as the migration barrier of silicon for crystallization. The ion beam irradiation at higher temperatures should be needed for the effective recrystallization of amorphous Si layers grown on the hydride surfaces.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Prof. Mizuno T and Mr. Saito Y for their valuable suggestions and maintaining experimental setups. The authors also thank Mr. Seki Y for their support in the experiments and the analysis. This research was partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University.

References

- 1) Kononchuk O and Nguyen BY (2014) *Silicon-On-Insulator (SOI) Technology : Manufacture and Applications*. Woodhead Publishing, Cambridge.
- 2) Colinge JP (2004) *Silicon on Insulator Technology: Materials to VSLI*. Springer 3rd ed., Berlin.
- 3) Anc MJ (2004) *SIMOX*. The Institution of Electrical Engineering, London.
- 4) Izumi K, Doken M and Ariyoshi H (1978) CMOS devices fabricated on buried SiO₂ layers by oxygen implantation into silicon. *Electron. Lett.* **14**: 593-594.
- 5) Nakashima S and Izumi K (1992) Buried oxide layers formed by low-dose oxygen implantation. *J. Mater. Res.* **7**: 788-790.
- 6) Nakashima S and Izumi K (1993) Analysis of buried oxide layer formation and mechanism of threading dislocation generation in the substoichiometric oxygen dose region. *J. Mater. Res.* **8**: 523-524.
- 7) Kawamura K, Nakajima T, Hamaguchi I, Yano T, Nagatake Y and Tachimori M (1995) Improvement of buried oxide quality in low-dose SIMOX wafers by high-temperature oxidation. *Proc. IEEE. Int. SOI Conf.* 156-157.
- 8) Takahashi M, Nakashima S, Kodate J and Ohno T (2001) Characterization of the interface between the top Si and buried oxide in separation by implanted oxygen wafers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **40**: 5211-5216.
- 9) Nagano H, Sato T, Miyano K, Yamada T and Mizushima I (2003) SOI/bulk hybrid wafer fabrication process using selective epitaxial growth (SEG)

- technique for high-end SoC applications. *Jpn. J. Appl. Phys.* **42**: 1882-1886.
- 10) Bagchi S, Yu Y, Mendicino M, Conner J, Anderson A, Prabhu L, Tiner M and Alles M (1999) Defect analysis of patterned SOI material. *Proc. IEEE Int. SOI Conf.* 121-122.
 - 11) Yamada T, Takahashi K, Oyamatsu H, Nagano H, Sato T, Mizushima I, Nitta S, Hojo T, Kokubun K, Yasumoto K, Matsubara Y, Yoshida T, Yamada S, Tsunashima Y, Sato Y, Nadahara S, Katsumata Y, Yoshimi M and Ishiuchi H (2002) An embedded DRAM technology on SOI/bulk hybrid substrate formed with SEG process for high-end SOC application. *IEEE Symp. on VLSI Tech. Digest Tech. Papers* 112-113.
 - 12) Ogura A (2003) Formation of patterned buried insulating layer in Si substrates by He⁺ implantation and annealing in oxidation atmosphere. *Appl. Phys. Lett.* **82**: 4480-4482.
 - 13) Dong Y, Wang X, Wang X, Chen M and Chen J (2003) Low defect density and planar patterned SOI materials by masked SIMOX. *Chem. Phys. Lett.* **378**: 470-473.
 - 14) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature (~300°C) crystallization and amorphization for the amorphous Si layer on the crystalline Si substrate by high-energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev. B* **43**: 14643-14668.
 - 15) Copel M and Tromp RM (1994) H coverage dependence of Si(001) homoepitaxy. *Phys. Rev. Lett.* **72**: 1236-1239.
 - 16) Eaglesham DJ, Higashi GS and Cerullo M (1991) 370°C clean for Si molecular beam epitaxy using a HF dip. *Appl. Phys. Lett.* **59**: 685-687.
 - 17) Karpenko OP, Yalisove SM and Eaglesham DJ (1997) Surface roughening during low temperature Si(100) epitaxy. *J. Appl. Phys.* **82**: 1157-1165.
 - 18) Oberbeck L, Hallam T, Curson NJ, Simmons MY and Clark RG (2003) STM investigation of epitaxial Si growth for the fabrication of a Si-based quantum computer. *Appl. Surf. Sci.* **212-213**: 319-324.
 - 19) Ramana MV and Twater HA (1994) Crystal-state amorphous-state transition in low-temperature silicon homoepitaxy. *Phys. Rev. B* **49**: 8483-8486.
 - 20) Ji JY and Shen TC (2004) Low-temperature silicon epitaxy on hydrogen-terminated Si(001) surfaces. *Phys. Rev. B* **70**: 115309.
 - 21) Neuwald U, Hessel HE, Feltz A, Memmert U and Behm RJ (1993) Wet chemical etching of Si(100) surfaces in concentrated NH₄F solution: formation of (2×1)H reconstructed Si(100) terraces versus (111) faceting. *Surf. Sci.* **296**: L8-L14.
 - 22) Nishimura T, Ikeda A, Koshikawa T, Yasue T and Kido Y (1998) Direct detection of H(D) on Si(001) and Si(111) surfaces by medium-energy recoil spectroscopy. *Surf. Sci.* **409**: 183-188.
 - 23) Sakurai T and Hagstrum HD (1976) Interplay of the monohydride phase and a newly discovered dihydride phase in chemisorption of H on Si(100)2×1. *Phys. Rev. B* **14**: 1593-1596.
 - 24) Meyerson BS, Himpfel FJ and Uram KJ (1990) Bistable conditions for low temperature silicon epitaxy. *Appl. Phys. Lett.* **57**: 1034-1037.
 - 25) Chabal YJ (1984) Hydride formation on the Si(100): H₂O surface. *Phys. Rev. B* **29**: 3677-3680.
 - 26) Takahagi T, Nagai I, Ishitani A, Kuroda H and Nagawawa Y (1988) The formation of hydrogen passivated silicon single-crystal surfaces using ultraviolet cleaning and HF etching. *J. Appl. Phys.* **64**: 3516-3521.
 - 27) Kawase K, Tanimura J, Kurokawa H, Wakao K, Inoue M, Umeda H and Teramoto A (2005) XPS study of H-terminated silicon surface under inert gas and UHV annealing. *J. Electrochem. Soc.* **152**: G163-G167.
 - 28) Hirashita N, Kinoshita M, Aikawa I and Ajioka T (1990) Effects of surface hydrogen on the air oxidation at room temperature of HF⁻treated Si(100) surfaces. *Appl. Phys. Lett.* **56**: 451-453.
 - 29) Yabumoto N, Saito K, Morita M and Ohmi T (1991) Oxidation process of hydrogen terminated silicon surface studied by thermal desorption spectroscopy. *Jpn. J. Appl. Phys. Part 2.* **30**: L419-422.
 - 30) Lauridsen EM, Baker J, Nielsen M, Feidenhans' l R, Falkenberg G, Bunk O, Zeysing JH and Johnson RL (2000) Structure determination of the Si(001)-(2×1)-H reconstruction by surface X-ray diffraction: weakening of the dimer bond by the addition of hydrogen. *Surf. Sci.* **453**: 18-24.
 - 31) Gupta P, Colvin VL and George SM (1988) Hydrogen desorption kinetics from monohydride and dihydride species on silicon surfaces. *Phys. Rev. B* **37**: 8234-8243.
 - 32) Murty MVR and Atwater HA (1994) Crystalstate amorphous-state transition in low-temperature silicon homoepitaxy. *Phys. Rev. B* **49**: 8483-8486.
 - 33) Jeong S and Oshiyama A (1997) Adsorption and diffusion of Si adatom on hydrogenated Si(100) surfaces. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 4425-4428.
 - 34) Jeong S and Oshiyama A (1998) Diffusion mechanisms of a Si adatom on H-terminated Si(100) surfaces. *Phys. Rev. B* **58**: 12958-12963.
 - 35) Nara J, Sasaki T and Ohno T (1997) Adsorption and diffusion of Si atoms on the H-terminated Si(001) surface: Si migration assisted by H mobility. *Phys. Rev. Lett.* **79**: 4421-4424.
 - 36) Flowers MC, Jonathan NBH, Morris A and Wright S (1998) A quasi-equilibrium model for the uptake kinetics of hydrogen atoms on Si(100). *Surf. Sci.* **396**: 227-240.
 - 37) Flowers MC, Jonathan NBH, Liu Y and Morris A (1993) Dissociative adsorption of H₂ using the close coupling wave packet method. *J. Chem. Phys.* **99**: 7038-7048.
 - 38) Chabal YJ and Raghavachari K (1985) New ordered structure for the H-saturated Si(100) surface: the (3×1) phase. *Phys. Rev. Lett.* **54**: 1055-1058.
 - 39) Boland JJ (1991) Evidence of pairing and its role in the recombinative desorption of hydrogen from the Si(100)-2×1 surface. *Phys. Rev. Lett.* **67**: 1539-1542..
 - 40) Sinniah K, Sherman MG, Lewis LB, Weinberg WH, Yates Jr. JT and Janda KC (1989) New mechanism for hydrogen desorption from covalent surfaces: The Monohydride Phase on Si(100). *Phys. Rev. Lett.* **62**: 567-570.
 - 41) Sinniah K, Sherman MG, Lewis LB, Weinberg WH,

- Yates Jr. JT and Janda KC (1990) Hydrogen desorption from the monohydride phase on Si(100). *J. Chem. Phys.* **92**: 5700-5711.
- 42) Golecki I, Chapman GE, Lau SS, Tsaur BY and Mayer JW (1979) Ion-beam induced epitaxy of silicon. *Phys. Lett. A* **71**: 267-269.
- 43) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temperature recrystallization of amorphous silicon by high-energy ion beam. *Appl. Phys. Lett.* **40**: 686-688.
- 44) Nakata J, Takahashi M and Kajiyama K (1981) In situ self ion beam annealing of damage in Si during high energy (0.53 MeV-2.56 MeV) As⁺ ion implantation. *Jpn. J. Appl. Phys.* **20**: 2211-2222.
- 45) Svensson B, Linnros J and Holmén G (1983) Ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum. Methods.* **209-210**: 755-760.
- 46) Holmén G, Linnros J and Svensson B (1984) Influence of energy transfer in nuclear collisions on the ion beam annealing of amorphous layers in silicon. *Appl. Phys. Lett.* **45**: 1116-1118.
- 47) Linnros J and Holmén G (1985) Channeling dependence of ion-beam-induced epitaxial recrystallization in silicon. *J. Appl. Phys.* **59**: 1513-1517.
- 48) Linnros J, Holmén G and Svensson B (1985) Proportionality between ion-beam-induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev. B* **32**: 2770-2777.
- 49) Ishizaka A and Shiraki Y (1986) Low temperature surface cleaning of silicon and its application to silicon MBE. *J. Electrochem. Soc.* **133**: 666-671.
- 50) Kern W and Puotinen DA (1970) Cleaning solutions based on hydrogen peroxide for use in silicon semiconductor technology. *RCA Rev.* **31**: 187-206.
- 51) Kahng SJ, Ha Y, Park JY, Kim S, Moon D and Kuk Y (1998) Hydrogen-surfactant mediated growth of Ge on Si(001). *Phys. Rev. Lett.* **80**: 4931-4934.
- 52) Voigtlander B (2001) Fundamental processes in Si/Si and Ge/Si epitaxy studied by scanning tunneling microscopy during growth. *Surf. Sci. Rep.* **43**: 127-254.

■ Full-Length Paper ■

Implementation of Chemical Structure Formula Online Editing System Based on Flex Framework

Ruiqiang Ma^{1, 2, 3} and Shanjun Zhang²

¹ Inner Mongolia University of Technology, Huhhot 010080, China

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: ma1543179@hotmail.com

Abstract: This study aims to conduct research and develop a new organic compound search website with the data submission function of the new products. The search coding of the website is the popular linear coding SMILES. The molecular structure graphic editor uses the web plug-in FME (Flex Molecular Editor). Users may edit the chemical structure formula online and submit data online through this website. The data structure and operation algorithm of the molecular structure information are put forward to ensure unique SMILES search coding derived from the editor. For the convenience of users, the plug-in is used to implement a local data storage function.

Keywords: flex framework; smiles; mdl molfile; chemical structure; online editor

Introduction

There are some frequently used chemical structure formula editing software at present, standalone mode ChemDraw series, C/S (Client/Server) mode Chemsite, CACTVS3.176 series, B/S (Browser/Server) mode JChemPaint series, etc. But there are some limitations or disadvantages for these software tools. For example, they are expensive. They don't support multiple operating system platform. Edit and query function are limited. Unlimited chemical structure not conforming to the basic chemical rule phenomenon may appear, and so on.

The research and development of chemical structure formula online editor can be realized by two kinds of technical means, that is, non-plug-in technology and plug-in technology. Non-plug-in technology can be realized using html+javascript+css. CSS provides style, and JavaScript+html develops the editor. The advantage of using this technology is that the editor can run in all major browsers, and the browsers do not need to install any plug-ins. But its shortcomings are obvious. First, HTML does not provide the functions of drawing, the drawing can be realized simply based on block element splicing. The strong drawing function is required in this subject, so this method is inconvenient ¹⁾.

Secondly, the JavaScript scripting language is mainly used for the dynamic effects of web page and enhancing interactivity, so it is not suitable for handling the complex data. Therefore, this method is not an ideal choice for this subject. Plug-in technology means are Applet, JavaFX, Flex, etc.

Flex technology is determined by a comprehensive analysis of a variety of online editing technology. Although Flex ActionScript scripting language supports fewer data types, and it is difficult to handle complex data, Flex technology is determined to research the molecular structure online editor ²⁾. Because Flash player is installed widely in the browser and Flex has the across platform. The purpose of the subject is designing the data structure and operation algorithm of molecular structure information to ensure the uniqueness of SMILES and developing a new organic compound search Website based on PHP+MySQL technology ³⁾.

Method

Firstly, Flex is a highly productive, free open source framework. Users may use ActionScript and MXML (Macromedia XML) in Flex Builder to develop and build rich Internet application. Finally forming a

local play byte code (.SWF) file which is not only loaded through the browser but also played locally. As a new generation of rich client technology leader, this technology has the following characteristics ⁴⁾.

Interface development is efficient and Action Script is an object-oriented language. The front-end interface is described by MXML, the interface is controlled by the ActionScript. The back-end application logic encapsulated in the middleware separates with the front-end to realize the true development of the MVC (Model View Controller). The program can run not only in the browser, but also out of the browser which expand the application occasions greatly. It has cross platform performance of supporting various major operating system and browser. It is welcomed by users.

Secondly, the dynamic web programming technology includes ASP, ASP.NET, PHP, JSP, etc. ASP and ASP.NET are developed by Microsoft Corp, so they can only run on Microsoft's server products IIS and PWS. Although they have the characteristic of the safety and stability, but their developments are limited. The running speed of JSP is realized based on taking up more memory, and in order to ensure the cross platform, its complexity is increased greatly. Compared with the above three kinds of technology, PHP language has the characteristics of learning easily, short development cycle, maintaining easily, cross platform, cross server, high efficiency and generating image simply, so the server of this study will use PHP. MySQL is an open source database, it has the advantages of small size, high speed, low cost, supporting million records, supporting multi-user, multi-thread, efficient data storage and search, cross platform, and it is welcomed by users, so the database of this study will use MySQL.

Thirdly, the linear coding used frequently include WLN (Wiswesser Line Notation), Sybyl, InChI and SMILES, SMILES has the advantages of the most compact structure, more readable and more extensive application, so the search coding of this study will use SMILES. MDL Molfile is used to storage the atomic coordinates of chemical structure diagram and connection information between the atoms and save locally. The users may make MOL file import into the editor, and edited again ⁵⁾.

Function Design and Implementation

The Chemical structure formula editor provides the following functions according to the application demand. The editing functions used frequently include addition of chemical bond, addition of ring structure, addition of atom name (symbol), empty canvas, deleting a key, returning to the previous step, and so on. For the convenience of users this study also provides a Quick Add option of common chemical structure fragment (substituent) ⁶⁾. The basic error detection mechanism which gives error messages for the place not conforming to the basic chemical rules. According to the chemical structure, the corresponding unique SMILES coding is generated and search online, the corresponding MOL file is exported and saved locally. The chemical structure analysis block which imports the local MOL file into the editor and analyze its data and then display the corresponding chemical structure. The users can submit the drawing to the database ⁷⁻⁸⁾.

The general drawing software can draw the chemical structure diagram, and finally generate the picture format file. The software is often used in the volume, courseware, etc. In this paper, the SMILES coding is generated which is based on the chemical structure diagram. Therefore, we must consider a suitable data structure to store the information of the structure.

Considering the whole structure diagram as an undirected diagram of the atom or group of the atoms as nodes (known as element nodes), and the following data structure is put forward to store the structure diagram information. Firstly, Record the total element node number of the structure diagram. Secondly, key matrix (400 x 400 (max)), storage key (single bond~1 double bonds~2 triple bonds~3). Thirdly, node element array(3XN). Each element symbols are stored on the first line, X and Y coordinates of each element node are stored on the second and third line.

Algorithm implementation

Add a line and a column after the key matrix and add the symbol and position coordinates of the element after the groups of node element and then the number of the element node variables add 1. Delete the corresponding ranks of the key matrix and the subsequent ranks move forward. Delete the cor-

responding column of the node element groups and the subsequent column moves forward, and then the number of the element node variables minus 1.

Results and Discussion

SMILES search uniqueness

For a structure diagram, firstly iterate starting point should be found while iterating through SMILES. One way is making the element node drew firstly as a starting point, but perhaps its drawing order is different for every people which will lead to the different starting point and different SMILES. But as a search keyword, the SMILES must be unique. Therefore, we need to consider another way, namely each atom is distinguished independently by different atomic numbers, and then the atom of minimum (or maximum) number is considered as the iterate starting point, priority is given the atom of minimum (or maximum) number, so SMILES is ensured unique.

Structure editor interface design

In this paper, the interface of the editor is designed as following diagram to provide a simple and easy operating interface. Edit tool area includes the operations of emptying canvas, adding chemical key, ring structure, deletion, canceling. Chemical structure editing area, the chemical structure formula is designed in the region. SMILES generation area, the SMILES search coding generated by the chemical structure diagram. Read and write area of chemical format file, input and output buttons for MOL files are provided. Chemical structure formula search button, click the button to search the corresponding Chemical structure formula (Fig. 1).

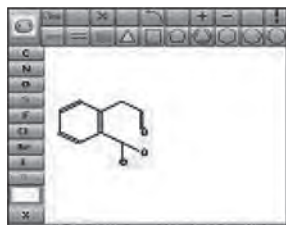


Fig. 1. The layout image.

SMILES search coding generation process

After the atom number is determined uniquely by the CANON algorithm, according to the new atom number we reorder for the array variables and as-

sign a value to the array created newly and the content of the original array doesn't change. In the same time, the iterate temporary variables are generated by access, for example, visited (store the atom state of being visited or not, "yes" is 1, "no" is 0), td (count the connectivity of each atom), and so on. According to the depth-first iterate algorithm, the minimum number "0" is set as starting point, and the small number is given priority to generate SMILES. According to the above algorithm, the SMILES generated is CC1CCC (CC1C) C2CC2, that is, encountering the branch of node 10, we firstly iterate the node 8 and its longitudinal structure. However, if the six sides of the ring are regarded as a whole and the node "9" is regarded as a branch, it seems that it fits in with people's conventional logic and the JME iterate mode. As a result, we need to add in the above algorithm, that is, if there is a branch in the node of the ring and whatever the branch node number is, the non-ring node is regarded as the starting point and iterate firstly. It uses the broken ring to realize.

Chemical structure formula editor

In Flex, the Graphics object cannot be created directly by the ActionScript code, so the diagrams are completed by the method of Sprite display object calling Graphics.

Because flash.Display::Sprite doesn't realize mx.core.UI Component interface and can't add to the Flex component (Canvas) to display directly, sprite display object must be added in the UI Component container firstly and then the container is added in the Canvas to display the diagrams. A single bond is formed by six Sprites, respectively two element node Sprites (element symbol C as an empty Sprite which is not shown) and three draw point selection Sprites (two node collision circles and a key collision circle) Sprite and a key Sprite. The collision circle Sprite is hided. When the mouse moves, the collision circle Sprite is displayed. The users can click here to add an atomic name or key when the collision circle is displayed. The two-element node Sprite (element symbol C as an empty Sprite, which is not shown) and three points (choose the paper called the collision circle, two nodes and a key collision circle) Sprite, a key Sprite. Where the collision circle Sprite hide until the mouse moves to display.

The users can click here to add an atomic name or key when the collision circle Sprite is displayed.

Drawing single key is to add the six Sprites in the UIComponent and occupying the 0~5 layer of the container respectively. Adding / deleting a key the layer will be up / down automatically.

At the same time, the element node and the key value (the element node coordinates are omitted in order to express expediently) are stored in the corresponding array Vertices and Bonds. The collision circle layer at both ends of the key is stored in the VerticesIndex array and the collision circle layer of two element nodes is stored VerticesIndex array and its subscript is atom Index number. If continuing to add a key at either end of the single key, we must determine the element node to add, that is, iterating the VerticesIndex array.

When adding a new key, to prevent the occurrence or cross collision of the new key and the existing key, we need to add in a certain key angle rule. The solution of the key angle problem is divided into two aspects, adding a key on a node and adding a ring on a node.

Case1: The solution of the angle problem when adding a key on a node.

(1) Firstly, setting the maximum key number (denoted as a) added on the node (that is, the maximum degree of a), by reference to JME, the subject is set to 6.

(2) calculate the current angle value of a (denoted as $D[a]$).

If $D[a]=1$, the following steps are used to solve the key angle problem.

① Making "a" as a starting point, add a new key ac (6 Sprites) in the horizontal direction.

② According to the coordinates of "a" and "b" we calculate the rotation angle. That is, according to the inverse trigonometric function $\text{atan}()$ we calculate. We find "a" collision circle Sprite based on `uicomp.getChildAt(VerticesIndex[a])` function in the container UIComponent and then calculate the coordinates of node (such as a) based on `getRect(uicomp).x+5` function (5 is node collision radius) and `getRect(uicomp).y+5` function.

③ (a.x, a.y) as a rotating point the collision circle Sprite of new key "ac" and key Sprite rotate by $\text{angle}+60$ degrees.

It is worth noting that the coordinates obtained by

`getRect(uicomp).X+5` function and `getRect(uicomp)` function is the center of the rectangle occupied by "C" collision circle. But after rotating, the coordinates calculated by this method is not the center of the rectangle. Therefore, before rotating, we regard the center of node "C" collision circle as rotating point and make node "C" collision circle rotate automatically by $-\text{angle}$ degrees and then regard (a.x,a.y) as rotating point to rotate by angle degrees. If $D[a]=2$, firstly we calculate the included angle between the reverse extension line of $\angle bac$ angle bisector and the horizontal direction and assign it an angle, and then (a.x, a.y) as a rotating point make the collision circle Sprite of new key "ac" and key Sprite rotate by angle degrees. . If $D[a]>2$ and $D[a]<6$, we regard the included angle between the extension line of "ba" "ca" "da" and the horizontal direction as rotating angle respectively, and then (a.x, a.y) as a rotating point make the collision circle Sprite of new key "ae" "af" "ag" and key Sprite rotate. If $[a]=6$ and we continue to add a key on the nod "a", the editor will give you a hint that you can't continue.

Case2: The solution of the angle problem in the case of adding a ring in a node.

Solving the problem of the angle in this condition is about the same with the solution described above, that is, firstly calculating the angle and then rotating the collision circle Sprite and key Sprite. Rotation function is displayed in the following program coding segment. The parameters of `xuanzhuan()` function are specified rotating Sprite display object, specified rotation point and specified rotation angle.

Treatment of non-connection structures

In the process of Chemical structure formula editing, the non-connection structure can appear. At this time, when the SMILES is generated, different editors will make different processing. For example, JChemPaint will use the "." to express the two non-connected structures as. CC.C1CCCC1. In this study we refer to the treatment way of JME and firstly according to the uniqueness of the CANON algorithm number each atom and then iterate from the atom which number is 0 (the node denoted by a) till the part of including the iterate starting point is visited completely. In this way, the SMILES generated in this case is CC.

But when SMILES is generated the structure which

has not been visited will be cleared. In this study, the structure which has not been visited will still exist, and the users can continue to edit. When the SMILES is generated next time, it will number according to the CANON algorithm again and start iterating from the atom which number is 0.

MDL molfile access

In the research and development, the local read and write function of the MOL format file is provided. The users can save the chemical structure not finished locally in MOL format and import it to the editor to edit again if necessary.

In general, the flash of webpage is unable to operate the local files due to security concerns, including read and write, even with the help of JS, it will be banned because of the browser's security settings. When Flash player8 appears, the FileReference file can be used to open a browser dialog box of local file. It seems that it can operate locally, but unfortunately the browser frame is only designed for uploading file. The browser frame is the equivalent of a webpage file realm. If we need to save the text file locally, the official sample method in Flash8 installation directory must be used, that is, through the submission of data to the server, the file generates and then the file is downloaded locally.

Local storage of MDL Molfile

Using FileReference.save (data:*, defaultFileName:String = null) method can save data to a local file. The "data" parameter is the data which will be saved. The data can be used String, XML, ByteArray and other formats and the function does corresponding treatment automatically. DefaultFileName parameter is the default file name of the file saved (user can change) and the string of the file name cannot contain '/', '\', '*', '?', '|', '%' , etc.

When a dialog box appears, the users input the file name and select the saving situation for the file on the machine. When the users confirm the selection and click "save" button, the data will begin to save. The method opens a dialog box at the beginning, allowing the users to enter a file name and select the location to save the file on the machine. When the users confirm the selection and clicks "save", the data stored procedure begins. In order to determine the status of the dialog box and the saving operation, in general ActionScript code will intercept can-

cel, open, progress and complete events.

It is important to note that in Flash Player, the FileReference.save () method is called only in response to the user' s events, otherwise it will cause Flash Player error.

In actual development, the Adobe Flex 3 (Integrated development environment of Flex application program) is modified firstly. That is the HTML wrapper is modified which is in the Flex Compiler option of the project attributes.

And then according to the MOL file format the data of the atomic coordinates, atomic name and the key connection which are produced by the chemical structure diagrams are saved locally.

In the response function onComplete data processing function is, the string loaded in the MOL file is translated into the corresponding variables which include the number of the atom, the number of the key, atomic array (storage x, y coordinates of the atom, atom name, VerticesJudge content), the key array, and so on. Using ActionScript drawing function to reduce the chemical structure diagram in the editing area according to the transformed array information (the angle between keys must be calculated constantly), according to the position of coordinates the button is drew and then the atom name is added.

Conclusion

This study realized the function of the structure graph editing and submitting and the function of the structure graph local storage, report errors and adding the chemical bonds. To research and develop a kind of convenient chemical structure graph online editor the FLEX technology which was available to animation application is found to develop the online graphic editor. Researching the event mechanism, graphic display mechanism, file operation of the FLEX technology and developing the structure graphic editor. Offering a kind of convenient data structure and operation algorithms which record and process the information of molecular structure and taking steps to ensure the uniqueness of the SMILES search coding. Realizing the client local storage function. As a test platform and application example, a simple organic compound search website is developed. Although the research and development complete the expected design goals basically,

the web interface art designing and the rotating and zooming function of the chemical structure graph are needed further improvement.

Acknowledgements

The research was supported by the funds of the following. Inner Mongolia university of technology scientific research fund (ZD201417), Inner Mongolia autonomous region college of science and technology research project (NJZY16094) and China scholarship council (201608155034).

References

- 1) Zakas NC (2006) *JavaScript advanced program-*
ming. Wiley Publishing, Prentice Hall.
- 2) Noble A and Na X(2009) *ActionScript 3.0 Cookbook*.
- 3) Pan K (2009) The design and implementation of the method of searching chemical molecular substructure in ChemDataBase. *Master's thesis, Lanzhou University*. China.
- 4) Gong XH (2011) Design of GEF graphical editing framework based on Flex technology, *ELECTRIC POWER IT*. **9** :47-51.
- 5) <http://www.daylight.com/smiles/index.html>.
- 6) Luo L Y (2009) The research and implementation of molecular visualization tool. E-Chemistry. *Master's thesis, Lanzhou University*. China.
- 7) Gasteger J (2005) *Tutorial of Chemical Informatics*.
- 8) Rekaby MM, El-Thalout IA and Rahman AA H (2010) Technological evaluation of carboxymethyl sesbanin galactomannan gum derivatives as thickeners in reactive printing. *Bioresources* **5**: 1517-1529.

■ Full-Length Paper ■

Detecting Fall Events in Elderly Care Using Bidirectional EMG Sensor

Hao Han^{1,2}

¹ Department of Healthcare Information Management, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail : han@hcc.h.u-tokyo.ac.jp

Abstract: Falling is one of the most serious life-threatening events for the elderly, and the ICT-based solutions play a key role in addressing this problem. In this paper, a bidirectional electromyographic sensor network model was experimentally constructed for fall detection, and qualitative analysis is conducted to explain that this solution can be applied more realistically and rationally.

Keywords: fall detection, electromyographic sensor, elderly care, wearable sensor

Introduction

Falls bring the elders a higher risk for injuries and fractures because of weakness in their muscle, bone, vision and balance. Nowadays, falls in elderly people are the main cause of admission and extended period of stay in a hospital. It is the sixth cause of death for people over the age of 65, the second for people between 65 and 75, and the first for people over 75¹⁾. As the super aging societies, Japan and many other countries have to face up the problem of a serious shortage of nursing care staffs in hospitals and healthcare facilities for the elderly²⁾.

Information & Communication Technology based solutions are being developed for fall prevention prevalently, and the number of fall alarm products is growing fast. All alarms belong roughly to one of two types: manual and automatic. Compared with manual solutions like pressing a button when a fall happens, automatic solutions/products collect data from various sensors such as accelerometers, and assess the risk of falling in a real-time way. These automatic solutions perform well in the situations where a user becoming unconscious after falling or a user with dementia cannot manually send an alarm.

In this paper, a bidirectional electromyographic sensor network model is constructed for quick and flexible communication between users and nursing care staffs. Moreover, diverse analyses and prospective studies are conducted on various segments and factors.

Surveillance cameras are most generally employed

as a real-time monitoring for fall detection. Although vision/voice recognition technologies are imported in some new products, the recognition runs with low precision and still needs manual labor. Since falls are usually characterized by larger acceleration and end with lying prone horizontally on the floor. Human activities³⁾, such as gravitational acceleration and gyroscope data of static postures and dynamic transitions, are collected to analyze various patterns of falls like balance abnormalities⁴⁾. However, fall events are context-aware and human-oriented.

The unique features of some activities like falling slowly against wall or sitting down to sleep on the tatami (traditional Japanese-style flooring mat) are usually ignored. Automatic Fall Monitoring⁵⁾ presented a comprehensive overview of fall monitoring techniques, related commercial products, existing research problems as well as future trends. For fall prediction, the analysis of health and medication data extracted from EHR (Electronic Health Record) is conducted⁶⁾. However, it cannot realize a real-time prediction.

Results and Discussion

Bidirectional sensor network

An armband-type EMG sensor is imported to evaluate and record the electrical activity generated by skeletal muscles. The sensor is also equipped with WLAN (Wireless LAN), gravitational acceleration and gyroscope sensor. As shown in Fig. 1, the proposed sensor network system contains the following

functions.

- **Monitoring:** Through wearable sensor, the live logs are collected and stored in real-time. Live logs contain the continuous information of location, status of movement and arm electromyogram data of users. The nursing staffs can learn the status of target users through the monitoring anytime.
- **Detection:** The collected live log is analyzed in real-time, and the fall alarm (location and user profile) is sent to nursing staffs if a fall event is detected (one of fall patterns is matched). Moreover, a confirmation is sent to the sensor for a possible reply from the detected target user. The nursing staffs run to the fall location or stop the help if they receive a cancellation reply from the user.
- **Prediction:** Based on the analysis of personal activity patterns, fall history records, profile information and various comprehensive statistics (e.g., dangerous areas such as stairs), a user-oriented customizable prediction mechanism is constructed. If a possible coming fall is predicted, a notification is sent to the sensor as a warning message.
- **Call/Reply:** A bidirectional “call/reply” interactive mechanism is provided as a simple and

quick communication between users and nursing staffs through the system when a wrong or missed detection happens.

Geolocation

When falls happen, the information of precise location would be immediately sent to the system and nursing staffs. Here, WLAN geolocation is employed because (1) surveillance cameras cannot be set in some places such as toilets or bedrooms, and (2) GPS (Global Positioning System) for nonmilitary use had poor accuracy and signal reception was mostly cut off indoor.

However, WLAN geolocation has to face up the signal interferences caused by interior walls or doors, which weaken the signals. Considering this problem, linear regression analysis is used to calculate distance and direction based on the following signal propagation model.

Tracking like walk-in-lines data collection⁷⁾ is also possible if there are adequate access points. By analyzing the sequences of locations determined form a trajectory from the first to the most actual location, various activity patterns (e.g., a walking pattern containing path, speed and others factors) can be mined for the further analysis and secondary use, such as finding dangerous areas where falls often

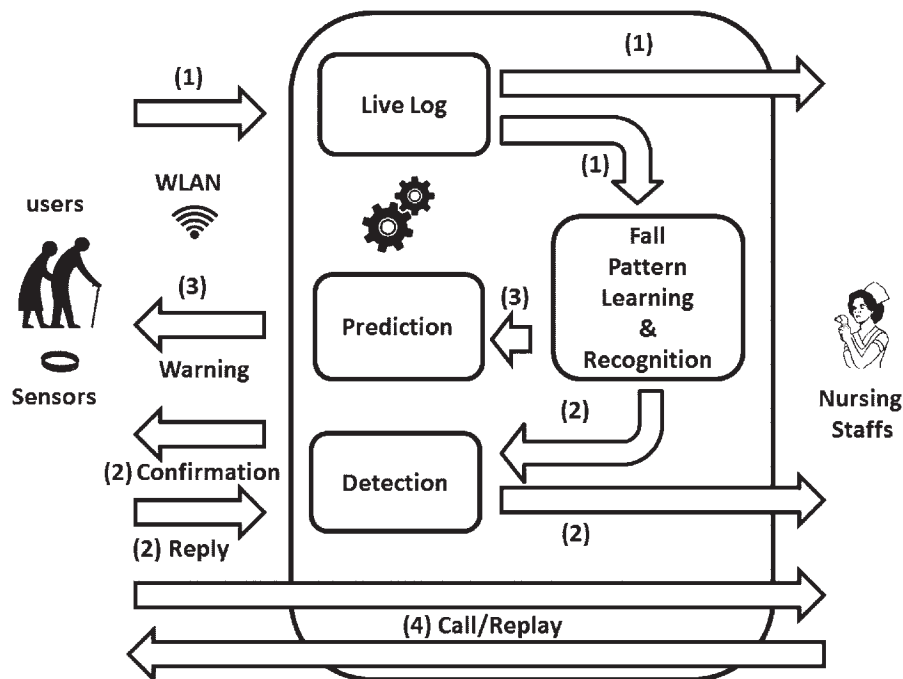


Fig. 1. Outline of bidirectional sensor network system.

happen.

Detection and prediction

A fall is a context-aware event. Personalized fall detection and prediction is a real-time analysis mechanism using various factors such as movement of body, location, and user profile information. Gravitational acceleration and gyroscope sensors are often used in wearable devices to get status of movement and balance of users. However, these data are not comprehensive enough to support diverse fall detection since only the movements of body are focused. Actually, people would grip something like banister or lean arms against wall to stop themselves from falling when they lose their balance, and arm/wrist/hand gesture recognition technologies are bringing us a novel and promising solution.

Here, EMG or electrical impedance tomographic data of arms is collected by an armband equipped with 8 EMG pods to analyze the biomechanics of human since arms give a sudden movement naturally and instinctively to stop falls. Here, 13 panel users (20's - 70's) assisted our experimental data collection by wearing the armband on their right forearms in the following activities.

- Walk: The users walked indoor as usual.
- Sit: The users quickly sat down on the chair or floor (not a fall).
- Fall: The users simulated fall events as naturally as possible.
- Lean: The users leaned their arms against wall to stop a (simulated) fall.

Here, we randomly selected 26 collected event data, of which are 13 fall events and 13 non-fall (e.g., sit, lean) events. An assessors was asked to complete judgement of fall events from the collected experimental data. As shown in Table 1, PPV (Positive Predictive Value) = 81.8%, sensitivity = 69.2%, and specificity = 84.6%, which performs better than sensor data without EMG information.

Table 1. Assessment

Event	Real fall	Non-fall	Sum
Assessed fall	9	2	11
Assessed non-fall	4	11	15
Sum	13	13	

A fall prediction is a statement about an uncertain fall event. It is often based on real-time analysis of risk factors and fall experience or context oriented information. Risk factors contributed to a particular fall event are not always clear. Large-scale and long-term data collection/analysis is necessary for further understanding the mechanism of falls. To gain further insight into the impact of different factors on predictability, user clustering is done artificially according to the following categories of information before semi-supervised and self-evolving learning.

Bidirection

Single-direction communication, such as surveillance camera and nurse call, is inefficient, and simple “call/reply” interactivity is more effective in falls prevention⁸.

- By repeating a predefined special hand gesture (e.g., hold fist and rotate) which is seldom occurred in general life and easily learnt by the elderly, users can send a “call/reply” ' message to the system.
- By remotely sending a vibration (trigger built-in vibration motor), the system can send a “call/reply” ' message to the target users.

Bidirectional “call/reply” ' can well solve/satisfy the following problems/requirements.

- Wrong detection: when a fall is detected by system, a continuous call is sent to the user for a confirmation. The user can reply it if this is a wrong detection. The nursing staffs would be notified by a cancellation of alarm.
- Failed detection: when a fall happens and confirmation call is not sent to the user. The user can continuously call the system for a help and the nursing staffs would be notified.
- Prediction and warning: when the system predicts a possible coming fall caused by current movement of the user or dangerous areas, the system would send a short warning call to the user.

Conclusion

In this paper, we designed an ICT-based solution for elder-oriented fall prevention, and constructed a model of bidirectional EMG sensor network. A simple “call/reply” communication mechanism was imported, and the EMG data was proved to be contributing factors of a more precise detection and

prediction result.

Moreover, as future research, we plan to explore further the problems of fall pattern learning and recognition based on gathering more simulated data. We will also work at real data collection in hospitals. Further studies will be conducted in bridging the gap between simulated data and real data.

References

- 1) Abbate S, Avvenuti M, Corsini P, Light J and Vecchio A (2010) *Monitoring of Human Movements for Fall Detection and Activities Recognition in Elderly Care Using Wireless Sensor Network: a Survey, Wireless Sensor Networks : Application-Centric Design*. Merrett GV and Tan YK, eds., InTech, CA, USA.
- 2) The Japan Times (2015) "Shortage of nursing care workers". <http://www.japantimes.co.jp/opinion/2015/07/07/editorials/shortage-of-nursing-care-workers-2/>
- 3) Li Q, Stankovic JA, Hanson MA, Barth AT, Lach J and Zhou G (2009) Accurate, fast fall detection using gyroscopes and accelerometer-derived posture information. In: *The Proceedings of the 6th International Workshop on Wearable and Implantable Body Sensor Networks*. CA, USA. pp. 138-143.
- 4) Ghasemzadeh H, Jafari R and Prabhakaran B (2010) A body sensor network with electromyogram and inertial sensors: multimodal interpretation of muscular activities. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine - Special Section on Sffective and Pervasive Computing for Healthcare*. **14**: 198-206.
- 5) Pannurat N, Thiemjarus S and Nantajeewarawat E (2014) Automatic fall monitoring: A review. *Sensors* **14**: 12900-12936.
- 6) Yokota S and Ohe K (2016) Construction and evaluation of FiND, a fall risk prediction model of inpatients from nursing data. *Jap. J. Nurs. Sci.* **13**: 247-255.
- 7) Anyplace - A free and open Indoor Navigation Service with superb accuracy, <http://anyplace.cs.ucy.ac.cy/>.
- 8) Kenny RA, Scanail CN and McGrath M (2011) Intelligent technologies for bridging the grey digital divide. In: *Falls Prevention in the Home: Challenges for New Technologies*. Soar J, Swindell R and Tsong P, eds., IGI Global, Hershey, PA, USA. pp.46-64.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

MeV 級イオン照射による新しい SOI 構造形成法の研究 — 超高真空中における電子衝撃 (EB) 加熱型蒸着法による 非晶質 Si 層形成の検討 —

中田穰治^{1,4} 井上航大¹ 谷地田剛介¹ 栗田紳平² 斎藤保直¹
村下 達³ 星野 靖¹

Novel SOI Structure Formation Using MeV Ion Beam Irradiation
— Study of Amorphous Si Layer Deposition Using EB Evaporating
Method in The UHV Environment —

Jyoji Nakata^{1,4}, Kodai Inoue¹, Gosuke Yachida¹, Shimpei Kurita²,
Yasunao Saito¹, Toru Murashita³ and Yasushi Hoshino¹

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

² Oki data, Inc. 4-11-22 Shibaura, Minato-ku, Tokyo 108-8511, Japan

³ NTT Electronics Corporation 6700-2 To, Naka City, Ibaraki 311-0122, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: nakatj01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Amorphous Si layers have been formed on the crystalline (001) Si substrates in an Ultra-High-Vacuum (UHV) chamber using the sputtering method via electron bombardment. A study to realize amorphous Si layers has been planned in order to produce very clean interfaces between amorphous Si layers and the crystalline Si substrates. These clean interfaces without oxygen atoms originating from natural oxides make it possible for amorphous Si layers to crystallize two-dimensionally and epitaxially in a layer-by-layer form on the crystalline Si substrates. These will more easily induce lateral-solid-phase epitaxial growth of deposited amorphous Si layers on the SiO₂ film, leading to the formation of SOI (Si On Insulator) structures. Firstly, we deposited amorphous Si layers on the oxygen-free surface in the UHV environment, and investigated various deposition conditions. However, after annealing these deposited amorphous Si films under the various conditions, three-dimensional island crystal growth occurred. These experimental results were confirmed by the AFM (Atomic Force Microprobe) and RHEED (Reflection High Energy Electron Diffraction) measurement methods. This island crystalline formation may be partly due to impurity atoms with a mass number around 40 abundantly incorporated into the amorphous layers, which was confirmed by the RBS (Rutherford Backscattering Spectroscopy) measurement method. Three-dimensional island growth tends to occur during the surface migration of Si atoms around the impure atoms. Thus, we have not yet succeeded in forming impurity-free amorphous Si layers. We finally propose a novel deposition method using micro-wave plasma, aiming at obtaining a clean interface and achieving the growth of impurity-free amorphous Si layers.

Keywords: IBIEC, SOI, SIMOX, BOX clean-interface, amorphous Si, impurity-free, RHEED, STM, AFM, Microwave plasma

序論

本研究の目的は、パタン形成した SiO₂ 層を有する Si 基板上に非晶質 Si 層を堆積・熱処理後、MeV 級

イオン照射により SiO₂ 層上の非晶質 Si 層に広範囲なエピタキシャル (エピ) 成長が起こる照射条件、

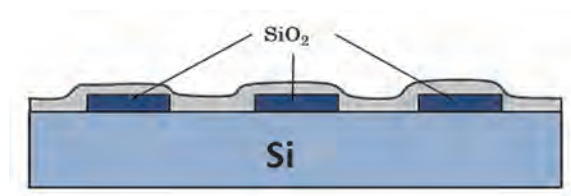


図 1. SOI 構造断面図.

成長機構を詳細に検討することである。また、バルクと SOI (Silicon on Insulator) 層が併存するパターン化された 2 次元ハイブリッド SOI 基板作製条件を明らかにすることである。これにより、Si 単結晶バルク層にメモリセル、SOI 層に入出力高速データ処理回路のハイブリッド構成が可能となる。図 1 に断面構造図を示す。

SOI 基板を形成する手法として従来 SIMOX^{1,2)} (Separation by IMplanted OXgen) 法と貼り合わせ法の 2 種類があった。SIMOX 技術は酸素イオン注入と超高温 (～ 1400℃) 熱処理により BOX (Buried Oxide) 層を形成する。貼り合わせ SOI 技術とともに有力な SOI 形成技術として位置付けられていた。

しかし、高ドースの酸素イオン注入に伴う SOI 層への欠陥導入と基板への微小リーク電流の原因となる BOX 層の微小穴の存在、及び BOX 層厚を一様にする条件を見出す困難さから一般的な SOI 構成法としては貼り合わせ SOI 技術にとって代わられてしまった。しかし、張り合わせ SOI 技術では 2 次元的に分離された SOI 層形成が困難である。超高速大容量メモリ製作を見通した時にはメモリセルと入出力処理回路を構成できるように分離された SOI 層を構成することは必須である。SIMOX 法はこの種の分離した SOI 層を形成できるが、現在まで上記した困難性からこの種の基板を作製できていない。

そこで、SIMOX 法でもなく、貼り合わせ法でもない全く新しい分離 BOX 層を形成する方法として、パターン化した SiO₂ 層上にバルク Si との界面が清浄な非晶質 Si 層を堆積した後、MeV 級イオン照射により SiO₂ 層上の非晶質 Si 層に、バルクから縦方向にエピ成長した Si 層を横方向にさらに広範囲に高速にエピ成長をさせる方法を提案する。この方法によれば SIMOX と異なり、ひずみや応力フリーな SOI 構造形成も可能になる。すなわち、高ドース酸素イオン注入に伴うひずみの導入が避けられる。

さて、図 1 においてパターン化された SiO₂ 上に非晶質 Si 層が CVD 法で堆積されている。この CVD 非晶質 Si 層は図 2(a) のように堆積されるが、その時、非晶質 Si 層と単結晶 Si 基板との界面が清浄でなければならない。そうでないと単原子層以下の厚さを持つ SiO₂ 自然酸化膜層があるだけでも通常の熱処理

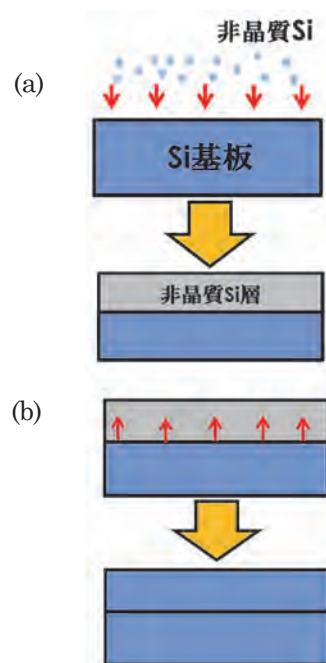


図 2. 非晶質 Si 層の堆積過程 (a) とその後の熱処理で 2 次元エピ単結晶化する過程 (b).

においては、図 2(b) に示すような 2 次元的な縦方向のエピ単結晶成長は全く起きないからである。

しかし、通常の熱処理ではなく、イオンビーム誘起結晶成長法 (IBIEC, Ion Beam Induced Epitaxial Crystallization) ではたとえ自然酸化膜が界面に存在しても、界面を乗り越えて縦方向に 2 次元エピ成長が起こる。

このことを図 3 に明確に示した³⁾。この図は非晶質層を CVD 法で単結晶 Si 基板上に堆積した (△) 後に 600℃ で 24 時間熱処理した (▲) 試料と 2.56 MeV の As イオンを～ 300℃ で 30 分程度照射する MeV 級イオンによる IBIEC で深さ方向に 2 次元エピ成長を起こさせた試料 (○) の RBS (Rutherford Backscattering Spectroscopy) チャネリングスペクトルである。この IBIEC は MeV 級イオンビーム照射で、非晶質 Si 層が非常に低温 (～ 300℃) で 2 次元エピ成長を引き起こす現象である。

図 3 において、600℃ 24 時間という長時間熱処理にも関わらず、全く単結晶化は進行していない³⁾。同じ試料を 2.6 MeV の As⁺ イオンを照射すると、わずか～ 300℃ 程度であっても、3.5 μA/4 cm² のドースレートで 1 × 10¹⁶/cm² の照射量 (時間的には 30 分程度) で大きく単結晶化が進行している。

このように、非晶質 Si 層は基板単結晶界面との間に自然酸化膜程度の酸素が存在しただけでも、通常の熱処理においては全くエピ成長が起こらない。

図 4 はこの IBIEC を 600 keV Kr を 350℃ において 2 × 10¹⁵/cm² 照射した同様な実験である^{4,5)}。

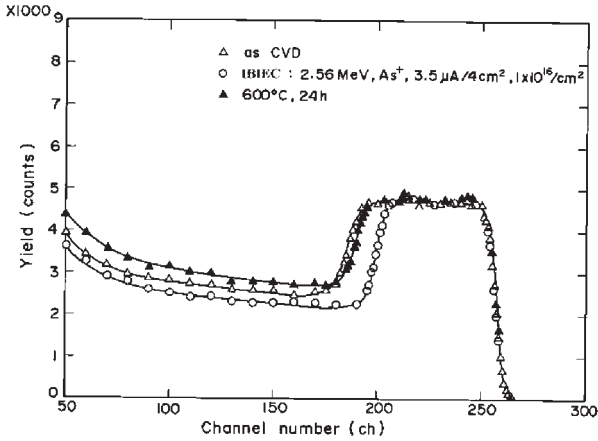


図 3. 堆積非晶質 Si 層の熱処理と IBIEC での単結晶化の違いを示す RBS チャネリングスペクトル。

図 4(a) の場合、通常の CVD 堆積プロセスで単結晶/非晶質 CVD 層の間に自然酸化膜程度の SiO₂ 層が残っている。その後界面を超えて As を注入して非晶質 Si 層の厚さを伸ばしている。この As 注入で界面に存在する O 原子をノックオンさせて O 原子を散らし、界面における O の体積濃度を減じている。しかし、上記 IBIEC 条件では界面をわずかに超えて、表面側に 2 次元エピ成長が進行しただけである。

ところが、図 4(b) の場合非晶質 Si 層を CVD 法ではなく、最初から図 4(a) と同じ条件で単結晶 Si 基

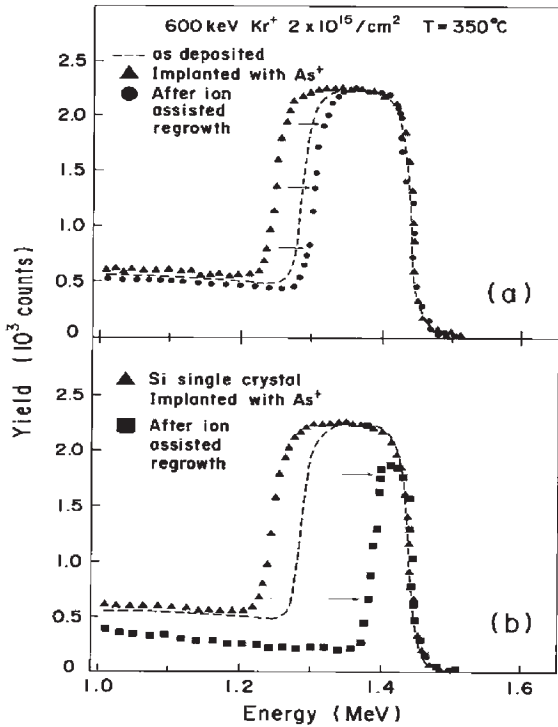


図 4. 堆積非晶質 Si 層界面にイオン注入で界面を超えて非晶質層を形成した後に IBIEC した試料 (a) とイオン注入のみで非晶質層を形成した試料 (b) を同条件で IBIEC した RBS チャネリングスペクトル。

板に As を注入して非晶質 Si 層を形成した場合、その後の 600 keV の IBIEC で著しく 2 次元のエピ成長が進行して表面近傍まで単結晶化が起きていることが明瞭に確認できる。即ち、非晶質 Si 層内部に何も O 原子が存在しない状況では IBIEC による結晶化の速度は大きいし、この場合は通常の熱処理だけでも、IBIEC と比較して高い成長温度は必要であるが、表面まで単結晶化が進むことは確認されている。

さらに CVD 法において単結晶基板に非晶質 Si 層を堆積する際に、界面に形成される自然酸化膜をあらかじめ 1000 °C 程度の温度で高温熱処理して自然酸化膜を除去した後に、温度を下げて通常の CVD 法で非晶質 Si 層を堆積させた。この手法は Clean CVD 法 (CCVD) と呼ばれる⁶⁾。この CCVD 法で堆積した非晶質 Si 層を 2.56 MeV の As イオンで MeV 級 IBIEC を行った RBS チャネリングスペクトルを図 5 に示す⁷⁻¹⁰⁾。

この場合、非晶質 Si 層内部にも界面にも O 原子が殆どないため、MeV 級 IBIEC⁷⁻¹⁰⁾ で 2 次元エピ成長が起きて表面まで結晶化が進行した。MeV 級 IBIEC は照射イオンの電子的非弾性散乱により図 4 に示した数百 keV (あるいはそれ以下) のエネルギー領域における IBIEC よりも非常に効率的にエピ成長が行われることが確認されている⁷⁻¹⁰⁾。次に CCVD 法と呼ばれる手法により非晶質 Si 層を、図 6 のようなパタン化された Si 酸化膜基板上に堆積させた。すると、基板単結晶と非晶質 Si 層との界面には酸素が殆どないので、パタン酸化膜との間にある非晶質 Si 層は通常の熱処理において縦方向に 2 次元エピ成長を起こして酸化膜の窓開き直上の表面まで単結晶化が進行することが期待される。

しかし、通常の熱処理だけでは横方向に即ち、パタン酸化膜上に堆積された非晶質 Si 層まで結晶化が

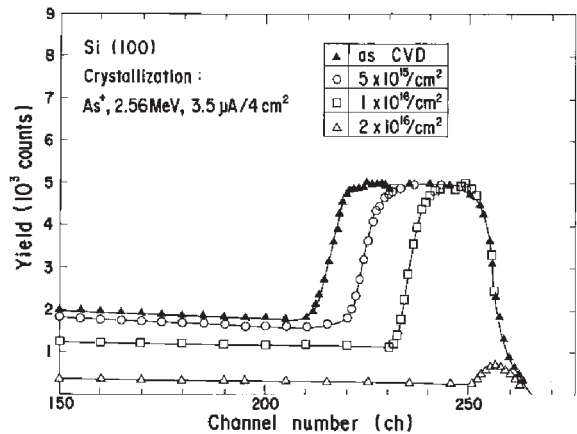


図 5. CCVD 法による特殊な製法で形成した堆積非晶質 Si 層が IBIEC で表面まで単結晶化したことを示す RBS チャネリングスペクトル。

及ぶことはないであろう。実際、このことは図7に示した RHEED パターン観察から確認された^{11,12)}。

図7は図6に示す具体的な数値の入ったパターン化された構造に対して熱処理と IBIEC を行った RHEED パターンである。(a)は SiO₂ 膜上に CCVD 法で堆積された非晶質 Si 層を 600 °C で 24 時間熱処理した後の RHEED パターンである。(b)はその後 ~ 300 °C 程度の温度 (2.56 MeV のエネルギーで 3.5 μA / 4 cm² の照射量率に相当する温度) で As を 1 × 10¹⁶ / cm² の照射した後の RHEED パターンである^{11,12)}。図7(a)において 600 °C 24 時間の熱処理にも関わらず、ほとんど完全なハローパターンが観測された。これは、600 °C、24 時間の熱処理においても図6に示す酸化膜上の非晶質 Si 層までは結晶化されなかった(すなわち横方向には殆ど結晶化が進行していない)

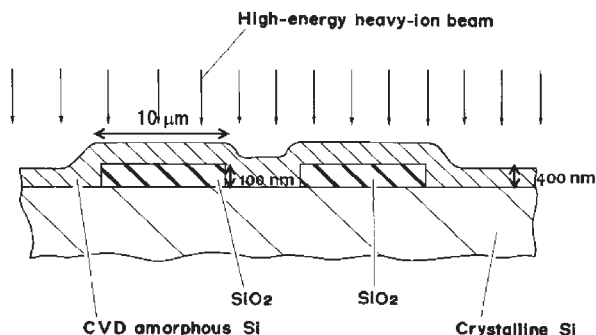


図6. パターン化された Si 酸化膜上に界面清浄な非晶質 Si 層を堆積した時の断面図。

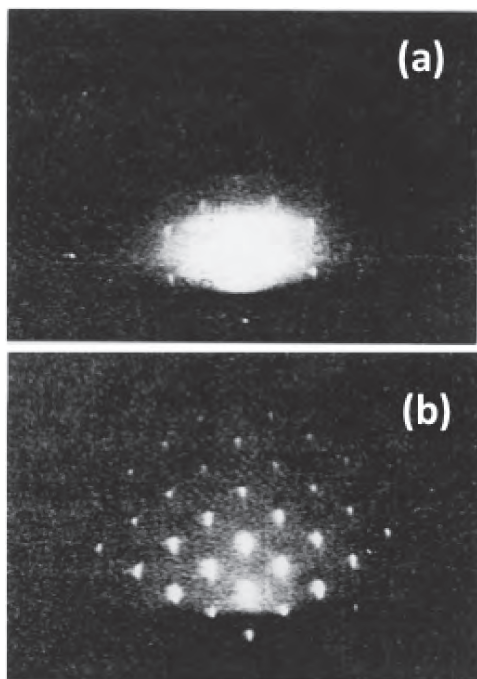


図7. 24 時間熱処理後 (a) とその後 ~ 300 °C、MeV 級イオン照射で IBIEC した後 (b) の RHEED パターン。

ことを意味する。何故なら、RHEED という観測手法は 20 keV 程度のエネルギーで加速された直径 100 μm 程度の電子ビームを図6の断面図において斜め左方向から試料表面に 2 ~ 3° のすれすれの角度で入射させ、散乱してくる電子ビームを蛍光板に当ててその散乱パターンから、試料表面の結晶性を測定する手段であるからである。即ち入射電子ビームはそのすれすれ角度から、縦方向に 2 次元成長を行った領域は酸化膜上に堆積された非晶質 Si 層の影になり、観測にかからなかった。横方向の単結晶化が進行しなかった酸化膜パターン上にある 10 μm の非晶質 Si 層領域のみを観測した。従って非晶質特有のハローパターンが観測されたのである。

しかし、24 時間の熱処理後に 2.56 MeV の IBIEC を ~ 300 °C で行なうと、酸化膜上の 10 μm に及ぶ広い領域まで横方向に単結晶化が起こり、図7(b)に示すスポットビームの RHEED パターンが現われた。

以上のことから IBIEC は広範囲な横方向エピ成長を促し、パターン化された SOI 構造形成において張り合わせ SOI あるいは SIMOX とは全く異なる手法による新しい SOI 構造形成手法として展開できる可能性がある。

材料と方法

超高真空電子衝撃 (EB) 加熱型蒸着法の検討

序論において述べたように、非晶質 Si に対して IBIEC を利用した横方向エピ成長を促すために前章で示した CCVD 法が有効であるが、当研究室の装置的な制約から、新たに STM 用超高真空装置を活用した電子ビーム蒸着装置を取り付けた。その立ち上げと非晶質 Si 層の堆積及び非晶質 Si 層の分析や解析を行った。その経緯を以下に示す。

超高真空 EB 蒸着装置の組上げと原理

真空中で物質を加熱する方法には、抵抗加熱法、電子衝撃加熱法などがある。一般に知られる抵抗加熱法は、蒸着材料を接触させた抵抗線に電流を流し、加熱して蒸着材料を熔融し、試料上に堆積させる方法である。しかし、抵抗材料の薄膜中への混入、蒸発原材料の融点による制約等の問題がある。これらの問題を避けるため、本実験では電子衝撃加熱法を用いた。電子衝撃加熱法とは、フィラメントに電流を流し、加熱させ熱電子を発生させる (図8参照)。それを +1 kV 程度の高電圧で加速し、蒸着材料を入れたるつばに照射して加熱して材料を蒸発させる仕組みとなっている。蒸発した材料は蒸発源の上部に置いた基板に堆積され薄膜を形成する。これより、抵抗加熱法での課題であった抵抗材料の混入、蒸発

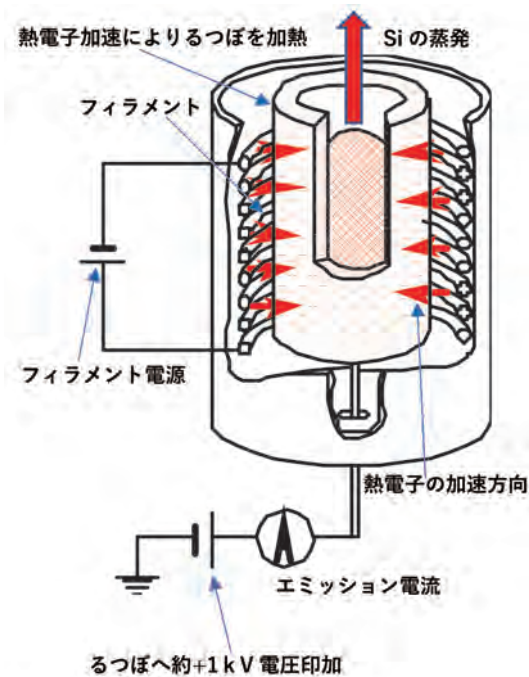


図 8. 電子衝撃によりるつぼを加熱して中に入っている Si を蒸発させる蒸着装置の構造図。

原材料の融点による制約が解消される。なお課題として、大面積単位での蒸着が困難な点が挙げられる。

本実験では、1 mm × 1 mm 程度に砕いた Si を図 8 に示した装置中心部にのるつぼへ挿入する。EB 衝撃によりるつぼ内 Si を融解させて蒸着実験を行う。本蒸着装置は電子衝撃加熱法を用いてるつぼを高温している。タングステンフィラメントに電流を流して発生した熱電子は電場により加速されてるつぼに衝突する。そしてるつぼを加熱し、中に入っている Si を蒸発させる。蒸発した Si は、装置上方に設置した Si 基板に堆積して非晶質 Si 膜を形成する。

図 9 に示すように、光 STM 真空一貫プロセス装置に 2 種類の EB 蒸着装置を取り付けた。一つは Co 蒸着用、もう一方は Si 蒸着用である。一般的な蒸着実験では、蒸着基板のすぐそばに水晶振動子を利用した膜厚測定装置を配置し、堆積量（蒸着量）の変化を確認しながら蒸着を行う。しかし図 10 に示すように、構造上試料台と膜厚計の同時稼動が不可能なので、先ず膜厚計（水晶振動子）へ蒸着した後、堆積量を推定し、Si 基板上へ非晶質 Si 層を蒸着する。

図 10 のるつぼから蒸着用 Si を蒸発させ、上方の試料台に設置した Si 基板に堆積させる。このプロセスを図 11 に示す。単結晶 Si 基板に対しさまざまな堆積時間で非晶質 Si 層を堆積し、その量を RBS 分析して堆積量の時間依存性を調べる。そして約 20 nm の非晶質 Si 膜厚形成に最適な堆積時間を決定する。膜厚計と試料台の同時稼動が不可能であるため、

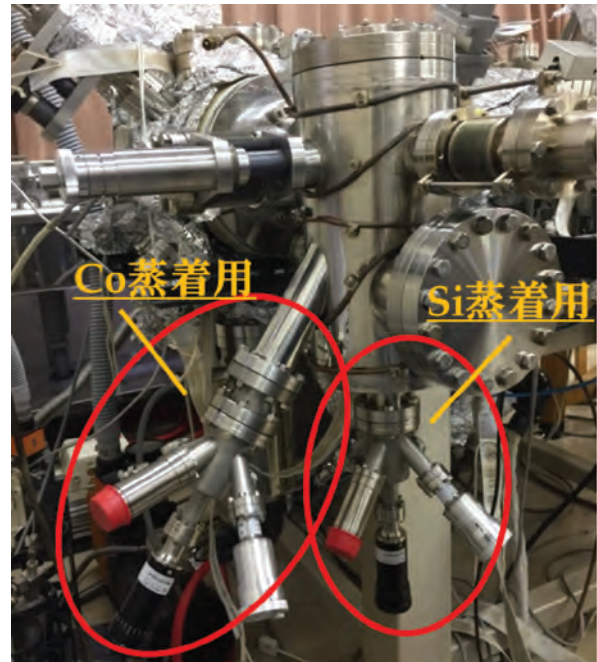


図 9. 超高真空装置に組み込まれた EB 蒸着装置。

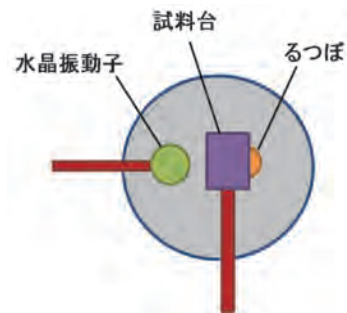


図 10. るつぼと蒸着させる基板を置く試料台、および膜厚測定用水晶振動子の位置関係（上から見た図）。

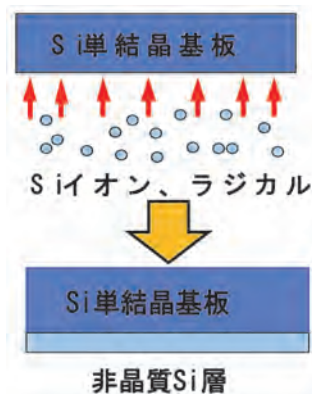


図 11. 単結晶 Si 基板への非晶質 Si 層の堆積。

まず膜厚計のみを用いて堆積する。堆積速度推定後に、実際に Si 単結晶基板へ非晶質 Si 層を堆積する。堆積時間は 500, 1000, 2000 s で、RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) 評価から、約 20 nm の膜厚形成に適当な堆積条件を明らかにする。

超高真空 EB 蒸着条件の決定

蒸着装置による Si 融解

上記で述べたように、るつぼ内にある蒸着用 Si 片は 1 mm × 1 mm 程度に砕かれた状態で敷き詰められている。るつぼからの熱損失を抑え、なおかつ不純物の混入を防ぐためには、るつぼ内の蒸着用 Si を一度融解させる必要がある。Si の融解はエミッション電流の制御でるつぼの温度を上げ、上部の窓より目視で Si 融解の確認をした。表 1 に結果を示す。

表 1. るつぼ内 Si 融解のための各種パラメータ設定条件

Filament (A)	Emission (mA)	HV (V)	Temp (°C)	真空度 (×10 ⁻⁸ Torr)
0	0	1000	—	3.2
7	30	1000	—	—
7	35	1000	1100	52
7	40	1000	1250	60
7	45	1000	—	65
7	50	1000	—	83
7	50	1100	1400	120

目視による観察から、Filament:7 A Emission:50 mA、HV:1100 V において蒸着用 Si の融解が観察された。放射温度計を用い温度測定を行った結果、るつぼの温度は約 1400 °C であった。一般に Si 融点は 1414 °C であることから、上記の条件において Si 融解が起こったと結論づけた。

水晶振動子膜厚計による堆積レート測定

蒸着装置の各パラメータと蒸着量の関係を推定するため、膜厚計による蒸着レート測定を行った。先に述べたように、真空一貫プロセス装置の設計上、試料台と膜厚計の同時蒸着が不可能であるため、膜厚計による蒸着量推定の後、Si 基板への蒸着を行う。装置取扱説明書の参考データより、初期条件を Filament:7.1 A Emission:15 mA HV:1400 V と設定した。以降 Emission 電流を 5 mA ずつ上昇させ、その時の蒸着レートを膜厚計で観察した。表 2 に結果を示す。前出の通り、本実験で目標とする膜厚は約 20 nm である。従って、上記の実験結果を参考に、Si 基板への非晶質 Si 堆積実験の各パラメータは表 3 の通りと推定した。

ただし、水晶振動子設置を手动・目視によって行ったことによる中心からのズレ、試料台が水晶振動子の設置箇所から数センチ程度上方に配置されていることなどから、実際の試料台への蒸着実験では水晶振動子による推定量から減少することが予想され

表 2. 蒸着実験による堆積レート測定結果

Filament (A)	Emission (mA)	HV (V)	Temp (°C)	RATE (Å/sec)
7.1	15	1400	1100	0
7.1	20	1400	1160	0
7.1	25	1400	1255	0
7.1	30	1400	1310	0.1
7.1	35	1400	1375	0.1
7.1	40	1400	1430	0.3

表 3. 非晶質 Si 堆積に向けた実験条件

Filament (A)	Emission (mA)	HV (V)	RATE (Å/sec)	蒸着時間 (min)
7.1	40	1400	0.3	9

る。よって、Si 基板へ非晶質 Si を蒸着する本実験での実験条件と実際に必要となる蒸着時間および蒸着量は若干異なることが予想される。

RBS による堆積量解析

水晶振動子による膜厚計での測定結果から、実際に Si 基板に非晶質 Si 層の蒸着を行い、蒸着量の RBS 法による精密測定を行った。前章で述べたように、実際の蒸着位置と膜厚計による測定位置に誤差があるので、蒸着装置条件、蒸着時間の詳細な条件を決定する必要がある。本実験では蒸着の際の Filament 電流、Emission 電流、ハースとるつぼの間の加速電圧の条件はそのままに、蒸着時間を変えて蒸着を行った。蒸着量の精密測定法として RBS によるスペクトル解析を行った。非晶質 Si 層の堆積条件を表 4 に示す。

表 4. 非晶質 Si 蒸着堆積条件

Filament 電流 (A)	Emission 電流 (mA)	HV (V)	蒸着時間 (sec)
7.1	40	1400	500
			1000
			2000

図 12 に RBS によるチャネリング及びランダムスペクトルを示す。いずれのスペクトルも RBS の測定条件は入射イオン ¹⁰B でエネルギーは 2.53 MeV、入射角 0°、散乱角 160° である。横軸のチャンネル番号は 160° 方向に散乱されてきた ¹⁰B のエネルギーであり、縦軸はそのエネルギーを保持している ¹⁰B の収率 (カウント数) である。1 ch 当たりのエネル

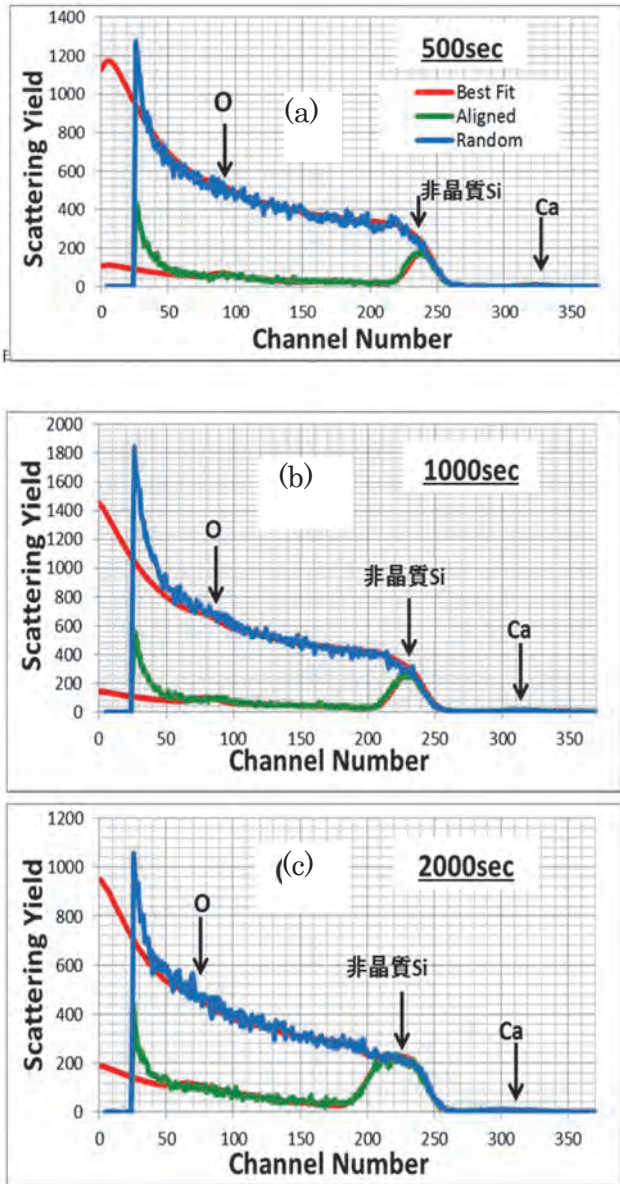


図 12. 表 4 に示す 3 通りの成長時間で堆積した直後の RBS チャネリングスペクトル. (a) 500 sec, (b) 1000 sec, (c) 2000 sec.

ギーは～ 4 keV である。

図中赤色の線は Si の面密度を仮定して測定結果と best fit するようにしたシミュレーションの結果である。青色のランダムスペクトルと、緑色のアラインドスペクトルの非晶質 Si 層部分の収率が一致しており、非晶質 Si 層が形成されていることが確認できた。

この非晶質 Si 層のエネルギー幅から蒸着量（非晶質 Si 層の厚さ）の算出を行う。図中のスペクトルには不純物として非晶質 Si 層の中に取り込まれているのが Ca のような質量数約 40 の元素である場合、そのピークが測定されるエネルギーの位置、また非晶質 Si 層が堆積される際に取り込まれたと思われる O 原子のエネルギー位置も矢印で示した。蒸着実験の実施前後において真空度の向上が観察されたことから、蒸着装置本体に酸素化合物が付着し、蒸着実験を繰り返すことで次第に酸素混入は防げると考えられる。カルシウムの発生源推定も含めて不純物混入について更に検討の必要がある。

この図 12 から 500 sec の堆積では約 5.7 nm の非晶質 Si 堆積が確認された。前節での水晶振動子での堆積条件と比較して若干異なるが、誤差の範囲と解釈できる。1000 sec 蒸着では約 8.8 nm、2000 sec 蒸着では約 22.5 nm の膜厚が確認された。本研究で目標とする膜厚は約 20 nm である。以上の実験結果から、2000 sec 前後での非晶質 Si 蒸着が適当であると結論づけた。

図 13 に図 12 のチャネリングスペクトルから算出した非晶質 Si 層の蒸着量（厚さ）の堆積時間依存性のグラフを示す。単結晶 Si 基板に堆積された非晶質 Si 層の膜厚は、非晶質 Si 層のアラインドスペクトルのエネルギー幅から測定条件の各種パラメータを導入して計算できる。その結果、厚さを堆積時間に対してプロットすると、図 13 からほぼ線形に増加していることが確認できた。

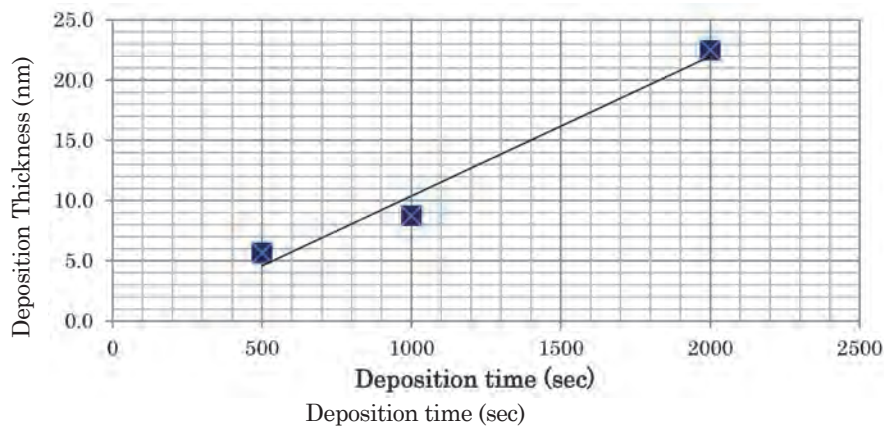


図 13. 最適な堆積条件で得られた非晶質 Si 層厚さの堆積時間依存性を示す図.

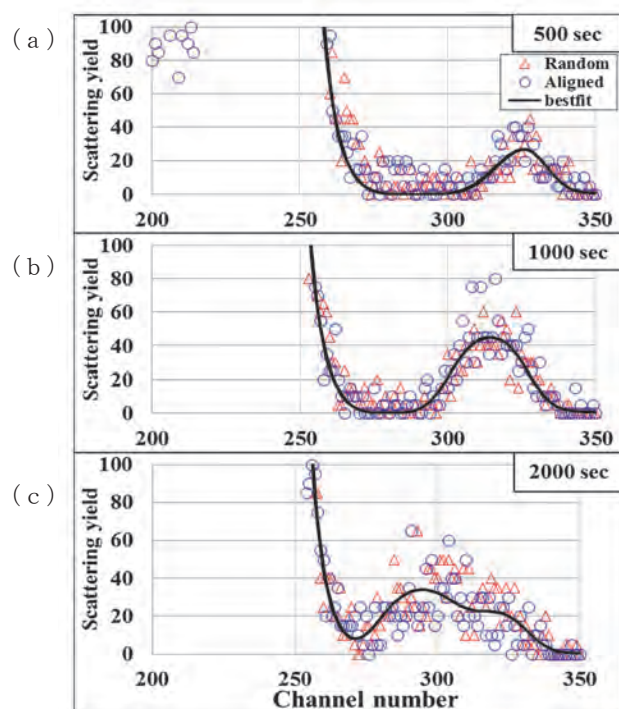


図 14. 図 12 の RBS スペクトルにおいて質量数 40 程度の元素を表わす 300 ch 付近の拡大スペクトル. 堆積時間 500 sec (a), 1000 sec (b), 2000 sec (c).

図 14 に、図 12 の RBS スペクトルにおける 300 ch 付近の拡大図を示す。この図に示すように、RBS スペクトル解析から、Si 非晶質層への質量数 40 程度の不純物元素の混入が確認された。非晶質 Si 層中にカルシウム (Ca) とと思われる不純物が (~2 atoms%)、また酸素が一様に混入していることが確認された。Q-mass による装置内元素推定から、真空雰囲気中に H₂O の混入が確認されている。

結果

超高真空 EB 蒸着法で堆積した非晶質 Si 層の熱処理による結晶化条件の検討

RHEED による表面結晶性の評価

前章で得られた最適な EB 蒸着条件を用いて、自然酸化膜を除去した清浄表面を持つ Si(001) 基板に非晶質 Si 層を堆積し、各種温度・時間で加熱処理する。そして非晶質 Si 層の単結晶化の程度を RHEED 回折パターンから観察した。RHEED 像は化学処理による表面洗浄後の Si 基板、非晶質 Si 堆積直後の面、800°C・10~30 min 加熱後の面、800°C・180min 加熱後の面、1000°C・10 min 加熱後の面について観察したが、図 16 には 800°C・10~30 min 加熱後の面を除いて示した。

図 15 に単結晶 Si 基板上に非晶質 Si 層を堆積した後、各種熱処理を行い縦方向に 2 次元エピ成長が

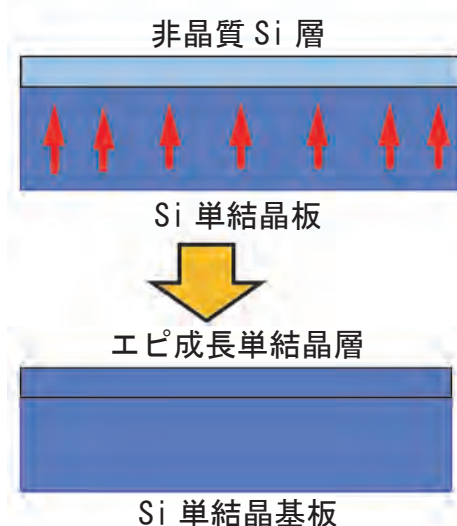


図 15. 加熱処理による非晶質 Si の再結晶化過程.

起こる様子を示した。実際に成長した層が 2 次元エピ成長を起こしたのかどうかを、次に RHEED で観察した結果を示す。

図 16(a) に酸化膜除去後の Si(001) 基板回折パターンを示す。2 次元平面単結晶 2 × 1 パターンが確認できることから、表面が清浄になっていることが確認できた。前章で詳細に説明した電子ビーム蒸着装置を用いてこの清浄表面に非晶質 Si 層を約 20 nm 堆積した。この試料に対して図には示していないが RHEED 観察をしたところ、Halo パターンとなった。従って、非晶質 Si が蒸着されていることが分かる。同様に図には示されていないが、800°C・10~30 min 加熱処理をした試料に対する RHEED 観察でも、単結晶 Si の回折パターンは観察できなかった。これらの観察結果からより、800°C・10~30 min 加熱処理条件において非晶質 Si の再結晶化は起こらなかった。そこで、加熱時間を 180 min に増やし RHEED 観察を行った。

図 16(b) に 800°C・180 min 加熱による RHEED 像を示す。RHEED 像から、単結晶 Si の回折パターンがうっすらと確認できることから、非晶質 Si が再結晶化されたことが分かるが、明瞭ではない。

図 16(c) に、1000°C・10 min 加熱による RHEED 像を示す。RHEED 像から、単結晶 Si の回折パターンが明瞭に確認できることから、非晶質 Si の再結晶化が達成されたことが分かる。このように加熱温度と加熱時間を増加させることにより非晶質 Si 層が結晶化することが確認できた。

しかし、図 16(b)、(c) より、これらは RHEED パターンではなく微結晶を透過した電子ビームが回折を起こす透過回折パターンであることが分かった。従って、基板表面に 3 次元 Si 構造 (島状成長した結晶)

が形成されたことが考えられる。このことを確認するために RHEED(b), (c) 試料表面の AFM 観察を行った。

AFM による表面形状評価

そこで次に加熱条件による基板表面形状変化を調べるため、RHEED 観察した図 16 (b), (c) の試料に対して AFM による表面形状の観察を行った。

図 17b に 800°C・180 min、17(c) に 1000°C・10

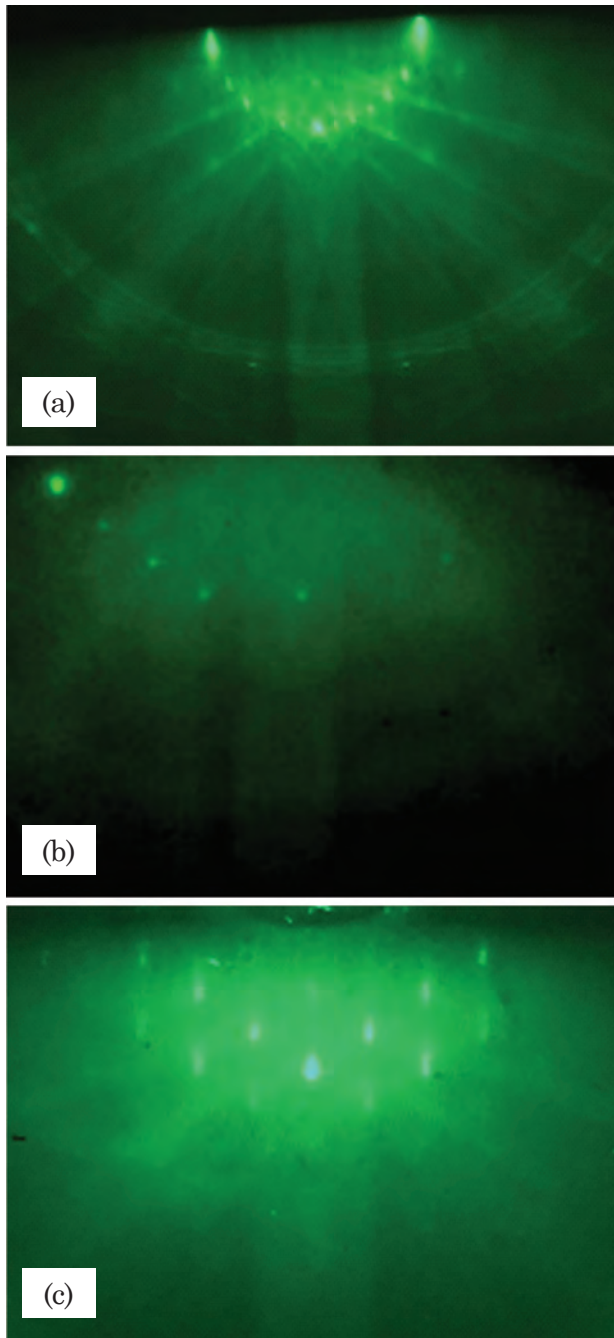


図 16. 非晶質 Si 層堆積前かつ単結晶 Si 基板の表面酸化膜除去後の清浄表面 (a) と、非晶質 Si 層堆積後 800°C・180 min 加熱後の試料表面 (b) と、非晶質 Si 層堆積後 1000°C・10 min 加熱後の試料表面 (c) の RHEED パタン。

min 加熱した試料に対する AFM による表面解析結果を示す。図 17 より、どちらにも表面形状に高さ 50 nm、幅 100 nm 程度の突起が確認できた。このことから、800°C・180 min、及び 1000°C・10 min の加熱処理では、蒸着された Si が島状 3 次元成長したことが分かる。RHEED においても透過結晶パタンが観察できたことから、AFM で観察された 3 次元 Si 島は結晶性を持つことが示唆される。また Si 島の数は、加熱時間が長いほど多くなることが分かる。これは Si の表面マイグレーションにより島状成長が進んだためと考えられるが、温度依存性も含め今後検討する必要がある。

討論

単結晶 Si 基板上に EB 蒸着法により堆積された非晶質 Si 層の最適な堆積条件を前章において検討した。また、堆積した非晶質 Si 層を加熱処理した後の結晶性の回復の様子を RHEED, AFM により評価した。まず、RBS チャネリングスペクトルの結果から蒸着直後に非晶質 Si 層が形成されているが、同時に質量数 40 程度の不純物が検出された。この不純物が果たして Ca 元素であるかどうかはまだ確定できないが、もしそうであれば蒸発したるつぼの成分が検出された可能性も否定できない。また、可能性としては低い空気中に微量に含まれる Ar 元素が EB 蒸着堆積中に非晶質 Si 層に取り込まれたのかもしれない。いずれにしろ、この不純物が存在することが、その後の加熱処理による 2 次元エピタキシャル成長を著しく阻害する要因になりかねない。

実際、前章における RHEED 及び AFM の測定結果により非晶質 Si 層が 3 次元の島状単結晶成長をしている。このことは非晶質 Si 層内の不純物を核にして結晶成長が起きている可能性を示唆している。

いずれにしろ、たとえ高真空 EB 蒸着法により、単結晶 Si 基板と非晶質 Si 層界面との間で自然酸化膜等に起因する O 不純物原子が残留しなくても、堆積層中に不純物元素が取り込まれている限り、2 次元の layer-by-layer の単結晶成長は困難のように思える。

今後の予定

以上の結果を踏まえ、今後とも非晶質 Si 層の 3 次元島状結晶成長から脱却できない場合も想定し、主に高品質ダイヤモンド薄膜のエピ成長やカーボンナノチューブ成長に使用していた μ 波プラズマ CVD 装置を改良することを早急に考える。

この装置は従来 CH_4/H_2 ガスを流して試料ホルダーに μ 波を投入し、メタン原子を分解して C ラジ

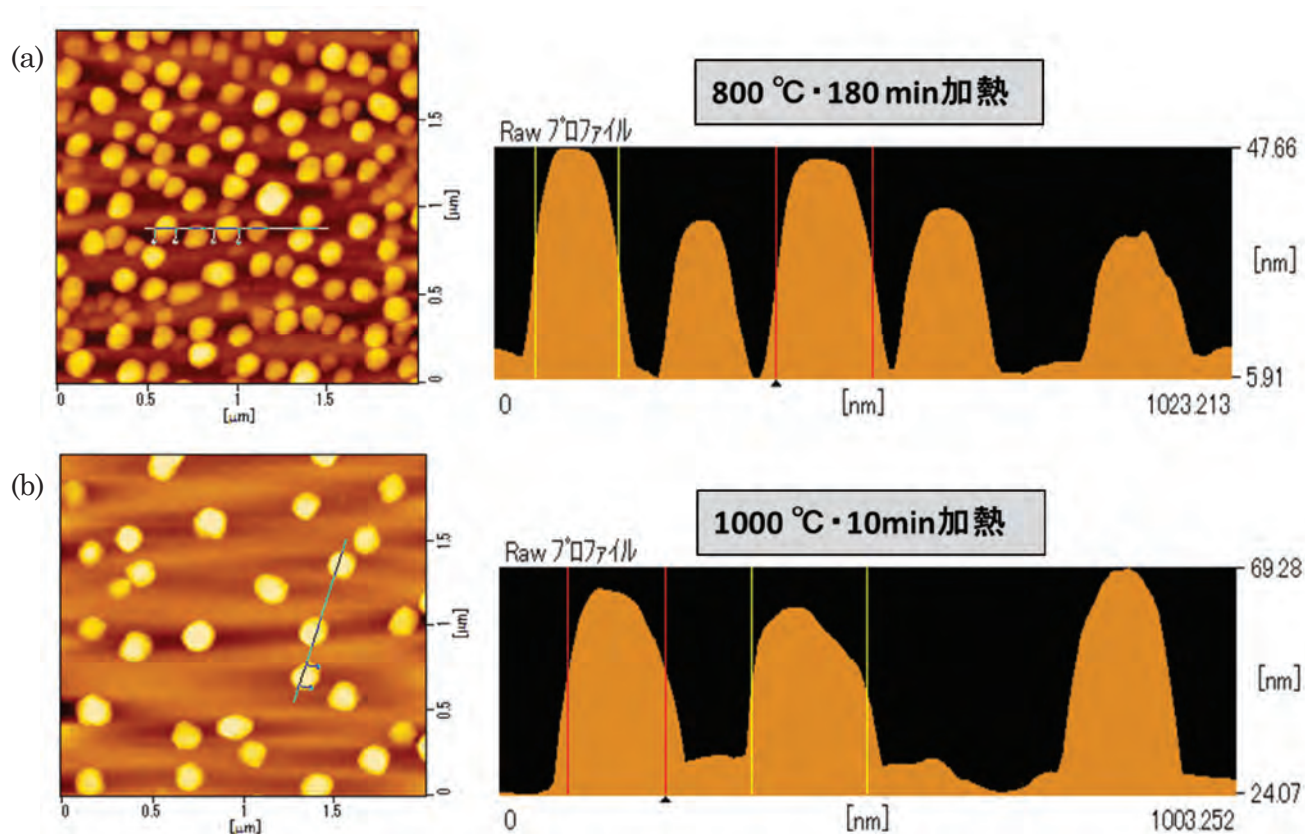


図 17. EB 衝撃の加熱により蒸発した Si が堆積した後に、800 °C · 180 min : (a)、1000 °C · 10 min : (b) の熱処理をした。その試料表面を AFM 観察した表面モフォロジー画像。

カルや C イオンを形成し、ダイヤモンド薄膜やカーボンナノチューブを堆積させる通常の μ 波プラズマ CVD 装置であった。本来高品質ダイヤモンド薄膜を非常に高速で成長させる (\sim 数十 $\mu\text{m}/\text{h}$) ことを目的にチャンバー構造を改良することを考慮していた。しかし、Ar ガス等を流して μ 波プラズマを利用して Ar イオンやラジカルを形成し、それをスパッタリングターゲット試料に -1 kV 程度の電界で加速させる。そして、ターゲット原子 (Si や C 等) をスパッタさせ、ターゲットとは反対方向に設置する試料台 (800 °C 程度にまで加熱する機構を設け、温度による界面状態の制御や温度計測可能な機構にする) に導く。この試料台はターゲットに近づけたり遠ざけたりする移動機構を備えた構造にし、試料への蒸着レートを制御できるようにする。そしてこれらスパッタ CVD の機構は高速でダイヤモンド薄膜を CVD で堆積するのは別のアタッチメント構造で取り付ける形式にする。

これを使えば通常の高品質ダイヤモンド薄膜の高速成長やカーボンナノチューブの高速成長だけでなく、温度を制御した形で任意の基板表面に非晶質 Si 層や非晶質 C 膜等をスパッタ蒸着できるようになる。

謝辞

本研究は 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201602) を受けて行った。記して感謝する。

文献

- 1) Izumi K, Doken M and Ariyoshi H (1978) C.M.O.S. devices fabricated on buried SiO_2 layers formed by oxygen implantation into silicon. *Electronics Lett.* **14** :593-594
- 2) 中島定夫 (1993) 酸素イオン注入法により形成した埋め込み酸化膜を有する半導体基板の研究. *D.Tec. thesis, University of Toyohashi Institute of Technology and Science.* Japan.
- 3) 中田穰治 (1990) 交エネルギー重イオン照射による非晶質 Si の低温単結晶化の研究. *D.Sci. thesis, University of Tokyo.* Japan.
- 4) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam-induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon. *Mater. Sci. Rep.* **5** :321-379.
- 5) Priolo F, Spinella C and Rimini E (1990) Phenomenological description of ion-beam-induced epitaxial crystallization of amorphous silicon. *Phys. Rev. B.* **41** :5235-5242.
- 6) 国井泰夫 (1988) 堆積非晶質 Si の横方向固相エピタキシャル成長の研究. *D.Tec. thesis, University of Tokyo Institute of Technology.* Japan.
- 7) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temper-

- ature crystallization of amorphous Si by high energy ion beam. *Appl. Phys. Lett.* **40** : 686-688.
- 8) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature ($\leq 300^{\circ}\text{C}$) crystallization and amorphization for the amorphous Si layer on the crystalline Si substrate by high-energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev. B* **43** :14643-14668.
 - 9) Nakata J (1997) Enhanced crystallization of amorphous Si containing hydrogen without oxygen during ion-beam irradiation at 310°C and during furnace annealing below 450°C . *J. Appl. Phys.* **82** :5433-5445.
 - 10) Nakata J (1997) Epitaxial crystallization during 600°C furnace annealing of amorphous Si layer deposited by low-pressure chemical-vapor-deposition and irradiated with 1-MeV Xe-ions. *J. Appl. Phys.* **82** :5446-5459.
 - 11) 日本国特許第 1316930 号
 - 12) 日本国特許第 1683801 号

■原 著■ 2016 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 SiGe 及び SiC を用いた赤外 / 可視域 EL 素子の研究

水野智久¹ 青木 孝¹ 鮫島俊之²

Experimental Study on EL Device in Visible/IR Regions
Using Two-Dimensional SiGe and SiC Layers

Tomohisa Mizuno¹, Takashi Aoki¹ and Toshiyuki Sameshima²

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

² Department of Electrical and Electronic Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture/Technology, Bunkyo-ku, Tokyo 184-8588, Japan.

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

Abstract: We experimentally studied the material structures and photoluminescence (PL) characteristics of two/three-dimensional (2D/3D) silicon carbon alloys $\text{Si}_{1-Y}\text{C}_Y$ with a maximum Y of 0.25 for a Si-based photonic device, using hot C^+ ion implantation into the (100) silicon-on-insulator (SOI) substrate. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) confirmed the approximately 2-nm-thick C-atom segregation formation at both surface-oxide (SOX)/Si and buried-oxide (BOX)/Si interfaces. In the C segregation layers, corrector-spherical aberration transmission electron microscopy (CSTEM) and high-angle annular-dark-field scanning TEM (HAADF-STEM) showed that 3C-SiC areas were partially formed. As a result, we experimentally confirmed photoluminescence (PL) from the local C segregation layers in a wide range of near-UV/visible regions, which is probably attributable to the large band structure modulation in the C segregation layer. The PL spectrum can be well fitted by three curves with a different PL peak energy E_{PH} . The PL intensity I_{PL} of 2D- $\text{Si}_{1-Y}\text{C}_Y$ markedly increased with increasing Y . However, E_{PH} was mostly independent of the SOI thickness. Consequently, the $\text{Si}_{1-Y}\text{C}_Y$ technique is very promising for novel E_G engineering of future high-performance CMOS and Si-based photonic devices.

Keywords: silicon-carbon, 3C-SiC, photoluminescence, Si-based photonics, quantum confinement effects, band structure modulation, carbon-ion implantation, 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²⁾ に広く応用されている。SOI 素子においては、Si 膜厚 $d_s = L_{EFF}/3$ (L_{EFF} は素子のチャネル長) に従って薄膜化するだけで短チャネル効果を抑制でき、その結果、SOI 素子は将来素子としても非常に有望と言われている³⁾。しかし、 d_s の薄膜化を続けると Si 格子定数程度まで薄膜化が進み、SOI は 2D-Si 構造となり、現在の 3D-Si とは物性が異なってくる³⁻¹⁰⁾。従って、将来素子の特性を予測するには、2D-Si 構造の物性を解明する必要がある。また、高速 CMOS

素子実現には、(110) 面 CMOS や歪み Si 構造などの研究も進められている¹⁾。

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

度の劣化も予想されている⁵⁾。

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

しかし、可視域から近紫外までの PL 発光を目指すには、更なる E_G の増大が必須である。そこで、2D-Si_{1-y}C_y 構造を C ホットイオン注入法を用いて作製し、その大きな PL 発光を実証してきた^{15,16)}。

本報告においては、発光層である Si_{1-y}C_y の主に構造解析により 3C-SiC 形成の確認と、近紫外域での PL 発光現象の実証を行ったので報告する¹⁷⁾。

材料と方法

2D-Si_{1-y}C_y の形成法

(100)2D-Si_{1-y}C_y は、図 1 に示すように、膜厚 55nm の (100)SOI 基板を酸化法によって薄膜化後 (1-(a))、¹²C⁺ホットイオン注入を基板温度 900°C で行った後に (1-(b))、酸化法により半導体層を薄膜化することにより作製した (1-(c))¹⁵⁾。今回は、図 1-(a) の Si 膜厚を 20 nm と 8 nm の二種類の SOI にそれぞれ ¹²C⁺ホットイオン注入を行った。¹²C⁺イオンエネルギーは 32keV、 Y は ¹²C イオンドーズ D_C (ドーズ量は 5×10^{12} から $4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$) により制御した。また、 d_s 値は図 1-(c) の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⁾。本研究においては $0.4 \leq d_s \leq 22 \text{ nm}$ 、原子層数 N_L ($\equiv d_s/d+1$, d は原子層間隔で、(100) では 0.136 nm) に換算すると $4 \leq N_L \leq 148$ を実現した。

フォノン評価用 UV-Raman 分光、及びバンド構造評価用の PL 特性は波長 325 nm レーザ光を用いた。レーザビーム径は 1 μm 、レーザパワーは約 1 mW である。

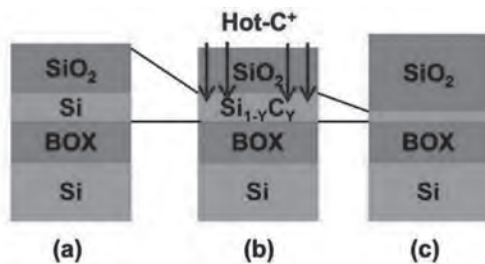


図 1. Si_{1-y}C_y の形成方法. 40 nm まで薄膜化 (a) 後、C⁺ のホットイオン注入 (b)、その後の酸化法による薄膜化 (c) を行う。

Si_{1-y}C_y 層の構造解析

図 2(a) に XPS (X 線光電子分光) の C1s スペクトル解析による SOI 膜厚 22 nm の Si-C 結合及び C-C 結合での C 原子濃度深さ分布を示す。SOX 及び BOX 界面に C 濃度のピークがあり、C 原子が界面に偏析しているのがわかる。更に、一部の C 原子が酸化膜中に析出している。その結果、界面での最大 Y は 0.2 以上に達した。図 2(b) は、BOX 界面でのピーク Y 、及び C 析出濃度の D_C 依存性である。両者とも、 D_C に比例しているのが判明し、 Y は D_C により制御できることがわかった。

一方、図 3(a) に BOX 界面付近の C 偏析領域の断面 CSTEM (球面収差補正 TEM) 写真を示す。Si 層とは明らかに違う小さな格子スポット (丸内) が見られ、しかし、その配列は Si 原子と同じである。従って、C 偏析層の結晶構造は立方晶である。また、図 3(b) に FFT 法 (高速フーリエ変換) により求めた電子線回折 (ED) パターンを示す。明らかに (220) 面の d 値 (面間隔) が、Si の d 値より約 20% ($\equiv \Delta d/d$) も小さくなっているのがわかる。この d の低下は、3C-SiC の格子定数 ($\equiv 0.436 \text{ nm}$) が Si 値 (\equiv

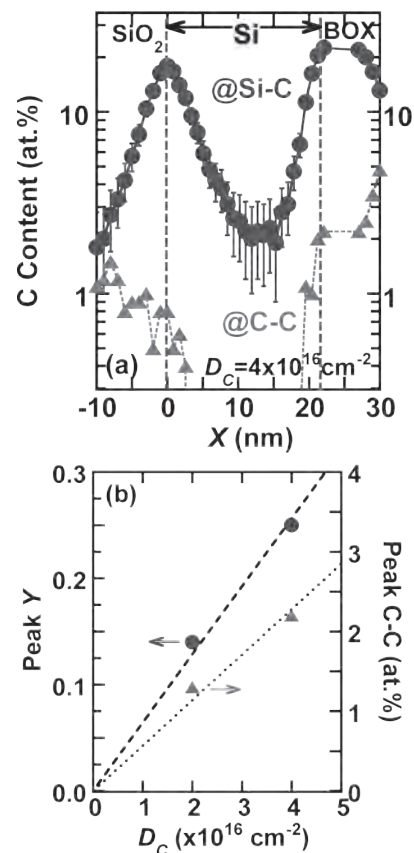


図 2. (a) XPS (C1s) により求めた C 濃度深さ分布. 丸及び三角は、それぞれ Si-C (●), 及び C-C 結合 (▲) の C 濃度を表す. (b) BOX 界面でのピーク Y (左軸) 及び C-C 結合濃度 (右軸) の D_C 依存性. $d_s = 22 \text{ nm}$, $D_C = 4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$.

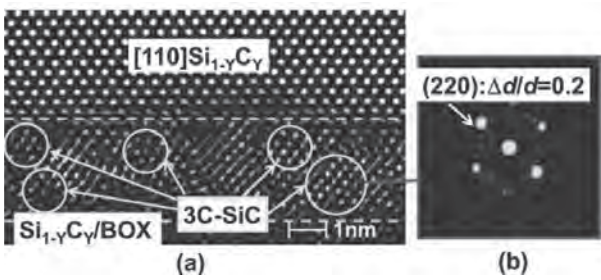


図 3. (a)BOX 界面付近の C 偏析領域の断面 CSTEM 写真. 丸印内は 3C-SiC である. (b)FFT より求めた 3C-SiC 電子線回折. $d_s=22 \text{ nm}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$.

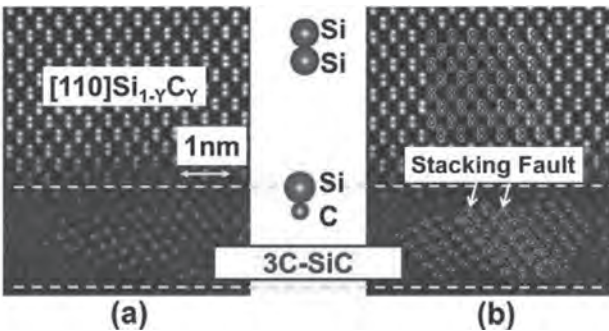


図 4. (a)BOX 界面付近の C 偏析領域の断面 HAADF-STEM 写真での原子配列. (b)図 (a)に Si 及び C 原子模式配列の重ね図. $d_s=22 \text{ nm}$, $D_c=4 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$.

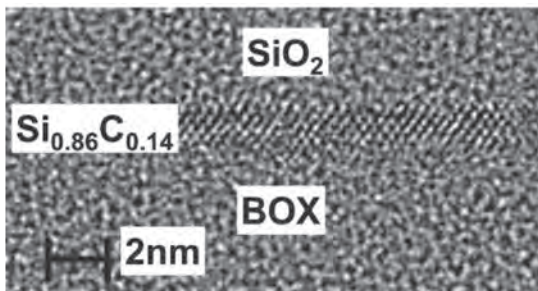


図 5. 0.8 nm $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層の断面 CSTEM 写真. $D_c=2 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$

0.543 nm) より約 20%小さいことに対応しており¹⁷⁾, 図 3(a) の C 偏析領域が 3C-SiC である証拠の一つである。

更に、図 4 は C 偏析領域の HAADF-STEM (高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡) 観測による原子配列である。Si 層の典型的な Si 原子対に対し、C 偏析領域は、原子対は見られず Si 原子と C 原子 (C 原子は小さすぎて観測不能) の原子対と思われる。しかも、原子配列は Si 同様の立方晶であるため、この SiC は 3C-SiC である。

また、0.8 nm の極薄膜 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層においても、連続した $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層形成が実現できているのが、図 5 の CSTEM 観測からわかる。

図 6(a) は $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層 Raman 分光結果の Y 依存性を示す。 Y の増大とともに、 1500 cm^{-1} 付近のグラファイト系の D (多結晶系) 及び G バンド (結晶系)

強度が増大し、SiC 層に付随したグラファイト形成が行われているのがわかり、Raman 分光からも SiC 形成が実証された。

以上の議論により、今回の薄膜 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層の詳細構造模式図を図 7 に示す。図 1 (c) の薄膜工程により、表面の C 偏析層は消滅するため¹⁵⁾、C 偏析層は BOX 界面に存在し、3C-SiC (R_3)、C 高濃度 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層 (R_2)、及び C 濃度分布の裾野での C 低濃度 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層 (R_1) の 3 つの局所領域からの PL 発光が予想される。

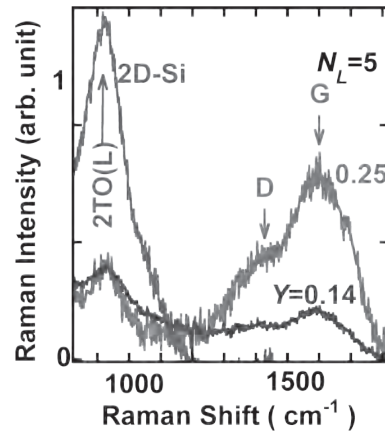


図 6. 0.5 nm $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 及び Si の Raman スペクトル. 矢印は G 及び D バンドを示す. $Y=0.25$ 及び 0.14 .

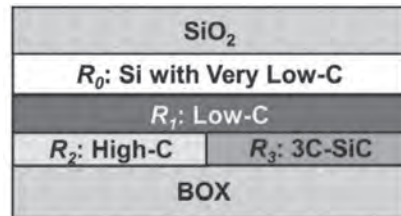


図 7. 薄膜 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層構造の断面模式図.

結果と討論

発光特性

図 8 に PL 発光スペクトルの Y 依存性を示す。 Y の増大とともに、急激な PL 強度 I_{PL} の増大と PL ピークエネルギー E_{PH} の増大が明らかである。しかも、 $Y=0.25$ の場合、近紫外領域まで PL 発光が観測された。しかも、PL スペクトルには矢印で示した E_1 から E_3 の 3 つのピークが有るのもわかる。特に、 E_3 での PL 強度 I_3 は、 Y が 0.1 以上の場合のみ観察される。図 8(b) は、各 Y における I_3 と G バンド強度 I_G の相関である。相関係数がほぼ 1 の正の相関をもっていることから、 I_3 は SiC からの PL 発光現象であることがわかる。

次に、PL の N_L 依存性を議論する。図 9 は、 $Y=0.25$ における PL スペクトルの N_L 依存性である。PL スペクトルの形は N_L 依存性は無いが、 N_L の増

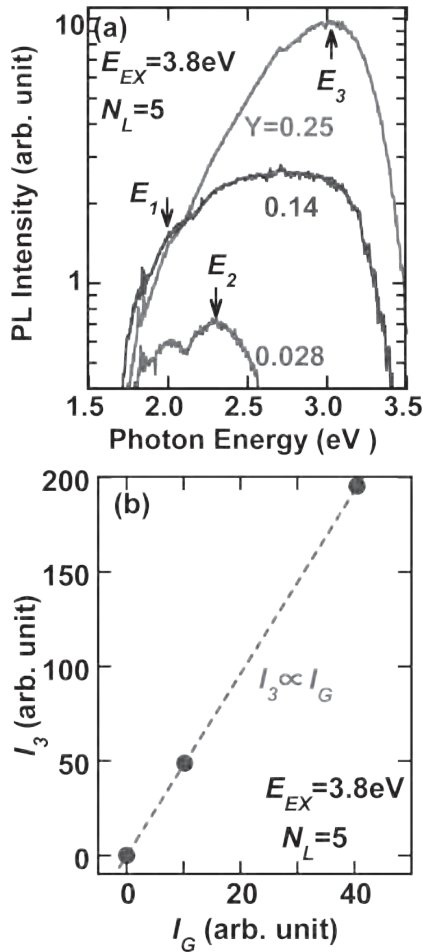


図 8. (a) $E_{EX}=3.8$ eV での PL スペクトルの Y 依存性. (b) I_3 強度の I_G 依存性. $N_L=5$.

大とともに I_{PL} は減少する。しかし、2D-Si と違い、 $N_L = 38$ においても PL 発光しており、 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層の発光機構は 2D-Si とは大きく違うことがわかる。

ここで、PL 発光の N_L 依存性を図 10 にまとめる。図 10(a) は各ピークエネルギーの N_L 依存性である。2D-Si の場合、量子閉じ込め効果により N_L 減少とともに E_G が増大するのは違い¹⁴⁾、 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層の発光機構は図 7 の構造図に示すように、局所的な C 偏析領域からの PL 発光のため、各ピークエネルギーの N_L に依存していない。これは、 N_L の変化が図 7 の R_0 領域の膜厚変化であることに起因している。また、図 10(b) は各 PL 強度ピークの N_L 依存性である。2D-Si の場合、 $N_L < 10$ の場合の、PL 発光している。これは、2D-Si のバンド構造が $N_L < 10$ のみで直接遷移型に変調されるためである⁹⁾。一方、 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層においても、PL 強度ピークは、 N_L の増加とともに、減少している。しかし、これは PL 発光自体が低減しているわけではなく N_L に依存しないことを図 11 の結果を使って説明する。

図 11 に I_3 の d_s 依存性を示す。 I_3 は d_s の指数関数で減少しているのがわかる。これは次のように説

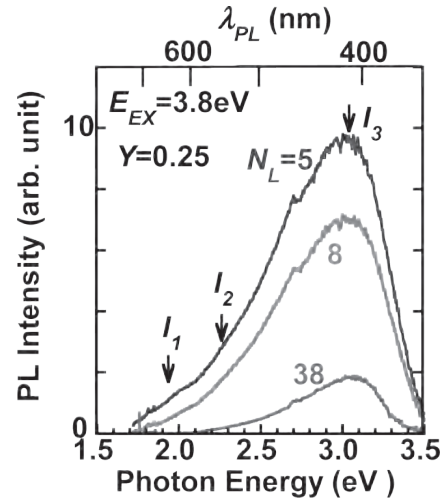


図 9. $E_{EX}=3.8$ eV での PL スペクトルの N_L 依存性. $E_{EX}=3.8$ eV, $Y=0.25$.

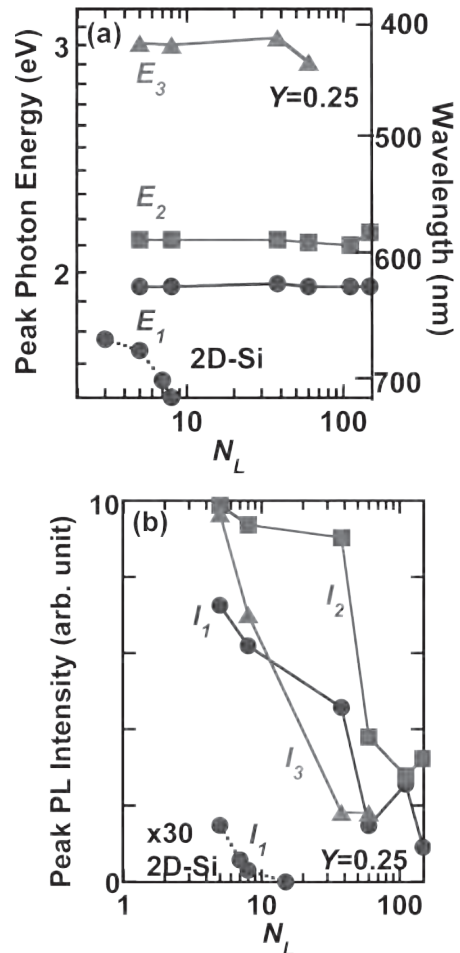


図 10. $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 及び Si における (a) 各ピークエネルギー、及び (b) 各ピーク PL 強度の N_L 依存性. $E_{EX}=3.8$ eV, $Y=0.25$.

明できる。Si 中の深さ x での入射励起レーザー光流量 $I_{EX}(x)$ は、Si 表面での光流量を I_0 、Si 中での励起レーザー光の侵入長を λ_{EX} とすると、次式になる¹⁶⁾。

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

すると、Si 中の深さ x からの PL 強度は (1) 式より

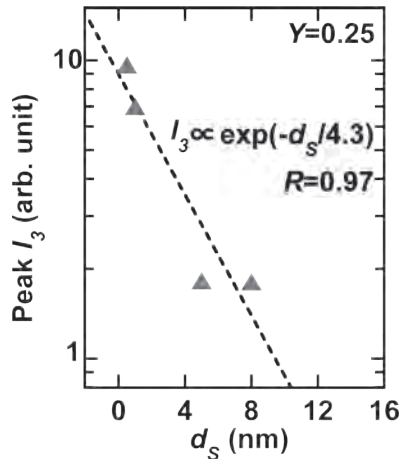


図 11. $E_{EX}=3.8$ eV での I_3 ピーク強度の d_s 依存性. $Y=0.25$. 点線は指数関数の回帰曲線で、相関係数 R は 0.97 である。

次式で表される¹⁶⁾。

$$\begin{aligned} I_{PL}(x) &= \eta I_{EX}(x) \exp(-x/\lambda_{PL}) \\ &= \eta I_0 \exp\{-(\lambda_{EX}^{-1} + \lambda_{PL}^{-1})x\} \\ &= \eta I_0 \exp(-x/\lambda_0) \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、 η は PL 発光効率、 λ_{PL} は Si 中での PL 光の侵入長、 λ_0 は $\lambda_0^{-1} \equiv \lambda_{EX}^{-1} + \lambda_{PL}^{-1}$ で表される実効侵入長である。Si 中の各侵入長を式 (2) に代入すると、 $\lambda_0 \equiv 7.9$ nm となり、実測値の 4.3nm の約 2 倍になっている。これは、 $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層中の光の侵入長は短いためと思われる。

以上の議論により、図 10 での PL 強度の N_L 依存性は、各光の半導体中での吸収に起因しており、図 7 の各層の PL 発光自体は N_L 依存性が無いことを表し、これは図 7 に示す PL 発光体が局所的な C 偏析層であることから自明である。

結論

Si 系発光素子研究の一環として、(100)SOI 基板への C ホットイオン注入法により作製した $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層の構造解析と PL 発光及び発光機構についての研究を行った。

CSTEM 及び XPS 分析により、SOX/Si 及び BOX/Si 界面には数 nm 厚の C 偏析層が形成され、高濃度 C と Si との結合によりナノサイズ 3C-SiC が部分的に形成されていることが判明した。

その結果、SOI 膜厚によらない C 偏析領域からの強い PL 発光 (近紫外から可視域) が実現できた。従って、この $\text{Si}_{1-y}\text{C}_y$ 層技術は将来の Si 系発光素子にとって有望であることがわかった。

謝辞

本研究の一部は、総合理学研究所共同研究助成金

(RIIS201601) の援助を受けた。

文献

- 1) Nazarov A, Colinge JP, Balestra F, Raskin JP, Gamiz F and Lysenko V. S. (2011) *Semiconductor-On-Insulator Materials for Nanoelectronics Applications*. Springer, Berlin.
- 2) Saito S, Sakuma N, Suwa Y, Arimoto H, Hisamoto D, Uchiyama H, Yamamoto J, Sakamizu T, Mine T, Kimura S, Sugawara T, Aoki M and Onai T (2008) Observation of optical gain in ultra-thin silicon resonant cavity light-emitting diode. In: *IEDM Tech. Dig.*, Paper 19.5., pp.1-4.
- 3) Uchida K, Koga J and Takagi S (2007) Experimental study on electron mobility in ultrathin-body silicon-on-insulator metal-oxide-semiconductor field-effect transistors. *J. Appl. Phys.* **102** 074510 :1-8.
- 4) Agrawal BK and Agrawal S (2000) First-principles study of one-dimensional quantum-confined H-passivated ultrathin Si films. *Appl. Phys. Lett.* **77** : 3039-3041.
- 5) Kumar V (2008) *Nanosilicon*. Elsevier, Amsterdam.
- 6) Mizuno T, Tobe K, Maruyama Y and Sameshima T (2012) Experimental study of silicon monolayers for future extremely thin silicon-on-insulator devices: phonon/band structures modulation due to quantum confinement effects. *Jpn. J. Appl. Phys.* **51** 02BC03 :1-8.
- 7) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on surface-orientation/strain dependence of phonon confinement and band structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **52** 04CC13 :1-8.
- 8) 水野智久、青木 孝、鮫島俊之 (2013) 低次元シリコン半導体構造の研究. *神奈川大学理学誌*. **24**: 17-24.
- 9) 水野智久、青木 孝、鮫島俊之 (2014) 二次元シリコン半導体基板の物性研究. *神奈川大学理学誌* **25** : 23-30.
- 10) 水野智久、前田辰郎、多田哲也、青木 孝 (2015) 二次元半導体デバイスの研究. *神奈川大学理学誌*. **26**: 33-39.
- 11) Mizuno T, Nagata Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Crystal direction dependence of quantum confinement effects of two-dimensional Si layers fabricated on silicon-on-quartz substrates: modulation of phonon spectra and energy-band structures. *Jpn. J. Appl. Phys.* **53** 04EC08 : 1-6.
- 12) Mizuno T, Nakahara Y, Nagata Y, Suzuki Y, Aoki T and Sameshima T (2014) Quantum confinement effects in doped two-dimensional Si layers: novel device design for two-dimensional pn-junction structures. *Jpn. J. Appl. Phys.* **53** 04EC09 : 1-7.
- 13) Mizuno T, Nagamine Y, Suzuki Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Sameshima T (2015) Impurity doping effects on impurity band structure modulation in two dimensional n+ and p+ Si layers for future CMOS. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54** 04DC05 : 1-6.
- 14) Mizuno T, Suzuki Y, Nagamine Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T and Maeda T (2015) Surface-oxide stress induced band-structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54** 04DC02 : 1-6.

- 15) Mizuno T, Nagamine Y, Omata Y, Suzuki Y, Urayama W, Aoki T and Sameshima T (2016) C-atom-induced bandgap modulation in two-dimensional (100) silicon carbon alloys. *Jpn. J. Appl. Phys.* **55** 04EB02 : 1-8.
- 16) 水野智久、前田辰郎、青木 孝、鯨島俊之 (2016) 可視域シリコン発光素子の開発. *神奈川大学理学誌* **27** : 15-21.
- 17) Mizuno T, Omata Y, Nagamine Y, Aoki T and Sameshima T (2017) Material structure of two-/three-dimensional Si-C layers fabricated by hot-C⁺ ion implantation into Si-on-insulator substrate. *Jpn. J. Appl. Phys.* **56** 04CB03 : 1-8.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

形式アシュランスケース事例：
メタノール ^1H NMR 帰属評価結果の妥当性
— SDBS の帰属および帰属決定プロセスについての
アシュランスケースの研究 —

渡邊 宏^{1,4} 木下佳樹^{2,3} 武山 誠^{2,3} 奥野康二³

A Formal Assurance Case for Chemical Shift Assignment
~ Case Study ~

Hiroshi Watanabe^{1,4}, Yoshiki Kinoshita^{2,3}, Makoto Takeyama^{2,3} and Koji Okuno³

¹ Research Institute for Materials and Chemical Measurement Standard, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba City, Ibaraki 305-8565, Japan.

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

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. Email: hiroshi-watanabe@aist.go.jp

Abstract: We present a case study of the construction of a formal assurance case in Agda language. The formal assurance case claims the validity of chemical shift assignment data for ^1H NMR spectra of methanol obtained from SDBS (spectral database for organic compounds) developed and maintained by AIST. The novelty of our case is as follows: introduction of concrete data that our claims in Goals refer to; implementation of functions that evaluate the claims using the data. We note that these items are not provided in the conventional description system for assurance cases such as GSN, CAE and D-case.

Keywords: assurance case, ^1H NMR assignment, database, SDBS, Agda, GSN

序論

データの信頼および品質を適切に伝えるための明文化方法として我々は形式アシュランスケースの適用可能性を検討している。アシュランスケースは、主張をその根拠とともに説明する議論が記述された文書である。安全およびディペンダビリティ分野ですでに使われており、自動車車載システムや医療システムでは認証（適合性評価）のための提出文書として提出が求められる例も現れている。

木下・武山が提案した形式アシュランスケース¹⁾は、アシュランスケースを計算機で自動処理可能な形式体系、すなわちプログラムとして表現する。アシュランスケースで記述するさいに問題となる記述の整合性、参照の正しさの確保などを計算機の支援を受けて解決するべく、形式アシュランスケースの効果の実証研究が行われている。

本研究では（形式）アシュランスケースの記述実験を行い、データの信頼および品質を伝えるための明文化方法としての適用可能性を検討する。具体的には、産業技術総合研究所の有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS)²⁾が Web 上で公開する「NMR スペクトルの帰属評価結果」を題材に、その妥当性を主張する議論をアシュランスケースで記述する実験を行っている。

これまでの研究ではメタノールなど初歩的かつ教科書的な ^1H NMR スペクトルの帰属評価結果について、GSN (Goal Structuring Notation)³⁾の記法によるアシュランスケース記述事例を得た⁴⁾。また、妥当性の議論の内容と構成も同時に観察した。帰属結果の妥当性を主張する議論は、測定解析データなどデータに関する議論であり、過去の測定経験や文献

などにもとづいて専門家(スタッフ)が判断した証拠や、測定データを使った計算結果にもとづく証拠などから構成されることを観察した。

一方、我々のアシュランスケース記述事例⁴⁾からは、GSNでは系統的な表現が困難な課題として、以下のものを観察した。

- GSNはデータを定義する機構を持たず、記述者が引用データの書き方を工夫する必要がある。我々のアシュランスケースは測定データなどを議論するためデータの引用が不可欠である。そこで文脈(context)ノードの中に表の形でデータを配置してみたが、それでは利用、管理しにくかった。
- 数式を評価して命題の真偽が判定できるゴールについて、証拠の記述の有無を決め、記述する場合には内容の検討が必要である。しかし、記述する／しないのどちらを選んでも一長一短がある。
- 証拠に出てきた専門家判断の記述方法の工夫が必要である。

これらの課題をうまく解決して記述するには、どんな枠組みを採用すれば良いのか?というのが我々の問題である。

我々は、形式アシュランスケースの枠組みを採用すれば良いと考える。アシュランスケースをプログラムとして実現すれば、データの導入、引用は容易に可能となる。また、適当な関数を実装して、データを用いて計算させ、ゴールの主張が成り立つことを確認することも考えられる。はたして実際にそのように記述できるか?そこで我々は、これまでに得たアシュランスケースの事例を形式アシュランスケースで記述する、形式化作業を進めた。その結果、形式アシュランスケースの事例を得たとともに、上の課題を問題なく解決できることを確認した。

本論文ではこれまでに得た形式アシュランスケースの具体例を示して、形式アシュランスケースの概要を紹介する。特に我々は上の述べた課題に関して、引用データの表現事例、ゴールが成立する条件の実装について、また専門家判断の記述事例を示して報告する。

材料と方法

帰属評価結果の妥当性を主張するアシュランスケースとその課題

本論文では図1のアシュランスケースを題材にその形式アシュランスケース記述について述べる。そのためにまず題材のアシュランスケースを紹介する。

題材のアシュランスケースは、メタゴールの帰属評価結果の妥当性を主張する議論のアシュランスケ

ース⁴⁾の一部を取り出したもので、GSNの記法³⁾で書かれている。

序論で述べたことと重複するが、GSNで書かれたアシュランスケース(図1)から次の課題を観察した。

- 測定データの解析結果(表1)および化合物の解析結果(表2)のデータを引用可能な形でGSNの文脈の中にうまく記述できていない。また、ゴールはデータを適切に引用できていない。そのため、議論全体が曖昧に見える可能性がある。
- ゴールの主張を確認する方法が数式などを用いた具体的な条件で与えられる場合、ゴールの下に提示する具体的な証拠をどう記述するか判断が難しい。条件を評価すれば真偽が判定できるため、証拠を設けない／設ける両方の立場が可能である。しかし、どちらを選択してもデータが修正されると次の問題が発生する可能性がある。
 - 証拠を設置しない場合: ゴールが満たされることを確認し忘れる可能性がある。また、証拠が書かれていないため注意して見ないと未完成のアシュランスケースに見えてしまう。一方、
 - 証拠を設置する場合: 証拠の記述の整合性を確保するのが煩雑になる。計算自体はアシュランスケースと別の場所で行われるため、結果の転記が必要になる。転記ミスの発生も考えられ、管理する手数が増える。
- 専門家判断の記述と管理方法の工夫が必要である。我々の議論の中で専門家判断は大事であることがわかったが、専門家判断であることを特段協調する工夫はしていない。

形式アシュランスケースのアイデア

アシュランスケースを形式言語で記述し、議論の整合性検査や証拠への参照が正しいことを確認する検査は計算機の機械的な処理にまかせてしまおう、というのが木下-武山が提案した形式アシュランスケース¹⁾である。

具体的に、構成的型理論にもとづくプログラミング言語Agda⁵⁾を利用して形式アシュランスケースを構築するアイデアが提案されている。この場合Agdaがもともと持つ強力な型検査機構がアシュランスケースの整合性検査を実現する。そのため、ユーザーはAgda上でアシュランスケースを表現するだけで良い。ただし、整合性を確保し、意義のある議論を展開するには、議論に用いる前提知識および用語をあらかじめ準備しておかなければいけない。我々の記述実験でも議論に用いる引用データをどの程度まで導入して定義するか、適切に設計選択する。

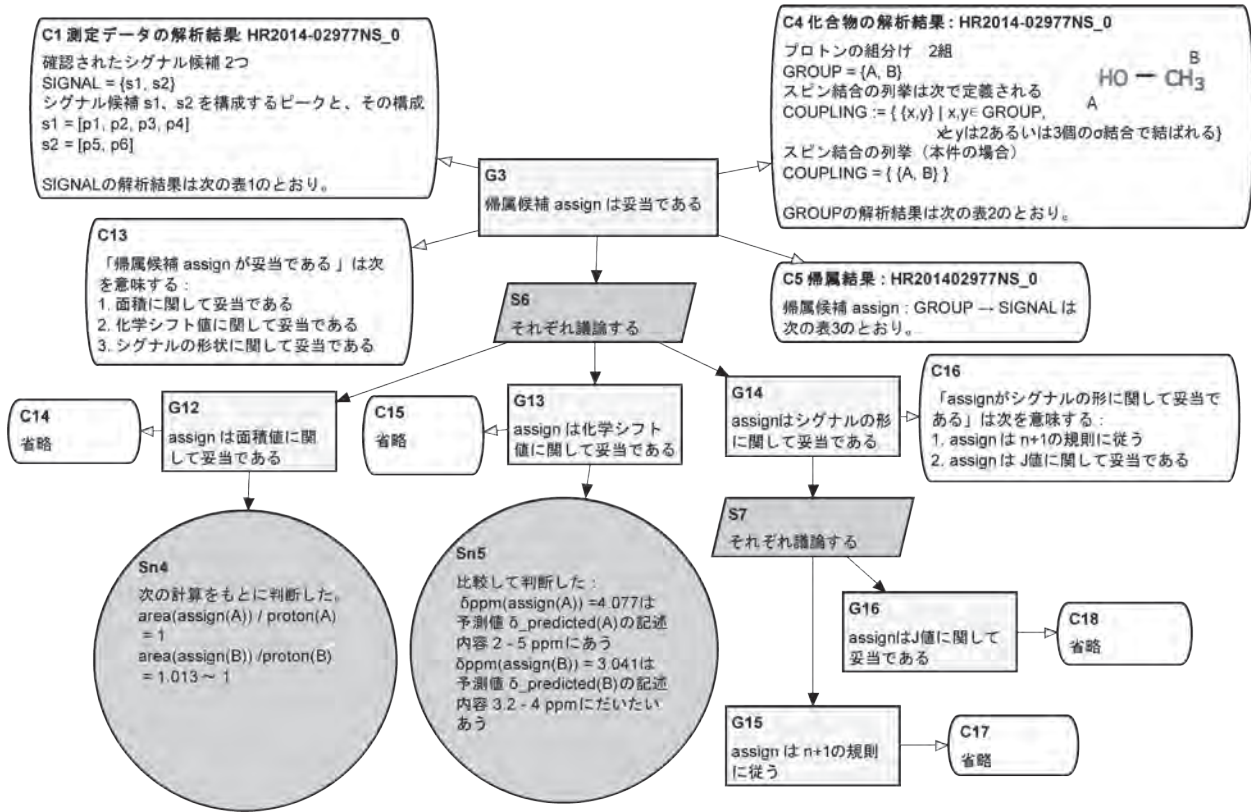


図 1. 題材のアシュランスケース. 図中の文脈 C5 および表 3 で与えられる帰属候補 assign が, 測定サンプルの化合物の解析結果 (表 2) と測定データの解析結果 (表 1) に矛盾しないことが議論される. サブゴールの文脈は省略した.

表 1. 測定データの解析結果

SIGNAL	pattern	JValue	v	δ	area
s1	[4]	[5.25]	1629.37	4.077	1.000
s2	[2]	[5.25]	1269.28	3.176	3.041

表 2. 化合物の解析結果

GROUP	protons	neighbors	$\delta_{\text{predicted}}$
A	1	[B]	2-5ppm
B	3	[A]	3.2-4ppm

表 3. 帰属候補

assign	
GROUP	SIGNAL
A	s1
B	s2

表 4. アシュランスケースと Agda 言語

アシュランスケース	Agda 言語
ゴール	型
ストラテジー	関数
証拠	型のオブジェクト
議論全体	トップゴールの型のオブジェクト (証明)

形式化作業

GSN で書かれた題材のアシュランスケース (図 1) をもとに、Agda 言語を用いて形式アシュランスケースを作成する。Agda 言語による形式アシュランスケースでは、表 4 の通り、アシュランスケースの各構成物を表現する。

このことを念頭に、GSN で記述されたアシュランスケースを次の手順で形式化する。

1. 引用する測定データの解析結果、化合物の解析結果のデータを表現する。同時に議論に必要となる型、関数を定義する。
2. ゴールを型で表現する。ストラテジーを型の間関数として表現する。
3. 検査関数および証拠を作りこむ。ゴールの型の構成子を修正する。
4. トップゴールの型のオブジェクト、すなわち証明を完成させる。すると、形式アシュランスケースが完成したことになる。

結果

題材の図 1 をもとに作成した形式アシュランスケースの概要を説明する。とくに、引用データの定義、検査関数、専門家判断の記述、管理方法の具体例を示して、序論で述べた課題を我々がどう解決したの

か紹介する。

形式アシュランスケースの全体構成

形式アシュランスケースの Agda コードは次の構成でまとめた。

1. 基本的な定義

コード全体にわたり使用する基礎的な型および関数を準備した。例えば、真偽値型、自然数型、浮動小数点数型からリスト型、ベクトル型とそれらに付随する関数など。

2. 文脈の定義

アシュランスケースの文脈をまとめてここに表現した。

(ア) 解析結果データ、帰属候補

ゴールが議論の対象とする測定データ、解析結果データ、帰属候補を定義した。

(イ) 専門家判断機構

専門家判断の案件を格納するために、中身が空の型を準備した。

(ウ) 検査関数

ゴールが成り立つかどうか確認するために用いる、データの検査関数を実装した。

3. ゴール

アシュランスケースのゴールおよびサブゴールをまとめた。

4. 証拠

専門家判断の事実と事由をまとめた。

5. ストラテジー

6. アシュランスケースの議論

トップゴールの型のオブジェクトを証明した。このオブジェクトは GSN で書かれたアシュランスケースの議論の木構造全体を表現している。

以下では、構成物について具体例をあげて述べる。

測定、解析結果データの導入事例

議論の対象とする用語および前提知識をあらかじめ導入しておくことができる。

我々の事例では、化合物の解析結果とシグナルの解析結果のデータをそれぞれ次の手順で定義してまとめた。

1. データを格納するパラメータ付きレコード型を準備する。
2. ラベルの集合を列挙型で表現する。
3. データをレコード型のインスタンスに格納する。
4. ラベルの集合とレコード型のインスタンスを依存直積型のオブジェクトとしてまとめる。

表 2 に示した化合物の解析結果のデータの具体例を述べる。まず初めにデータを格納するパラメータ

付きレコード型として次の「グループ解析」を準備した。

```
record グループ解析 (D : Set) (E : Set) : Set where
  constructor prop
  field
    basis : D
    protons : D → ℕ
    neighbors : D → ℤ D
    δ-predicted : D → Description
    pair : E → (∀ D 2)
    eqd : Eq D
    eqe : Eq E
```

ここで、レコード型に二つのパラメータを持たせて、組の集合とスピン結合を指定できるようにした。

次に、具体的にラベルの集合とデータを定義する。ラベルの集合としては、プロトンの組の集合 GROUP とスピン結合の集合 COUPLING の二つを用意した。このうち GROUP は次のように二つのオブジェクトを持つ列挙型として定義した。

```
data GROUP : Set where
  A B : GROUP
```

データの定義では、レコード型のインスタンス result-GROUP にデータを格納した。レコード型「グループ解析」のパラメータには GROUP と COUPLING を指定している。

```
グループ解析結果-型 : Set
グループ解析結果-型 = グループ解析 GROUP COUPLING
```

```
open グループ解析
```

```
result-GROUP : グループ解析結果-型
basis result-GROUP = A
protons result-GROUP A = 1
protons result-GROUP B = 3
neighbors result-GROUP A = B :: []
neighbors result-GROUP B = A :: []
δ-predicted result-GROUP A = "2-5 ppm"
δ-predicted result-GROUP B = "3.2-4.0 ppm"
pair result-GROUP c1 = A :: (B :: [])
eqd result-GROUP = eqGROUP
eqe result-GROUP = eqCOUPLING
```

最後に依存直積型を用いて、既に定義済みの GROUP と COUPLING、result-GROUP の三つを Data- 化合物解析 として一つにまとめた。

グループと解析結果-型 = $\exists 2 \text{ Set } (\lambda X \rightarrow (\exists \text{ Set } (\text{グループ解析 } X)))$

Data-化合物解析 : グループと解析結果-型

Data-化合物解析 =

```
record {
  dataid = GROUP ;
  properties =
    record {
      dataid = COUPLING ;
      properties = result-GROUP } }
```

これで化合物解析の結果のデータを「Data-化合物解析」としてひとかたまりにまとめられた。こうすると、データをまとめて扱えるとともに、個々のデータへのアクセスも可能である。例えば、組 B のプロトン数は、

グループ解析.protons

(\exists .properties ($\exists 2$.properties Data-化合物解析)) B

で参照できる。

帰属候補の表現

データ定義の仕組みを利用して、帰属候補もより正確に表現するようにした。もともと題材の中の帰属候補は単にプロトンの組の集合 GROUP からシグナルの集合 SIGNAL への写像であった。形式アシュラ

ンスケースでは、それぞれの集合がデータの一部であることを明確に表現するため、化合物解析の結果「Data-化合物解析」のラベルの集合から測定データの解析結果「Data-シグナル解析」のラベルの集合への写像として定義した。

_と_の間の帰属候補-型 : グループと解析結果-型 \rightarrow シグナルと解析結果-型 \rightarrow Set

a と b の間の帰属候補-型 = ($\exists 2$.dataid a) \rightarrow (\exists .dataid b)

帰属候補 assign のデータは表 3 のとおり与えた。

assign : Data-化合物解析 と Data-シグナル解析 の間の帰属候補-型

assign A = s1

assign B = s2

検査関数の表現例

題材のゴールの文脈にはそのゴールの主張が成り立つことを確認するための条件が記述されていた。それらの条件のうち、データを用いて計算した結果から判定できるものは、データを入力として真偽値を出力する検査関数として実装した。

例えば、ゴール「G12 assign は面積について妥当である」が満たされる条件は、任意のプロトンの組の対について、組を構成するプロトンの数の比と対応するシグナルの面積の比がほぼ一致することであ

```
module 信号面積検査 where
-- 面積比の検査関数
checkArea : (res-compound : グループと解析結果-型)  $\rightarrow$ 
             (res-signal : シグナルと解析結果-型)  $\rightarrow$ 
             (res-compound と res-signal の間の帰属候補-型)  $\rightarrow$ 
             ( $\exists 2$ .dataid res-compound)  $\rightarrow$   $\mathbb{R}_+$   $\rightarrow$  Bool
checkArea res-compound res-signal f g  $\epsilon$  = Abs( p-0xarea-g , p-gxarea-0 )  $\leq$   $\epsilon$ 
  where
    result =  $\exists$ .properties ( $\exists 2$ .properties res-compound)
    basis = グループ解析.basis result
    p-0 = primNatToFloat (グループ解析.protons result basis) -- 基準とする組 A のプロトン数
    area-0 = シグナル解析.area ( $\exists$ .properties res-signal) (f basis) -- シグナル f A の面積
    p-g = primNatToFloat (グループ解析.protons result g) -- 組 g のプロトン数
    area-g = シグナル解析.area ( $\exists$ .properties res-signal) (f g) -- シグナル f g の面積
    p-0xarea-g = primFloatTimes p-0 area-g -- 内項の積
    p-gxarea-0 = primFloatTimes p-g area-0 -- 外項の積
-- 命題版
CheckArea : (res-compound : グループと解析結果-型)  $\rightarrow$ 
            (res-signal : シグナルと解析結果-型)  $\rightarrow$ 
            res-compound と res-signal の間の帰属候補-型  $\rightarrow$ 
             $\mathbb{R}_+$   $\rightarrow$  ( $\exists 2$ .dataid res-compound)  $\rightarrow$  Set
CheckArea res-compound res-signal f  $\epsilon$  g = T (checkArea res-compound res-signal f g  $\epsilon$ )
```

図 2. 検査関数, 検査関数の例である.

る。この条件を判定するために図2の検査関数を実装した。条件の中に出てきた「(二つの実数値が)ほぼ一致する」などの曖昧な記述は、二つの実数値の差が適当な範囲に含まれることと解釈した。

ゴールの表現例

ゴールに書かれた命題は型として表現した。表現の仕方は次のいずれかを選択した。

- 天下り的に `postulate` を使って仮定する。
- データ型宣言する。

トップゴールなど、直下に証拠を持たずサブゴールへ分解されるゴールは前者で表現した。一方、アシュランスケースの末端に配置されたゴールなど、具体的な判定条件を持つゴール、具体的な証拠を持つゴールは後者で表現した。そのさいデータ型宣言では検査関数あるいは後で説明する専門家判断を用いる構成子を持たせた。

具体的な実装例を見せる。まず例えばトップゴールは次のように `postulate` を使って仮定した。

```
postulate
-- G3 OK
_と_の間の帰属候補_は妥当である :
  (res-compound : グループと解析結果-型) →
  (res-signal : シグナルと解析結果-型) →
  (res-compound と res-signal の間の帰属候補-型) → Set

一方、図2の検査関数を持つゴール G12 は次のようにデータ型宣言で定義した。

-- G12
data _と_の間の帰属候補_は面積値に関して妥当である :
  (res-compound : グループと解析結果-型) →
  (res-signal : シグナルと解析結果-型) →
  (res-compound と res-signal の間の帰属候補-型) → Set
where
  auto : ∀ {res-compound res-signal f} →
  (Forall (∃2.dataid res-compound)
  (CheckArea res-compound res-signal f e))→
  (res-compound と res-signal の間の帰属候補 f は面積値
 に関して妥当である) -- 基準 e
```

ここで、構成子 `auto` は検査関数（ここではシグナルの面積値を確認する `CheckArea`）の結果が真ならばゴールの型のオブジェクト、つまりゴールを満足する証拠を生成できる。

証拠の表現事例：専門家判断

形式化作業のなかでゴールが成立する条件を検査関数へ置き換えたため、我々の形式アシュランスケースでは証拠の部分の記述量が減った。題材のアシュランスケースでは化学シフト値の妥当性確認のなか所だけになった。化学シフト値の妥当性確認のゴールの証拠は、測定されたシグナルの化学シフト値が、文献および知見から導かれる予測値の通りであることをスタッフ（専門家）が確認したという事実であった。この証拠を扱うための仕組みは次のようにした。

1. 専門家判断の案件を格納するために、オブジェクトを持たない空の型「専門家判断事実」を準備しておく。
2. 専門家判断の案件はこの型のオブジェクトとして仮定する。
3. 型「専門家判断事実」のオブジェクトを用いてゴールのオブジェクトを生成できるようにゴールの型構成子を定義する。

題材の形式アシュランスケースでは図3のように専門家判断の案件を与えた。そのためにあらかじめ次のデータ型宣言を行った。

```
data 専門家判断事実 (A : Set) (docref : Description) : Set
where
```

また、図3のインスタンスを利用するゴールのデータ型および構成子は次で与えた。

```
-- 専門家判断
PropA = Data-化合物解析 と Data-シグナル解析 の間の帰属候補 assign は組 A の化学シフト値に関して妥当である
PropB = Data-化合物解析 と Data-シグナル解析 の間の帰属候補 assign は組 B の化学シフト値に関して妥当である
postulate
  evidence1 : 専門家判断事実 PropA "2017-03-09-NS-1 比較して判断した: 測定値 4.077ppm は予測値 2-5 ppm と一致する"
  evidence2 : 専門家判断事実 PropB "2017-03-09-NS-2 比較して判断した: 測定値 3.041ppm は予測値 3.2-4ppm と大体一致する"
```

図3. 専門家判断の例. インスタンス `evidenc1` および `evidence2` を定義している.

```

postulate
-- S6 : G12 → G13 → G14 → G3
  S6 : {res-compound : グループと解析結果-型} →
    {res-signal : シグナルと解析結果-型} →
    {f : res-compound と res-signal の間の帰属候補-型} →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f は面積値に関して妥当である →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f は化学シフト値に関して妥当である →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f はシグナルの形に関して妥当である →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f は妥当である
-- S7 : G15 → G16 → G14
  S7 : {res-compound : グループと解析結果-型} →
    {res-signal : シグナルと解析結果-型} →
    {f : res-compound と res-signal の間の帰属候補-型} →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f は n+1 の規則に従う →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f は J 値に関して妥当である →
    res-compound と res-signal の間の帰属候補 f はシグナルの形に関して妥当である

```

図 4. ストラテジー. `postulate` を使い関数として定義する. トップゴールはゴール G12 および G13, G14 から導かれるため関数 S6 で定義する.

```

main : Data-化合物解析 と Data-シグナル解析 の間の帰属候補 assign は妥当である
main = S6 (auto (dfun 証拠-面積値))
  (auto (dfun 証拠-化学シフト値))
  (S7 (auto (dfun 証拠-n+1 の規則))
    (auto (dfun 証拠-J 値)))
where
証拠-面積値 : (g : ∃2.dataid Data-化合物解析) →
  (CheckArea Data-化合物解析 Data-シグナル解析 assign e g)
証拠-面積値 A = trivial
証拠-面積値 B = trivial
--
証拠-化学シフト値 : (g : ∃2.dataid Data-化合物解析) →
  (Data-化合物解析 と Data-シグナル解析 の間の帰属候補
    assign は組 g の化学シフト値に関して妥当である)
証拠-化学シフト値 A = 専門家の判断 evidence1
証拠-化学シフト値 B = 専門家の判断 evidence2
--
証拠-n+1 の規則 : (g : ∃2.dataid Data-化合物解析) →
  (CheckN+1 Data-化合物解析 Data-シグナル解析 assign g)
証拠-n+1 の規則 A = trivial
証拠-n+1 の規則 B = trivial
--
証拠-J 値 : (p : ∃.dataid (∃2.properties Data-化合物解析)) →
  (CheckJ 値 Data-化合物解析 Data-シグナル解析 assign e p)
証拠-J 値 c1 = trivial

```

図 5. トップゴールの議論. トップゴールのオブジェクト `main` が証明として与えられている. 化学シフト値の妥当性に関するゴールの証拠を与えるために `evidence1` および `evidence2` を利用している. 残りのゴールは検査関数を満足するため, 自明な値 `trivial` が用いられている.

data $_$ と $_$ の間の帰属候補 $_$ は組 $_$ の化学シフト値に関して妥当である：

```
(res-compound : グループと解析結果-型) →
(res-signal : シグナルと解析結果-型) →
(res-compound と res-signal の間の帰属候補-型) →
(∃2.dataid res-compound) → Set
where
  専門家の判断 :
    ∀ {res-compound res-signal f g docref} →
      (専門家判断事実
        (res-compound と res-signal の間の帰属候補 f
          は組 g の化学シフト値に関して妥当である)
          docref) →
        (res-compound と res-signal の間の帰属候補 f
          は組 g の化学シフト値に関して妥当である))
```

題材の形式アシュランスケースでは証拠を表現するのに一種類の型しか導入していない。もし多様な種類の証拠を取り扱う場合は、複数の型を導入すれば良い。

ストラテジーの表現事例

アシュランスケースの議論の構造をもとに、ストラテジーをゴール間の関数として表現した(図4参照)。

議論の表現事例

アシュランスケースの議論全体はトップゴールの型のオブジェクトとして証明した(図5参照)。証明作成にはAgdaの対話的環境を活用した。

討論

形式アシュランスケースの事例作成

本論文では我々が作成した形式アシュランスケースの具体例を示してその概要を紹介した。特に、GSNで表現しにくかった課題を形式アシュランスケースの枠組みで解決できたことを、データ定義、検査関数、専門家判断の記述事例を示して説明した。

形式アシュランスケースの利点

GSNによる記述と形式アシュランスケース記述の客観的な比較、評価は今後行っていきたいが、これまでの我々の記述実験の経験から得た形式アシュランスケースの利点をまとめる。

形式アシュランスケースによる記述は、整合性検査が手軽に行えるため便利である。もし、アシュランスケースを修正して整合性が失われても、型検査を走らせれば直後にそのことを検知できる。これは、形式アシュランスケースを作成する過程でも有益であることが実感できた。

形式アシュランスケースでは、議論の対象とする

具体的なデータを導入可能である。また、そのデータを引用してゴールを具体的に記述することも可能になる。そのため、より精密な議論が展開できるようになる。

データを導入すれば議論を精密にできるだけでなく、ゴールの主張が成り立つ条件を確認する検査関数も実装できる。そして、ゴールの主張が成り立つ確認作業を言語処理系にまかせることも可能である。これは、修正などが起こった場合の確認漏れ、証拠の不整合の発生など防止することにもつながるだろう。

また、我々の専門家判断の例のように、型を導入して証拠の種類を区別するなどの作り込みも可能である。人手をかけて注意深くレビューすべき部分とそうでない部分を分離する作り込みも可能であると考える。

GSNで記述されたアシュランスケースを形式アシュランスケースへ書換える形式化作業は特に難しいわけではない。議論部分の書換えは素朴な書換えにすぎない。ただし、データの部分をどの程度まで実装するか判断するのが難しい部分である。本論文が目指すことと直接関係しないが、形式化作業はアシュランスケースをレビューするための具体的手段としても役立つかもしれない。今回の形式化作業を通してGSNで記述したゴールのあいまいな箇所を見つけて、見直すこともできた。

今後の課題

帰属評価結果の妥当性を主張するアシュランスケースについては、形式アシュランスケースの記述事例を増やす実験を続け、適用範囲を広げ、議論に必要なデータ定義、すなわち型、関数を集めてライブラリを作成する。また、議論のテンプレートを作成することなど考えられる。

謝辞

本研究遂行には神奈川大学総合理学研究所の共同研究助成(RIIS201603)を受けた。

文献

- 1) Kinoshita Y and Takeyama M (2013) Assurance case as a proof in a theory: towards formulation of rebuttals. In: *Assuring the Safety of Systems – Proceedings of the Twenty-first Safety-critical Systems Symposium*. Bristol, UK. Dale C, Anderson T, eds., CreateSpace Independent Publishing Platform, Bristol. pp.205-230.
- 2) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS). <http://sdb.sdb.aist.go.jp>

- 3) Kelly TP (1999) Arguing safety: a systematic approach to managing safety cases. *Ph.D. thesis, University of York*. UK.
- 4) 渡邊 宏, 木下佳樹, 武山 誠, 奥野康二 (2016) SDBS の帰属および帰属決定プロセスについてのアシュランスケースの研究. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**:29-38. <http://hdl.handle.net/10487/14213>
- 5) Agda Team, The Agda Wiki. <http://wiki.portal.chalmers.se/agda>

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

バクテリア、酵母、カビに対し広い抗菌活性スペクトルを示す 新規貴金属ヘテロ環カルベン錯体の合成、構造解析と 抗菌機構の解明

力石紀子¹ 野宮健司^{1,3} 松永 諭¹ 両角宗一郎¹ 黒瀬香緒理¹

Synthesis, Characterization and Structure-Activity Relationship of the Antimicrobial Activity of Novel *N*-Heterocyclic Carbene (NHC)-Coinage Metal Complexes.

Noriko Chikaraishi Kasuga¹, Kenji Nomiya^{1,3}, Satoshi Matsunaga¹,
Soichiro Morozumi¹ and Kaori Kurose¹

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: Several novel silver(I) complexes with *N*-heterocyclic carbene (NHC) ligands were prepared by the reaction of the PF₆ salts of NHC precursors with silver oxide in acetonitrile. Single-crystal X-ray analysis of the complexes showed that mononuclear to dinuclear silver(I) complexes were formed according to the precursors used. In the silver(I) complexes, C-Ag bonds were formed. Most of the complexes were highly soluble in organic solvents such as acetone, CH₃CN and DMSO. The antimicrobial activities of the silver(I) complexes together with their NHC precursors were evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) in a water-suspension system. Among the silver(I) complexes, the light-stable dinuclear complex {[Ag₂(L-1a)](PF₆)₂} (Ag-1a), showing a basket-like structure, exhibited a wide spectrum of effective antimicrobial activities against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*), yeasts (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*), and molds (*Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium citrinum*), whereas the mononuclear silver(I)-NHC complex showed no activity. Since the Ag-C bond in the NHC-silver(I) complexes is strong or even stronger than the Ag-P bond, these results suggest that a structure-activity relationship exists.

Keywords: coinage metal(I) complexes, *N*-heterocyclic carbene (NHC), antimicrobial activity, single-crystal x-ray analysis

序論

周期表の第 11 族元素のうち、金、銀、銅は貨幣金属や貴金属元素として古くからよく知られた元素である。

貨幣、装飾品に用いられてきたこれらの元素のカチオンと有機物からなる錯体は、いくつかの生理活性を示すことが知られている。金 (I) 錯体は抗リウマチなどの生理薬理活性を持つことが知られ、経口投与剤オーラノフィンが有名であり、金 (I) 錯体は抗腫瘍、抗 HIV 作用についても盛んに研究されてきている¹⁾。銀 (I) 錯体に関する研究は、切り花の花鮮度保

持作用、抗菌作用に関するものがほとんどである²⁾。銀や硝酸銀が抗菌作用を示すことは古くから知られており、食器や目の消毒、やけど等の感染予防に用いられてきた³⁾。銀 (I) 錯体にはバクテリア、酵母、カビにまで抗菌活性を示すものがあり、一般に銀 (I) 錯体の抗菌活性スペクトルは金 (I) 錯体のスペクトルに比べ広い。

我々のグループは、これまで種々の有機配位子を用いて、金属まわりの環境(供与原子の種類や配位数)が異なるウエルナー型の錯体を多数合成し、分子構

造と抗菌活性の関係について研究してきた⁴⁾。貴金属イオンのうち Ag^+ や Au^+ に強く配位するソフトな硫黄、リンおよびハードな酸素、窒素を配位供与原子として、配位子の有機化合物を選択、分類してきた。

金 (I) 錯体は、いずれの供与原子を含む錯体もほぼ直線 2 配位構造 (一部 $\text{Au}^+ \cdots \text{Au}^+$ 相互作用を含む) をとり、グラム陽性菌に対し抗菌活性を示した。他方、銀 (I) 錯体には 2 より大きい配位数のポリマー構造を示す錯体が多く得られた。チオールを含む有機化合物から得られる銀 (I) 錯体には硫黄が架橋した多核錯体が多く知られ、バクテリアに抗菌活性を示した。リン原子を配位供与原子とする銀 (I) 錯体は単核錯体が多く知られているが、抗菌活性は限られるか、低いことが多かった。窒素原子や酸素原子を供与原子とするアミノ酸を配位子とした銀 (I) 錯体は、特にタンパク質と銀 (I) イオンの相互作用を研究する上でも重要である。ポリマー性で光に不安定な錯体が多いが、配位子交換性があり、抗菌活性を示すものが多かった。これらの結果から、ウェルナー型銀 (I) 錯体では、配位交換性が抗菌スペクトルと密接に関係し、より容易に配位子交換できる結合を有する銀 (I) 錯体の分子設計を行うことが、高い抗菌活性の広いスペクトルを示すために重要であるとの指針を得てきた。

金属-炭素結合を含む有機金属錯体は、空気や水に不安定な化合物が多いため、これまで当研究室では Ag-C 結合を有する有機金属錯体は対象としてこなかった。しかし、アクロン大学の Youngs らのグループにより、electrospinning 法で繊維状に加工できるほど安定な銀 (I) - *N*-ヘテロ環カルベン (*N*-heterocyclic carbene, NHC) 錯体が報告された⁵⁾。そこでまず新規 NHC 配位子を持つ銀 (I) 錯体を対象とし、抗菌活性試験を行い、抗菌スペクトルと分子構造について調べたので報告する。

材料と方法

材料

新規 NHC 前駆体 $\text{H}_4\text{L-1}$ の PF_6 塩は、既報⁶⁾ を参考に 1,2,4,5-テトラキスプロモメチルベンゼンと 1,2'-ビス (*N*-イミダゾール-1-イルメチル) ベンゼンとの反応後、 KPF_6 を加えて合成した (Fig. 1)。カルベン前駆体 ($\text{H}_2\text{L-2} \cdot (\text{PF}_6)_2$ ⁶⁾、 $\text{H}_2\text{L-4} \cdot (\text{PF}_6)_2$ ⁷⁾ は既報に従い合成した。4 種類の銀 (I) 錯体は各カルベン前駆体と酸化銀を加熱攪拌して合成した (Fig. 1)。得られた化合物は、 ^1H 、 ^{13}C NMR、FTIR、熱分析、CHN 元素分析により同定した。酸化銀、原料の有機物、HL-3 は市販品をそのまま用いた。

測定方法

CHN 元素分析は既設の Perkin-Elmer PE2400 series II CHNS/O analyzer、熱分析は Rigaku Thermo Plus 2 TG8120 を使用した。赤外吸収スペクトルは JASCO FTIR4100、NMR は JEOL ECP500 を使用した。単結晶 X 線構造解析は Bruker SMART APEX CCD または Rigaku VariMax with Saturn CCD 回折計でデータを収集し、解析ソフトウェア Yadokari を使用した。最小発育阻止濃度 (minimum, inhibitory concentration, MIC; $\mu\text{g}/\text{mL}$) は秦野食品安全センターで測定した⁸⁾。

結果と討論

NHC 前駆体 PF_6 塩の合成、構造解析

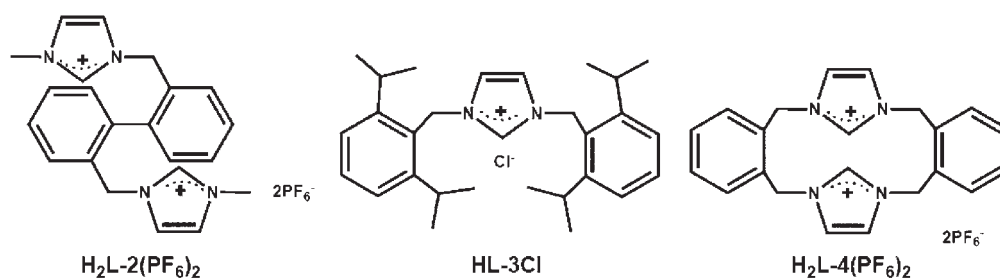
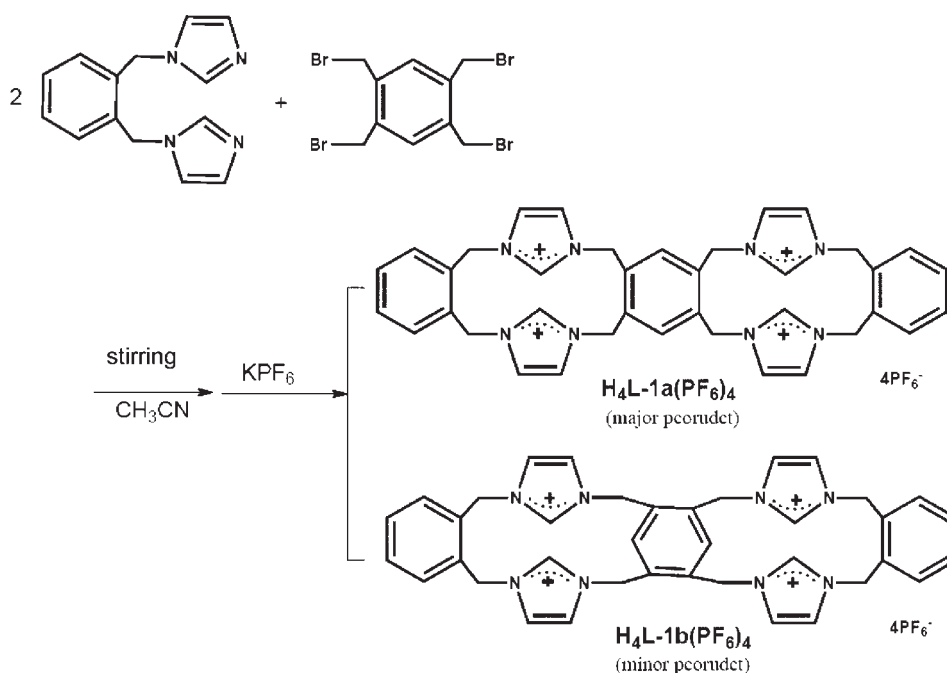
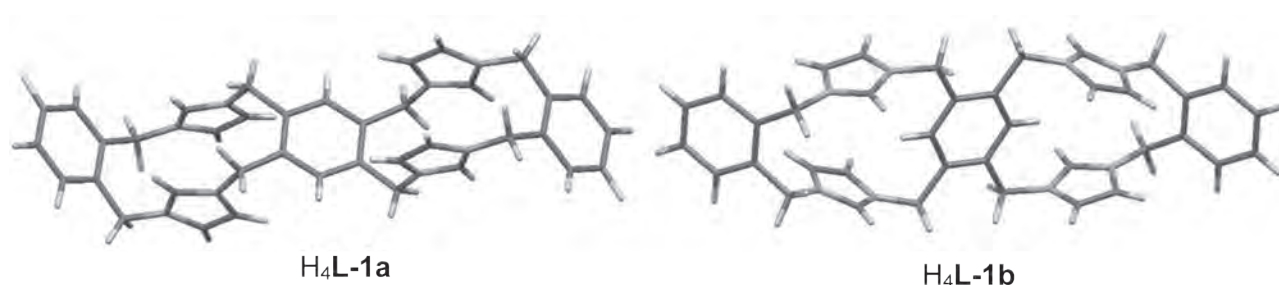
N-ヘテロ環カルベン前駆体 $\text{H}_4\text{L-1}$ の PF_6 塩は、スキーム (Fig. 2) に示す 1,2,4,5-テトラキスプロモメチルベンゼンと 1,2'-ビス (*N*-イミダゾール-1-イルメチル) ベンゼンをアセトニトリル中、室温で攪拌した後、 KPF_6 を加え白色固体として得た。アニオン変換する前のカルベン前駆体は水に可溶だが、交換後は水には不溶となり、DMSO、アセトニトリルに可溶になった。また得られた粉体をアセトニトリルに溶解し、外部溶媒をジエチルエーテルとした vapor-diffusion 法により、単結晶 X 線解析に適した透明な単結晶を得て、分子構造を決定した。その結果、 $\text{H}_4\text{L-1} \cdot (\text{PF}_6)_4$ には 2 種類の幾何異性体 ($\text{H}_4\text{L-1a} \cdot (\text{PF}_6)_4$ 、 $\text{H}_4\text{L-1b} \cdot (\text{PF}_6)_4$) があることがわかった (Fig. 3)。 ^1H NMR のシグナルはすべてブロードニングしており、溶液中でいくつかのコンホメーションを相互変換していることが示唆された。カルベン前駆体 $\text{H}_2\text{L-2} \cdot (\text{PF}_6)_4$ 、 $\text{H}_2\text{L-4} \cdot (\text{PF}_6)_4$ は、既報に従い PF_6 塩を合成した^{6,7)}。

銀 (I)-NHC 錯体の合成、構造解析

$[\text{Ag}_2(\text{L-1a})] \cdot (\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$ (Ag-1a)

L-1 を配位子とした銀 (I) 錯体は、カルベン前駆体 ($\text{H}_4\text{L-1a} \cdot (\text{PF}_6)_4$ 、 $\text{H}_4\text{L-1b} \cdot (\text{PF}_6)_4$) を分離することなく混合物のままアセトニトリル中 Ag_2O と加熱攪拌し、セライトろ過後、ジエチルエーテルに再沈殿して得た。銀 (I) 錯体の形成は、 ^1H NMR で前駆体の特徴的な低磁場に現れるイミダゾールプロトン (8-10 ppm) が消失し、 ^{13}C NMR でカルベンのシグナルが 180-190 ppm へ低磁場シフトし、かつ ^{107}Ag 、 ^{109}Ag とのカップリングにより分裂したことから確認した。得られた粉体をアセトニトリルに溶解し、ジエチルエーテルを外部溶媒とした vapor-diffusion 法により透明な柱状の単結晶を得た。

単結晶 X 線解析から得られた銀 (I) 錯体は $[\text{Ag}_2(\text{L-1a})]$

Fig. 1 Chemical structures of the other NHC precursors, $H_2L-2 \cdot (PF_6)_2$, $HL-3Cl$ and $H_2L-4 \cdot (PF_6)_2$.Fig. 2 Synthetic scheme of *N*-heterocyclic carbene precursors of $H_4L-1 \cdot (PF_6)_4$ Fig. 3 Molecular structures of $H_4L-1a \cdot (PF_6)_4$ and $H_4L-1b \cdot (PF_6)_4$ in the crystal, The anions and solvent molecules are omitted for clarity.

1a)] $\cdot (PF_6)_2 \cdot 2CH_3CN$ (Ag-1a) であった (Fig. 4)。Fig. 3 に示した階段状の構造をした NHC 前駆体、 $H_4L-1a \cdot (PF_6)_4$ とは異なり、Ag-1a はかご状の 2 核錯体であり、2 つの Ag^I は 2 つの炭素に挟まれた Ag-C 結合を形成していることがわかる。(Ag1 - C16 2.102(3), Ag1 - C36 2.109(3), Ag2 - C17 2.095(3), Ag2 - C37 2.096(3) Å)、C-Ag-C の角度は 180 度に近

い値であり (C16-Ag1-C36 176.69(12)、C37-Ag2-C17 177.22(11)°)、Ag1, Ag2 とほぼ直線 2 配位構造であった。Ag1...Ag2 間の距離は 3.0460(4) Å であり、この値は van der Waals 半径の 2 倍 3.44 Å より短く⁹⁾、金属内銀原子間距離 2.88 Å より若干長い¹⁰⁾、Ag-1a の分子内に Ag...Ag 相互作用が存在するといえる。また、Ag-π 相互作用も見られた

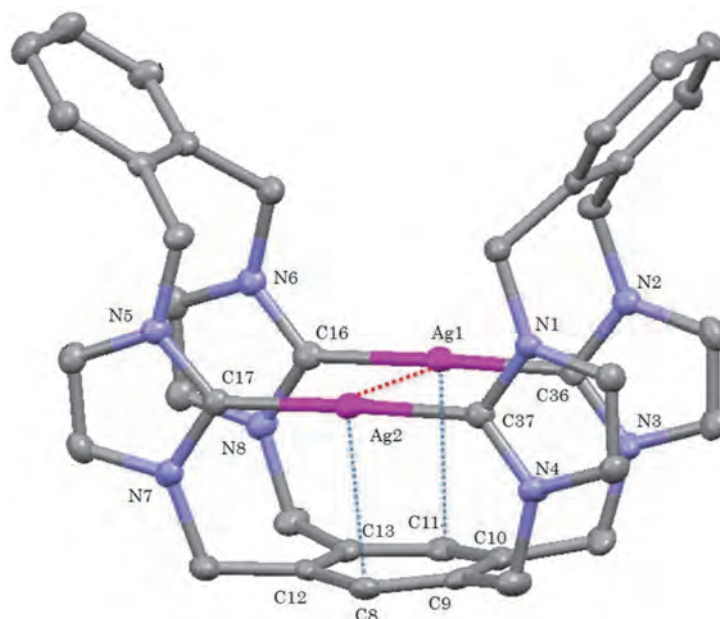


Fig. 4 Molecular structure of Ag-1a in the crystal. The hydrogen atoms, anions and solvent molecules are omitted for clarity.

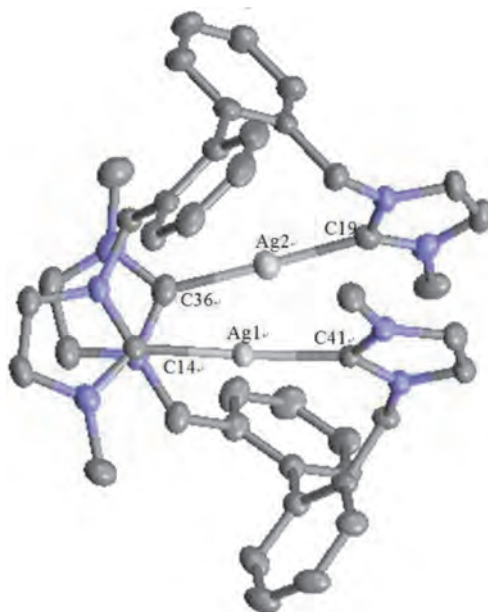


Fig. 5 Molecular structure of Ag-2 in the crystal. The hydrogen atoms, anions and solvent molecules are omitted for clarity.

(Ag1 \cdots C11 2.796(3)、Ag2 \cdots C8 2.766(3) Å)。結晶中にはアセトニトリル溶媒和が見られたが、それらと銀イオンとの相互作用はなかった。Ag-1aの ^1H NMRのシグナルがNHC前駆体と異なりシャープに現れたのも、かご型分子内に存在する相互作用により、コンホメーションが固定されたためと考えられる。Ag-1aは水に不溶であるが、アセトン、アセトニトリルなどの有機溶媒には可溶であった。Ag-1aは1年ほど空气中で光に安定であった。

一方、L-1aの異性体、L-1bを配位子とした銀(I)錯体、“ $[\text{Ag}_2(\text{L-1b})] \cdot (\text{PF}_6)_2$ ”はこれまで単離できていない。原因として、 $\text{H}_4\text{L-1b}(\text{PF}_6)_4$ がマイナー生成物であること、銀(I)錯体が生成しても微量であること、ろ過の際除去されたこと、もしくは $[\text{Ag}_2(\text{L-1a})] \cdot (\text{PF}_6)_2$ より安定性が低いことなどが考えられる。

$[\text{Ag}_2(\text{L-2})] \cdot (\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ag-2)

Ag-1aと同様に、 $\text{H}_2\text{L-2} \cdot (\text{PF}_6)_2$ と酸化銀をアセト

ニトリル中、加熱攪拌して粉体を得たのち、vapor diffusion 法により単結晶を調製した。単結晶 X 線構造解析により得られた $[\text{Ag}_2(\text{L-2})] \cdot (\text{PF}_6)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ag-2) の分子構造を Fig. 5 に示す。Ag-2 も 2 核の銀 (I)-NHC 錯体であった。Ag-C 結合距離の値はほぼ Ag-1a と同じであり (Ag1-C14 2.096(3), Ag1-C41 2.096(3), Ag2-C19 2.089(3), Ag2-C36 2.081(3) Å) かつ C-Ag-C もほぼ直線 2 配位構造であった (C14-Ag1-C41 173.66(11), C19-Ag2-C36 177.55(14)°)。しかし、Ag-2 中の Ag1...Ag2 間の距離は 3.2918(5) Å であり、金属イオン間の相互作用はないと考えられる。また Ag-2 はかご状構造ではなく 2 つの NHC 配位子がねじれて銀イオンに結合していることがわかった。

また、Ag-1a と Ag-2 の比較対象の NHC 銀 (I) 錯体として既知化合物の $[\text{Ag}(\text{L-3})\text{Cl}]$ (Ag-3)¹¹⁾ と $[\text{Ag}_2(\text{L-4})] \cdot (\text{PF}_6)_2$ (Ag-4)¹²⁾ を合成した。それらの分子構造を Fig. 6 に示す。Ag-3 の分子構造は、Ag-1、Ag-2 と異なり単核の平面 2 配位の銀 (I) 錯体であり、Ag-4 は L-4 が 2 分子、2 つの銀イオンを C-Ag-C 結合を介して向かい合った 2 核銀 (I) 錯体である。

最少発育阻止濃度による抗菌活性の評価

水に不溶の銀 (I) 錯体 Ag-1a から Ag-4、および NHC カルベン前駆体を水に分散させた状態で菌液に投与し、細菌が増殖しない最少発育阻止濃度 (MIC) より抗菌活性を評価した。対象として選んだ微生物は、4 種類のバクテリア (大腸菌 *E. coli*, 枯草菌 *B. subtilis*, 黄色ブドウ球菌 *S. aureus*, 緑膿菌 *P. aeruginosa*)、2 種類の酵母 (病原性酵母 *C. albicans*, ビール酵母 *S. cerevisiae*)、2 種類のカビ (黒麹菌 *A. brasiliensis* (*niger*), 青カビ *P. citrinum*) の 8 種類である。Table 1 に結果を示す。値が小さい錯体ほど抗菌活性は強いことを示している。

NHC 前駆体の中にはバクテリアや酵母に抗菌活性を示すものがあつた。H₄L-1·(PF₆)₄ は 3 種類のバクテリア (*E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*) と 2 種類の酵母 (*C. albicans*, *S. cerevisiae*) に抗菌活性があつた。H₂L-2·(PF₆)₂ は選んだ 8 種類の微生物、すべてに活性を示さなかつた。HL-3Cl は、*E. coli*, と *B. subtilis* に高い活性を示した。H₂L-4·(PF₆)₂ は 3 種類のバクテリアに弱い抗菌活性を示した。これらカルベン前駆体と酸化銀の反応から得られた銀 (I) 錯体は、単核錯体の Ag-3 を除き、抗菌活性を示した。その中でも Ag-1a は 4 種類のバクテリア、2 種類の酵母、カビ (*A. brasiliensis*) に対し有効な活性を示した。この抗菌スペクトルの広さは、配位子交換が起こりやすい Ag-O 結合錯体の抗菌スペクトルにほぼ

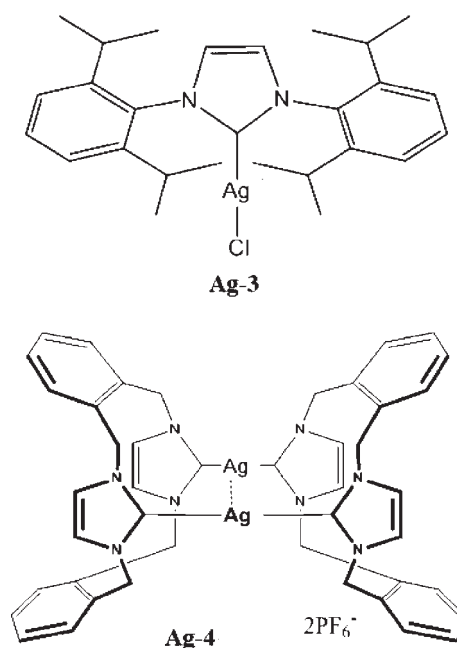


Fig. 6 Schematic pictures of molecular structures of Ag-3⁷⁾ and Ag-4⁸⁾ in the crystal

匹敵していた⁸⁾。

Ag(I)-NHC 錯体では back-donation によって Ag-P 結合と同等、またはそれより強い Ag-C 結合を形成すると言われている^{13, 14)}。一連のウエルナー型銀 (I) 錯体では、銀と配位供与原子の結合の強さが弱い順に Ag-O 結合錯体 \geq Ag-Sc, O 結合錯体, Ag-Sc, N 結合錯体 $>$ Ag-S_H (チオール) 結合錯体となり、配位子交換反応の起こりやすさ、即ち Ag(I) への配位供与原子の強さと抗菌活性の間に相関があつた。しかし、Ag-C 結合が強い NHC 錯体では、異なる機構で抗菌作用が発現していると考えられる。¹⁵⁾、グロニンゲン大学の Casini らは蛍光性 NHC 銀 (I) および金 (I) 錯体を用いて、腫瘍細胞に対する毒性を調べており、thioredoxin reductase (TrxR) 阻害活性があることを報告している^{16, 17)}。Ag-1a の広い抗菌活性スペクトルは、対象とした微生物に共通に存在し、阻害されるタンパク質の存在を示唆しているかもしれない。

まとめ

Ag-C 結合を持つ 2 核有機金属錯体である NHC 銀 (I) 錯体 Ag-1a, Ag-2, Ag-4 を合成し、各種キャラクタリゼーションから構造を決定し、高純度であることを確認したのち、MIC 評価による抗菌活性を見出した。中でもかご型の構造を持つ Ag-1a は、光に対して安定で、大腸菌、枯草菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、酵母、カビに対し広いスペクトルの抗菌活性を示すことがわかつた。Ag-C 結合の強さからこれまでのウエルナー型銀 (I) 錯体とは異なる抗菌機構を考

Tabel 1. Antimicrobial activities of silver(I) complexes (Ag-1a-Ag-4) and as well as NHC precursors evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC; $\mu\text{g mL}^{-1}$) under suspension conditions⁹⁾

	Ag-1a	Ag-2	Ag-3	Ag-4	H ₄ L-1(PF ₆) ₄	H ₂ L-2(PF ₆) ₂	HL-3Cl	H ₂ L-4(PF ₆) ₂
<i>Escherichia coli</i>	15.7	500	>1000	250	62.5	>1000	1000	500
<i>Bacillus subtilis</i>	31.3	1000	>1000	250	125	>1000	15.7	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	31.3	250	>1000	125	1000	>1000	15.7	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62.5	500	>1000	125	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Candida albicans</i>	62.5	>1000	>1000	1000	125	>1000	>1000	>1000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31.3	1000	>1000	125	31.3	>1000	1000	>1000
<i>Aspergillus brasiliensis (niger)</i>	62.5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Penicillium citrinum</i>	125	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

える必要がある。

今後、Ag-NHC 錯体の抗菌機構について調べたい。一般にトランスメタレーション剤として他金属錯体の合成に用いられる NHC-銀 Ag(I) 錯体が得られたことから、Ag-1a を出発原料として Au^I, Cu^I 錯体の合成を行い、分子構造、抗菌活性について調べていきたいと考えている。

謝辞

この研究は神奈川大学総合理学研究所共同研究助成の助成番号 RIIS201604 「バクテリア、酵母、カビに対し広い抗菌活性スペクトルを示す新規貴金属ヘテロ環カルベン錯体の合成、構造解析と抗菌機構の解明」の援助を受けて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Shaw CF, III (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* **99**: 2589-2600.
- 2) Gimeno MC and Laguna A (2004) Silver and gold. In: *Comprehensive Coordination Chemistry II, Vol. VI*. McCleverty JA and Mayer TJ, eds., Elsevier, Oxford pp. 911-1091.
- 3) Russel AD and Hugo B (1994) Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* **31**:351-370.
- 4) Nomiya K, Kasuga NC and Takayama A (2014) Synthesis, structure and antimicrobial activities of polymeric and nonpolymeric silver and other metal complexes. *RSC. Polymer chemistry series.* **10**: 153-207.
- 5) Melaiye A, Sun Z, Hindi K, Hemamalini K, Ely D, Remarker DH, Tessier CA and Youngs WJ (2005) Silver(I)-imidazole cyclophane gem-diol complexes encapsulated by electrospun tectophilic nanofilers: Formation of nanosilver particles and antimicrobial activity *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 2285 - 2291.
- 6) Ahamed BN, Dutta R and Ghosh P. (2013) Role of wingtip substituents on benzene-platform-based tetrapodal ligands toward the formation of a self-assembled silver carbene cage. *Inorg. Chem.* **52**: 4269-4276.
- 7) Budagumpi S, Haque RA, Endud S, Rehman GU and

Salman AW (2013) Biologically relevant silver(I)-N-heterocyclic carbene complexes : Synthesis, structure, intramolecular interactions and applications *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**: 4367-4388.

- 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(Hhis)]_n and {[Ag(Hpyrrld)]₂]_n in the solid state. *Inorg. Chem.* **39**: 3301-3311.
- 9) Bondi A (1964) van der Waals volumes and radii *J. Phys. Chem.* **68**: 441-451.
- 10) Wells AF (1975) *Structural Inorganic Chemistry, 4th Ed.* Oxford University Press, London.
- 11) Yu X-Y, Patrich BO and James BR (2006) New rhodium(I) carbene complexes from carbene transfer reactions. *Organometallics* **25**: 2359-2363.
- 12) Baker MV, Brown DH, Haque RA, Skelton BW and White AH (2004) Dinuclear *N*-heterocyclic carbene complexes of silver(I), derived from imidazolium-linked cyclophanes. *Dalton Trans.* **2004**: 3756-3764.
- 13) Kascalan-Nebioglu AK, Panzner MJ, Tessier CA, Cannon CL and Youngs WJ (2007) *N*-heterocyclic carbene-silver complexes: A new class of antibiotics. *Coord. Chem. Rev.* **251**: 884-895.
- 14) Regitz M (1996) Nucleophilic carbenes: An incredible renaissance. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 725-728.
- 15) Sakamoto R, Morozumi S, Yanagawa Y, Toyama M, Takayama A, Kasuga NC and Nomiya K (2016) Synthesis, characterization and structure-activity relationship of the antimicrobial activities of dinuclear *N*-heterocyclic carbene (NHC)-silver(I) complexes. *J. Inorg. Biochem.* **163**: 110-117.
- 16) Citta A, Schuh E, Mohr F, Folda A, Massimino ML, Bindoli A, Casini A and Rigobello MP (2013) Fluorescent silver(I) and gold(I)-*N*-heterocyclic carbene complexes with cytotoxic properties: mechanistic insights. *Metallomics* **5**: 1006-1015.
- 17) Bertrand B and Casini A (2014) A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans.* **2014**: 4209-4219.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

¹³C 2D INADEQUATE NMR による穴あきフラーレンの構造解析

田中輝彦¹ 高橋利和² 深谷訓久² 崔 準哲² 加部義夫^{1,3}

Structural Assignment of Open-Cage Fullerenes
by ¹³C 2D INADEQUATE NMR Spectrum

Teruhiko Tanaka¹, Toshikazu Takahashi², Norihisa Fukaya², Jun-Chul Choi²,
and Yoshio Kabe^{1,3}

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

² National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba city, Ibaraki 305-8565, Japan

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

Abstract: For the structural assignment of open-cage fullerenes, 30% ¹³C-enriched fullerene derivatives (**2** and **3**) were synthesized and their 2D ¹³C INADEQUATE experiments were carried out. The ¹³C NMR spectrum of **3** showed 56 fullereryl carbons together with two sp³ and two carbonyl carbons indicating C₁ symmetry. This difficulty of assignment was reduced using both relatively higher ¹³C enrichment, i.e., 30% compared with normal 10-15% enrichment, and Non Uniform Sampling (NUS). Without the employment of NUS, the 2D INADEQUATE spectrum of azafulleroid **2**, indicating 32 fullereryl carbons with C_s symmetry, only showed ca 50 Hz digital resolution, while the NUS-assisted 2D INADEQUATE spectrum of **3** showed ca 10 Hz digital resolution. A key element for assignment is that two bonded carbon atoms, i.e., three cross peaks, share a double quantum frequency in the vertical dimension (F1), while only one-bonded carbon atoms, i.e., two cross peaks, appeared in the horizontal dimension (F2). The spectrum of **3** reveals a 5-bond connectivity described between an amide carbonyl carbon (C1) and ketone carbonyl carbon (C6), providing unequivocal evidence for the orifice structure of **3**. Assignment of more than half a carbon sphere was also achieved on the basis of one-bonded ¹³C-¹³C connectivity and the examination of ¹³C-¹³C coupling (¹J_{cc}) values. ¹J_{cc} values of ¹³C-¹³C couplings for the single bond correlation showed bond alternation with fullerene's unique π system.

Keywords: Open-cage fullerene, ¹³C enriched, INADEQUATE NMR, NUS, ¹³C-¹³C coupling

序論

フラーレンならびにその誘導体など少数の¹Hしか持たない有機物のNMRによる構造解析においては多くの場合¹³C NMRが用いられる。芳香族領域の炭素が密に観測される場合、一次元¹³C NMRスペクトルではピークの本数以外には、結合や電子状態はおろか化合物の同定にも十分な情報が得られない。そこで推定構造とNMRピークとの関係を明確にするうえで最も強力な手法である2D INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment) が用いられる¹⁻³⁾。多くのフ

ラーレン系化合物についてこれが現在選択できる最良の方法と思われる⁴⁻¹⁰⁾。一般的には天然存在比の試料に対する適用は難しく、¹³Cエンリッチ(enrich)試料を用いることが必須である。

INADEQUATEはNMRスペクトル上に観測される核間の共有結合を見出すための手法であり、主に2次元NMRスペクトルとして単一分子に対して測定され、構造解析に用いられてきた。核間Jカップリングに基づくDQ(Double Quantum)コヒーレンスの検出によってNMRピーク間の相関を追跡す

ることにより、共有結合ネットワークを明確に把握できる。とくに ^{13}C - ^{13}C INADEQUATE において多用され、化合物構造の決定や ^{13}C シグナルのピークの帰属に用いられている。

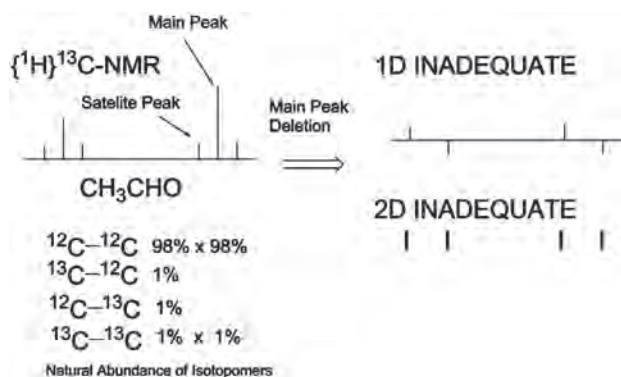


図 1. ^{13}C INADEQUATE スペクトルの原理。

高分解能、高感度で測定された（線幅<数 Hz, S/N 比 >200） ^{13}C スペクトルを注意深く見ると中心ピークから 30 Hz ほど隔たった左右のほぼ対称的な位置に、中心線に対する振幅 1/200 程度のサテライトシグナルが一對もしくはそれ以上現れることがある（図 1 参照）。このダブルットシグナルは、たまたま隣接する 2 個の炭素の双方が ^{13}C であるような分子の ^{13}C シグナルが J 結合により分裂して観測されるピークで、 ^{13}C サテライトと呼ばれる。サテライトピーク間の周波数の差は $^1J_{\text{CC}}$ に等しい。 J 結合している相手方のピークも 2 本に分かれていて、1 組の炭素・炭素結合につき最大 4 本のピークがサテライトとして現れる。天然存在比では ^{13}C は炭素全体の 1% 程度しかないのでサテライトピークは全炭素の 0.01% のマイナーな分子からのシグナルである。炭素ピーク間の共有結合という重要な情報を携えているが、感度不十分ということから INADEQUATE と名付けられた経緯がある。 ^{13}C エンリッチ試料を使えばこの問題は解決される。最近では様々な改良法も開発されている。

フラーレン化学のなかで、アザフレロイド¹¹⁻¹⁶ や穴あきフラーレン¹⁷⁻²⁰ は内包フラーレン²¹⁻²⁴ やヘテロフラーレン合成²⁵⁻²⁶ の重要な鍵中間体である。このうち穴あきフラーレンはその骨格が非対称なため、 ^{13}C NMR で非等価に 60 本の 4 級炭素が観測され、分子の対称性を利用して容易に構造を決定することができない。もし X 線結晶構造解析に適した単結晶が作成できないと、 ^{13}C - ^{13}C スピンカップリングを観測する INADEQUATE スペクトルの測定でしか構造を決定できない。我々はアザフレロイド (1) の一重項酸素酸化反応で生成する穴あきフラーレン (2)²⁷⁻²⁸ のヒドラジン²⁹ やジエン³⁰ との反応で穴あきフ

ラーレン誘導体 (3, 4 と H_2O @5) の生成を見出している。穴あきフラーレン誘導体 3 はいずれも非対称なために、反応が位置選択的に進んで単一生成物を与えているにもかかわらず、いくつかの構造異性体と区別することができない。我々は ^{13}C で 30% ラベルした C_{60} から合成した穴あきフラーレン誘導体 3 について ^{13}C INADEQUATE NMR の測定を行い、4 級炭素のつながりを明らかにすることで構造異性体を決定できることを報告した³⁰。

とくに NUS 法を 2D INADEQUATE スペクトルに応用すると、これまで適用されなかった非対称フラーレン炭素の半分以上を帰属できることが明らかになったので報告する。

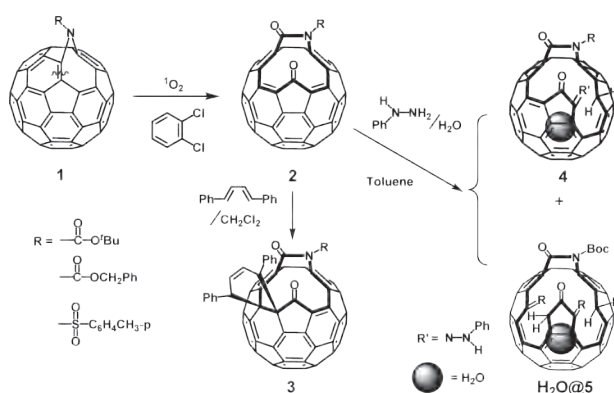


図 2. アザフレロイドと穴あきフラーレンの反応。

材料と方法

^{13}C エンリッチアザフレロイド (1) と穴あきフラーレン誘導体 (3) の合成

米国 MER 社より 30% エンリッチフラーレン C_{60} を購入し、それよりアザフレロイド (1) を既知の方法^{2e)} で合成した。1 の一重項酸素酸化と続く 1,4-ジフェニルブタジエンとの Diels-Alder 反応により 30% ^{13}C エンリッチ穴あきフラーレン誘導体 (3) を合成した³¹。

2D INADEQUATE の原理

基本的な 2D INADEQUATE 実験は 4 パルスからなるパルスシーケンスを用いて行われる。図 3 にそのシーケンスを示すが、最初の二つのパルス $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau -$ によってエコーを生成し、第 3 の 90° パルスの位相回しによって SQ (Single Quantum) コヒーレンスに基づくメインピークを消去し、DQ (Double Quantum) コヒーレンスに基づくサテライトピークのみを選択してそれをいったん縦磁化とし、 t_1 時間 DQ コヒーレンスの下に展開させたのち、 90° 倒して SQ シグナルとして検出する。最初の 3 パルス間に設定される時定数 τ は $1/(4J)$ に選ばれ、この間に 2 本のサテライトピークは J 結合によって逆位相に

展開される (図 1 参照)。第 3 パルス後にこのふたつのサテライトピークは $\pm z$ 磁化となり、同時にメインピークは消去される。これらの磁化ベクトルはふたつの結合した ^{13}C の共鳴周波数の和周波数で展開するため、互いに結合した 2 個の ^{13}C による 2 対の正負逆位相のピークペアが t_1 に対して同じ周波数で振動し、最終的に J だけ離れた正負の位相をもつピークペアとして、互いに結合した炭素同士が F1 軸上の同じ周波数ライン上に 2 組、F2 軸上のそれぞれのサテライトピークの位置に正負逆位相からなる交差ピークペアとして現れる (図 1 参照)。

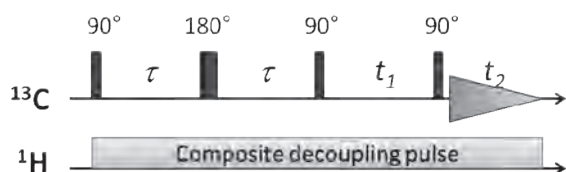


図 3. ^{13}C INADEQUATE スペクトルのパルスシーケンス。

2D スペクトルを効率よく取得するために INADEQUATE では F2 軸の観測幅を見たい信号の左右ぎりぎりに設定する。このとき F1 軸の幅は F2 軸の 2 倍になるよう設定する必要がある。F1 軸の周波数範囲が広がるため、F1 軸上の分解能を向上させるには t_1 軸上の多数のポイントについて FID を取得しなければならなくなり、このことがもうひとつの制約となる。このため F1 軸上において高分解能の情報が得たい場合、スペクトル範囲を限ってその一部に関する測定が行われる。この場合、F2 軸上の観測範囲外のピークは自動的にフィルターされるが F1 軸上の観測範囲外のピークには同様のフィルターを設けることができないので 2D データ取得方法に依存して折り返し (Folded) もしくは繰り上がり (繰り下がり) (Aliased) ピークとして別の場所に現れるため、注意が必要となる。

2D スペクトルの位相情報は F1 軸側のデータ取得時の位相を制御して疑似的に複素数データを発生させることで行われる。ここではこのための方法として States-TPPI を選択した。これは同じ t_1 データについて 90° 位相をずらしたデータを取得して F1 軸上の虚数データとして用いる方法である。これによりセンターにアキシャルピークと呼ばれるアーティファクトが生じにくくなる。また測定範囲をはみ出した位置にあるピークは F1 軸上の繰り越しピーク (aliased peak) として、ひとつの端からはみ出し分が反対側の端から繰り上がった (繰り下がった) 場所に観測される。

2D INADEQUATE のひとつの限界はケミカルシ

フトも J_{CC} も近いピークが重なって分離困難になる場合があることと、 $J \ll \Delta\nu_0$ (結合している 2 個のピーク間の差周波数) が成立しない場合、2 対 4 本のピークペア対全体のうち特に外側の 2 本のピークが観測されにくくなることである。分離困難なピークが隣接する場合、結合の追跡が不可能となる。外側のピークも観測するために $\tau = 3/(4J)$ に設定する手法等も提案されているが、複数の近接 ^{13}C スピンによるカップリングが影響しているためか今回行った実験については有効な結果が得られなかった³⁾。

2D INADEQUATE NMR の感度向上と NUS 法

INADEQUATE の場合、ひとつの ^{13}C の周囲にどのくらいの確率で第二、第三の ^{13}C が存在するかが問題となる。感度とスペクトルの複雑さの双方への影響を考慮して 30% エンリッチ体を用いて INADEQUATE 実験に用いた。このひとつの正の効果として、パルスシーケンス間の待ち時間を通常 10 秒待たなければならないところを 2 秒で 98% 以上の初期磁化を回復できることが確認できた。

INADEQUATE 実験では最低でも 32 回の積算を行わなければならない。パルスインターバルを 2 秒に設定しても一点の FID を取得するために 1 分半以上の時間がかかるため、丸一日かけても 900 点の t_1 ポイントの FID を取得するのが限界である。一方 F1 軸上の必要な分解能は例えばアルキル炭素からカルボニル炭素までの 140 ppm (14 kHz) の幅を見たい場合、F1 軸上のスペクトル幅は 28 kHz となり、分解能は約 30 Hz までしか得られない。同じ測定時間でより高い分解能を得るためには次に述べる NUS (Non-uniform Sampling) を援用して F1 軸データを間引いて取得することが必要であった。

NUS (Non-uniform Sampling)³¹⁾ は多次元 NMR のためにデータ取得点数を節約し、効率を向上させるための手法で最近たんぱくの多次元 NMR に必ず用いられている。前世紀末から用いられてきた 1D スペクトルにおけるリニアプレディクションは最大エントロピー法などにより実験的に得られていないデータを都合の良いように作りだすような印象があったためか必ずしも有効活用されてこなかった。しかし 3 次元以上のスペクトルの取得においてはデータ取得点数の省略が不可欠となる。

NMR で必要なデータは基本的にシャープなローレンツ曲線かガウス曲線の集合である。またはどんな NMR スペクトルもローレンツ曲線かガウス曲線の和であらわすことができる。それを作り出すために必要なパラメータは一本のピークについてその中心周波数と線幅 (時定数の逆数) の 2 個しかない。

したがって高々ピーク数×2個のパラメータを得る目的と比較してFIDで集めているデータの点数は溶液の場合一般に3万点以上×F1軸側最低256点と多く、これを効率化したいという欲求はFT NMRの開発当初から当然のようにあった。一方、通信や信号処理の世界では限られたバンドパスにどれだけ多くの情報を押し込めるかなど、データの圧縮とその復号技術が種々開発され最適化が図られてきた。こうして発展した信号処理技術にNMRの専門的知識を加えて開発された新しい手法がここ十年ほどの間に相次いで報告された。その中にTOPSPIN3.2に採用された2種類の手法がMdd法(Multi-dimensional Decomposition)とCS法(Compressed sensing)である³²⁻³³⁾。いずれもt1データポイントの一部が間引かれた不完全なフーリエ変換前のFIDデータをもとにノルム最小化アルゴリズムによって完全な推定FIDデータセットを生成し、最終的なフーリエ変換に用いて多次元NMRスペクトルを得る手法であり、推定されるスペクトルのノルムを最小化することによって求められるという点で同じであるが、ノルムの取り方や最適化の際に課される条件に違いがある。ノルムとはベクトルの(抽象的な)長さを表現する実数のことで、ユークリッドノルム($\sqrt{\sum |x_i|^2}$)が代表的であり、 l_1 ノルムと呼ばれる。Mddは特に3次元以上のNMRに有効な手法とされ、いくつかのパラメータを指定する必要がある。一方CSは必要な分解能に対応するFID×t1データポイント中の何%を取得するかだけを決めればよい。一般的にはアーティファクトを抑えるために25%から最低でも12%程度のデータを取得するべきであるとされている。我々はCSを選択した。専門的なその詳細には立ち入らないがCSはt1データポイントを間引いて得られたデータから l_1 ノルム最小化アルゴリズムにより任意性なく一意に決定されるデータを生成する方法を用いている。ひとつのデータセットからはひとつの2Dデータしか生成されないため、前述のような心理的な抵抗も少ない。2D実験においてはもっぱらこの手法を用いればよいとされる。

NUSによって得られる2Dスペクトルは最初パワースペクトルとして得られるため、ヒルベルト変換をほどこして複素数データを生成しなおしたのち、位相補正を行った。結果的に得られたスペクトルは標準的な交差ピークの高さの半分程度の高さを持つ細いスパイク状のノイズが多数みられたものの、シグナルとノイズの区別はピーク幅と上下逆位相のシグナルのみを見出すことでアーティファクトと見誤ることがなかった。

2D INADEQUATE NMR 測定の実際

測定および解析はブルカー・バイオスピン社製、AVANCEIII 400M上、Topspin 3.2を用いた。パラメータとして用いる J_{cc} は60 Hzに設定した。2次元実験はF1軸中心にアーティファクトが出ないようF1軸側データをStates-TPPIにより取得した。またt1軸側データ取得にNUSを設定し、12.5%から25%の範囲でデータを取得した。

一個のt1につき実部・虚部各32回の積算を行った。1800点のt1のうちランダムに選ばれた384×2点についてのみデータを取得し、高分解能データについては1600点のうち256×2点のt1についてFIDデータを取得し(それぞれ、t1データポイント全体の22.2%と13.7%)、残りのt1の全FIDデータをCS法に従って自動生成ののち、フーリエ変換を行って二次元スペクトルを得た。これによって、それぞれF1軸分解能は40 Hz、9 Hzとなった。後者は待ち時間2秒で取得され、12時間を費やした。一部の $J \sim \Delta \ll 0$ の一部のピークについては4本のピークのうち内側の2本のピークのみを用いて結合検出に用いた。

2つの異なるスペクトル幅、すなわち全部の範囲ともう1つはF2軸方向の高解像度スペクトルをえるために、アミド・カルボニルとフラーレン骨格炭素領域の範囲に限定した。F1軸で相関関係のある3つの交差したピークの組を観測した。

データ処理はBruker社製のTopspin3.5を用いて行った。F1スライスをもとに1D NMR用のピークピッキングの操作を行い、このデータを2D NMRの解析に適用した。得られたピークファイルの中のF1とF2の化学シフト(ppm)を表計算ソフトで処理し、互いにF1軸上の同じ値を有し等価なカップリングをもつ2組の相関ピークとF2軸上の同じ化学シフトを有する最大3組みの相関ピークを検出しカップリング定数と化学シフトの算出を行った。

結果的に半分以上の炭素に対して十分な確度での帰属に成功し、のこりすべての炭素についても同定を行った。

結果と討論

NUS法を用いない¹³Cエンリッチアザフレロイド(1)の¹³C 2D INADEQUATE スペクトル

一般に C_1 対称の穴あきフラーレンの合成前駆体であるアザフレロイド(1)は C_3 対称であるため、フラーレン骨格炭素は32本のピークが観測される。 C_1 対称のフラーレン誘導体よりは、より分解能の良いスペクトルが得られることを予想して、30% ¹³Cエンリッチしたアザフレロイドの¹³C 2D INADEQUATE

を NUS 法を適用しないで測定を行った。その結果を図 4 に示す。F1 軸側の TD = 192 で 50 ppm 分だけに観測領域を絞ったために、F1 軸の SW \approx 100 ppm になっている。それにもかかわらず F1 軸の分解能は 50 Hz に過ぎず、縦に長く伸びたピークしか得られなかった。待ち時間 10 秒で 32 回の位相まわしが必要なため、18 時間の実験におけるこれが限界である。図 4 から予想される 32 本のフラーレン骨格炭素の中で、F1 軸に同じ大きさのカップリングを有する 2 組の相関ピークが 13 組確認できるが、アザフレロイド (1) のどのフラーレン炭素か帰属できない。その原因は、低い分解能であることのほか、炭素のつながりを解析する起点となるフラーレン骨格炭素ピークが、他のフラーレン骨格炭素の中に埋もれていることが上げられる。最初にアザフレロイドの合成とその構造決定について Wudl らは ^{15}N ラベル誘導体の ^{13}C NMR から、N 原子と結合しているフラーレン骨格 sp^2 炭素が 3 本に分裂することを報告している¹⁰⁾。この sp^2 炭素はフラーレン炭素ピークの中に埋もれているので、炭素つながりの起点として使えない。

そこで、以後 NUS 法を使って F1 軸側のサンプリングをまばらに行うことを通じて同じ測定時間での分解能を大幅に向上することを試みた。

NUS 法を用いた ^{13}C エンリッチ穴あきフラーレン誘導体 (3) の ^{13}C 2D INADEQUATE スペクトル

NUS 法を用いた ^{13}C 2D INADEQUATE スペクトル

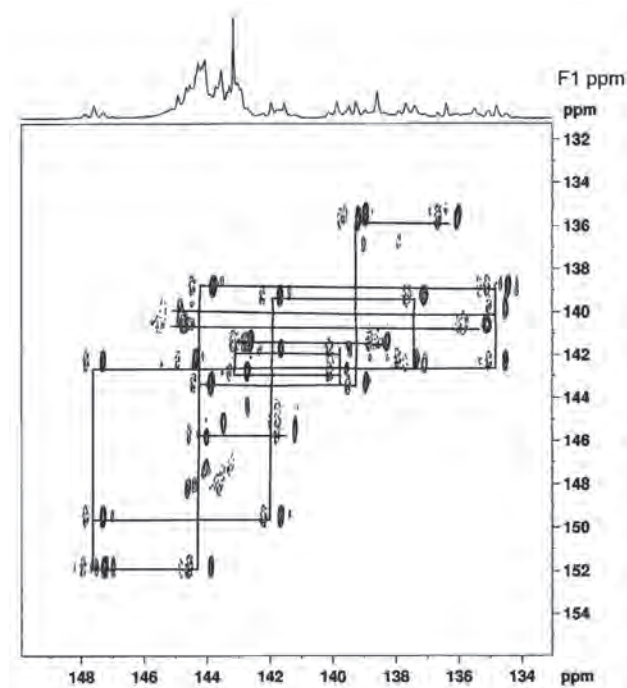


図 4. ^{13}C エンリッチアザフレロイド (1) の ^{13}C 2D INADEQUATE NMR スペクトル (100 MHz, CDCl_3).

は測定範囲をかえて 2 回実験を行った。1 つはフラーレン sp^3 炭素、フラーレン sp^2 炭素、そしてアミドカルボニル炭素とケトン炭素を含む全範囲で、もう一つは、フラーレン sp^2 炭素とアミドカルボニル炭素に限定された範囲である。NUS 法を用いサンプリングデータを 1/5 程度に低減することで、24 時間

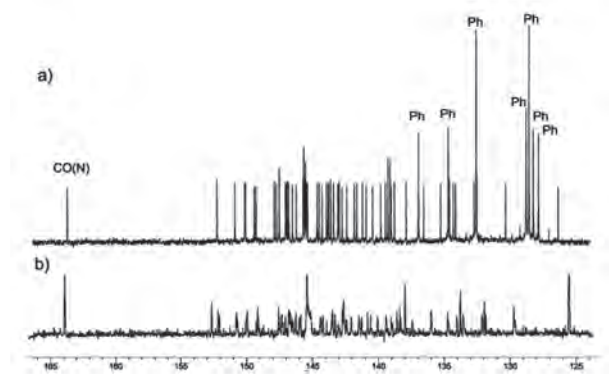


図 5. 非 ^{13}C エンリッチと ^{13}C エンリッチ穴あきフラーレン誘導体 (3) の ^{13}C 1D NMR の比較。

で分解能約 10 Hz を達成することができた。

その分解能を比較するために、図 5 に限定した範囲の F2 軸方向の投影スペクトルと非 ^{13}C エンリッチ 1D ^{13}C NMR の比較を示した。1D ^{13}C NMR ほどではないが、いずれのピークも鋭くなっており、図 4 の F2 軸の投影スペクトルと比較すると、大きな差が見られた。フラーレン炭素のみを ^{13}C エンリッチした誘導体なので、1,4-ジフェニルブタジエンのフェニル基炭素は殆ど観測されず、さらに、 ^{13}C - ^{13}C カップリングで約 0.5 – 1.0 ppm 幅に分裂したピークの重なりなので非 ^{13}C エンリッチの ^{13}C 1D NMR とは精確に一致しない。しかしおよその対応は識別できる。 ^{13}C の濃度が高いため、遠方の ^{13}C からの多数の J 結合の影響のために線幅が広がっているが識別できる分解能のスペクトルを示した。穴あきフラーレン誘導体 (3) の 2D ^{13}C INADEQUATE NMR

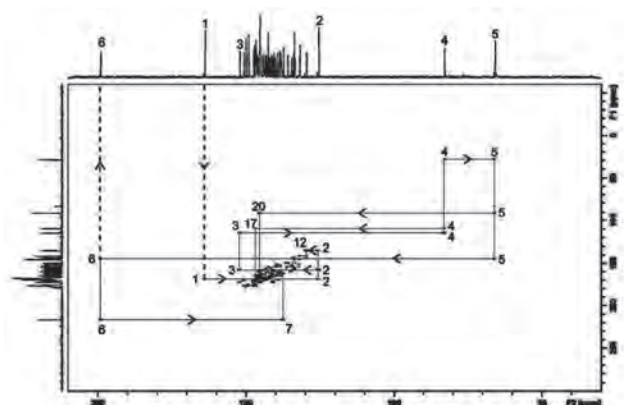


図 6. ^{13}C エンリッチ穴あきフラーレン誘導体 (3) の 2D ^{13}C INADEQUATE NMR スペクトル (全範囲).

スペクトル（全範囲）を図6に示す。図6よりジエン部分の sp^3 炭素（4, 5）やアミドカルボニル炭素（1）、ケトンカルボニル炭素（6）がフラレン骨格炭素から分離しているため、炭素のつながりを解析する起点として利用できる。すなわち、図7のシュリーゲル図に見るように、アミドカルボニル炭素（1）→2→3→4→5→ケトンカルボニル炭素（6）へフラレン sp^2 炭素がつながっており、穴あきフラレンの開口部周辺の構造を明らかにできた。この結果に基づいて、Diels-Alder 付加反応で生成する位置異性体について構造決定できることを報告した³⁰。

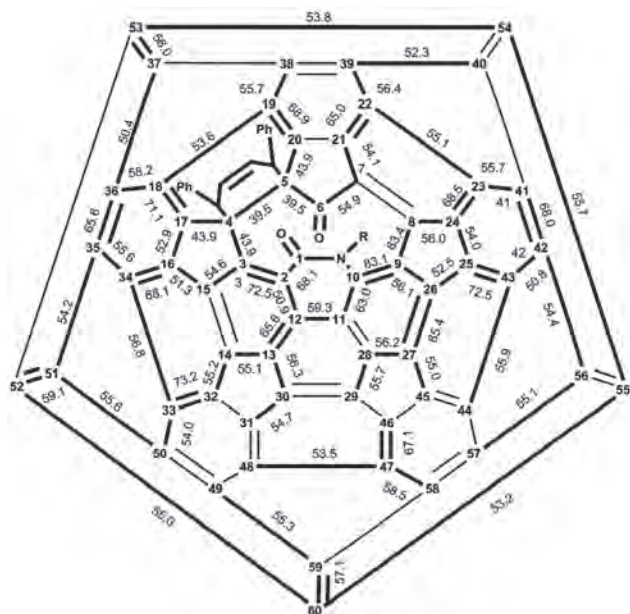


図7. 穴あきフラレン誘導体(3)のシュリーゲル。太字は2D ^{13}C INADEQUATE NMRからの炭素炭素結合のつながりと数値はその ^{13}C - ^{13}C カップリング定数(Hz)。

次に、フラレン骨格炭素の sp^2 炭素間のつながりを明らかにするために、測定範囲を(F2軸、約120–170 ppm)に限定して実験を行った。得られた2D ^{13}C INADEQUATE NMRスペクトルを図8に示す。関連ピークが密集しているため、図8をF1軸報告に3分割して、図9–図11に示した。3分割すると、関連ピークの密集の程度に差があることが理解できる。図9と図10では密集の程度も高くなく、F2軸方向に2組のダブルットピークとF1軸方向に3組のダブルットピークが多く関連しているのがわかる。フラレン炭素の番号づけは、フラレンの命名法にしたがって、官能基化された炭素を1番として、そこから外側かららせん状に炭素番号をつけた。すると図9と図10でフラレン骨格の帰属の番号はアミドカルボニル(1)とケトンカルボニル(6)の周辺の番号で小さく、化学シフトも差も大きいので帰属できることになる。一方図11に示すように開口部

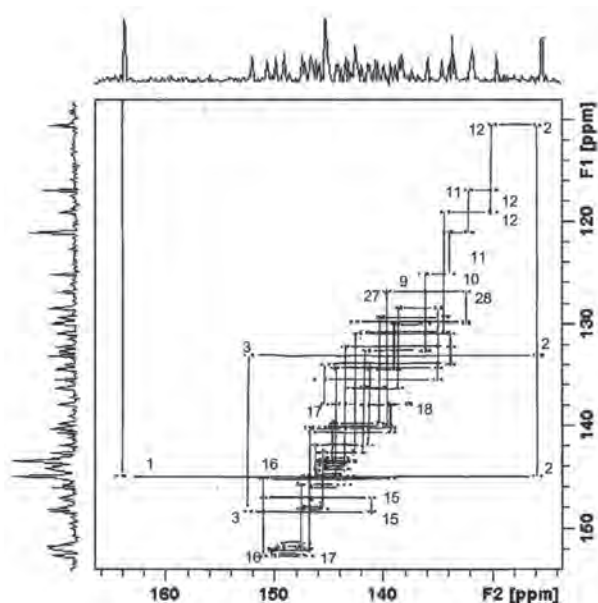


図8. ^{13}C エンリッチ穴あきフラレン誘導体(3)の2D ^{13}C INADEQUATE NMRスペクトル(限定範囲)。

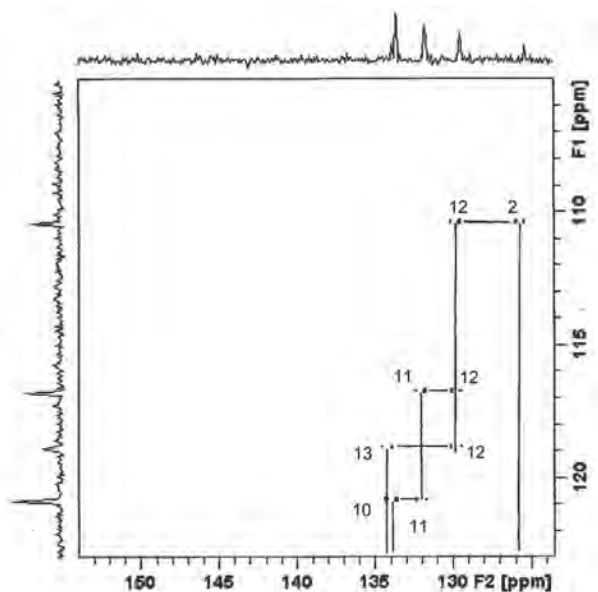


図9. 図8の拡大(F1 94–125 ppm)。

周辺から遠くフラレン球の反対側になり、番号も大きいと化学シフトも約144–145 ppm付近に密集してきて帰属が困難となる結果である。

フラレン骨格炭素について帰属できた炭素の連結とその ^{13}C - ^{13}C カップリング定数、さらにはカップリングしたダブルットピークの平均した中央値から求めた化学シフトを表1にまとめた。フラレン骨格炭素の番号が大きくなるに従い、関連ピークが観測されなくなっているのがわかる。これは、カップリング定数(J)と化学シフトの差($\Delta\delta$)の比が小さくなることで、非一次のスペクトルになり、ピークが変形して2組みのダブルットピークの外側

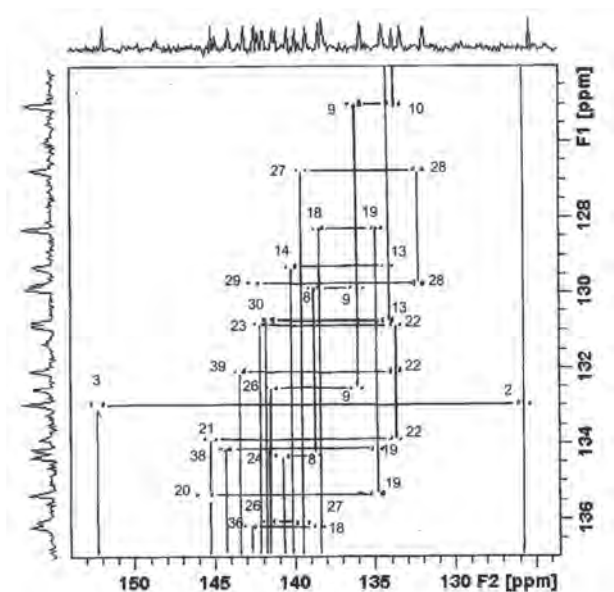


図 10. 図 8 の拡大 (F1 24 ~ 137 ppm).

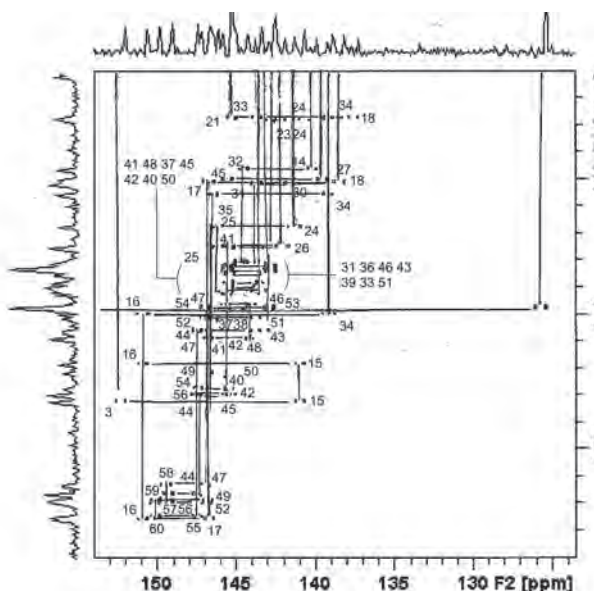


図 11. 図 8 の拡大 (F1 136 ~ 154 ppm).

が変形して小さくなったり消失したりするためである。図 7 に示すシュリーゲル図の太線は、前述の開口部周辺以外に観測できたフラーレン球の炭素連結と ^{13}C - ^{13}C カップリング定数も示されている。この ^{13}C - ^{13}C カップリング定数の大きさを見ると、フラーレン骨格がもつ [5,6] 結合と [6,6] 結合に対応する結合交替を反映していることがわかる。すなわち $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-C}(\text{sp}^3)$ 結合は約 48 Hz と小さく、長い [5,6] 結合では 53-59 Hz と大きくなり、短い [6,6] 結合ではさらに 65-71 Hz と大きくなることが知られている。番号の大きい炭素になると、この結合交替も必ずというわけではなく、これはピークの密集によりピークの非一次化による変形が原因と考えられる。しか

し結合交替はフラーレンの π 系は共役せずに独立したポリオレフィンとの理解を支持する結果である。

まとめ

2D ^{13}C INADEQUATE NMR によるフラーレン誘導体の構造決定を検討した。高分解能なスペクトルを得るために通常より高い ^{13}C エンリッチ試料 (30%) と NUS 法を適用した。穴あきフラーレンの合成前駆体で、骨格炭素が 32 本存在する C_{32} 対称のアザフレロイドを NUS 法を用いず 1 日測定したところ、スペクトルの分解能は 50 Hz で、フラーレン骨格炭素の帰属には至らなかった。一方で、フラーレン骨格炭素が 60 本存在する、非対称 (C_{11}) な穴あきフラーレン誘導体に NUS 法を適用したところ、分解能 10 Hz が実現し、開口部周辺の構造はもちろん、フラーレン球のおよそ半分以上のつながりを ^{13}C - ^{13}C カップリング定数とともに決定することができた。 ^{13}C - ^{13}C カップリング定数はフラーレン特有の結合交替を示した。

謝辞

本研究は研究課題「穴あきフラーレン類の ^{13}C INADEQUATE NMR スペクトルによる構造解析」として (RIIS201606) 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成を受けて行いました。

文献

- 1) Bax A, Freeman R and Frenkiel TA (1981) An NMR technique for tracing out the carbon skeleton of organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 2102-2110.
- 2) Bax A, Freeman R and Kempell SP (1980) Natural abundance ^{13}C - ^{13}C coupling Observed via double-quantum coherence. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 4849-4851.
- 3) Bax A and Freeman R (1980) Investigation of ^{13}C - ^{13}C couplings in natural abundance samples: The strong coupling case. *J. Magn. Reson.* **41**: 507-511.
- 4) Hawkins JM, Loren S, Meyer A and Nunlist R (1991) 2D nuclear magnetic resonance analysis of osmylated C_{60} . *J. Am. Chem. Soc.* **113**:7770-7771.
- 5) Hawkins JM (1992) Osmylation of C_{60} : proof and characterization of soccer-ball framework. *Acc. Chem. Res.* **25**: 150-156.
- 6) Hawkins JM, Meyer A, Lewis TA, Bunz U, Nunlist R, Ball GE, Ebbesen T W and Tanigaki K (1992) Regiochemistry of the bisosmylation of C_{60} . "Ortho, meta and para" in three dimensions. *J. Am. Chem. Soc.* **114**:7954-2955.
- 7) Iwamatsu S-I, Ono F and Murata S. (2003) A novel migrative addition of hydrazines to the diketone derivative of C_{60} . *Chem. Comm.* **2003**: 1268-1269.
- 8) Tsuchiya T, Wakahara T, Maeda Y, Akasaka, T, Waelchli M, Kato T, Okubo H, Mizorogi N, Kobayashi K and Nagase S (2005) 2D NMR characterization of

表 1. 穴あきフラーレン誘導体 (3) の炭素連結と ^{13}C - ^{13}C カップリング

C atom number	Chemical shift δ [ppm] ^{a)}	Single-bond correlation (C atom number) $^1\text{J}_{\text{C-C}}$ (Hz)	C atom number	Chemical shift δ [ppm] ^{a)}	Single-bond correlation (C atom number) $^1\text{J}_{\text{C-C}}$ (Hz)
1	169.7	(2) 68.1	31	143.6	(30) 54.7 ^{c)}
2	125.6	(1) 68.1, (3) 72.5, (12) 52.7	32	144.5	(14) 55.2, (33) 73.2 ^{c)}
3	152.3	(2) 69.8, (4) 43.9, (15) 54.6	33	143.6	(32) 73.2, (34) 56.8, (50) 54.0
4	83.1	(3) 43.9, (5) 39.5, (17) 43.9	34	139.1	(16) 68.1, (33) 56.8, (35) 55.6
5	66.0	(4) 39.5, (6) 39.5, (20) 43.9	35	146.4	(34) 55.6, (36) 65.6, (51) 54.2
6	199.2	(5) 39.5, (7) 54.9	36	142.7	(18) 58.2, (35) 65.6, (37) 50.4
7	137.5	(6) 54.9, (21) 54.1 (8) ^{b)}	37	145.5	(36) 50.4, (53) 56.0 ^{c)}
8	138.7	(7) ^{b)} , (9) 63.4, (24) 56.0	38	144.3	(19) 55.7 ^{c)}
9	136.1	(8) 63.4, (10) 83.0, (26) 56.1	39	143.4	(22) 56.4, (40) 52.3 ^{c)}
10	133.8	(9) 83.0, (11) 63.0	40	145.4	(39) 52.3 ^{c)}
11	132.0	(10) 63.0, (12) 59.3 (28) ^{b)}	41	145.3	(23) 55.7, (42) 68.0 ^{c)}
12	129.7	(2) 50.9, (11) 59.3, (13) 65.6	42	145.3	(41) 68.0, (43) 50.8, (56) 54.4
13	134.1	(12) 65.6, (14) 55.1, (30) 56.3	43	143.2	(25) 72.5, (42) 50.8, (44) 55.9
14	140.1	(13) 55.1, (32) 55.2 (15) ^{b)}	44	147.4	(43) 55.9 ^{c)}
15	140.9	(3) 54.6, (16) 51.3 (14) ^{b)}	45	145.5	(27) 55.0 ^{c)}
16	150.9	(15) 51.3, (17) 52.9, (34) 68.1	46	142.8	(47) 67.1 ^{c)}
17	146.7	(4) 43.9, (16) 52.9, (18) 71.1	47	146.8	(46) 67.1, (48) 53.5, (58) 58.5
18	158.4	(17) 71.1, (19) 52.6, (36) 58.2	48	144.0	(47) 53.5 ^{c)}
19	134.8	(18) 53.6, (20) 68.9, (38) 55.7	49	146.9	(59) 55.3 ^{c)}
20	145.5	(5) 43.9, (19) 68.9 (21) ^{b)}	50	145.4	(33) 54.0, (51) 55.6 ^{c)}
21	145.2	(7) 54.1, (22) 65.0 (20) ^{b)}	51	143.7	(35) 54.2, (50) 55.6, (52) 59.1
22	133.6	(21) 65.0, (23) 55.1, (39) 56.4	52	146.9	(51) 59.1, (60) 55.0 ^{c)}
23	142.1	(22) 55.1, (24) 68.5, (41) 55.7	53	142.8	(37) 56.0, (54) 53.8 ^{c)}
24	140.6	(8) 56.0, (23) 68.5, (25) 54.0	54	146.8	(53) 53.8, (55) 55.7 ^{c)}
25	146.1	(24) 54.0, (26) 52.5, (43) 72.5	55	147.4	(54) 55.7, (60) 53.2 ^{c)}
26	141.4	(9) 56.1, (25) 52.5, (27) 65.4	56	147.6	(42) 54.4, (57) 55.1 ^{c)}
27	139.5	(26) 65.4, (28) 56.2, (45) 55.0	57	149.3	(56) 55.1 ^{c)}
28	132.2	(11) ^{b)} , (27) 56.2, (29) 55.7	58	149.4	(47) 58.5 ^{c)}
29	142.5	(28) 55.7, (30) ^{b)} , (46) ^{b)}	59	150.0	(49) 55.3, (60) 57.1 ^{c)}
30	141.5	(13) 56.3, (29) ^{b)} , (31) ^{b)}	60	150.1	(52) 55.0, (55) 53.2, (59) 57.1

[a] Averaged median chemical shifts between ^{13}C - ^{13}C couplings.

[b] Correlation peaks were observed imperfectly.

[c] No correlation peak was observed between carbons.

the La@C₈₂ anion. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**:3282-3285.

- 9) Yamada M, Wakahara T, Lian Y, Tsuchiya T, Akasaka T, Waelchli M, Mizorogi N, Nagase S and Kadish KM (2006) Analysis of lanthanide-induced NMR shifts of the Ce@C₈₂ anion. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 1400-1401.
- 10) Chaker L, Ball GE, Williams JR, Burley GA, Hawkins BC, Keller PA and Pyne SG (2005) Synthesis of novel e-edge-[60]fullerenylmethanodihydropyrroles and 1,2-dihydro-methano-[60]fullerenes. *Eur. J. Org. Chem.* **24**: 5158-5162.
- 11) Prato M, Li QC, Wudl F and Lucchini V (1999) Addition of azide to C₆₀: Synthesis of azafulleroid. *J. Am. Chem. Soc.* **115**:1148-1150.
- 12) Grösser T, Prato M, Lucchini V, Hirsch A and Wudl F (1995) Ring expansion of the fullerene core by highly regioselective formation of bisazafulleroids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **34**:1343-1345.
- 13) Nakahodo T, Okada M, Morita H, Yoshimura T, Ishitsuka MO, Tsuchiya T, Maeda Y, Fujihara H, Akasaka T, Gao X and Nagase S (2008) [2+1] Cycloaddition of nitrene onto C₆₀ revisited: Interconversion between an aziridinofullerene and azafulleroid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**:1298-1300.
- 14) Hachiya H, Kakuta T, Takami M and Kabe Y (2009) Syntheses and crystal structures of azafulleroid and aziridinofullerene bearing silyl and germyl benzene. *J. Organometallic Chem.* **694**:630-636.
- 15) Nagamachi T, Takeda Y, Nakayama K and Minakata S (2012) Selective functionalization of fullerenes with *N,N*-dihalosulfonamides as an N1 unit: Versatile syntheses of aza[60]fulleroids and aziridino[60]fullerenes and their application to photovoltaic cells. *Chem. Eur. J.* **18**:12035-12045.
- 16) Hummelen C, Prato M and Wudl F (1995) There is a hole in my bucky. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 7003-7004.
- 17) Iwamatsu S-I and Murata S (2005) Open-cage fullerenes: Synthesis, structure and molecular encapsulation. *Synlett* **2005**: 2117-2129.
- 18) Vougioukalakis GC, Roubelakis MM and Orfanopoulos M (2010) Open-cage fullerenes: towards the construction of nanosized molecular containers. *Chem. Soc. Rev.* **39**: 817-844.
- 19) Gan L, Yang D, Zhang Q and Huang H (2010) Preparation of open-cage fullerenes and incorporation of small molecules through their orifices. *Adv. Mater.* **22**: 1498-1507.
- 20) Shi L and Gan L (2013) Open-cage fullerenes as

- tailor-made container for a single molecule. *J. Phys. Org. Chem.* **26**: 766-772.
- 21) Rubin Y (1997) Organic approaches to endohedral metallofullerenes: cracking open or zipping up carbon shells? *Chem. Eur. J.* **3**: 1009-1016.
- 22) Murata M, Murata Y and Komatsu K (2008) Surgery of fullerenes. *Chem Commun.* Vol. 6083-6094.
- 23) Komatsu K, Murata M and Murata Y (2005) Encapsulation of molecular hydrogen in fullerene C_{60} by organic synthesis. *Science* **307**: 238-240.
- 24) Kurotobi K and Murata Y (2011) A single molecule of water encapsulated in fullerene C_{60} . *Science* **333**: 613-616.
- 25) Vostrowsky O and Hirsch A (2006) Heterofullerenes *Chem.Rev.* **106**:5191-5207.
- 26) Rotas G and Tagmatarchis N (2016) Azafullerenes C_{59}N in donor-acceptor dyads: synthetic approaches and properties. *Chem. Eur. J.* **22**:1206-1214.
- 27) Kabe Y, Hachiya H, Saito T, Shimizu D, Ishiwata M, Suzuki K, Yakushigawa Y and Ando W (2009) Diastereoselective syntheses and oxygenation of silyl fullerenes. *J. Organometal Chem.* **694**: 1988-1997.
- 28) Hachiya H and Kabe Y (2009) Production of a 15-membered ring orifice in open-cage fullerenes by double photooxygenation of azafulleroid. *Chem. Lett.* **38**: 372-373.
- 29) 志村慶太, 石田卓也, 金子 愛, 竹内寛貴, 関野隼人, 綿貫宣裕, 鈴木康之, 横山 宙, 安藤 亘, 加部義夫 (2012) 穴あきフラーレンケトラクタム誘導体のヒドロアミノ化反応と水内包. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**:27-37.
- 30) Tanaka T, Nojiri R, Sugiyama Y, Sawai R, Takahashi T, Fukaya N, Choi J-C and Kabe Y (2017) Orbital-controlled regioselective diels-alder reaction on the rim of open-cage ketolactam derivatives of C_{60} . *Org. Biomol. Chem.* in submission.
- 31) Hyberts S G, Arthanari H and Wagner G (2011) Applications of non-uniform sampling and processing. *Topi. of Curr. Chem.* **316**: 125-148 and references therein.
- 32) Holland DJ, Bostock MJ, Gladden LF and Nietlispach D (2011) Fast multidimensional NMR spectroscopy using compressed sensing. *Angew. Chme. Int. Ed.* **50**: 6548-6551.
- 33) Kazimierczuk K and Orekhov VY (2011) Accelerated NMR spectroscopy by using compressed sensing. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**:5556-5559.

■原 著■

アレロパシー活性のハイスループットバイオアッセイ法開発 —画像解析を加えたプロトプラスト共培養法—

笹本浜子¹ 安積良隆^{1,2,3} 鈴木季直^{1,2}

Development of a High-Throughput Bioassay Method of Allelopathy
— Protoplast Co-Culture and Digital Image Analysis —

Hamako Sasamoto¹, Yoshitaka Azumi^{1,2,3} and Suechika Suzuki^{1,2}

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

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

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

Abstract: The protoplast co-culture method was previously developed as an *in vitro* bioassay method to assess allelopathic activities of various test plants and putative allelochemicals. The numbers of non-spherically enlarged and divided protoplasts of recipient lettuce, in 50 μ L of liquid medium in a well of a 96-well culture plate, were counted under an inverted microscope, whose counting needed skill and was time-consuming. In this report, we noted the accumulation of a yellow substance during the growth of lettuce protoplasts, and developed a simple high-throughput bioassay method of allelopathy in combination with digital image analysis. From the digital images obtained by scanning of 96-well culture plates using two common scanners, the yellow substance of each well was repeatedly quantified by image analysis using the softwares Image J and Excel. The yellow substance of lettuce protoplast precipitates was extracted using Triton X-100, and identified as a carotenoid. The 'digital image analysis-protoplast co-culture method' was efficient to demonstrate the inhibitory allelopathic effect of leaf protoplasts of a test plant, *Arabidopsis thaliana* var. Columbia.

Keywords: allelopathy, digital image analysis, *in vitro* bioassay, protoplast culture

序論

アレロパシー（他感作用）は、ある植物から放出される化学物質が、他の生物に何らかの影響を及ぼす現象であり、広義には、動物や微生物に対する影響や、生長促進効果なども含まれるが¹⁻²⁾、侵入外来植物によるインパクトや、農業における雑草防除への利用など、他の植物に対する生長阻害作用を指すことが多い。アレロパシー物質は、ある植物が生産する、他の隣生植物（レシピエント植物）に対して生長阻害の活性を持つ化学物質と言える。これまで、アレロパシー活性のインビトロバイオアッセイ法として、検定する試験植物の乾燥葉を用いた「サンドイッチ法」や生きた苗の根を用いた「プラントボックス法」が開発され、レシピエント植物としてレタス (*Lactuca sativa*) 芽生えの胚軸や根の伸長に対する阻害活性を

定量する試みが、非常に多くの試験植物において行われた¹⁻⁴⁾。しかしアレロパシー物質の特定や、その細胞レベルの分子機構は未だ未解明で残されているものが多い。著者らは、この機構解明に寄与するために、新規のインビトロバイオアッセイ法として、「プロトプラスト共培養法」を最近開発した⁵⁾。それは96穴シャーレの各50マイクロリットルの微量液体培養中で、アレロパシー試験植物のプロトプラストと、レシピエント植物のプロトプラストを、各プロトプラスト密度を変化させ共培養し、レシピエント植物のプロトプラストの生長（細胞壁形成や、細胞分裂）に対する影響を倒立顕微鏡観察により計数定量する方法である。この方法により試験植物として草本マメ科植物ハッショウマメ *Mucuna pruriens*

のプロトプラストと、レシピエントとしてレタスおよびイネ *Oryza sativa* のプロトプラストとを共培養した結果は、他のインビトロバイオアッセイ法やフィールド試験の結果とも一致し、この方法を適用すれば、いろいろな植物間や、実際の生育環境を模した研究が可能であることが見出された⁵⁾。さらに著者らは、レシピエントレタスプロトプラストの生長度を、試験植物を含まないコントロールに対する%表示にし、レシピエントレタスプロトプラストの異なる密度での%生長度を平均化することにより、阻害の強弱を試験植物間で比較する方法を考案した⁶⁾。これにより、汽水域に生育するマングローブ樹木マヤブシキ *Sonneratia alba*、マルバマヤブシキ *S. ovata*、ベニマヤブシキ *S. caseolaris* のアレロパシー活性の強さと、耐塩性の強さととの逆相関が見出された⁶⁾。また、熱帯性マメ科樹木のクロヨナ *Derris indica*⁷⁾ や、ワニグチモダマ *Mucuna gigantean*⁸⁾、インバーダーとして知られるギンネム *Leucaena leucocephala*⁸⁾ の、強い阻害のアレロパシー活性が明らかにされている。これらの研究では、同様な96穴シャーレの微量液体培地でのレタスプロトプラスト培養試験により、試験植物プロトプラストの代わりに、種々の化学物質を定量的に加えることにより、阻害活性の濃度比較が可能になり、アレロパシー候補物質の活性比較試験も可能になった。上記植物種の中では、*Mucuna* 属の DOPA⁶⁾、クロヨナのロテノン⁷⁾、ギンネムのミモシン⁸⁾ などの強いアレロパシー活性がこのプロトプラスト（共培養）法で確認されている。さらに著者らにより、プリンアルカロイドカフェイン代謝関連物質⁹⁾ の比較によるカフェインのアレロパシー活性が明らかにされ、ピリジニアルカロイドトリゴネリンと代謝前駆物質ニコチン酸やニコチンアミドの活性が比較され、それらの解毒の意味が議論されている¹⁰⁾。

レタスとのプロトプラスト共培養法を用いて、著者らはさらに多くの試験植物のアレロパシー活性比較やアレロパシー候補物質の検索を進めているが、これまでの方法では顕微鏡下の計数が必要であり、定量測定にはかなりの熟練を要する。この点を改良するため、今回、レシピエントとなるレタスプロトプラストの特徴である生長に伴う黄色物質形成能を基にして、プロトプラスト共培養法に画像解析法を加える簡便なアレロパシー活性の定量法を開発した。

本論文では、シロイヌナズナ葉プロトプラストによる強い阻害活性を例とし、市販のスキャナー機種を用いてデジタル画像を取得し、その画像の画像処理により活性を定量する方法についての詳細を述べる。さらにレタス黄色物質については、カロチノイ

ド色素抽出法の改良と定性を試みたので、その結果についても報告する。

材料と方法

プロトプラスト単離と培養法

無菌のプロトプラスト単離と培養は、既報⁵⁻¹⁰⁾ により行った。レタスの種子（グレートレーク）を、次亜塩素酸ナトリウム液 1.5%（塩素濃度）で 15 分間滅菌し、クリーンベンチ内において、オートクレーブ滅菌水で 3 回洗浄後、30 mL の 0.8% 寒天培地を含む 100 mL フラスコに 20 粒前後無菌播種した。明所 25°C のインキュベータ中で 6 ~ 11 日間育成後緑色の子葉を、少量の滅菌水中で、メスによりカットし、フィルター滅菌した酵素液、各 1% セルラーゼ RS（ヤクルト）、マセロザイム R10（ヤクルト）を含む浸透圧剤マンニトール 0.4 M または 0.8 M 濃度 10 mL 中で、20 ~ 24 時間 25°C 暗条件で処理した。プロトプラストの浸透圧は試験植物側の適浸透圧条件を用いるので、シロイヌナズナ葉プロトプラストと共培養の時は、0.4 M マンニトールを選択した。63 ミクロン径のナイロンメッシュを通し、50 mL、10 mL などの丸底遠心管を用いて、浸透圧剤の溶液で遠心洗浄 100g（低速遠心器 800-900 rpm）5 分を 3 回繰り返した後、沈殿を少量の浸透圧剤液に懸濁した。血球計算盤でプロトプラスト密度を計数後、マイクロチューブ中で、ピペットマンを用いて浸透圧剤液で希釈し、 10^6 個/mL、 5×10^5 個/mL、 2.5×10^5 個/mL、 1.2×10^5 個/mL、 6×10^4 個/mL になるように調整した。

試験植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) コロンビア品種の苗育成は既報¹¹⁾ により、若い緑葉を、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム液で 5 分間滅菌し、オートクレーブ水で 3 回洗浄後、滅菌シャーレ中メスでカットし、酵素液 1% セルラーゼ R10（ヤクルト）、0.15% ペクトリアーゼ Y-23（協和化成）、0.4 M マンニトール液で数時間から一晩処理した。酵素の組み合わせは、上述 4 酵素にヘミセルラーゼ（シグマ H-2125）とドリセラーゼ 20（協和発酵工業）を加えた 6 種の酵素を用いた 24 組み合わせの予備試験を行い選択した¹²⁾。80 ミクロン径のナイロンメッシュを通し、マンニトール液でレタスと同様に遠心洗浄した。密度を計数後、 10^6 個/mL、 5×10^5 個/mL、 2.5×10^5 個/mL、 1.7×10^5 個/mL、 8×10^4 個/mL、 4×10^4 個/mL になるよう、マイクロチューブ中で希釈した。

培養培地は、ムラシゲスケーグ (MS)¹³⁾ の基本培地に、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) $1 \mu\text{M}$ 、ベンジルアデニン (BA) $0.1 \mu\text{M}$ 、3% sucrose、0.4 M または 0.8 M マンニトールを含む。96 穴シャーレ

(No. 3075, 3072, Falcon) の各ウェルに 50 μL ずつ分注した。これに、各密度のレタスプロトプラストを 5 μL ずつ、試験植物シロイヌナズナプロトプラストを 5 μL ずつ、コントロールにはマンニトール液を各 5 μL 加えた。各々のプロトプラスト最終密度は十分の一と計算した。レタス黄色物質の抽出用には 10^5 個/mL で培養した。96 穴シャーレのウェル間にオートクレーブ滅菌した超純水 100 μL を加え、パラフィルムで 2 重にシールし、加湿恒温培養器 (CO_2 供給無し) の炭酸ガス培養器 Astec APC 30D/CL-30)、あるいは加湿ボックスをいれたペルチェ素子タイプインキュベータ (MEE クールインキュベータ CN-25C) 内で、 28°C 暗条件で培養した。

倒立顕微鏡 (オリンパス IX71 あるいは CK40) により、超長焦点作動距離の長い 10 倍、20 倍の対物レンズを用いて観察した。写真撮影はデジタルカメラシステム (NY1S, Micronet corp.) によった。

画像解析法

試験植物シロイヌナズナのプロトプラストとレタスプロトプラストを 29 ~ 43 日間共培養した後の 96 穴シャーレを、2 種のスキャナー (A: CanoScan D2400U, B: Epson GT-X970) を用い 24 bit 300 dpi でスキャンした。スキャナーの縦方向の中心に、シャーレの短辺の中心を合わせて置き、シャーレのカバーには、白いアクリル板の箱、あるいは、スキャナー付属の白いバックを用いた。得られた画像を画像ソフト PhotoshopElements で左右反転し、90 度回転させ、jpg ファイルとして保存した。次に Image J ソフト (NIH) を用いて画像処理し、各ウェルの黄色の発色度を Excel ソフトを用いて定量解析した。

カロチノイドの抽出と定性

カロチノイドの抽出法は、Triton X-100 で処理したこと以外は、既報^{14,15)} によった。レタスプロトプラスト 10^5 個/mL 条件で 1 ~ 2 カ月間培養したシャーレから、培養液および細胞沈殿物を集め、遠心分離 (900g 10 分間) 後の沈殿と 0.1g 炭酸カルシウムを乳鉢に入れ、0.1% Triton X-100 を加えたイソプロパノール 3 mL で 10 分間の磨砕を 2 回行い、 4°C で、3000g 10 分間遠心した上清を回収した。沈殿部はさらにヘキサン計 5 mL により磨砕後遠心し、先の上清と合わせた。13 mL になるように純水を加え、3000g 3 分間遠心分離により、黄色のヘキサン上層を回収した。ヘキサン層に純水を 5 mL 加え、遠心分離の行程を 3 回繰り返す、ヘキサン層を精製した。無水硫酸ナトリウムを加え脱水し、3000g 5 分間の遠心分離により黄色のヘキサン抽出液を得た。

分光光度計 (JASCO-V630) により波長 250 ~ 700 nm の範囲で 0.5 nm ごとに抽出液の吸光度を測定した。得られた吸収スペクトルを解析し、それらのピーク波長に基づいてカロチノイドの定性¹⁶⁾ を行った。

結果

レタスプロトプラストの黄色発色

Figure 1 は培養されたレタスプロトプラストの倒立顕微鏡写真である。培養初日では、プロトプラストは緑色で直径 30 μm 程度の球体であった (Fig. 1A)。培養 8 日目には、プロトプラストは一様な形状ではなく、変形肥大細胞や分裂コロニーを形成しており、細胞内は薄い黄色に呈色していた (Fig. 1B)。 10^5 個/mL のような高密度で培養された時、15 日後にはプロトプラストの殆どが黄色変形肥大細胞となっていた (Fig. 1c)。

96 穴シャーレを裸眼で観察すると、培養 3 週間前

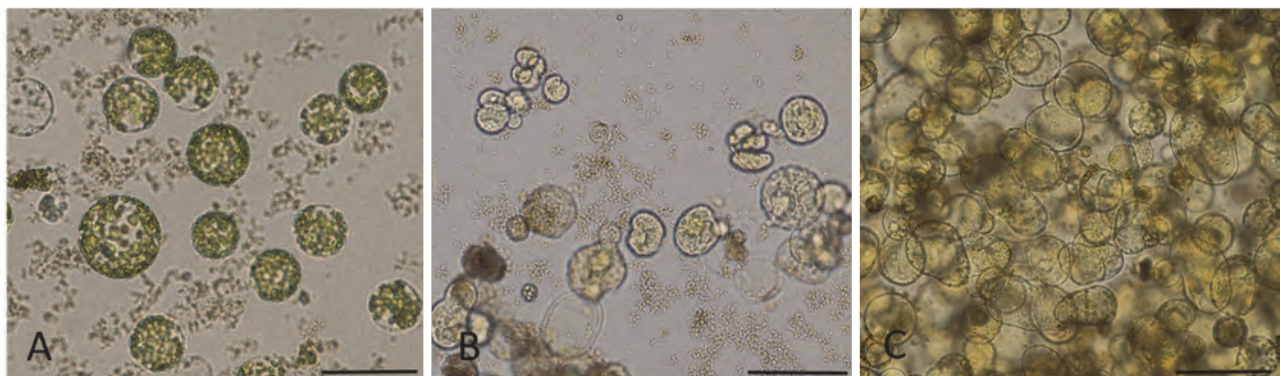


Fig. 1. Photographs of lettuce protoplasts cultured by using a 96-well culture plate. Medium was 50 μL liquid MS basal medium containing 1 μM of 2,4-D, 0.1 μM of BA, 3% sucrose, and 0.4 M (A, B) or 0.8 M mannitol (C). A. Spherical green protoplasts on the 1st day of culture at protoplast density of 6×10^3 / mL. B. Yellow colored-non-spherical cell enlargement and cell divisions after 8 days of culture at protoplast density of 6×10^3 / mL. C. Accumulation of yellow color at 15 days of culture at protoplast density of 10^5 / mL. Bar, 50 μm (A) and 100 μm (B, C).

後から黄色発色が強くなり、試験植物シロイヌナズナプロトプラストの高密度側における発色阻害が観察された。その後、培養1か月くらいまでの間に黄色の呈色は強くなり、その後は色の变化は認められなかった。

画像解析による黄色発色阻害の定量

Figure 2はシロイヌナズナとレタスのプロトプラストを共培養して43日後に、2種のスキャナーAとBにより得られたそれぞれの96穴シャーレのデジタル画像である。このデジタル画像を、Fig. 3のフロ

ー図のように、イメージJソフトとエクセルソフトを用い解析した。

イメージJソフトにより、Fig. 2A、Bの画像ファイルを開き、「Color, Split Channels」により (Image Type RGB color)、Blue, Green, Redの3色に分け、Blue図のみを使用した。

次に、「Line 直線」を選択し、ウェルの中心を通る直線を横に引いた。

次に、この直線について、「Analyze, Plot profile, List」、「File (Plot values), Save as」により Plot values をエクセルファイルとして保存した。レタスプロト

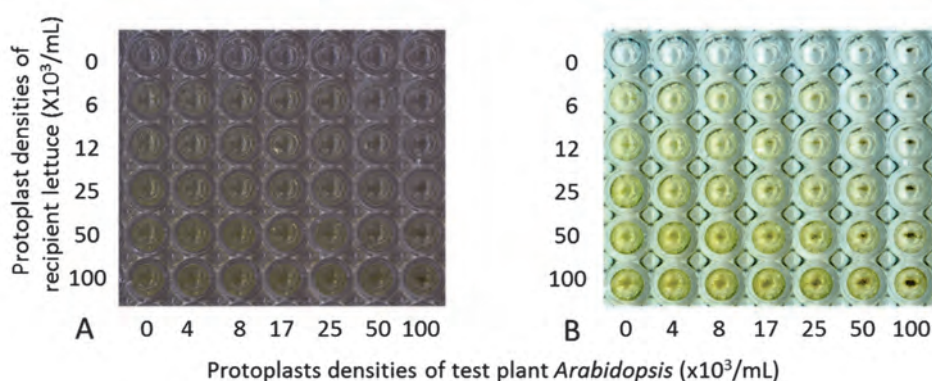


Fig. 2. Digital images (A and B) obtained by using two scanners (A and B), respectively, of a 96-well culture plate of lettuce after 43 days of culture. Intensities of yellow color at each lettuce protoplast densities ($6 \sim 100 \times 10^3/\text{mL}$) were reduced by depending protoplast densities of *Arabidopsis*.

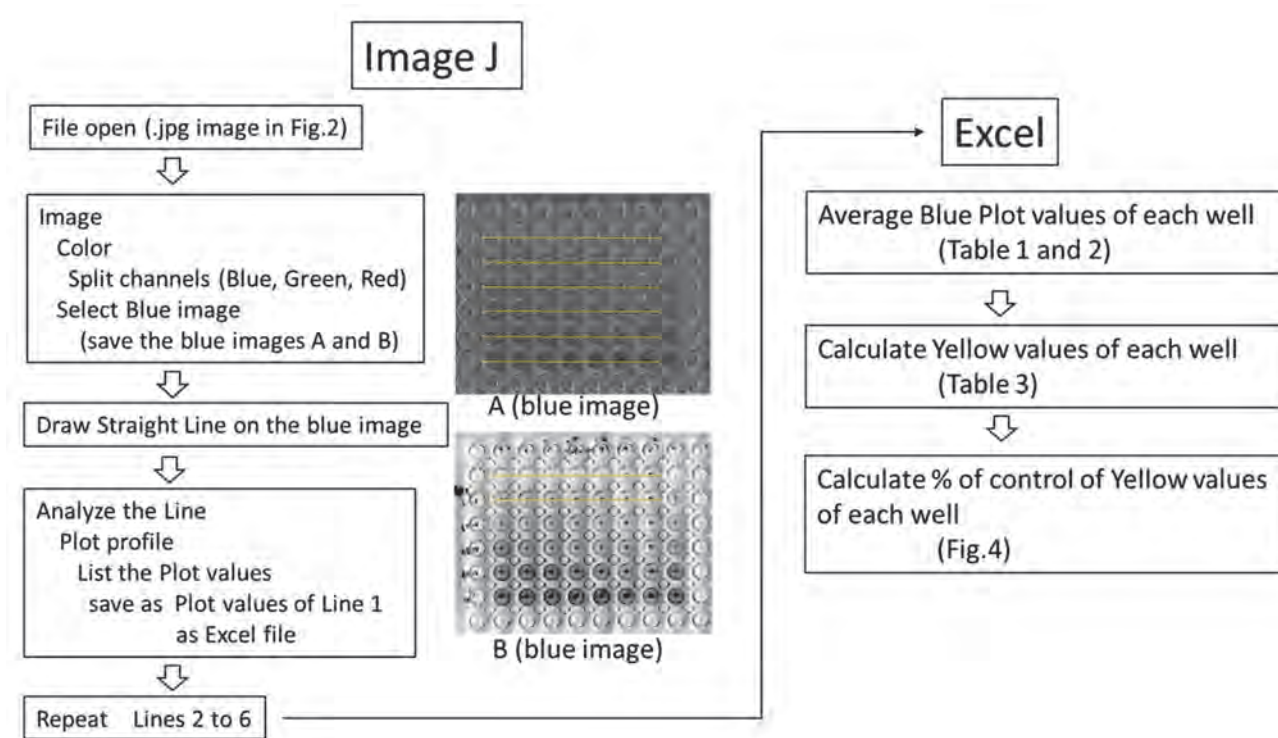


Fig. 3. Scheme of image analysis of the digital images of Fig. 2 (A and B) using softwares Image J and Excel for quantification of yellow color accumulation in each well of a 96-well culture plate.

プラストの異なる密度における同様な直線を引き、同様な Plot values (blue) のリストをエクセルファイルに保存した。

次に、エクセルソフトにおいて、青色の点データのリスト（例えば8ウェル分の1~848点）から各ウェルの中側のデータ値の平均を求める。あらかじめウェルの縁とウェル内の距離点を測定し（例えば、ウェルの縁1個部分を19点、2個部分を38点、ウェルの中部分を68点として計算し）、各ウェルの縁を除いた中側の点部分の、青色値を平均化し、各ウェルの青色値とした。各ウェルのプロトプラスト密度条件における青色値の表を作成した。Table 1はスキャナーAの画像(Fig. 2A)から得られた青色値を、Table 2は、スキャナーBの画像(Fig. 2B)から得られた青色値を示している。

次に、黄色値への変換を行なった。最も青色値の

Table 1. Averaged blue values in each well of a 96-well culture plate analyzed from scanned image of Fig. 2A using softwares Image J and Excel

		Protoplast densities of Arabidopsis (x10 ³ /mL)						
		0	4	8	17	25	50	100
Protoplast densities of lettuce (x10 ⁹ /mL)	0	123.4	124.8	124.0	123.7	121.6	120.5	116.1
	6	108.9	111.4	112.7	110.2	109.3	114.5	113.4
	12	107.9	109.7	110.2	111.5	113.9	114.0	111.2
	25	99.7	102.8	103.2	103.9	104.2	103.5	105.8
	50	99.1	96.3	94.1	98.4	94.9	103.4	97.8
	100	93.8	92.3	93.8	92.7	87.3	94.5	86.8

Table 2. Averaged blue values in each well of 96-well culture plate analyzed from scanned image of Fig. 2B using softwares Image J and Excel

		Protoplast densities of Arabidopsis (x10 ³ /mL)						
		0	4	8	17	25	50	100
Protoplast densities of lettuce (x10 ⁹ /mL)	0	225.1	224.6	223.8	222.5	217.4	216.8	197.4
	6	164.7	176.4	172.9	171.1	163.2	198.6	188.0
	12	144.9	156.7	149.5	157.8	170.1	171.9	170.5
	25	109.6	126.1	134.5	133.2	135.0	140.3	149.5
	50	103.0	84.9	83.3	96.7	99.4	118.8	113.7
	100	88.9	66.8	76.7	73.6	57.0	88.9	72.1

Table 3. Yellow values in each well of 96-well culture plate, calculated from the averaged blue values of Table 1

		Protoplast densities of Arabidopsis (x10 ³ /mL)						
		0	4	8	17	25	50	100
Protoplast densities of lettuce (x10 ⁹ /mL)	6	14.5	13.3	11.3	13.6	12.3	6.0	2.8
	12	15.5	15.1	13.7	12.2	7.8	6.5	4.9
	25	23.7	21.9	20.8	19.8	17.4	17.0	10.4
	50	24.4	28.5	29.8	25.3	26.7	17.1	18.3
	100	29.7	32.5	30.2	31.0	34.4	26.0	29.3

高い数値（培地のみウェル）から、各ウェルの数値を差し引いた値を黄色値と計算した。Table 3は、スキャナーAを用いた画像(Fig. 2A)を処理し得られた青色値の表(Table 1)からの計算値を示している。レタスが共存しない、試験植物シロイヌナズナのプロトプラスト自身の黄色値は高くはないが、レタスが無いコントロールそれぞれの同じ密度の値を差し引いた。Fig. 2Bについても同様に黄色値を計算した。

次に、レタスプロトプラストの各密度ごとに、レタスのみのウェル（試験植物シロイヌナズナプロトプラストを含まないウェル）の黄色値を100%として、試験植物シロイヌナズナのプロトプラストの各密度を加えたウェルの黄色値を%表示し、各レタス密度(6×10³個/mL、1.2×10⁴個/mL、2.5×10⁴個/mL、5×10⁴個/mL、10⁵個/mL)におけるグラフを作成した(Fig. 4)。

次に、Fig. 5に、レタスの各密度(6-100×10³個/mL)ごとの%値を平均化し、標準誤差を示した。スキャナーAとスキャナーBから得られた各平均値に関して、t検定を行った結果、有意水準P<0.05において、両者間に差は認められなかった。これにより、スキャナーの機種に限定されることなく、この画像解析法は成り立つことが示された。

また、培養日数の異なる96穴シャーレ画像を取得、解析した結果も同様な、シロイヌナズナプロトプラストによるレタスプロトプラストの黄色発色への阻害パターンが得られた。但し、イメージJソフトにおいて、ウェルの中心線を通らない直線や縦の線を引き解析した場合には、スキャナーAでの阻害が増強されて計算され、誤差が大きく示されるようになる場合があった。

レタスプロトプラストの黄色物質の定性

レタス細胞沈殿部に含まれる黄色物質は、Triton X-100非処理の時は、ヘキサン層に回収されなかったが、Triton X-100処理によって可溶化でき、ヘキサン層に回収された。その吸光スペクトル(Fig. 6)は、410、430、450 nm付近にピークまたは肩をもち、紫外部275、285、310や665 nmなどにもピークが見られた。レタスプロトプラスト培養培地の浸透圧条件(0.4 M、0.8 M マンニトール)や培養日数によらず、同様な吸光スペクトルが得られた。レタスプロトプラストが集積する黄色物質は、ヘキサン層に回収されることと吸光スペクトルから、カロチノイドと考えられる。既知のヘキサン溶媒中における各種カロチノイドの吸光スペクトルピーク¹⁶⁾と比較検討したところ、β-ゼアカロテンのそれに近似していた。

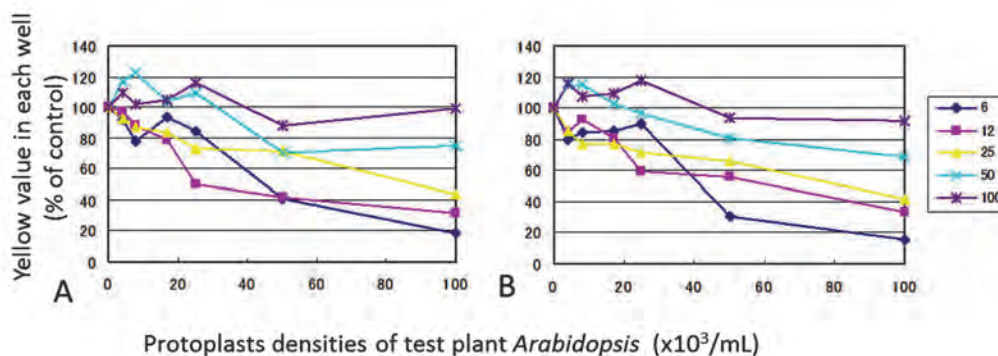


Fig. 4. Percentage values of yellow color values in each well after Image J analysis of scanned jpg images A and B of Fig. 2. Percentage of control (without *Arabidopsis* protoplasts) at different protoplast densities of lettuce (6, 12, 25, 50, 100x10³/mL) was reduced depending protoplast densities of *Arabidopsis*.

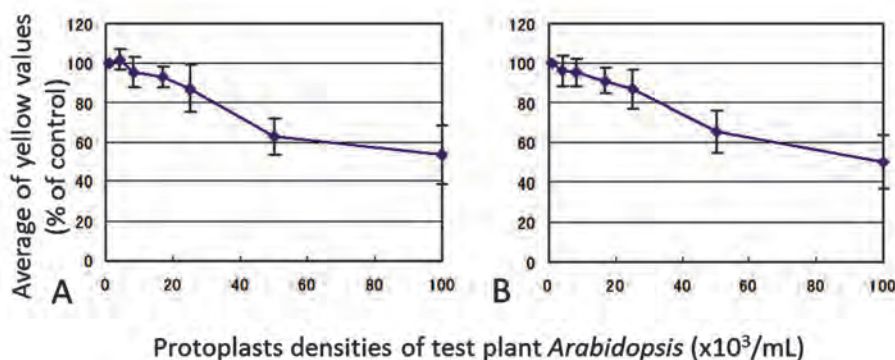


Fig. 5. Averages with standard errors of % values of yellow color values at different protoplast densities of lettuce described in Fig. 4. Similar patterns of inhibitory effects of *Arabidopsis* protoplast densities were shown in A and B, which were analyzed by Image J analysis of jpg images scanned using two scanners A and B, respectively.

討論

アレロパシー活性のハイスループットバイオアッセイ法の開発

アレロパシー活性の測定法として、試験植物プロトプラストとレタスプロトプラストとの共培養により、細胞壁形成や細胞分裂に対する阻害効果を倒立顕微

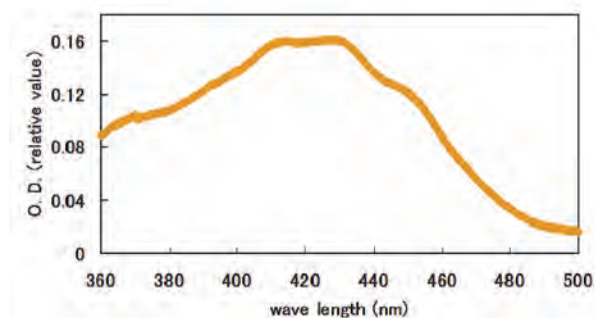


Fig. 6. Absorption spectrum of the yellow pigment in hexane, extracted using Triton X-100 from lettuce protoplasts cultured for 2 months. Protoplast culture medium was the same as of Fig. 1 except for 0.4 M mannitol.

鏡下計数し定量する「プロトプラスト共培養法」が2013年に開発された⁵⁾。この方法で1枚の96穴シャーレの試験を行うためには、4本程度のレタス芽生えの子葉と2 mLの酵素液、マイクロチューブでの低速遠心洗浄によって得られるレタスプロトプラスト量が供されれば十分である。通常の実験では20数個のレタス芽生えを用い、10 mL以上の容量の遠心管を用いて精製し、10枚以上の96穴シャーレでの試験が可能であり、さらに大量のレタスプロトプラストを供することは可能である。しかし、プロトプラストの特定の生長時期(4日から12日間)での顕微鏡観察による計数には研究者の熟練が必要であり、多数のシャーレを用いて計測するにはかなりの時間を要するので、多数の試験植物を同時に比較することはこれまで困難であった。

一方レタスプロトプラストの生長に伴い黄色物質が集積する現象は早くから観察されていたが、96穴シャーレ用マイクロプレートリーダーによっては吸光度を測定できなかったため、黄色発色阻害を定量することは困難であった。これは、細胞沈殿部分に

固着した黄色物質が、通常の抽出法では可溶化できなかったこととも関係していた。しかし、本論文で明らかにされたように、Triton X-100 処理により初めて可溶化できた。この可溶化法は、酸アルカリや溶媒、熱水などによっては可溶化できないために解析が遅れている他の色素類にも応用できる可能性が考えられる。レタスプロトプラストが集積する黄色物質は、カロチノイド抽出法で用いられるヘキサソール層に溶出し回収することができること、および、得られた吸光スペクトルパターンにより、カロチノイド色素と考えられる。

本論文において、試験植物シロイヌナズナプロトプラストと共培養した時のレタスプロトプラストの黄色物質集積が著しく阻害されることが明らかになり、その阻害効果を、市販されている一般のスキナーで取り込んだデジタル画像を、画像解析することにより定量的に評価する方法が確立された。顕微鏡下計数する手法と比べて、レタスプロトプラスト低密度条件での画像解析可能な黄色集積には日数を要するが長期間安定しており、解析に特に熟練を要しないという利点がある。多くの試験植物について検定する場面においては、強い阻害活性を持つ植物を選抜し、その後、より詳しくアレロパシー反応過程について調べることも可能となる。今回は、レタスプロトプラスト 6×10^3 個/mL から、 10^5 個/mL までの 5 密度での % 値を平均化することにより (Fig. 5)、試験植物間の活性の差をあらわすことにしたが、レタス低密度の方が、試験植物の阻害効果は大きい傾向がある (Fig. 4)。阻害活性の強い試験植物では、試験植物のプロトプラストが少量しか得られない場合にも検定が可能となる。大量の試験植物サンプルやアレロパシー候補物質を検定する場合は、このようなレタス低密度側のみと比較試験も有効と考えられる。今回、96 穴シャーレを用いたプロトプラスト共培養と画像解析法を組み合わせることにより、多数の試験植物やアレロパシー候補物質の活性をハイスループットに評価可能な方法を開発できた。今後、この新規インビトロバイオアッセイ法「画像解析—プロトプラスト共培養法」は、アレロパシー物質の特定や、作用機構の解明に大いに寄与すると考えられる。プロトプラスト共培養法に画像解析法を加えた検定例については、これまでタケ類、ヘアリーベッチ、ユキヤナギなどの試験植物や、アレロパシー候補物質として桂皮酸、シアナミド、カナバニンなどについて、国内・国際学会で講演発表されたことはあるが、論文として発表されたものは無く、本論文は最初の公表論文である。

謝辞

本論文の一部は、2016 年度神奈川大学総合理学研究共同研究助成 (RIIS201610) を受けて行われた。記して感謝する。

文献

- 1) 藤井義晴 (2000) アレロパシー：他感物質の作用と利用。農文協，東京。
- 2) Fujii Y and Hiradate S (2007) *Allelopathy, New concepts and methodology*. Science Publishers, USA.
- 3) Fujii Y, Parvez SS, Parvez MM, Ohmae Y and Iida O (2003) Screening of 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biol. Manag.* 3:233-241.
- 4) Fujii Y, Shibuya T, Nakatani K, Itani T, Hiradate S and Parvez MM (2004) Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. *Weed Biol. Manag.* 4:19-23.
- 5) Sasamoto H, Murashige-Baba T, Inoue A, Sato T, Hayashi S and Hasegawa A (2013) Development of a new method for bioassay of allelopathy using protoplasts of a leguminous plant, *Mucuna pruriens* with a high content of the allelochemical L-DOPA. *J. Plant Studies* 2:71-80.
- 6) Hasegawa A, Oyanagi T, Minagawa R, Fujii Y and Sasamoto H (2014) An inverse relationship between allelopathic activity and salt tolerance in suspension cultures of three mangrove species, *Sonneratia alba*, *S. caseolaris* and *S. ovata*: Development of a bioassay method for allelopathy, the Protoplast Co-culture Method. *J. Plant Res.* 127:755-761.
- 7) Inoue A, Mori D, Minagawa R, Fujii Y and Sasamoto H (2015) Allelopathy in a leguminous mangrove plant, *Derris indica*: Protoplast co-culture bioassay and rotenone effect. *Nat. Prod. Commun.* 10:747-750.
- 8) Mori D, Ogita S, Fujise K, Inoue A and Sasamoto H (2014) Protoplast co-culture bioassay for Allelopathy in leguminous plants, *Leucaena leucocephala* and *Mucuna gigantea*, containing allelochemical amino acids, mimosine and L-DOPA. *J. Plant Studies* 4:1-11.
- 9) Sasamoto H, Fujii Y and Ashihara H (2015) Effect of purine alkaloids on the proliferation of Lettuce cells derived from protoplasts. *Nat. Prod. Commun.* 10:751-754.
- 10) Sasamoto H and Ashihara H (2014) Effect of nicotinic acid, nicotinamide and trigonelline on the proliferation of lettuce cells derived from protoplasts. *Phytochem. Lett.* 7:38-41.
- 11) Hayakawa S, Iwamoto A and Azumi Y (2007) Analysis of chromosome behavior during meiosis of Arabidopsis polyploid mutants. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 18:71-75.
- 12) Azumi Y and Sasamoto H (2017) Production of protoplasts from pollen mother cells of higher plants and observation of their chromosomes. *Sci. J. Kanagawa Univ.* 28: 85-92.
- 13) Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- 14) Aoki Y, Ono M, Hayatsu M and Suzuki S (2011)

Changes of pigments and plastic ultrastructures in the pericarp during fruit ripening of *Aucuba japonica* Thunb. *Sci. J Kanagawa Univ.* **22**:63-70.

- 15) Hayatsu M, Sato M and Suzuki S (2016) Pigment changes and chromoplast morphogenesis in pericarp during fruit ripening of *Trichosanthes cucumeroides*

Maxim. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**:45-51.

- 16) Davies BH (1965) Analysis of catotenoid pigments. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin TW, ed., Academic Press, London. pp.489-532.

■原 著■

自然環境から単離された珪藻類培養株の 全 DNA 試料への次世代シーケンサーの試験的適用

鈴木祥弘^{1,3} 鈴木 英¹ 金沢謙一¹ 西本右子²

Trial Application of Next-Generation Sequencing Techniques the Total
DNA of a Diatom Strain Isolated from a Natural Environment

Yoshihiro Suzuki^{1,3}, Hana Suzuki¹, Ken'ichi Kanazawa¹ and Yuko Nishimoto²

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

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail:suzuky03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Next-generation sequencing (NGS) techniques are used for many biological applications. We applied NGS to the isolated algal cells of *Thalassiosira nordenskiöldii* from a natural environment of the sea to test the application of NGS to natural communities of planktonic algae in Sagami Bay. Contaminating bacteria in the culture of algal cells strongly competed for the sequencing reactions with algal genomes, although the biomass of the bacteria was negligible. We could not determine any of the sequences of the nuclear genome. Only the plastid and mitochondrial genomes were determined, as the copy numbers of these genomes are higher than the nucleus. The plastid and mitochondrial genomes showed structures almost same as those of the related species *T. pseudonana*.

Keywords: diatoms, plastid genome, mitochondrial genome, next-generation sequencing, *Thalassiosilla nordansioeldii*

序論

近年、急速に普及しつつある次世代シーケンシング (NGS) は、百万から数十億の DNA 分子の塩基配列決定 (シーケンシング) を同時に行う技術である。NGS を用いて生物学的に有用な情報を得るため、ショットガン法や RNA-seq、メタゲノム解析など様々な実験方法が開発されている。NGS の適用範囲は実験生物から生態系まで、生物学の取り扱う全ての分野へ広がっている。

メタゲノム解析では、生物群集からヘテロな全 DNA 試料を抽出し、生物種や生態型ごとの差異が認められる共通の DNA 領域を増幅して DNA 断片を得る。これを NGS に供して、DNA 断片を差異で分類し、その数と個体数を対応付けて、生物群集の種組成を推定する。ショットガン法の適用により、非モデル生物でゲノムの解析が進められている。マイクロアレイ法に代わり RNA-seq を適用することで、非モデル生物で遺伝子発現状況の解析も可能になった。

NGS は旧来難しかった環境中の非モデル生物への分子生物学的手法の適用を可能にしている。しかし、非モデル生物である天然の生物への NGS の適用は依然として容易ではない。参照配列が無いことやヘテロな遺伝子構成は、天然生物のゲノム読解を難しくしている。天然の生物種ではモデル生物で確立された生理・生化学的手法がそのままでは適用できない場合もある。試料への他の生物の混入が避けられない場合もある。

NGS の適用が困難な非モデル生物の 1 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にも関わらず、ゲノム解読は進んでおらず、2017 年 4 月現在で、ゲノムが解読された種は中心目と羽状目それぞれ 2 種に過ぎない¹⁻⁴⁾。本研究では、相模湾植物プランクトン群集への NGS の適用を目指し、海洋プランクトン藻類群集から単離した珪藻種を用いて実験を行った。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、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、珪藻類培養株から高分子 DNA を精製する方法の確立した⁵⁾。さらに、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、de novo シーケンスに必要な無傷 DNA 精製法を検討した⁶⁾。本研究ではこれらの方法を適用して得られた DNA 試料を NGS システムに供し、得られた情報を専用ソフトウェアで解析した。実験を通して、珪藻類の De novo 解析で生じる問題点を検討した。

材料と方法

低温珪藻類の培養

2012 年 3 月、北海道サロマ湖にサロマ湖第二湖口で採集したプランクトン藻類群集から単離した、優占種珪藻種 *Thalassiosira nordenskiöldii* Cleve を実験に用いた。Guillard の f/2 培地中、0°C、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) 連続光の下で培養を行った。本種は完全な無菌状態での継代培養が難しかった。このため、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、できる限りバクテリアの混入が少ない状態で細胞を集めた⁵⁾。細胞は 0°C、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°C、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°C で保存した^{5,6)}。

全 DNA の調整

マイクロチューブ中で破碎用ペッスルを用いて細胞を破碎した。破碎液から DNA 吸着カラム法 (DNeasy, Qiagen CO.,LTD) で全 DNA を抽出した⁴⁾。精製された全 DNA の濃度と共雑物の過多は、試料の吸収スペクトルで検討した。

NGS によるゲノム読解

Qubit および DNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Japan) を用いて、精製試料の DNA 濃度測定を行った。1000 ng の DNA をせん断し (Covaris S2, Covaris 社, USA)、ライブラリーを作成した (KAPA Hyper Prep Kit, KAPA Biosystems, USA)。作製されたライブラリーは、断片長の確認を行った (Fragment Analyzer, Advanced Analytical Technologies, USA)、NextSeq 次世代シーケンサー

(illumina 社, 日本) を用いて 2×151 bp 読解の設定でシーケンシングを実施した。得られた各シーケンシング情報 (リード) は付属ソフトウェアを用いて選別し、低品質 (q 値 <20)、低読解長 (<127 bp) リードとそのペアリードを除いた。残った高品質リードをアセンブルした。

読解データの解析

アセンブルしたコンティグに、SSU rRNA 予測スク립トを適用し、培地中に混在するバクテリア由来のコンティグと *T. nordenskiöldii* 由来のコンティグを識別した。*T. nordenskiöldii* 由来のコンティグは、近縁種で既にゲノム塩基配列情報が得られている、*T. pseudonana* および *T. oceanica* と比較した (LaserGene, DNASTAR 社, USA)。

結果と討論

培養細胞からの全 DNA の精製

実験に用いた珪藻種 *T. nordenskiöldii* は完全な無菌状態での継代培養が難しく、バクテリアが混入した状態で培養している。対数増殖期にある細胞を用いることで、混入するバクテリアの相対量を低く抑えるよう試みた。相対増殖期の様々な時期に光学顕微鏡で観察を行ったが、いずれの時期にも遊泳するバクテリアが観察され、これを除くことは難しかった。珪藻の細胞密度が高くなり、相対的にバクテリアのバイオマスが小さくなると推定された対数増殖期後期に、細胞を集めて以下の実験に用いた。

ペッスルを用いてマイクロチューブ中で行う破碎では、細胞は完全には破碎されなかった。破碎後の遠心分離では、未破碎の細胞と思われる緑色の沈殿が観察された。温和な破碎により、著しいせん断を避けられた。精製された全 DNA 試料は、蛋白質の混入の指標である A260/A280 の値がいずれの試料でも 1.8 以上で、電気泳動像からは、せん断された短い分子の割合が低いことが推定された (図 1)。

NGS によるゲノム読解

精製した全 DNA 試料を NGS に供した。精製試料の DNA 濃度は、15.6 ng/ μL で、液量は 100 μL であった。このうち 1000 ng の全 DNA 試料 (64 μL) をせん断し、ライブラリーを作成した。十分な量の試料が得られているため、PCR による試料の増幅は行わなかった。作製されたライブラリーは、6.54 ng/ μL で、液量は 20 μL であった。Fragment Analyzer で解析した結果、ライブラリーは 603 bp にピークを持つ、平均長 598 bp の DNA 断片の集まりで、短い断片を含まないことが確認された。このライブラリーについて 2×151

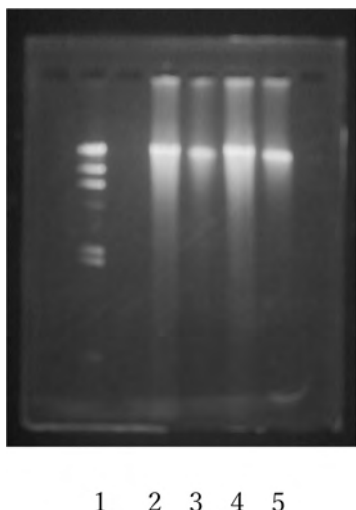


図1. 精製試料の電気泳動。レーン1は分子量マーカー、2-5は独立して精製したDNA試料。1%アガロースで各2.0 μ lの試料を電気泳動し、SYBR Greenで染色した。分子量マーカーは下から500, 1000, 1500 bpを示す。

bp 読解の設定でシーケンシングを実施した。その結果、2,772 万クラスタについて、8,370 Mbses のシーケンス情報が得られた。既知の珪藻類のゲノムサイズは、中心目の *T. pseudonana* と *T. oceanica* で 32.4M と 92.2M で、羽状目の *Phaeodactylum tricornutum* と *Fragilariopsis cylindrus* で 27.5M と 74.8M である¹⁻⁴⁾。得られた情報量は、最大サイズの *T. oceanica* の 91 カバレッジとなり、NextSeq 次世代シーケンサー 1 回の解析で、十分な情報量が得られることが明らかになった。

各シーケンシング情報（リード）から高品質リードを選別してアセンブルすると、最長 1,168,576 bp のコンティグが 2,102 列得られた。しかし、各コンティグの長さは短く、このため、コンティグ総延長は、シーケンス情報の 1/1000 程度、約 9 Mbp にすぎなかった。これは DNA 資料中に、短い配列が高いコピー数で大量に含まれていたことを示唆していた。

アセンブルしたコンティグに、SSU rRNA を予測して抜き出すスクリプトを適用すると、18S rRNA 配列だけでなく、複数種の原核生物の 16S rRNA 配列が抽出された。さらに、抽出された 16S rRNA 配列について blast 検索を行うと、*Colwellia* 属や *Glaciecola* 属のバクテリアと高い相関性が示された。これらのバクテリアは低温海域に生息することが知られている⁷⁾。単離培養の際に混入したバクテリアが、藻類細胞と共存していたものと推定された。単一の個体から一定量の組織を採取し、均質な DNA 試料を作成可能な大型の生物と異なり、単細胞生物では培地などに共存する微生物を排除して、均質な試料を作成することは不可能である。試料作成の際

の光学顕微鏡観察では、ごく僅かな生物量にしか見えなかったバクテリアであるが、細胞数やそれに対応したコピー数の多さから、NGS シーケンシングの際に、バクテリア由来の DNA が大量のリードを生成したと推定される。本研究の結果は、NGS に供する試料は無菌状態であることが不可欠であることを強く示唆していた。

全コンティグのうち 26 コンティグが、藻類ゲノムに由来することが予測された。そのうち 21 コンティグは短く、核ゲノムの断片であると推定された。プラスチドやミトコンドリア特有の遺伝子を指標として相同検索を行った結果、比較的長い 3 コンティグ（長いコンティグから PtA、PtB、PtC とする）がプラスチドゲノム、1 コンティグ (Mt) がミトコンドリアゲノムに由来する配列であることが明らかになった。PtA、PtB、PtC、Mit はそれぞれ 66.5 kbp、27.2 kbp、19.2 kbp、48.0 kbp であった。核ゲノムに対してコピー数の多いプラスチドやミトコンドリアのゲノムは、厳しい条件下でも十分なリードを残し、その結果として、コンティグを形成することができたものと考えられる。

読解データの解析

プラスチドゲノムについて得られた 3 コンティグの配列を、近縁種である *T. pseudonana* の既知の配列と比較した。各コンティグを *T. pseudonana* プラスチドゲノム (EF067921.1) にアラインメントしたところ、PtA、PtB、PtC は登録されたゲノム配列 (EF067921.1) 上の開始点から、それぞれ 0.1 ~ 66.5k、83.9 ~ 110.4k、110.8 ~ 128.7k、の配列と対応していた。コードされた各遺伝子を MAUVE 法でコンティグ上にアラインメントしたところ、開始点から最初にコードされている *psaA* 遺伝子から、128.7 kbp に位置する *rnP* 遺伝子まで、全く同一の順番で位置していることが明らかになった。決定されたコンティグは、*T. pseudonana* プラスチド DNA 全 129 bp の内、113 kbp (88%) に相当することが示された。また、PtA 中に位置することが予想された 3 遺伝子は相当する配列を検出できず、PtA と PtB 間の 19 kbp の領域にコードされる 22 遺伝子についても配列や配列の順番は不明のままであった (図 2a)。これらのコンティグから、既知のプラスチドゲノムにコードされている 180 遺伝子中 151 遺伝子 (84%) を確認することができた。

Mit を *T. pseudonana* ミトコンドリアゲノム (AB038235.1) にアラインメントしたところ、Mit の先頭から 47.7 kbp の配列は、既知の配列の 3.0 ~ 48.0k の配列と対応していた。さらに最後尾の 3.0

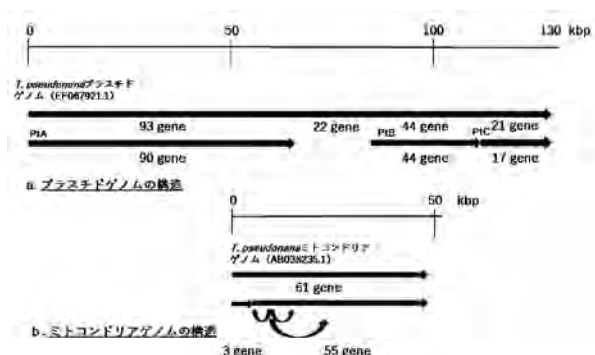


図 2. *T. nordenskiöldii* のプラスチドゲノムとミトコンドリアゲノムの構造. 各ゲノムに特有の遺伝子を指標として対応するコンティグを選別し、近縁種 *T. pseudonana* の既知のプラスチドゲノム (EF067921.1), ミトコンドリアゲノム (AB038235.1) の配列との比較で構造を検討した. 既知の配列中の各遺伝子を MAUVE 法でアラインメントし、全ての遺伝子について、存在と位置を検討した.

kbp は、既知の配列の先頭から 3.0 kbp と対応していた。コードされた各遺伝子を MAUVE 法でコンティグ上にアラインメントしたところ、ほとんどの遺伝子は既知の近縁種ミトコンドリアゲノムと同じ順番に配列していたが、先頭から 8 kbp 付近の 4 遺伝子が位置を変えていることが明らかになった。決定されたコンティグは、*T. pseudonana* ミトコンドリア DNA 43.8 kbp を上回り、48.0 kbp であったが、既知の 61 遺伝子のうち 3 遺伝子に対応する配列を検出することができなかった (58 遺伝子 94% を検出) (図 2b)。

結論

NextSeq 次世代シーケンサー 1 回の解析で、珪藻類の De novo ゲノムシーケンスに十分な情報量が得られることが明らかになった。しかし、培養株に共存する細菌は、僅かな生物量であっても高いコピー数の DNA を試料中に混在させ、シーケンス解析を阻害した。NGS に供する試料は無菌状態であることが不可欠である。

核ゲノムに比較してコピー数が大きいプラスチドゲノムやミトコンドリアゲノムの塩基配列は、混在する細菌ゲノムの阻害を受け難く、本研究でもプラスチドの 84%、ミトコンドリアゲノムの 94% の配列が決定された。決定したプラスチドゲノムとミトコンドリアゲノムは、同属の *T. pseudonana* のプラスチドゲノムとミトコンドリアゲノムと配置、塩基配列ともよく対応していた。

謝辞

相模湾プランクトン群集への NGS 活用の準備研究として実施された本研究は、神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成により行われた。研究にご理解を頂き、支援いただいた神奈川大学理学部総合理学研究所の所員の皆さんに深くお礼申し上げます。

文献

- 1) Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, *et al.* (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306** (5693):79-86.
- 2) Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, *et al.* (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456** (7219):239-244.
- 3) Lommer M, Specht M, Roy AS, Kraemer L, Andreson R, Gutowska MA, *et al.* (2012) Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biol.* 201213:R66.
- 4) Mock T, Otilar RP, Strauss J, McMullan M, Paajanen P, Schmutz J, *et al.* (2017) Evolutionary genomics of the cold-adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature* **541**:536-540.
- 5) 鈴木祥弘, 金沢謙一, 森本貴之, 米澤直樹, 中山 堯 (2014) 好冷性珪藻類 *Thalassiosira Nordenskiöldii* からの全ゲノム遺伝子の抽出. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**:107-110.
- 6) 鈴木祥弘, 金沢謙一, 森本貴之, 米澤直樹, 中山 堯 (2015) 断片化した珪藻類全ゲノム DNA からの高品質 DNA の精製. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**:71-74.
- 7) Thomas DN and Dieckmann GS (2008) *Sea Ice: An Introduction to its Physics, Chemistry, Biology and Geology*. Blackwell Publishing, Oxford.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

クルマエビの成熟制御因子の探索

甲高彩華¹ 城下菜那¹ 馬久地みゆき² 大平 剛^{1,3}

Transcriptomic Characterization of Hormones Regulating Vitellogenesis from the Kuruma Prawn *Marsupenaeus Japonicus*

Sayaka Kotaka¹, Nana Shiroshita¹, Miyuki Mekuchi², Tsuyoshi Ohira^{1,3}

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

² National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Yokohama City, Kanagawa 236-8648, Japan

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

Abstract: A small number of vitellogenesis-regulating hormones have been characterized in crustaceans. One of the most well-known molecules is vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH). Six VIHs have been characterized in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. Recently, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) was purified from the ovary of the American crayfish *Procambarus clarkii*. This is the first known GnRH molecule from a crustacean species. Moreover, recently crustacean female sex hormone (CFSH) was discovered in the blue crab *Callinectes sapidus*. In order to discover new vitellogenesis-regulating hormones in *M. japonicus*, we conducted RNA-seq analysis in this study. Total RNA samples of the ovary and brain were extracted and used for library preparation. Single-end sequencing of the constructed cDNA library was performed using an Illumina NextSeq system. *De novo* assembly produced 69,323 contigs, whose total size was approximately 40.0 Mb. A new VIH-like molecule was found in the ovary and brain. This VIH had six Cys residues. That are conserved among crustacean hyperglycemic hormone (CHH) family peptides, but was longer than the six VIHs of *M. japonicus*. Although a homology search by tblastX using the amino acid sequence of *P. clarkii* GnRH as a query was conducted, no homologs were identified in the contigs. On the other hand, corazonin (Crz), which is a member of the GnRH superfamily, was found in the brain. The known *M. japonicus* ovarian CFSH was expressed in the ovary, but new CFSH-like molecules were not identified in this study. Taken together, this study provides a comprehensive transcriptome of the commercially important *M. japonicus* with novel peptides and protein hormones.

Keywords: kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH), gonadotropin-releasing hormone (GnRH), crustacean female sex hormone (CFSH), corazonin (Crz)

序論

通常、甲殻類の複眼は頭部から突出しており、その複眼を支えている柄の部分を目柄と呼ぶ。この目柄を切除すると、雌の卵黄形成が早まることから、目柄内には成熟を抑制的に制御する因子が存在すると推定されていた。また、目柄の基部にはX器官と呼ばれる神経分泌細胞群と、そこからのびる軸索の末端で形成される神経血管器官（サイナス腺）が存在すること、およびX器官で合成された神経ペプチ

ドがサイナス腺に貯蔵された後、血リンパ中に放出されることが判明した。そして1991年にアメリカンロブスターのサイナス腺から成熟を抑制する作用を持つ神経ペプチドが単離され、卵黄形成抑制ホルモン（Vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH）と名付けられた¹⁾。その後、日本の水産重要種であるクルマエビのサイナス腺には、少なくとも6種類のVIHが存在することが報告され、多様なVIHによ

り成熟が制御されていることが示唆された²⁾。その後、シバエビやクマエビなどクルマエビ科のエビ類から次々と VIH が単離・同定されている³⁾。

近年、VIH 以外の成熟制御因子として同定されたのが、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) である。GnRH は 1971 年にブタとヒツジから最初に単離・構造決定されて以来、脊椎動物と無脊椎動物から GnRH が次々と単離されてきた⁴⁾。現在までに、30 種類以上の GnRH が見つかり、アミノ酸 10～12 残基からなることが分かっている。甲殻類に GnRH が存在するのには永らく不明であったが、2014 年にアメリカザリガニの卵巣から GnRH が初めて単離・構造決定された⁵⁾。アメリカザリガニ GnRH は無脊椎動物の GnRH と相同性があり、アメリカザリガニの卵成熟を促進させる活性を有していた。そのため、この分子は真に甲殻類初の GnRH と考えられた。しかし、それ以降、新たな GnRH は甲殻類から見つかっていない。

2014 年、アオガニのサイナス腺から甲殻類雌性ホルモン (CFSH) が単離された⁶⁾。アオガニの CFSH は雌のサイナス腺にのみ存在し、遺伝子発現も雌特異的であった。そして、雌アオガニの CFSH の遺伝子発現をノックダウンさせると、雌特異的な外部形態や生殖孔に異常が確認された。このことから、CFSH は甲殻類の雌の二次性徴を制御していると考えられている。クルマエビにおいても、眼柄から CFSH (眼柄 CFSH) をコードする cDNA がクローニングされている⁷⁾。しかし、クルマエビ眼柄 CFSH は雌雄の眼柄で遺伝子発現しており、アオガニのような雌雄特異性は観察されなかった。この結果より、クルマエビ眼柄 CFSH は雌性ホルモンとは別の機能を有すると考えられた。そのため、クルマエビでは眼柄以外の組織で CFSH が発現しており、その分子が雌性ホルモンとして働いていると考えられるようになった。その推測を裏付けるように、次世代シーケンサーを用いた網羅的な RNA-seq 解析により、クルマエビの卵巣に新たな CFSH (卵巣 CFSH) が存在することがごく最近明らかとなった (未発表データ)。クルマエビの卵巣 CFSH は雌雄の生殖腺に限定されていた。発現量は卵巣で高く、精巣ではごく低かったことから、クルマエビでも雌性ホルモンとして雌性形質発現や卵巣発達などの制御に関わる可能性が考えられた。

このように、幾つかの成熟制御因子が明らかにされているものの、ホルモンの受容からピテロジェニン遺伝子の発現制御までの経路や、同遺伝子の発現抑制以外の卵巣における作用は不明である。エビ養殖量は世界的に増加を続けており、その多くはクルマ

エビの近縁種である。養殖の拡大に伴って、産卵可能な親エビの確保が難しくなりつつある状況を鑑みると、クルマエビをモデルとして成熟制御機構を明らかにし、それに基づいた人為催熟法を開発することが必要と考えられた。そこで本研究では、新たな成熟制御因子の探索を目的として、次世代シーケンサーを用いて網羅的な発現遺伝子の配列解析を行った。

材料と方法

クルマエビ脳と卵巣 total RNA の抽出

2016 年 4 月に愛知県の一色漁港で水揚げされた天然の雌クルマエビ 20 尾から脳と卵巣を摘出し、RNA later 中で保存した。卵巣の一部はブアン固定液で固定をした。固定した卵巣はパラフィンに包埋し、連続切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオシン染色に供した。脳と卵巣からの total RNA の抽出は、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit を使用した。脳と卵巣の total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。抽出した脳と卵巣の total RNA が分解していないことを、2100 バイオアナライザー (アジレント・テクノロジー) を用いたキャピラリー電気泳動およびアガロース電気泳動で確認した。

RNA-seq 解析

クルマエビの脳と卵巣から抽出・精製した total RNA から cDNA ライブラリーを構築した。そしてイルミナ社の NextSeq システムを用いてシングルエンド法で各ライブラリー 1000 万リードずつ解析した。得られた塩基配列を de novo アセンブルすることによりコンティグを作製した。重複を除いたコンティグの塩基配列を遺伝子配列解析ソフト DNAsis (日立) に取り込み、相同性検索 (tBlastX 解析) を行った。

結果

クルマエビの脳と卵巣で発現している遺伝子の網羅的解析

クルマエビ卵巣のヘマトキシリン・エオシン染色の観察結果をもとに、卵巣の成熟ステージを卵原細胞期、前卵黄形成期、内因性卵黄形成期、外因性卵黄形成期、成熟期の 5 段階に分けた。そして、様々な成熟ステージとなるように 20 尾から 8 尾を選抜した。クルマエビの脳にニワトリ II 型の GnRH 抗体と反応する免疫陽性細胞が存在することを考慮し、選抜した 8 尾の脳を RNA-seq 解析に供した。また、アメリカザリガニの GnRH は卵巣から精製されたこ

とから、同じ個体の卵巣も解析対象とした。RNA-seq 解析で得られた配列の新規アセンブルにより、N50 長が 760 b の 69,323 コンティグが構築された。総塩基配列は 40.0 Mb であった。

卵黄形成抑制ホルモン (VIH)

眼柄で発現している多くのクルマエビ VIH は脳でも発現が観察された。また、今回の解析で新たな VIH 様の分子が卵巣と脳に存在していた。VIH が属している血糖上昇ホルモン (CHH) ファミリーペプチドにおいて保存されている 6 つのシステイン残基のうち、3 番目と 4 番目の間が 1 残基長いという、これまでにない構造上の特徴を有していた。卵巣で CHH 族ペプチドが発現しているのも新規の特徴である。

生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)

アメリカザリガニの GnRH のアミノ酸配列をクエリーに用いて相同性検索を行った結果、今回解析したデータの中にはアメリカザリガニ GnRH と相同性を有するコンティグは存在しなかった。次に、マダコの GnRH 前駆体のアミノ酸配列をクエリーに用いて相同性検索を行った結果、クルマエビの脳で発現する遺伝子の中にマダコの GnRH と相同性を有する Contig_64555 が存在した。Contig_64555 の成熟ペプチドの演繹アミノ酸配列は、マダコの GnRH と比べて 11 残基中 4 残基のアミノ酸が保存されていた。Contig_64555 の演繹アミノ酸配列をクエリーに用いて、公共の DNA データベースで BLAST 解析を行った。その結果、Contig_64555 は昆虫の Crz のホモログであることが分かった。昆虫の Crz は脊椎動物の GnRH とともに GnRH スーパーファミリーを形成している。これらのことを考慮すると、今回の解析で見つかった Contig_64555 がクルマエビの GnRH ではないかと推測された。

甲殻類雌性ホルモン (CFSH)

既知のクルマエビ卵巣 CFSH は卵巣で、眼柄 CFSH は脳で発現が観察された。しかし、卵巣 CFSH と眼柄 CFSH 以外の新たな CFSH 分子は、今回の網羅的な解析では発見できなかった。

討論

本研究により新たなクルマエビの成熟制御因子の候補を発見することができた。まず、卵巣と脳で発現している VIH 様の分子である。これまでに、VIH が属している CHH 族ペプチドは脳や胸部神経節などの中樞神経系、囲心器官、腸で発現していることが明らかとなっていたが⁷⁾、卵巣で発現している CHH

族ペプチドは本研究が初めての例である。また、本研究で発見した VIH 様の分子のアミノ酸配列には、これまでにない特徴があった。通常、CHH 族ペプチドの 3 番目と 4 番目システインの間は 12 アミノ酸からなる。これまでに分かっている CHH 族ペプチドでこの法則に逸脱する分子は存在しない。しかし、本研究で同定した VIH 様の分子の 3 番目と 4 番目システインの間は 13 アミノ酸からなっていた。この構造上の特徴が、生物活性にどのような影響を与えているのかを明らかにするために、将来的にこの分子の組換え体を作製して生物活性を調べる予定である。

本研究では、クルマエビにもアメリカザリガニ GnRH とよく似たアミノ酸配列を持つ分子が存在するだろうと考えて実験をスタートさせた。しかしながら、69,323 コンティグの中にアメリカザリガニ GnRH と相同性を有する分子は存在しなかった。近年、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析がアメリカザリガニでも行われたが、そのデータ中にもアメリカザリガニ GnRH は存在しなかった⁸⁾。GnRH の発現量が低いことが原因かもしれないが、今のところ理由は分かっていない。

本研究では GnRH を同定することはできなかったが、GnRH スーパーファミリーのメンバーである Crz を同定することができた。Crz はバッタの体色を黒化させるホルモンとして同定されたが、カイコガにおいては幼虫における吐糸の阻害作用を有している。また、Crz はキイロショウジョウバエにおいてセロトニン投射ニューロンを活性化することで精子および精液を増加させ、交尾継続時間を短縮させる。この様に、昆虫の Crz は多機能なホルモンとして知られている。一方、甲殻類における Crz の生理作用は全く明らかにされていない。今後、クルマエビに化学合成した Crz を投与することで、GnRH 活性、すなわち成熟促進活性が観察されるかどうかを調べていく予定である。

謝辞

本研究は 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「クルマエビの成熟制御因子の探索」(RIIS201607) で行われたものです。また、本研究は JSPS 科研費 JP26450294 の助成を受けたものです。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Soye D, Le Caer JP, Noel PY and Rossier J (1991) Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* 20:25–32.

- 2) Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* **6**:49-90.
- 3) 福島 翠 (2010) クルマエビ類における成熟制御因子の探索. 日本大学大学院生物資源科学研究科 修士論文.
- 4) Roch GJ, Busby ER and Sherwood NM (2011) Evolution of GnRH: Diving deeper. *Gen. Comp. Endocrinol.* **171**:1-16.
- 5) Guan ZB, Shui Y, Liao XR, Xu ZH and Zhou X (2014) Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the ovary of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquaculture* **418-419**:67-71.
- 6) Zmora N and Chung JS (2014) A novel hormone is required for the development of reproductive phenotypes in adult female crabs. *Endocrinol.* **155**:230-239.
- 7) Kotaka S and Ohira T (2017) cDNA cloning and in situ localization of a crustacean female sex hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fish. Sci.* in press.
- 8) Veenstra JA (2015) The power of next-generation sequencing as illustrated by the neuropeptidome of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **224**:84-95.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

神奈川県下で採集された原生動物ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) に関する研究

細谷浩史^{1,6} 濱生こずえ² 加藤 薫³ 道羅英夫⁴ 小谷 享⁵

Studies of Green Paramecium, *Paramecium Bursaria*,
Isolated in Kanagawa Prefecture

Hiroshi Hosoya^{1,6}, Kozue Hamao², Kaoru Katoh³, Hideo Dohra⁴
and Susumu Kotani⁵

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

² Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima City, Hiroshima 739-8526, Japan

³ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba City, Ibaraki 305-8560, Japan

⁴ Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka City, Shizuoka 422-8529, Japan

⁵ Department of Biological Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁶ To whom correspondence should be addressed. E-mail: 2pmrlcelldivision@gmail.com

Abstract: A green paramecium, *Paramecium bursaria*, widely distributed in freshwater habitats of the world, has several hundred endosymbiotic algae in its cytoplasm. Such symbiotic associations, as observed in *P.bursaria*, are excellent models for studying cell-to-cell interaction, mechanisms of immunity, and the evolution of eukaryotic cells. However, it has not been clarified why endosymbiosis of *P.bursaria* but not other kinds of paramecia with algae has been successfully established. Furthermore, it has not been elucidated whether the hundreds of endosymbiotic algae in *P.bursaria* are the same species. The symbiotic algae have been isolated from *P.bursaria* and also removed from *P.bursaria*, producing algae-free paramecia strains. The resulting exsymbiotic algae can grow independently of their host and also re-infect the algae-free paramecia. Unfortunately, several related experiments are still restricted to a phenomenological description, and reproducibilities of these experiments as well as defined experimental conditions, including the growth phase or age of treated paramecia, are usually lacking. Therefore, it is difficult to draw any conclusions in the study of endosymbiosis. Here, we isolated and established several cloned strains of *P.bursaria* from Kanagawa Prefecture. The results obtained will be discussed in this report.

Keywords: green paramecium, symbiosis, symbiotic algae, chlorella, protistology

序論

繊毛虫ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は代表的な原生生物の一種であり、世界各地に普遍的に生息している。ミドリゾウリムシの大きさは髪の毛の太さ程度 (約 100 ミクロン)、体内には緑藻クロレラに類似の共生藻が数百個共生しており、肉眼でも緑色に見え、他の原生生物と容易に区別できる。ミドリゾウリムシは、ゾウリムシと類似の形態を持ち同じ繊毛虫に分類されているが、両者を交配

させる事、さらにはゾウリムシに共生藻を共生させる事なども不可能で、互いに形態は類似しているものの両者は全く異なる生物である。

また、ミドリゾウリムシは「ミドリムシ」と良く間違われる。ミドリムシは、単細胞内に直接葉緑体が存在する「藻類」である。言うなれば、共生藻とミドリムシは同列である。一方、ミドリゾウリムシでは葉緑体は共生藻の内部にあり、直接ミドリゾウ

リムシの体内に存在している訳ではない。れっきとした「動物細胞」である。

一方、なぜ動物細胞であるミドリゾウリムシ体内に共生藻が共生できるのか、その理由やメカニズムについては解明が進んでいない。共生藻は太陽光を浴び光合成することから、光合成産物をミドリゾウリムシが利用できるメリットがある、という説明は魅力的である。しかし、共生藻を除去した共生藻除去ミドリゾウリムシ（白いミドリゾウリムシ）を作成する事も可能¹⁾で、白いミドリゾウリムシは培養液内のバクテリアやカビなどを補食して十分生存が可能である。太陽光が利用できない環境（夜間など）でも、（共生藻を有する）ミドリゾウリムシはバクテリアやカビを補食している可能性が高い。これらの事実は、共生藻の共生がミドリゾウリムシの生存に必須であるとは限らない事情をはっきりと示している。共生藻に関しても、ミドリゾウリムシ体内の数百の共生藻が全て同じ種類のものか否か、さらには、世界各地に生息するミドリゾウリムシが、同じ種類、または種類の比率が同じパターンで共生させているのか否か、など、共生藻の性質に関し個体差や地域差などを含む基本的な事柄について未解明のままである。

これらの状況のもと、ミドリゾウリムシから共生藻を除去する再現性の高い方法や、作成された白いミドリゾウリムシに、他のミドリゾウリムシから単離した共生藻を再共生させた再共生ミドリゾウリムシを作成する方法がすでに確立されている。体内に共生する共生藻の素性を明らかにした新規の再共生ミドリゾウリムシを用いることで、研究結果の再現性を高める事ができるだろう。また、ミドリゾウリムシの遺伝子の解析も始まっており²⁾、ミドリゾウリムシが共生藻を獲得した経緯について遺伝子レベルで具体的な手がかりを得る事ができる日も近い。

本研究では、神奈川県産ミドリゾウリムシの単離・クローン化を成功させることを通じて、ミドリゾウリムシに共生藻が共生するメカニズムの解明に関する研究の土台を確立させる事を目標とした。

材料と方法

ミドリゾウリムシの探索

まず、湘南ひらつかキャンパス内各所の湿地や池でミドリゾウリムシの探索を行った。候補地から池水を底土や沈殿草木ごと採取し（時期は4-6月）、直接倒立顕微鏡でミドリゾウリムシの有無を確認した。また、これらの池水を研究室で室温・日光照射下で培養し、定期的にミドリゾウリムシの有無を観察した。

ミドリゾウリムシの単離とクローン化

ミドリゾウリムシの生育が確認できた場合、一個体を培養池水から単離し、レタス培地で培養した。スライドガラスの上にレタス培地のドロップを4カ所滴下、単離したミドリゾウリムシを最初のドロップ中で遊泳させ次のドロップに移し替えていく作業を4度繰り返すことにより、一個体を単離できた事の確認と、池水中のミドリゾウリムシ以外の成分（他の混入原生生物や草木片など）の除去を実行した。この洗浄作業を4回行ったミドリゾウリムシ個体をレタス培地中で増殖させ、クローン化ミドリゾウリムシとして本研究で使用した。

共生藻の単離とクローン化

作成したクローン化ミドリゾウリムシを破碎し、寒天培地に塗布後インキュベートした。寒天培地は、北島博士（神奈川大学）らの協力を得て作成したBG-11培地を用いた。形成された共生藻コロニーから共生藻をクローン化する方法はNishiharaらの方法³⁾に従って行った。

結果と討論

神奈川県下でのミドリゾウリムシの採集

ミドリゾウリムシに関する過去の報文を見ると、ミドリゾウリムシは、我が国に限らずヨーロッパなど世界の広い地域に生息している事がわかる。この事から、我が国においても、北海道から沖縄に至る各地の池や沼にミドリゾウリムシは普遍的に生息しているものと予想される。

一方、ミドリゾウリムシを主要な研究材料とする原生物関連の研究グループは、国内では、中国地方をはじめ数カ所の所在地に限られている。これらの研究グループは、それぞれ複数の地方からミドリゾウリムシを採集し精力的に研究成果を報告しているが、我が国の各地域のミドリゾウリムシについてあまねく情報が蓄積されつつあるとは言い難い状況にある。

神奈川大学湘南ひらつかキャンパス（図1）が所



図1. 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス（神奈川大学HPより引用）。



図2. 図1のA地点.



図3. 図1のB地点.

在する神奈川県にもミドリゾウリムシが生存するものと思われる。しかし、県下で野外から採集後クローン化したミドリゾウリムシを実験に使用したという論文は見当たらない。

このような状況のもと、本研究ではまず、湘南ひらつかキャンパス各所の湿地帯等でミドリゾウリムシの探索を行う事とした。その結果、キャンパス内のA地点に点在する湿地(図2)ではミドリゾウリムシは見つからなかったが、B地点にある雨水調整池(図3)からミドリゾウリムシを単離することができた。この事により、神奈川県下に生息するミドリゾウリムシの性質を明らかにできる手がかりを得た。

ミドリゾウリムシ体内に数百の共生藻が共生して

いることは既に述べた。ところで、「数百」とは正確にいくつか、と問われると、文献的には400〜800個、と答えるのが妥当と思われる。野外から採取したミドリゾウリムシの観察を続けると、通常の大さ(100ミクロン程度)を遥かに越える巨大なミドリゾウリムシや、逆に100ミクロンに満たない小型のミドリゾウリムシが有為な頻度で観察される。前者は、経験的に細胞分裂の前、すなわちひょうたん型になる前の個体、後者は細胞分裂直後の個体と想像される。しかし、単なるミドリゾウリムシの個体差(要するに、もともと体の大きなミドリゾウリムシと小さなミドリゾウリムシ、それぞれに同数の共生藻が共生しているのだろうか?あるいは、ミドリゾウリムシの大きさに依存して共生する共生藻数は決まるのだろうか?このような単純な質問に対しても答えは用意されていない。課題解決のために、本研究で確立できたクローン化ミドリゾウリムシ(図4)を用いて、ミドリゾウリムシの大きさと体内の共生藻数との相関を定量的に明らかにする研究が求められる。

共生藻のミドリゾウリムシからの取り出しとクローン化

ミドリゾウリムシは、一日〜数日に一回の割合で分裂をするものと考えられている。この場合、宿主(ミドリゾウリムシ)の分裂に同調して共生藻数が増加していかないと、宿主の分裂が進むにつれて体内の共生藻は減少し、やがてゼロになってしまう。野外に白いミドリゾウリムシが生息するという報告⁴⁾



図4. 本研究で確立されたクローン化ミドリゾウリムシ。スケール、50ミクメン。

はあるものの、白いミドリゾウリムシを野外で実際に見いだすチャンスは殆ど無い。多くの野外採集ミドリゾウリムシは、冒頭で述べた様に数百の共生藻を体内に共生させている(図4)。

前節で述べた課題解決を目標として、我々は以前、細胞分裂前後でのミドリゾウリムシ体内の共生藻数の変化を観察した。ホスト体内の共生藻数(仮に400とする)が800に増殖してから分裂後400に再配分されるのか、あるいはホストの分裂に伴い400が200に減少し、その後分裂細胞内で400に戻るのか、どちらだろうか。観察の結果、ミドリゾウリムシは前者の経路で体内の共生藻数を調節している事が明らかになった⁹⁾。この事から、ホストの分裂直前に、ホストが分裂する事を検知し共生藻数を分裂させ、しかもその回数を一回程度(それ以上分裂すると、共生藻はミドリゾウリムシ体内で1000個を越えてしまう)に抑制するメカニズムは何か、という興味深い課題が新たに提示された。この課題解決には、ホスト体内の共生藻を注意深く観察する作業

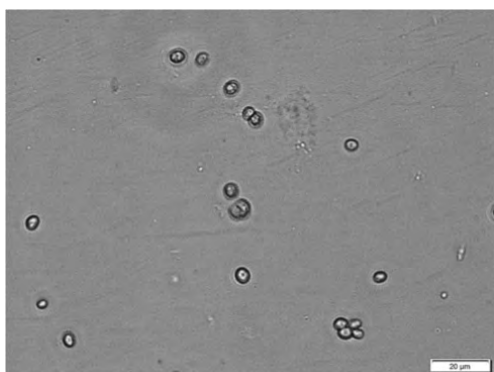


図5. クローン化共生藻. スケール, 20 ミクロン.

とともに、ホストから取り出しクローン化された共生藻の性質をホスト体外で解析する作業も欠かせない。後者の実施には共生藻のクローン化が必須である。

本研究では、神奈川県産ミドリゾウリムシの単離とともに、ミドリゾウリムシ由来の共生藻についても複数のクローン化を得る事ができた。今後、得られたクローン化共生藻(図5)を用いて詳細な解析を実施する土台が整った。

共生藻数に関する課題を解決する際に、さらにもう一つ参考となる興味深い事実がある。数百の共生藻は、ホスト体内で静かに共生している訳ではない。一定の方向に、常にホスト体内で移動し、いわゆる原形質流動を行っている状態にある。流動するにあたり、共生藻は「レール」が必要である。このレールは、様々な検討から、細胞骨格構造のひとつ「微

小管」であることが示された⁶⁾。微小管には様々な微小管関連タンパク質が結合している事が高等動物培養細胞などを用いた研究で明らかにされており⁷⁾、ミドリゾウリムシ体内においても、微小管関連タンパク質と共生藻の相互作用で原形質流動が実現されているものと考えられる。原形質流動は、ミドリゾウリムシが細胞分裂する直前に停止し、分裂後の分裂細胞内では復活、間期では継続して流動が続いている。これらの事実から、原形質流動が続く間期で微小管阻害剤(脱重合剤)を作用させ人工的に流動を停止させた場合、間期であっても共生藻数が倍加するのではないかと予想した。実験の結果、原形質流動を停止させると、間期のミドリゾウリムシ体内でまさに共生藻が増加した⁸⁾。原形質流動は、どのようにして共生藻の細胞分裂制御に一役買っているのだろうか? 今回クローン化されたミドリゾウリムシ共生藻を使用し、原形質流動による共生藻の分裂制御機構の解明にチャレンジしていきたい。

今後の課題

本研究で単離されたミドリゾウリムシは無菌化されておらず、正確な意味ではクローン(純粋な単一細胞由来の細胞集団)ではない。ゾウリムシでは、野外から採集された個体の内部にバクテリアなどの共生生物が存在することが報告されている。ゾウリムシやミドリゾウリムシを無菌化したと言う報文も過去にある。しかし無菌化ゾウリムシでは、その後体内にバクテリアが共生している事が明らかにされた。共生バクテリアの共生がゾウリムシ(ミドリゾウリムシも?)の生存には必須で、無菌株の作成は本質的に難しい事なのかもしれない、この問題の解決は極めて大きな課題である。

これらの事実をふまえると、例えば、「ある地域」で単離されたミドリゾウリムシを用いて得られた結果が、「他の地域」のそれと一致するという保証はない。ミドリゾウリムシ自体の遺伝的背景は解析が始まったばかり、体内の共生藻についても冒頭で述べた通りの状況で、ミドリゾウリムシの「質」自体に大きな振れがあるからである。今後、共生藻の質が保証された再共生ミドリゾウリムシを実験に導入し、上述の課題に関し新規知見を得て行くだけでなく、既報の知見の丹念な再確認作業も必須である。

最後に。共生生物として代表的なアブラムシでは、真核細胞(アブラムシ)と原核細胞(共生細菌ブネラ)との間で共生が成立し、長い間(一億年とも言われる)に両者は「不可分」となった。真核/原核の共生系はアブラムシの系以外でも解析が進み、葉緑体やミトコンドリアの起源を探る「細胞内共生

説」も有名である。一方、ミドリゾウリムシでは、真核細胞同士の共生である。ミドリゾウリムシと共生藻はまだ十分「可分」であり、両者の共生の開始は意外に最近なのかもしれない。共生する側に回った真核細胞（共生藻）は、今後、真核細胞の進化の過程でどのような役割を果たしていくのだろうか。真核/原核の共生系だけでは解明できない興味深い課題である。今後の研究の進展に期待したい。

謝辞

本研究は 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金 (RIIS201608) を受けて行った。本研究の遂行には、神奈川大学の日野晶也教授（理学部）、河合忍客員研究員（総合理学研究所）、北島正治客員研究員（総合理学研究所）、井上和仁教授（理学部）、櫻井英博研究員（理学部）を始め、日野研究室の卒論生各位（飯田敦子、井戸畑和幸、紺野大地、高塚蔵馬、諸橋礼大、吉田泰、吉野菜摘）の協力を得た。ここに感謝の意を表す。

文献

- 1) Hosoya H, Kimura K, Matsuda S, Kitaura M, Takahashi T and Kosaka T (1995) Symbiotic algae-free strain of the green paramecium *Paramecium bursaria* produced by herbicide paraquat. *Zool. Sci.*, **12**: 807-810.
- 2) Dohra H, Fujishima M and Suzuki H (2015) Analysis of amino acid and codon usage in *Paramecium bursaria*. *FEBS Letters* **589**:3113-3118.
- 3) Nishihara N, Horiike S, Takahashi T, Kosaka T, Shigenaka Y and Hosoya H (1998) Cloning and characterization of symbiotic algae from the green paramecium *Paramecium bursaria*. *Protoplasma* **203**: 91-99.
- 4) Tonooka Y and Watanabe T (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Eur. J. Protistol.* **38**:55-58.
- 5) Kadono T, Kawano T, Hosoya H and Kosaka T (2004) Flow cytometric studies of the host-regulated cell cycle in algae symbiotic with green paramecium. *Protoplasma* **223**:133-41.
- 6) Nishihara N, Horiike S, Oka Y, Takahashi T, Kosaka T and Hosoya H (1999) Microtubule-dependent movement of symbiotic algae and small particles in green paramecia *Paramecium bursaria*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **43**: 85-98.
- 7) Hashi Y, Kawai G and Kotani S (2014) Microtubule-associated protein (MAP) 4 interacts with microtubules in an intrinsically disordered manner. *Biosci. Biotech. Bioch.* **78**:1864-1870.
- 8) Takahashi T, Shirai Y, Kosaka T and Hosoya H (2007) Arrest of cytoplasmic streaming induces algal proliferation in green paramecia. *PLoS ONE* **2**(12):e1352.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

高等植物の花粉母細胞のプロトプラスト化と 染色体観察に関する研究

安積良隆^{1,2,3} 笹本浜子¹

Production of Protoplasts from Pollen Mother Cells of Higher Plants and
Observation of Their Chromosomes

Yoshitaka Azumi^{1,2,3} and Hamako Sasamoto¹

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

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

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

Abstract: Protoplast isolation conditions were investigated to observe the chromosomes during the meiosis of pollen mother cells (PMCs) of *Arabidopsis thaliana*, without the fixation of cells. At first, optimal cell wall-degrading enzyme combinations for protoplast isolation from leaves were determined as Cellulase R10 and Pectolyase Y23 from 24 combinations of 6 cell wall-degrading enzymes, dissolved in 100 μ L of 0.6 M mannitol solution using a 96-well plate method. As for recalcitrant anther material, using the same small-scale surveying method, two strong enzyme combinations, A; Cellulase RS, Hemicellulase, and Pectolyase Y23, and B; 4-times concentrations of A plus Driselase 20, were selected. Protoplasts of PMCs were only isolated from the anthers at a young stage in both varieties of Columbia and Landsberg in a 4-well dish, and were stained with DAPI solution after transferring to osmoticum solution without enzymes, by micromanipulation under an inverted microscope. From the anthers of developed stages, the PMC capsule was isolated from the surrounding protoplasts of tapetum cells by enzyme treatments and mechanical loosening under an inverted microscope. PMCs in the isolated capsule were observed by staining with DAPI solution after transferring using fine forceps, and squashed in 2 M sorbitol solution on a glass slide. From the anthers of a more developed stage, the PMC capsule was isolated and callose in cell walls of tetrads was stained with aniline blue solution.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, chromosome, pollen mother cell, protoplast

序論

一部の例外を除き、ほとんどの高等植物は有性生殖を行うことによって子孫を生み出す。有性生殖はその種の遺伝的多様性を増大し、進化や絶滅回避に貢献するが、有性生殖を行うには雌雄の配偶子をつくり受精を成功させる必要がある。植物の雌雄の配偶子は雌性配偶体である胚嚢の卵細胞と、雄性配偶体である花粉の精細胞である。植物では配偶体世代の生殖器官である花の中で、胚嚢母細胞と花粉母細胞が減数分裂を行うことによって、配偶体世代の始まりである胚嚢細胞と花粉小胞子が生み出される。こ

れらの細胞からつくられる配偶体世代の細胞は受精するまで1組しか染色体を持たない。この減数分裂については酵母菌、動物、植物などで多くの研究がある¹⁻³⁾。一般にどの生物でも、減数分裂前間期のS期にそれぞれの染色体は1回複製され、その後、減数第一分裂と減数第二分裂が連続して進行する。それぞれに前期、中期、後期、終期があり、第一分裂前期はさらに細糸期、合糸期、太糸期、複糸期、移動期に分けられる。細糸期になると核という構造は認められなくなり、それぞれの染色体が細い糸状に

見え始める。合糸期には体細胞分裂では見られない相同染色体同士が対合を開始し、対合部位では相同染色体間にシナプトネマ複合体が形成される。この時期に相同組換え反応が進行していると考えられている。太糸期には相同染色体同士が端から端まで対合し、均一な太さの糸状の染色体が観察される。複糸期にはシナプトネマ複合体は分解し、交叉した部分が視認される。移動期には相同染色体は繋がったまま、凝縮し赤道面に移動する。第一分裂中期にはすべての染色体の動原体部分が赤道面に整列する。第一分裂後期には相同染色体が分離し、互いに逆の方向に分配される。第二分裂では半数になった染色体を構成する姉妹染色分体が分離する。

このような減数分裂期の染色体の形態観察は植物でもコムギなどを用いて古くから行われているが⁴⁾、その動態の遺伝的制御に関する研究は進まなかった。全ゲノムの塩基配列が高等生物で初めて解明されたシロイヌナズナは⁵⁾、モデル植物に選ばれて以来、多くの変異体が単離され、遺伝子の機能解析技法が蓄積され、細胞内で起こる様々な現象が分子遺伝学的に解析されるようになった^{6,7)}。モデル植物に選ばれた当初は、シロイヌナズナの染色体はゲノムサイズに比例して矮小であるため染色体の観察が困難であったが、性能の高い顕微鏡や有効な観察方法が開発され、染色体が詳細に調べられるようになった⁸⁾。その結果、シロイヌナズナでは体細胞分裂期の染色体の構成要素・動態制御が遺伝子レベルで解析が可能となっている。しかし、減数分裂に関しては、生きた細胞での経時観察はほとんど行われておらず、細胞内で起きている減数分裂に特有の現象の制御機構も不明な点が多い。相同染色体の対合や、シナプトネマ複合体の構築・分解や、交叉の形成・解消などの現象には、どのような遺伝子が発現し、どのような構造がつけられるのか、またその構造はどのような成分で構成されているのかを明らかにすることは減数分裂の全貌解明に不可欠である。しかし、花粉母細胞は特殊な細胞壁を有するため、高精細な顕微鏡観察や遺伝子発現の解析が難しい。植物では葉などでは細胞壁を取り除き、プロトプラスト化する手法が開発されている⁹⁾。しかし、花粉母細胞の細胞壁は特殊な成分を含むため、プロトプラスト化の条件は知られていない。我々はシロイヌナズナを材料にして花粉母細胞のプロトプラスト化を試みることにした。これに成功すれば、生きた細胞内での染色体の形態変化を詳細に観察することができ、また、特定の時期の花粉母細胞から無傷に近いRNAなどの細胞構成要素が得られ遺伝子発現解析も進展するものと期待できる。

材料と方法

葉と葯の細胞壁分解酵素条件の検討

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の、Columbia 株と、Landsberg *erecta* 株の育成は、既報¹⁰⁾ によった。6種の酵素、各1%のセルラーゼ R10 (R10)、セルラーゼ RS (RS)、ヘミセルラーゼ (H)、ドリセララーゼ 20 (D)、マセロザイム R10 (M)、0.25% ペクトリアーゼ Y23 (P) の24通りの組み合わせ¹¹⁾ を用いた。0.6 M マンニトールに溶解した4倍濃度の酵素をピペットマンにより分注し、8ウェルセパレート型96穴シャーレ (SUMILON) の各ウェルに100 μ Lの酵素液を作り、透明フィルム (マイクロプレートシーリングテープ 9793, 3M) を貼り、冷凍保存し、室温に溶解して用いた。

Columbia の根生葉をメスで細断して各ウェルに加えた。つぼみから実体顕微鏡下または、倒立顕微鏡下、水滴中で柄付き針 (虫ピン00番)、ピンセット (Dumont No.5) を用いて、葯を取り出し、各酵素条件のウェルに加えた。透明フィルムでカバーし、25°C、300 rpm、振とう培養 (SI-300C アズワン) を行なった。1-2時間、および一晩反応後ピンセットでほぐし、倒立顕微鏡観察により、葉はプロトプラストの単離度を5段階で評価した。葯は、消化の程度について観察し、4段階で評価した。

葯の細胞壁分解酵素処理と蛍光観察

Columbia と Landsberg の葯について、選択した2酵素条件 (A: 各1%RS, H, 0.25%P, B: 各4%RS, H, D, 1%P) を用い、浸透圧条件については、マンニトール 0.6-0.8 M あるいはソルビトールを 0.6-2 M まで変化させた。Bの酵素処理に加えてサイトヘリカーゼ 0.4% または、 β -グルクロニダーゼ 1.4% 処理の影響も検討した。

マンニトール液はオートクレーブ滅菌後、酵素を溶解した。ソルビトール各濃度液は、2 M 液をオートクレーブ滅菌し、滅菌水と混合して用いた。B酵素は、0.6 M マンニトール液中一晩でバクテリア汚染が起きるので、フィルター滅菌 (0.22 μ m) を行なった後、冷凍保存、溶解して用いた。

4穴シャーレ (Nunc, Thermo Scientific) 中で酵素反応後、倒立顕微鏡下、葯を柄付き針とピンセットでほぐし、花粉母細胞袋を分け取り、8ウェルセパレート型の96穴シャーレを用いて、浸透圧剤を含む酵素液および蛍光色素液への移動を行なった。

蛍光倒立顕微鏡 (オリンパス IX71) を用いて、可視光、DAPI 染色 (終濃 2.5 ng/mL, 青色、WU フィルター) とアニリンブルー染色 (終濃 0.05%, pH 8.5, 青緑色、WU フィルター), クロロフィル蛍光 (赤

色、WIB フィルター), などの観察を行なった。

マイクロマニピュレーション

マイクロマニピュレータ (MM-89, Narishige) と空圧式インジェクター (IM-11-2) を用いて、花粉母細胞袋、プロトプラスト、融合細胞などを、ピックアップ移動した。キャピラリー (10 μ L, Drummond) 作成は、プレー (PC-10, Narishige) を用い、先端は紙やすり (粒度 2000, 360) によって内径を調節し、水で洗浄して用いた。先端形状は、既報によりペンバーナー (Prince) を用いて改良した¹²⁾。

結果と討論

葉と葯からの細胞壁分解酵素条件の検討

図 1 に Columbia の葉のプロトプラスト化酵素の例を示す。96 穴シャーレを用い振とう処理することにより、1 条件 100 μ L の少量で、通常の 24 穴シャーレ、0.4 mL の条件¹¹⁾と同様に、倒立顕微鏡観察により、プロトプラスト単離量の評価が可能であった。葉からのプロトプラスト単離は、セルラーゼは RS より R10 の方が良い。R10, H, M の組み合わせも効果的であったが、最適酵素組み合わせ条件としては、できるだけ少ない酵素種の条件を選択し、短時間でも単離が見られる R10, P の組み合わせが選択でき

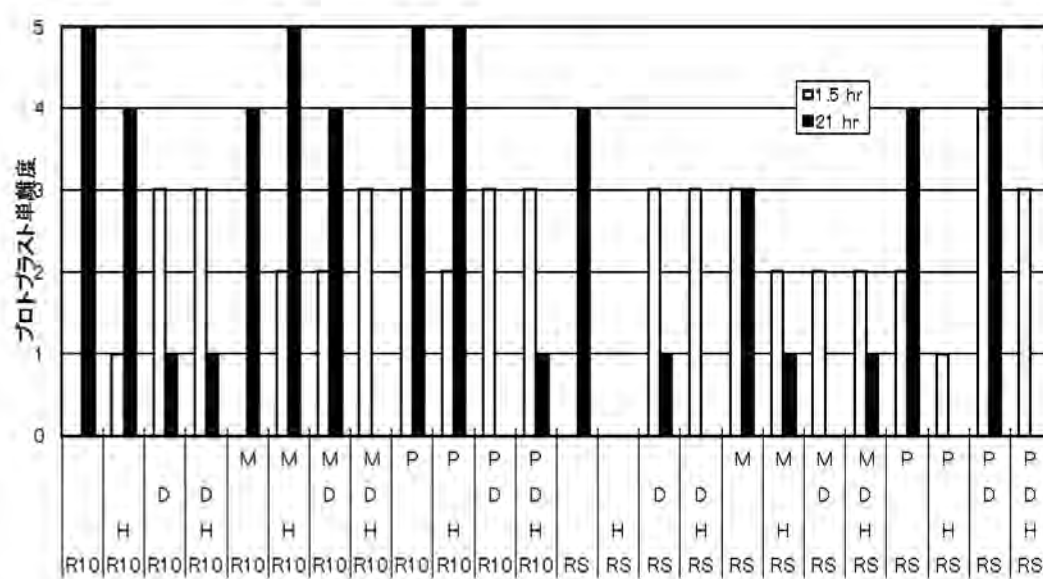


図 1. Columbia 葉の最適プロトプラスト化酵素条件検索. R10, RS, H, D, M, P の 24 通りの組み合わせを 0.6 M マンニトールに溶解した. 縦軸は 1.5 時間 (白), 21 時間 (黒) 処理後のプロトプラスト単離度.

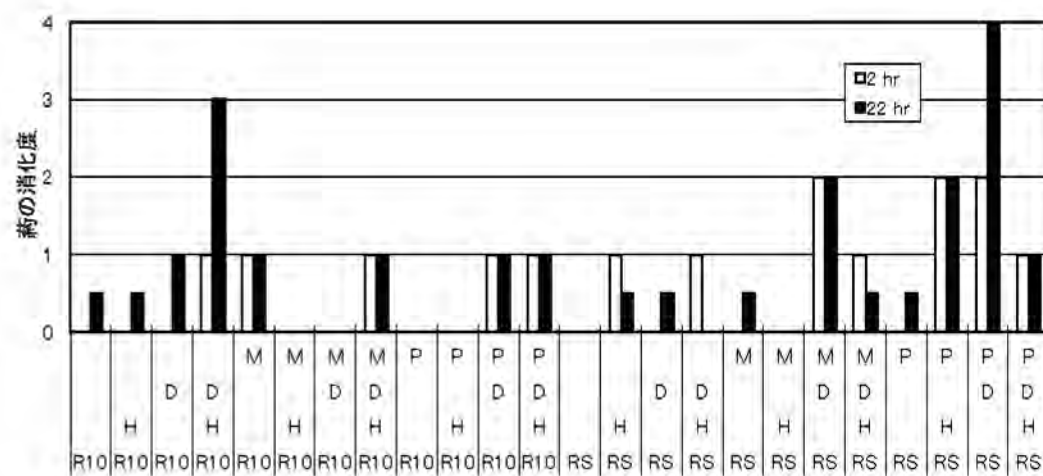


図 2. Columbia 葯の最適消化酵素条件検索. R10, RS, H, D, M, P の 24 通りの組み合わせを 0.6 M マンニトールに溶解した. 縦軸は 2 時間 (白), 22 時間 (黒) 処理後の消化度.

る。セルラーゼのみでも、一晩後には単離されてくるが、短時間では見られなかった。また、HとDが共に加わると、葉プロトプラストを壊す働きがあった。RS, H, D, Pのように、強すぎる酵素条件では、プロトプラストは短時間では単離されても、後に壊れて低評価になった。

一方葯は、葉に比べプロトプラスト単離は容易ではないので、最初に消化実験(図2)を行なった。セルラーゼはR10側より強い活性のあるRS側が良い傾向が見られた。Mとの組み合わせに比べ、Pとの組み合わせの方が良い傾向が見られた。

図3に示すように葯の外側薄膜は残るが、内部組織は、葯の発達時期により花粉囊の部分が大きく残る場合(図3A, B)と、花粉母細胞の部位まで消化されるもの(図3C, D)とがあった。一晩反応により、RS, H, Pの組み合わせ、または、RS, D, Pの組み合わせ条件が、花粉囊外側のタペタム層までは消化されたと考えられた(図3B, D)。RS, H, D, Pの最も強い組み合わせ条件において葯の消化度が悪いのは、投入葯の発達時期が遅い花粉形成期だった可能性も考えられる。

以上の結果から、次項の、葯の内部にある花粉母細胞のプロトプラスト化の目的のためには、酵素組み合わせとして、RS, H, Pの組み合わせ(酵素A)と、RS, H, D, Pの2組み合わせを選択し、色々な発達時期の葯を用いることとした。また、難プロトプラスト化材料のマングローブ樹木の葉での知見¹³⁾を元に、RS, H, D, Pの酵素濃度を4倍まで高くする(酵素B)選択をした。

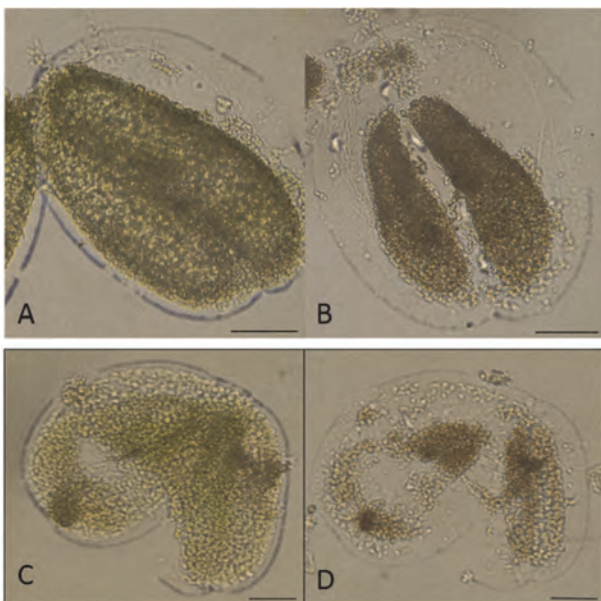


図3. Columbia 葉の最適プロトプラスト化酵素条件検索. R10, R細胞壁分解酵素による葯の消化の様子. A, BはRS, H, Pの組み合わせ. C, DはRS, D, Pの組み合わせ. A, Cは2時間後. B, Dは一晩後の倒立顕微鏡写真. Bar, 50 μ m.

花粉母細胞の観察

Columbia 葯の発達段階第1期

花粉母細胞が減数分裂を開始する時期の若い葯(第1期)大きさは、100-150 μ m程度であった。この時期の葯から、図4に示すように若干消化された花粉母細胞塊と思われる構造が酵素液中で観察された。図5に示すように、若い葯からは、タペート細胞以外に、花粉母細胞のプロトプラストも得られていると考えられるが、酵素液中では、DAPIによる青色蛍光は検出できず、また比較のためのタペート細胞の葉緑体の赤い蛍光も検出できないので、酵素液から染色液へ移す必要があった。この時、若い発達段階の葯から消化が進んだ細胞(塊)は、第2期以降の葯の場合と異なり、マイクロマニピュレーションによってしか移動できなかった。

図6に示すように、大きいプロトプラストをマイクロマニピュレーションにより、酵素液からソルビ

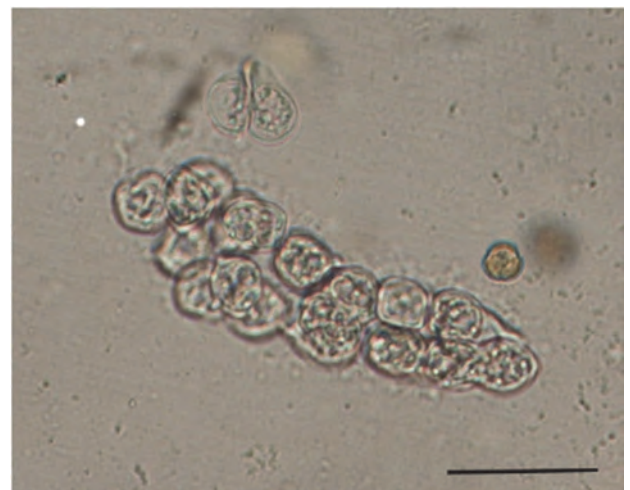


図4. Columbia の若い葯の花粉母細胞塊. 酵素B処理したもの. Bar, 50 μ m.

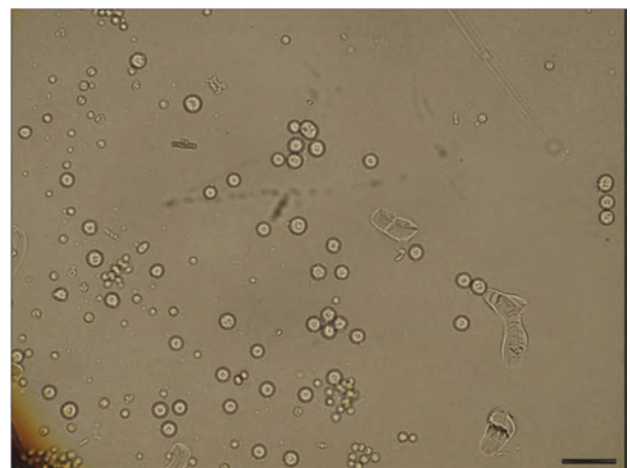


図5. Columbia の若い葯からの大小プロトプラスト. 酵素Bにより1時間処理したもの. Bar, 50 μ m.

トール液へ移すと DAPI で染色されたが、葉緑体の蛍光は見られなかったので、花粉母細胞起源のプロトプラストが得られたと考えられる。

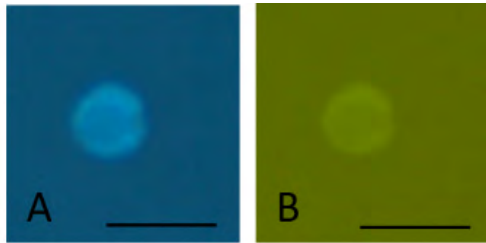


図 6. Columbia の若い葯から得られたプロトプラスト。酵素 A 処理後、大き目のプロトプラストをマイクロマニピュレーションにより 2M ソルビトール液へ移動し DAPI 染色したもの。WU フィルター (A), WIB フィルター (B)。Bar, 20 μm 。

Columbia 葯の発達段階第 2 期

減数分裂を進めていると考えられる第 1 期よりもやや発達した時期の葯を酵素 A 処理し、柄付き針とピンセットでほぐすと、花粉母細胞袋と、その周囲にタペタム細胞構造が見られた (図 7)。

独立した花粉母細胞袋を、倒立顕微鏡下、ピンセットで 4 穴シャーレの 0.6 M ソルビトール中の DAPI 染色液へ移し染色した。花粉母細胞袋内の染色は、短時間では完了せず、一晩を要した。さらに、ピンセットで、スライドグラス上、2 M ソルビトール 10 μL に移し、カバーグラスをかけ押しつぶし観察した (図 8, 9)。分裂細胞の核が染色されて観察された。

この時、スライドグラス上のカバーグラスをかけた状態において、0.6 M ソルビトール液で封入すると、液の蒸発があり、長期の観察ができないが、2 M のソルビトール液で封入すると、蒸発が抑えられ、数日間の観察が可能であった。

Landsberg 葯の発達段階第 1 期

Landsberg の葯についても、Columbia と同様に、酵素処理と、染色を行ったところ、葯の発達段階が若い時期には、図 10 のように、花粉母細胞起源と思われるプロトプラスト化が観察された。この時葯の大きさは 200 μm 程度であった。

Landsberg 葯の発達段階第 2 期

やや発達した時期の葯を、酵素 B の処理により、Columbia で見られたものと同様な、独立した花粉母細胞袋が得られた (図 11)。

DAPI 染色には、酵素液からピンセットでソルビトール液に移動する必要があるため、染色には時間を要したので、Columbia と同様に、袋の浸透性が悪い



図 7. Columbia 葯発達段階第 2 期の独立した花粉母細胞袋とねタペタム細胞のプロトプラスト。酵素 A で処理したもの。Bar, 50 μm 。

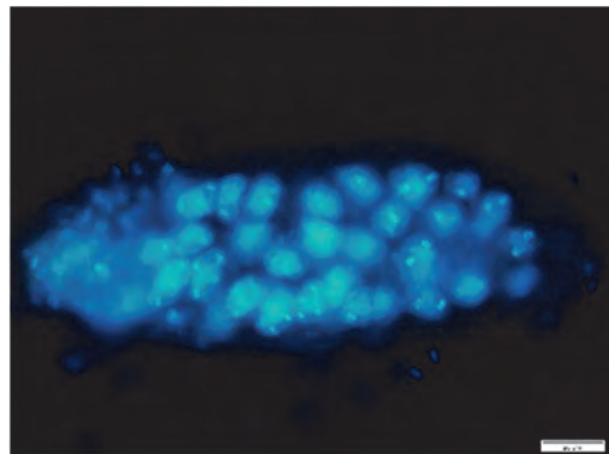


図 8. Columbia 葯の発達段階第 2 期の独立した花粉母細胞袋。酵素 A 処理したもの。DAPI 染色後、スライドグラス上 2 M ソルビトールへ移動し、カバーグラスをかけた。正立顕微鏡観察写真。Bar, 20 μm 。

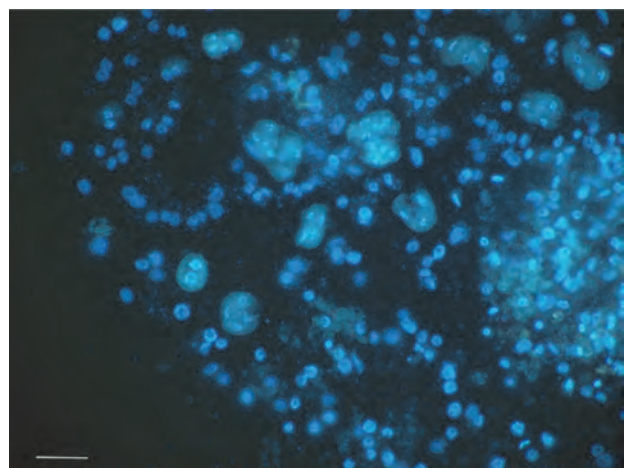


図 9. 発達段階第 2 期の Columbia 葯の DAPI 染色。Bar, 25 μm

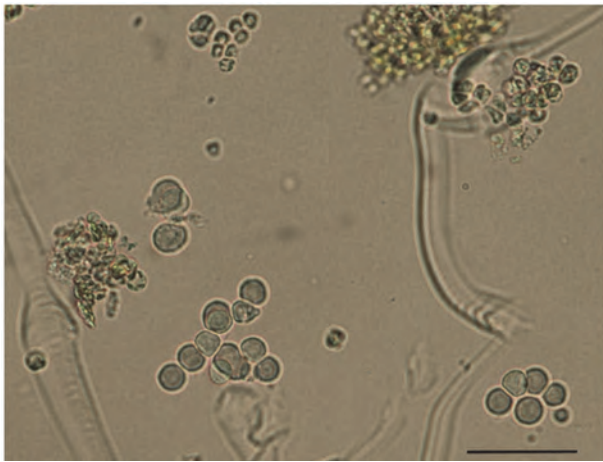


図 10. Landsberg 葯の発達段階第 1 期の大小プロトプラスト. 酵素 B で 2 時間処理したもの. Bar, 50 μm .

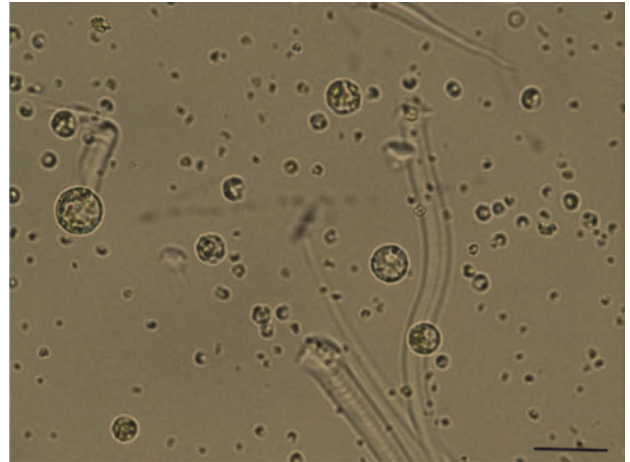


図 12. Landsberg 葯の発達段階第 2 期のプロトプラスト. 酵素 B を用いて一晩処理したもの. Bar, 50 μm .

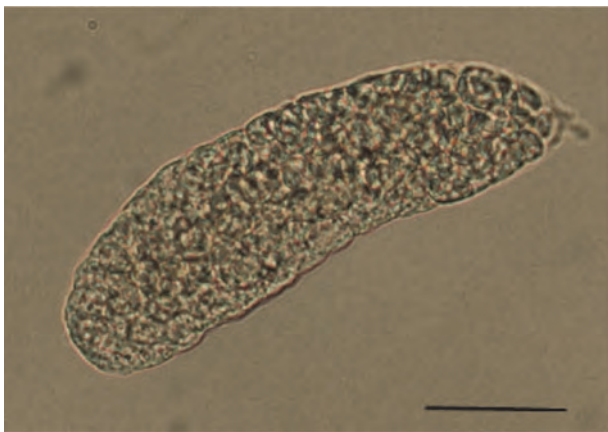


図 11. Landsberg の葯の発達段階第 2 期の花粉母細胞袋. 酵素 B で処理したもの. Bar, 50 μm .

と考えられる。

Landsberg の場合は、Columbia に比べ、タペート起源と思われる細胞には葉緑体の顆粒がより多く観察された。

酵素液中には、細胞内容物が見られない花粉母細胞起源と考えられるプロトプラストと同じ大きさか、さらに大きいプロトプラストが観察された (図 12)。この起源を明らかにするため、マイクロマニピュレーションによって、大きな球状細胞を DAPI 染色液に移動して観察したところ、図 13 のように、葉緑体の赤い蛍光が強く観察されたので、タペート細胞由来のプロトプラストが酵素液中で融合したものと判断された。

第 2 期の葯の大きさは、倒立顕微鏡下、250 μm 程度が目安になるが、第 3 期とのみかけの違いははっきりしなかった。

Landsberg 葯の発達段階第 3 期

第 3 期の葯の大きさは、300 μm 以上が目安になるが、

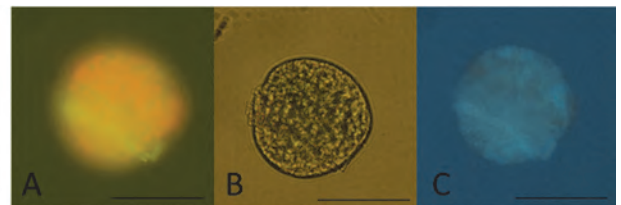


図 13. Landsberg のタペート細胞由来プロトプラストからの融合細胞. 赤い蛍光 (A, WIB フィルター), 可視光 (B), 青い蛍光 (C, WU フィルター). Bar, 50 μm

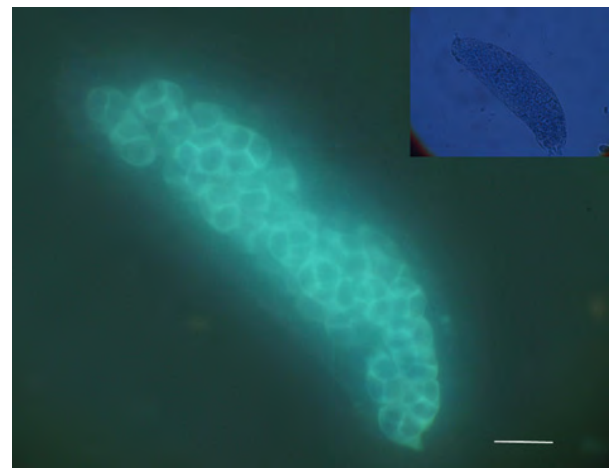


図 14. Landsberg の発達した葯の花粉母細胞袋. アニリンブルーによりカロースを染色したもの. Bar, 25 μm . 枠内は可視光下で観察したもの.

第 2 期とのみかけの違いは明確ではない。酵素処理後、マイクロマニピュレーションにより、花粉母細胞袋を、ソルビトール液に移し、アニリンブルー染色液を加えたところ、図 14 のようにカロースに特異的な青緑色に細胞壁が染色された、四分子構造と考えられた。この染色には、2 日間を要したので、袋の膜の浸透性は悪い。

花粉母細胞袋の他の酵素処理

Landsberg の発達した葯からの花粉母細胞袋の、DAPI による染色には、通常一晩かかるが、酵素 B 処理後、マイクロマニピュレータにより花粉母細胞袋を、セパレート型 96 穴シャーレ中で β -グルクロニダーゼ処理することにより、短時間での染色が見られたので、酵素処理により浸透性が向上したと考えられた。

しかし、固定した葯で用いられる β -グルクロニダーゼやサイトヘリカーゼ処理によっても、発達した葯から得られた花粉母細胞袋は、溶解することはできなかった。

まとめ

シロイヌナズナ *Columbia* の葉と葯を用いた細胞壁分解酵素 6 種類の 24 組み合わせの、96 穴シャーレ中、各 100 μ L の少量の実験により、葉のプロトプラスト化酵素としては、セルラーゼ R10, ペクトリアーゼ Y23 の組み合わせを最適条件として選択できた。しかし、葯は、葉に比べてより強い酵素条件でのみ消化が見られ、葯の発達時期により消化される組織が異なる結果が得られた。葯の細胞壁分解酵素条件として、セルラーゼ RS, ヘミセルラーゼ、ペクトリアーゼ Y23 の組み合わせ酵素条件 A と、これにドリセララーゼ 20 を加え、さらに、通常の 4 倍濃度の強い酵素条件 B を用いることとした。

次に、*Columbia* と Landsberg の、葯の発達段階を若い時期の 1 から 3 期として、各々の時期でのプロトプラスト化を試みた。葯の発達時期は、倒立顕微鏡下の観察により、*Columbia* の葯は、Landsberg の葯より小さめであり、150 μ m、200 μ m の長さが目安となり、後者は 200 μ m、250 μ m、300 μ m などの長さが目安となるが、大きさだけでは細かい発達時期の特定は困難であった。

若い第 1 期の葯では、大小プロトプラストの単離を観察した。プロトプラストの起源として、目指す花粉母細胞か、タペート細胞かどうかについて調べた。マイクロマニピュレーションにより、酵素液から浸透圧剤を含む染色液に移し、DAPI 染色と後者が持つ葉緑体の蛍光が見られないことにより、大きいプロトプラストの一部は花粉母細胞起源と判断された。

Landsberg においては、酵素 B 条件により、得られたタペート細胞のプロトプラストが融合することが明らかになったが、細胞内容物から花粉母細胞とは区別できることが判明した。

第 2 期以降の発達した葯においては、*Columbia* と Landsberg 共にプロトプラスト単離は困難であっ

たが、消化された葯から、独立した花粉母細胞袋が得られた。これを倒立顕微鏡下、4 穴シャーレまたは 96 穴シャーレの各ウェル中、核や染色体を染色する DAPI 液や、細胞壁のカロースを染色するアニリンブルー液に、ピンセットで移すことにより、紫外蛍光を観察できた。

今回得られた花粉母細胞袋構造は、スライドグラス上の、2 M ソルビトール液にピンセットで移し、カバーガラスで押しつぶすことにより、容易に分裂核の観察と保存が可能となった。

以上、シロイヌナズナの葯の発達時期に応じた処理により、花粉母細胞を固定することなく、核や染色体などの観察が可能となったと考えられる。

謝辞

本論文は、2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201610) を受けて行われた。記して感謝する。

文献

- Hillers KJ, Jantsch V, Martinez-Perez E and Yanowitz JL (2015) Meiosis. In: *WormBook*. doi: 10.1895/wormbook.1.178.1.
- Davis L and Smith GR (2001) Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**:8395-8402.
- Mercier R and Grelon M (2008) Meiosis in plants: ten years of gene discovery. *Cytogenet. Genome Res.* **120**:281-290.
- Riley R and Miller TE (1970) Meiotic chromosome pairing in *Triticale*. *Nature* **227**(5253):82-83.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**(6814):796-815.
- Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Körber H, Redei GP and Schell J (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**(21):8467-71.
- Bancroft I(1), Bhatt AM, Sjodin C, Scofield S, Jones JD and Dean C. (1992) Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **233**:449-461.
- Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**:507-16.
- Nagata T and Takebe I (1970) Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* **92**:301-308.
- Hayakawa S, Iwamoto A and Azumi Y (2007) Analysis of chromosome behavior during meiosis of *Arabidopsis* polyploid mutants. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **18**:71-75.
- Sasamoto H, Wakita Y and Baba S (1997) Effect of high sorbitol concentration on protoplast isolation from cotyledons of mangroves, *Avicennia marina*

- and A. lanata. Plant Biotechnol.* **14**:101-104.
- 12) Ogita S, Sasamoto H and Kubo T (1999) Selection and microculture of single embryogenic clusters in Japanese conifers; *Picea jezoensis*, *Larix leptolepis* and *Cryptomeria japonica*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **35**:428-431.
- 13) Kawana Y, Sasamoto H, Mochida Y and Suzuki K (2004) Leaf protoplast isolation from eight mangrove species of three different families; Avicenniaceae, Rhizophoraceae and Sonneratiaceae. *Mangrove Sci.* **3**:25-31.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

インゲンマメの若い根におけるアポプラスト経由の溶質移動 に関する組織学及び細胞化学的研究

早津 学^{1,2,3} 安積良隆^{1,2} 加藤純一¹ 加藤真央¹ 二見有紀¹
笹本浜子² 鈴木季直^{1,2,4}

Histological and Cytochemical Studies on the Apoplastic Movement of
Solute in Young Roots of the Kidney Bean

Manabu Hayatsu^{1,2,3}, Yoshitaka Azumi^{1,2}, Jun'ichi Katoh¹, Mao Katoh¹,
Yuki Futami¹, Hamako Sasamoto² and Suechika Suzuki^{1,2,4}

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 Present Address: Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata City, Niigata 951-8150, Japan

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

Abstract: To examine whether the apoplastic movement of solutes is regulated by the developing endodermis in young roots of kidney beans, histological observations and a cytochemical study using lanthanum (La) as an apoplastic tracer were carried out. In transverse sections from the elongation zone of young roots cut at about 7.5 mm from the end of root cap, Casparian strips were found at the anticlinal walls of endodermal cells. While, in transverse sections from a similar zone of roots grown in the solution containing 10 mM LaCl₃, numerous electron-dense precipitates were distributed at the cell walls not only in the cortex including the endodermis but also in the vascular cylinder. Electron probe X-ray microanalysis demonstrated that those precipitates contained mainly lanthanum. Light microscopic observations of serial sections from the root tip revealed that the endodermis appeared in the upper region about 1 mm from the end of root cap. These results indicate that possible influx of solutes into the vascular cylinder may occur through the region of root tip without any blocking at the apoplastic pathway, especially in young seedlings.

Keywords: apoplastic movement, endodermis, kidney bean root, casparian strip, La cytochemistry, X-ray microanalysis

序論

種子植物の根は、植物体の地上部を支える機械的支持器官であり、同時に、土壤中から水や無機塩類を吸収して地上部に輸送する重要な役割を果たしている。根の表面から吸収された水や溶質たる無機塩類の中心柱までの移動は、細胞壁を経由するアポプラストと細胞膜および細胞質を経由するシンプラストの二つの経路を経てなされていると考えられているが、物質移動の選択は、専ら、後者のシンプラストにおいて透過する細胞膜によってなされており、アポプラスト経路による自由拡散移動は内皮細胞層に

局在するカスパリー線によって遮断されることが知られている¹⁻⁴⁾。従って、根の表皮から侵入した水と溶質は必ず内皮細胞の細胞膜を経て中心柱内へと移動することとなり、この際、細胞膜の選択性が有害物質や細胞膜不透過性物質の中心柱内への侵入を阻止していると考えられる。

一方、根端の組織学においては、内皮は根端分裂組織辺縁部で形成されるが、内皮細胞層のカスパリー線分化は皮層の求心性成長が完了してから始まるとされている²⁾。根における水の最大吸収部位は、

中心柱内の維管束の形成と相関して根端分裂組織から数 cm 上の部分であることが報告されている⁵⁾が、それより下部においても水や溶質の侵入が生ずることは否定できない。特に、カスパー線に伴う内皮細胞層が形成される以前、あるいは、以後に、根冠を含む根端において根の中心部への異物侵入は生じうるか否かは興味深い。本研究では、この問題解明への試みとして発芽および発根初期の根の組織および微細構造観察を行った。

La イオンは細胞膜の Ca イオンチャネルに結合することで平滑筋細胞内への Ca イオンの流入を阻害することが良く知られている^{6,7)}。このことは、同時に、La が細胞膜を透過できない物質であることを意味し、従って、植物のアポプラスト経路を確認するためのトレーサーとして利用できる^{8,9)}。本研究では、発芽後のインゲンマメの根における物質移動を観察するために La を用いた。また、根の組織内で観察された沈澱顆粒が La であることを証明するために X 線マイクロアナリシスを行った。

材料と方法

材料

市販のツルナシインゲンマメ *Phaseolus vulgaris* L. (以下、インゲンマメ) の種子を入手し、表面に塗布されていた防腐剤を蒸留水で洗浄した後、シャーレの底部に敷いた蒸留水を含んだ脱脂綿上に播種し、20°C に設定した恒温器中で発芽、発根させた。播種から 4 日後に、一部の種子は、育成液を蒸留水から 10 mM LaCl₃ 液に変えた。また、一部の種子は播種の段階から 10 mM LaCl₃ 液を与えて発芽させ、育成した。

根の組織および微細構造の観察

播種から 4 日後のインゲンマメの根を、根端から 10 mm まで 2.5 mm ずつ 4 区画に分け、それぞれのブロックを蒸留水中で脱気した。その後、pH 7.2 のリン酸緩衝液で希釈した 6% グルタルアルデヒド溶液で前固定し、リン酸緩衝液で洗浄してから 2% 四酸化オスミウム (OsO₄) 溶液で後固定した。固定試料はアセトン系列で脱水した。アセトンとエポキシ樹脂 (Quetol 812) の混合液で 24 時間置換処理してから樹脂に包埋し、40°C と 60°C で 24 時間ずつ加温重合した。ウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut-N) を用い、各試料ブロックから厚さ約 0.9 μm の光学顕微鏡用切片と厚さ約 70 nm の電子顕微鏡用の超薄切片を作製した。光学顕微鏡用切片はトレイジンプルーで加温染色し、光学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察した。根端組織の詳細観察のため、根

冠の先端からおおよそ 100 μm ほどの連続横断切片を作製して光学顕微鏡で観察した。一方、超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX、JEOL JEM1230) で観察した。

La 細胞化学

アポプラストを経由する物質移動を観察するため、10 mM LaCl₃ 溶液で育成された根から、通常観察用試料と同様に、根端から 10 mm まで 2.5 mm ずつ 4 区画に分けた樹脂ブロックを作製した。通常観察と同様に、それぞれ、光学顕微鏡用切片はトレイジンプルーで、電子顕微鏡観察用切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で染色したが、後者の一部は無染色とした。

X 線マイクロアナリシス

生体内に浸透した La イオンは、電子顕微鏡下では沈澱顆粒として観察される^{7,9)}。観察される沈澱顆粒が確かに La を含むことを示すために、エネルギー分散型 X 線検出器 (JEOL EX-14033 JTP) を装着した分析電子顕微鏡 (JEOL JEM1230) により LaCl₃ 溶液で育成された根の無染色超薄切片の X 線マイクロアナリシスを行った。

結果

伸長域の組織と細胞の観察

播種から 4 日後に根はおおよそ 20 mm に伸長し、背軸付近は細いが次第に太くなり中程を過ぎると先細りとなり、先端にはドーム型の根冠が形成される。根の組織観察のために、徒手切片法により、伸長域となる、根冠先端からおおよそ 7.5 mm 上部の横断切片を作製し、光学顕微鏡で観察した (Fig. 1A)。切片作製領域の根の直径はおおよそ 1 mm であった。この領域では、根の中央に典型的な放射中心柱が形成されており、中心部には明瞭な木部と篩部が見られ、中心柱の外周には内鞘も発達していた。その内鞘を取り囲む皮層の最内層として内皮が観察された。同領域の樹脂包埋試料から作製した横断超薄切片を電子顕微鏡で観察した。Fig. 1B は、皮層と中心柱の境界領域を示しており、内皮と内鞘が隣接して同心円状に配列し、内皮細胞間には細胞壁中葉付近のみが隣接細胞の原形質で圧着されているような巾 0.1 ~ 0.2 μm、長さ 2 ~ 5 μm の細い帯状構造が観察された。その外観は、動物の表皮系細胞などで見られる密着結合に似ており⁹⁾、カスパー線と考えられた。内皮細胞内の中央液泡はかなり発達していたが、原形質は細胞壁に沿って十分な厚さを保持しており、これらの細胞が、機能細胞として活発に活動している

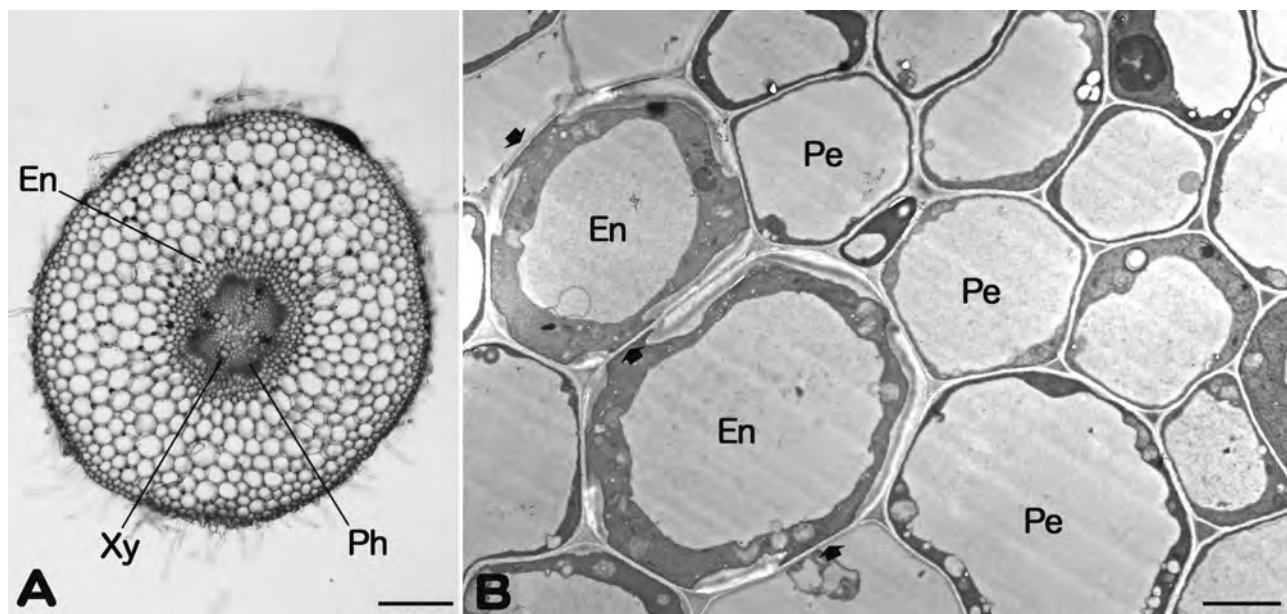


Fig. 1. Transverse sections from the elongation zone of young roots cut at about 7.5 mm from the end of root cap. A. Light micrograph, showing typical root tissues of epidermis, cortex including endodermis (En) and vascular cylinder including xylem (Xy) and phloem (Ph). B. Electron micrograph, showing boundary region between cortex and vascular cylinder. Endodermal cells (En) with Casparian strips (arrows) are adjacent to pericycle cells (Pe) of the stele. Scale bars, 200 μm (A) and 5 μm (B).

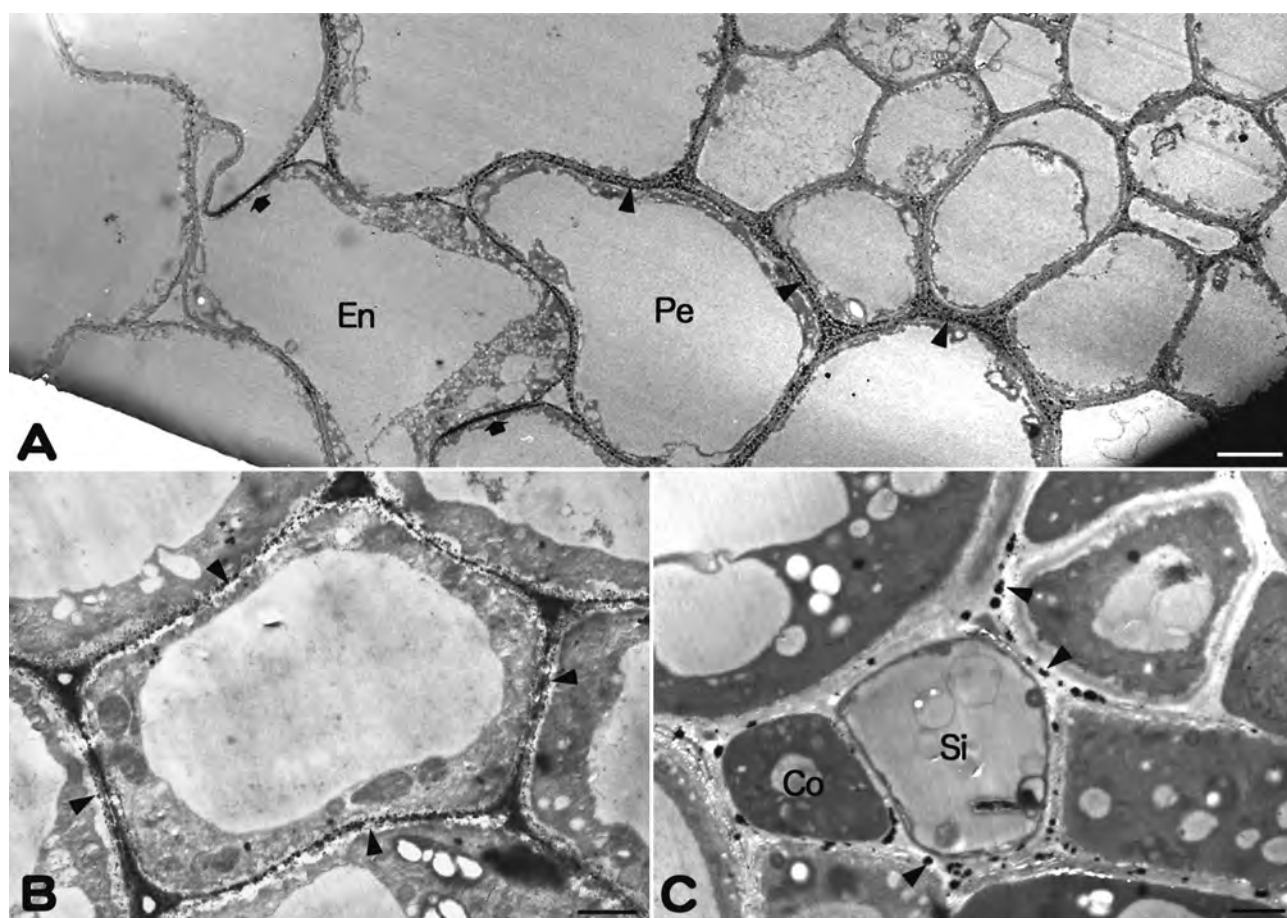


Fig.2. Electron micrographs of transverse sections from elongation zone at about 7.5 mm from the end of root cap in young roots incubated in La solution. A. Boundary region between cortex and vascular cylinder, showing endodermal cells (En) with Casparian strips (arrows) and adjacent pericycle cells (Pe). Note the distribution of electron-dense precipitates (arrow heads) along the cell walls even in inside of vascular cylinder. B. Enlarged view of cortex cells, showing electron-dense precipitates (arrow heads) in cell walls. C. Enlarged view of stele, showing electron-dense precipitates (arrow heads) in the cell walls around sieve element (Si) and companion cell (Co). Scale bars, 5 μm (A) and 2 μm (B, C).

ことが示唆された。

組織への La の浸透

発根後に La を含む水で育成した植物の根を対象とし、根冠先端からおよそ 7.5 mm 上の領域を化学固定して樹脂包埋した試料の横断超薄切片を電子顕微鏡で観察した (Fig. 2)。Fig. 2A は皮層と中心柱の境界領域を示しており、内皮細胞間には明瞭なカスパー線が観察された。La は超薄切片では微細な顆粒状の沈澱として観察されることが知られており^{6,7)}、これに該当する沈澱顆粒と思われるものは、皮層の細胞間 (Fig. 2B) はもちろんのこと、中心柱内の細胞間 (Fig. 2C) にも同様に観察され、La 浸透がカスパー線でブロックされるという予想とは異なり、皮層と中心柱の境界領域全体の細胞壁部分に局在分布していた。

酢酸ウランやクエン酸鉛などの電子染色を施さない超薄切片を用いて細胞壁部分に観察される沈澱顆粒の X 線マイクロアナリシスを行った。典型的な分析例である Fig. 3 の X 線スペクトルで示されるように、皮層と中心柱内の細胞壁に局在するいずれの沈澱顆粒からも La-L α (4,650 eV)、La-L β_1 (5,041 eV: X 線強度は L α の 50%)、La-L β_2 (5,383 eV: X 線強度は L α の 20%) のスペクトルピークが検出され、これらの沈澱顆粒が La の沈澱顆粒であること

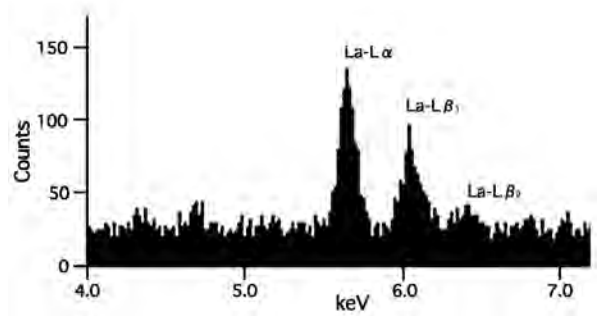


Fig.3. Typical X-ray spectrum obtained from the analysis of precipitates localized at the cell wall in the vascular tissue, indicating the spectral peaks of La-L α and La-L β_1 and β_2 emissions. Labels of peaks show the element-line emission, respectively. The ordinate gives the number of X-ray events, and the abscissa indicates the X-ray energy in keV.

が確認された。

根端の組織観察

内皮細胞層に分布するカスパー線はアポプラスト経路による物質の自由拡散移動を妨げるとされており、外部から加えた La は内皮で阻止され、中心柱内には浸透できないと予測されたにも拘らず、前述の結果では、根冠先端からおよそ 7.5 mm 上の領域の中心柱細胞間の細胞壁にも La の沈澱顆粒が観察された。中心柱内への La の浸透は、根のもっと先端部分で生じている可能性があり、先端部の組織観

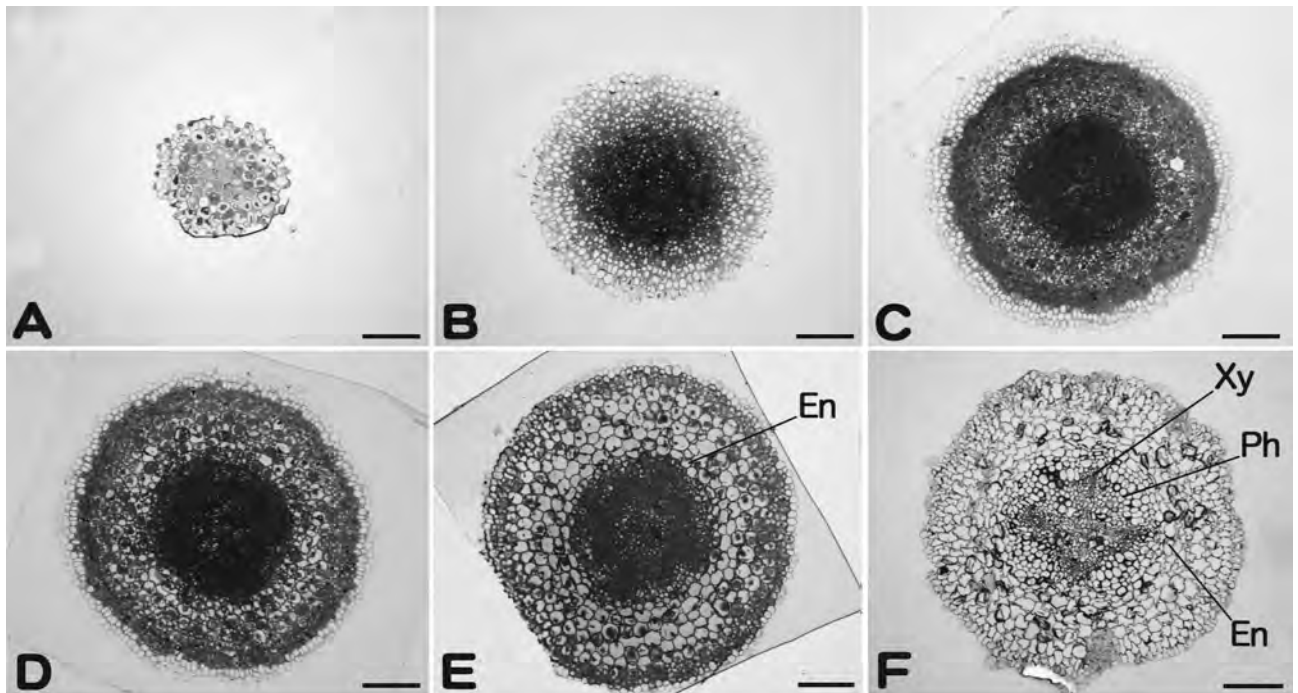


Fig.4. Representative serial transverse sections of the young root cut every 100 μ m from the end of root cap. A. Section of 70 μ m upper region, showing only root cap cells. B. Section of 270 μ m upper region, showing apical meristem in the central zone. C and D. Section of 670 μ m and 820 μ m upper regions, showing developing cortex cells between central apical meristem and peripheral root cap cells. E. Section of about 1 mm upper region, showing developing endodermis (En) and central vascular system. F. Section of about 2.5 mm upper region, showing epidermis, cortex including endodermis (En) and complete vascular cylinder with xylem (Xy) and phloem (Ph). Scale bars, 100 μ m (A-F).

察を行った。

Fig. 4は、化学固定後に樹脂包埋した根を根冠の先端からおよそ100 μmごとに連続的に横断薄切して光学顕微鏡で観察した結果を示している。先端部は根冠細胞のみで形成されており (Fig. 4A)、根端分裂組織は根冠先端から上の0.2～0.3 mmあたりの領域から見られ、根の軸中心に局在していた (Fig. 4B～D)。その領域よりさらに上部となる0.8～2.5 mmの領域では皮層と中心柱が観察されるようになり、内皮および維管束の木部や篩部も明瞭に観察された (Fig. 4E, F)。また、Fig. 4Dでは、最外層はなお細胞質が疎である大きめの細胞で構成されており、それらが根冠細胞であることを示していた。一方、先端から3.7 mm上の領域で観察された横断切片像は、伸長域⁴⁾とされる7.5 mm上の領域での像 (Fig. 1A) に近似しており、表皮、皮層、中心柱が明瞭であり、内皮、内鞘、木部、篩部が確認された。

討論

カスパリー線の微細構造

幼根から伸びた全長およそ20 mmの若い根の中央部付近の横断切片像では明確な表皮、皮層、中心柱が観察された (Fig. 1)。皮層と中心柱の境界では内皮と内鞘が隣接しており、内皮細胞の側面には隣接する細胞間の細胞壁に巾0.1～0.2 μm、長さ2～5 μmの細い帯状構造が観察された (Fig. 1B, Fig. 2A)。動物細胞に見られる密着結合との形態学的類似性と内皮細胞間に局在することから、それらはカスパリー線と考えられる^{1-4,10)}。カスパリー線は、細胞壁の中葉域のみを隣接細胞の細胞膜が挟み込むような構造をしており、電子顕微鏡像では、その部分の電子密度が高いとされている¹⁰⁾。今回観察されたカスパリー線の電子密度はさほど高くはない。カスパリー線の電子密度はスベリンなどの沈着物質の蓄積濃度と相関しているように思われるが、そうであれば、観察された低電子密度のものは、試料がまだ未成熟な根であったことを反映しているのかもしれない。一部のカスパリー線では、挟み込む二細胞のうちの一細胞の原形質がそこに見られないものもあったが、液胞の膨大化によりその付近の原形質が移動させられることはありうることで、その結果、そのような像が生じたのではないかと思われる。

若い根における中心柱への溶質移動

Laを含む水で育成したインゲンマメの若い根を根冠先端からおよそ7.5 mmの部分で横断して得られた切片像の観察では、中心柱の細胞間細胞壁に多数

の沈澱顆粒が認められ、X線マイクロアナリシスによりこれらの沈澱顆粒はLaからなるものであることが示された。内皮細胞の背斜側壁に形成されるカスパリー線はアポプラスト経由の溶質移動を妨げると考えられており¹⁻⁴⁾、ヤセイカンラン⁸⁾やトウモロコシ⁹⁾の根では、Laは中心柱内には浸透しないことが報告されており、今回の結果はそれと一致しない。発芽間もない若い根では、防御壁としてのカスパリー線の構築が不十分な領域やカスパリー線が関与できない領域においてLaが軸中心部に浸透した可能性が考えられる。根冠を含む根端先端部の組織観察結果 (Fig. 4) はこの可能性を示唆した。

一般に、内皮は根端の分裂組織から派生した細胞層として形成される⁴⁾が、インゲンマメの若い根では分裂組織は根冠先端から上の0.2～0.8 mmの領域に局在し (Fig. 4B～D)、根冠先端から1 mmより上部領域で明確な内皮が観察されていた (Fig. 4E)。根冠や表皮細胞の細胞壁にはロウ物質が蓄積されて水の通過を困難にしていると考えられている²⁾が、インゲンマメの若い根では、根冠先端からおよそ1 mmまでの領域はアポプラストを経由する水や溶質の移動は完全には阻止されず、Laもこの領域から浸透した可能性がある。また、前述したように、内皮カスパリー線の一部は電子密度があまり高くなく、観察された領域のカスパリー線構築が不完全で、水や溶質の通過を阻止出来ていないかもしれない。これらの解釈を検証する実験は今後の課題として残された。

謝辞

本研究の一部は、研究課題「マメ科植物の根のカスパリー線の分布とその機能に関する電子顕微鏡的研究」に対する2016年度総合理学研究所共同研究の研究助成 (RIIS201609) を受けて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Mohr H and Schopfer P (1969) *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin.
- 2) Esau K (1965) *Plant Anatomy, Second Edition*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 3) Esau K (1977) *Anatomy of Seed plants, Second Edition*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 4) Taiz L and Zeiger E (2002) *Plant Physiology, Third Edition*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts USA.
- 5) Kramer PJ (1959) Transpiration and the water economy of plants. In: *Plant Physiology, Vol.2*. Steward FC, ed., Academic Press, New York.
- 6) Van Breeman C, Fariunas BR, Casteels R, Gerba P, Wuytack F and Deth R (1973) Factors controlling

- cytoplasmic Ca^{2+} concentration. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B.* **265**:57-71.
- 7) Suzuki S (1982) Physiological and cytochemical studies on activator calcium in contraction by smooth muscle of a sea cucumber, *Isostichopus badiotus*. *Cell Tissue Res.* **222**:11-24.
- 8) Fernandez-Garcia N, Lopez-Pelez L, Hernandez M and Olmos E (2008) Role of phi cells and the endodermis under salt stress in *Brassica oleracea*. *New Phytologist* **181**:347-360.
- 9) Nagahashi G, Thomson WW and Leonard RT (1974) The casparian strip as a barrier to the movement of lanthanum in corn roots. *Science* **183**:670-671.
- 10) Ledbetter MC and Porter KR (1970) *Introduction to the Fine Structure of Plant Cells*. Springer-Verlag, New York.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

マダケのタケノコにおける道管の発達と水の通導

野島ひかる¹ 温井里奈子¹ 柏崎翔嘉¹ 丸田恵美子^{1,2} 箸本春樹^{1,2,3}

Vessel Development and Conductance of
the Bamboo Shoot of *Phyllostachys bambusoides*

Hikaru Nojima¹, Rinako Nukui¹, Shouka Kashiwazaki¹, Emiko Maruta^{1,2}
and Haruki Hashimoto^{1,2,3}

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

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

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

Abstract: Bamboo shoots are well-known to grow rapidly by means of internodal elongation supported by marked water uptake. In this study, we observed vessels of the proto- and metaxylem in different developmental stages in rapidly growing bamboo shoots of *Phyllostachys bambusoides*. The bamboo shoots for observation were ca. 20 cm in length from the apex to base, and segmented into 30 internodes. The protoxylem vessels developed preceding those of the metaxylem. However, the protoxylem vessels did not fully develop and were not functional for water uptake in the region above the 10th node. The metaxylem vessels were not mature in any regions of the bamboo shoot. While the protoxylem vessels below the 20th node appeared to be fully mature and functional, they were broken at some points, probably by stretching caused by the internodal elongation. This suggests that water may leak out of the protoxylem vessels into the apoplastic space around the broken points and reenter protoxylem vessels. These results suggest that water uptake in rapidly growing bamboo shoots depends on protoxylem vessels in part but may use the whole apoplastic space, and protoxylem vessels above the 10th or 20th node are not mature enough to function in water uptake. Also, no metaxylem vessels are functional in any internodal regions of the bamboo shoot.

Keywords: bamboo shoot, internodal growth, metaxylem, protoxylem, vessel element

序論

タケ類の地下茎の節から生じる若いシュートであるタケノコ（筍）は、節間下部に存在する介在分裂組織の細胞分裂と節間細胞の伸長成長が節間ごとにかかるために急速に成長する。植物細胞の伸長成長は、細胞壁の進展性の増加と液胞内の水の蓄積による膨圧の増加によって起こる。タケノコの急速な成長を支えるためには、地下部からの迅速な吸水が行われなければならない。一般に、土壌の水はおもに葉からの蒸散によって生じる水の化学ポテンシャルの勾配に従って道管を通して植物体を上昇する。道管を

構成する細胞である道管要素は成熟後、核と細胞質を失い、細胞壁の「管」となって死んだ状態で通導機能を担う。その細胞壁は全体がリグニンを含む物理的に強固な構造であるために伸長することはない。

急速に伸長する若い組織からなるタケノコで、その節間成長の過程において道管要素の分化と成熟がどのように進行し、実際どの程度の通導機能を果たし得るに至るかは興味深い問題である。若いシュートの茎頂分裂組織近傍での道管の分化と成熟は原生木部において始まり、それに遅れて後生木部の道管

が発達することがいくつかの種子植物で知られている¹⁻⁴⁾。モウソウチク (*Phyllostachys pubescens*) においても、タケノコの頂端付近では原生木部道管 (PV) の発達の後生木部道管 (MV) のそれに先行することが知られている⁴⁾。また、カヤツリグサ科の *Eleocharis acuta* では、途切れた環状要素は新しく分化した環状要素によって修復されることが報告されている⁵⁾。しかし、これらの観察事実が水の通導にどのように関わっているかは明らかではない。本研究の目的は、マダケ (*Phyllostachys bambusoides*) のタケノコを用いて、PV と MV それぞれの道管要素の発達過程と通導機能との関係を明らかにすることである。タケノコでは頂端から基部に向かって細胞および組織の齢の勾配が存在するので、本研究では道管の観察を頂端から基部までの節間ごとに行い、その観察結果に基づいてタケノコにおける水の通導経路について考察した。

材料と方法

神奈川大学湘南ひらつかキャンパス敷地内において2016年6月に地上部の全長が30~40cmのマダケ (*Phyllostachys bambusoides*) の「タケノコ」を採取した。図1aに示すタケノコは観察に用いたタケノコのひとつである。全体を被っている桿鞘を除去し(図1b)、縦に二等分し(図1c)、節間毎に切り取って観察に用いた。本稿では、節の位置を頂端から順に番号を付けて区別した。図1のタケノコでは30節が茎頂から約20cm、つまり地表に最も近い節である。節間については、たとえば、9節と10節の間の節間は9-10節間と呼び、他の節間についても同様に呼ぶことにした。

切り取った節間部は3%のホルムアルデヒドを含む0.1Mカコジル酸緩衝液(pH 7.2)中で固定し、使用時まで冷蔵庫内で保存した。固定した試料を緩衝液で洗浄後、エタノール上昇シリーズで脱水した後、Technovit7100樹脂に包埋した。包埋した試料をウルトラミクロームでガラスナイフを用いて薄切し、厚さ2 μ mの切片を作製した。切片はトルイジンブルーO、または、サフラニンで染色した。細胞壁の観察には、カルコフロールホワイトを用いた蛍光染色も用いた。核の観察では、Technovit7100樹脂に包埋した切片を4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で蛍光染色した。

結果と討論

30の節間からなるマダケのタケノコ(図1)の横断切片を観察した結果、中空の桿茎の外側から内側になるほど維管束全体や道管のサイズが大であった。

この結果は、マダケとモウソウチク (*Phyllostachys heterocyclus*) およびハチク (*Phyllostachys nigra*) について報告された知見と一致した^{6,7)}。本研究では、どの節間においても桿茎の中間部の道管について比較した。

図2a-cは、それぞれ10節の上部(9-10節間下部)、20節の上部(19-20節間下部)、30節の上部(29-30節間下部)の横断切片のトルイジンブルーO染色像である。10節の上部では、20節と30節の上部に比べて原生木部道管(PV)、後生木部道管(MV)とも細く未発達であった。10節、20節、30節の各上部のいずれの場合も、2本または3本のPVは側面で接していた。そのうちの1本は管壁が厚くトルイジンブルーOで強く染色されたため、その細胞壁は二次細胞壁であると考えられる。細胞壁の肥厚をより明瞭に観察するために、20節上部の横断切片についてカルコフロールホワイトを用いて蛍光染色した結果、すべての維管束で、2-3本のPVのうちの1本のPVでは細胞壁の顕著な肥厚が認められた(図3)。一方、PVを挟んで位置する2本のMVはいずれの場合も、管壁が薄く二次細胞壁特有の肥厚が認められなかった。各維管束のPV、MV、そして篩部以外の領域は、断面が小さい細胞によって占められていた。これらの横断切片の観察から、タケノコの頂端から基部(タケノコの30節付近)までの、すなわち、このタケノコすべての節間でMVが二次細胞壁特有の肥厚を持たず、道管要素として未成熟であることが示唆された。

MVとPVの成熟度を確かめるために、縦断切片の観察も行った。10節上部の縦断切片では、環紋肥厚を持つ細胞壁からなるPVの道管要素(図4a. 短矢印)とそれに接する環紋肥厚を持たないもう1つのPVの道管要素が認められ、横断切片での観察と符合する結果が得られた。環紋肥厚を持たないPVでは、道管要素間に長軸に垂直な明瞭な細胞壁が認められ、それらの道管要素が未成熟であることを示唆している。環紋肥厚をもつPVの道管要素の中には、核を持つ道管要素も認められた。したがって、それらはまだ道管として機能し得る段階にまで達していないと言える(図4b. 矢印)。一方、MVは細胞壁が薄く環紋肥厚は認められなかった(図4a. 長矢印)。

25節上部では、10節上部の観察結果と同様、2本のPVの一方(図5a. 黒短矢印)とMVの道管要素には環紋肥厚が認められなかった(図5a. 白矢印)。また、環紋肥厚を持つPVにおいて、核が残存した道管要素は観察した限り認められなかった(図5a. 黒長矢印)。25節上部の横断切片をDAPI蛍光

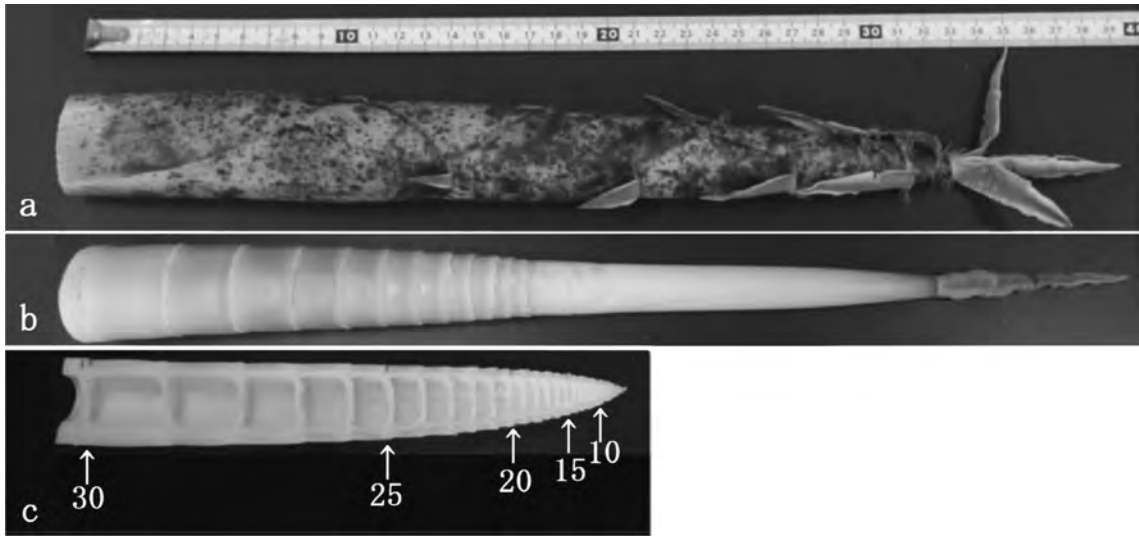


図1. マダケのタケノコ. a. 全長約 30 cm のマダケのタケノコ. b. 露出した筍皮を剥いだタケノコ. c. すべての筍皮を剥いだタケノコの縦断面. 桿茎頂端から基部までの長さは約 20 cm. 矢印とその下の数字は頂端の節から数えた節の番号を示す.

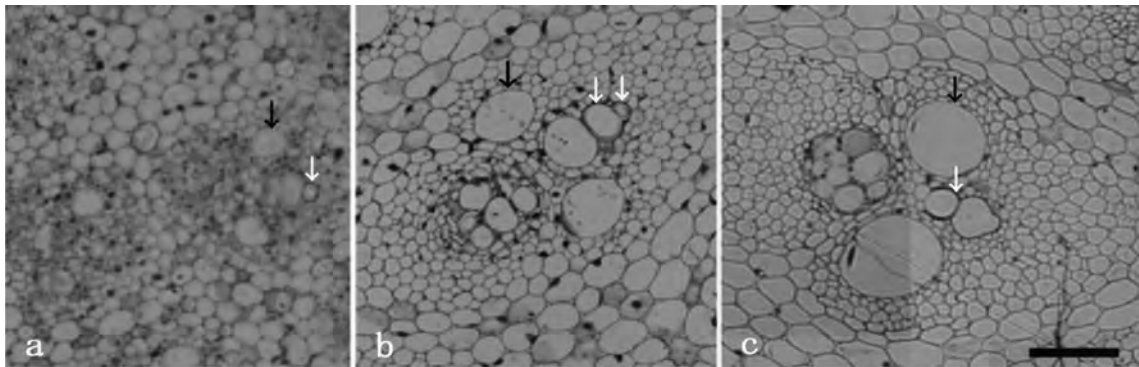


図2. 10 節上部 (a), 20 節上部 (b), 30 節上部 (c) の維管束の横断切片をトルイジンブルー O で染色した光学顕微鏡写真. 白矢印は PV、黒矢印は MV をそれぞれ示す. スケールバー: 100 μm .

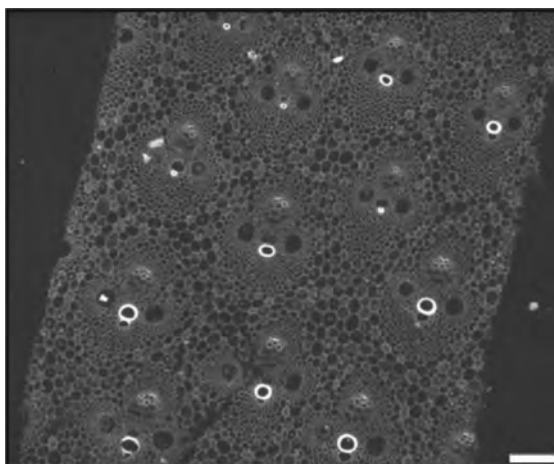


図3. カルコフルールホワイトで蛍光染色した 20 節上部の横断切片. 2 または 3 本の PV の内の 1 本のリグニン化された二次細胞壁からカルコフルールホワイトによる青白色の強い蛍光が発している. スケールバー: 100 μm .

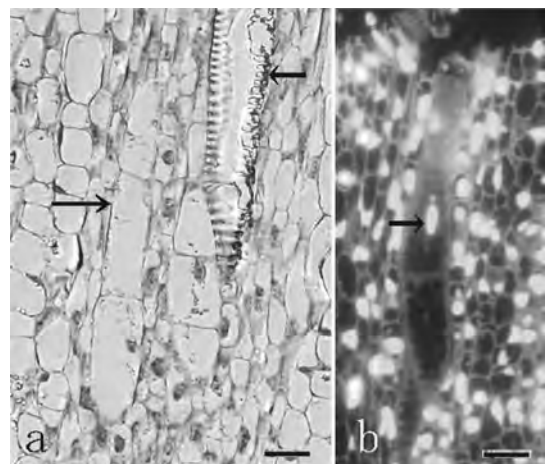


図4. 10 節上部の縦断切片. a. 環紋肥厚を持つ PV (短矢印) とそれに接する環紋肥厚を持たない PV. 2 本の PV の近傍に環紋肥厚を持たない MV が走向する (長矢印). スケールバー: 20 μm . b. DAPI で蛍光染色した蛍光顕微鏡写真. 環紋肥厚を持つ PV の道管要素に核が認められる (黒矢印). スケールバー: 20 μm .

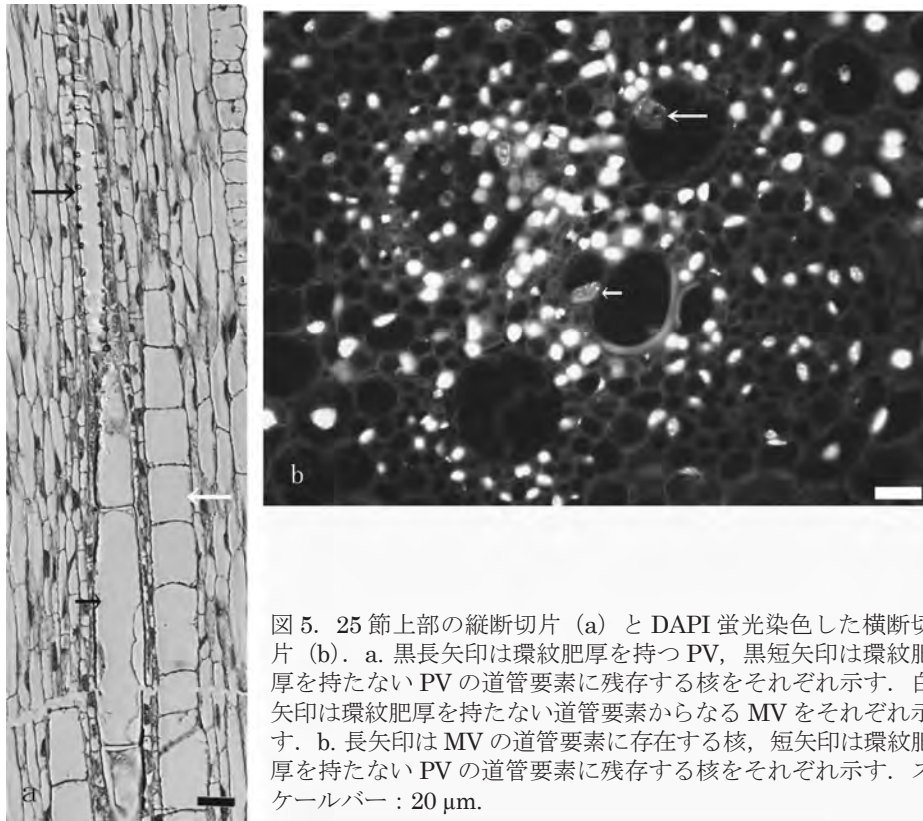


図5. 25節上部の縦断切片 (a) と DAPI 蛍光染色した横断切片 (b). a. 黒長矢印は環紋肥厚を持つPV, 黒短矢印は環紋肥厚を持たないPVの道管要素に残存する核をそれぞれ示す. 白矢印は環紋肥厚を持たない道管要素からなるMVをそれぞれ示す. b. 長矢印はMVの道管要素に存在する核, 短矢印は環紋肥厚を持たないPVの道管要素に残存する核をそれぞれ示す. スケールバー: 20 μm .



図6. 30節上部の縦断切片. 矢印は環紋肥厚を持つMVの道管要素内の核を示す. スケールバー: 20 μm .

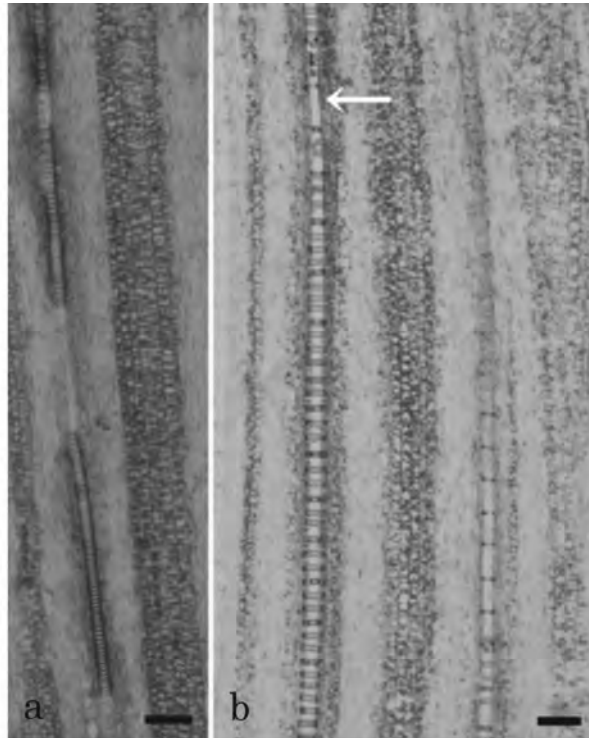


図7. 20節上部の縦断切片. a. 環紋肥厚を持つPVに途切れが認められる. b. 環紋肥厚を持つPVの環紋間の間隔が引き延ばされている (矢印). スケールバー: 20 μm .

染色して蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞壁が薄いPVとMVの道管要素に核が認められるものがあった (図5b)。

30節上部のMVの道管要素の中に、PVで見られ

る環紋肥厚ほどには顕著ではないが、環紋肥厚が認められるものがあった。しかし、そのような道管要素にも核や細胞質が認められるものがあった (図6)。したがって、頂端から30節の間ではMVのいずれ

においても道管として機能し得る段階にまで成熟が進んでいないと考えられる。

上述のように、10節上部、25節上部、30節上部のいずれにおいても、2本または3本のPVの中の1本には、間隔の狭い明瞭な環紋肥厚が、観察した限り例外無く認められたが(図3, 図4)、19-20節間、24-25節間、29-30節間(タケノコの基部付近)において、環紋肥厚を持つPVに途切れが生じているのが、かなりの頻度で観察された(図7a)。しかし、環紋肥厚を持たないPVには途切れが認められなかった。また、MVについては、頂端から30節に至るまで、観察した限り途切れは認められなかった。環紋肥厚をもつ成熟した道管要素は死んだ細胞であり細胞壁の進展性は極めて乏しいと考えられる。そのため環紋肥厚をもつ成熟した道管要素からなるPVの途切れは、節間成長の際に節間全体に生じる張力によって生じたと考えられる。図7b(矢印)は、PVの環紋肥厚の間の進展性がある程度残っている状態でPVが引き延され、さらに途切れつつある過程を示していると考えられる。節間成長の際には、道管要素を含めてすべての細胞に長軸方向の張力がかかるので、環紋肥厚をもつ死んだ道管要素からなるどのPVも、そのどこかで途切れていると考えられる。一方、未成熟の道管要素からなるMVに途切れが見られなかったのは、その細胞壁のリグニン化の程度が低いか、あるいは、環紋肥厚がある程度形成されていても、環紋と環紋の間の細胞壁部分に進展性が残存していたためと推察される。カヤツリグサ科の*Eleocharis acuta*では、途切れた環状要素は新しく分化した環状要素によって修復されることが報告されている⁵⁾。本研究で観察されたPVの途切れが修復されるかどうかは今のところ不明である。より成長したタケノコや成竹ではその途切れが修復される代わりに、MVが成熟して通導機能を果たす可能性も考えられる。

すでに述べたように、道管としての機能を有する可能性があるのは20節以下の成熟したPVのみである。しかし、それらのPVには途切れが生じているため、タケノコの基部から茎頂までの約20cmの間の水の上昇は、成熟したPVのみによって行われるのではなく、少なくとも途切れの部分では周囲のアポプラストを経由していると考えられる。また、MV自身も未成熟なため道管として機能していないと考えられる。マダケの桿茎にはリグニン化が十分に進んでいない細胞壁をもつ、道管以外の維管束組織や基本組織の細胞、そして分裂能を保持した細胞が相接して存在しているので、それらの細胞壁からなる密なアポプラストのネットワーク空間が存在する。10節から頂端までの領域では、どのPVも、そしてMVも未成熟なため、道管に依存せずにアポプラスト空間全体によって水の移動が行わ

れ、著しい伸長成長を支えるに十分な吸水が可能になっていると考えられる。頂端までの水の輸送の原動力が何かは今のところ結論できない。頂端から突き出た葉片からどの程度の蒸散が行われているのか、根圧が原動力になっているのか、あるいは両方なのか、何らかの形の水の化学ポテンシャルの勾配が形成されていると考えられるが、この問題については現在検討中である。

全長約30~40cmのタケノコではMVは道管として機能し得る段階にまで発達していないことが本研究で明らかになった。より成長したタケノコや成竹では、MVはPVに遅れて、道管として機能し得る段階に至ると推察されるが⁶⁾、機能し得るMVとして発達していく過程で、急速な節間成長とどのように歩調を合わせて途切れの無い道管が形成されていくのであろうか。これも今後に残された課題である。

謝辞

本研究は、「イネ科植物の節間成長における維管束系の発生・分化に関する研究」に対する2016年度神奈川大学総合理学研究所共同研究の助成金(RIIS201612)を受けて行われました。ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) Esau K (1953) *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 2) Fahn A (1990) *Plant Anatomy Fourth edition*. Pergamon Press, Oxford.
- 3) Goodwin RH (1942) On the development of xylary elements in the first internode of *Avena* in dark and light. *Am. J. Bot.* **29**: 818-828.
- 4) Lin J, He X, Hu Y, Kuang T and Ceulemans R (2002) Lignification and lignin heterogeneity for various age classes of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) stems. *Physiol. Plantarum* **114**: 296-302.
- 5) Evans PS (1965) Intercalary growth in the aerial shoot of *Eleocharis acuta* R. Br. *Prodr. I. Structure of the growing zone. Ann. Bot.* **29**: 205-217.
- 6) 野村隆哉 (1980) 竹の生長について. *木材研究・資料* 第15号: 6-33.
- 7) 今井友也, 間島重道, 藤田 稔, 佐伯 浩 (1995) マダケ, ハチクおよびモウソウチクの桿の細胞構造 (1). *京都大学農学部演習林報告* **67**: 147-157.
- 8) André JP (1998) A study of the vascular organization of bamboos (Poaceae-Bambuseae) using a microcasting method. *IAWA J.* **19**: 265-278.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ミトコンドリア 16SrRNA 領域を用いたキダリス類ウニの 系統解析

若山典央^{1,3} 齋藤礼弥¹ 金沢謙一²

Molecular Phylogeny of Cidaroid Echinoids Using 16Sr RNA

Norio Wakayama^{1,3}, Masaya Saitoh¹ and Ken'ichi Kanazawa²

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

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: wakayama_norio@jindai.jp

Abstract: Four cidaroids and two regular echinoids were newly sequenced and used for phylogenetic analysis. In this a study, a new DNA extraction method was tested. Coelomic fluid was collected from the coelom using a syringe through the peristome. The collected coelomic fluid was centrifuged to precipitate the cells, and DNA extraction was performed from the obtained pellet. This method does not require the dissection or destruction of specimens, and is therefore suitable for preserving voucher specimens. From the obtained phylogenetic tree, two speculations about the evolutionary history of cidaroida were presented. Ctenocidaridae is genetically included in Cidaridae. Two species of the genus *Prionocidaris* were placed in a different clade in the phylogenetic tree. This suggests the polyphyletic origin of the genus.

Keywords: molecular phylogeny, sea urchin, echinoid, mitochondria, 16Sr

序論

ペルム紀 - 三畳紀 (P-T) 境界における大絶滅の後、テチス海においてウニ類の大規模な適応放散が生じた¹⁾。この時代のテチス海の動物群が現在の西太平洋においてよく保存されていることが知られており、この地域のウニ類の進化史解明は全世界的なウニ類の進化を語る上で不可欠である。P-T 境界における大絶滅以前から存続する唯一のウニ類であるキダリス類に属するキダリス目 Cidaroida は特に注目されるグループであるが、その進化史の研究は古生物学を基盤としており、分子系統学解析は進んでいるとはいえない。分類学的研究²⁾では現生キダリス類は4つの科 (Histocidaridae, Cidaridae, Ctenocidaridae, Psychocidaridae) から構成され、これらに属する種の分子系統学的データを提示した研究は複数存在するが^{3,4)}、使用した遺伝子領域がそれぞれ異なるため、いまだ科レベルの分子系統関係すら解明に至っていない。

また、これまでウニ類の分子系統学的研究においては証拠標本の重要性が考慮されてこなかった。従

来は生殖巣や棘基部の筋肉などから DNA 抽出が行われてきたが⁵⁻⁷⁾、棘や卵巣から DNA 抽出を行う場合、少なからず標本の損壊を伴う。特に生殖巣を用いる場合は外殻を大きく切り開く必要があり、外殻部の全体形が損なわれることも多い。このため、従来法は証拠標本の保存には適していない。ウニ類は成長段階の初期において分類同定が難しい事が知られている。過去の研究⁸⁾で用いられた *Brisaster fragilis* と *Brisaster latifrons* の 16SrRNA 領域 (AJ639805 および AJ639806) が、配列の開始位置が異なるものの重複部分においては 100% 一致する配列が示されている。ブンブク類は幼体時の分類同定が難しい事が知られており、何らかの問題が生じているとみられる。このような場合、保存しておいた証拠標本を用いて分類形質を確認し、再度同定作業を行う必要があるが、上述した様な破壊的な DNA 抽出作業を行なった場合に十分な同定作業を行うかは疑問である。さらに、今回用いたキダリス類のウニは太い棘を持つ事が特徴の一つであり、しば

しば棘の表面上に様々な生物が付着している。そのため、特に体表部の組織を用いた場合にコンタミネーションの危険性が增大する。また、これらの問題を解決するためには、非破壊的な DNA 抽出技法を用いる事で証拠標本の保存と分子系統解析を両立する必要がある。今回試みた新たな DNA 抽出技法はこの問題の有力な解決法足り得るものである。

本研究は上記した諸問題を解決するため、既知のデータに新たに得たキダリス類の配列情報を加えて系統解析する事でキダリス類の進化史の一旦を明らかにするものである。

材料と方法

用いたウニ：2016年に高知県土佐清水市および大月町周辺の沖でダイビング中に採集された、もしくは珊瑚網で混獲された6属6種を用いた。4種は原始的な形質を多くとどめるとされるキダリス類に属する：フシザオウニ *Plococidaris verticillata*、ノコギリウニ *Prionocidaris baculosa*、サテライトウニ *Stylocidaris reini*、マツカサウニ *Eucidaris metularia*。他の2種は中生代以降に分岐した新しい形質をもった真ウニ類 Euechinoidea に属するオトヒメウニ *Bathysalenia cincta* (アルバキア類)、および *Salmacis rubricincta* (ホンウニ類) である。

DNA 抽出

オトヒメウニ、ノコギリウニについては従来法を用い、それぞれ棘および生殖巣を DNA 抽出に用いた。他の4種については体腔液を DNA 抽出に用いた。体腔液採取は周口部から行い、18Gの注射針を取り付けたシリンジを用いて周口膜を貫通させた注射針から体腔液を採取した。採取した体腔液を1500xgで5min遠心し、上清を除いて得たペレットから DNA 抽出を行なった。それぞれのウニの組織あるいは細胞ペレットに TNES-Urea バッファ⁸⁾と Proteinase K を加えて8時間以上室温で震盪した後55°Cで1時間処理し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールおよびクロロホルム・イソアミルアルコールを用いた二段階の精製を経たのち、エタノール沈殿を行なって精製 DNA を得た。得られた total DNA は TE バッファに溶解し、凍結保存した。

PCR ~シーケンス

既報⁹⁾にて設計、使用したプライマのうち2種 (echF03 5'-CCTGTTTACCAAAAACATCGCTCC-3', echR02 5'-GTAGATAGAACTGACCTGGCTCTCG-3') を用い、ミトコンドリア DNA のうち 16SrRNA 領域の一

部を増幅した。PCR は Tks Gflex DNA Polymerase (TAKARA) を通常の半分の酵素量で用い、サーマルサイクラ PCR Thermal Cycler Dice Touch (TAKARA) により行なった。テンプレート濃度は 2.5 ng/50 μL 反応系とし、アニーリング温度 55°C で PCR を行なった。PCR 産物の精製には AMPure XP (Agencourt) を用い、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いたシーケンスリアクションの後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によってシーケンスを行ない、配列情報を得た。

系統解析

シーケンスの波形データからの配列修正およびマルチプルアライメントには Geneious R9 (Biomatters) を用いた。今回配列決定を行ったキダリス6種と真ウニ類2属2種に加え、すでに mtDNA の 16Sr RNA 配列が明らかになっているキダリス類5属5種について Genbank から配列情報を取得してアライメント後、もっとも短い配列に合わせた 578bp を系統解析に用いた。取得した配列の種名と Accession No. は次の通り：*Stereocidaris excavatus* (excavata の誤記とらしい。DQ073750)、*Prionocidaris bispinosa* (DQ073747)、*Calocidaris micans* (DQ073737)、*Ctenocidaris perrieri* (GU226988)、*Phalacrocidaris japonica* (JQ322575)。系統解析には PAUP¹⁰⁾ を用い、モデルテストの結果に基づき解析パラメータを決定し、NJ 法および最尤法による系統樹を得た。系統樹の根は正形類2種を外群として定めた。樹形の妥当性はブートストラップ値 (1000 回試行) により評価し、ブートストラップ値が 50 を切る分岐については多分岐として表記した。

結果

PCR ~シーケンス

既報⁹⁾で設計したプライマは現生ウニ類でもっとも初期に分化したとされるキダリス類に対しても問題なく機能した。6種のミトコンドリア DNA の 16SrRNA の部分配列情報が得られた。キダリス類4種については 608-616bp、真ウニ類2種では 585、587bp と分子量に差が見られた。得られた配列の Genbank の Accession No. は以下の通り：*Plococidaris verticillata* MF077372、*Prionocidaris baculosa* MF077373、*Stylocidaris reini* MF077374、*Eucidaris metularia* MF077375、*Bathysalenia cincta* MF077376、*Salmacis rubricincta* MF077377。

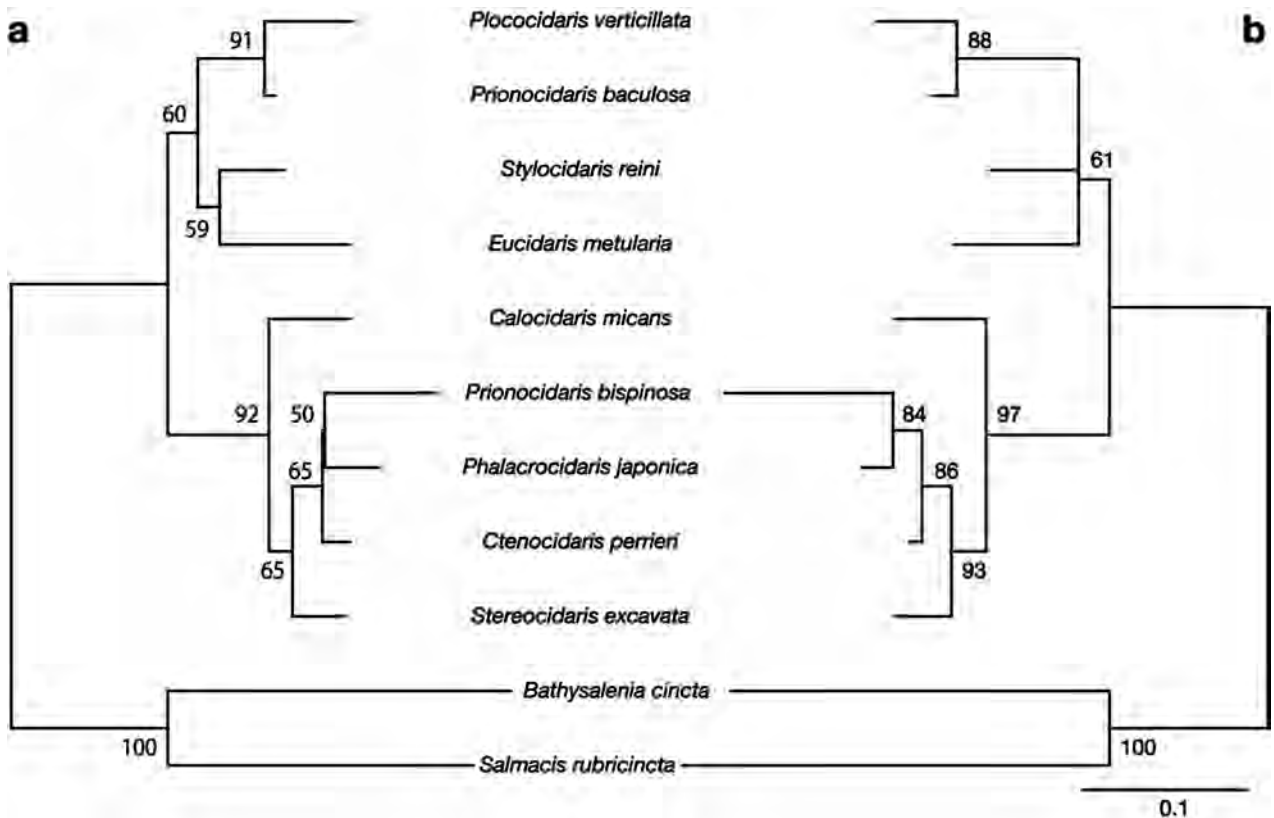


図 1. 求められたキダリス類の系統樹. a. NJ 法 (GTR+I+G) による樹形. b. 最尤法 (GTR+I+G) による樹形. それぞれの分岐に記されている数字はブートストラップ値.

系統解析

NJ 法と最尤法により得られた 2 つの樹形は、最尤法の系統樹で一箇所多岐になっている点を除いては同一のトポロジを示した。キダリス類は共に大きく 2 つのクレードを形成した。それぞれのクレードに含まれる種は 2 つの系統樹で共通しており、1 つのクレードは *Prionocidaris bispinosa*, *Calocidaris micans*, *Ctenocidaris perrieri*, *Stereocidaris excavatus* に加え、*Phalacrocidaris japonica* から構成された。以下、これをクレード A とする。もう 1 つのクレードは今回配列を得たキダリス類 4 種から構成された。これをクレード B とする。ノコギリウニ *Prionocidaris baculosa* と *Prionocidaris bispinosa* の 2 種は形態による分類で同じ *Prionocidaris* 属とされた。

討論

体腔液法による DNA 抽出

前述したとおり系統分類学的研究を行うにあたって証拠標本の保存は重要な課題である。そこで今回、新たな DNA 抽出の方法として、体腔液を用いての DNA 抽出を試みた。この方法の最大の利点は、外殻、棘、顎などの分類上重要な形質を一切損なわないという点にある。定量的比較は行っていないものの、

この方法でもこれまで取られてきた方法と同様に精製 DNA を得て PCR ベースの解析を行うことが可能であった。ウニ類の DNA 抽出でしばしば生じる色素の夾雑も低く押さえられており、PCR の効率は良好であった。この技法を採用する事でコンタミネーションの危険性を低減しつつ、過去に指摘したウニの PCR 時の困難⁹⁾ を軽減する可能性がある。また、ウニ類では体腔内に大量の水分を含むことから、固定標本を作成する際に固定液の濃度が低下し、数度にわたり固定液を入れ替える必要が生じがちである。この体腔液法の副産物として体腔液を回収した後、体腔内に直接固定液を送り込む事が可能となることから、証拠標本の固定状況の向上も期待される。

キダリス類の科間関係

2 種の系統樹においてキダリス類を二分している 2 つのクレードを構成する種は完全に一致していた。今回の系統解析に用いたキダリス類 2 科 8 属 9 種は、同 2 科 9 属 13 種の分子系統解析を試みた先行研究³⁾ と 4 属が共通している。Cidaroida について mtDNA の 16SrRNA 領域の情報はこれまで極めて少なかったことから系統関係について十分な考察は不可能だったが、今回既知の 5 種に加え新たに Cidarinae 4 種の配列情報を加えた事で、先行研究³⁾

の COI および 28Sr RNA 領域を用いて得た系統関係と比較する事が可能となった。今回得られた系統樹と先行研究³⁾の系統樹の樹形と分岐関係を比較すると次の様に解釈される。まず、クレード A は先行研究³⁾において *Stereocidaris*, *Cidaris*, *Goniocidaris* を含むクレードに相当する。このクレード A には *Goniocidarinae*, *Stereocidarinae* そして *Cidarinae* の一部が含まれるとみられる。次にクレード B は *Stylocidaris*, *Acanthocidaris*, *Prionocidaris*, *Plococidaris* を含むクレードに相当する。このクレード B には *Cidarinae* の多くが含まれるとみられる。今回新たに構築された系統樹により、これまで判明していなかった *Ctenocidaridae* の系統的位置が示された。*Ctenocidaridae* は *Stereocidaris* を含むクレード B に含まれる。先行研究では、取り扱った 2 つの科がそれぞれ 1 つのクレードにまとまっていたが³⁾、今回の結果からは *Ctenocidaridae* は *Cidaridae* に含まれると判断される。

Prionocidaris 属の多系統性

これまで *Cidaroida* の系統推定において、形態に基づく分類²⁾と分子系統は科レベル以上ではよく一致し、亜科レベルでは相違がみられるが³⁾、同属とされるものが大きく異なるクレードに含まれてしまった例はなかった。これは従来の形態分類が低次分類階級において高い精度を持つ事を示す。しかし、今回の解析では *Prionocidaris* 属の 2 種が異なる二つのクレードに含まれ *Prionocidaris baculosa* はクレード A に、*Prionocidaris japonica* はクレード B と、明確に異なるクレードに含まれた。さらに配列そのものの相同性も低いことからこの 2 種は形態的分类において同属とされているものの、本来は別々の属に組み込まれるべき種である可能性が高い。すなわち *Prionocidaris* 属は多系統であると考えられる。このことからウニ綱の種を網羅的に取りまとめて作成された種検索表¹¹⁾で挙げられている *Prionocidaris* 属を特徴付ける形態は、収斂現象により生じやすい形態であり、2 種でそれぞれ独自に発達したものであると判断される。

以上から、キダリス類については科一亜科レベルの分類に再検討の余地があり、さらに *Prionocidaris* 属については大幅な再検討が必要であると考えられ

る。今後の精査が必要とされるが、キダリス類の分類形質やその基準は今後大幅に見直される可能性があるだろう。

謝辞

本研究は 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201611) を受けて行った。ウニの採集において公益財団法人黒潮生物研究所所長中地シェウ氏にご協力頂いた。ご厚情に深謝致します。

文献

- 1) Smith AB (1984) *Echinoid Palaeobiology*. Allen and Unwin, London.
- 2) Kroh A and Smith AB (2011) The phylogeny and classification of post-Palaeozoic echinoids. *J. Syst. Palaeontol.* **8**: 147-212.
- 3) Smith AB, Pisani D, Mackenzie-Dodds JA, Stockley B, Webster BL and Littlewood DT (2006) Testing the molecular clock: molecular and paleontological estimates of divergence times in the Echinoidea (Echinodermata). *Mol. Biol. Evol.* **23**: 1832-1851.
- 4) Brosseau O, Muriene J, Pichon D, Vidal N, Eléaume M and Ameziane N (2012) Phylogeny of Cidaroida (Echinodermata: Echinoidea) based on mitochondrial and nuclear markers. *Org. Div. Evol.* **12**: 155-165.
- 5) Littlewood DTJ and Smith AB (1995) A combined morphological and molecular phylogeny for sea urchins (Echinoidea: Echinodermata). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B347**: 213-234.
- 6) Stockley B, Smith AB, Littlewood T, Lessios HA and Mackenzie-Dodds JA (2005) Phylogenetic relationships of spatangoid sea urchins (Echinoidea): taxon sampling density and congruence between morphological and molecular estimates. *Zool. Scr.* **34**: 447-468.
- 7) Hart MW, Abt CHJ and Emlet RB (2011) Molecular phylogeny of echinometrid sea urchins: more species of *Helicoidaris* with derived modes of reproduction. *Invertebr. Biol.* **132**: 175-185.
- 8) Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K and Nakayama I (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing urea. *Fish. Sci.* **62**: 727-730.
- 9) 若山典央, 齋藤礼弥, 金沢謙一 (2016) 次世代シーケンサを用いたウニ類ミトコンドリア DNA 全配列の解析手法の開発. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**: 73-76.
- 10) Swofford DL (2003) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 11) Mortensen T (1928) *A Monograph of the Echinoidea. Vol. I. Cidaroida*. C. A. Reitzel, Copenhagen.

■原 著■ 2016 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 4 流入河川水の元素濃度

荒井 健² 島川涼太² 武井尊也^{1,2} 鈴木祥弘^{1,3} 金沢謙一^{1,3} 西本右子^{1,2,4}

Long Term Environmental Change Monitoring in The Sagami Bay
Estuary 4-Element Concentration of Influent River Water-

Masaru Arai², Ryota Shimakawa² Takaya Takei^{1,2}, Yoshihiro Suzuki^{1,3}
Ken'ichi Kanazawa^{1,3} and Yuko Nishimoto^{1,2,4}

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

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

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: y24moto@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The element concentrations of two rivers flowing into Sagami Bay were compared. The concentration of all detected elements was higher in the Kaname river than Sagami river. The separation and concentration system of minor metal elements with freeze and melt processes of environmental water such as river water was applied. The minor metal elements are concentrated by dissolving them in a eutectic mixture of salt and water in a freeze process. Since the concentration rate varies depending on the coexisting salt concentration, it was considered that the concentration of specific elements from environmental water is possible.

Keywords: river water, melt process, freeze concentration, ice chromatography, eutectics

序論

有害な試薬を用いずに河川水・温泉水等の環境水中の有害元素や微量元素(レアメタル)を分離濃縮するシステムとして、凍結・融解過程に注目してきた。現在研究開発が進んでいる分離・分析法の多くは、微量・希薄試料を対象とした高感度な手法が多い。試薬の使用料も少なく環境配慮型分析法として有用ではあるが、一方で比較的多くの試料を扱う環境試料に適用できる手法の開発は多くない。本研究では有害な試薬を用いずに、数百mL～L単位での試料の分離・濃縮を行うことを目的とした。これまで人の健康の保護に関する環境基準が定められており、温泉水の成分として含まれていることが多く、河川への流入が問題視されているホウ素を取り上げ、有害な試薬や高価な試薬を使用しない分離・濃縮法として、凍結融解過程を利用する方法を示した¹⁾。この方法は塩と水の共晶の融解過程にホウ素等の微量元素が溶け込むことで濃縮される方法である。そこで今回は氷の粒子を固定相とするクロマトグラフィ

ーの一種であるアイスクロマトグラフィーの応用と考えることができる手法を応用し、塩を含む水へ環境水を通過させることで濃縮するシステムの構築を目指した。これまでにホウ素は中性以上のpHの水溶液中ではCa²⁺などの共存する陽イオンと作用して、一種の錯体を形成することが知られているため、ホウ素では環境水中に共存する陽イオンと相互作用した形で存在し、NaClと水の共融混合物中に濃縮されたと考えられたが、さらに他の元素への適用を考えたシステムの構築を図った。前報では著者らが継続して測定を行っている相模湾の平塚市周辺の海域で採取した海水及び相模湾への流入河川である金目川の河川水を使用した結果を報告した。相模湾河口域の海水では、冬期に流入した河川水の影響で、表層に塩濃度の低下が観測されている^{2,3)}。今年度はこれまで継続して測定してきた相模湾流入河川である相模川及び金目川(花水川)の河川水を同日にサンプリングし、両河川水の分析結果の差異を検討し

た。さらに実試料のモデル系として性質の近い微量元素が2元素同時に含まれる際の凍結融解過程における元素濃度の変化を考察した。

材料と方法

河川水の採取

河川水の試料は、相模川（上流：座間市水と緑の風広場付近、中流：海老名市運動公園付近、下流：平

表 1. 相模湾流入河川である相模川及び金目川採取試料の定量結果 (mg/L)

Date	River	Sampling point	Ca	Na	Si	Mg	K	Sr	B	Fe	Mn
2016 4/12	Sagami	upper	16.36	7.22	9.77	4.42	1.70	0.06	0.01	0.02	-
		middle	27.52	12.51	9.75	7.24	2.13	0.08	0.02	0.06	0.01
		lower	29.00	133.2	11.30	50.13	34.67	0.40	0.25	0.08	0.03
	Kaname	upper	24.41	9.84	12.51	6.41	1.71	0.06	0.02	0.02	-
		middle	27.98	19.05	12.92	6.71	4.05	0.08	0.02	0.02	-
		lower	31.29	21.12	13.50	7.83	4.42	0.09	0.03	0.04	0.01
2016 5/25	Sagami	upper	15.94	6.67	9.31	3.82	1.64	0.05	0.01	0.01	-
		middle	21.18	8.26	9.80	5.79	1.88	0.06	0.01	0.03	-
		lower	17.25	133.8	9.69	21.85	15.50	0.17	0.11	-	-
	Kaname	upper	24.65	9.79	12.86	6.69	1.62	0.06	0.02	-	-
		middle	29.40	19.41	13.13	7.35	4.29	0.08	0.03	0.01	-
		lower	28.13	18.60	11.52	6.85	4.59	0.08	0.03	0.06	-
2016 7/5	Sagami	upper	16.44	7.20	9.38	4.81	0.84	0.06	0.01	0.02	0.01
		middle	24.19	10.10	10.85	7.97	1.26	0.08	0.01	0.14	0.03
		lower	33.90	137.1	9.90	55.83	43.95	0.43	0.26	0.03	0.05
	Kaname	upper	23.35	10.40	13.74	7.29	0.92	0.07	0.02	0.01	-
		middle	27.18	19.19	13.56	7.89	3.31	0.08	0.02	0.01	-
		lower	24.07	16.99	11.11	7.35	3.28	0.09	0.03	0.13	0.02
2016 10/12	Sagami	upper	14.34	6.43	10.68	4.91	1.51	0.05	0.01	0.01	0.01
		middle	26.21	19.61	15.18	10.59	2.96	0.09	0.02	0.03	0.06
		lower	21.12	129.2	11.11	18.88	17.12	0.15	0.07	0.01	0.01
	Kaname	upper	18.05	8.38	12.51	7.17	1.44	0.05	0.01	-	-
		middle	21.09	15.86	13.44	7.55	3.33	0.06	0.02	0.01	-
		lower	23.54	17.47	14.72	8.68	4.08	0.07	0.02	0.02	0.01
2016 12/7	Sagami	upper	17.99	7.27	9.91	5.84	1.88	0.05	0.01	0.06	-
		middle	23.21	8.85	11.49	7.54	2.03	0.06	0.01	0.06	0.01
		lower	48.37	150.5	11.06	92.96	179.0	0.66	0.31	0.06	0.01
	Kaname	upper	25.73	10.04	13.42	8.27	1.73	0.06	0.02	0.06	0.01
		middle	29.77	16.14	13.81	8.99	3.55	0.07	0.02	0.05	-
		lower	34.99	24.39	14.71	10.36	6.05	0.09	0.03	0.06	0.01

-: 定量下限以下

塚市馬入ふれあい公園北側)、金目川(上流:秦野市内、国道 246 号線との交差点付近、中流:平塚市内土屋橋付近、下流:平塚市内花水橋付近)で採取した。河川水の分析

採水した試料を、No.5A (ADVANTEC) と No.5C (ADVANTEC) のろ紙でろ過後、孔径 0.45 μm のシリンジフィルター (Minisart RC15, Sartorius) でろ過した。

測定には ICP-AES(日立ハイテクサイエンス SPS3500) を使用し、キャリアーガス: 0.35 L/min、プラズマガス: 14.0 L/min、補助ガス: 0.40 L/min (いずれも Ar)、吸い込み量: 1.70~1.90 mL/min の条件で測定した。

結果と討論

河川水の測定結果

表 1 に相模川及び金目川で同日に採水した測定結果を示した。上流から下流にいくに従って各元素濃度が増加する傾向は共通するが全体的に金目川の方が元素濃度が高いことがわかる。また下流での測定結果には著しい季節変動は観測されていない。2月に連続して 5 日間同一時刻にサンプリングした金目川中流の測定結果では、いずれも濃度は 5% 以内で一致する値であった。

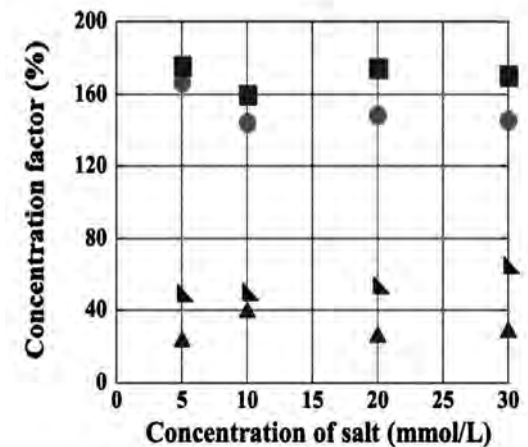
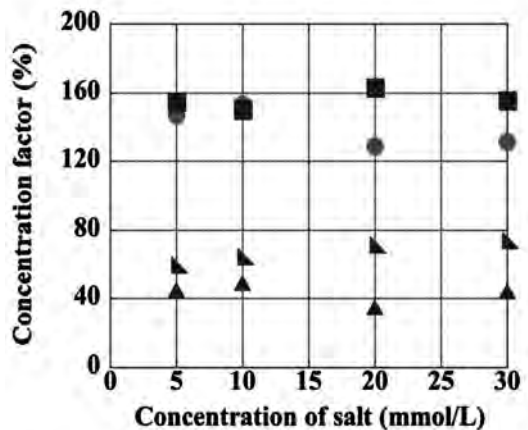
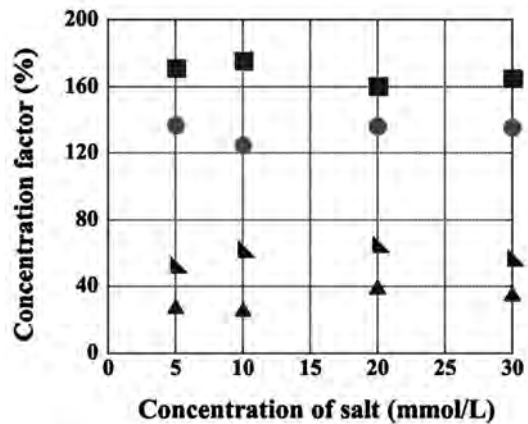
凍結融解過程での共融混合物への濃縮

有害な試薬や高価な試薬を使用しない分離・濃縮法として、凍結融解過程を利用する方法を検討している。NaCl 水溶液を冷却すると、氷が形成された後に NaCl と水の共晶が生成する。NaCl と水の共晶には溶存気体やリン酸、アミノ酸などがとりこまれる。河川水等の環境水中の微量元素も NaCl と水の共融混合物に濃縮されると考えられた。そこで、NaCl 水溶液を凍結させた氷を粉砕し、各元素を含む溶液を滴下し、氷を通過した溶液及び溶液通過後の氷中の濃度を測定した。昨年度は NaCl 以外のハロゲン化アルカリを用いて Fe, Cr の濃縮挙動を検討したがいずれもハロゲン化アルカリと水の共融混合物中へ濃縮することがわかり、環境水中の微量元素の濃縮法として有用であると考えられた⁴⁾。そこで今年度はより簡単なシステムでの分離濃縮法の構築を目指し、凍結融解のみでの元素濃度の分離濃縮を試みた。

図 1 には塩の水溶液中に微量元素を共存させ、凍結融解過程での濃度変化を検討した結果を示した。Co 及び Cr, Sr は凍結融解過程共に液相に濃縮することがわかった。

図 1 の結果は、共存する NaCl 水溶液の濃度によって、凍結融解過程共に各元素の濃縮率が異なるこ

とを示している。支持体として NaCl 水溶液を凍結させて 15~20℃ に保持し、塩と水の共融混合物中への微量元素の濃縮を試みる際に、NaCl 水溶液の濃度を変えることで、混合系でのそれぞれの元素の分離濃縮が行える可能性が示された。



●凍結液(水)相 ▲凍結固(氷)相 ■融解液(水)相 ▲融解固(氷)相

図 1. 5~30 mmol/L の NaCl 水溶液中に 5 ppm の Co (上) 及び Cr (中), Sr (下) を共存させた際の凍結融解過程における濃度変化。

謝辞

本研究は、平成 28 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIS201605) を受けて行った。ここに謝意を表します。

文献

- 1) 澤田直孝, 清水秀世, 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2013) 環境水からのホウ素及び稀少元素の分離を目的とした試薬フリーな分離濃縮システム. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **24**: 41-46.
- 2) 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.
- 3) 野木大輔, 平賀義路, 金澤謙一, 西本右子, 武井尊也, 鈴木祥弘 (2015) 相模川河口域プランクトン生物量の周年変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 91-96.
- 4) 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2016) 相模川河口域海水及び流入河川水の元素濃縮. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**: 81-84.

■教育論文■

研究成果の「流体力学」(教職課程の教科に関する科目)的解釈

逸見 学^{1,2}

Interpretation of Research Results Based on “Fluid Mechanics.”
(Subjects Related to The Field of Specialization)

Manabu Itsumi^{1,2}

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt120948ct@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Fluid Mechanics provides an introduction to modern hydromechanics and aeromechanics theory for the interpretation of familiar, and/or common natural phenomena, such as daily weather, air flow, or water stream.

Especially, Bernoulli's theorem and related experiments are discussed in detail as the main theme. Now, I am teaching “Fluid Mechanics” to third-year students.

Keywords: fluid mechanics, aero-dynamics, air flow, water stream, Bernoulli's theorem

はじめに

教育課程「教科に関する科目」のひとつとして「流体力学」を担当している。その流体力学では、気象現象や水の流れのような具体的な現象とともに、それを理解するために必要な基礎的事項について講義を行っている。

具体的な項目としては、1) 流体の概念と諸現象、流体の分類、2) 流体場の物理量と圧力、3) ラグランジュの方法とオイラーの方法、4) 連続の方程式、5) 運動方程式、6) 状態方程式、ガウスの定理、7) ベルヌーイの定理、8) 渦と循環、9) 渦定理、ストークスの定理、10) 地球の自転とコリオリの力、11) 台風と竜巻、風呂の排水、12) ダランベールのパラドックス、13) レイノルズ数、乱流、14) 粘性の効果とナビエ・ストークス方程式、等がある。

一方、研究に関しては、シリコン結晶成長時におけるシリコン融液の挙動について研究を進めてきた。液相であるシリコン融液は、1420°C付近で固相のシリコン結晶に変化する。シリコン種結晶をシリコン融液に浸し、それを種結晶として、液相の中から引き上げて製作するチョコラルスキー結晶成長法は直径30cm、長さ1mの巨大なシリコン完全結晶のインゴットの製作に応用され近年のLSIの普及に寄与してきた。しかし、シリコン融液の微視的(ミクロスコピック)な振舞には、まだまだ不明の点が多く、

実験・理論とも改善の余地がある。

他方、流体力学の実験を教室で行う際に直面するいくつかの制約・課題について述べる。

制約・課題

1. YouTube 利用の問題点

YouTubeの動画・映像には興味深いものが多数見られるが、制作者の知的財産権や人格権等の諸権利が複雑に絡むことが多く、使用許諾を得るのが困難という。複数人の学生の対象を前提とする教室での使用ははばかれる。

2. 市販ソフトの限界

使用許諾の心配のない流体力学の市販ソフト(動画・映像)の利用を考え、多くの出版社や研究機関等に問い合わせたが、該当したのは1本(ベルヌーイの定理、(丸善、29分、1999、DVD))だけだった。早速これを教室で放映したところ、学生の感想は「実験数例は、どれも瞬時(0.1秒程度)に現象がおわるので、途中の詳細な経過がわからない。また、物体のどの部位に、力がどの方向に作用したのか?一瞬なので、よくわからない。」と不評だった。その放映直後、再度、映像を何度か停止させ、その都度、補足説明を繰り返したが、不評の払拭には至

らなかった。

3. 煙や水使用の問題点

空気は目に見えないので、空気の動きを観察するには煙を利用するのが効果的である。例えば、煙を用いる空気砲(ダンボール内に煙を充満させ、一部の開口穴から発射する渦輪)の実験は煙を用い、しばしばTVで放映され、好評を博している。あるいは、タバコの煙を口から出す渦輪は、教室内での火や煙の使用が前提となり、防災・安全、風紀・環境等の観点からも望ましくない。

また、TVで時折紹介される噴水上にピンポン玉を浮かせる実験も教室を水浸しにする恐れがあり、実施がはばかれる。

上記の制約や問題点を回避するには、自作の実験道具を準備するのも一案だと思い始めた。「自作の安全な道具立てで、ゆっくりした動き(1秒以上)」を目標に思案した。その結果下記の3つの実験例に辿り着いた。

実験試行例1. 2個の円筒を用いた実験

教室で、2個の円筒を横にし、約5mm離して並べた後、学生達に問うた。「両者の間に、上方から息を吹き込む場合、円筒はどう動くと思いますか? 答えは3択で、1つ目は、両者が離れる、2つ目は何も変化しない、3つ目は両者が衝突する、の3つです。さあ、皆さんはどう思いますか?」と問うたところ、教室内の20余名の学生は全員「(1つ目)両者は離れる」に挙手した。実際に私が息を吹きかけると、両者は衝突した。息の量を少なくすることによって、ゆっくり(1秒以上かけて)両者が転がり始め、ついに衝突させることができることも示した。ベルヌーイの定理の関与例であることを説明し、どこの部位にどの方向に力が作用するかを解説した。

実験試行例2. やじろべえ応用

やじろべえの頭部を大き目の球体にし、上方から息を吹きかける実験をした。吹きかける位置と球体との位置関係によって、やじろべえの傾斜する方向が逆になる。吹きかける位置が球体のやや(約5mm)右側の場合、やじろべえはゆっくり左側に大きくスイング(傾斜)し、息を吹き続ける限り左側に大きく傾斜したままである。息を止めると、当然ながら元の安定点に戻る。一方、吹きかける位置が球体のやや(約5mm)左側の場合、やじろべえはゆっくり右側に大きくスイング(傾斜)し、息を止めない限り右側に大きく傾斜し続ける。この現象もベルヌー

イの定理の関与した現象である。

実験試行例3. 円錐状拡声器を用いた実験

下方に向けた円錐状の拡声器の中にちょうど納まるくらいの発泡スチロールの玉を入れ、上方から強く息を吹き込むと、玉は一瞬落下せず、拡声器の中に留まる。強い息が続く限り玉は拡声器の中に留まる。息が弱くなると、当然ながら玉は落下する。息の代わりに、校内備品の真空掃除機を逆接続して利用した実験を授業で実施した。掃除機のスイッチを入れると、玉が拡声器内に維持され、その瞬間「おおっ」というどよめきが教室内に響いた。ベルヌーイの定理が強く印象付けられた一瞬であった。

因みに、3つの実験試行例では、ベルヌーイの定理の成立する部位がそれぞれ異なり、例1では、2個の円筒の中央点(1点)、例2では、やじろべえの頭部(球体)の左右の2点、例3では、発泡スチロール玉が拡声器内壁と接する一円周上のすべての点である。

まとめ

流体力学に関わる物理現象は、気象にしろ水流にしろ身近なテーマであるが、高校までの教育ではあまり扱われてこなかった。大学での流体力学の教育では、流体に関わる代表的な現象を数多く観察してもらうことが重要と考えている。そこで、簡単な道具立てで、わかり易く、ベルヌーイの定理を説明する実験例3つを工夫した。本稿では、その実施例を紹介した。

■研究交流報告■

第12回神奈川大学—国立台湾大学学術交流

木原伸浩^{1,2}

Report of the 12th International Exchange Program
between Kanagawa University and National Taiwan University

Nobuhiro Kihara^{1,2}

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

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

はじめに

神奈川大学化学科と国立台湾大学化学科（化学系）は毎年交互に教員と学生を派遣しながら国際会議を開催する国際学術交流を続けている¹⁻¹⁰⁾。2016年度には、2017年3月10日(金)から13日(月)にかけて、国立台湾大学において第12回学術交流行事が行なわれた。

学術交流

第12回学術交流の位置づけ

国立台湾大学化学系と神奈川大学理学部化学科は2005年以来、毎年度、交互に訪問団を組織し、奇数年度には神奈川大学で、偶数年度には国立台湾大学で、それぞれ国際会議を開催する学術交流を続けてきた。2008年度の第四回学術交流からは大学院生も参加するようになり³⁾、現在では大学院生の交流が中心である。

さらに、本交流をベースとして、国立台湾大学化学系と神奈川大学理学部化学科は2012年度から学部3、4年生を対象とした国際共同授業を開始した。こちらは、偶数年度には神奈川大学で、奇数年度には国立台湾大学で開催される。この国際共同授業は本学理学部の正式な科目となっており、神奈川大学で開催されるときには「化学国際交流I」、国立台湾大学で開催されるときには「化学国際交流II」となっている。したがって、学生は3年次と4年次の2回「化学国際交流」を履修でき、そのうちどちらかは必ず台湾で開催されることなる。

本年度、学術交流に派遣されたのは、筆者と以下の、合わせて18名である。

辻 勇人	(理学部化学科・教授)
藤田 深里	(理学部生物科学科・特別助教)
松本 太	(工学部物質生命化学科・教授)

一ノ瀬 智弘	(理学研究科化学専攻・M2)
両角 宗一郎	(理学研究科化学専攻・M2)
矢部 丈登	(理学研究科化学専攻・M2)
水沼 諒	(理学研究科化学領域・M1)
笠井 力	(理学研究科化学領域・M1)
櫻井 正美	(理学研究科化学領域・M1)
ヤウ ガジュン	(理学研究科化学領域・M1)
河田 有紀	(理学研究科化学領域・M1)
柳瀬 和也	(理学研究科化学領域・M1)
佐藤 和	(理学研究科生物領域・M1)
甲高 彩華	(理学研究科生物専攻・D2)
三浦 望	(理学研究科生物専攻・M2)
劉 雨彬	(工学研究科応用化学専攻・M1)
安藤 風馬	(工学研究科応用化学専攻・M1)

この中で、矢部君と櫻井さんは「化学国際交流」でも国立台湾大学に行っている。「化学国際交流」の受講生が大学院生として本交流事業に参加するようになったのは昨年度からのことであるが、彼らは国立台湾大学に知り合いも多く、交流の層が厚くなってきていることが分かる。このような学生の存在により、国際交流の質は大きく向上している。

3月10日(金)

集合は羽田空港国際線ターミナルに6:30であった。家のある場所によっては一番電車が動き出す前に家を出なければならぬ集合時間であったが、誰一人遅れることなく、交流の成功を予感させた。

台北松山空港に昼前に到着した。空港には詹益慈助理教授（国立台湾大学側の窓口を務めておられる）と共に十数人の学生が迎えに来てくれた。学生の中には懐かしい顔もあり、交流の歴史を感じた。

バスに乗り、まず、国立国父記念館に向かった。

国立国父記念館は台湾の国父、孫文（台湾では孫中山の名で呼ばれる）を記念するものである。あらかじめ台湾の歴史については学んでくるように指示してあったので、国民党のことについて事前知識がある学生は内容を理解したようであった。衛兵の交代式があり、日本との違いを感じた。

いったんホテルにチェックインした後、国立台湾大学の校史館を見学し（図1）、国立台湾大学の歴史を学んだ。台北帝国大学としての出発点も含め、日本との深い関係を改めて感じた。



図1. 校史館にて。

夕食は台湾料理の食堂で取った。この名物は、臭豆腐の唐揚げであった。臭豆腐は台湾名物であるが、あまりの臭さに食べられない人も多い。この店の臭豆腐は特に臭いが強く、揚げてあるにも関わらず、台湾の学生でも多くの学生が食べられないほどの臭いであった。本学の学生には特に強烈な思い出となったようである。

夕食の後は、日本人学生は台湾人学生に連れられてナイトマーケットに繰り出していた。

3月11日(土)

2日目には国際交流学術会議が開催された。会場は化学棟のレクチャーホールである（図2）。プログラムは後掲する。教員は、神奈川大学の教員4名の他に、国立台湾大学の教員4名（化学3名、生物1名）が講演を行なった。いずれの講演も多くの質問が出て、大変盛り上がった。また、学生も、神奈川大学と国立台湾大学からそれぞれ2名（化学と生物で1名ずつ）が講演を行なった。ただし、学生は話すだけで、質問はポスターセッションで受付ける、と言う方式である...はずだったのだが、そのルールが徹底されていなかったのか、甲高さんの講演では質問が続出した。心の準備ができていなかったはずだが、甲高さんがきちんと乗り切ったのは素晴らしかった。

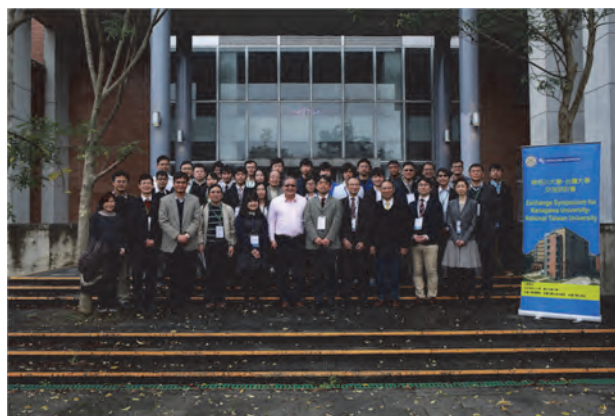


図2. 国際交流国際会議が始まる前の集合写真（化学棟前にて）。

昼の時間には、ポスターセッションが行われた。日本の学生は1人1件、全14件のポスターを出したが、台湾の学生からも18件（化学12件、生物6件）のポスターが出された。ポスターセッションは昼食を取りながらの和やかな雰囲気の中で行われた（図3）。あちらこちらで熱心なディスカッションが繰り広げられ、時間は3時間あったにも関わらず、終了の合図があっても、ディスカッションの終わらないポスターもあった。

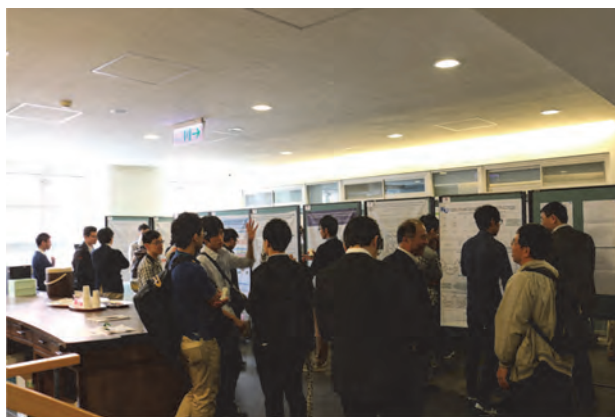


図3. ポスターセッションの様子。

本国際会議の特徴は、化学系と生物系が一堂に会して会議を行うことである。普段はあまり聞くことのない内容の講演であるが、分かってもらえるように講演者の方も工夫をされていたのであろう、いずれもよく理解でき、大変興味深く聞かせてもらった。

閉会の辞は理学院（理学部）長の劉緒宗教授が述べられた。劉教授は第1回の国際交流で来日された3人の教員の中の1人であり、その時の思い出も述べられた。

閉会後は大学近くのレストランでパンケットが行われた。国立台湾大学から多くの教員が参加し、また、

やはり第1回の国際交流で来日された3人の教員の中の1人であり、本国際交流の始まりを主導した陳竹亭名誉教授も参加され、大変盛り上がった。

3月12日(日)

3日目には台湾の観光を行なった。笠井俊夫客座教授と王宗興助理教授も(王助理教授は家族連れで)参加された。

まず、台北市から北東の方向の海岸にある野柳地質公園を訪れた(図4)。海の向うには日本の最西端の与那国島があるはずであるが、さすがに見ることはできない。野柳地質公園では、砂岩が波で侵食されてできた奇岩群を見ることができる。日曜日で天気が良いこともあって非常に混雑していたが、日本語での解説ビデオを見た後、日本語でのガイドを付けてもらい、堪能することができた。野柳地質公園ではあちらこちらでウニの化石を見ることができ、金澤研究室の佐藤さんは歓声を上げていた。



図4. 野柳地質公園の奇岩群。

新鮮な海産物の昼食に舌鼓を打っていると、お祭りのパレードがやってきた。何でもありの愉快的パレードで、台湾のエネルギーが感じられた。

野柳地質公園を後にして西に回り、著名な彫刻家朱銘氏の彫刻を集めた朱銘美術館を訪れた。非常に広大な敷地に巨大な彫刻が様々な組み合わせで展示されている。軍隊をモチーフとしたもの、太極拳をモチーフとしたものなど、台湾ならではの彫刻であった。

さらに西に回り、台北市の北にある淡水市を訪れ、夕食を取った。淡水も魚介類で有名な街である。台湾は小さい島国であるにもかかわらず、地域によってこれほど食べる物が変わると驚かされた。食事の後は賑やかな古い街並を堪能してから帰途についた。

3月13日(月)

最終日は士林官邸公園を訪れた。士林官邸公園は蒋介石が執務した官邸跡とそれに付随する広大な公園であり、今は植物園となっている。バラとスイカズラが同時に咲いていたり、梨の実のなっている木で梨の花が咲いていたり、日本人からすると季節感の無い、いかにも台湾らしい植物園で大変興味深かった。

飲茶の店でゆっくりと昼食をとった後、空港に向かった。名残りは尽きず、空港でもなかなかゲートに向かうことができなかつたが、出発の時刻は動かせず、帰国の途についた。

19時過ぎに無事羽田空港に到着し、解散した。毎回のことであるが、大変充実した国際交流であった。

さいごに

神奈川大学と国立台湾大学との国際交流は12回となり、干支を一巡した。この交流は、「化学国際交流」の授業とも連携するようになり、双方にとって重要な行事として定着してきたように思う。

この間の国際交流で培われた関係は、理学研究科化学専攻(当時)の猪狩拓真君が、M1の2015年10月からM2の2016年8月まで、詹研究室で1年間の交換留学生生活を送ったことなどに結実している。猪狩君はその後博士後期課程に進学しており、国立台湾大学との関係は学生の大きなモチベーションとなっている。

2017年度には、理学部化学科でも、理学研究科化学領域でも、数は多くないが英語で行われる授業が始まる。また、6月から8月にかけての8週間、タイ王国のランシット大学から短期研修生を化学科と生物科学科で引き受ける。さらに、ドイツのクラウスタール工科大学からの交換留学生を引き受ける計画もある。本交流で培われた国際感覚は、いよいよ本格的なグローバル化への道筋に沿って流れ始めた感がある。

おりしも、神奈川大学はみなとみらい地区に新キャンパスを造ることを決定した。新キャンパスのコンセプトはinternationalである。本交流事業は理学研究科のグローバル化に大きく貢献してきたが、本学全体がグローバル化に大きく方向づけられていく中で、本交流事業は本学のグローバル化の礎としての役割も期待されよう。

謝辞

第12回神奈川大学-国立台湾大学国際交流は理学研究科特別予算で行ないました。年度末の忙しい中、開催に尽力して下さった多くの関係者の方々に深謝

します。

文献

- 1) 杉谷嘉則 (2007) 「国立台湾大学」訪問の記. *神奈川大学理学誌* **18**: 103-105.
- 2) 竹内重夫 (2007) 台湾大学における第2回化学科合同シンポジウムに参加して. *神奈川大学理学誌* **18**: 107.
- 3) 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.
- 4) 木原伸浩 (2010) 第五回神奈川大学-国立台湾大学学術交流の記. *神奈川大学理学誌* **21**: 77-88.
- 5) 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.
- 6) 木原伸浩 (2012) 第七回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* **23**: 89-98.
- 7) 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.
- 8) 木原伸浩 (2014) 第九回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* **25**: 125-130.
- 9) 加部義夫 (2015) 第十回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* **26**: 97-105.
- 10) 木原伸浩 (2016) 第11回神奈川大学-国立台湾大学学術交流. *神奈川大学理学誌* **27**: 101-107.

研究交流報告：付録

**2017 Exchange Symposium for
Kanagawa University-National Taiwan University**

**March 11 (Saturday), 2017, Pan-Kuan Lecture Hall
Department of Chemistry, National Taiwan University**

09:30 - 09:45 Group Photo Session

09:45 - 10:00 Welcome Address

Chair, Prof. Yit-Tsong Chen, National Taiwan University, Chemistry

Session 1 - Chair: Prof. Tsung-Shing Wang, National Taiwan University, Chemistry

10:00 - 10:25 Prof. Jye-Shane Yang, National Taiwan University, Chemistry

“Mechanochromic Luminescent Materials for Multicolor Fluorescence Drawing and Differential Sensing”

10:25 - 10:50 Prof. Hayato Tsuji, Kanagawa University, Chemistry

“Synthesis, Properties, and Applications of Rigid Planar Carbon-Bridged Oligo(phenylenevinylene)s”

10:50 - 11:00 Mr. Chang-Ming Wang, National Taiwan University, Chemistry

“Paper-Polymer Composite Devices with Minimal Fluorescence Background”

11:00 - 11:10 Mr. Joto Yabe, Kanagawa University, Chemistry

“Development of Regioselective Catalyst Using Hydrogen-Bonding”

11:10 - 14:10 Lunch and Poster Sessions

Odd number poster: 11:10 - 12:10

Even number poster: 13:10 - 14:10

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

14:10 - 14:35 Prof. Nobuhiro Kihara, Kanagawa University, Chemistry

“Development and Application of Oxidatively Degradable Polymers”

14:35 - 15:00 Prof. Wei-Ssu Liao, National Taiwan University, Chemistry

“Chemical Lift-Off Lithography for Sensors”

15:00 - 15:25 Prof. Futoshi Matsumoto, Kanagawa University, Material and Life Chemistry

“Application of Ordered Intermetallic Nanoparticles to Polymer Electrolyte Fuel Cell as Electrocatalysts”

15:25 - 15:55 Coffee break

Session 3 - Chair: Prof. Shyh-Jye Lee, National Taiwan University, Department of Life Science

15:55 - 16:20 Prof. Misato Fujita, Kanagawa University, Biological Sciences

“Assembly and Patterning of the Vascular Network of the Zebrafish”

16:20 - 16:45 Prof. Su-Yi Tsai, National Taiwan University, Life Science

“Efficient Generation of Cardiac Lineages from Stem Cells by Chemical Approaches”

16:45 - 16:55 Ms. Sayaka Kotaka, Kanagawa University, Biological Sciences

“Localization of Crustacean Female Sex Hormone Producing Cells in the Eyestalk of the Kuruma Prawn *Marsupenaeus Japonicus*”

16:55 - 17:05 Mr. Po-Ting Yeh, National Taiwan University, Life Science

“Feedback Connections of Dopamine and Light Intensity on Retina”

Closing Remarks

17:05 - 17:15

Dean, Prof. Shih-Tzung Liu, National Taiwan University, College of Science

2016年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

所長	化学科	教授	川本達也
運営委員	数理・物理学科	教授	阿部吉弘
	数理・物理学科	教授	水野智久
	情報科学科	教授	木下佳樹
	情報科学科	教授	張 善俊
	化学科	教授	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	化学科	教授	川本達也
編集委員	数理・物理学科	教授	長澤倫康
	数理・物理学科	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	准教授	安積良隆
	生物科学科	教授	井上和仁

(3) 産官学委員

委員長	数理・物理学科	教授	水野智久
運営委員	数理・物理学科	准教授	加藤憲一
	数理・物理学科	教授	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	井上和仁
	生物科学科	教授	大平 剛

(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	教授	木村 敬
	数理・物理学科	教授	長澤倫康
	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	上村大輔、	紀 一誠

客員教授	鈴木季直、	羽鳥尹承
	松本正勝、	森 和亮
客員研究員	笹本浜子、	細谷浩史
	安部 淳、	阿部孝宏
	市川貴美子、	大石不二夫
	河合 忍、	岸 康人
	北島正治、	河野 優
	齋藤礼弥、	坂本峻彦、
	鈴木健太郎、	谷村昌俊
	田仲二郎、	辻本和雄、
	堤 一統、	豊泉和枝、
	中川清子、	永島咲子、
	平井 誠、	八柳祐一、
	湯浅能史、	若山典央

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第44回湘南ハイテクセミナー

ー機器分析入門ー

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) 「環境分析」
西本右子(神奈川大学理学部化学科)
- 2) 「赤外分光」
高柳正夫(東京農工大学大学院 連合農学研究科)
- 3) 「液体クロマトグラフィー」
渋川雅美(埼玉大学大学院理工学研究科)
- 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) 「有機・高分子材料の組成分析」
奥村明男(株式会社日東分析センター)

日時：2016年6月2日(木)・3日(金)

10時～16時40分

会場：KUポートスクエア

(みなとみらいクイーンズタワー 14階)

主催：神奈川大学総合理学研究所

後援：日本分析化学会関東支部

(2) 第45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・開発と赤外分光」
由井宏治(東京理科大学理学部化学科)
- 2) 「研究・開発と環境分析」
田中 敦(国立研究開発法人国立環境研究所)
- 3) 「研究・開発と表面分析」
田沼繁夫(国立研究開発法人物質・材料研究機構)
- 4) 「研究・開発とNMR分光」
嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 5) 「研究・開発と材料分析」
志智雄之(株式会社 日産アーク)
- 6) 「研究・開発と超微量分析」
原口紘丞(名古屋大学 名誉教授)

日時：2016年12月1日(木)・2日(金)

10時～16時40分

会場：KUポータスクエア

(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27回神奈川大学平塚シンポジウム

「ーものづくりの最前線ー

マテリアルからバイオサイエンスまで」

日時：2017年3月4日(土)

10時00分～17時00分

会場：神奈川大学湘南ひらつかキャンパス

(11号館サーカムホール)

主催：神奈川大学理学部化学科

神奈川大学総合理学研究所

共催：日本化学会

演題・発表者：

- 1) 「Taming Iron for Catalytic C-H Bond Activa

tion」

イリエシュ ラウレアン(東京大学大学院理学系研究科)

- 2) 「天然物全合成を起点とした生体機能分子の開発研究」

早川一郎(岡山大学大学院自然科学研究科)

- 3) 「生体内合成化学治療：有機合成化学反応を臨床・治験に進める！」

田中克典(理化学研究所)

- 4) 「迅速合成触媒が拓く分子ナノカーボン科学」
伊丹健一郎(名古屋大学ITbM拠点長)

- 5) 「15族元素リンを鍵とする蛍光色素のデザイン」

深澤愛子(名古屋大学大学院理学研究科)

- 6) 「人工細胞をつくる」

菅原 正(神奈川大学理学部)

(4) 講演会

演 題：「油を高機能化させる三相乳化法」

講演者：田嶋和夫 教授

(神奈川大学特別招聘教授)

日 時：2016年6月14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

(11号館サーカムホール)

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：

油脂は食品、燃料、薬品をはじめ我々の身の回りで広く使われている。「油と水は混ざらない」が、もしも「油と水を混ぜることができたらどうなるであろうか」。油を水に分散させたり、水を油に分散させた状態を乳化という。乳化すると、水と油の共同作用 (Synergy) によって、新しい機能を発現させることができる。油脂を高機能化した乳化状態は、日常生活をはじめ、広範な産業分野で使用されている。本講義は油と水を混ぜて安定な乳化物を作る技術について、以下の項目に従い、平易に解説いただいた。

1. 乳化とは、界面とは
2. 界面活性剤による熱力学的乳化現象
3. 界面活性剤を使わない乳化現象
：三相乳化法

4. 実用化：化粧品、燃料、食品、農薬など

5. 三相乳化構造が醸し出す興味深い現象

(報告者 山口和夫 2016.6.28)

(5) 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：2016年8月5日(金)
16時50分～18時00分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館207室)

主 催：神奈川大学大学院理学研究科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館207号室で開催しました。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線結晶解析の発見と発展に貢献した日本人科学者の活躍などを豊富な資料に基づき、詳しく解説していただきました。また、核磁気共鳴に関しては最新装置についてもご紹介いただきました。今回のご講演は、化学の発展に際してそれら分光器および分光学の果たした役割の大きさを改めて知る機会になりました。

(報告者 川本達也 2016.8.8)

(6) 講演会

演 題：「Marine biological research in deepwaters of the Northern Pacific Ocean」

講演者：Dr.Alexander Ziegler
(Institut für Evolutionsbiologie
und Ökologie der Universität Bonn)

日 時：2016年8月18日(木)
15時30分～16時30分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館205室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

共 催：神奈川大学生物科学科

報 告：

アレクサンダー・ツィークラー博士は、ドイツボン大学進化生物学・生態学教室の研究員で、専門は比較形態学、比較解剖学です。今年6月からドイツ、アメリカ、ロシアの国際共同調査船に乗り込み、北太平洋アラスカ～アリューシャン列島～ロシアの海域の深海調査を行いました。今回の講演では、最初にその調査結果をお話し頂きました。これは深海の生物相とその特徴を知るとてもよい機会になりました。その後、ツィークラー博士がここ数年取り組んでいる形態の解析方法につい

での紹介がありました。ここでは、MRIやCT、マイクロCTといった医学機器を用いた解析の実態と応用、その利点を知る事ができ、21世紀の重要な形態解析方法を学ぶ貴重な機会となりました。

(報告者 金沢謙一 2016.8.18)

(7) 講演会

演 題：「不斉な多核錯体
—合理的合成法の開拓—」

講演者：弓削秀隆 教授
(北里大学理学部)

日 時：2016年9月5日(月)
16時00分～17時10分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館207室)

主 催：神奈川大学大学院理学研究科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館207号室で開催しました。X線結晶解析の結果をベースとして、化合物としてはルテニウムの三核錯体を中心に、ここ数年の研究成果を詳しく解説していただきました。その中で、元々キラル要素がない配位子から単離された錯体が、自然分晶により化合物全体として右回りと左回りの関係にあることがX線結晶解析により示され、また、類似錯体の持つ多様な反応性も示されました。今回のご講演は、X線結晶解析の役割を再認識とともに、化学反応における金属錯体の高い潜在能力を知る機会になりました。

(報告者 川本達也 2016.9.7)

(8) 講演会

演 題：「小麦の種子の色を決めているR遺伝子について」

「高校生と始めたミドリゾウリムシの実験」

講演者：氷見英子 氏
(岡山大学資源植物科学研究所)

日 時：2016年10月3日(月)
15時10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305室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

報 告：

染色体上の位置でR遺伝子について、変異株

を用いて遺伝子解析を行った結果、転写因子の機能があることが明らかになった。この遺伝子を子葉鞘に挿入すると複数の遺伝子が発現し、色素を持つ細胞が創出された。

スーパーサイエンス高から研究支援を依頼され、日野研究室から供与された株を用いて培養条件の検討を開始した。培地にカロリメイトを添加することで安定な培養ができることを追試できたので当方の結果と比較した。抗生物質や抗菌薬を加えた場合の影響について、解析中の結果を基に、今後双方で検討すべき事項について議論した。

(報告者 日野晶也 2016.10.6)

(9) 講演会

演 題：「Convolution operators on $L_1(G)$ which are tauberian」

講演者：Manuel Gonzalez 教授
(スペイン・カンタブリア大学)

日 時：2016年11月12日(土)
10時30分～11時30分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(13号館105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：

スペイン・カンタブリア大学教授の Manuel Gonzalez 氏は今回の講演で、バナッハ空間上の tauberian 作用素の性質とその特徴を解説され、さらに Cotauberian 作用素の性質と特徴について大変に詳しく講演されました。特に locally compact group での convolution 作用素が tauberian である必要十分条件はそれが可逆であること、さらに T_m が tauberian 作用素である必要十分条件は、その second dual T_m^{**} が tauberian 作用素であることを示されました。

(報告者 長 宗雄 2016.11.16)

(10) 講演会

演 題：「Differentials of complex interpolation processes」

講演者：Jesus M.F. Castillo 教授
(スペイン・Extremadura 大学)

日 時：2016年11月12日(土)
11時30分～12時30分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(13号館105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：

スペイン・Extremadura 大学教授の Jesus M.F.Castillo 氏は今回の講演で Kalton, Rochberg and Weiss により研究が進められたバナッハ空間での differentials of complex interpolation processes についての最近の研究成果をまとめた論文「Singular twisted sums generated by complex interpolation」(Transaction Amer.Math.Soc. から近々出版予定) について、その概要を大変詳しく講演されました。

(報告者 長 宗雄 2016.11.16)

(11) 講演会

演 題：「標準模型、主に自発的対称性の破れについて」

講演者：森竹貫人 氏
(総合研究大学院大学)

日 時：2016年12月20日(火)
16時00分～17時00分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(2号館231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：

標準模型とは、現在の素粒子物理学の基礎である。この模型は1970年代までに理論としてほぼ完成された。そして、2013年の Higgs boson の発見により、標準模型で予言された粒子が全て発見され、標準模型は完全に確立したと言える。従って、この模型を理解することは、少なくとも物理学を学ぶ者にとって、重要なことである。

今回の講演では、はじめに、標準模型の全体像を簡単に概観された。その上で、この模型を構築する中で重要な考え方の一つである自発的対称性の破れについて丁寧に説明された。最後に、標準模型では説明できない現象について、宇宙論的問題に言及されつつ、興味深い考察をされた。

(報告者 粕谷伸太 2016.12.21)

(12) 講演会

演 題：「数理最適化の計画法に表れる数列たち—フィボナッチ、トリボナッチ、ペリン数列」

講演者：安田正實 名誉教授
(千葉大学)

日 時：2016年12月27日(火)
14時45分～15時45分
会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(13号館105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：
フィボナッチ数列が2乗評価関数での整数2分割累和問題(2次計画)の最適解であることが導かれている(岩本誠一、木村寛)。ここでは関連する動的計画法の再帰関係式からトリボナッチ数列と多項数への拡張問題を論じ、ペリン数列による2通りの再帰関係の特徴などを整数論の素数に関する話題とともに紹介した。

(報告者 堀口正之 2017.1.12)

(13) 講演会

演 題：「最適化と評価 — 経路問題 —」
講演者：岩本誠一 名誉教授
(九州大学)
日 時：2016年12月27日(火)
16時00分～17時00分
会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(13号館105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：
同一のグラフ上で最適化問題と評価問題を扱う。いずれも(a)直説法(b)再帰的方法(動的計画法)がある。典型的問題は(1)加法型関数の多重積分で、これは動的計画法による同時最適化問題の逐次最適化を意味する。別の関数型(2)乗法(3)最大(4)最小等に応じた再帰的方法と埋め込み法による解法も示した。

(報告者 堀口正之 2017.1.12)

(14) 平塚祭 特別参加企画

テーマ：「神大理学部の産官学連携へのアプローチ」公募に参加した理学部の研究をポスターで紹介
日 時：2016年10月22日(土)、23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 2016」
日 時：2016年5月11日(水)～13日(金)
会 場：東京ビッグサイト
出展者：光機能性材料研究所
独立研究者 中西 淳
テーマ：「光応答性細胞移動アッセイ系」
主 催：リードエグジビションジャパン(株)

(2) 展示会

「JASIS 2016 ～アジア最大級の分析・科学機器展」
日 時：2016年9月7日(水)～9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：「環境とエネルギー問題—分析化学からのアプローチ—」
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

「湘南ひらつかテクノフェア2016」
日 時：2016年10月20日(木)～22日(土)
会 場：ひらつかアリーナ
出展者：理学部生物科学科
准教授 安積良隆
テーマ：「汚染肥料(汚泥コンポスト)の肥料としての有効性について」
主 催：平塚商工会議所

(4) 展示会

「プリンタブルエレクトロニクス2017 ～有機エレクトロニクスデバイスに関する「次世代ものづくり」～」
日 時：2017年2月15日(水)～17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：「近紫外光によって分解する表面修飾剤の開発と応用」
主 催：株式会社加工技術研究会

(5) 特 許

[日本出願]

1)「化合物、表面処理剤、及び表面処理方法」

山口和夫

- 2)「フッ素原子含有ポリマーの分解方法、及びフッ素原子含有ポリマーの分解装置」

堀 久男

- 3)「化合物、パターン形成用基板、光分解性カップリング剤、パターン形成方法及びトランジスタの製造方法」

山口和夫、伊藤倫子、川上雄介

- 4)「画像処理装置、画像データ圧縮方法、圧縮データ伸長方法及び画像処理プログラム」

張 善俊、菅野将志

- 5)「質問回答システム及び質問回答管理装置」

張 善俊

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) と原著 (Full-Length Paper/ Note)、および報告書 (Report) とする。原著には短報 (Note) を含む。報告書 (Report) は原著に準ずる。

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

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

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

(1) 頁数

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

(2) 原稿用紙サイズ

A4版の用紙を用いる。本文および図表の占

める範囲 (紙面) は縦横 245 × 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10.5Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

番号は片括弧（閉じ括弧のみ）表示とする。

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

文字サイズは、項目の見出しは太字で12P、各文献は9Pとする。

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

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

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus 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) Taiz L and Zeigen E [西谷一彦, 島津研一郎 監訳] (2003) *テイツ ザイガー 植物生理学 第3版*. 倍風館. 東京
- 7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試

料の元素分析法. *微生物* 5: 34-44.

- 8) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版, 東京.
- 9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. *よくわかる電子顕微鏡技術*. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
- 10) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川大学総合理学研究所年報 2003*. pp.41-80.

(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。タイトルの末尾にピリオドはつけない。

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

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

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

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。

図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

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

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

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

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

(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…………… 31
 Arai, Masaru 荒井 健…………… 109
 Azumi, Yoshitaka 安積良隆…………… 63, 85, 93

C

Choi, Jun-Chul 崔 準哲…………… 53

D

Dohra, Hideo 道羅英夫…………… 79

F

Fukaya, Norihisa 深谷訓久…………… 53
 Futami, Yuki 二見有紀…………… 93

H

Hamao, Kozue 濱生こずえ…………… 79
 Han, Hao …………… 15
 Hashimoto, Haruki 箸本春樹…………… 99
 Hayatsu, Manabu 早津 学…………… 93
 Hoshino, Yasushi 星野 靖…………… 1, 19
 Hosoya, Hiroshi 細谷浩史…………… 79

I

Inoue, Kodai 井上航大…………… 1, 19
 Itsumi, Manabu 逸見 学…………… 113

K

Kabe, Yoshio 加部義夫…………… 53
 Kanazawa, Ken'ichi 金沢謙一… 71, 105, 109
 Kashiwazaki, Shouka 柏崎翔嘉…………… 99
 Kasuga, Noriko Chikaraishi 力石紀子…………… 47
 Katoh, Jun'ichi 加藤純一…………… 93
 Katoh, Kaoru 加藤 薫…………… 79
 Katoh, Mao 加藤真央…………… 93
 Kihara, Nobuhiro 木原伸浩…………… 115
 Kinoshita, Yoshiki 木下佳樹…………… 37
 Kotaka, Sayaka 甲高彩華…………… 75
 Kotani, Susumu 小谷 享…………… 79
 Kurita, Shimpei 栗田紳平…………… 19
 Kurose, Kaori 黒瀬香緒理…………… 47

M

Ma, Ruiquang …………… 9

Maruta, Emiko 丸田恵美子…………… 99
 Matsunaga, Satoshi 松永 諭…………… 47
 Mekuchi, Miyuki 馬久地みゆき…………… 75
 Mizuno, Tomohisa 水野智久…………… 31
 Morozumi, Soichiro 両角宗一郎…………… 47
 Murashita, Toru 村下 達…………… 19

N

Nakata, Jyoji 中田穰治…………… 1, 19
 Nishimoto, Yuko 西本右子…………… 71, 109
 Nojima, Hikaru 野島ひかる…………… 99
 Nomiya, Kenji 野宮健司…………… 47
 Nukui, Rinako 温井里奈子…………… 99

O

Ohira, Tsuyoshi 大平 剛…………… 75
 Okuno, Koji 奥野康二…………… 37

S

Saito, Yasunao 斎藤保直…………… 19
 Saitoh, Masaya 齋藤礼弥…………… 105
 Sameshima, Toshiyuki 鮫島俊之…………… 31
 Sasamoto, Hamako 笹本浜子…………… 63, 85, 93
 Shimakawa, Ryota 島川涼太…………… 109
 Shiroshita, Nana 城下菜那…………… 75
 Suzuki, Hana 鈴木 英…………… 71
 Suzuki, Suechika 鈴木季直…………… 63, 93
 Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘…………… 71, 109

T

Takahashi, Toshikazu 高橋利和…………… 53
 Takei, Takaya 武井尊也…………… 109
 Takeyama, Makoto 武山 誠…………… 37
 Tanaka, Teruhiko 田中輝彦…………… 53

W

Wakayama, Norio 若山典央…………… 105
 Watanabe, Hiroshi 渡邊 宏…………… 37

Y

Yachida, Gosuke 谷地田剛介…………… 1, 19

Z

Zhang, Shanjun …………… 9

編集後記

本誌の発行で *Science Journal of Kanagawa University* も第 28 巻を数えることになりました。今回は原著論文 5 件、共同研究助成論文 12 件、教育論文 1 件、研究交流の記事 1 件が掲載されています。投稿者の皆様に原稿執筆と、短期間での校正作業にご協力いただきまして深く感謝申し上げます。

本誌は大学の紀要の一種ですが、紀要類にどのような意義があるのか時々考えることがあります。結論として本誌は神奈川大学理学部全体としての研究や教育の活動状況を世間の皆様にお知らせするのに大きな存在価値があると思います。理学部の教員はそれぞれの分野の査読付きの英文専門誌に研究成果を発表しますが、それだけでは理学部全体としてどのような研究をやっているのかが分かりにくいと思います。もちろん各教員の専門分野は大学のパンフレットやホームページに書いてありますが、深い内容まで書いてあるわけではありません。これに対し、本誌を見れば内容だけでなく、学部内でどのような共同研究が行われているのか等、研究の実施体制等も容易に分かります。また、研究の中にはノウハウ的なものや、著的財産権の関係で一般の査読付き論文誌

に発表しにくいものもあると思います。本誌はそういう内容の発表の場にも適しているのではないのでしょうか。またうまくいった事例は外部に発表できても、うまくいかなかった事例はそのままでは闇に葬られてしまいます。失敗事例でも他所で同じ失敗を繰り返さないために公表したほうが社会のためになる場合があります。そういう内容の発表があってもいいのではないかと思っています。教員が日ごろ創意工夫している教育に関する論文にしても、もちろん専門誌もありますが、数も少なく、ノウハウの塊なので本誌が気楽に発表のできる媒体としてふさわしいのではと思います。しかも本誌はオープンアクセスです。

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

〔 神奈川大学総合理学研究所、
理学部化学科 堀 久男 〕

神奈川大学理学誌編集委員会		Science Journal of Kanagawa University	
委員長		Editor-in-Chief	
川本達也	化学科	Tatsuya Kawamoto	Department of Chemistry
委員		Editors	
安積良隆	生物科学科	Yoshitaka Azumi	Department of Biological Sciences
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
顧問		Adviser	
鈴木季直	神奈川大学名誉教授	Suechika Suzuki	Emeritus Professor of Kanagawa University

Science Journal of Kanagawa University Vol. 28 No.1
(*Sci. J. Kanagawa Univ.*)

発行日 2017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