

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol. 33 2022

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

原 著

Establishment of a Method to Culture a Washed and Cloned Green Paramecium
(*Paramecium bursaria*)

Yuri Matsushima, Yui Hirano, Miyu Iwanaga, Mahiro Komiya, Natsuko Kondo
Yuka Ominato, Soushun Suzuki, Masaki Yokoyama, Kazuhito Inoue
and Hiroshi Hosoya

1

ヴァイオリンを A 音からチューニングする根拠の理解

青木 孝

5

IV 族半導体量子ドットの基盤研究

水野智久、青木 孝

15

イオンビーム誘起結晶成長 (IBIEC, Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization) 法による
ダイヤモンド半導体へのイオン注入 n 型ドーパントの電氣的活性化の可能性

中田穰治、関 裕平、星野 靖

21

ノンプラズモニックナノ構造を用いた光マニピュレーション法の探求

吉田匡志、坪井泰之、東海林竜也

41

フェナントリジン部位をもつ N,C,S- ピンサー鉄錯体の合成と分光学的性質

塩谷直樹、藤井 翔、伊藤亮孝、中島 洋、廣津昌和

47

オリゴシラン化合物の励起状態に関する研究

辻 勇人

53

器官培養系を用いたアフリカツメガエル幼生腸管の形態形成の研究

秋永 薫、安積良隆、茂木和枝、豊泉龍児

57

両生類アフリカツメガエルの心臓の形態形成における Actomyosin の役割

秋永 薫、茂木和枝、安積良隆、豊泉龍児

67

ホワイトレッグシュリンプの脱皮抑制ホルモンの探索

大平 剛、豊田賢治、Nguyen Thi Van Anh、高塚由美子、原富次郎

81

扁形動物の微小管重合蛋白質遺伝子を同定する試み

越智拓海、石田汐里、ニエンタンフォン、橋友理香、筒井直昭、小谷 享

85

ナンキョクオキアミの発光器官制御ホルモンの探索

大平 剛、松田 乾、豊田賢治、鈴木信雄

91

胎生ラット下垂体原基におけるレチノアルデヒド脱水素酵素の発現

藤原 研、藤原葉子、堀口幸太郎

95

| | |
|---|-----|
| 相模川河口域における長期環境変動のモニタリング 9 夏季高水温の海況と植物プランクトン分布 浅井泰地、川延京子、磯野柊太、西本右子、鈴木祥弘 | 103 |
| テクニカルノート | |
| 化学実験科目のオンデマンド教材の作成と評価 東海林竜也 | 111 |
| 教育論文 | |
| 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学(10) 加部義夫 | 115 |
| 2021 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告 | 125 |
| Science Journal of Kanagawa University 投稿規定 | 127 |
| Author Index | 131 |
| 編集後記 | 132 |

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

Establishment of a Method to Culture a Washed and Cloned Green Paramecium (*Paramecium bursaria*)

Yuri Matsushima¹, Yui Hirano¹, Miyu Iwanaga¹, Mahiro Komiya¹,
Natsuko Kondo¹, Yuka Ominato¹, Soushun Suzuki¹, Masaki Yokoyama¹,
Kazuhito Inoue^{1,2} and Hiroshi Hosoya^{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: ft160257sv@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The green paramecium, *Paramecium bursaria*, widely distributed in freshwater habitats around the world, has hundreds of symbiotic green algae in its cytoplasm. *P. bursaria* is classified as a paramecium, a species of ciliate. Symbiotic algae cannot exist inside paramecia other than *P. bursaria*, like as *P. tetraurelia* or *P. caudatum*. Much interest has been accumulating in elucidating the symbiotic mechanism of symbiotic algae that can exist only inside *P. bursaria*. However, the basic properties related to *P. bursaria* and symbiotic algae have not yet been fully elucidated. Are the species of symbiotic algae in *P. bursaria* uniform or diverse? Are the symbiotic microorganisms in *P. bursaria* symbiotic algae only? Does each individual *P. bursaria* show physiologically similar properties regarding the rate and frequency of cell division and also in terms of longevity? Actually, many things described above still remain unanswered. In this study, after isolating, washing and cloning *P. bursaria*, the rate of proliferation was measured for individual cells. Although each cloned strain should have the same genetic background, we obtained interesting results showing that the proliferation rates were significantly varied among the strains.

Keywords: green paramecium, *Paramecium bursaria*, symbiotic algae, symbiosis, cloning

Introduction

Paramecium bursaria (*P. bursaria*) harbors hundreds of symbiotic algae in its cytoplasm.

It has been reported that “algae-free” *P. bursaria* (white *P. bursaria*) has been produced in the laboratory^{1,2} and also that such paramecia actually exist in the field³. However, in the case of white *P. bursaria*, it has not been confirmed that the symbiotic algae are completely removed from the cell body.

Papers published so far regarded the observation that green algae could not be seen in the cell body of *P. bursaria* under an optical microscope or that autofluorescence emitted by symbiotic algae was not detected under a fluorescent microscope, as proof of removal of symbiotic algae^{1,2,4}. These criteria suggest that the chlorophyll pigment of the symbiotic algae does not exist in the cell body of *P. bursaria* but are

not a direct proof that the symbiotic algae have been completely removed. For a long time, experiments of re-symbiosis of symbiotic algae, in which symbiotic algae were administered to the white *P. bursaria* and the symbiotic algae were taken up into the cell body, were often carried out. However, it was impossible to determine whether the symbiotic algae were newly taken up from the outside and proliferated in the cell body, or the original symbiotic algae remaining in the white *P. bursaria* were stimulated to proliferate by the additional symbiotic algae from the outside. Until the complete removal of symbiotic algae is proved, it is difficult to regard the uptake of symbiotic algae into white *P. bursaria* as the establishment of re-symbiosis.

It has been revealed that the ribulose-1,5-bispho-

sphate carboxylase small subunit (*rbcS*) encoding gene present in photosynthetic plant cells was no longer detected in the white *P. bursaria*⁵⁾, which were generated by the treatment with a photosynthesis inhibitor paraquat and in which the autofluorescence of symbiotic algae was no longer detected. Thus, we were one step closer to the proof of algal removal from *P. bursaria*.

Are the hundreds of symbiotic algae in *P. bursaria* the same species in all individuals? Furthermore, are there the same species or the same proportion of symbiotic algae in *P. bursaria* found all over the world? The basic matters regarding the characteristics of such individual or regional differences in symbiotic algae remain unclear. Under these circumstances, there is no guarantee that the results obtained with *P. bursaria* isolated in one area will be consistent with those using *P. bursaria* isolated in another area.

In order to further develop symbiosis research on *P. bursaria*, it is an urgent task to make the quality of *P. bursaria* stabilize, which has so far not been uniform. For the first step to supply *P. bursaria* having stabilized quality, it is important to clarify what kind of property difference is observed in each individually cloned *P. bursaria* that should have the same genetic background. In this study, for each individual in a *P. bursaria* clone obtained using a unified method, its proliferation was observed over time.

Materials and Methods

1. Preparation of lettuce medium

Lettuce medium was used for the culture of *P. bursaria*⁶⁾. The preparation of lettuce medium is as follows: After washing leaves of the lettuce, they were soaked in boiling tap water for 1 minute. After boiling, they were soaked in tap water at room temperature, spread on filter paper and dried in a dry heat

sterilizer at 75°C for 3 hours and further at 65°C for 3.5 hours. The dried lettuce leaves were crushed to an appropriate size and stored in a jar inside a desiccator at room temperature. 1.5 gram of the stocked lettuce leaf was added to 3 L of deionized water in a 5 L Erlenmeyer flask, and extraction was performed at 100°C for 5 minutes. After the extract cooled, it was filtered using filter paper (Advantec, No. 2, 50 cm) to remove tiny pieces of lettuce leaves. The lettuce medium thus obtained was dispensed into wide-mouth medium bottles, autoclaved (121°C, 20 minutes), and stored at 4°C until use.

2. Isolation and cloning of *P. bursaria*

A strain KUNY-2 has been originally established in 2016 and stocked in the bacterized lettuce medium⁷⁾. In 2017, the strain was further cloned and washed with the sterilized lettuce medium, as described in Fig.1. This strain was designated as KUHH-4 and has been stocked in the sterilized lettuce medium under no-feed condition until use. One single *P. bursaria* was isolated using a micropipette from the stock (KUHH-4), washed with sterilized lettuce medium as follows, and then cultured in the sterilized lettuce medium. Four drops of the lettuce medium were placed on a slide glass, and isolated individuals of *P. bursaria* were allowed to swim in the first drop, and transferred to the second drop. This procedure was further repeated two times (Fig. 1). By this operation, we confirmed the isolation of one individual (cloning) and removal of microorganisms existing in the original culture media (washing). Then, 3 mL of sterilized lettuce medium was placed into each well of a 6-well plate (TPP 92006, flat bottom), and one individual *P. bursaria*, treated by the above-mentioned isolation and washing four times, was put into each well. The cells were cultured in an incubator (Biotron, LH-411S) at 23°C under light irradiation (12 hours light, 12 hours dark). Two

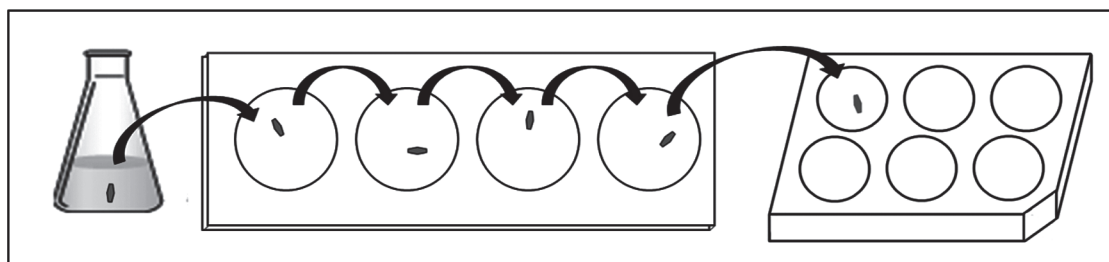


Fig. 1. Overview of cleaning and cloning methods for *P. bursaria*.

weeks after the start of culture, strains that grew to about 20-30 cells/well (7-10 cells/mL in density) were selected and placed in a 100 mL sterilized lettuce medium (200 mL Erlenmeyer flask) and growth was observed. About 40-60 days after the start of the culture, the cells grew to a density of 1,000-1,400 cells/mL and were stored in the incubator for a long period of time in that state (the steady phase of growth).

Results and Discussion

As mentioned above, for *P. bursaria* collected either in Japan or overseas, it is unclear whether the same type of symbiotic algae exist in all individuals or whether the symbiotic algae (about 400 cells) inside one individual are of the same species.

For multiple *P. bursaria* individuals (clones) obtained by the above method, growth was started from one individual in each well (3 mL sterilized lettuce medium) of a 6-well plate, and the number of cells in each well was observed over time. The growth densities around 73 days and 98 days from the start of growth are shown in (a) and (b) of Table 1 as growth index. The growth index was designated as the number of *P. bursaria* cells in one well at around 73 days or 98 days of growth divided by the initial number of cells in one well (1 cell), respectively. From Fig. 2, which shows the average values of 13 data in (a) and 11 data in (b), it was found that *P. bursaria* reached the stationary phase of growth about 2 months after the start of culture. In addition, as shown in Table 1, it was found that there are some strains, even arrived at the stationary phase, in which the cell density suddenly decreases. By repeating the cloning, the individuals, whose prolifera-

tion was measured, should have the same genetic background. However, as is clear from Table 1 and Fig. 2, the proliferation rate considerably varied among individual clones. It is natural to think that these differences in proliferation ability are derived from symbiotic algae and/or other microorganisms existing in the cell body of *P. bursaria*. Specifically, it seems highly possible that the species of symbiotic algae in each individual *P. bursaria* are not uniform but diverse in the first place and that the extent of diversity is different for each *P. bursaria* individual. In addition, it is also possible that symbiotic microorganisms other than symbiotic algae exist in *P. bursaria*⁸⁾ and they induce the proliferation diversity of the host.

In the present study, it is revealed that there is a large difference in the proliferation rate among individuals of *P. bursaria*, which are considered to have the same genetic background. From this, it is newly indicated that the growth of the host may be controlled by symbiotic algae and other symbiotic microorganisms. It is an urgent task to clarify what are the specific factors controlling the growth of *P. bursaria*.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to Dr. A. Hino, Dr. M. Kitashima, Dr. S. Kotani and Dr. A. Toyoda for their comments. We also would like to ac-

Table 1. The growth indices at (a) around 73 days and (b) around 98 days after the start of culture. I stands for Iwanaga (2 samples). O, Ominato (4); K, Komiya (1); S, Suzuki (2); M, Matsushima (2); Y, Yokoyama (2).

| (a) | | | (b) | | | | |
|------|---|--------------|------|-----|--------------|---|------|
| days | # | growth index | days | # | growth index | | |
| 72 | I | 1 | 54 | 100 | I | 1 | 150 |
| | | 2 | 537 | | | 2 | 667 |
| 73 | O | 1 | 1446 | 98 | O | 2 | 1287 |
| | | 2 | 308 | | | 3 | 3766 |
| | | 3 | 847 | | | 4 | 1791 |
| | | 4 | 3170 | | | | |
| 74 | K | 1 | 989 | 98 | S | 1 | 11 |
| 73 | S | 1 | 8 | 98 | S | 2 | 1202 |
| | | 2 | 797 | 99 | M | 1 | 136 |
| 73 | M | 1 | 312 | 99 | M | 2 | 1941 |
| | | 2 | 742 | 92 | Y | 1 | 854 |
| 74 | Y | 1 | 1301 | 92 | Y | 2 | 792 |
| | | 2 | 814 | | | | |

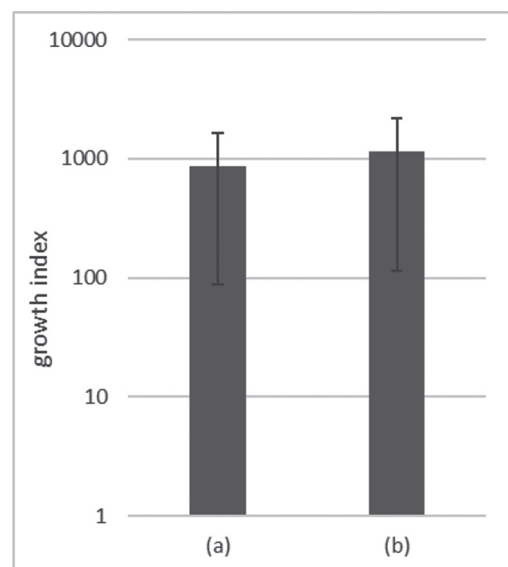


Fig. 2. The bars represent the average values growth indices shown in (a) and (b) of Table 1, respectively (error bars: standard deviations).

knowledge graduate students in Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University for their cooperation. This work was partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS 202110).

References

- 1) Jennings HS (1938) Sex Reaction Types and Their Interrelations in *Paramecium Bursaria*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **24**: 112-120.
- 2) 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.
- 3) Tonooka Y and Watanabe T (2002) A natural strain of *Paramecium bursaria* lacking symbiotic algae. *Europ. J. Protistol.* **38**: 55-58.
- 4) Siegel RW (1960) Hereditary endosymbiosis in *Paramecium bursaria*. *Exp. Cell Res.* **19**: 239-252.
- 5) Tanaka M, Murata-Hori M, Kadono T, Kawano T, Yamada T, Kosaka T and Hosoya H (2002) Complete eliminations of endosymbiotic algae from *Paramecium bursaria* and its confirmation by diagnostic PCR. *Acta Protozool.* **41**: 255-262.
- 6) Jennings HS (1938) Genetics of *Paramecium bursaria*. I. Mating types and groups, their interrelations and distribution; Mating behavior and self sterility. *Genetics* **24**: 202-233.
- 7) Hosoya H, Hamao K, Katou K, Dora H and Kotani S (2017) Studies of green paramecium, *Paramecium bursaria*, isolated in Kanagawa Prefecture (in Japanese). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 79-83.
- 8) Görtz HD (1982) Infections of *Paramecium bursaria* with bacteria and yeasts. *J. Cell Sci.* **58**: 445-453.

■原 著■

ヴァイオリンを A 音からチューニングする根拠の理解

青木 孝^{1,2}

Understanding Why the Violin is Tuned from A Pitch

Takashi Aoki^{1,2}

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

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

Abstract: The understanding of why the violin is tuned from A pitch was studied. It was noted that the understanding is based on the historical process of the violin.

Keywords: Violin, tuning, harmony, mean temperament, combination tone, Pythagoras

序論

報告者は、物理学実験 I の課題の 1 つ「音速の測定とリサージュ図形の観測」実験を担当していた。その実験の導入にあたり、音波の周波数に関連した、音律と音階の物理についても説明していた。学生の数人は、身近な音楽と、身近でない物理との 1 つの結びつきに驚き関心を示す。そこに意義も感じ続けているが、説明をしながらも、「なぜ、A 音からチューニングするのか？」という疑問がいつも付きまとっていた。そこで、調べることにしたわけである。その結果、300 年前には完成形となったヴァイオリン系楽器を A 音からチューニングする根拠について、現代のヴァイオリン系楽器が、歴史上の到達点であるという観点と、音律の変遷を照らし合わせ、その関係性から納得できる理解を得ることができたので報告し、学生への補足とする。

表 1. 西洋と日本の音階

| | | | | | | | |
|---|---|---|----|---|---|---|-----|
| ド | レ | ミ | ファ | ソ | ラ | シ | (ド) |
| C | D | E | F | G | A | B | (C) |
| ハ | ニ | ホ | ヘ | ト | イ | ロ | (ハ) |

音階は、ドレミファソラシ (ド) の 7 音からなる。音名は、英米式では、ドを記号 C として、ラの A から始まり一巡する。日本では、表 1 の下段として対応させる。音域上、中央の C を C4 として、1 オクターブ上の C は C5 と表記する。したがって、A 音は A4 となる。C4 ~ C5 は、なじみ深くハ長調と呼ばれ、近代音楽では基本となっているが、C4 音からではなく、この A4 音を、一般的に、1939 年ロンドン国際会議で決められた 440 Hz としてチューニングする。

17 世紀から 18 世紀のバッハに代表されるバロック音楽では、A4 音のピッチが 435 Hz であったとされ、まさに 1891 年において国際 A4 ピッチは、435 Hz と決められていた。時代により、A4 音の周波数は変遷するが、チューニングの基準は音階ラであり、その音名を A としていることに、歴史的必然があることが理解できたので報告する。

方法

倍音の解析

倍音は、マラン・メルセンヌにより、1636 年に発見された。それと同時に、後述の平均律も、ほぼ完璧に記述している。倍音は、1 オクターブが基本となる。C4 と C5 の周波数比は、2 倍となる (2 の倍数系列)。C4 の音に調弦した開放弦長を l とすれば、C5 は弦長を $\frac{l}{2}$ にして弾けばよい。以降、3 倍音、4 倍音 (2 オクターブ上) 等は、表 2 となる。2 倍音 C5 と 3 倍音 G5 の周波数比は、 $\frac{C5}{C4} = \frac{3}{2}$ で完全 5 度の音程という。C4 の開放弦長を l とし、C5 の弦長を $l/2$ とすれば、G5 は、弦長を $\frac{2}{3}l$ (3 の倍数系列) ($=\frac{l}{3}$) として弾く音と同じである。

表 2. 調和律 (純正律)

| | | | | | | |
|-----|-----|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | 1 | 2 | $3(2 \cdot \frac{3}{2})$ | 4 | $5(4 \cdot \frac{5}{4})$ | 6 |
| トーン | C4 | C5 | G5 | C6 | E6 | G6 |
| 弦長 | l | $\frac{l}{2}$ | $\frac{l}{3}$ | $\frac{l}{4}$ | $\frac{l}{5}$ | $\frac{l}{6}$ |

また、4 倍音 C6 と 5 倍音 E6 の周波数比は、 $\frac{E6}{C6} = \frac{5}{4}$ で、長 3 度の音程という。C6 の開放弦長を l ($=\frac{l}{4}$) とすれば、E6 は弦長 $\frac{4}{5}l$ (5 の倍数系列) として弾

く音と同じになる。これらの周波数比を、弦長で表せば、表 2 の下段となる。これらの倍音系列の音を、C4 ~ C5 のオクターブ内に対応する音に埋め込めば (G5 は長さを 2 倍にして 1 オクターブ下げて C4 ~ C5 内に入るように調整する)、C4、E4、G4、C5 の周波数比が決まる。倍音系列に基づく音階は、長 3 度 (E4: $\frac{5}{4}$) と完全 5 度 (G4: $\frac{3}{2}$) が調和音となるような音階となる。この音階は、純正律 (Just intonation) と呼ばれ、後で論ずる。ヴァイオリン系楽器では、この純正律の音律で演奏する。

表 3. ピアノのオクターブトーン

| | | | | | | | | | | | | |
|----|----|--|---|---|---|--|---|---|---|----|--|---|
| B3 | C4 | | D | E | F | | G | A | B | C5 | | D |
|----|----|--|---|---|---|--|---|---|---|----|--|---|

ピアノの鍵盤として、C4 音を中心に音階を示せば、表 3 となる。表 3 において、ピアノの C4 と D4 の間にある黒鍵盤は、C4 の右隣りにある「||」で代用し、半音のキィを表わす。D4 以降の表記も同様とする。C4 の半音上がった音階を C4# と表し、D4 の半音下がった音階を D4^b と表す。この C4# と D4^b は、周波数が音楽的には違う音であるが、ピアノでは、同じ周波数の音として 1 つのキィに割り振り演奏する。西欧近代音楽のピアノでは、1 度のチューニングで転調の保証をするために、半音周波数比を一定にし、# = b とするために、平均律というチューニングを使用する。平均律は、半音を含む、C4、C#、D、D#、E、F、F#、G、G#、A、A#、B、(C5) の 12 音階で成り立っている。半音比は一定なので、全音比も一定となり、半音は全音の完全に半分となる。調和を基本とする純正律では、全音比は 2 種類あり、大全音と小全音がある。半音は全音の半分ではなく、# と b の比は違う。このことが、純正律の音階では、1 度のチューニングによる転調を不可能にし、音階が、どの音名からチューニングするかに関係する。これが、本報告の主題である。

この報告は、300 年前に完成形となった現代西欧ヴァイオリン系楽器の調和律 (純正律) による調弦が、歴史上の到達点であるという観点と、ピタゴラス律、調和律、平均律それぞれの音律の音楽的変遷を照らし合わせるという方法で、現代ヴァイオリン系楽器を A 音からチューニングする根拠について、納得できる理解を与えることを目的とする。チューニングする音律と楽器は密接に関連することに注目する。ピアノは、平均律の音階を採用しており、同様に、ギターフレット間隔も平均律で調整されており、両楽器とも転調 (コード変換) が保証されている。次に、平均律について説明する。

平均律とピタゴラス音律の解析

平均律は、1585 年にシモン・ステヴィンが 1 オクターブの中に存在する「半音」をすべて同等な比: $\sqrt[12]{2}$ で算出する平均律 (Mean temperament) を西欧世界で初めて導出した¹⁾。1 オクターブを周波数比 2 とし、半音比: $\sqrt[12]{2} \approx 1.059463094$ を一定値として音階を構成する (表 4)。# (半音あげる)、b (半音下げる) は、同音となる。平均律では、オクターブ以外は協和音となり得る音程は存在しないが、表 4 に見るように、1 度のチューニングで転調が保証される。5 度音程の平均律と調和音の差は、Martin D18 ギターの弦長で 0.5 mm である。

表 4. 平均律

| | | C 調 | A 調 |
|----|--------------------------------------|-----|-----|
| 1 | 1.0 | C | A |
| 2 | $\sqrt[12]{2} \approx 1.0595$ | C # | A # |
| 3 | $(\sqrt[12]{2})^2 \approx 1.1225$ | D | B |
| 4 | $(\sqrt[12]{2})^3 \approx 1.1892$ | D # | C |
| 5 | $(\sqrt[12]{2})^4 \approx 1.2599$ | E | C # |
| 6 | $(\sqrt[12]{2})^5 \approx 1.3348$ | F | D |
| 7 | $(\sqrt[12]{2})^6 \approx 1.4142$ | F # | D # |
| 8 | $(\sqrt[12]{2})^7 \approx 1.4983$ | G | E |
| 9 | $(\sqrt[12]{2})^8 \approx 1.5874$ | G # | F |
| 10 | $(\sqrt[12]{2})^9 \approx 1.6818$ | A | F # |
| 11 | $(\sqrt[12]{2})^{10} \approx 1.7818$ | A # | G |
| 12 | $(\sqrt[12]{2})^{11} \approx 1.8877$ | B | G # |
| 13 | $(\sqrt[12]{2})^{12} = 2.0$ | C | A |

平均律から約 2000 年さかのぼり、ピタゴラスが、第 3 倍音の完全 5 度の音程を持つ周波数比で $\frac{3}{2}$ となる関係 (開放弦長の半分がオクターブ、開放弦長の $\frac{2}{3}$ が完全 5 度) だけを使って、ピタゴラスの音律を作っている。例えば、C 調のドから音階を作るとすれば、C (ド) が周波数 1 とすると、 $C \cdot \frac{3}{2} = 1.5$ (C の弦長を $\frac{2}{3}$ にすること) は、完全 5 度上の G の周波数になる。平均律の表 4 と比べると、G (ソ) は、8 番目の音: $(\sqrt[12]{2})^7 \approx \frac{3}{2}$ に対応する。さらに、この G に対して完全 5 度上の音は、 $(\frac{3}{2})^2 = 2.25$ となり、C の 1 オクターブ上の音域の D (レ) となるので、同じ音域に収めるために、オクターブ下げて、 $(\frac{3}{2})^2 (\frac{1}{2}) = 1.125$ とする。このように、完全 5 度 ($\frac{3}{2}$) とオクターブ下げ ($\frac{1}{2}$) の関係だけで音階を作っていくピタゴラス律では、C から始めて繰り返す 3 番目の音に、D (レ) が対応する (表 5)。C から順に、C、G、D と、D 以降も完全 5 度の関係を芋づる式に 12 回繰り返すと、表 5 の順のように、13 番目の音として、1 オクターブ上の C が出てくる。ちょうど、13 番目の音が、1 オクターブ比の 2 に近いので、ここで 12 音階を打ち切ったのである²⁾。

$$2.0273 \approx (\frac{3}{2})^{12} (\frac{1}{2})^6 \approx 2$$

しかし、この2と2.073の比率の差（ピタゴラスのコンマという）が、正確に音階を閉じないために、転調できない等の弊害を生む。Cから始めるピタゴラス音律では、FCの音程比は原理的に $\frac{3}{2}$ にならない。

ピタゴラス音律において、表5のように、Cから始めて芋づる式に作る最初の5音：C、G、D、A、Eだけで音階を打ち止めにしても楽曲は成立する。日本では俗に、この5音では、第4(ヨソ)音と第7(ナナ)音が抜けるので、「ヨソ抜き音階」と呼ばれるが、この5音階は、世界に共通する音階の1つになっている。「赤とんぼ(中山晋平作曲)」、スコットランド民謡に基づく「蛍の光」、「アメイジング・グレイス」、ドヴォルザークの第2楽章主部：新世界より「遠き山に日は落ちて(日本)」など多くの曲がこの5音階を用いて作曲されている。

表5. ピタゴラス律

| | | |
|----|---|-----|
| | | C 調 |
| 1 | 1.0 | C |
| 2 | $(\frac{3}{2}) = 1.5$ | G |
| 3 | $(\frac{3}{2})^2(\frac{1}{2}) = \frac{9}{8} = 1.125$ | D |
| 4 | $(\frac{3}{2})^3(\frac{1}{2}) = \frac{27}{16} = 1.6875$ | A |
| 5 | $(\frac{3}{2})^4(\frac{1}{2})^2 = \frac{81}{64} = 1.265625$ | E |
| 6 | $(\frac{3}{2})^5(\frac{1}{2})^3 = \frac{243}{128} = 1.8984375$ | B |
| 7 | $(\frac{3}{2})^6(\frac{1}{2})^4 = \frac{729}{512} = 1.423828125$ | F # |
| 8 | $(\frac{3}{2})^7(\frac{1}{2})^5 = \frac{2187}{2048} = 1.067871093$ | C # |
| 9 | $(\frac{3}{2})^8(\frac{1}{2})^6 = \frac{6561}{4096} = 1.60180664$ | G # |
| 10 | $(\frac{3}{2})^9(\frac{1}{2})^7 = \frac{19683}{16384} = 1.20135498$ | D # |
| 11 | $(\frac{3}{2})^{10}(\frac{1}{2})^8 = \frac{59049}{32768} = 1.80203247$ | A # |
| 12 | $(\frac{3}{2})^{11}(\frac{1}{2})^9 = \frac{177147}{131072} = 1.35152435$ | F |
| 13 | $(\frac{3}{2})^{12}(\frac{1}{2})^{10} = \frac{531441}{262144} = 2.02728653$ | C |

表5によれば、芋づる式に完全5度($\frac{3}{2}$)の関係から、Eの次に6番目「B」、7番目「F#」が出てくる。この、C、D、E、F#、G、A、Bの音階は実は、G、A、B、C、D、E、F#、(G)のト長調(長音階)の音階になっている。これを、C音から見た場合には、7番目の音階「F#」の音程 $\frac{729}{512} \approx 1.4238$ が、他の6音と比べ、純正音程からずれるので、次の、

- G, A, B, C, D, E, F#, (G) : ト長調
- C, D, E, F#, G, A, B, (C)
- C, D, E, F, G, A, B, (C)

による対応のように、ハ長調の始めのC音から4度上、オクターブ上からは5度下のF($2 \cdot \frac{2}{3} = \frac{4}{3} \approx 1.3333$)で、F#を置き換える。元のト長調のGC間は、完全4度 $\frac{4}{3} \approx 1.3333$ になっている。それに合わせ、この7音階：C、D、E、F、G、A、B、(C)として一部再構成した音律によって、単旋律のグレゴリオ聖歌(9

～10世紀)や中世の音楽は作曲されたとされることがある。Cから始めたピタゴラス音律の本来のFは、表5の12番目に、 $\frac{177147}{131072} \approx 1.3515$ として出てくる。表5のFを再構成した7音で並び替えると、表6となる。この表6で、オクターブ上のCは、周波数比2としてしまい、ピタゴラスのコンマのつけをFに押し付け7音とする。これが、ピタゴラス7音階の正体である。この表6の7音階は、音程完全5度 $\frac{3}{2}$ を基に音階を作っているのだから、CG間は音程 $\frac{3}{2}$ 、DA間も $\frac{27}{16} \cdot \frac{8}{9} \cdot \frac{3}{2}$ と正しい音程となっている。

このCから始まる：

C, D, E, F, G, A, B, (C)

の自然長音階C(ハ)長調の音列は、そのまま、Aから始まる：

A, B, C, D, E, F, G, (A)

の自然短音階A(イ)短調の音階になっている。実は、グレゴリオ聖歌(9～10世紀)など中世の音楽は、この7音のC(ハ)長調ではなく、基音をAとしたA(イ)短調の音階で作られている。この基音がC(ハ)ではなく、A(イ)短調の音階であることが、Aからヴァイオリンのチューニングを始める理由を考える上で、「1つの着眼点」(着眼点1)である。A短調から、感じのよいC長調へは、始めの音を変えれば良いだけなので、すぐ行き着く³⁾。

表6. 再構成したピタゴラス律(音階)

| | | C 長調 | A 短調 | |
|---|-------------------|------|------|------------------|
| 1 | 1 | C | A | 1 |
| 2 | $\frac{9}{8}$ | D | B | $\frac{9}{8}$ |
| 3 | $\frac{81}{64}$ | E | C | $\frac{32}{27}$ |
| 4 | $\frac{4}{3}$ | F | D | $\frac{4}{3}$ |
| 5 | $\frac{3}{2}$ | G | E | $\frac{3}{2}$ |
| 6 | $\frac{27}{16}$ | A | F | $\frac{128}{81}$ |
| 7 | $\frac{243}{128}$ | B | G | $\frac{16}{9}$ |
| 8 | 2 | C | A | 2 |

結果と討論

和音の解析

全音(例えばCD間)は、半音が2つ分(半音は全音の半分ではない)の音程、全音と全音で長3度(例えばCE間)の音程、全音と半音で短3度(例えばAC間)の音程となる。このとき、長3度と短3度で長3和音(例えばCEG間)、短3度と長3度で短3和音(例えばACE間)となる。根音(基音)からの主和音が長3和音の音階が長調(長音階例えばC長調)で、一方、根音からの主和音が短和音の音階が短調(短音階例えばA短調)と呼ばれる。したがって、長音階例えばC長調は、

C(全音) D(全) E(半) F(全) G(全) A(全) B(半) C、短音階例えばA短調は、

A (全音) B (半) C (全) D (全) E (半) F (全) G (全) A となる。

ピタゴラス音律では、完全5度（長3度と短3度）を、単純な周波数比 $\frac{3}{2}$ として音階を作る。この完全5度の音程のある2音（例えば基音Aと5度上E）の開放弦を同程度の強さで弾くと、開放弦よりは弱い響きだが、両者の振動数の差に相当する音程（「差音」）として、1オクターブ下の基音Aの音が聞こえてくる。Aの周波数をfとして、

$$(0.1) \quad E-A = \frac{3}{2}f - \frac{2}{2}f = \frac{1}{2}f$$

(Aの1オクターブ下の差音)

となる。この2音:EとAがピッタリ合っていないと、ずれの周波数に相当するうなり (beat) を生じ、「ワンワンワン」という響きが聞こえる。この完全5度調弦が、ピッタリと合えば(基音Aに基づきEをチューニングできれば)、式(0.1)から、基音Aを、さらに1オクターブ下の基音A音が支えて、ヴァイオリンの楽器全体が、「裏板から良く鳴る」ようになる。これが「和音」の本質である⁴⁾。A(sin(x))と5度上E(sin(1.5x))の2音の差音(sin(1.5x)-sin(x)) : E-Aを表わすと、この差音の波形は、A音の1オクターブ下の周期波形(元のAの波長の2倍 : 周波数は $\frac{1}{2}$)になる。

純正律の解析

音の周波数比が単純な数比であると、調和音を生む。完全5度の音程を持つ2和音は、基音(根音)の1オクターブ下の差音低音がしっかりと響き全体を支え、充実した「協和音」を作り出す。これが、西欧近代音楽の和音、いわゆる調和音(harmony)の本質である。

楽曲が、グレゴリオ聖歌のような、単旋律のモノフォニーから、多声部合唱(ポリフォニー : 15~16世紀)に移行するにしたがい、長3度(例えばCE間)のピタゴラス音律の周波数比 : $\frac{81}{64} \approx 1.2656$ を単純な数比 : $\frac{5}{4} = 1.25$ に置き換え、調和音(harmony)に重きをおく音階に再構成されるようになる³⁾。これに基づく音階を、純正律と呼ぶ。この再構成により、純正律の長3度は、ピタゴラス音律に比べ、音程はかなり狭くなり、この差をシントニック・コンマと言う。周波数比 $\frac{5}{4}$ は、4倍音(C6)と5倍音(E6)との周波数比に相当し、C4開放弦長の $\frac{4}{5}$ 弦長が、純正律の長3度音程E4の弦長に当たる。

長3度(例えばCとE)の音程の周波数比を $\frac{5}{4}$ とすると、2音の差音は、Cの周波数をfとすれば、

$$(0.2) \quad E-C = \frac{5}{4}f - \frac{4}{4}f = \frac{1}{4}f$$

(Aの2オクターブ下の差音)

となり、完全5度の2音の時の1オクターブ下の基音よりさらに1オクターブ下の、基音の2オクターブ下の低音差音が基音を支え、長3度の和音は、さらにもっと良く響く充実した協和音を得られる。C(sin(x))と長3度上E(sin(1.25x))の2音の差音(sin(1.25x)-sin(x)) : E-Cを表わすと、この差音の波形は、C音の2オクターブ下の周期波形(元のCの波長の4倍、周波数は $\frac{1}{4}$)になる。

あわせて単純な周波数の比ゆえに、その差音(Combination tone)が、基音のオクターブ下の低音差音となり、基音の響き全体を支え、良く響く充実した「協和音」を得られる。この純正律と差音のメカニズム : これが西欧近代音楽の3和音(調和音)の本質である。3和音(例えばC, E, G)の差音も、長3度の2和音(C, E)と同様に、基音(根音) : fの2オクターブ下 : $\frac{1}{4}$ の周期波形となる。

ここで、和音の本質である、ド(C4 : f)とソ(G4 : $\frac{3f}{2}$)の1オクターブ下の差音($\frac{f}{2}$)と、ドの第3倍音(G5 : 1オクターブ上+完全5度上)との関係、または、ド(C4 : f)とミ(E4 : $\frac{5f}{4}$)の2オクターブ下の差音($\frac{f}{4}$)と、ドの第5倍音(E6 : 2オクターブ上+長3度上)との関係について説明する。

まず、ド(C4開放弦)とソ(G4開放弦)の完全5度の和音では、基音C4と基音G4に対して、それぞれ表7の倍音系列をとり、C4に対しては第3倍音、G4に対しては第2倍音に当たる : G5の共有倍音同志が協和する(うならない)。C4とG4の完全5度を持つ2弦のチューニングが、途上で未完の時は、このG5の共有倍音同志がうなるわけである。チューニング完成時には、差音として、基音C4の1オクターブ下のC3が協和音として鳴る。これはちょうど、表7下段のように、協和音である差音C3を基音と考えたときの、第2、第3倍音が、C4、G4となるような関係になるのである。

このとき、基音C4に対して、同じ開放弦1音に対し、振幅を $\frac{1}{3}$ にした3倍音 : G5を加えた、次に示す合成音(z) :

$$(0.3) \quad z = C4 - \frac{1}{3}G5 = \cos(t) - (\frac{1}{3})\cos 3t$$

の周期は、基音と同じC4の矩形波形の音色になる。

次に、ド(C4)とミ(E4)の長3度の2和音について解析する。基音C4に対しては、倍音が1,2,3,4,5,6倍音に対して、C4,C5,G5,C6,E6,G6の音名に対応す

表7. 2和音 (G/C) の純正律倍音系列

| | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | C4 | | C5 | G5 | C6 | | |
| | | G4 | | G5 | | D6 | G6 |
| C3 | C4 | G4 | C5 | | | | |

る。基音 E4 についても同様に、表 8 のような、それぞれの倍音系列を取り、E6 (C4 については第 5 倍音、E4 については第 4 倍音) の共有倍音同志が協和する (うならない)。C4 と E4 の長 3 度を持つ 2 弦の、チューニングが途上で未完の時は、この E6 の共有倍音同志がうなるわけである (平均律のピアノの調律は、このうなりを利用して純正律からずらす)。完全 5 度の場合の協和倍音 G5 (C4 の 3 倍音) よりも、長 3 度では、より高次の E6 (C4 の 5 倍音) の倍音同志が協和する。チューニング完成時は、差音として、基音 C4 の 2 オクターブ下の C2 が協和音として鳴る。これはちょうど、G/C 和音の表 7 下段の時と同様に、協和音である差音 C2 を基音と考えたときの、第 4、第 5 倍音が、C4、E4 となるような関係になるのである (表 8)。

この時、基音 C4 の開放弦に対して、振幅の小さい $\frac{1}{3}$ 3 倍音 (G5) と $\frac{1}{5}$ 5 倍音 (E6) を加えた合成音 (z) :

$$(0.4) \quad z = C4 - \frac{1}{3}G5 + \frac{1}{5}E6 \\ = \cos(t) - (\frac{1}{3})\cos 3t + (\frac{1}{5})\cos 5t$$

の周期は、C4 の周期と同じになる。この倍音の重ね合わせが、楽器の音色の正体である。C4 の弦を弾けば、各倍音が開放弦より弱い響き (小さい振幅) であるが固有振動として混ざり、その構成比が音色の違いとして聞こえる。たとえば、木管楽器の 1 種クラリネットの音の波形は、合成音 : 式 (0.4) のいわゆる矩形波に近い波形であることが知られている。クラリネットは、ほぼ管体の太さが一定であり、さらに、閉管していることで奇数倍音だけが現れる。各々の倍音の量と発音のタイミング、長さ等の組み合わせによって、楽器特有の音色として表せる。

ドミソ (C4,E4,G4) の 3 和音は、差音として、基音 (C4) の 2 オクターブ下の C2 が協和音となる。これもちょうど、表 7 下段の (C3) の場合と同様に、協和音である差音 C2 を基音としたときの、第 4、第 5、第 6 倍音が、C4、E4、G4 となるような関係になっているのである。

表8. 2和音 (E/C) の純正律倍音系列

| | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | C4 | | C5 | | G5 | | C6 | E6 |
| | | | | E4 | | E5 | | B5 | | E6 |
| C2 | C3 | G3 | C4 | E4 | | | | | | |

C 調系と A 調系の解析

C 長調系列の表 9 で、音名間の数字は、音名間の周波数比を表わす。ピタゴラス音律では、C 系において DE 間の全音比は、 $\frac{9}{8}$ となる。EF、BC 間は半音で、他は全音となっている。表 9 右欄のように、長 3 度 (周波数比が $\frac{5}{4}$) の調和音を考えた C 系列の純正律を作る。その手順を示す。

- (1)ピタゴラス音律の音階を、C から芽づる式に完全 5 度 ($\frac{3}{2}$) の関係で 7 音作る。オクターブ上の C は周波数比 2 とする。
- (2)第 7 番目にできる F 井を、オクターブ上の C から 5 度下 ($\frac{3}{2}$) の F (周波数比では $\frac{4}{3}$) に置き換えて、7 番目で打ち切り 7 音を再構成し、広い意味でのピタゴラス音律とする。
- (3)C から始めて、主要 3 和音の根音 : C、F、G に対して長 3 度の音 : それぞれ、

E (C → E)、A (F → A)、B (G → B)

を周波数比 $\frac{5}{4}$ に再構成する。この再構成により、ピタゴラス音律から純正律へ、次のようになる (表 9)。

$$E : \frac{81}{64} \rightarrow \frac{5}{4} \\ A : \frac{27}{16} \rightarrow \frac{5}{3} \\ B : \frac{243}{128} \rightarrow \frac{15}{8}$$

表9. C 調系のオクターブ

| | ピタゴラス律 | 比 | 純正律 | 比 |
|-----|-------------------|-------------------|----------------|-----------------|
| C | 1 | | 1 | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ |
| D | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{10}{9}$ |
| E | $\frac{81}{64}$ | | $\frac{5}{4}$ | |
| | | $\frac{256}{243}$ | | $\frac{16}{15}$ |
| F | $\frac{4}{3}$ | | $\frac{4}{3}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ |
| G | $\frac{3}{2}$ | | $\frac{3}{2}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{10}{9}$ |
| A | $\frac{27}{16}$ | | $\frac{5}{3}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ |
| B | $\frac{243}{128}$ | | $\frac{15}{8}$ | |
| | | $\frac{256}{243}$ | | $\frac{16}{15}$ |
| (C) | 2 | | 2 | |

この(3)の純正律による再構成により、ピタゴラス音律では全音比がすべて同じ比率 $\frac{9}{8}$ 、半音比も同じ $\frac{256}{243}$ であったが、純正律では、CD 間の比 $\frac{9}{8}$ のような「大全音」と、DE 間の比 $\frac{10}{9}$ のような「小全音」の 2 種類に全音が分かれてしまう。純正律の半音は、ピ

タゴラス音律の比 $\frac{256}{243}$ から比 $\frac{16}{15}$ となり、「全音階的半音」という。

この純正律で、全音が2種類できてしまうことが、転調を保証しないばかりか、音程に関して重大な問題を引き起こす。この影響で、Cから始めたピタゴラス音律では、CG間、DA間、EB間、FC間すべてにおいて完全5度比 ($\frac{3}{2}$) の音程になっているが、純正律では、このうち、DA間だけ、完全5度音程： $\frac{3}{2}$ とならない。

$$(0.5) \quad DA \text{ 間} = \frac{5}{3} \cdot \frac{8}{9} = \frac{40}{27} \approx 1.4815 \neq \frac{3}{2}$$

これは、純正律では、

長3度 = 大全音 + 小全音

短3度 = 大全音 + 全音階的半音

完全5度 = 長3度 + 短3度 = 大全音 + 小全音 + 大全音 + 全音階的半音

とならねばならないが、Cから始めたC系列の純正律のDA間の比だけは、

DA間 = 大全音 + 小全音 +

「小全音 (DE間の違い)」 + 全音階的半音 となってしまうために、完全5度： $\frac{3}{2}$ とならない。A音から楽器をチューニングする理由を考える上で、この点に注目する。

ここで次に、表9のC系列を、グレゴリオ聖歌の音階に習い (着眼点1)、Aを基音として、Aから始まるA系列に作り直してみる。ピタゴラス音律部分はC系列の場合と全く変わらず、C系列の手順(3)に相当するA系列の純正律部分は、表10の右欄のよ

表10. A調系のオクターブ

| | ピタゴラス律 | 比 | 純正律 | 比 |
|-----|-----------------|-------------------|----------------|-----------------|
| C | $\frac{16}{27}$ | | $\frac{3}{5}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{10}{9}$ |
| D | $\frac{2}{3}$ | | $\frac{2}{3}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ |
| E | $\frac{3}{4}$ | | $\frac{3}{4}$ | |
| | | $\frac{256}{243}$ | | $\frac{16}{15}$ |
| F | $\frac{64}{81}$ | | $\frac{4}{5}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ |
| G | $\frac{8}{9}$ | | $\frac{9}{10}$ | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{10}{9}$ |
| A | 1 | | 1 | |
| | | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ |
| B | $\frac{9}{8}$ | | $\frac{9}{8}$ | |
| | | $\frac{256}{243}$ | | $\frac{16}{15}$ |
| (C) | $\frac{32}{27}$ | | $\frac{6}{5}$ | |

うに変わる。

表10において、表示上はC系列の表9と同じ並びにするが、Aから始めて、主要3和音の根音、A、D、Eに対して短3度 (A短調) の音程として、

C (A → C)、F (D → F)、G (E → G)

を周波数比 $\frac{6}{5}$ に再構成する。この再構成により、ピタゴラス音律から純正律へ、次のようになる (表10)。

$$C : \frac{32}{27} \rightarrow \frac{6}{5}$$

$$F : \frac{64}{81} \rightarrow \frac{4}{5}$$

$$G : \frac{8}{9} \rightarrow \frac{9}{10}$$

となる。これにつれ、1オクターブ下のCも、

$$C : \frac{16}{27} \rightarrow \frac{3}{5}$$

となる。短3度は、「全音階的半音 + 大全音」で、周波数比は、 $\frac{16}{15} \cdot \frac{9}{8} = \frac{6}{5}$ となる。A系列純正律の再構成により、C系列と同様に、「大全音 $\frac{9}{8}$ 」と、「小全音 $\frac{10}{9}$ 」に分かれるが、

C系列で、CD間：大全音 = $\frac{9}{8}$

C系列で、DE間：小全音 = $\frac{10}{9}$

であったものが、Aから始まる、

A系列で、CD間：小全音 = $\frac{10}{9}$

A系列で、DE間：大全音 = $\frac{9}{8}$

と、同じ2音間の音程でありながら変更される。純正律は、1つのチューニングで転調ができないわけである。

このとき、変更によって、Aから始めた純正律では、1オクターブ内に収まる：

CG間、DA間、EB間、FC間すべてが完全5度になり、Cから始めた純正律では、

DA間 $\neq \frac{3}{2}$ (完全5度でない)

であったものが、A系列では純正律においても、完全5度となる。この点が、チューニングをA音から始める理由を考える上での「着眼点2」となる。

ヴァイオリン系楽器の調弦

ストラディバリウス等に代表されるヴァイオリンは、純正律が確立していた中世と同時期：17世紀後半から18世紀に完成形を見た。ヴァイオリンは、音が高い方から、1、2、3、4弦と言い、高い第1弦から順に、E、A、D、Gの音に、第2弦のA音のピッチを基準に、すべて完全5度の音程を基本に、A (2弦)、D (3弦)、G (4弦)、E (1弦) の弦の順にチューニングする。チューニング手順は以下になる (表11)。

(1) まず、2弦をA4のピッチ：通常は440 Hzに合わせる。

(2) 3弦：D4が、2弦：A4を基準に、完全5度「下」になるように、差音である基音D4の1オクターブ下の音が弱く響くようにチューニングする。

表 11. ヴァイオリンの調律

| St. | Violin | | T | u | n | e |
|-----|----------------------------------|------|---|---|---|---|
| 1H | E5 : $A4 \times (\frac{3}{2})$ | 5UP | | | | 4 |
| 2 | A4 : 440Hz | | 1 | | | |
| 3 | D4 : $A4 \times (\frac{2}{3})$ | 5DWN | | 2 | | |
| 4L | G3 : $A4 \times (\frac{2}{3})^2$ | 5DWN | | | 3 | |

(3) 4 弦 : G3 が、3 弦 : D4 を基準に、完全 5 度「下」になるように、差音である基音 G3 の 1 オクターブ下の音が弱く響くようにチューニングする。

(4) 1 弦 : E5 が、2 弦 : A4 を基準に、完全 5 度「上」になるように、差音に注意してチューニングする。

ヴァイオリンには、フレットがないので、演奏者が耳により、弦を押さえる位置を指位置で調節して、純正律で弾く。ピアノとギターは、平均律でチューニングするので、転調が保証される。ギターのフレットは、弦長が、平均律になるように、純正律からずらして切っている。ピアノの鍵盤では同音となるが、ヴァイオリンなどの純正律では、C # と B ♭ は別の音で、指位置で弾き別ける。

少し大きめのビオラは、4 弦を持ち、楽曲の低音域をカバーするために、ヴァイオリン同様に完全 5 度の音程を基本に、ヴァイオリンの基準ピッチとする第 2 弦:A4 (440 Hz) を、ビオラの高い方の第 1 弦:A4 として、すべて低くなる 2、3、4 弦を、順に完全 5 度下になるように、2 弦 : D4、3 弦 : G3、4 弦 : C3 としてチューニングする。

やや大きめのチェロは、4 弦を持ち、さらにビオラの 1 オクターブ下の低音域をカバーするために、ヴァイオリンの第 2 弦の基準ピッチ A4 = 440 Hz の 1 オクターブ下の A3 = 220 Hz を、高い方の第 1 弦 : A3 として、ビオラと同様にすべて低くなる 2、3、4 弦を、順に完全 5 度下になるように、2 弦 : D3、3 弦 : G2、4 弦 : C2 とチューニングする。これら、ビオラ、チェロの各弦の音域を整理すると、表 12 となる。表 12 の左端は、比較のために、ヴァイオリンの 4 弦の音域を示す。

300 年前には完成形だった、ヴァイオリン。ビオラ、チェロは、その調弦に純正律の歴史を残している。ヴァイオリンでは、2 弦:A4 ピッチを基準にして、完全 5 度の音程によって、低い側の A の下は、D、G として、高い側の A の上は、E としてチューニングしていることが分かる。先の表 5 に見るような、完全 5 度音程によるピタゴラス音階の作成過程は、C から芋づる式に始まったのではなく、A から始まり、下の低い方に、D、G、C とつくり止まり、反転して、基準 A から上の高い方に、E という順番に作られたとされる。まさにこれは、ヴァイオリン系楽器

表 12. ヴィオラとチェロの調律

| V. | St. | Viola | St. | Cello |
|----|-----|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|
| 1H | | | | |
| 2 | 1H | A4:440Hz | | |
| 3 | 2 | D4:A4×($\frac{2}{3}$) | | |
| | | | 1H | A3:220Hz |
| 4L | 3 | G3:A4×($\frac{2}{3}$) ² | | |
| | | | 2 | D3:A3×($\frac{2}{3}$) |
| | 4L | C3:A4×($\frac{2}{3}$) ³ | | |
| | | | 3 | G2:A3×($\frac{2}{3}$) ² |
| | | | 4L | C2:A3×($\frac{2}{3}$) ³ |

のチューニング手順と同一である。チューニング手順と、調弦音に、300 年の音律の歴史が残っているのである。このことが、A からヴァイオリン系楽器をチューニングする理由の「着眼点 3」となる。これですべての 3 つの着眼点が整った。

一方、コントラバスは、その楽器の完成形が、ヴァイオリン系楽器に比べかなり遅く、19 世紀になってほぼ固まり、ヴァイオリン系楽器とは異なり、高い方から 1、2、2、4 弦とし、第 1 弦をチェロの 3 弦 : G2 と同音にして、1 弦 : G2、2 弦 : D2、3 弦 : A1、4 弦 : E1 と、完全 5 度音程ではなく、すべて 4 度音程で調弦する。

ここで、コントラバスの調弦を、4 度音程調弦に、ヴァイオリン系と変えた理由として、次のことが考えられている。チェロに比べかなりサイズの大きいコントラバスは、チェロの音域より 1 オクターブ下の音域をカバーする、高い 1 弦 : A2 から 5 度音程の 4 本調弦の構成が考えられていたが、サイズが大きくなるために、弦の音程を取る指幅が大きくなり演奏できない。できたとしても、当時はガット (羊の腸でできている) 弦しかなく、それで一番低い 4 弦 : C1 弦を作ろうとすると、人間の親指より太くなってしまいうので、C1 弦を作ることができなかった。そこで、最低弦の音を G1、完全 5 度ずつ上がって、D2、A2 としたチューニングの 3 弦コントラバスの歴史が始まった。その後、18 世紀から徐々に巻線弦が発明され、ガット弦またはナイロン弦に金属線を巻き付け補強して弦径を細くできるようになり、しだいに、高い方の 1 弦を G2 (チェロの 3 弦) から始める 4 度音程の、全体音域を狭めた、4 弦コントラバスに変わった。さらに巻線の開発を加え、完全 5 度チューニングに最適な弦を求めて、ジャズ・ベーシストのレッド・ミッチェル (Red Mitchell : 1927-1992) は、この歴史をふまえ、あえてチェロより 1 オクターブ音域を下げて完全 5 度調弦した、初期目標の 4 本弦:

高い方から1弦：A2、D2、G1、C1で、コントラバスをチューニングして演奏した⁹⁾。したがって、弦楽器の調弦の基本は、完全5度チューニングのヴァイオリン系に代表されると考えてよい。

今ここで、ヴァイオリン系楽器の調弦に、300年前の純正律の音律と音階の名残が残る、すなわち、調弦は音律そのものを反映したものと考える（着眼点3）。また、近代は長調が基本となり、Cを基本に自然長音階を考えるが（音域表示もCを基準）、ヴァイオリンが完成形となった300年前の中世では、A音から始まる自然短音階（短調）を基本にしていたことを思い出す（着眼点1）。一方、表9（C系列）と表10（A系列）によれば、Cから始まるピタゴラス音律では、DA間の音程は完全5度： $DA = \frac{3}{2}$ であるが、Cから始まる純正律では、オクターブ内のDA間の音程が完全5度にならない： $DA \neq \frac{3}{2}$ 。Aから始まる自然短音階のオクターブ内にあるDA間の音程は、Aから始まるピタゴラス音律でも、Aから始まる純正律でも、DA間の音程は完全5度になる（表15）。現に、ヴァイオリン、ビオラ、チェロでも現れる、オクターブ内のD弦とA弦間（DA間音程）は、完全5度音程でチューニングするので、C系で始まる自然長音階の純正律を反映した楽器の調弦ではあり得ない。A系から始まる自然短音階の純正律でなければならないし、現に調弦は、Aピッチを基準にして、Aから始めて、他3本をチューニングしていく（着眼点2）。

表 15. C 調と A 調における DA 間音程

| | ピタゴラス音律 | 純正律 |
|-----|--------------------|-----------------------|
| C 調 | $DA = \frac{3}{2}$ | $DA \neq \frac{3}{2}$ |
| A 調 | $DA = \frac{3}{2}$ | $DA = \frac{3}{2}$ |

ここまで、理解した上で、ピタゴラス音律の音階を、完全5度音程 $\frac{3}{2}$ で、Cから始めて芋づる式に導出した表5を再考する。実は、この表は、Cから高音側に始めるのではなく、Aを始めとして、Aから低音側に3つ、 $(\frac{2}{3})$ 、 $(\frac{2}{3})^2$ 、 $(\frac{2}{3})^3$ として、D、G、Cを作り、一転戻って、Aから高音側に1つ、 $(\frac{3}{2})$ して、Eを作る手順と見る。すると、Cから高い方へ合計、C、G、D、A、Eの5音（ヨナ抜き音階）が定まる（表16）。実際に、ピタゴラスの音階は、このような手順で作られたと言われる。

また、純正律から見ても、この表16の音階は、A系から始めるので、表10のように、オクターブ内のDA間の音程は、完全5度音程： $DA = \frac{3}{2}$ が保証される。Cから始めた純正律と見れば、オクターブ内のDA間音程は完全5度にならず： $DA = \frac{20}{27} \neq \frac{3}{2}$ 、表16とは異なる数値になる。表16は、ピタゴラス音

表 16. A 調に対するピタゴラス音律

| | | A 調 |
|---|---|-----|
| 4 | $(\frac{2}{3})^3 \cdot 2 = \frac{16}{27}$ | C |
| 3 | $(\frac{2}{3})^2 \cdot 2 = \frac{8}{9}$ | G |
| 2 | $(\frac{2}{3})$ | D |
| 1 | 1.0 | A |
| 5 | $(\frac{3}{2})$ | E |

律としては、見た目は、Cから始めても、Aから始めても同じになるが、オクターブ内のDA音程が完全5度である要請から、Cからではなく、Aから始まる純正律が選ばれる。

この表16で、Aから始めて、低音に2つ、高音に1つ音階を取れば（4弦）、高音から、E,A,D,Gとなり、まさにこれが、ヴァイオリンの調弦音とチューニング手順そのものになる。また、Aから始めて、すべて低音側に3つとれば（4弦）、高音から、A,D,G,Cとなる。これはまさにビオラの調弦方法となる。Aから始める純正律の自然短音階の300年の歴史が、完全5度調弦（低い方からG,D,A,E）のヴァイオリン系の調弦として、その名残りが残っている。逆に言うと、300年前に完成形となったヴァイオリンは、Aから始まる純正律そのものに、楽器をチューニングしているわけである。したがって、まず、道理として、A音のピッチを合わせるのである。

また、表板には、ネックに平行な柁目の板を使う。木目間隔も揃っている方がよい。表板を伝わる振動速度は、木目に平行な速さが、垂直方向に比べほぼ2倍である。したがって、振動が周辺まで同時に伝わるには、表板の長さの比が、2:1がよい。製造する過程で、経験的に探り出した、表板の形状に対する結論であったと考えられている⁹⁾。

まとめ

17世紀から18世紀に完成したヴァイオリン系楽器は、当時の、DA間音程が完全5度となる、Aから始まる純正律の自然短音階を正確に反映し、その名残りを現在も、各調弦音とそのチューニング手順に歴史を残している。したがって、A音からピッチをチューニングする必然がある。ヴァイオリンをA音からチューニングする根拠は、次の理由による。

ヴァイオリンのチューニング＝

Aをピッチとする純正律の自然短音階

謝辞

物理学実験I「音速の測定」の発案者である、二階堂誠也教授（神奈川大学）には、退任後、わざわざ

大学まで来ていただいて、貴重なご意見をいただきました。ここに感謝いたします。

文献

- 1) 伊藤 乾 (2010) 物理の響き こころのひびき#トー音楽への認知的アプローチ 第16回新しい「協和構造」を出すーピタゴラスとメルセンヌの交錯. *科学* **80** (4). 岩波書店, 東京.
- 2) 小方 厚 (2007) *音律と音階の科学*ブルーボックス (B-1567). 講談社, 東京.
- 3) 大橋 力 (2011) 第22回音楽のなかの有限と無限(1) *科学* **81** (7). 岩波書店, 東京.
- 4) 伊藤 乾 (2010) 物理の響き こころのひびき#ト 第15回タルティーニと「響きの衝突」 *科学* **80** (3). 岩波書店, 東京.
- 5) Red Mitchell (1994) *Cats of any color : jazz, black and white genelees* 「The return of red mitchell」. *Oxford Univ Pr (txt)* : 143-166. England.
- 6) チャールズ・テイラー (1998) 佐竹 淳, 林 大 訳 *音の不思議をさぐる*. 大月書店, 東京都.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

IV 族半導体量子ドットの基盤研究

水野智久^{1,2} 青木 孝¹

Experimental Study of Group-IV Semiconductor Quantum Dots

Tomohisa Mizuno^{1,2} and Takashi Aoki¹

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: mizuno@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We experimentally studied three types of group-IV-semiconductor quantum-dots (IV-QDs) of Si⁻, SiC⁻, and C-QDs in a thermal SiO₂ layer that were fabricated using a very simple hot-ion implantation technique for Si⁺, double Si⁺/C⁺, and C⁺ into the SiO₂ layer, respectively, to realize a different wavelength photoluminescence (PL) emission from near-IR to near-UV ranges. TEM analyses newly confirmed both Si⁻ and C-QDs with a diameter of approximately 2-4 nm in addition to SiC-QDs in SiO₂. We successfully demonstrated very strong PL emission from three IV-QDs, and the peak photon energies (E_{PH}) (peak PL-wavelength) of Si⁻, SiC⁻, C-QDs were approximately 1.56 eV (800 nm), 2.5 eV (500 nm), and 3.3 eV (380 nm), respectively. IV-QDs showed that the PL properties markedly depend on the hot-ion doses of Si and C atoms and post N₂ annealing processes. Consequently, it is straightforward to design peak PL wavelengths by controlling the ion doses of Si⁺ and C⁺ implanted into the SiO₂ layer.

Keywords: IV-group-semiconductor, quantum-dot, Si, SiC, C, photoluminescence, Si-based photonics, quantum confinement, hot-ion implantation, oxide

序論

2次元 Si (2D-Si) 構造は、極微細 SOI (silicon-on-insulator)、FinFET¹⁾ などの CMOS (complementary metal-oxide-semiconductor) 素子、及び Si 光子素子²⁾ に広く応用されている。SOI 素子においては、Si 膜厚 $d_s = L_{EFF}/3$ (L_{EFF} は素子のチャネル長) に従って薄膜化するだけで短チャネル効果を抑制でき、その結果、SOI 素子は将来素子としても非常に有望と言われている¹⁾。しかし、 d_s の薄膜化を続けると Si 格子定数程度まで薄膜化が進み、SOI は 2D-Si 構造となり、現在の 3D-Si とは物性が異なってくる³⁻¹⁰⁾。従って、将来素子の特性を予測するには、2D-Si 構造の物性を解明する必要がある。また、高速 CMOS 素子実現には、(110) 面 CMOS や歪み Si 構造などの研究も進められている¹⁾。

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

一方、低次元 Si 構造 (Si ナノワイヤー、Si ドットなど) においては、量子的な閉じ込め効果による第一次近似以外のフォノンも活性化される⁵⁾。これがフォノン閉じ込め効果である。その結果、半導体素子におけるキャリアのフォノン散乱確率が増えキャリア速度の劣化も予想されている⁵⁾。

以上のように、2D-Si を含めた低次元 Si 研究は、微細素子実現のための実用的な目的のみならず、種々の量子的閉じ込め効果の実証という物性研究にとっても非常に重要である。我々は、2D 化による間接遷移型から直接遷移型への変調効果による PL (Photoluminescence) 発光を利用して、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 EG 増大効果を実験的に実証してきた⁶⁻¹⁴⁾。

しかし、この PL 発光を利用した可視域から近紫外までの発光素子を目指すには、更なる半導体の E_G の増大が必須である。そこで、単結晶 Si (c-Si) からアモルファス Si (a-Si) までの基板に C ホットイ

オン注入法を用いて SiC ドットを作製し、その大きな PL 発光を実証してきた¹⁵⁻²²⁾。しかし、 E_G の小さい Si 層 ($E_G \approx 1.1$ eV) 中の大きな E_G を持つ SiC ドット ($E_G \geq 2.4$ eV) は量子ドットではないため、励起電子の量子閉じ込め効果による寿命増大が期待できず PL 発光効率低下の原因となる。従って、 E_G の大きな Si 酸化膜 ($E_G \approx 9$ eV) へのダブルホット Si^+/C^+ により SiC 量子ドット (QD) を実現し、その励起電子の閉じ込め効果による PL 発光効率の増大化を実現してきた²³⁻²⁴⁾。QD からの広帯域の PL 発光を実現するには、SiC-QD 以外の E_G を持つ QD の形成が必要となる。

本報告においては、Si 酸化膜への各種ホットイオン注入を行い、Si-QD から C-QD までの IV 族半導体 QD (IV-QD) 作成し、高帯域 PL 発光を実現したので報告する²⁵⁻²⁶⁾。

材料と方法

IV-QD 形成法

本研究において、IV 族半導体の E_G より大きい Si 酸化膜中での IV-QD 形成を目指した。IV-QD での PL 発光時に、励起電子の大きな量子閉じ込め効果により、励起電子の拡散を抑制しその寿命の増大化が起これり、PL 発光効率の改善が期待できる。

図 1 と表 1 に三種の IV-QD (Si-QD、SiC-QD、C-QD) 作製法とそのプロセス条件を示す。Si 基板に形成した熱酸化膜層 (OX) (約 150 nm) (図 1(a)) へのホットイオン注入法 (図 1(b)、表 1) により、IV-QD の形成を行った²⁵⁾。その後、図 1(c) に示すように、IV-QD 形成促進とイオン注入後の結晶性回復のため、 N_2 アニールを行った (アニール温度 $T_N = 1000^\circ\text{C}$)。ホットイオン注入温度 T 、及び Si ドーズ量 D_S 、C ドーズ量 D_C は表 1 に示す。

PL 特性は波長 325 nm レーザー光を用いて室温で測定した。レーザービーム径は $1 \mu\text{m}$ 、レーザーパワーは約 0.6 mW である。更に、広帯域 PL 発光強度は、標準光により補正を行った。

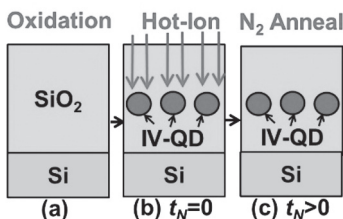


図 1. OX へのホットイオン注入法を用いた IV-QD の製造方法。

表 1. IV-QD のプロセス条件

| QD-Type | Hot-ions | D_S ($\times 10^{16}\text{cm}^{-2}$) | D_C ($\times 10^{16}\text{cm}^{-2}$) | T ($^\circ\text{C}$) |
|---------|--------------------------|--|--|--------------------------|
| Si | Si^+ | 6–10 | | 600 |
| SiC | Si^+/C^+ | 4–8 | 4 | 200–900 |
| C | C^+ | | 4–10 | 400–600 |

結果及び討論

IV-QD の構造解析

最初に、XPS (X 線光電子分光) 解析による酸化膜中の Si 及び C 濃度深さ分布を図 2 に示す。予想通り、Si 及び C 濃度は酸化膜中央付近にピークを持ち、本

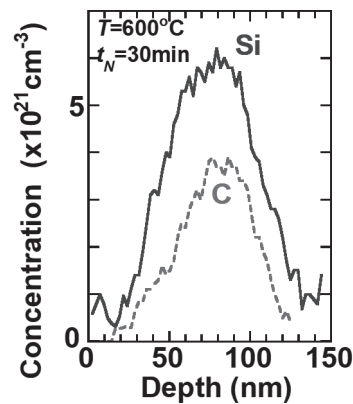


図 2. XPS 分析による酸化膜中 Si (実線), 及び C 濃度 (破線) の深さ分布. なお $T = 600^\circ\text{C}$, $T_N = 1000^\circ\text{C}$, $D_S = 6 \times 10^{16} \text{cm}^{-2}$, $D_C = 4 \times 10^{16} \text{cm}^{-2}$, $t_N = 30$ 分.

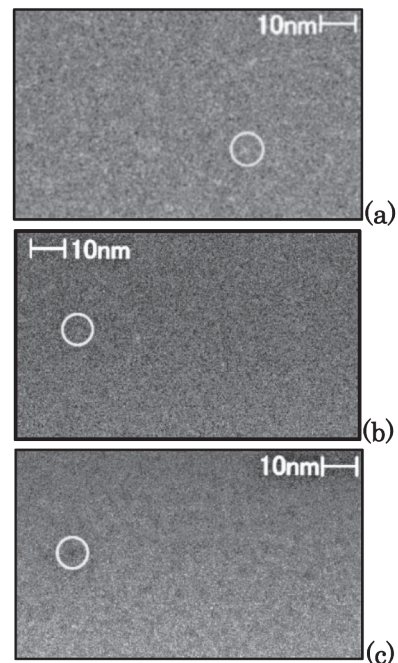


図 3. HAADF-STEM による OX 中 (a)Si-QD ($D_S = 6 \times 10^{16} \text{cm}^{-2}$, $T = 400^\circ\text{C}$, $t_N = 60$ 分) (b) SiC-QD ($T = 400^\circ\text{C}$, $D_S = 6 \times 10^{16} \text{cm}^{-2}$, $D_C = 4 \times 10^{16} \text{cm}^{-2}$, $t_N = 60$ 分), 及び (c) C-QD ($T = 400^\circ\text{C}$, $D_C = 4 \times 10^{16} \text{cm}^{-2}$, $t_N = 30$ 分) 断面図. なお, $t_N = 30$ 分.

実験においてはそれぞれ約 $6\cdot 10 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ 及び $4\cdot 10 \times 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ の範囲であった。また、SiC-QD においては、C1s スペクトルより、C 原子の約 80 %は Si 原子と結合し、SiC 形成を確認できた。C 原子の残りの 20 %は酸化膜中で析出していることが判明した。

次に、図 3(a)-3(c) は、それぞれ Si-QD、SiC-QD 及び C-QD の HAADF-STEM (高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡) 観察結果である。図 3(a)-3 (b) 中の多数ある白色のドット及び図 3(c) の黒色ドットがそれぞれの QD である。

図 3 の結果から IV-QD の長径の平均値 Φ 及び密度 N を図 4(a) に示す。 Φ 及び N のエラーバーは、それぞれ、 Φ の測定標準偏差及び観測視野中のドット個数 n の統計的バラツキ N/\sqrt{n} より求めた²⁵⁾。 Φ は約 2-4 nm、 N は約 $2 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ であり、IV-QD の種類に依存している。 Φ は Si-QD が一番小さく、反対に N は Si-QD は一番大きいのがわかる。ここで、PL 強度 I_{PL} は式(1)のように、視野中の IV-QD トータル面積比 S に比例する²⁵⁾。 η 及び I_0 は、それぞれ PL 量子効率及び入射光強度である。

$$I_{PL} = \eta I_0 S, \quad (1)$$

図 4(a) のデータを使用し $S (\equiv N\pi(\Phi/2)^2)$ を求め、その結果を図 4(b) に示す。 S は $0.1 \leq S < 0.25$ であることがわかり、しかも IV-QD の種類に依存している。

図 5 は CSTEM (球面収差補正走査透過型電子顕微鏡) 観察による IV-QD 格子像である。全ての IV-QD において格子像が観測され、数 nm の半導体ドットが形成されているのが確認された。しかも、格子パターンにより、SiC-QD では立方晶と六方晶のポリタイプを確認し、C-QD の格子スペース値 0.36 nm からグラファイト構造の可能性もわかってきている。

IV-QD からの PL 発光

次に、IV-QD からの PL 発光について議論する。

図 6 は、三種の IV-QD の PL スペクトルである。全ての IV-QD からの近赤外から近紫外までの高帯域 PL 発光を実現することができた。しかも、Si、SiC、及び C-QD のピーク $I_{PL} (I_{MAX})$ での光子エネルギー値 E_{PH} は、それぞれ約 1.5、2.4、及び 3.3

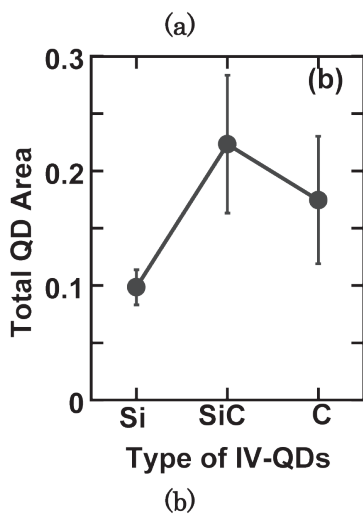
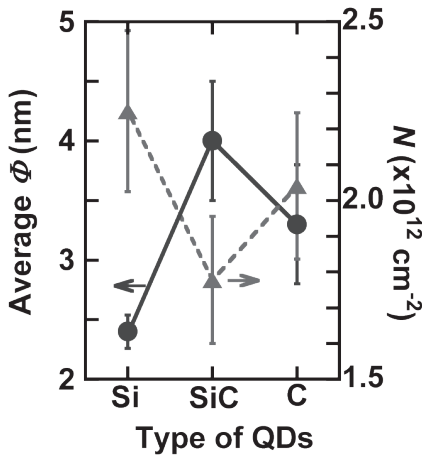


図 4. (a)IV-QD における平均 Φ (丸印) 及び N (四角印). (b)IV-QD でのトータル面積. プロセス条件は図 3 に同じ. 誤差棒はそれぞれの標準偏差である.

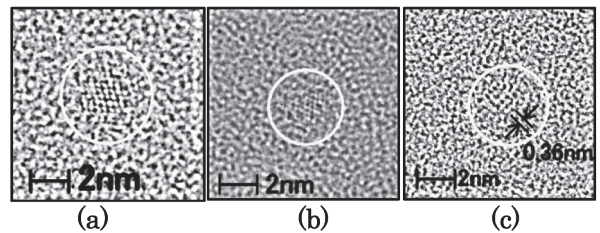


図 5. CSTEM による IV-QD の格子像. (a) Si-QD、(b)SiC-QD、(c)C-QD. プロセス条件は図 3 に同じ.

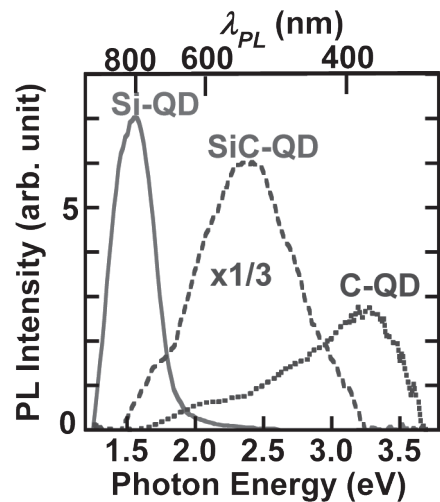


図 6. 三種の IV-QD の PL スペクトル比較. Si-QD (実線: $t_N = 90$ 分), SiC-QD (破線: $T = 200^\circ\text{C}$, $t_N = 30$ 分), C-QD (点線: $T = 600^\circ\text{C}$, $t_N = 30$ 分). イオンドーズは図 3 に同じ.

eVとなり、各半導体の E_G により制御されている。Si-QDでは、電子の量子閉じ込め効果による $E_G \propto \Phi^{-2}$ に従いQDの微細化とともに E_G は増大し、 $\Phi \approx 3$ nmで $E_G \approx 1.5$ eVと報告されている結果²⁷⁾と本研究での $\Phi \approx 2.5$ nmで $E_{PH} \approx 1.5$ eVはほぼ一致し、量子効果による E_G は増大効果を確認した。一方、SiC-QDにおいては、量子効果による E_G の増大は $\Phi < 3$ nmの条件のため²⁸⁾、本SiC-QDの $\Phi \approx 4$ nmでは E_G の増大はないと考えられる。

更に、図7はIV-QDのPLスペクトルの N_2 アニール時間 t_N 依存性である。 I_{PL} は N_2 アニール後、全

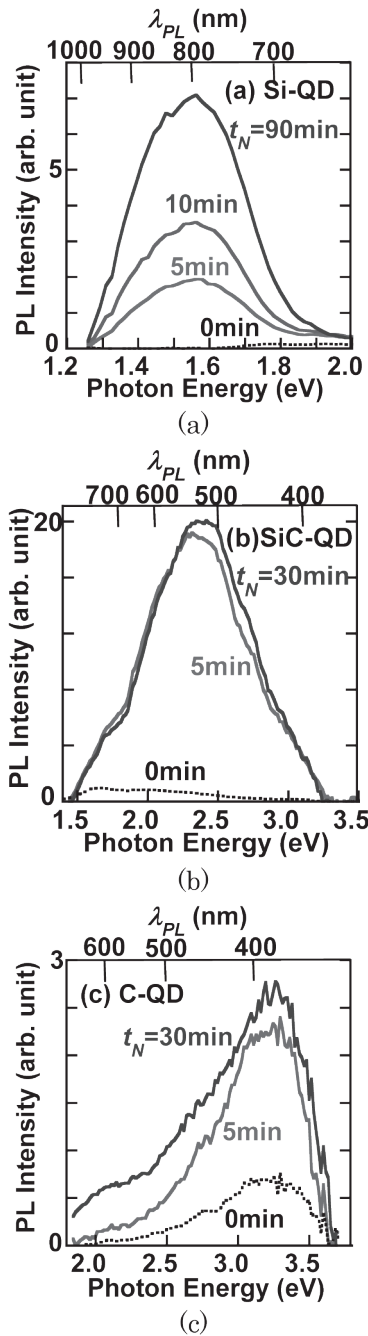


図7. IV-QDにおけるPLスペクトルの t_N 依存性. (a) Si-QD, (b) SiC-QD, (c) C-QD. プロセス条件は図6に同じ.

てのIV-QDにおいて飛躍的に増大しているのがわかる。

更に、図8(a)及び8(b)は、それぞれ I_{MAX} 及び E_{PH} の t_N 依存性である。どのIV-QDも $t_N = 5$ 分で飛躍的に I_{MAX} は増大し数十倍に達する。これは、QDの結晶性の向上によると思われる。一方、 E_{PH} の t_N 依

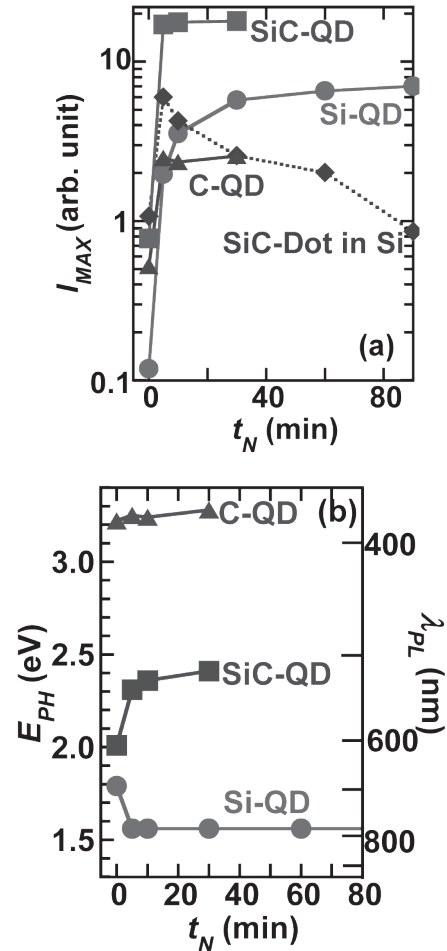


図8. (a) I_{MAX} , 及び(b) E_{PH} の t_N 依存性. Si-QD (丸), SiC-QD (四角), (c) C-QD (三角). プロセス条件は図6に同じ.

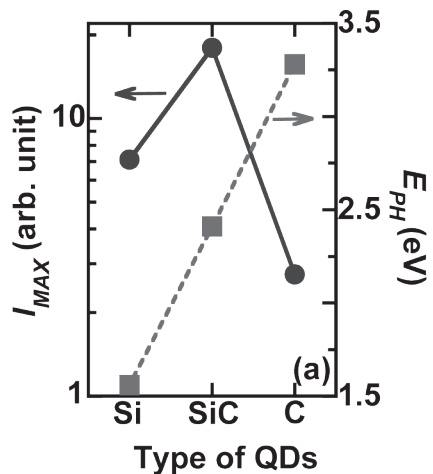


図9. I_{MAX} (●), 及び E_{PH} (■)のIV-QD構造依存性.

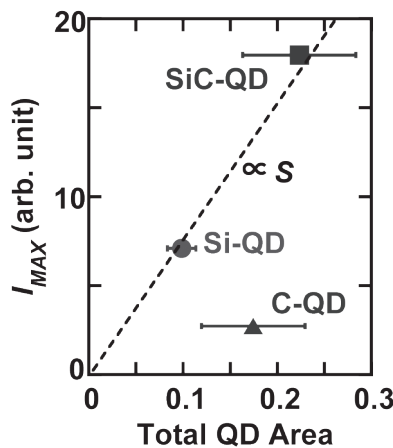
存性はIV-QD種類により異なる。Si-QDでは、N₂アニール後、急激に低下しており、高温N₂アニールによるΦの増加に起因していると思われる。また、SiC-QDではN₂アニール前後で E_{PH} は約2 eVから2.4 eVに増大している。これは、N₂アニール後、Si-Cの混晶状態が3C-SiC形成に変化したためと思われる²⁶⁾。

図9での I_{MAX} 、及び E_{PH} のIV-QD構造依存性を示すように、PL特性は大きく構造に依存している。 I_{MAX} はSiC-QDが一番大きく、 E_{PH} は各半導体の E_G に依存して大きく変わることがわかる。

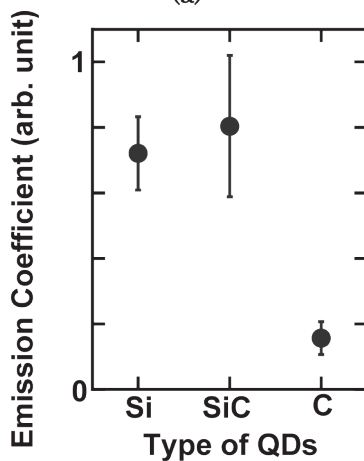
IV-QDのPL発光効率

式(1)に従って、IV-QDの発光効率 η の構造依存性を議論する。

図10(a)は I_{MAX} の S (図4(b))依存性である。Si-QDとSiC-QDにおいては、式(1)に示すように、 I_{MAX} は同じ S 依存性(破線)を示している。その結果、Si-QDとSiC-QDでの I_{MAX} の違いは各 S の違い



(a)



(b)

図10. (a) I_{MAX} の S (式(1))依存性。(b) IV-QDにおける η . プロセス条件は図6に同じ。

によって説明でき、従って、 η は両構造とも同じと結論できる。一方、C-QDの I_{MAX} は破線から大きくずれ、 η が小さいことを示している。図10(b)に式(1)より求めた各IV-QDの η を示す。C-QDの η は他の2構造の約1/4しかないことがわかった。この原因の詳細はわかっていないが、C-QDの結晶性に問題がある可能性がある。

結論

Si酸化膜中への各種ホットイオン注入法を用いてIV-QDの形成に成功し、大きなPL発光も実現した。

Si-QD、SiC-QD、及びC-QDは、それぞれ、ホットSi、Si/C、およびCイオン注入により作製し、STEM観察により $\Phi \approx 2-4$ nm、 $N \approx 2 \times 10^{12}$ cm⁻²であることがわかった。さらにCSTEMにより、QDの格子像も観察でき、結晶性も確認できた。

IV-QDからのPL発光は近赤外から近紫外までの高帯域をカバーできた。各QD半導体により大きくピークPL波長は変化し、Si-QD、SiC-QD、及びC-QDのピーク波長は、それぞれ、約830 nm(近赤外)、520 nm(緑色)、及び380 nm(近紫外)であった。

$\Phi \approx 2.5$ nmのSi-QDの場合、QD内の電子の量子閉じ込め効果による E_G 増大効果がPL発光より確認できた。

また、Si-QDとSiC-QDのPL発光効率はほぼ同じであったが、C-QDの η は、前者の約1/4であった。

今後、IV-QDの発光素子への応用には、その結晶性の向上、Φの微細化、Nの増大化が必要となる。

謝辞

本研究の一部は、総合理学研究所共同研究助成金(RIIS202101)の援助を受けた。

文献

- 1) Nazarov A, Colinge JP, Balestra F, Raskin JP, Gamiz F and Lysenko VS (2011) *Semiconductor-on-insulator materials for nanoelectronics applications*. Springer, Berlin.
- 2) Saito S, Sakuma N, Suwa Y, Arimoto H, Hisamoto D, Uchiyama H, Yamamoto J, Sakamizu T, Mine T, Kimura S, Sugawara T, Aoki M and Onai T (2008) Observation of optical gain in ultra-thin silicon resonant cavity light-emitting diode. 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. In: *J. Appl. Phys.* **102**: 074510 pp.1-8.
- 4) Agrawal BK and Agrawal S (2000) First-principles study of one-dimensional quantum-confined H-passivated ultrathin Si films. In: *Appl. Phys. Lett.* **77**: pp. 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. In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**: 02BC03 pp.1-8.
- 7) Mizuno T, Aoki T, Nagata Y, Nakahara Y and Sameshima T (2013) Experimental study on surface-orientation/strain dependence of phonon confinement effects and band structure modulation in two-dimensional Si layers. In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **52**: 04CC13 pp.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. In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**: 04EC08 pp.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, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**: 04EC09 pp.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, In: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **54**: 04DC05 pp.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, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**: 04DC02 pp.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, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**: 04EB02 pp.1-8.
- 16) 水野智久, 前田辰郎, 青木 孝, 鮫島俊之 (2016) 可視域シリコン発光素子の開発, *神奈川大学理学誌* **27**: 15-21.
- 17) Mizuno T, Omata Y, Nagamine Y, Aoki T and Sameshima T (2017) Material structure of two-/three-dimensional Si-C layers fabricated by hot-C⁺-ion implantation into Si-on-insulator substrate, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**: 04CB03 pp.1-8.
- 18) Mizuno T, Nakada S, Yamamoto M, Irie S, Omata Y, Aoki T and Sameshima T (2017) SiC nano-dots in bulk-Si substrate fabricated by Hot-C⁺-Ion implantation technique, In: *Ext. Abstr. Solid State Devices and Materials*, pp.597-598.
- 19) Mizuno T, Omata Y, Kanazawa R, Iguchi Y, Nakada S, Aoki T and Sasaki T (2018) Nano-SiC region formation in (100)Si-on-insulator substrate: optimization of hot-C⁺-ion implantation process to improve photoluminescence intensity, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**: 04FB03 pp.1-9.
- 20) Mizuno T, Kanazawa R, Aoki T and Sameshima T (2019) SiC nano-dot formation in amorphous-Si and poly-Si substrates using hot-C⁺-ion implantation technique, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **58**: SBBJ01 pp.1-10.
- 21) Mizuno T, Yamamoto M, Nakata S, Irie S, Aoki T and Sameshima T (2019) SiC nano-dot formation in bulk-Si substrate using hot-C⁺-ion implantation process, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **58**: 081004 pp.1-12.
- 22) Mizuno T, Aoki T and Sameshima T (2022) Si surface-orientation dependence of SiC-dot formation in bulk-Si substrate using hot-C⁺-ion implantation technique, In: *J. Appl. Phys.* **131**: 074301 pp.1-13.
- 23) Mizuno T, Kanazawa R, Aoki T and Sameshima T (2020) SiC quantum dot formation in SiO₂ layer using double Hot-Si⁺/C⁺-Ion implantation technique, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**: SGGH-02 pp.1-12.
- 24) 水野智久, 鮫島俊之, 青木 孝 (2020) 低次元シリコンカーバイドのSi結晶構造依存性, *神奈川大学理学誌* **31**: 33-39.
- 25) Mizuno T, Kanazawa R, Yamamoto K, Murakawa K, Yoshimizu K, Tanaka M, Aoki T and Sameshima T (2021) Group-IV-semiconductor quantum-dots in thermal SiO₂ layer fabricated by hot-ion implantation technique: different wavelength photon emissions, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **60**: SBBK08 pp.1-11.
- 26) Mizuno T, Murakawa K, Yoshimizu K, Aoki T and Sameshima T (2022) Physical mechanism for photon emissions from group-IV-semiconductor quantum-dots in quartz-glass and thermal-oxide layers, In: *Jpn. J. Appl. Phys.* **61**: SC1014 pp.1-10.
- 27) Binns C, Bakar S.H, Louch S, Sirotti F, Cruguel H, Prieto P, Thornton S.C and Bellier JD (2003) Building high-performance magnetic materials out of gas-phase nanoclusters, In: *Appl. Surf. Sci.* **226**: pp. 249-260.
- 28) Fan J and Chu P.K (2014) Silicon carbide nanostructure, springer, *cham*, Chap. 4.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

イオンビーム誘起結晶成長 (IBIEC, Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization) 法によるダイヤモンド半導体へのイオン注入 n 型ドーパントの電気的活性化の可能性

中田穰治^{1,2} 関 裕平¹ 星野 靖¹

Possibility of Electrical Activation of Ion-Implanted n-type Dopants into Diamond Semiconductor Substrates Using IBIEC (Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization) Technologies

Jyoji Nakata^{1,2}, Yuhei Seki¹ and Yasushi Hoshino¹

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: nakatj01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We already reported previously that we succeeded in obtaining excellent electrical properties of B-implanted type-IIa chemical-vapor-deposition (CVD) diamond substrates under conditions for room-temperature (RT) B implantation followed by relatively low-temperature annealing of 1150°C ~ 1300°C. The doping efficiency markedly progressed to 78% and the Hall mobility at RT was 108 cm²/(V · sec) for the RT-implanted sample followed by annealing at 1300 °C. We consequently confirmed *p*-type conductivity and typical ionization energy of acceptor B using a wide temperature range. Furthermore, we have succeeded in fabricating a Schottky barrier diode using the all-ion-implantation process of B-ion-implanted into self-standing CVD diamond substrate. We have also succeeded in achieving extremely high-efficient B ion implantation doping efficiency of around 100% using high-quality CVD film with a 5 μm thickness deposited on the high-pressure high-temperature (HPHT) type-Ib diamond substrate. Thus, B doping implantation into diamond semiconductors along with *p*-type electrical activation is now a reality for diamond device fabrication.

This time, we report that *n*-type conductivity has been achieved for the P-implanted CVD diamond film annealed by MeV ion beam irradiation technologies at the comparatively low temperature of 750°C. After 140-keV P implantation for a 2 × 10¹⁴/cm² dose and successive 50-keV P implantation for a 1 × 10¹⁴/cm² dose at RT, 3-MeV Ne²⁺ irradiation for a 1 × 10¹⁶/cm² dose at 750°C was performed. The dependence of sheet resistivity upon the reciprocal absolute temperature showed two activation energies of ~1.2 eV and ~0.4 eV, using Hall effect measurement methods. In the temperature range from 300 °C to 700 °C, sheet resistivity exhibited ~1.2 eV activation energy. We also observed clear *n*-type conductivities at within the temperature range. However, in the temperature range from 100°C to 300°C, exhibiting ~0.4 eV activation energy, *n*-type conductivities could not be entirely observed. We qualitatively discussed these *p*-*n* judgement results. Eventually, after Hall effect measurement had been completed, we performed SIMS measurement to investigate profiles of impurity elements contained in the CVD films. We found not only implanted P atoms, but also N atoms that had been unintentionally present during CVD film deposition. These facts will be published elsewhere. That is, the CVD film had double donor states. We discussed possibilities of electrical activation for implanted P atoms being introduced into substitutional sites. Atomistic models of dynamic movement for implanted P and surrounding C atoms were proposed. These models showed that implanted P atoms could

be introduced into substitutional sites during MeV-IBIEC annealing irradiations. We also discussed defects annealing mechanism using MeV-IBIEC technologies, based on basic atomistic models.

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

序論

現代社会は電力によって成り立っている。スマートフォンをはじめ、テレビや冷蔵庫といった家電、車や電車、飛行機などの輸送機器など、身の回りの多くの製品が電力によって動作している。しかし、電力に頼りすぎた結果、地球温暖化などの環境問題や、石油や天然ガスの枯渇といったエネルギー問題が取り上げられ、省エネが叫ばれるようになっていく。そこで注目されているのが、パワーエレクトロニクスである。パワーエレクトロニクスとは、主に電力変換や制御、輸送、供給などに関わる技術であり、近年の高密度記録、エンジン制御、移動体通信等の技術進歩に伴い、盛んに研究が続けられている。パワーエレクトロニクスのシステム構築に大きな役割を果たしているのが、半導体パワー電子デバイスである。この電子デバイスの基板として今まで Si が用いられてきた。しかし、Si そのものの性能限界が近づいてきており、Si パワー電子デバイスのさらなる改良は困難であると考えられている。そこで、新たな半導体素材としてワイドギャップ半導体が目ざされている。ワイドギャップ半導体とは、Si よりもバンドギャップが大きい半導体の総称である。主なワイドギャップ半導体には、SiC や GaN、ダイヤモンドが挙げられる (図 1)。特にダイヤモンドは、広いバンドギャップ、高熱伝導率、高い絶縁破壊電界、高キャリア移動度など、ワイドギャップ半導体の中でも多くの優秀な物性を持っているため、次世代型パワー電子デバイス素材として期待されているが、実用化への課題が多いのが現状である。ダイヤ

モンド半導体実用化への課題の 1 つに、不純物導入がある。半導体内に不純物を導入する方法は、CVD (Chemical Vapor Deposition) 法で成膜中に不純物ガスを混合してプラズマを形成するか、イオン注入法で基板内に直接イオンを打ち込むかの二通りがある。CVD 法では、 PH_3 (ホスフィン) を不純物ガスとして導入して作製した n 型ダイヤモンド半導体が、ホール効果測定より n 型伝導が確認されている¹⁾。しかし、CVD 法では素子の微細化や複雑な導入層の形成、不純物濃度の調節が難しい。一方、イオン注入では、注入による結晶欠陥や導入した不純物の電気的活性化が難しいといったことから、n 型伝導の報告はされていない。しかし、注入領域や注入量の制御がしやすい、不純物がガスでなくても注入可能なので、ダイヤモンド半導体の実用化には必要不可欠な技術である。課題である注入欠陥の低減や導入した不純物の活性化には、高温イオン注入やポストアニール処理が有効であると考えられている。

しかし我々は既にダイヤモンド基板構成原子である C 原子とほぼ同様な原子半径を持つ B イオン注入において、基板温度を室温に保ったイオン注入と電気炉による通常の熱処理、しかも熱処理温度が $1150^\circ\text{C} \sim 1300^\circ\text{C}$ の比較的低温の熱処理により非常に良好な結果を得ている²⁻⁵⁾。これらの結果は B 注入量と注入エネルギー、ポストアニールにおける熱処理温度を最適化した結果であるが、イオン注入で形成される欠陥がどの程度ダイヤモンド基板に導入されるのかを予め TRIM2013 計算コードにより把握しておく必要がある。結果を図 2 に示す⁶⁾。

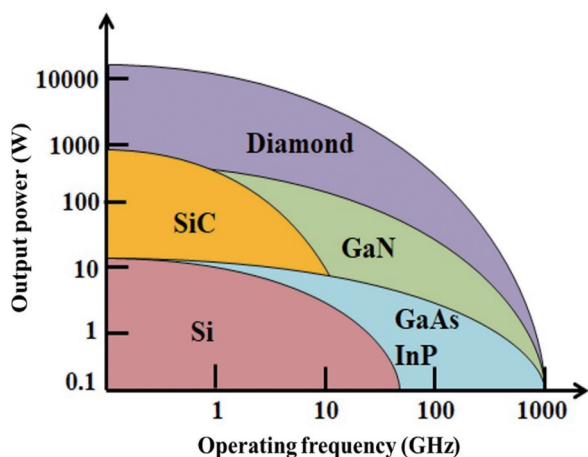


図 1. 各種半導体の動作特性比較。

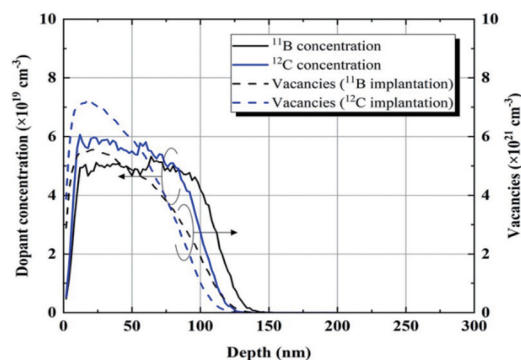


図 2. ^{11}B 元素を多重注入あるいは ^{12}C 元素を多重注入して得られた各元素の深さ方向分布と多重注入によって導入された空格子点深さ方向分布の計算値。

この図からダイヤモンドへの¹¹B注入の場合、形成される空格子点濃度の平均値が $\sim 5 \times 10^{21}/\text{cm}^3$ 程度で、上記に記した良好な電気特性結果が得られていることが判明した。この程度の欠陥を導入することで比較的低温の通常熱処理によりBが効率的に置換位置に導入されたのである。同様にC原子と同程度の原子半径を持つN原子についても、Bの時と同程度の欠陥(vacancy)を導入すればポストアニールで効率的に置換位置に導入される可能性がある。しかし、V族元素であるn型ドーパントN原子に関しては、そのドナーエネルギー準位が伝導帯下端から1.4~1.7 eVと非常に深く室温からの半導体動作を期待できない。P, As, Sb等の元素に関してはNと比較してドナー準位は浅くなるが、その原子半径の大きさから通常の熱処理ではイオン注入したドーパント元素を置換位置に導入することは極めて困難であり、現在まで50年以上イオン注入したn型ドーパントの電氣的活性化が成功した例はない。

このような状況の中で我々の最終目的は、高品質ダイヤモンド基板にイオン注入と通常の電気炉によるポストアニール、更に工夫した新しいアニール方法によりダイヤモンド基板に導入したn型不純物の電氣的活性化を達成することである。もしイオン注入によるダイヤモンド半導体のn型ドーパントが電氣的に高効率に達成できれば世の中を変えてしまうような非常に大きなインパクトが期待できる。

材料と方法

序論で述べたBイオン注入の結果はB注入量と注入エネルギー、ポストアニールにおける熱処理温度を最適化した結果であるが、イオン注入で形成される欠陥がどの程度基板に導入されているかを予めSRIM2013計算コードにより把握しておく必要がある。図3は二重したPの濃度と欠陥分布(空格子点或いは格子間原子の深さ方向分布)の計算値である。HPHT(High-Pressure High-Temperature、高圧高温合成)Ib基板上に0.13~0.18 μm 厚さの薄膜をCVDでエピタキシャル成長させた。薄膜中にPイオンを次節(1)、(2)の条件下で室温注入した。その後MeVのSi或いはsub-MeVエネルギーのNeを照射してアニール処理した。以下の(1)、(2)節にイオン注入したP及びIBIECに使用したSi、Neの各種計算結果を示す。

ダイヤモンドCVD膜へのPイオン注入

SRIM計算における二重P注入と多重P注入のエネルギーとドーズ量条件は下記の通りである。

1) 二重注入条件

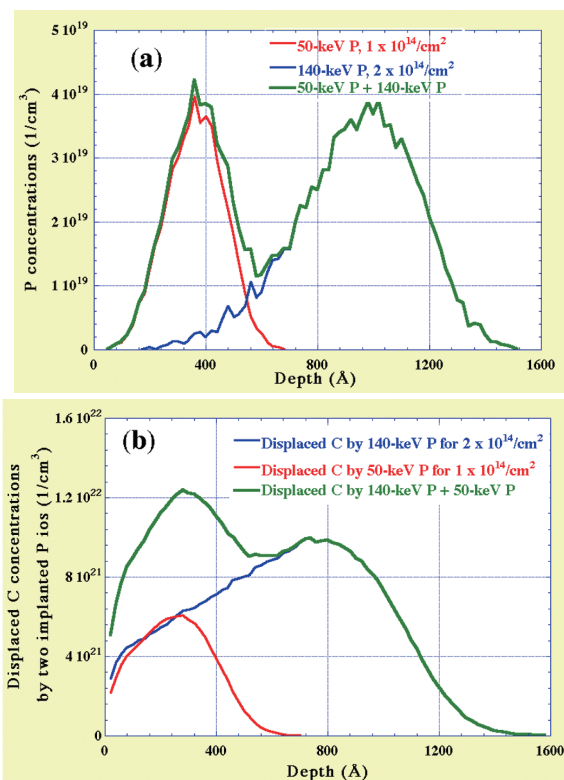


図3. (a): 二重注入したPの絶対値体積濃度の深さ方向分布. (b): Pイオン注入により変位したC原子の深さ方向分布. この分布は注入直後に形成されている空格子点分布とほぼ同じである.

140 keV $2 \times 10^{14}/\text{cm}^2 + 50 \text{ keV } 1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$

この条件でSRIM2013 code⁶⁾で注入Pの分布を計算した結果を図3に示す。(a)の図は二重イオン注入したPの各注入エネルギー50-keV、140-keVの絶対値濃度分布(赤線と青線)と両者を加算した(緑線)合計のP分布を示した図である。はっきりと2つのピークに分かれている。(b)の図は変位した母材C原子の分布から入れ代わり衝突(replacement collision)を起こして空格子点に収まった変位したC分布を差し引いた分布で、格子間原子分布であるが、これはほぼ空格子点分布に一致した分布となる。(a)、(b)いずれの分布も各注入エネルギーにおけるピーク位置が分離されるため、上記SRIMコードでの計算値をSIMS等の分析結果と直接比較できる。しかし、この注入状態ではホール効果による電気測定をする場合、電流が流れる2重層が存在する可能性もあり、測定結果に対して、定量的な議論をする場合不確実な要素が入り込む可能性がある。そこで、試料表面から一様な伝導層を形成するためにフラットな分布になる多重注入も行なった。それが次に示した多重注入の計算結果である。この多重注入は試料中を流れる電子キャリアを1層の中に閉じ込めるためホール効果電気測定の結果を定量的に解釈する際にはその不確実性を減らし、電子キャリア体積密度の深さ

方向分布を精度良く算出できるメリットがある。そこで次に多重Pイオン注入による図3(a), (b)と同様なSRIM2013コードによる計算結果分布を示す。

2) 多重注入条件

200-keV $2.6 \times 10^{13}/\text{cm}^2$
 + 170 keV $2.3 \times 10^{13}/\text{cm}^2$
 + 140 keV $2.0 \times 10^{13}/\text{cm}^2$
 + 110 keV $1.7 \times 10^{13}/\text{cm}^2$
 + 80 keV $1.5 \times 10^{13}/\text{cm}^2$
 + 50-keV $1.0 \times 10^{13}/\text{cm}^2$

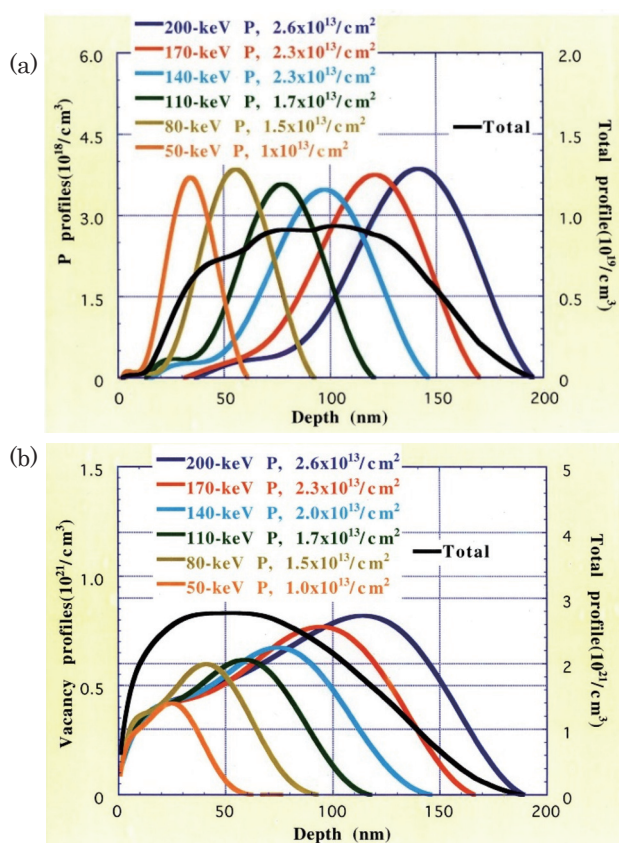


図4. (a): 多重注入したPの絶対値体積濃度の深さ方向分布.
 (b): 多重注入したPにより形成された基板中の空格子点密度の深さ方向分布.

(a)の図は多重イオン注入したPの各注入エネルギー50 keV ~ 200-keVの絶対値濃度分布とすべての分布を加算した(黒線)合計のP分布を示した図である。ほぼフラットな分布になっていることが明らかであり、ホール測定から分かる幾つかの電気測定結果も定量的な議論に耐えるデータを取得することが可能になる。即ち、この多重注入は試料中を流れる電子キャリアを1層の中に閉じ込めるためホール効果電気測定の結果を定量的に解釈する際にはその不確実性を減らし、電子キャリア体積密度の深さ方向分布を精度良く算出できるメリットがある。

(b)の図は縦軸が空格子点濃度であり、図3(b)とは異

なる。しかし、図3の説明の時にも言及したが、変位したC原子は一部形成された空格子点とreplaceされ、大部分は格子間原子として残る。この格子間原子は空格子点と近接しているために空格子点分布と格子間原子分布はその深さ方向分布はほぼ一致している。RBS測定においては注入後或いは熱処理後に最終的に残った格子間原子が観測されるのであって、空格子点分布は観測されない。即ち、基本的に結晶格子中に形成されている格子間原子の分布が観測される。これら注入直後或いは注入中に形成される格子間原子、或いは注入後の熱処理により形成される積層欠陥や転移のような2欠陥等に起因する格子間原子相当の欠陥分布をRBS-channeling法は観測するのである。

Pイオン注入ダイヤモンドCVD膜のIBIECによるアニール

アニール方法に関しては通常の電気炉による熱処理ではなく、条件1)の下でPを二重注入したCVD膜に3-MeV Ne^{2+} イオンを750°Cの真空中で $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 照射してアニールした。また、2)の条件下でPを多重注入した試料に対しては、4-MeV Si^{2+} イオンを660°Cの真空中で $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 照射してアニールした。この時、別の同一多重条件でPを注入した試料に対して750°Cで400-keV Ne^+ を $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 照射してアニールした。この後者の実験は400-keV (0.4-MeV) と4.0-MeVという照射エネルギーの差がIBIECアニール効果に対してどの程度の差異があるかを測定するために行なった。これらイオンビーム照射におけるアニール現象、或いは低温結晶化現象は従来から良く知られている⁷⁻²⁰⁾。特にその照射エネルギーがMeV級の時、MeV-IBIECと呼ばれる。ここでIBIECとはIon-Beam-Induced Epitaxial Crystallizationの略である。このIBIECアニールによる単結晶化効果はパターン化されたSOI構造形成にも、その横方向への結晶化増速現象を応用して特許にもなっている^{19, 20)}。

図5(a)にIBIECの各種イオンと照射エネルギーをパラメータとして形成される空格子点体積密度の深さ方向分布をのグラフを示す。照射エネルギーをパラメータ変数としている。この図には4-MeV Siの空格子点分布が含まれているので、CVDで堆積した表面から150 nm程度の深さについての空格子点分布の詳細が分かりにくい。なのでその領域を拡大したグラフを図5(b)に示す。この図5(b)にはIBIECイオンの電子的非弾性散乱効果による単位体積密度あたりのエネルギーロス分布も示している。この図5(b)から明らかであるがCVD薄膜中におい

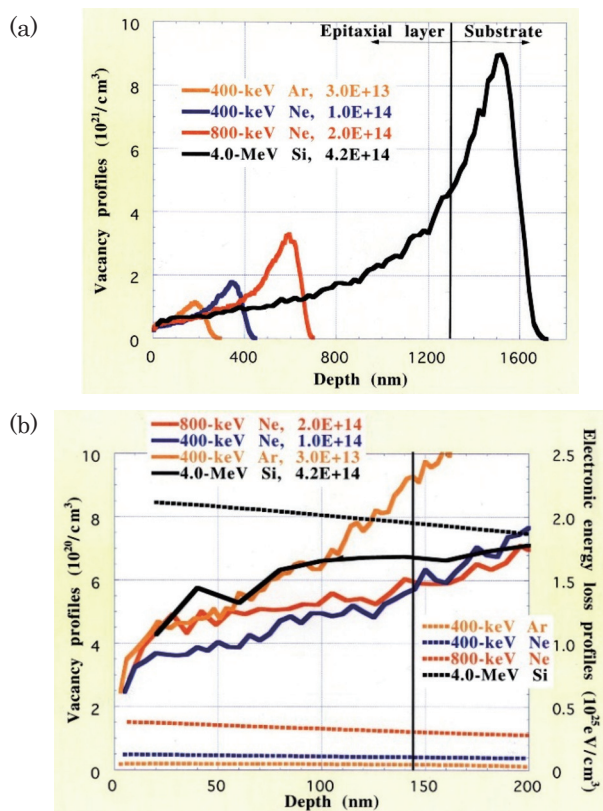


図5. (a): IBIEC アニールの利用候補となる各イオン種に対して、エネルギーと照射量をパラメータとして形成される空格子点体積密度の深さ方向分布. (b): 横軸を P が注入されている表面から 200 nm 厚さの浅い領域に限定し、縦軸方向のスケールも拡大した空格子点体積密度分布. 点線は電子的非弾性散乱による入射 IBIEC イオンの CVD 膜中の電子的非弾性散乱によるエネルギーロスの体積密度深さ方向分布.

て形成される空格子点体積密度分布については照射イオン種とエネルギーによらずほぼ同様な分布である。しかし、電子的非弾性散乱によるエネルギーロスの体積密度深さ方向分布に関しては大きな差がある。即ち、4.0-MeV Si 照射（黒の破線）は一桁低い 400-keV Ne 照射（青の破線）の 20 倍近くもの大きなエネルギーロスになっている。この後者の差が次節に出てくる図 7(a) ~ (d) に示す電極間抵抗の値に大きく影響している。即ち、4.0-MeV Si IBIEC の方が 400-keV Ne IBIEC より 4 桁も抵抗値が降下しており、電気的活性化の程度は MeV-IBIEC 照射の方が sub-MeV IBIEC 照射よりも圧倒的に良好である。これについては、結果の章の第 (2) 節と討論の章の第 (1) 節においてさらに詳細な議論を展開する。

結果

P を二重注入したダイヤモンド CVD 膜の MeV IBIEC 熱処理後のシート抵抗測定

厚さ ~0.3 μm 堆積した CVD ダイヤモンド薄膜に P を室温で二重注入した。その後試料を真空中で温度

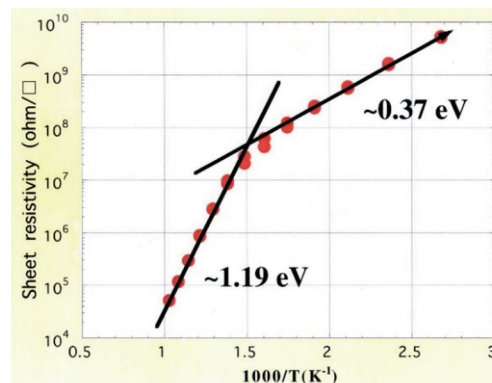


図6. 二重注入した P を活性化させるために 3-MeV Ne²⁺ を 750°C の真空中で 1 x 10¹⁶/cm² 照射アニールしたシート抵抗の逆数絶対温度依存性.

750°C に保ち、3-MeV Ne²⁺ イオン 1 x 10¹⁶/cm² ドーズ量照射して IBIEC 処理した。

図 6 はその試料のシート抵抗を、測定絶対温度の逆数に対してプロットした結果を示すグラフである。この図から明らかのように、シート抵抗の値は二段階の傾きをもって変化していることが明らかである。~1.2 eV の高い活性化エネルギーを持つ高温側の領域と ~0.37 eV の低い活性化エネルギーを持つ低温側の領域である。このことは測定温度によって、電子キャリアの異なる伝導機構が存在することを示している。図 6 における高活性化エネルギーの値は ~1.2 eV となっている。これは N の活性化エネルギー (1.4 eV ~ 1.7 eV) に近い値を持っているがその値より明らかに低い値である。実は後で分かったことであるが、CVD 膜中には数百 ppm の N 原子が膜中に取り込まれていることが SIMS 分析から判明した。その原因は CVD 膜堆積時に CH₄/H₂ の混合ガスを μ 波によりプラズマ状態にして C 膜を堆積するのであるが H₂ の割合を多くし過ぎていたためである。即ち、一般的に CH₄/H₂ プラズマにより Ib 基板の上に結晶 C 薄膜を堆積する場合、H₂ の割合が多すぎると堆積ではなく逆にエッチングが起こってしまう。エッチングが起こるぎりぎりの条件で非常に堆積成長速度を遅くして結晶性の良いダイヤモンド膜を形成することに注力したため、Ib 下地基板に数百 ppm 存在する大量の N 原子が膜中に取り込まれながら膜が成長してしまったのである。その後、新しく改良導入した CVD 装置により実験条件の改善を試み、膜中 N 原子濃度は SIMS 分析の感度以下に減少させることに成功した。しかし、以下の結果は膜中に大量の N 原子が取り込まれている条件での測定のため、イオン注入による P 原子とのダブルドナー状態での電気測定の結果である。実際、~1.2 eV の活性化エネルギーは注入 P 原子だけではなく、堆積中に混入した N 原子も同時に存在しているダブルドナー状態での電気

的 I-V 特性である。即ち、N(1.4 eV~1.7 eV) よりは浅い活性化エネルギーを持つ P(0.6 eV~0.7 eV) と共存する状態が起きている。そして P イオン注入条件、或いは IBIEC におけるアニール照射条件により、最終的に残留する 2 次欠陥の量が決定される。その 2 次欠陥が sub-band 構造を形成し、バンド図全体の中に占める sub-band の伝導帯準位下端からの位置(距離)と幅が活性化エネルギーの値に影響してくると考えている。このことは次章の第 2 節において詳しく議論する。

P 多重注入したダイヤモンド CVD 膜の IBIEC 熱処理後の電極間抵抗測定

図 6 に示したシート抵抗測定の結果から、ダイヤモンド CVD 膜に二重イオン注入した P は測定温度により異なった活性化エネルギーを持つ。しかし、これは P を二重注入したからではない。すぐ前の文章で述べているように、元々の CVD 膜を堆積した直後から高濃度に存在していた N 原子が関係している。N 原子が多量に含まれた原因は、CH₄/H₂ 混合ガスプラズマが堆積ではなくエッチングが起こりぎりのバランス条件で成長速度を遅くしたた

めである (~0.01 μm/h)。これは良好な結晶性を保つためである。下地 Ib 基板に含まれる数百 ppm の N 原子が膜中に取込まれながら成長したと考えている。多重注入 P の場合も同様の CVD 膜であった。次に、この低い活性化エネルギーの温度領域 (30°C → 190°C) について、詳細に電気特性 (I-V 特性から対角電極間の抵抗値を測定した) を調べた。

図 7(a) は P を二重注入 (□) 或いは多重注入 (○) した CVD 膜を下記に示す IBIEC 条件でアニールして電氣的に活性化させたグラフである。アニール後に対角にある 2 極間電極の抵抗値を測定温度の絶対値の逆数に対してプロットしたグラフである。抵抗の絶対値は多重注入と二重注入の抵抗値を比較すると両者はほぼ同じ活性化エネルギーであるが、絶対値は多重注入の方が二重注入よりも小さい。これは図 3(a) と図 4(a) の P 分布の計算結果からも分かるように多重注入の方が二重注入の P 分布よりもトータルの濃度 (シートキャリア濃度) が少ない分、抵抗値としては上昇しているからである。ただし、測定温度の範囲は 303 K(30°C) ~ 463 K(190°C) であり、アニール条件は図 7(a) の 1) である。

前述したように CVD 膜堆積直後には N が最初か

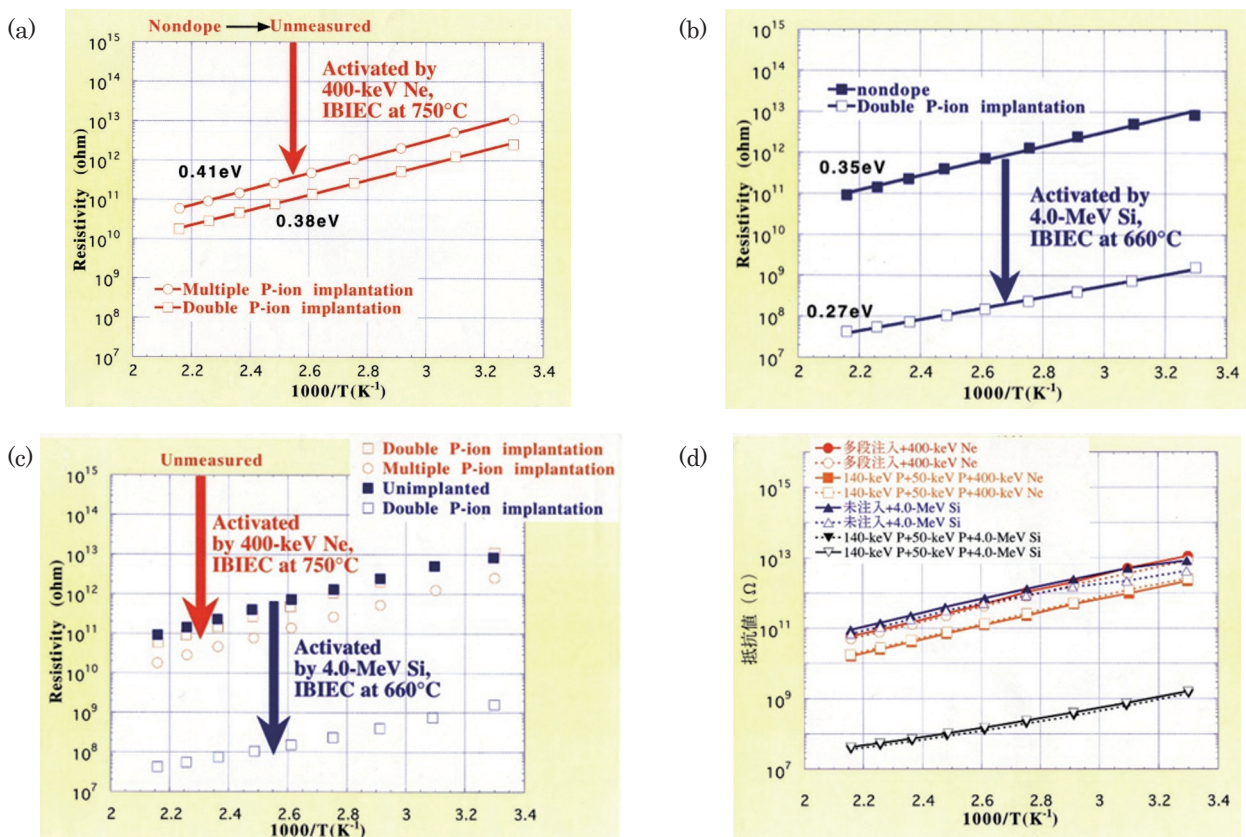


図 7. 二重注入 (□) 或いは多重注入 (○) 後に IBIEC 条件で電氣的に活性化させた試料の I-V 特性 (降温時 (190°C → 30°C) に測定し、4 隅の対角にある電極間の I-V 特性を測定) から抵抗値を算出した. (a): IBIEC 条件は 1) 400-keV Ne+ 750°C, $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$. (b): IBIEC 条件は 2) 4.0-MeV Si+ 660°C, $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$. (c): (a) と (b) を合わせた図. (d): (a) と (b) の各測定点について昇温時 (実線 30°C → 190°C) と降温時 (点線 190°C → 30°C) のヒステリシスの確認.

ら数百 ppm ドープされていた。従って、P を注入する前であっても堆積直後の CVD 膜は、IBIEC アニール後に電気的に活性化して電流が流れるかもしれないと思った。しかし、2) の IBIEC 条件では図 7(b) の青で示したように高抵抗 ($10^{11}\Omega \sim 10^{13}\Omega$) ながら対角にある電極間の電流を測定できたが、1) の IBIEC 条件では電流は全く検知されず、測定不可能であった。CVD 膜堆積直後は N がドープされていても殆ど置換位置を占有しておらず、従って電気的にも活性化していないと思われる。しかし 2) の MeV Si の IBIEC 処理によって N が置換位置に導入された結果として電流が検知されたと考えている。しかし、この伝導機構は上記低温領域 ($30^\circ\text{C} \sim 190^\circ\text{C}$) で起きている sub-band 中をキャリア電子が走行する Hopping 伝導の可能性が高い。図 7(a) のグラフの上枠に **Non dope → Unmeasured** と記したのは N が上記したように元々深い準位にあり、今回の測定温度範囲内 ($30^\circ\text{C} \sim 190^\circ\text{C}$) では伝導帯には励起されず、測定不可能と判断されたのである。

図 7(b) には、N がオートドープされた CVD 膜に P 注入した場合の電極間抵抗測定の結果が示されている。この時には 2) のアニール条件で抵抗がさらに 4 桁近くも降下し ($5 \times 10^7\Omega \sim 10^9\Omega$) P 注入の効果が如実に現われた (■)。これはオートドープされた N 原子以外にも注入した P も 4-MeV Si IBIEC アニールにより同時に電気的に活性化した証拠である。但し、図 6 に示したように低温における活性化エネルギーは $\sim 0.3 \text{ eV}$ と小さく、この試料に関しては実際に Hall 測定していないので確定的ではないが、pn 判定が不可能である可能性が高い。そしてその場合、キャリア電子は $30^\circ\text{C} \sim 190^\circ\text{C}$ の低温領域で sub-band 中を何らかの Hopping 伝導をしていると思われる。

図 7(a) と 7(b) から確実に言えることは IBIEC アニールによる電気的活性化は数百 keV の照射エネルギーではなく数 MeV の照射エネルギーの方がはるかに電気的活性化を効率よく行なえるということである。数百 keV の Ne エネルギーでは CVD 堆積中にオートドープされた N 原子は置換位置に導入できず、従って電気的に全く活性化されなかったと考える。これらの事実は次の章においても議論する。

図 7(c) は (a) と (b) を合わせた図である。赤で示した 400-keV Ne⁺ 750^o C, $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ IBIEC の効果と紫で示した 4.0-MeV Si²⁺ 660^o C, $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ IBIEC の効果の相違を分かりやすくまとめた図である。総括的に結論を先に述べると、CVD 堆積直後は意図しない形で N 原子が Ib 基板から膜中にオートドープされてしまい、その濃度は Ib 基板に迫る数百 ppm のオーダーになっている。しかし、この

N は電気的には全く活性化していない。唯一 4-MeV Si²⁺, 660^o C, $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ IBIEC 照射で高抵抗ながら ($10^{11} \sim 10^{13}\Omega$) 電気的に活性化したが、400-keV Ne⁺, 750^o C, $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ の IBIEC では全く活性化しなかった。しかし、その後に CVD 膜に二重 P 注入した試料に関しては、4-MeV Si²⁺, 660^o C, $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ IBIEC 照射で $5 \times 10^7 \sim 10^9\Omega$ と 4 桁も低抵抗になった。ということはこの顕著な低抵抗は明らかに注入 P イオンが MeV Si IBIEC により電気的に活性化したこと以外に説明できない。即ち、P 注入していない as-CVD の状態では膜中に含まれている N 原子が 4-MeV, Si IBIEC のみで電気的に活性化し、as-CVD 状態の薄膜に P 注入した試料は同じ 4-MeV Si IBIEC により N, P 二つの n 型ドーパント原子を同時に電気的に活性化したことになる。但し、電極間抵抗を測定した図 7 の実験においては誠に残念ながらホール効果測定を行っていないので、pn 判定はできていない。また as-CVD 試料においては 400-keV Ne の IBIEC では低温領域 ($30^\circ\text{C} \sim 190^\circ\text{C}$) において電流は流れず全く活性化できていなかったもので、アニール効果としては 4-MeV Si IBIEC の方が 400-keV Ne IBIEC よりもはるかに大きいという結論になる。

図 6 における IBIEC 照射条件では 3-MeV Ne²⁺, $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$, 750^o C で、照射エネルギーとしては MeV 級であるが、照射量は $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ とかなり高過ぎる条件で IBIEC している。従って、照射後に 2 次欠陥が成長している可能性がある。それら 2 次欠陥は各種の Trap 準位や sub-band を形成している可能性がある。それ故せっかく置換位置に入って活性化したイオン注入 P のキャリア電子が sub-band 中を走行して低温領域では pn 判定できなかった加納氏が大きい。このことは現状の P 注入条件を含めて MeV 級イオンの IBIEC 照射条件を見直し、最適化する必要があるということを示唆している。たとえ注入 P 原子により電子キャリアが多く発生しても 300°C 以下の低温領域、ましてや図 7 の $30^\circ\text{C} \sim 190^\circ\text{C}$ の低温領域において全く pn 判定は不可能であると考え。その理由はその低温領域においては電子キャリア自身伝導帯を走行しているのではなく、孤立した個々の Trap 準位、或いはそれらの集合体である sub-band 内を Hopping 伝導しているため、外部磁場に対して電子キャリアの動きがローレンツ力を受けても鈍感になる。それ故 Hall 電圧が誘起されにくくなって、pn 判定は不可能という結論が出ていると思われる。

図 7(d) は (a) と (b) の各測定点について昇温時 (実線 $30^\circ\text{C} \rightarrow 190^\circ\text{C}$) と降温時 (点線 $190^\circ\text{C} \rightarrow 30^\circ\text{C}$) に

ヒステリシスがないかどうか確認した図である。殆どヒステリシス効果は認められない。

討論

この章においては n 型ドーパントイオン注入したダイヤモンド半導体の IBIEC アニール法による新しい電氣的活性化の可能性について議論する。ここでの議論に使用する図 8～図 13 は既に発表済み論文の中から引用している¹⁸⁾。

電極間抵抗測定における MeV と sub-MeV エネルギーにおける IBIEC 効果

実験結果の章における電極間の I-V 特性、特に図 7 に示した MeV 級イオン照射によるアニール効果により 4 桁程度電極間抵抗値が降下することから、注入した P 原子が置換位置に入って電氣的に活性化している可能性が高いと考えている。ただし、この実験結果だけからは残念ながらホール効果測定を行っていないので、伝導タイプが n 型であることを保証できていない。しかも、電氣的活性化エネルギーが 0.27 eV~0.41 eV と通常 CVD ドープした P の活性化エネルギーである 0.6 eV ~ 0.7 eV と比較すると小さ過ぎるように思える。また、前章の図 6 の結果においてシート抵抗は 2 通りの活性化エネルギーの値を報告しており、一つは高温領域における ~1.2 eV であり、もう一つは低温領域の 0.37 eV である。この ~1.2 eV という値も N 原子自身が本来示す活性化エネルギー 1.4 eV ~ 1.7 eV に比較すると明らかに小さい値である。このように、CVD 基板中に存在するイオン注入による P 原子と CVD 膜堆積中に意図せず含まれてしまった N 原子の両方の n 型ドーパント元素の存在により、ダブルドナー状態になっている可能性が高い。それらダブルドナーから供給されるキャリア電子が測定温度に対してどのような活性化エネルギーを持つのかということは次のように決定される。それは P イオン注入とその後の IBIEC 処理の 2 段階のイオン照射後に最終的に残存している孤立した Trap 準位、或いはそれらが集合した sub-band がエネルギー band 構造全体の中で価電子帯からどの位置（距離）に如何なるエネルギー幅で形成されているのかに依存するということである。即ち、バンド構造図全体の中にある sub-band の位置（距離）とその幅により、欠陥がない結晶系の中でそれらドーパント原子が本来持っている活性化エネルギーが実効的に低い値にシフトしてしまっていると考えている。即ち、キャリア電子を供給する N と P が形成する不純物準位と、そのキャリア電子が走行する sub-band までの距離（エネルギー差）が小さいほど活

性化エネルギーは低い方向にシフトする。前章で示した 0.3 eV ~0.4 eV というかなり小さな活性化エネルギーの値は電子を供給している N, P の不純物準位から 0.3 eV ~0.4 eV 程度の小さなエネルギーの距離に sub-band 準位が存在し、sub-band 中でキャリア電子が走行している。しかし、sub-band 中ではキャリアの Hall 移動度も小さくなり、何よりも pn 判定が不能になるという大きなデメリットがある。要は sub-band が形成されにくいアニール条件が必須であり、そのためには MeV 級 IBIEC の照射条件を最適化し、できるだけ低ドースの照射量で抑えて n 型ドーパント原子を活性化させることが肝要となる。

基本的には比較的浅いイオン化エネルギー（活性化エネルギー）を持つ n 型ドーパント元素を探し出し、その注入条件を最適化することとイオン注入後のアニール方法に関しても従来の熱処理とは根本的に異なる非熱平衡過程のアニール処理法である IBIEC に抜本的に変更する必要があると考える。

これらのことを実行するためには先ず、

- 1) 高品質でできるだけ含まれる不純物が少ない基板を形成する。
- 2) イオン注入する n 型ドーパント原子はその注入によって、基板内部に誘起される欠陥量が現在 B イオン注入によって良好な電気特性が得られている注入による適度な欠陥量の中に入るような範囲を決定する。
- 3) 基板に含まれる不純物に関しては特に電子キャリアの補償中心となる B 不純物が非常に少ない例えば ppb オーダーの基板を使用すべきである。他の不純物としては深い準位を持つ N 原子も ppb 程度に極力少なくするようにすべきである。

以上の指針に従い、さらに IBIEC に必要な照射エネルギーとドース量、そして照射中の温度を最適化して最終的アニール後に残る欠陥量を極力減少させる。そうすることにより、2 次欠陥形成に伴う sub-band 形成を極力抑える。特に図 6 に示したホール効果測定を行なった試料の IBIEC 条件は 3-MeV Ne^{2+} を 750°C の真空中で $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ という極めて高い照射量である。なので、アニールビーム自身が形成する 2 次欠陥量が、RBS-channeling 法では欠陥として殆ど認識できなかったとしても多量に形成されている可能性がある。結果としてそれが sub-band 構造や孤立した Trap 準位の形成につながる。さらに P, N 不純物準位 band 幅 (1.4 ~ 1.7 eV、0.6 ~ 0.7eV) が伝導帯に対して本来持つ活性化エネルギーの値を減少させてしまうことにつながる。

N 原子や注入 P 原子がダイヤモンド単結晶基板中

でそれぞれ固有の不純物エネルギー band 準位 (イオン化エネルギー) を持ち、それらの値が前の章で示されているよう N については $1.4 \sim 1.7 \text{ eV} \rightarrow 1.2 \text{ eV}$ 、P については $0.6 \text{ eV} \sim 0.7 \text{ eV} \rightarrow 0.3 \text{ eV} \sim 0.4 \text{ eV}$ とシフトしている。その理由はこの章の最初にも述べてあるが、重要なことなので再度掲載する。

P, N 原子がダイヤモンド結晶中で本来持っている不純物準位バンドの値が変化 (シフト) する理由は、電子キャリアの全体エネルギーバンド図において、アニール後に最終的に残留する 2 次欠陥主体の sub-band 構造、或いは点欠陥主体の孤立的 Trap 準位構造に依存する。即ち、これら sub-band 構造が価電子帯や伝導帯の間にある大きな band-gap 中でどの位置 (エネルギー差) と幅で形成されるかに依存する。特に sub-band 中をキャリア電子が走行する sub-band 伝導の際には VRH (Variable Range Hopping), NNH (Nearest Neighbor Hopping (NNH)) と呼ばれるキャリア電子が Hopping する伝導形態がある。このような伝導形態は Hall 効果測定の際に外部からかける磁場によりローレンツ力を受ける感度が非常に悪くなり Hall 電圧を誘起しにくい。それ故、往々にして pn 判定が不可能となる。図 6 で低活性化エネルギーを示す温度領域 (室温 $\sim 300^\circ\text{C}$) ではこの Hopping 伝導により pn 判定が不可能となっている。またそれら sub-band 構造が価電子帯と伝導帯を含むバンド構造全体の中でどの位置 (エネルギー差) と幅で形成されるかが分かれば、活性化エネルギーの変化量 (シフト) を説明できる。こうして P, N 不純物準位と伝導帯とのエネルギー差 ($1.4 \sim 1.7 \text{ eV}$, $0.6 \sim 0.7 \text{ eV}$) から求まる活性化エネルギーの値より低エネルギー側 ($\sim 1.2 \text{ eV}$, $0.3 \sim 0.4 \text{ eV}$) にシフトすることが説明できる。なので図 6 の場合、実効的な活性化エネルギーの値が低エネルギー側にシフトすることは十分にあり得ることである。結論的にはイオン注入ダイヤモンド半導体を効率よく電氣的に活性化するためには、

- 1) 元々のダイヤモンド基板自体を高品質で不純物も殆ど含まない基板を使用する。
- 2) ドープメント不純物をイオン注入するには的確なドーズ量を設定して、最適な量の欠陥を導入する。
- 3) イオン注入後のアニールに使用する IBIEC 照射量を可能な限り低ドーズ ($10^{13} \sim 10^{14}/\text{cm}^2$) に抑えて、2 次欠陥形成を抑える。

ということに尽きる。特に 3) に関しては sub-band の形成を極力抑えることに直接つながる。

図 6 における低温側の低い活性化エネルギーを示

している温度領域においては sub-band 中をキャリア電子が走行しているということ、それ故 pn 判定が不能であるという事実を定性的ではあるが、以上述べてきた矛盾しない論理で説明できると考えている。現在、高温領域における高い活性化エネルギーから低温領域の低活性化エネルギー領域へ測定温度とともに変化していくプロセスを包括的に説明する電子キャリア伝導機構のモデルを構築中である。別途論文誌に投稿する予定である。

イオン照射による非晶質化と結晶回復の機構 (ダイヤモンドと Si との比較)

ここでの議論は IBIEC によるアニール処理が、ダイヤモンド半導体の母材原子である C よりも原子半径が大きな n 型ドープメント原子をどのように置換位置に導入するのか、その機構をミクロな原子構造モデルを基礎に説明する。先ず、C イオン注入でダイヤモンド結晶に導入される欠陥分布を RBS の channeling スペクトルで示す。その後非晶質化と IBIEC 現象の機構について、基本的な原子構造に基づいたモデルを提案する。これらのモデルについては既に、発表された論文に掲載された内容であるが、十分に直感的に分かりやすいモデルを提案しているので、ここに再掲する¹⁸⁾。

先ず、HPHT Ib 型ダイヤモンド基板と Si 単結晶基板に C イオン注入した時に誘起される結晶欠陥の様子を [100]-channeling スペクトルを中心に比較する。

図 8 の 3 枚のグラフは HPHT ダイヤモンド Ib 基板に C を 50 keV で室温注入して欠陥を導入した試料の RBS random スペクトルと [100]-channeling スペクトルである。RBS 測定条件は 1.0-MeV He^+ で SSB 検出器角度は 170° に固定した。

図 8(a) に書かれている点線は C を $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入直後のスペクトルで赤と青の破線で示してある。それぞれ試料番号は No.(1), (2) である。実線はアニール後の試料のスペクトルである。赤は 3.0-MeV Ne^{2+} イオンビームによる 750°C での IBIEC 後のスペクトルで、照射量は $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ である。また青の実線は MeV 級 IBIEC と同じ温度と照射時間である 750°C , 80 分で真空中熱処理を行なった試料のスペクトルである。

図 8(b) のスペクトルは試料 No.(3), (4) で C 注入ドーズ量が $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ と 2 倍にした試料の同様なアニールプロセスを経た試料の結果である。

図 8(c) は試料 No. (1), (2) で図 8(a) 試料と全く同等であるが、8(a) において RBS-channeling 測定上はほぼ単結晶に戻ったのでそれらの試料に対して更に

C を $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 重ねて注入した。なので実効上 $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入した形とみなして同様なアニール処理を行なった試料のスペクトルである。従って、厳密には as-supplied の Ib 基板試料に $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ の C を注入したものではないが、channeling スペクトルで観測される damage の量としては大きな影響はないと考え測定を行なった。

まず、8(a) のグラフで特徴的なのは注入直後の 50-keV C の射影飛程 R_p 付近 (70 ch 付近) のチャンネル番号において収率が上昇し、その値は random スペクトルの収率と比較して 1/2 程度にまで増加して

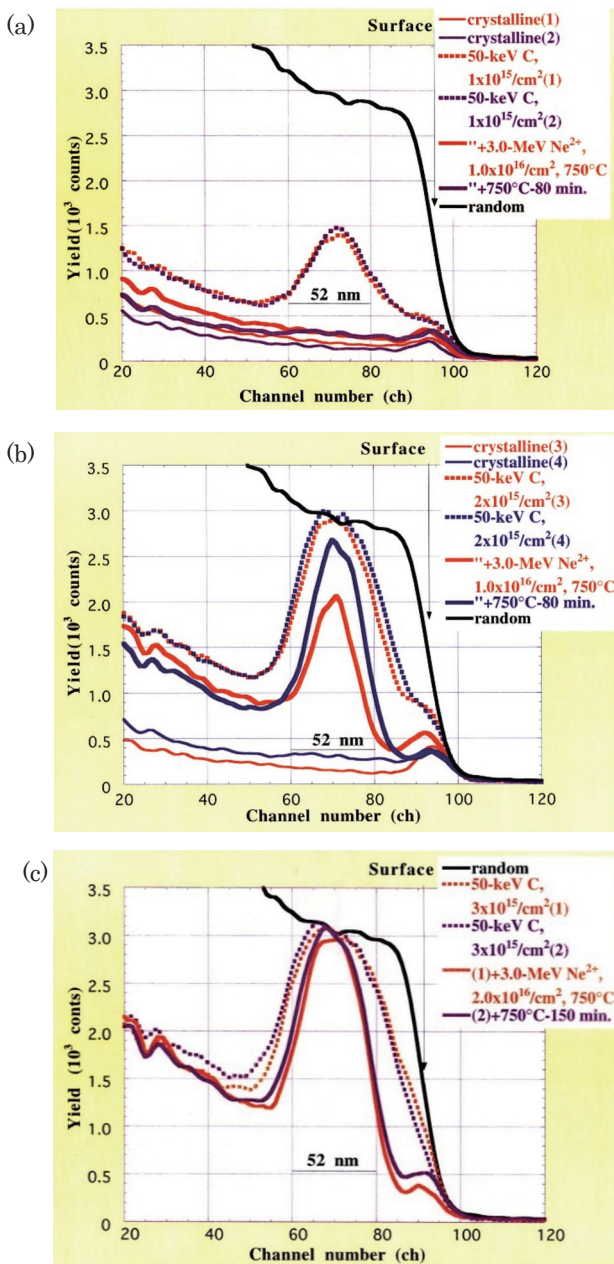


図 8. HPHT Ib ダイヤモンド基板に C を 50keV で室温注入して欠陥を導入した試料の RBS-random スペクトルと [100]-channeling スペクトル。C ドーズ量は (a): $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$, (b): $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$, (c): $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ である。

いることである。これはざっくり言ってダイヤモンド基板を構成する半数の C 原子が格子間原子として結晶格子の位置からはずれているということである。これは筆頭著者の経験からすると Si 単結晶基板の場合、もしそれだけ変位した Si 原子がイオン注入によって形成されていれば、その後の熱処理で成長した 2 次欠陥 (積層欠陥、転移等) はかなり残存するはずである。そしてこれら 2 次欠陥を消滅させるためには通常 $1200^\circ\text{C} \sim 1300^\circ\text{C}$ のアニール温度が必要になる。しかし、図 8(a) から分かるように、驚いたことに 750°C 程度の温度の真空中熱処理後に RBS-channeling スペクトルから明らかなように、ほぼ単結晶に近い収率まで減少している。

次に図 8(b) であるが、as-supplied 試料である別の No. (3), (4) に 50-keV C を図 8(a) の 2 倍である $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ と 2 倍に注入してみた。すると非晶質 C 層の収率である random スペクトルの収率に一致するほど damage 量が R_p 付近の深さ (70 ch 付近) において収率増加が観測された (赤と青の破線)。このこと自体は図 8(a) の結果を見れば予想がつく。即ち、C 注入量が 2 倍になった分、変位した C 量も 2 倍に増え、結果として random 収率に一致した訳である。 $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ C を注入後にアニールしたスペクトルを実線で示す。赤の太い実線が 3-MeV Ne^{2+} IBIEC で青の太い実線が 750°C 80 分の熱処理後のスペクトルである。この図から明らかなように、熱処理後に R_p 付近の収率が減少しており、結晶化がそれなりに進んだことが明らかである。しかも、同じアニール温度でありながら IBIEC による結晶化の進行の程度が通常の熱処理だけによる結晶化の程度よりも大きくなっており、IBIEC アニール効果の方が大きいということも分かった。

図 8(c) は図 8(a) に出てきた試料 No. (1), (2) について通常の熱処理または 3-MeV Ne^{2+} IBIEC アニールしてほぼ単結晶に戻した後に、追加の C を $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入した試料の channeling スペクトルである。最初から $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入した訳でない。しかし、channeling スペクトルで測定する欠陥量の解析には十分と考えたので追加注入という処置をした。この図 8(c) においては収率が非晶質のそれと一致する領域 (幅) が増加していて通常の Si で予想される振る舞いと同様である。アニール後については図 8(b) に示したほどではないが、3-MeV Ne^{2+} IBIEC によるアニールが通常の真空中熱処理よりも若干進行している。この C を $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入した試料ではアニール時間も 150 分とほぼ 2 倍にした。これは IBIEC アニール照射量も 2 倍の $2 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ にしたからである。しかし、どちらの場合も注入直後のスペクトル

ルと比較すれば、基板深い側からと表面側からの結晶化が進行しているが両者でアニール効果はほぼ同じである。

この章の第2節「イオン照射による非晶質化と結晶回復の機構(ダイヤモンドとSiとの比較)」においては、特に図8(a)と図8(b)におけるC注入直後のスペクトルが驚愕に値する結果であった。即ち、SiにCを室温でイオン注入する場合、注入量が $1 \sim 2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 程度であれば著者の経験によるとRBS-channeling測定では殆ど欠陥が検出できなかったはずなのである。これは筆頭著者がSiで長年経験したことと全く相いれない実験事実であった。そのことを次の図9に端的に示すグラフを示す。そしてSi単結晶へCイオン注入する場合と、ダイヤモンドC結晶へCイオン注入するのと何が異なるのか基本的な原子モデルを基礎に議論する。

図9はSiにCを50-keV、 $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 室温注入した試料の[100]-channelingスペクトルである。RBS測定条件は1.0-MeV He⁺でSSB検出器角度は170°に固定した。この測定条件は図8(a)~8(c)と同じである。参考のために20-keV Cを $3 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 室温注入した結果も示す。このスペクトルから明らかなようにCをSiに注入する場合には $1 \sim 2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ の注入量では収率の増加は殆ど検出できない程であり、僅かに210 chのR_p付近で収率の膨らみがあるかと思われる程度である。しかも青と赤の区別がつかない程であり、2倍照射の効果は全く観測されていないと言っていいくらいに結晶性が保たれている。この実験事実は図8(a)、8(b)に示したダイヤモンド基板に対して同じ注入条件のC室温イオン注入と比較すると全く異なる結果になっている。この原因はSiの場合、当初筆頭著者がSiへのイオン注入効果を総括的に研究していた際にMeV級イオンによる注入が計算値で予測される欠陥量よりも

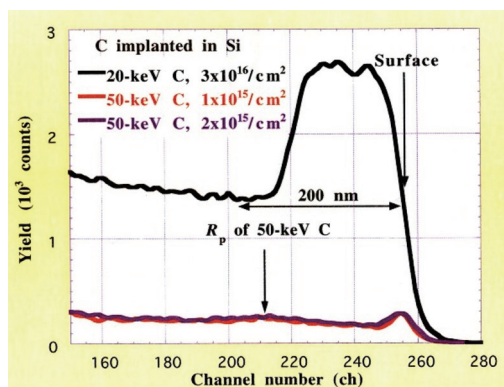


図9. SiにCを50-keVで $1 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 、 $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 室温注入した試料の[100]-channelingスペクトル(—)。20-keV Cを $3 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 室温注入して表面まで非晶質Si層を形成した試料のスペクトル(—)。

圧倒的に少ない欠陥しか残さないと気づき、SIBA (Self-Ion Beam Annealing) 効果⁹⁾と名付けた現象が起きているということである。詳細は論文8)に譲るとしてここではエッセンスだけを簡単に述べる。一般的にイオン注入直後($\sim 10^{13}$ sec)に導入される欠陥は入射イオンの反跳効果によりイオントラックの中心付近で空格子点が多く、周囲には反跳された格子間原子が多量に存在するという欠陥構造になっている。その状態から $10^{13} \sim 10^9$ sec程度の時間内で室温であってもイオントラックの周りに形成される空格子点と格子間原子のトラックの垂直方向に相互に反対方向に向かう熱拡散による移動途中で次々と再結合を起こし、欠陥が回復する。そして、照射イオンがMeV級の高エネルギーである場合、イオントラックの周りに空格子点・格子間原子(Frenkel Pair)とともに多数形成されている電子・正孔対の働きにより熱拡散が加速されて効率の良い再結合が促進される。これにより結晶回復が注入中に効率的に起こるのであるが、別にMeV級の照射エネルギーでなくても通常の数十keV級のイオン注入エネルギーでも同様な注入中欠陥回復は起こっている。MeV級エネルギーではさらに結晶化効果が加速されているのであるが数十keVでも基本的に空格子点・格子間原子の拡散と再結合により欠陥回復が注入中にしかも室温近くでも起こっているのである。

それでは、図8(a)と図9に示されている同じ条件でイオン注入したSiとダイヤモンドというターゲット基板に誘起される大きな欠陥量の相違は何に起因するのかということになる。この原因はSiは単一の結晶系しか世の中に存在しないが、ダイヤモンドはダイヤモンドとグラファイトという2種類の安定した同素体結晶系が存在することによるのではないかと考えている。図8(a)~8(c)に示したように、Cイオン注入した試料にはSIBA効果がSiほど働かないのである。前述したようにイオン注入したC原子は $\sim 10^{13}$ 秒程度の時間で停止する。この時イオン飛跡中心付近には反跳されたC原子により残った空格子点が高い濃度で飛跡の中心に留まり、飛跡の周辺付近には反跳されたC格子間原子が高い濃度で存在する構造になる。その後、 $10^{12} \sim 10^9$ 秒の時間間隔の間で空格子点と格子間C原子が飛跡とは垂直方向にそれぞれ逆方向に熱拡散する。熱拡散する間に会った空格子点と格子間原子とは互いに再結合すると、その段階で格子間C原子が置換位置に入り、結晶が回復する。しかし、注入イオンがダイヤモンド結晶の母材と同じC原子の場合、最終的にトラックの中心近くに残っているのは反跳で形成された高濃度のC原子となる。即ち、格子間原子は注入イオン

を含めて再結合できなかった場合には飛跡の中心付近に残り、各格子間 C 原子が凝集して sp^2 結合を主体とするポリグラファイトの微結晶核を形成する。このグラファイト微結晶は一旦形成されると MeV IBIEC 照射を行なっても、ダイヤモンドの結晶構造に変換されずに、ダイヤモンド結晶の中で安定したポリグラファイトという形で存在することになる。すると、ダイヤモンド結晶の中で C イオン注入を行なっても SIBA 効果での空格子点・格子間原子の熱拡散が、グラファイト構造を形成しているポリグラファイト結晶系に抑制され、再結合が効率的に行われなくなる。それ故 SIBA 効果が弱くなり、[100]-channeling スペクトル中の格子間 C 原子による Rp 付近の収率増加になっていると考えられる。

以上の定性的なモデルをサポートする実験結果を次の図 10 に示す。

図 10 は 50-keV C を $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$, $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入した直後のダイヤモンド Ib 基板中に誘起された欠陥分布を RBS の高感度、高分解能法で測定したスペクトルである。 $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ のドーズ量では明らかではないが、 $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ に増加すると 50-keV C の Rp 近傍の深さ (100 ch 近傍) において明らかに収率の減少が確認できた。この理由を以下に示す。50-keV C の注入量が $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ と多量なために、注入量がピーク付近の深さにおいて多数の微細グラファイト結晶を形成している。これらの微結晶グラファイトは、その結晶方位が基板ダイヤモンド結晶方位と揃っていないポリグラファイトとして構成されている。ポリグラファイト中ではコリメートされた照射 He ビームが基板のダイヤモンドの結晶方位と同方向に入射しても殆どポリグラファイト中で de-

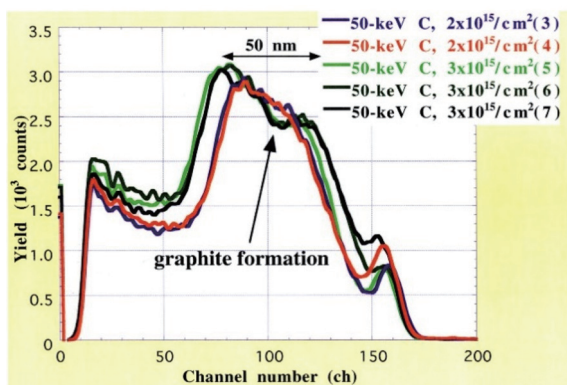


図 10. 50-keV C を $2 \times 10^{15}/\text{cm}^2$, $3 \times 10^{15}/\text{cm}^2$ 注入した直後のダイヤモンド Ib 基板中に誘起された欠陥分布を RBS の高感度、高分解能法で測定した。測定条件は 1.0-MeV He+ で SSB 検出器のビームに対する角度は 110° である。括弧の中の数値は試料番号であり、(3), (4) は図 8 中の試料と同じ。

channeling され、一部のビームしか channeling されない。その一部の channeling ビームにより後方散乱ビームの収率がわずかに減少したのである。

このようにグラファイトの微結晶がポリグラファイトとして非晶質 C 原子の中に埋め込まれていると収率減少として観測することができる。この核となっている sp^2 結合を主体にしたポリグラファイトの成分が存在すると。その後のアニールにおいてそれらの結合がダイヤモンドの sp^3 結合に変換されることは不可能である。それ故図 8(b), (c) においては多量の 3-MeV Ne^{2+} $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$, 750°C 照射による IBIEC によってもダイヤモンドの結晶化が起きなかったのである。しかしグラファイト成分が核になっている深さの周辺領域に関しては、 sp^2 結合主体の非晶質ダイヤモンド成分が殆どなので、図 8(b), (c) に示したように基板深い領域と表面領域から結晶化が進行したのである。

次節においては、イオン注入や IBIEC によって如何なる機構で結晶化や非晶質化が起こるのかを原子構造に基づいたモデルで考察する。

マイクロな原子構造に基づいたイオン照射による非晶質化・単結晶化モデル

図 11 はイオン注入により空格子点が形成され、非晶質化されていく過程を示すマイクロな原子構造に基づくモデルである。通常空格子点は入射イオンとターゲット基板を構成する C や Si 原子との直接的な弾性衝突により反跳されたターゲット原子が形成されたときにできる。反跳とは共有結合をしていた隣接する 4 つの結合手を切断して衝突したターゲット原子 1 個を自由にするということである。その時、切断された結合手は dangling bond となり、元のターゲット原子がいた空間は空格子点となる。その空格子点は反跳直後切断された 4 つの結合手の片

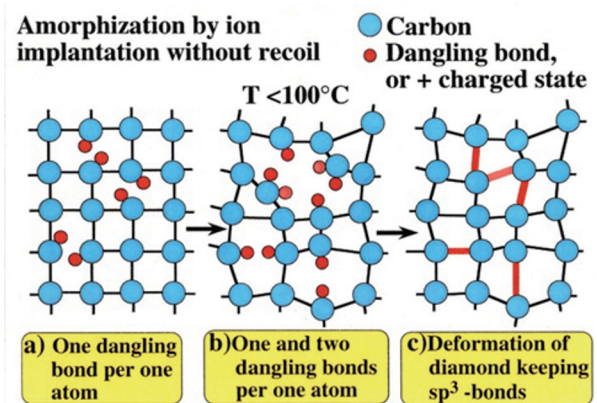


図 11. イオン注入により空格子点が形成され、非晶質化されていく過程を示すマイクロな原子構造に基づくモデル。

割れである4つの電子で占有されている。一方、反跳されたC原子も反跳直後には電氣的には中性である。そして単体の中性C原子として格子点間のポテンシャルの低い位置に収まり、安定した格子間原子となる。反跳直後の空格子点の空間には未結合のペアの片割れである4つの電子が存在しているがそれらは4つのdangling-bondになっている。その状態から、別の反跳された電氣的に中性のC原子がやってくると空格子点内にあった4つのdangling-bondと共有結合して結晶の中に納まる。即ち、Frenkel pairの再結合による結晶回復である。このプロセスがいわゆるreplacement collisionでの結晶回復である。しかし、反跳によって直接空格子点と格子間原子が形成されなくても、注入原子とターゲット原子との非弾性衝突によっても空格子点形成されることがあることを図11のモデルは示している。この非弾性衝突とは入射イオンの+電荷をもった原子核とターゲット原子核の周りに存在している電子との間の衝突である。この非弾性散乱においては、ターゲット原子中の電子が高いエネルギー状態に励起されるとか電離されるとかの現象が起きる。これにより図11の左端a)に示すように比較的離れたターゲット原子の結合手が切断される。切断されただけであればdangling bondとして赤印で示された電子が1個の原子についた状態になるが、この状態では電離されていないので原子が一価の+イオン状態になることはない。入射イオンとの衝突で結合手を構成していた電子対の1個とさらにそれと対を構成していたもう1個電子が同時に飛ばされてしまうと、結合していた隣り合った2個の原子は同時に一価の+イオンになる。すると、イオン同士のクーロン反発力により互いが反発しあいそこに空格子点に類似した空間(vacant space)が形成され、それと同時に一価に電離した二個の格子間イオン(格子間原子ではない)が形成される。しかし、dangling bondで隣り合った一対の原子同士もその対が別の同様に形成された原子対とも離れて形成されている限り、格子が歪む(deformation)ことはない。しかし、これらの切断された結合手やdangling-bondはドースレートが高い場合には同時に5個のdangling-bondを形成する場合もあり得る。その様子は図11の真ん中に(b)書かれたモデル図に示されている。このような場合には電離した状態になった時には勿論、dangling-bondが5個もある状況では格子の歪も大きくなり、二重空格子点(divacancy)と2個の格子間原子或いは格子間イオン(interstitials)の構成と成り得る。図11中のa), b)いずれの状態も室温注入程度の温度($T < 100^{\circ}\text{C}$)でも起きる可能性があり、ダイヤモンド

の場合は注入量が少なくてもSIBA現象である空格子点と格子間原子の再結合確率が微小ポリグラファイト形成の為に抑制されて低注入量でも格子間原子の量が増加する。これが前節の(2)で示したRBS-channelingスペクトルに現れた欠陥量の収率増加となって観測されたと思われる。

最終的に結合が完成した図11c)で示された構造は、基本的に sp^3 結合を保持した歪んだ非晶質ダイヤモンド構造なので、比較的低温($300^{\circ}\text{C} \sim 400^{\circ}\text{C}$)の通常熱処理であってもIBIECであっても、channelingスペクトルにおける単結晶ダイヤレベルに回復する。

以上が、定性的ではあるが大きな矛盾はない原子レベルでの非晶質化のモデルである。次に示すのは上記のように、単結晶化の過程において重要なのは基板中に存在する空格子点(vacancy)或いはvacant space¹¹⁾と呼ばれる結晶中に誘起される空間である。これらの余裕を持ったspaceが結晶中に存在すると格子間原子や格子点置換位置にある原子の振動運動自由度が大きくなり、低温での結晶化がSiでもダイヤモンドでも起きるという結論に至る。この低温単結晶化はIBIEC処理を行なって強制的に非晶質層中にvacant spacesを形成することで実行できるが、図12(a)におけるUHV(Ultra-High-Vacuum)CVD法で堆積した非晶質Siにおいては、イオンビーム照射を伴わない通常の熱処理においても低温($300^{\circ}\text{C} \sim 400^{\circ}\text{C}$)での単結晶化は観測されている¹⁶⁾。

UHV-CVDで堆積した薄膜の低温単結晶化機構を図11の場合と比較してその類似点を考察する。

図12(a)はUHV-CVD法でエピタキシャルにダイヤモンド薄膜を厚さ80 nm堆積した後に80-keV Pを注入して100 nm厚さの非晶質層を形成した。その後熱処理して単結晶化する様子を示したモデル図である。このCVDエピタキシャル単結晶薄膜は SiH_4/H_2 の混合ガスを高真空中で流しながらSi基板上にエピタキシャルに成長させる。その際、かなりの量のH原子が膜中に取り込まれている。SIMS分析の結果、膜中にH原子が $\sim 10^{20}/\text{cm}^3$ 近く含まれていることが判明している。そのような条件で堆積した膜中に界面を超えてPイオン注入して非晶質層を形成した後は、図12(a)の左端に示したような形態でH原子が非晶質Siと結合して含まれていると考えている。これは図11の真ん中に示した図に類似しているが、図11の場合は●はdangling bondを示す電子であるが、図2(a)の場合●はH原子を表わしている。このようなH原子との結合形態がPイオン注入で形成した非晶質Si層の中に含まれていると考える。これらのH原子は最初 $300 \sim 350^{\circ}\text{C}$ の熱処理で $\text{SiH}_2 \rightarrow \text{SiH} + \text{H}_2/2$ という化学反応でHが非晶

質 Si 層から抜け出ていく。直後に抜け出た二個の H の部分が dangling bond、すなわち電子に置き換わり、二つの電子の共有が起こり一つの結合手を形成する。次に続く 350°C ~ 450°C の熱処理の段階では、

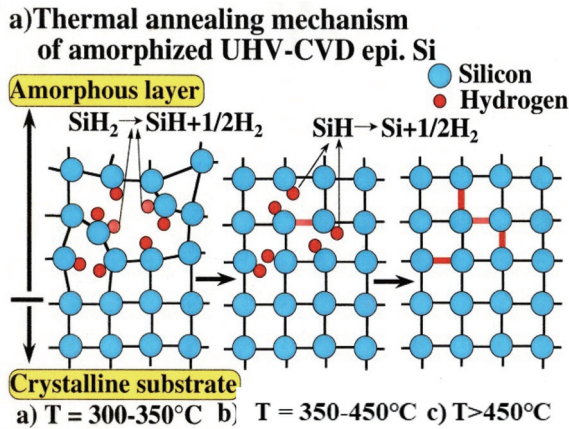


図 12 (a). 水素原子を多量に含んだ Si 基板上に UHV-CVD 法で堆積した非晶質 Si 層は 450°C 程度の低温熱処理でエピタキシャルに単結晶化した。

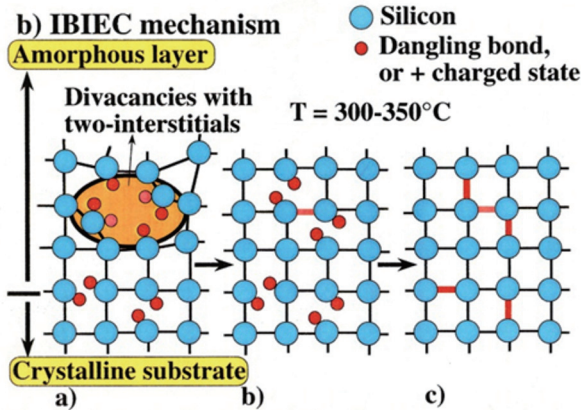


図 12 (b). MeV 級 IBIEC 照射により単結晶 Si 基板上の非晶質 Si 層が単結晶化していく機構をミクロな原子レベルで描写したモデル。

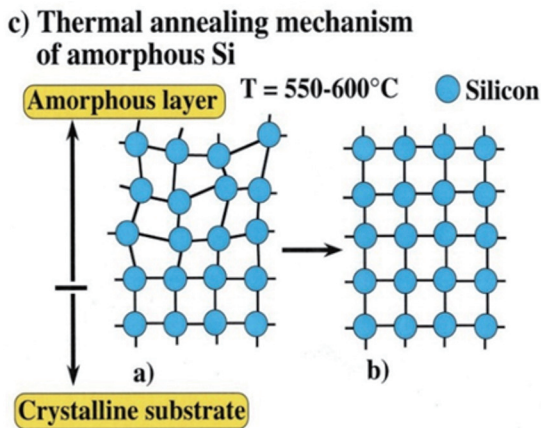


図 12 (c). Si 非晶質層が Si 単結晶基板上に存在し、その非晶質層内部に殆ど vacant spaces が存在しない場合に熱処理だけでどのような結晶回復の形態が起こり得るのかを示したミクロな原子構造モデル。

$\text{SiH} \rightarrow \text{Si} + \text{H}_2/2$ が起こる。こうして最終的に 450°C 程度の熱処理温度で P イオン注入形成した非晶質 Si 層の単結晶化が完成する。450°C という温度ではバルク Si 基板を P イオン注入して非晶質化しただけでは単結晶エピタキシャル成長速度は非常に遅く、当該実験における 30 分程度のアニール時間では、ほとんどエピタキシャル成長が観測できない。H を多く含む UHV-CVD 薄膜を非晶質化した後の低温単結晶化も、IBIEC による低温単結晶化も、その原理機構は根本的に非晶質層の中に何らかの形で形成される vacant spaces あるいはそのクラスターという欠陥の存在により、それら欠陥に隣接した母材原子の振動自由度を大きくすることにつながり、結果として低温による単結晶化が進行する。

次に図 12(b) を使って IBIEC による低温単結晶化の機構を Si 基板について考察する。本質的にはダイヤモンド基板に関しても同様であるが、もう一つの安定な同素体結晶のグラファイトが微結晶ポリグラファイトとして存在するので、イオン注入時或いは IBIEC 時に照射量を極力抑えた形で n 型ドーパントのイオン注入条件と IBIEC 照射によるアニール条件の二つの条件の最適化を行なわなければならない。

図 12(b) は MeV 級 IBIEC 照射により単結晶 Si 基板の上の非晶質 Si 層が単結晶化していく機構をミクロな原子レベルで描写したモデル図である。Si の場合はダイヤモンドと異なり、安定した同素体であるグラファイトに相当する構造は自然界にはない。従って、SIBA 効果は図 8(a) と図 9 に示したように、明らかに Si 単結晶基板の方がはるかに顕著である。その分ダイヤモンド基板の結晶回復よりもっと低温で 300 ~ 350°C 程度で結晶回復が行なわれるので、MeV IBIEC アニール条件を最適化するのも容易である。従って、図 12(b) のモデル図では代表的なアニール温度である 300°C ~ 350°C を想定してある。このような低温においては勿論非晶質 Si 層は通常の熱処理では全くエピタキシャル成長はしないのであるが、その温度で同時に MeV 級イオン照射を行なうと、著しくエピタキシャル成長速度が増速される。これは MeV 級イオンの弾性衝突により基板の Si 原子が反跳されて単体の空格子点 (single vacancy) を形成するだけでなく、適切な注入量率 (dose rate) を設定することにより divacancy, triple vacancy, その他 vacancy クラスター等を形成する確率も高くなる。図 12(b) の左側の図は divacancy が形成された様子を示す。● は dangling bond の成分である電子であるが、それさえも弾き飛ばされた場合には一価の+イオンが格子間イオン (格子間原子ではない) として存在することになる。divacancy が形成されると

隣接した二個の格子間原子が一度に二個置換されて、効率よい結晶回復が進行する。それが図 12(b) の真ん中と右側のモデル図に描写されている。さらに、MeV 級照射イオンを IBIEC に使用するメリットは、非弾性散乱効果で形成される基板中の電子/正孔対濃度が各段に上昇し、それらが再結合するときに放射される輻射エネルギーが格子間原子に吸収されて原子移動を増速する効果も顕著になる。それは何より IBIEC 照射イオンの照射量を減少させる方向にもなり、IBIEC イオン自身が形成する 2 次欠陥の量も減らすことになる。最終的にはアニール後の電気特性向上にもつながる可能性がある。前章の図 7(c) において、4-MeV Si^{2+} の IBIEC 効果と 400-keV Ne^{2+} の IBIEC 効果とを比較すると、明らかな前者の方が顕著に大きいことが明らかに分かる。両照射とも弾性散乱による同空格子点形成体積密度はほぼ同じであるが、20 倍近く大きい非弾性散乱効果によって形成される電子・正孔対体積密度のために大きな IBIEC 効果が生じている。

次の図 12(c) においては vacancy、或いは vacant spaces が存在しない場合の非晶質 Si 層の通常熱処理による欠陥回復を考察する。

図 12(c) は Si 単結晶基板上に Si 非晶質層が存在し、の非晶質層内部に殆ど vacant spaces が存在しない場合に熱処理だけでどのような結晶回復の形態が起こり得るのかを示したマイクロな原子構造モデルである。非晶質 Si 層のエピタキシャル成長温度は 550 から 600°C 程度であることはよく知られている。ただそれは非晶質層の中に希ガスの成分や酸素元素が含まれていない場合に成立する。決定的なのは単結晶基板界面に SiO_2 のような膜が sub-monolayer 程度存在しているだけで熱処理だけでは全くエピタキシャル成長しない。しかし、MeV IBIEC 処理では界面を超えてエピタキシャル成長することは既に、報告している。熱処理だけで容易に成長できるのは例えばイオン注入法に依って非晶質化した場合である。その場合であっても n 型や p 型ドーパント元素によるイオン注入の場合には成長速度はさらに増速されるが、酸素や希ガス成分をイオン注入すると著しく成長レートが減速する。上記図 12(c) は界面に何ら不純物が存在せず、非晶質中にも欠陥や不純物がない場合を想定したモデル図であり、その場合には 550°C ~ 600°C 程度の温度でエピ成長が起こる。このような場合の非晶質 Si 層のマイクロな原子構造は基本的には sp^3 結合が歪んだ形で存在する。もし、何も結合しない状態で電氣的に中性を保った Si 原子が独立にあったとしても、そのような状態の Si 原子の割合は極めて少数である。そして、歪んだ結合状態が

基板の結晶方位にそろった形で整列していくのがエピタキシャル成長であり、そのために必要な活性化エネルギーは 2.3 eV 程度の値であり、エピタキシャル成長温度も 550°C ~ 600°C と比較的高温になる。しかし、図 12(b) で述べたように何らかの外からの刺激（この場合は IBIEC 照射）で非晶質層中に空間 (vacant spaces) を強制的に形成することによりエピタキシャル成長速度を増加させることができる。

最後に、ダイヤモンド基板に P 等の母材原子よりも大きな n 型ドーパント原子をイオン注入し、それらを IBIEC で置換位置に導入して電氣的に活性化させるというプロセスのマイクロな原子機構モデルを説明する。

図 13 は P 等の母材原子よりも大きな n 型ドーパント原子をイオン注入し、それらを IBIEC アニール処理で置換位置に導入して電氣的に活性化させるプロセスのマイクロな原子機構モデルである。IBIEC 照射中の温度は仮に 600°C ~ 800°C を想定しているが、これについては最適化する必要がある。このモデル図から分かるようにイオン注入した P は母材 C 原子とともに結合を形成し、歪んだ状態で存在している。しかし、この状態ではドナー P 原子 (●) の周囲を回っているドナー電子 (●) は歪んでいない結晶格子の中に取り込まれていれば通常の 0.6 ~ 0.7 eV のドナー準位を持つであろうが、左側の非晶質構造の中に取り込まれている場合には全く異なる準位を持っていることが予想される。そこで先ず結晶回復させて P を通常の格子点の置換位置に導入するために IBIEC 処理を行う。それにより置換位置に P を導入するために P 原子の周囲に余裕のある大きな空間 (vacant spaces) を形成する。この空間は例えば divacancy 程度の大きさの空間が一時的に形成されれば、より容易に置換位置に P 原子を導入可能にな

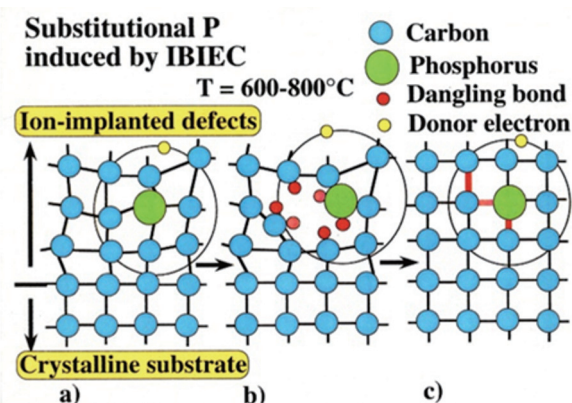


図 13. P 等の母材原子よりも大きな n 型ドーパント原子をイオン注入し、それらを IBIEC で置換位置に導入して電氣的に活性化させるプロセスのマイクロな原子機構モデル。

る。divacancy 程度の大きさの空間を IBIEC による母材非晶質中に形成したのが図 13 の真ん中の図 b) である。一旦このような状態を創成してしまえばあとは自然に 600°C ~ 800°C という温度においてペアの dangling bond (●) が結合を共有して格子構造が回復する。即ち、置換位置という格子点位置に大きな P 原子が取り込まれた状況になる。こうして置換位置を占有する P 原子のドナー電子は 0.6 ~ 0.7 eV の比較的浅いドナー準位を持つことができる。

この章の最後に PIXE 法と RBS-channeling 法に依る追補的な結果を示す。

PIXE と RBS 法による不純物分析

図 14 は Si 単結晶と購入直後の HPHT Ib 型ダイヤモンド基板の RBS-channeling スペクトルである。測定条件は 1.0-MeV He⁺ イオンで青色は単結晶 Si、赤色はダイヤモンドのスペクトルである。この RBS 測定において一番重要視したのは、非常に長時間 He ビームを照射してスペクトルの全体収率を上げたことである。Si の場合はトータル 25.6 μC、ダイヤモンドの場合には 16.6 μC まで蓄積電流量を増加させて測定した。通常の測定条件では 15 分程度の時間で 2 ~ 3 μC 程度の蓄積電流値である。特に今回の Si 試料の場合、SSB 検出器角度を He ビーム入射方向に対して 95° という glancing 角度にして感度を上昇させるとともに、試料の深さ方向分解能も格段に向上させて測定を行なった。

その結果は図に示すように Si に関しては表面に殆ど不純物が存在せず 200 ch 以上の高エネルギー側に現われる収率は殆どすべてのチャンネルにおいて 0 count であった。それに対して HPHT Ib 型ダイヤモンド基板に対しては高エネルギー側の Fe, Co, Ni 等の触媒金属汚染が表面に顕著に観測されているだけでなく、おそらく試料表面のクリーニングに伴う薬液に由来する成分も検出されている。しかし、一番驚愕したのは 100 ch 以上の高エネルギー側で検出されている高収率の background 直線である。これは同図における Si では全く検出されていない。従って、基板表面から奥深くまで一様にドーブされているなにかの不純物と思われる。100 ch 以上の高エネルギー background 直線上に乗っているピークは表面に付着している不純物と思われる。しかしダラダラと一定勾配で減少している background 収率は表面から奥深くまで薄くドーブされている不純物の可能性がある。そしてこの一様ドーブの不純物は前述したように、HPHT 基板合成の際に使用される触媒金属である Fe, Co, Ni 等の元素が合成中に微量に取り込まれている可能性が高いと考えている。結論的

には触媒金属汚染の全くない合成法で製造したダイヤモンド基板を使用すべきであると考えられる。

最後に購入直後の HPHT Ib 型基板の PIXE 法に依る不純物測定を行なった結果を示し、RBS 法に依る測定結果と比較する。

図 15 は購入直後の HPHT 合成の Ib ダイヤモンド

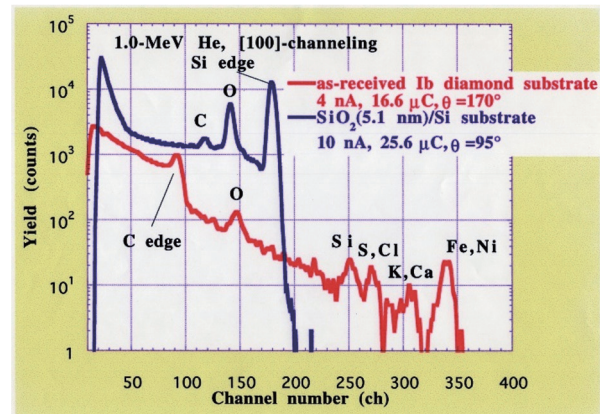


図 14. Si 単結晶と購入直後の HPHT Ib 型ダイヤモンド基板の RBS-channeling スペクトル。

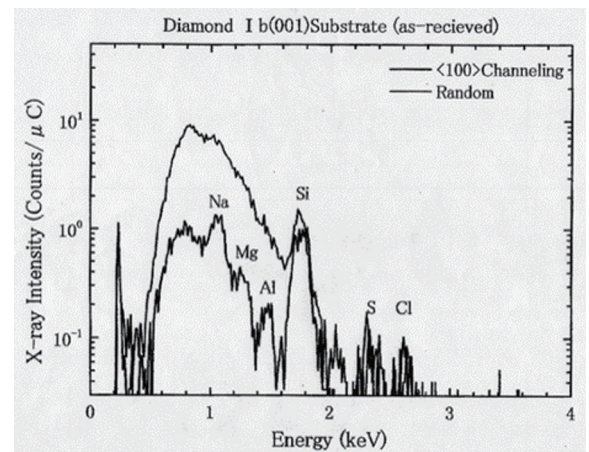
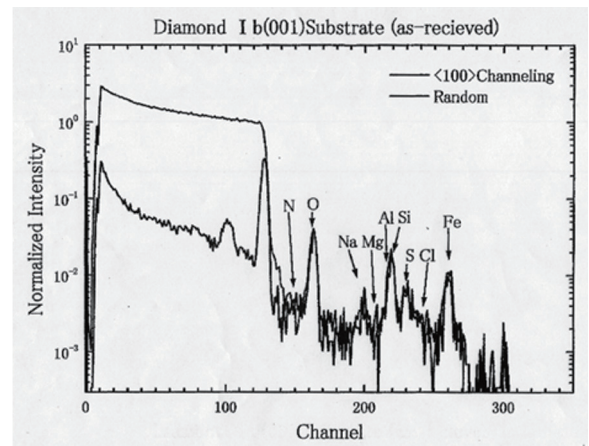


図 15. 購入直後の HPHT 合成 Ib ダイヤモンド基板の PIXE スペクトル。(a): random 方向から陽子ビームを入射させたスペクトル。(b): [100]-channeling 方向から陽子ビームを入射させたスペクトル。

基板のPIXE (Proton Induced X-ray Emission) スペクトルである。(a)は random 方向から陽子ビームを入射させて測定し、(b)は [100]-channeling 方向から陽子(水素)ビームを入射して測定した。PIXE法の原理は1 mm以下の直径とビームの角度分散が 0.03° 以下にコリメートされたMeV級エネルギーの陽子(プロトン)をターゲットに入射し、そこから放出されるX線のエネルギースペクトルを観測する。それにより表面近傍に存在する不純物元素の種類を同定する測定手法である。陽子線はターゲット元素の内殻電子と衝突を起しそれを反跳により跳ね飛ばす。すると内殻電子の位置に原子核の正の電荷により、注目している原子が一価(+)に帯電したイオンになっており、内殻電子雲に+の孔が空いているように見える。その位置に外殻電子が内殻電子の正の孔に落ち込み、そのエネルギー差(勿論外殻電子の方が内殻電子よりも高エネルギーである)に相当するX線をターゲット原子の外に放出する。或いはそのエネルギー差に相当する運動エネルギーを持った電子を外殻から外に放出する。後者の外に放出された電子をAuger(オージェ)電子と呼ぶ。

(a)のRBS-channelingスペクトルから明らかなように、表面に吸着或いは析出している各種不純物のスペクトルが明らかに検出されている。但し、100 ch付近にあるピークは母材C原子よりも軽いため、ダイヤモンド合成中に形成された何らかの欠陥によるピークの可能性が高い。

(b)のPIXEスペクトルでも(a)と殆ど同じ不純物元素が検出されている。しかし、PIXE法はRBS法と比較すると定量性があまりない。RBSはダイヤモンドの母材元素Cの体積密度が正確に分かっているので、それを標準試料として収率を同時測定しているので、表面不純物の面積密度が正確に定量可能である。従って定量性は極めてよい。しかし、PIXEの場合は別途標準試料を用意して測定しなければならず、定量性という点に関しては今一つというところである。また、(b)のスペクトルからは0.2 keV ~ 2 keV付近まで制動放射(Bremsstrahlung)と呼ばれる輻射エネルギー(電磁波)を放出する。これはPIXEスペクトルを測定する際の大きなbackgroundとして観測される。陽子で叩き出された電子が測定系を構成する構造物と衝突して静止する時に起こる現象である。このbackgroundはchanneling方向から陽子を入射する、或いは入射陽子のエネルギーを低減することにより減少させることができる。しかし定量性に関してはPIXE法のネックの一つである。ただ不純物元素の種類は放出されるX線のエネルギーから正確に同定できるというメリットはRBS以

上であろう。

いずれにしても、二つの測定法を相補的に使用することが肝心である。

まとめと今後の展望

本実験では、Ib型HPHTダイヤモンド基板上にホモエピタキシャル成長させて厚さ $0.13\ \mu\text{m} \sim 0.18\ \mu\text{m}$ のCVD膜を堆積させた。CVD直後の試料に関しては、その後4-MeV Si^{2+} を660°Cで $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 照射して電極間の抵抗測定を行なって $10^{11} \sim 10^{13}\ \Omega$ の抵抗を測定し電流が流れることを確認した。また3-MeV Ne^{2+} イオンを750°Cで $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 照射して低温領域における電極間抵抗測定を行なったが、こちらの方は高抵抗過ぎて電流が流れず、抵抗測定はできなかった。これらCVD試料に対して以下の条件でP注入を室温で行なった。

P注入条件

1) 二重注入

140-keV P $2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ と 50-keV P $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 室温で二重注入した。

2) 多重注入

50 keV ~ 200 keVの間の6段階で照射量を変えて室温で多重注入した。

IBIECアニール条件

1) の二重注入した試料に対して3-MeV Ne^{2+} イオンを750°Cで $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 照射して最後にホール測定を行なった。また二重注入した別試料は4-MeV Si^{2+} を660°Cで $4.2 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 照射して最後に電極間抵抗測定を行なった。

2) の多重注入試料に対して3-MeV Ne^{2+} イオンを750°Cで $1 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ 照射して最後に30°C ~ 190°Cの低温領域範囲で電極間抵抗測定を行なった。

ホール効果でシート抵抗の絶対測定温度の逆数依存性を測定した試料の結果を次に示す。

この試料の履歴は上記に示した二重注入でIBIECアニール条件は3-MeV Ne^{2+} イオンを750°Cで $1 \times 10^{16}/\text{cm}^2$ 照射である。シート抵抗の測定絶対温度の逆数依存性を図6に示した。その際、低活性化エネルギー($\sim 0.37\ \text{eV}$)の低温領域($1000/T(\text{K}) > 1.5$)と高活性化エネルギー($\sim 1.2\ \text{eV}$)を顕現する高温領域($1000/T(\text{K}) < 1.5$)の二通りに分かれることを観測した。これは両者の温度領域で電子キャリアの伝導機構が全く異なることを意味する。

対角電極間抵抗測定の測定結果は以下の通りである。測定温度範囲は30°C ~ 190°Cである。図7(d)に

まとめて示した。この図から明らかなように、アニール条件としては 4-MeV Si の低ドース照射が一番効率が良い。注入した P も二重注入、多重注入に関わらず、電気的に活性化し、P 未注入の as-CVD 試料も意図せず含まれていた N 原子も電気的に同時に活性化できた。

上記の電気測定結果を受けて、P 注入中や IBIEC アニール中に生じる CVD 単結晶薄膜への欠陥導入や回復の機構を考察し、具体的なミクロな原子構造を含むモデルを提案した。

今後の展望として n 型ダイヤモンド作製のために、

- (1) 浅いドナー準位を形成しかつ C 原子と原子半径が近いドーパントの探索をする。
- (2) 導入した不純物の置換および活性化を促す注入プロセス（注入中温度、ポストアニール温度、注入量）の検討をする。
- (3) 液体窒素 温度から 1000°C 近くまでの幅広い温度範囲のイオン注入、さらなる検討する。
- (4) n 型化が期待されるドーパント元素の種類についてそのイオン化エネルギーを、第 1 原理計算を実行する。
- (5) P, As, Sb 等の V 族元素に関して同様に注入温度、ポスト熱処理温度、注入量の最重要パラメータの最適化を行い、イオン注入による n 型半導体の形成を試みる。

ドーパント N に関しては N 原子はドナー準位が深く、伝導帯の下 1.4 eV ~ 1.7 eV である。注入量にもよるが、室温から n 型を顕現するにはかなり困難を伴う。実際、数百 ppm も CVD 法で N ドープされた Ib 型ダイヤモンド基板では 200°C ~ 300°C からしか、n 型を顕現しなかった。しかし、ダイヤモンド半導体を構成する母材 C 原子と同程度の原子半径なので B と同様に比較的容易に置換位置に導入できる可能性もある。それ故、N の高ドース注入で高抵抗ではあるが、室温から n 型を顕現できるかもしれない。ドーパント P, As, Sb に関して P のドナー準位は伝導帯の下 0.6 eV ~ 0.7 eV である。As は 0.4 eV で、B のアクセプタ準位とほぼ同じである。Sb は 0.2 eV で一番浅い準位である。この As ドーパントに関してはイオン注入法ではなく CVD 法でドープされた n 型の電気特性が報告されている。その活性化エネルギー（イオン化エネルギー）はドープ濃度によって変化し、 $1 \times 10^{17}/\text{cm}^3 \sim 9 \times 10^{19}/\text{cm}^3$ の範囲で 1.6 eV ~ 0.7 eV と変化するという報告もある⁷⁾。しかし、いずれの n 型ドーパント原子も C よりも原子半径が大

きい。結晶化する際に同時に置換位置にドーパント原子を導入するには非常な困難を伴う。実際、CVD 法で P を同時にドープして n 型薄膜形成を試みると、B を CVD 法でドープして p 型を形成するよりもはるかに困難である。まして、イオン注入で P や As 等の原子半径の大きな元素を置換位置に導入するのは困難であるというのが世界中の共通認識であり常識であった。注入中温度を高温にして注入時に導入される欠陥を減少させても、ポスト熱処理でドーパント原子をうまく置換位置に導入できるかどうかさえも不透明であった。そこでポスト熱処理法に関して以下の新しいアニール方法を提案した。MeV 級イオン照射による新しいポスト熱処理法である。この新しいポスト熱処理方法は、この理学誌論文の First 著者が学位取得時以前に執筆していた各種論文に基づいて発想した⁸⁻¹⁸⁾。Si 半導体分野で使われているイオン注入技術は数十 keV ~ 100 keV 程度の注入エネルギーで半導体ドーパント等のイオン注入を行うことが主流である。First 著者は数 MeV 程度のエネルギーで深い注入層を形成して Si デバイスを作製することを主眼に、その基本的な照射損傷や注入イオンの詳細な分布を研究してきた。その中で MeV 級イオン照射が Si 基板に与えるダメージが計算値よりも著しく減少していることに気が付いた。これはいわゆる照射中欠陥アニールとも呼ぶべき現象 SIBA (Self Ion Beam Annealing) である⁹⁾。この SIBA 機構を徹底的に検討する中で得た結論は以下の様である。

MeV 級イオンの原子核的弾性衝突で形成される空格子点・格子間原子が再結合して結晶が回復する際に、MeV 級イオン照射に伴う電子的非弾性散乱で多量の電子・正孔対が形成される。それらが再結合して輻射エネルギーが解放されるときに、空格子点・格子間原子の拡散係数が輻射エネルギーにより増速されて効率的に結晶が回復するという機構が働いていると推論した。例えば二価に負にチャージされた拡散係数の大きい空格子点を形成するとか、電子・正孔対が再結合する際に解放される輻射エネルギーが格子間原子に転移され、空格子点・格子間原子の再結合（再結晶化）を促進・増速する。こうして、SRIM2013 計算値よりも格段に少ない注入欠陥のみ Si 基板に残っているだけで、照射中の欠陥回復が室温でも活発に行なわれていることが分かった。実はこの MeV 級イオンは、基板単結晶表面上に非晶質 Si 層が存在している時に照射すると、非晶質 Si 層を 300°C 以下の極めて低温で Si 基板単結晶の結晶方位と同じ結晶方位に 2 次元エピタキシャル成長させる働きがあることが分かったのである⁸⁻¹⁸⁾。この現象は

Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization (IBIEC) と呼ばれ、既に数多くの研究者たちによってその機構も含めて十分に検討されている。これらの知見をまとめて本論文の First 著者は東京大学から理学博士の学位を取得した。また、この現象を低温における大面積 SOI(Si On Insulator) 構造形成に応用し、2 つの特許も取得している^{19, 20)}。イオン照射で進行する低温エピタキシャル成長現象は、通常熱処理による固相エピタキシャル成長が熱平衡過程による単結晶化現象なのに対して、非熱平衡過程による低温度における結晶化現象である。この IBIEC がダイヤモンド単結晶にイオン注入した P や As のような C 原子よりも原子半径が大きい元素を置換位置に導入することを、その非熱平衡的な特長ゆえに可能ならしめると考えた。すなわち MeV 級 IBIEC は照射直後、個別のイオン飛跡の周囲に多量の空格子点・格子間原子対を形成する。それらが基板温度によって決定される拡散係数で移動して再結合して結晶回復が起こる。さらにその飛跡に垂直な方向に空格子点と格子間原子が熱拡散により移動する。その途中の移動の段階で再結合して結晶が回復するのであるが、その移動の速度を増速する役割を担っているのが電子・正孔対の再結合に伴って放出される放射のエネルギーである。即ち、空格子点と格子間原子対と同時形成される多量の電子・正孔対が再結合する時に解放される放射エネルギーが、格子間母材原子や格子間位置にあるドーパント原子に転移される。そして熱振動状態にあるそれら原子に転移された放射エネルギーが加わり、格子間位置にある母材原子やドーパント原子が格子点位置(置換位置)に大きく変位する。即ち、母材格子間原子は空格子点との再結合後に再結晶化する。また、格子間ドーパント原子を空格子点に導き、そこで置換されて電氣的に活性化される¹³⁻¹⁸⁾。その結果、MeV 級イオン照射は注入ドーパント元素を効率的に置換位置に導入して電氣的に活性化させることが期待できると推論した。そのみならず、MeV 級 IBIEC によりアニールするとその低温での結晶性回復現象により、1 次欠陥がアニール中に 2 次欠陥に成長する可能性も低いのではないかと推測している。すなわち Si プロセスの場合、注入されたドーパント原子を活性化させる手法として、最初に低温(500°C ~ 600°C)でエピタキシャル成長させて 1 次欠陥を消滅させ、続いて 1000°C 以上の高温で注入ドーパントイオンの活性化と 2 次欠陥の発生を抑えるという 2 段階アニールを行なうことが有用であるという報告がある。最初から低温(電気炉による通常熱処理で起こる固相エピタキシャル成長温度よりもさらに低い温度)でアニール処理を

一度で済ませれば、ダイヤモンド基板に対してドーパント原子を置換位置に効率的に導入すると同時に 2 次欠陥形成も抑制できるので結果的に sub-band 形成も抑制できる。その帰結として Hopping 伝導さえも抑えることが出来るのではないかと考えている。

謝辞

本研究の一部は、2021 年度の神奈川大学総合理学研究所共同研究助成金(RIIS202102)の援助を受けた。

文献

- 1) Koizumi S, Kamo M and Sato Y (1997) Growth and characterization of phosphorous doped {111} homoepitaxial diamond thin films. *Appl. Phys. Lett.* **71**: 1065.
- 2) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J (2019) Remarkable p-type activation of heavily doped diamond accomplished by boron ion implantation at room temperature and subsequent annealing at relatively low temperatures of 1150 and 1300 °C. *Appl. Phys. Lett.* **115**: 072103.
- 3) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J (2020) Electrical properties and conduction mechanisms of heavily B⁺-ion-implanted type IIa diamond : effects of temperatures during the ion implantation and postannealing upon the electrical conduction. *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**: 021003.
- 4) Shigematsu S, Oishi T, Seki Y, Hoshino Y, Nakata J and Kasu M (2021) *Jpn. J. Appl. Phys.* **60**: 050903 .
- 5) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J, *J. Appl. Phys.* **129**: 195702 (2021).
- 6) Ziegler JF, Biersack JP and Littmark U (1985) The stopping and range of ions in solids, (Oxford: Pergamon Press). <http://srim.org/>
- 7) Kasu M and Kubovic M (2010) Arsenic-doped n-type diamond grown by microwave-assisted plasma chemical vapor deposition, *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**: 110209.
- 8) Nakata J, Takahashi M and Kajiyama K (1981) In situ self ion beam annealing of damage in Si during high energy (0.53MeV-2.56MeV) As⁺ ion implantation, *Jpn. J. Appl. Phys.* **20**: 2211-2221.
- 9) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low temperature recrystallization of amorphous silicon by high-energy ion beam, *Appl. Phys. Lett.* **40**: 686-688.
- 10) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low temperature ($\leq 300^\circ\text{C}$) annealing of amorphous Si by scanned high energy heavy ion beam. In: Proceedings of the 13th conference on solid state devices, Tokyo, 1981. *Jpn. J. Appl. Phys.* **21** (Supplement 21- 1): 211-216.
- 11) 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.* **B43**: 14643-14668.
- 12) Nakata J (1994) The role of inelastic electronic scattering in low-temperature crystallization of amorphous Si under high-energy heavy-ion beam

- irradiation. Invited lecture to the international conference on the application of accelerators in research and industry november 7-10, Denton, Texas, U.S.A.
- 13) 中田穰治 (1995) 『イオンビーム誘起低温結晶成長』—その機構と応用—. 荷電粒子ビームの工業への応用 132 委員会第 129 回講演会論文集 1-8 頁. pp.1-8.
 - 14) Nakata J (1996) Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **79**: 682-698.
 - 15) Nakata J (1996) Reply to comment on evidence of enhanced epitaxial crystallization at temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **80**: 4235-4239.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) Nakata J (1999) Annealing of ion implanted defects in diamond by MeV ion-beam irradiation. *Phys. Rev.* **B60**: 2747-2761.
 - 19) 中田穰治, 梶山健治 特許第 1316930 号「非晶質膜上の単結晶形成方法」
 - 20) 中田穰治, 梶山健治 特許第 1683801 号「単結晶層上の非晶質層または多結晶層の結晶成長法」

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ノンプラズモニックナノ構造を用いた光マニピュレーション法の探 求

吉田匡志¹ 坪井泰之² 東海林竜也^{1,3,4}

Development of Optical Tweezers based
on Non-plasmonic Nanostructures

Masashi Yoshida¹, Yasuyuki Tsuboi² and Tatsuya Shoji^{1,3,4}

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

² Division of Molecular Materials Science, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan

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

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

Abstract: A plasmon-enhanced electric field exerts a strong optical force on nanomaterials, leading to their optical trapping on plasmonic nanostructures. Such nanostructure-assisted optical manipulation techniques may become a promising tool for manipulation of nanomaterials. Recently, we demonstrated stable optical trapping of polymeric nanobeads on a nanostructured titanium surface (B-Ti). Irradiation of an incoherent weak UV light source resulted in optical trapping of numerous nanobeads on an irradiated black-Ti surface area: nanostructured Ti-assisted optical tweezers (NASTiA-OT). Such laser-free optical trapping behavior would be caused by an electric-field enhancement effect of nanostructured TiO₂ as a passive layer of black-Ti surfaces. However, the precise trapping mechanism is still under debate. In the present study, we demonstrate optical trapping of polystyrene nanospheres on black-Ti surfaces fabricated by an acid-etching process. Acid treatment resulted in wrinkle-like nanostructures on titanium surfaces. Irradiation of nanostructures with near-infrared laser light led to optical trapping of polystyrene nanospheres. We discuss the formation mechanism of B-Ti based on the redox reaction, and trapping mechanism based on calculation of the local electric field with the finite element method.

Keywords: optical tweezers, optical force, polystyrene nanospheres, fluorescence microscopy

序論

高分子微小球や油滴、乳酸菌などのマイクロメートルサイズの微粒子が分散した溶液中にレーザー光を強く集光すると、光電場内の微粒子には光の力学作用である光圧が作用する。溶媒よりも屈折率の高い透明誘電体のマイクロ粒子の場合、光圧は焦点方向に作用するため、レーザー光出力が十分に大きければ微粒子を集光位置にて捕捉できる。この光圧によるマイクロ粒子捕捉・操作法は、1970年代にベル研究所の Arthur Ashkin が実現した¹⁾。さらに1986年には、現在市販化されている光ピンセット装置の原

型も開発した²⁾。

この光ピンセットは比較的簡便敏な装置（光学顕微鏡に備えられた高開口数の対物レンズで1本のレーザー光を集光する）で使用できることも相まって、光学・物理学・生物学を含む様々な分野にて発展した。例えば、光ピンセットの生物学分野への応用は1980年代後半から取り組まれている。タバコモザイクウイルスや³⁾、赤血球や緑藻、酵母菌、さらにアメーバのような原生生物などの光捕捉も実現している⁴⁾。このような光捕捉・操作に加えて、特

に生物物理学では細胞や細胞小器官、生体分子などの力学特性解析のツールとして光ピンセットは重宝されている。例えば、1本のDNAの両末端に高分子マイクロ粒子を化学結合させ、マイクロ粒子を2本の集光レーザー光でそれぞれ光捕捉し、伸縮させることによりDNAの引っ張り応力を非破壊・非接触で分析できる⁵⁾。このほかにも、液液相分離⁶⁾や感熱応答性ゲルの体積相転移⁷⁾などの誘導、気液界面近傍におけるタンパク質⁸⁾や有機分子^{9,10)}の結晶化や凝集誘起発光の制御¹¹⁾、顕微分光学的手法を組み合わせた捕捉粒子の構造解析¹²⁾など、様々な応用が挙げられる。

この光ピンセット技術をさらに応用展開するには、ナノメートルサイズの捕捉・操作法の確立が必要不可欠である。これまでにDNA、タンパク質、鎖状高分子、ケイ素や金などの無機ナノ粒子などの光捕捉が実現されている^{13,14)}。しかしながら、すべからくナノ物質を光圧によって捕捉できるかと言うと、いまだ超えなければならない問題がいくつか残っている。その内のひとつが、捕捉対象物のサイズが小さくなると光圧は極めて弱くなることである。光の波長よりも小さなナノ粒子に働く光圧 F は、近似的に次の式で与えられる

$$F = \frac{1}{2} \alpha V E^2 \quad (1)$$

ここで α は捕捉対象物の分極率、 E は光電場である。分極率はClausius-Mossottiの関係式より

$$\alpha = 3V\epsilon_0 \frac{\epsilon_r - 1}{\epsilon_r + 2} \quad (2)$$

で与えられる。 V は捕捉対象物の体積、 ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ_r は比誘電率である。(1)、(2)式よりたとえば捕捉対象物が球体の場合($V=4\pi a^3/3$, a は粒子半径)、粒径が10分の1小さくなると(例100 nm \rightarrow 10 nm)光圧は1000分の1まで弱くなることを示している。光圧によりナノ粒子を安定的に捕捉するためには、光圧のポテンシャルエネルギー($U = \alpha E^2/2$)が熱揺らぎのエネルギー $k_B T$ (k_B : ボルツマン定数、 T : 温度)よりも上回らなければならない。

このようなナノ粒子に働く光圧を増幅させる方法として、ナノ構造体の電場増強効果が注目されている。金ナノ構造体の局在型表面プラズモンを用いた光ピンセット(プラズモン光ピンセット)は、その代表的な方法論のひとつである¹⁵⁻¹⁷⁾。このプラズモン光ピンセットを用いると、従来の集光レーザー型光ピンセットよりも効率的にDNAや高分子鎖などのナノ粒子を捕捉できる。さらに近年、我々は新しい学理に基づくナノ増強型光ピンセットを

開発した。それが、ナノチタン増強光ピンセット(Nanostructured titanium-assisted optical tweezers; NASTiA-OT)である¹⁸⁾。チタン単結晶基板をプラズマドライエッチングすることで黒色化したブラックチタン(black titanium; B-Ti)の表面には、無数のナノニードル構造が付与されている。このB-Ti表面に紫外線光を照射すると、溶液中のポリスチレンナノ粒子が捕集されることを見出した。注目すべきは、このとき使用した光源であり、これまでの光ピンセットではレーザー光(コヒーレント光)が用いられるが、本研究では高圧水銀灯を用いた。インコヒーレント光にも関わらず、粒子の光捕捉を達成したことが極めて興味深い。しかしながら、その捕集メカニズムについては十分に理解できていないのが現状である。具体的には、なぜこのような現象が引き起こされたのか、どのようなナノチタン構造体が最も光捕捉に適しているか、レーザー光を用いると捕捉効率は向上するのか、といった基礎的知見はいまだ明らかではない。

そこで本研究では、B-Ti構造体の作製法から検討し、NASTiA光ピンセットの機能と特徴の解明を目指す。先行研究で作製したB-Tiはプラズマドライエッチングにより得ているが、本研究では酸腐食によるB-Ti作製を新たに試みた。酸腐食で得られたB-TiによるNASTiA光ピンセットが実現できれば、ナノ構造体作製のコスト削減と大面積化が期待できる。

材料と方法

B-Tiの作製

純チタンは耐食性に優れた金属として有名であるが、これはチタン表面に極めて安定な不動態の酸化膜が形成されることに起因する。一方で、高温高濃度塩化物溶液やHCl/H₂SO₄水溶液中では腐食が発生することが知られている。本研究では既報を参考にB-Tiの作製を試みた¹⁹⁾。具体的には、まず工業用純チタン箔(JIS 1種, Ti > 99.5%, 厚み: 0.015 mm)をアセトンおよび純水で超音波洗浄し乾燥させた。このチタン箔を加熱した混酸(HCl/H₂SO₄)水溶液に所定時間浸漬させた。浸漬後、純水で洗浄、乾燥させ試料とした。走査型電子顕微鏡(scanning electron microscope; SEM)(日本電子社製、JCM-6000 Neo ScopeTM)にて形態観察を行った。

NASTiA光ピンセット

本研究で用いた光学系を図1に示す。光捕捉光源として808 nm近赤外レーザー光を、蛍光励起光源として473 nm青色レーザー光を使用し、2本の

レーザー光を同軸で自作の正立型光学顕微鏡に導入し、100倍油浸対物レンズ(Nikon, 開口数 1.3)により B-Ti 表面に集光した。捕捉挙動を顕微蛍光法により観察した。捕捉試料として、市販品の直径 500 nm の蛍光色素含有ポリスチレン粒子(蛍光極大波長 515 nm)の分散水溶液を使用した。独自の試料セルに試料溶液と B-Ti 基板を封入し、NASTiA 光ピンセットを試みた。

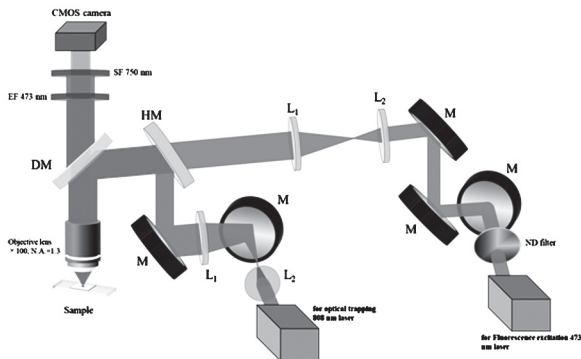


図 1. NASTiA 光ピンセットの光学系概要図.

結果

作製した B-Ti の評価

酸処理後のチタン箔を図 2 (a) に示す。酸処理前では、特有の金属光沢を観察できた。混酸水溶液への浸漬時間の増加に伴い、表面の黒色化が進行した。

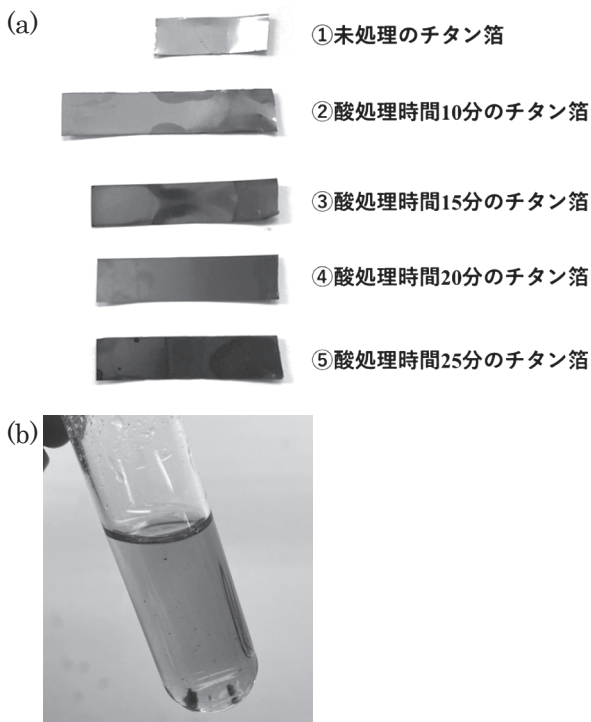


図 2. (a) 酸処理後のチタン箔の形態像。(b) 浸漬時間 25 分後の混酸溶液と崩壊したチタン箔。

浸漬時間 10, 15 分では、金属光沢がまだ残っているが、25 分経過すると表面が均一に黒色化した。25 分以上浸漬すると、図 2 (b) に示すように腐食がさらに進行しチタン箔が崩壊した。チタン箔の浸漬時間の増加に伴い、気泡が発生するとともに混酸溶液が青色を呈した。これは後述するように水素発生と三価のチタンイオン (Ti^{3+}) の生成に起因する。このように作製した B-Ti は、未処理のチタン箔に比べ親水性が向上した。親水性を評価するために接触角測定を試みたが、図 2 (a) に示すように薄膜(厚さ 0.015 mm)のチタン箔が湾曲しているため定量的評価は困難であった。今後はより剛直性の高い十分な膜厚のチタン箔を用いる必要がある。

図 3 および図 4 に B-Ti の SEM 像を示す。浸漬時間の増加とともに腐食が進行し、チタン表面に凹凸が形成されることがわかった。金属光沢の残る浸漬時間 10, 15 分では、腐食により島状構造の凹凸が見られた。金属光沢が消失する浸漬時間 20 分以降では、表面の島状構造は消失し、先端がナノメートルサイズに先鋭化したシワ状模様の微細な構造が現れた。我々はこの構造をナノリンクル(nano-wrinkle)構造と名付けた。このナノリンクル構造により、入射した光が反射せず、結果として黒色に見えるようになったと考えられる。ナノリンクル構造を定量的に評価するため、この構造の深さを計測したところ、浸漬時間 20 分で約 $2.9 \mu m$ 、25 分で約 $4.0 \mu m$ であった。

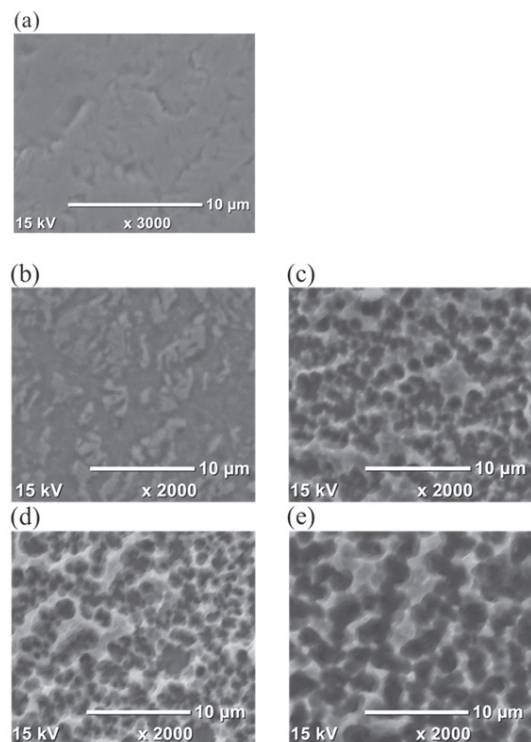


図 3. チタン箔の SEM 像:(a) 酸処理前, 浸漬時間 (b) 10 分, (c) 15 分, (d) 20 分, (e) 25 分。

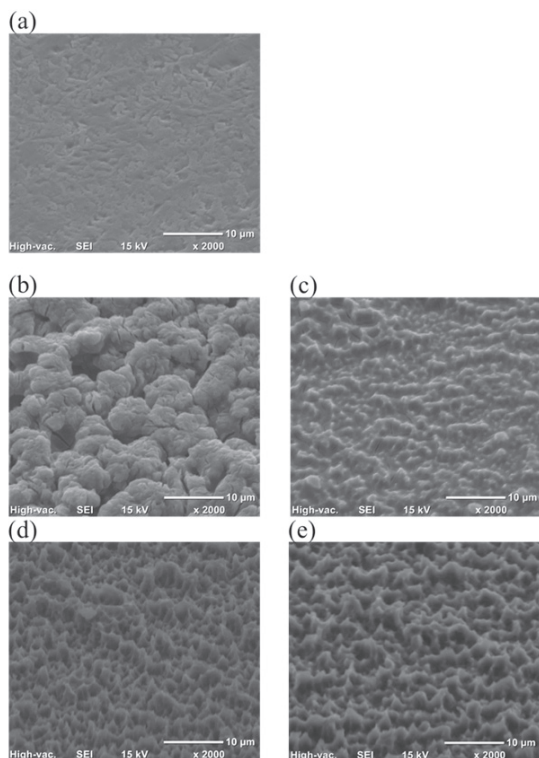


図 4. チタン箔の SEM 像 (傾斜 45 度) : (a) 酸処理前, 浸漬時間 (b) 10 分, (c) 15 分, (d) 20 分, (e) 25 分.

NASTiA 光ピンセットの実験的評価

以上のように作製した B-Ti の光捕捉能を評価すべく、直径 500 nm の蛍光性ポリスチレンナノ粒子 (PS 粒子) を捕捉対象に選び検討した。図 5 に浸漬時間 20 分の B-Ti を用いたときの蛍光顕微鏡像を示す。図内の白色円内が近赤外レーザー光の照射範囲である。近赤外レーザー光を 17 kW/cm² で照射したところ、照射開始 40 秒以内に PS 粒子由来の蛍光像を観察できた。さらに照射を続けると徐々に蛍光像の明るさが増大し、多数の粒子が集合している様子を観察できた。近赤外レーザー光の照射をやめると直ちに捕集された PS 粒子が拡散し溶液内に散逸した。これは近赤外レーザー光の On/Off に対応して繰り返し観察できた。

図 6 に浸漬時間 25 分の B-Ti を用いて、近赤外レーザー光を 17 kW/cm² で照射したときの蛍光顕微鏡像を示す。浸漬時間 20 分のときに比べてより短い時間 (約 30 秒) で粒子が光捕捉された。さらに照射を続けると蛍光像の明るさと面積が図 5 と比べ拡大していることから、より多くの PS 粒子が捕捉されたと考えられる。このときも近赤外レーザー光照射の停止とともに、捕捉粒子が散逸していく様子が観察された。これはすなわち光捕捉にともなう B-Ti 表面への吸着は起こらないことを示している。なお、蛍光像が白色円内の中心位置とずれている様に見えるが、これは蛍光励起光源の青色レーザー光と近赤外

レーザー光の集光位置がずれていることに起因する。より精細な捕捉挙動を追跡するためには、このようなずれの補正だけでなく、抜本的な自作顕微鏡の改善が必要である。本実験より作製した B-Ti を用いた PS 粒子の光捕捉に成功したと結論づけられる。今後、本手法の優位性や特徴を明らかにするためには、未処理の Ti 基板や先行研究の B-Ti 基板を用いた対照実験を綿密に実施する必要がある。

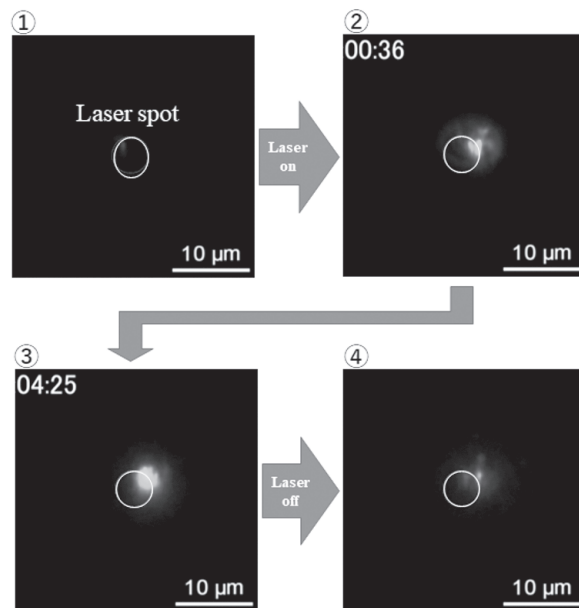


図 5. 浸漬時間 20 分で作製した B-Ti を用いたポリスチレンナノ粒子の光捕捉の蛍光顕微鏡像 (近赤外レーザー光強度 17 kW/cm²).

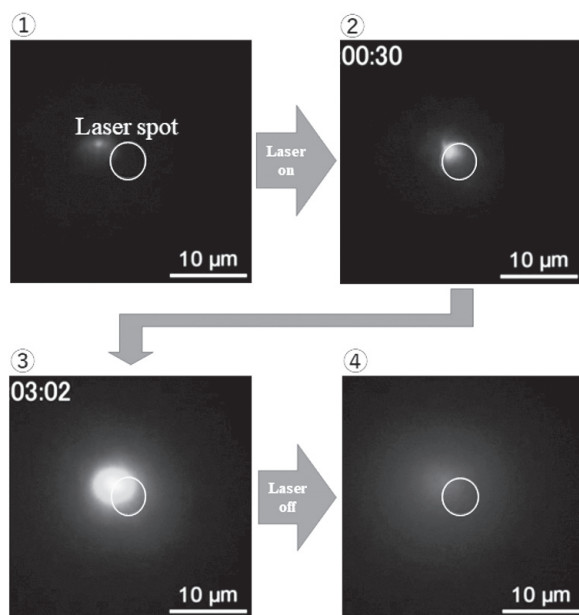


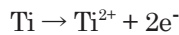
図 6. 浸漬時間 25 分で作製した B-Ti を用いたポリスチレンナノ粒子の光捕捉の蛍光顕微鏡像 (近赤外レーザー光強度 17 kW/cm²).

討論

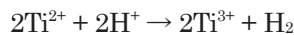
B-Ti を用いた光捕捉メカニズム

本研究の光ピンセット法はいまだ検討段階ではあるが、B-Ti の構造および B-Ti を用いたナノ粒子の捕捉メカニズムについて考察する。

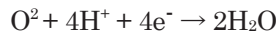
B-Ti 作製に高温混酸 (HCl/H₂SO₄) 水溶液による酸腐食を採用した。塩化物イオンが高濃度で存在する pH が低い高温水溶液では、チタンの不動態膜を破壊し、酸化還元反応による腐食 (孔食) が起こる²⁰⁾。図 7 に示すように、まず不動態膜に Cl⁻ が吸着すると、Cl⁻ とチタンの錯体が形成することで、不動態膜が溶解し微小欠陥が形成される。次に、露出した純チタン表面では、次のアノード反応が進行する。



チタンのイオン化傾向は非常に大きいため (Ti/Ti²⁺ の標準電極電位 $E^{\circ} = -1.63$ [V])、酸性水溶液中では H⁺ が酸化剤としてすみやかに働き、水素ガス H₂ の発生とともに Ti²⁺ は青紫色の Ti³⁺ になる。



アノード反応により生成した電子は不動態膜表面で溶存酸素とともに以下のカソード反応で消費される。



この酸化還元反応により、腐食が進行する。腐食反応後、水溶液中で厚さ数 nm 程度の不動態膜が生成し、チタン側から TiO、Ti₂O₃、TiO₂ となる層構造を形成するとともに内部に結合水を含む²¹⁾。そのため、B-Ti は純チタンに比べ親水性が増加したと考えられる。

このように得られた B-Ti 表面は不動態膜 (TiO₂) を有するナノリンクル構造を形成しており、この構造が入射光の電場増強の役割を果たしていると考えられる。図 8 に有限要素法により求めた増強電場プロファイルを示す。二次元平面でナノリンクル構造を模倣し、厚さ 10 nm の酸化チタン (TiO₂) 層をチタン素地に形成し、入射光 808 nm を照射したときをシミュレーションした。計算条件の最適化はいまだ検討段階ではあるが、基板表面で電場増強効果

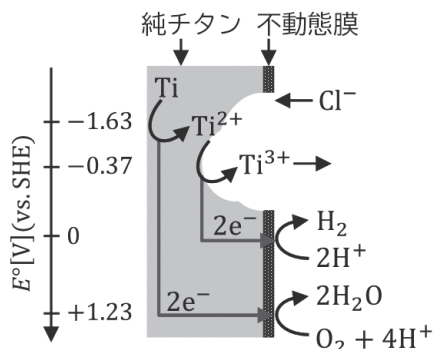


図 7. 高温混酸 (HCl/H₂SO₄) 水溶液中の腐食機構。

(enhancement factor; $EF = E^2/E_0^2$, E ; 応答電場、 E_0 ; 入射光電場) が 5 倍にまで増強することがわかった。これは、先行研究¹⁸⁾ のプラズマドライエッチングで得た B-Ti の増強電場プロファイルともおよそ一致している。緒言で述べたプラズモン光ピンセットとは異なり、B-Ti にはプラズモンの効果は働かない。この増強電場の有力な起源のひとつとして、半導体の Mie 共鳴が挙げられる。例えば Saitow らは、酸化チタンのナノ粒子を数 nm まで近接すると、ナノ粒子近傍で光アンテナ効果により入射光が 2000 倍まで増幅することを見出した²²⁾。本研究で得られた B-Ti にも同様の効果が発現するものと期待できる。今後、NASTiA 光ピンセットとしての機能と特徴を明らかにする。

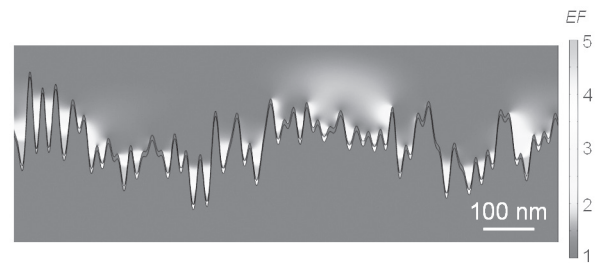


図 8. B-Ti 表面近傍の増強電場プロファイル。

謝辞

本研究の一部は、2021 年度神奈川大学総合理学研究共同研究助成 (RIIS202103)、科研費 (20K05558) を受けて実施した。

文献

- 1) Ashkin A (1970) Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24**: 156-159.
- 2) Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE and Chu S, (1986) Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* **11**: 288.
- 3) Ashkin A and Dziedzic JM (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*. **235**: 1517-1520.
- 4) Ashkin A (2000) History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **6**: 841-856.
- 5) Perkins TT, Quake SR, Smith DE and Chu S (1994) Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*. **264**: 822-826.
- 6) Ushiro K, Shoji T, Matsumoto M, Asoh TA, Horibe H, Katsumoto Y and Tsuboi Y (2020) Microanalysis of single poly(N-isopropylacrylamide) droplet produced by an optical tweezer in water: Isotacticity dependence of growth and chemical structure of the Droplet. *J. Phys. Chem.* **124**: 8454-8463.
- 7) Juodkazis S, Mukai N, Wakaki R, Yamaguchi A, Matsuo S and Misawa H (2000) Reversible phase transitions in polymer gels induced by radiation

- forces. *Nature*. **408**: 178-181.
- 8) Yuyama K, Chang KD, Tu JR, Masuhara H and Sugiyama T (2018) Rapid localized crystallization of lysozyme by laser trapping. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**: 6034-6039.
 - 9) Yuyama K, Chiu DS, Liu YE, Sugiyama T and Masuhara H (2018) Crystal growth and dissolution dynamics of L-phenylalanine controlled by solution surface laser trapping. *Cryst. Growth Des.* **18**: 7079-7087.
 - 10) Yuyama K, Islam MJ, Takahashi K, Nakamura T and Biju V (2018) Crystallization of methylammonium lead halide perovskites by optical trapping. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**: 13424-13428.
 - 11) Wang S, Lin J, Ishiwari F, Fukushima T, Masuhara H and Sugiyama T (2020) Spatiotemporal dynamics of aggregation - induced emission enhancement controlled by optical manipulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**: 7063-7068.
 - 12) Yang J, Zhang RN, Liu DJ, Zhou X, Shoji T, Tsuboi Y and Yan H (2018) Laser trapping/confocal raman spectroscopic characterization of PLGA-PEG nanoparticles. *Soft Matter*. **14**: 8090-8094.
 - 13) Dienerowitz M, Mazilu M and Dholakia K (2008) Optical manipulation of nanoparticles: A Review. *J. Nanophotonics*. **2**: 021875.
 - 14) Sugiyama T, Yuyama K and Masuhara H (2012) Laser trapping chemistry: from polymer assembly to amino acid crystallization. *Acc. Chem. Res.* **45**: 1946-1954.
 - 15) Yuan Y, Gu C, Huang S, Song L and Fang F (2020) Advances on studying optical forces: optical manipulation, optical cooling and light induced dynamics. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **53**: 283001.
 - 16) Shoji T and Tsuboi Y (2015) Plasmonic optical trapping of soft nanomaterials such as polymer chains and DNA: Micro-patterning formation. *Opt. Rev.* **22**: 137-142.
 - 17) Corsetti S and Dholakia K (2021) Optical manipulation: advances for biophotonics in the 21st century. *J. Biomed. Opt.* **26**: 1-23.
 - 18) Hashimoto S, Uenobo Y, Takao R, Yuyama K, Shoji T, Linklater DP, Ivanova E, Juodkazis S, Kameyama T, Torimoto T and Tsuboi Y (2021) Incoherent optical tweezers on black titanium. *ACS Appl. Mater.* **13**: 27586-27593.
 - 19) Okada M, Hara ES, Yabe A, Okada K, Shibata Y, Torii Y, Nakano T and Matsumoto T (2020) Titanium as an instant adhesive for biological soft tissue. *Adv. Mater.* **7**: 1902089.
 - 20) 木村雄二 (2010) 溶接接合教室—基礎を学ぶ—. *溶接学会誌*. **79**: 39-48.
 - 21) Shibata T and Zhu Y (1993) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of anodic oxide film on titanium. *電気化学および工業物理化学*. **61**: 853-856.
 - 22) Hanatani K, Yoshihara K, Sakamoto M and Saitow K (2020) Nanogap-rich TiO₂ film for 2000-fold field enhancement with high reproducibility. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**: 8799-8809.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

フェナントリジン部位をもつ N,C,S-ピンサー鉄錯体の合成と分光学的性質

塩谷直樹¹ 藤井 翔¹ 伊藤亮孝² 中島 洋³ 廣津昌和^{1,4,5}

Synthesis and Spectroscopic Properties of N,C,S-Pincer Iron Complexes Bearing a Phenanthridine Moiety

Naoki Shioya¹, Sho Fujii¹, Akitaka Ito², Hiroshi Nakajima³
and Masakazu Hirotsu^{1,4,5}

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

² Graduate School of Engineering, Kochi University of Technology, 185 Miyanokuchi, Tosayamada, Kami City, Kochi 782-8502, Japan

³ Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi-ku, Osaka City, Osaka 558-8585, Japan

⁴ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

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

Abstract: Thiolate iron complexes with a phenanthridine moiety were synthesized from 4-(benzo[*b*]thiophen-2-yl)phenanthridine. The photoreaction of pentacarbonyl iron with the ligand precursor afforded the diiron carbonyl complex $[\text{Fe}_2(\text{L}^3)(\text{CO})_5]$, where L^3 is a dianionic N,C,S-tridentate ligand containing thiolate S, vinyl C, and phenanthridine N. The diiron complex was converted to the N,C,S-pincer iron(II) complex *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^3)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ by reaction with an excess amount of trimethylphosphine. The electronic absorption spectrum of *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^3)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ was compared with those of the analogous iron(II) complexes *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^1)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ and *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^2)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$, where L^1 contains thiolate S, phenyl C, and pyridine N, and L^2 contains thiolate S, vinyl C, and quinoline N. For *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^3)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$, an intense band was observed at around 500 nm, which is due to the transition from the orbitals around the thiolate-containing metallacycle to phenanthridine moiety. The corresponding absorption band of *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^2)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ appears in a similar region at a lower intensity. These bands are red-shifted compared with *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^1)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$, which is attributed to the π systems containing the vinyl moiety. The higher intensity and red-shift for the phenanthridine-based iron(II) complex are consistent with the TD-DFT calculations of these three N,C,S-pincer iron(II) complexes.

Keywords: iron complex, benzothiophene derivatives, N,C,S-tridentate ligand, phenanthridine, charge transfer transition, electronic spectrum

序論

可視領域に金属-配位子電荷移動 (MLCT) 吸収帯をもつルテニウム錯体が、色素増感太陽電池や光触媒反応の光増感剤として広く利用されてきた¹⁻³⁾。近年は地球上に豊富な元素の利用が求められており、同族の鉄を中心金属とする増感剤や有機色素の開発が進められている⁴⁻⁶⁾。鉄錯体は金属内遷移に基づく励起状態 (MC 状態) の準位が低いいため、MLCT 遷

移により生じる励起状態が MC 状態を経て速やかに失活する点が問題であった^{5,6)}。そこで、強い σ 供与性配位子となる N-ヘテロ環状カルベン (NHC) が導入され、鉄錯体においても励起状態の長寿命化が可能であることが示された^{7,8)}。最近では、含窒素複素環配位子を基調とする低スピン型鉄 (II) 錯体を用いて、励起状態に関する研究が進められている^{9,10)}。

我々は図1に示すジアニオン性のN,C,S⁻三座配位子(L¹)を開発し、2つのリン配位子と1つのカルボニル配位子を有する低スピン型のN,C,S⁻ピンスー鉄(II)錯体 *trans*-[Fe(L¹)(CO)(PMe₃)₂] (1) (図2)が、400 nm 付近にMLCT遷移を含む吸収帯を示すことを見いだしている¹¹⁻¹³。この吸収帯はチオラトメタラサイクル周辺の軌道からフェニルピリジン骨格の反結合性π軌道への電荷移動遷移であることから、アクセプターとなるピリジン部位に芳香族置換基の導入が検討された¹⁴。その結果、ピリジン環4位に芳香族置換基を導入することで、500 nm よりも長波長側のショルダー部分で遷移確率が増大することが明らかとなった。中央のフェニル基部分をビニル基とし、ピリジン部分をキノリンに変更した配位子(L²) (図1)では、メタラサイクルのπ電子系が異なるため、大きな吸収帯の変化が予想される。実際、類似のN,C,S⁻ピンスー鉄(II)錯体 *trans*-[Fe(L²)(CO)(PMe₃)₂] (2) (図2)では、500 nm 付近に強い吸収帯が現れており、錯体1に比べて大きく長波長側にシフトしている¹⁵。

本研究では、錯体2のMLCT遷移においてアクセプター部位となるキノリン部分に変更を加え、MLCT吸収帯が受ける影響を調査した。キノリン部分をフェナントリジンに変更することでπ電子系を拡張した配位子(L³) (図1)を設計し、その鉄(II)錯体を合成した後、得られた電子吸収スペクトルを量子化学計算により評価した。

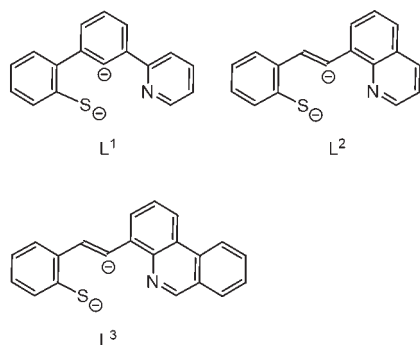


図1. N,C,S⁻三座配位子(L¹, L², L³)の構造。

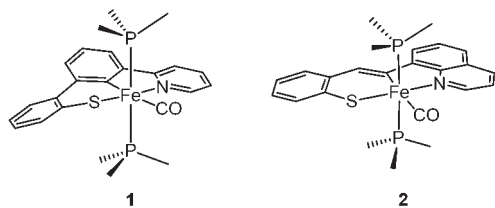


図2. N,C,S⁻三座配位子, リン配位子, カルボニル配位子をもつ鉄(II)錯体 *trans*-[Fe(L¹)(CO)(PMe₃)₂] (1) および *trans*-[Fe(L²)(CO)(PMe₃)₂] (2)。

材料と方法

実験手法と測定機器

鉄錯体の合成はグローブボックスもしくはシュレンク法を用いて行った。光反応には石英ガラス製水冷保護管を備えた高圧水銀灯 HL400BH-8 (400 W、セン特殊光源株式会社)を用いた。IR スペクトルは、KBr 錠剤法を用いて Jasco FT/IR-4600 分光計により測定した。NMR スペクトルは JEOL ECA-400、ECS-400 FT-NMR 分光計により測定した。UV-Vis 吸収スペクトルは Jasco V-770 分光光度計を用いて測定した。

4-ブロモフェナントリジンは文献の方法により合成した¹⁶。ベンゾチオフェン誘導体および鉄錯体は図3に従って合成した。

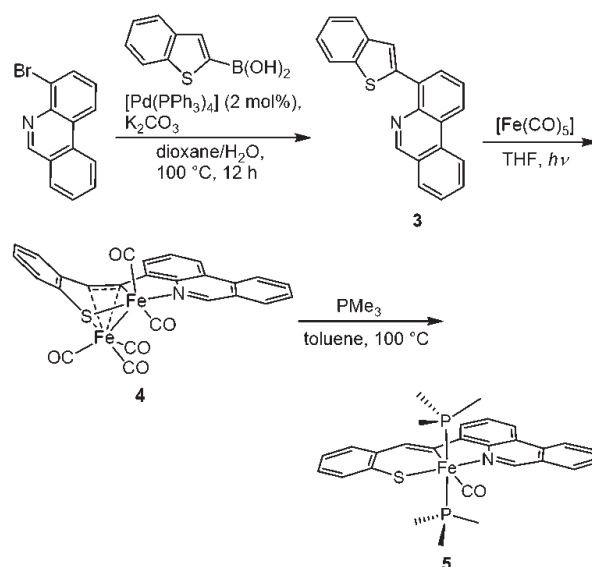


図3. 配位子前駆体3, 二核鉄錯体4, 単核鉄(II)錯体5の合成。

4-(ベンゾ[b]チオフェン-2-イル)フェナントリジン(3)の合成

炭酸カリウム (270 mg, 2.0 mmol) の水溶液 (3 mL) と 1,4-ジオキサン (12 mL) を混合し、窒素ガスを 30 分間通じた。ベンゾ[b]チオフェン-2-ボロン酸 (150 mg, 0.84 mmol)、4-ブロモフェナントリジン (200 mg, 0.77 mmol)、[Pd(PPh₃)₄] (17.8 mg, 0.015 mmol) を加え、窒素気流下、100 °C で 5 時間加熱攪拌した。得られた褐色溶液に水 (30 mL) を加えた後、ジクロロメタン (60 mL) で抽出した。抽出液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去することで褐色油状物を得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: ジクロロメタン/ヘキサン = 1/1) で精製し、3 の白色固体を得た (130 mg, 54%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.43 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.61 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 8.20 (dd,

$J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.94-7.85 (m, 3H), 7.79-7.73 (m, 2H), 7.40-7.31 (m, 2H).

二核鉄錯体 $[\text{Fe}_2(\text{L}^3)(\text{CO})_5]$ (4) の合成

窒素で満たされたグローブボックス内でテフロンコック付き石英シュレンク管に配位子前駆体 **3** (30.0 mg, 0.096 mmol)、 $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$ (0.026 mL, 0.20 mmol)、THF (5 mL) を加えた。得られた淡黄色溶液をグローブボックスから取り出し、凍結脱気を3回行った後、高圧水銀灯で光照射を8時間行った。反応後、暗褐色溶液を減圧下で溶媒留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：ジクロロメタン/ヘキサン = 2/1）で精製し、目的物を含む溶離液を濃縮した。得られた黒色固体を少量のテトラヒドロフラン（約 1 mL）に溶解し、セライトを通してろ過し、ろ液の上部にヘキサンをゆっくりと加え、 -30°C で2日間静置した。上澄み液をデカンテーションにより取り除きヘキサンで洗浄した後、減圧下で乾燥し、錯体 **4** の黒色結晶を得た (34.5 mg, 63%)。 ^1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ 9.49 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.26-7.17 (m, 2H), 7.10 (dd, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H), 7.02-6.93 (m, 3H), 6.79 (td, $J = 7.5, 1.1$ Hz, 1H), 6.48 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 5.88 (s, 1H).

単核鉄(II) 錯体 $\text{trans}-[\text{Fe}(\text{L}^3)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ (5) の合成

シュレンク管中で二核鉄錯体 **4** (22.5 mg, 0.040 mmol) のトルエン溶液 (4 mL) にトリメチルホスフィン (1 M トルエン溶液, 1.2 mL, 1.2 mmol) を加え、 100°C で48時間加熱攪拌した。得られた濃い赤紫色の溶液を減圧下で溶媒留去し、黒紫色の固体を得た。この固体をグローブボックス中でトルエン（約 2 mL）に溶解し、セライトを通してろ過した。ろ液を少し濃縮してヘキサンを加え、 -30°C で5日間静置した。上澄み液をデカンテーションにより取り除きヘキサンで洗浄した後、減圧下で乾燥し、錯体 **5** の赤紫色結晶を得た (16.7 mg, 73%)。 ^1H NMR (C_6D_6 , 400 MHz): δ 9.46 (s, 1H), 8.59 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.94 (d, 2H), 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.20 (ddd, $J = 8.2, 6.0, 2.4$ Hz, 1H), 7.11-7.04 (m, 2H), 6.97 (td, $J = 7.3, 1.3$ Hz, 1H), 6.91 (td, $J = 7.4, 1.5$ Hz, 1H), 0.87 (t, $J = 3.7$ Hz, 18H)。 ^{31}P { ^1H } NMR (C_6D_6 , 160 MHz): δ 15.2 (s)。IR (KBr): $\nu_{\text{CO}}/\text{cm}^{-1}$ 1906, 1899, 1893。UV-Vis (CH_2Cl_2): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 307 (21700), 323 (21800), 420 (6400)^{sh}, 496

(12700), 640 (620)^{sh}.

X線結晶構造解析

Rigaku MicroMax-007HF/ Saturn 724 HG CCD 回折計を用いて、錯体 **5** の結晶の回折データを測定した。CrystalClear プログラムを用いてデータを処理し、解析には WinGX プログラムを用いた。SIR97 を用いて初期構造を決定し、SHELXL-2013 を用いて精密化した。結晶学的データ: Mo $K\alpha$ 線; $0.07 \times 0.14 \times 0.15$ mm; $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{FeNOP}_2\text{S}$; $M = 547.39$; 三斜晶系; $a = 12.373(3)$, $b = 21.848(4)$, $c = 22.004(4)$ Å, $\alpha = 70.652(10)^\circ$, $\beta = 71.220(9)^\circ$, $\gamma = 79.296(11)^\circ$; $V = 5292.7(19)$ Å³; $T = 200$ K; 空間群 $P-1$ (no. 2); $Z = 8$; $D_{\text{calcd}} = 1.374$ Mg/m³; $\mu = 0.791$ mm⁻¹; $F(000) = 2288.00$; 測定反射数 86522; 計算に用いた独立反射数 24095 ($R_{\text{int}} = 0.0913$); 精密化後の R 因子 $R1$ [$I > 2\sigma(I)$] = 0.1103, $wR2$ (all data) = 0.2380; GOF = 1.248 (CCDC 2165577)。

電気化学測定

サイクリックボルタモグラムは ALS/DY2325 バイポテンシオスタットを用いて測定した。支持電解質として Bu_4NPF_6 (0.1 M, 1 M = 1 mol dm⁻³) を含むジクロロメタン溶液を用いて錯体 **5** (5.0×10^{-4} M) の試料溶液を調製し、測定前に窒素ガスでバブリングして脱酸素した。作用電極はグラッシーカーボン電極、対極は白金線、参照電極は Ag/Ag^+ 電極 (0.01 M AgNO_3) を使用した。測定結果の電位は同じ条件で測定したフェロセンの酸化還元電位 ($\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$) を基準として補正した。

結果と討論

配位子前駆体および二核鉄錯体の合成

フェナントリジン骨格を有する N,C,S- 三座配位子 L^3 (図 1) の前駆体として、4-(ベンゾ [b] チオフェン-2-イル) フェナントリジン (**3**) を設計した (図 3)。パラジウム触媒を用いたベンゾ [b] チオフェン-2-ボロン酸と 4-ブロモフェナントリジンのクロスカップリング反応により、目的の配位子前駆体 **3** を良好な収率で得た。

前駆体 **3** とペンタカルボニル鉄の THF 溶液を、高圧水銀灯を用いて光照射し、反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製することで二核鉄錯体 $[\text{Fe}_2(\text{L}^3)(\text{CO})_5]$ (**4**) を得た。 ^1H NMR スペクトル (C_6D_6) において、N,C,S- 三座配位子の中央の配位炭素原子に隣接した炭素上の水素 ($\text{Fe}-\text{C}=\text{CH}$) が高磁場側 (5.88 ppm) に現れることから、そのビニル基が、もう一方の鉄中心に π 配位してい

ると考えられる。また、錯体 4 の IR スペクトルにおいて、CO 伸縮振動に帰属されるシグナルは、既に構造が決定されている L^2 を配位子とする二核鉄錯体 $[\text{Fe}_2(\text{L}^2)(\text{CO})_2]$ に類似していた。これらの結果より、錯体 4 は $\text{Fe}(\text{L}^3)(\text{CO})_2$ ユニットと $\text{Fe}(\text{CO})_3$ ユニットが π 配位、硫黄架橋、Fe-Fe 結合で結びつけられた構造をもつと推定した (図 3)¹⁵⁾。

N,C,S- ピンサー鉄 (II) 錯体の合成と性質

錯体 2 の合成法を参考にして、二核鉄錯体 4 とトリメチルホスフィン (PMe_3) の反応により、軸位にリン配位子を持つ N,C,S- ピンサー鉄 (II) 錯体を合成した (図 3)^{11, 15)}。二核鉄錯体のトルエン溶液に 10 当量の PMe_3 を加え、100°C で加熱攪拌すると暗赤色溶液が得られた。¹H NMR スペクトルより、N,C,S- 三座配位子と PMe_3 を 1:1 の比で含む化合物 A と 1:2 の比で含む目的錯体 *trans*- $[\text{Fe}(\text{L}^3)(\text{CO})(\text{PMe}_3)_2]$ (5) が共存することが分かった。 PMe_3 を追加して反応を行うと化合物 A が減少し錯体 5 が増加することから、化合物 A を中間体 $[\text{Fe}_2(\text{L}^3)(\text{CO})_4(\text{PMe}_3)]$ と予想した。最終的に 30 当量の PMe_3 の存在下、100°C で 48 時間加熱し、再結晶により精製することで錯体 5 を単離した。

鉄 (II) 錯体 5 の構造を単結晶 X 線構造解析により決定した。構造は独立 4 分子として解析したが、基本的な幾何構造は同じであったため、その中の 1 つを図 4 に示した。錯体 1 や錯体 2 と同様、2 つのリン配位子は軸位を占めており、NMR スペクトルから推定される溶液中の構造と一致している。錯体 5 の鉄まわりの代表的な結合距離と結合角を錯体 2¹⁵⁾ と比較したところ、大きな違いは見られなかった (表 1)。一方、硫黄に隣接したベンゼン環とフェナントリジン環がなす二面角は、独立 4 分子の間でばらつきがみられるが (6.2(2)°, 14.5(2)°, 15.2(2)°, 14.9(2)°)、平均値は錯体 2 の 11.9(1)° に近い値となっている¹⁵⁾。

また、錯体 5 のサイクリックボルタモグラムのジ

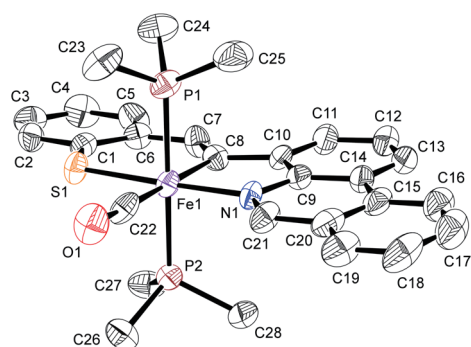


図 4. 錯体 5 の結晶構造 (独立 4 分子の 1 つ, 熱振動楕円体の確率は 50%, 水素原子は省略)。

表 1. 錯体 5 および 2 の結合長 (Å) および結合角 (°)

| | 5 | 2 ¹⁵⁾ |
|------------|-----------------------|------------------|
| Fe1-S1 | 2.2927(16)—2.2998(16) | 2.2895(8) |
| Fe1-N1 | 1.988(4)—1.994(4) | 1.993(2) |
| Fe1-P1 | 2.2426(16)—2.2540(17) | 2.2396(8) |
| Fe1-P2 | 2.2377(16)—2.2488(17) | 2.2365(8) |
| Fe1-C8 | 1.987(5)—1.997(5) | 1.997(2) |
| Fe1-C22 | 1.761(6)—1.766(6) | 1.767(3) |
| S1-Fe1-N1 | 176.68(13)—177.41(13) | 176.86(6) |
| P1-Fe1-P2 | 173.42(6)—173.70(6) | 173.63(3) |
| C8-Fe1-C22 | 179.2(2)—179.5(2) | 176.53(11) |
| C7-C8 | 1.347(7)—1.361(7) | 1.353(4) |
| C1-S1 | 1.756(6)—1.760(5) | 1.759(3) |

クロロメタン中で測定したところ、二段階の一電子酸化過程が -0.57 V および 0.45 V (vs Fc^+/Fc , Fc = フェロセン) に現れた (図 5)。これらはそれぞれ $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ および $\text{Fe}^{\text{IV}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ の酸化還元に対応し、錯体 2 に対して報告されている値 (-0.58 V, 0.46 V) と同等である¹⁵⁾。このことは、キノリン環をフェナントリジン環に変更しても、中心金属の電子的環境があまり変化しないことを示唆している。

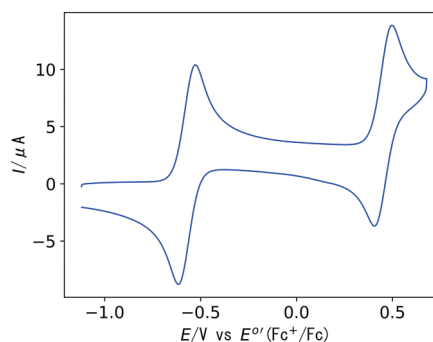


図 5. 錯体 5 (5.0×10^{-4} M) のサイクリックボルタモグラム (溶媒: CH_2Cl_2 , 走査速度: 100 mV s^{-1})。

N,C,S- ピンサー鉄 (II) 錯体の分光学的性質

錯体 1, 2, 5 のジクロロメタン溶液の紫外可視吸収スペクトルを図 6 に示す。錯体 5 においては 400-600 nm にかけて強い吸収帯が見られ、吸収極大波長 496 nm におけるモル吸光係数は $12700 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。また、より長波長側の 600-800 nm にかけて弱い吸収帯が見られる。これらの吸収帯の位置は錯体 2 と類似しており、錯体 1 に比べると大きく長波長側にシフトしている。これら錯体の可視領域の吸収波長は、N,C,S- 三座配位子と鉄からなる N-メタラサイクルと S-メタラサイクルの π 電子系により決まると考えられる。モル吸光係数に着目すると、錯体 5 は錯体 2 よりも全域にわたって大きくなっている。したがって、キノリン部位をフェナントリジンに変更したことの効果は、励起エネルギーよりも遷移確率に顕著に表れるといえる。

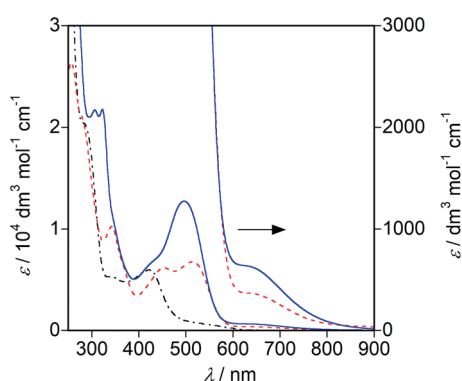


図 6. 錯体 1 (---)、錯体 2 (-·-·)、錯体 5 (-) の吸収スペクトル (溶媒: CH₂Cl₂) .

以上の結果に対して、計算化学による考察を行った。錯体 5 については密度汎関数法 (DFT) により構造最適化を行った後、時間依存密度汎関数法 (TD-DFT) により光物性を評価した。基底関数として 6-311G(d,p) を選び、B3LYP 混成汎関数を用いて Gaussian16 プログラムにより計算した。錯体 1 および 2 については以前に報告した結果を用いて比較した^{14, 15)}。

錯体 2 および 5 について、計算により求めた励起エネルギーと振動子強度を基に描いたスペクトルを図 7 に示す。また、錯体 5 の代表的な分子軌道を表 2 に示す。錯体 2 および 5 においては HOMO-1 → LUMO の成分を含む強い電荷移動遷移が 513 nm ($f = 0.1073$) および 507 nm ($f = 0.1611$) に予測される。一方、錯体 1 における HOMO-1 → LUMO の成分を含む電荷移動遷移は 400 nm ($f = 0.0338$) に予測されている。これらの遷移はいずれもチオラトメタラサイクル周辺の軌道から含窒素複素環周辺の軌道への電荷移動遷移に帰属でき、配位子内遷移と MLCT 遷移を併せもつとみなすことができる。実際のスペクトル (図 6) においても、配位子を L¹ から L², L³ に変更すると、可視領域に観測される強い吸収帯が長波長側にシフトしており、傾向が一致している。錯体 1 では HOMO-1, LUMO とともに中央のベンゼン環上に軌道が広がっているが、錯体 2, 5 では比較的分離しており、 π 電子系の差異が明らかである。

より長波長側に観測されるショルダーも、配位子を L¹ から L², L³ に変更することで長波長側にシフトする。錯体 1 では HOMO → LUMO+1 の成分を含む電荷移動遷移の寄与が大きいと考えられている¹⁴⁾。錯体 2 では HOMO → LUMO+1 の成分を含む遷移は 447 nm ($f = 0.0124$) に予測されるが、錯体 5 では 561 nm ($f = 0.0095$) に予測される。一方、HOMO → LUMO 遷移が錯体 2 では 793 nm ($f =$

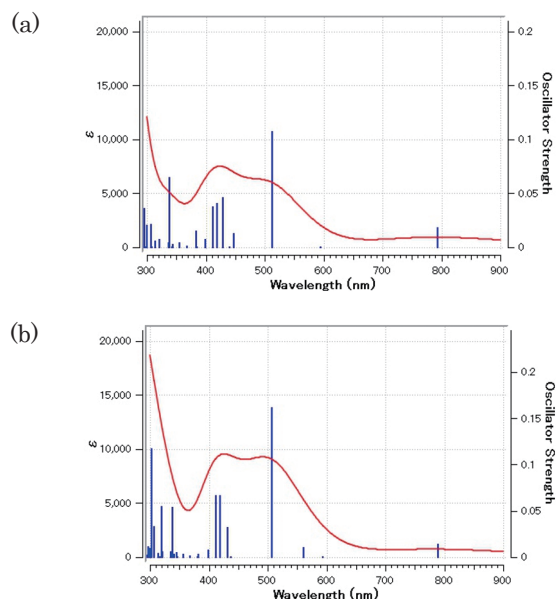


図 7. TD-DFT 計算の結果を基に描いた (a) *trans*-[Fe(L²)(CO)(PMe₃)₂] (2) および (b) *trans*-[Fe(L³)(CO)(PMe₃)₂] (5) の吸収スペクトル (半値幅: 2200 cm⁻¹) .

表 2. 錯体 5 の代表的な分子軌道 (isovalue = 0.03, atomic units).

| | |
|--------------------|--------|
| LUMO+1 (-1.668 eV) | LUMO+1 |
| LUMO (-2.229 eV) | LUMO |
| HOMO (-4.349 eV) | HOMO |
| HOMO-1 (-5.131 eV) | HOMO-1 |

0.0181)、錯体 5 では 790 nm ($f = 0.0139$) に予測される。LUMO および LUMO+1 はキノリン環あるいはフェナントリジン環上に広がる反結合性 π 軌道に相当するため、錯体 5 では π 電子系の拡張に伴い LUMO+1 のエネルギー準位が低下し、その影響が励

起エネルギーに反映されていると考えられる。

結論

フェナントリジン配位部位をもつ N,C,S-ピンサー鉄(II)錯体(5)を合成し、その電子吸収スペクトルを、ピリジン配位部位をもつ錯体(1)あるいはキノリン配位部位をもつ錯体(2)と比較した。可視領域に現れる強い吸収帯は、チオラトメタラサイクル周辺の軌道から含窒素複素環周辺の軌道への電荷移動遷移である。メタラサイクルの π 電子系が変わることで、錯体2,5の吸収帯は錯体1よりも長波長側にシフトする。また、キノリン部位をフェナントリジン部位に変更することでモル吸光係数が増大する。今後は錯体2,5の骨格を基本として、アクセプター部位への官能基の導入や励起状態寿命の評価が課題である。

謝辞

本研究は、研究課題「 π 拡張配位子を有する鉄メタラサイクル錯体の合成と光機能」に対する2021年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS202104)の支援を受けて行われました。深く感謝いたします。

文献

- O'Regan B and Grätzel M (1991) A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature* **353**: 737-740.
- Eckenhoff WT and Eisenberg R (2012) Molecular systems for light driven hydrogen production. *Dalton Trans.* **41**: 13004-13021.
- Prier CK, Rankic DA and MacMillan DWC (2013) Visible light photoredox catalysis with transition metal complexes: Applications in organic synthesis. *Chem. Rev.* **113**: 5322-5363.
- Mukherjee S, Bowman DN and Jakubikova E (2015) Cyclometalated Fe(II) complexes as sensitizers in dye-sensitized solar cells. *Inorg. Chem.* **54**: 560-569
- Förster C and Heinze K (2020) Photophysics and photochemistry with Earth-abundant metals - fundamentals and concepts. *Chem. Soc. Rev.* **49**: 1057-1070.
- Liu Y, Persson P, Sundström V and Wärnmark K (2016) Fe N-heterocyclic carbene complexes as promising photosensitizers. *Acc. Chem. Res.* **49**: 1477-1485.
- Chábera P, Kjaer KS, Prakash O, Honarfar A, Liu Y, Fredin LA, Harlang TCB, Lidin S, Uhlig J, Sundström V, Lomoth R, Persson P and Wärnmark K (2018) FeII hexa N-heterocyclic carbene complex with a 528 ps metal-to-ligand charge-transfer excited-state lifetime. *J. Phys. Chem. Lett.* **9**: 459-463.
- Chábera P, Liu Y, Prakash O, Thyrahaug E, Nahhas AE, Honarfar A, Essén S, Fredin LA, Harlang TCB, Kjaer KS, Handrup K, Ericson F, Tatsuno H, Morgan K, Schnadt J, Häggström L, Ericsson T, Sobkowiak A, Lidin S, Huang P, Styring S, Uhlig J, Bendix J, Lomoth R, Sundström V, Persson P and Wärnmark K (2017) A low-spin Fe(III) complex with 100-ps ligand-to-metal charge transfer photoluminescence. *Nature* **543**: 695-699.
- Braun JD, Lozada IB, Kolodziej C, Burda C, Newman KME, van Lierop J, Davis RL and Herbert DE (2019) Iron(II) coordination complexes with panchromatic absorption and nanosecond charge-transfer excited state lifetimes. *Nat. Chem.* **11**: 1144-1150.
- Steube J, Burkhardt L, Pöpcke A, Moll J, Zimmer P, Schoch R, Wölper C, Heinze K, Lochbrunner S and Bauer M (2019) Excited-state kinetics of an air-stable cyclometalated iron(II) complex. *Chem. Eur. J.* **25**: 11826-11830.
- Hirotsu M, Santo K, Tsuboi C and Isamu K (2014) Diiron carbonyl complexes bearing an N,C,S-pincer ligand: reactivity toward phosphines, heterolytic Fe-Fe cleavage and electrocatalytic proton reduction. *Organometallics* **33**: 4260-4268.
- Nakae T, Hirotsu M and Kinoshita I (2015) Di- and mononuclear iron complexes of N,C,S-tridentate ligands containing an aminopyridyl group: effect of the pendant amine site on catalytic properties for proton reduction. *Organometallics* **34**: 3988-3997.
- Nakae T, Hirotsu M and Nakajima H (2018) CO release from N,C,S-pincer iron(III) carbonyl complexes induced by visible-to-NIR light irradiation: mechanistic insight into effects of axial phosphorus ligands. *Inorg. Chem.* **57**: 8615-8626.
- Kawarai K, Nakajima H, Ito A, Isoda S and Hirotsu M (2020) Synthesis and spectroscopic properties of N,C,S-pincer iron complexes bearing an aromatic substituent. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **31**: 65-73.
- Masuda Y, Yagami Y, Nakazawa K and Hirotsu M (2020) Iron carbonyl complexes containing N,C,S-tridentate ligands with quinoline, vinyl, and benzenethiolate units. *Organometallics* **39**: 4051-4060.
- Mondal R, Giesbrecht PK and Herbert DE (2016) Nickel(II), copper(I) and zinc(II) complexes supported by a (4-diphenylphosphino)phenanthridine ligand. *Polyhedron* **108**: 156-162.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

オリゴシラン化合物の励起状態に関する研究

辻 勇人¹

Excited State of Oligosilane Compounds

Hayato Tsuji¹

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

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

Abstract: Structure-property associations of polysilane in the ground state have been extensively elucidated, whereas much less is known in the excited state. Previous studies on photoluminescence of polysilanes indicated that the emission wavelengths and Stokes shifts depend on the silicon chain lengths. In this study, the luminescent property of some tetrasilane compounds is discussed. It will be interesting to elucidate more details of structure-property associations in excited states and control the luminescence by designing a molecular structure in the near future.

Keywords: Oligosilanes, Excited state, Structure, Photophysical properties

序論

ケイ素 (Si) 原子が鎖状に連結し、側鎖として有機基を持つ化合物はポリシランと呼ばれ、半導体単結晶シリコンの一次元類縁体として見なされる。その構造的特徴から類推されるように、ケイ素鎖内における Si-Si σ 結合電子の非局在化効果が見られる (σ 共役)。このような σ 共役の効果により、ポリシラン化合物は単結合 (σ 結合) しか有しないにもかかわらず、近紫外領域の光吸収や発光などの特徴的な光物性や、薄膜状態における正孔輸送特性などの半導体機能等を示す¹⁾。これらの特徴的な機能性のために、1990年代から2000年代初頭にかけて、新たな材料としてのポリシランの可能性を調査するための研究がブームとなった。安定性などの問題から、その後一時下火であったが、最近のナノテクノロジーの進化によって、分子導線としての利用可能性に再び注目があつまっている²⁾。

σ 共役は基礎科学的にも興味深い研究対象である。ポリシランの電子状態は、主鎖のケイ素骨格構造に大きく依存するため、その構造制御が必要である。基底状態における構造・物性相関については、構造が制御されたポリシラン化合物を用いた検証によってかなりのことが解明され、 σ 共役はケイ素主鎖中の SiSiSiSi 二面角に大きな依存性を示すことが明らかとなった³⁻¹⁰⁾。一方で、励起状態に関する系統的な

研究については、実験的にはメチル置換オリゴシラン類 n -Si_nMe_{2n+2} における蛍光スペクトルの Si 鎖長依存性と¹¹⁾、いくつかの理論計算が示されているに限られていた^{12, 13)}。本研究では、ケイ素鎖が短いオリゴマーにおける発光測定から励起状態ならびにその構造制御の可能性に関する議論を行う。

材料と方法

Figure 1 に示すケイ素が4つ鎖状に連なったテトラシラン化合物のうち、立体配座制御がなされていない n -Si₄Me₁₀ (1)、二本のペンタメチレン鎖を持つ双環ジシランユニットでケイ素鎖の二面角が 10° 程度に固定された syn-テトラシラン化合物 2、180° に固定された anti-テトラシラン化合物 3、同じく双環ジシランユニットが2つ結合することで二面角が約 100° をとる ortho-テトラシラン化合物 4 について検証を行った。

結果

発光極大波長は n -Si₄Me₁₀ (1) は文献値によると 377 nm であり、Stokes シフト $\Delta\lambda$ は 150 nm にも及ぶ。固定されたテトラシラン化合物 2 は蛍光を示さなかったが、3 は 360 nm ($\Delta\lambda = 120$ nm)、4 は 412 nm ($\Delta\lambda = 180$ nm) であった。

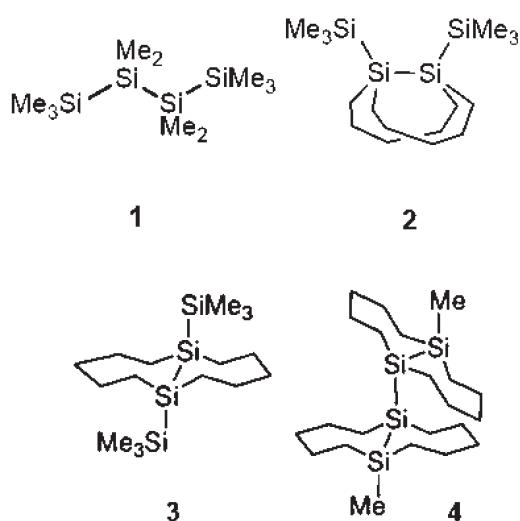


Fig. 1. Structural drawings of tetrasilanes examined in this study: n - $\text{Si}_4\text{Me}_{10}$ (1), conformationally constrained *syn*-tetrasilane (2), *ortho*-tetrasilane (3) and *anti*-tetrasilane (4) using bicyclic bis (tetramethylene)-tethered disilane unit(s).

討論

Michl らによる以前の研究から、メチル置換直鎖オリゴシラン n - $\text{Si}_n\text{Me}_{2n+2}$ では、ケイ素鎖長が 3 (トリシラン) 以下のものは発光を示さず、4 (テトラシラン) から 6 (ヘキサシラン) の短鎖のものではストークスシフトの大きい蛍光が観測され、7 (ヘプタシラン) 以上ではストークスシフトが小さい蛍光が観測されるという特徴的な鎖長依存性を有することが実験的に示されていた。これについては、ヘキサシラン以下ではエキシトンが局在化し、ヘプタシラン以上では非局在化するためであると説明されている¹⁾。

今回、もっとも鎖長が短い発光性のポリシランであるテトラシラン化合物を対象とした研究を行ったが、われわれが独自に開発したケイ素鎖の構造が制御されたテトラシラン化合物の 3 種類のうち、*syn* 体 2 からは発光が観測されず、二面角の大きい 3 と 4 からのみ観測された。これは、吸収スペクトルの二面角依存性を与える基底状態での電子状態から理解できる。すなわち、*syn* 体 2 では遷移振動子強度が弱い (ほぼ 0) の $\sigma\pi^*$ 遷移が最低励起状態を与え、振動子強度が強い $\sigma\sigma^*$ 遷移は高エネルギー側に現れる。一方で、*anti* 体 3 では $\sigma\sigma^*$ 遷移がもっともエネルギーが低く、 $\sigma\pi^*$ 遷移はエネルギーが高い。よって、*syn* 体では最低励起状態から基底状態への遷移も振動子強度が弱いために発光として観測されないと考えられる。中間の *ortho* 体 4 は基底状態で $\sigma\sigma^*$ と $\sigma\pi^*$ 遷移の *mixing* が起こっており、光励起の振動子強度は *anti* 体 3 よりも小さいものの、基底状態から最低励起状態への遷移が許容であり、逆のプロ

セス (すなわち発光) においても許容性があるものと考えられる。

発光性のテトラシラン化合物 3, 4 はいずれも、 n - $\text{Si}_4\text{Me}_{10}$ (1) と同様な短鎖のオリゴシランに特有の Stokes シフト $\Delta\lambda$ の大きな発光を示した。配座が強固に *anti* に固定されている 3 では 1 に比べて $\Delta\lambda$ が少し小さく、立体構造制御によって励起状態での構造変化が若干小さくなったものと推測できる。一方で、4 では $\Delta\lambda$ は逆に大きいことがわかった。これは、4 では励起によって中心の Si-Si 結合が伸長し、その周りにおける回転自由度が増大したために大きな構造変化をもたらしたものであると考えられる。励起状態の構造最適化などにより詳細な情報が得られるものと期待される。

基底状態の構造制御に用いた双環ジシランユニットが励起状態における構造制御に対する効果を評価するに、発光の ON/OFF (2 vs 3, 4) ができた点や、3 で Stokes シフトが n - $\text{Si}_4\text{Me}_{10}$ (1) に比べて小さかったという点においては一定の効果があったと言って良いと考えられる。今後は、励起状態における構造・物性相関の詳細を解明し、その知見に基づいた合目的分子設計によって、より高度な発光制御を行うことが課題であると言える。

謝辞

本研究の一部は 2021 年度総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202105) のサポートにより行われた。ここに感謝申し上げる。

文献

- 1) Miller RD, Michl J (1989) Polysilane high polymers, *Chem. Rev.* **89**: 1359-1410.
- 2) Su TA, Li H, Klausen RS, Kim NT, Neupane M, Leighton JL, Steigerwald ML, Venkataraman L and Nuckolls C (2017) Silane and germane molecular electronics, *Acc. Chem. Res.* **50**: 1088-1095.
- 3) Tsuji H, Michl J and Tamao K (2003) Recent experimental and theoretical aspects of the conformational dependence of UV absorption of short chain peralkylated oligosilanes, *J. Organomet. Chem.* **685**: 9-14.
- 4) Tsuji H, Fogarty HA, Ehara M, Fukuda R, Casher DL, Tamao K, Nakatsuji and Michl J (2014) Electronic transitions in conformationally controlled tetrasilanes with a wide range of SiSiSiSi dihedral angles, *Chem. Eur. J.* **20**: 9431-9441.
- 5) Fukazawa A, Tsuji H and Tamao K (2006) All-*anti*-octasilane: conformation control of silicon chains using the robust bicyclic trisilane as the building block, *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 6800-6801.
- 6) Tsuji H, Fukazawa A, Yamaguchi S, Toshimitsu A and Tamao K (2004) All-*anti* pentasilane: conformation control of oligosilanes based on bis(tetramethylene)-

- tethered trisilane unit, *Organometallics* **23**: 3375-3377.
- 7) Mallesha H, Tsuji H and Tamao K (2004) UV absorption and mass spectra of n-alkylsilyl end-capped anti, cisoid-alternating oligosilanes up to docosasilane (Si₂₂), *Organometallics* **23**: 1639-1642.
 - 8) Tsuji H, Terada M, Toshimitsu A and Tamao K (2003) $\sigma\sigma^*$ transition in anti,cisoid alternating oligosilanes: clear-cut evidence for suppression of conjugation effect by a cisoid turn, *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 7486-7487.
 - 9) Tsuji H, Toshimitsu A, Tamao K and Michl J (2001) UV, MCD, and LD spectra of a conformationally constrained ortho-tetrasilane: support for the avoided crossing model of conformational effects on excited states, *J. Phys. Chem. A* **105**: 10246-10248.
 - 10) Tamao K, Tsuji H, Terada M, Asahara M, Yamaguchi S and Toshimitsu A (2000) Conformation control of oligosilanes based on configurationally constrained bicyclic disilane units, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3287-3290.
 - 11) Raymond MK and Michl J (1999) Quantum confinement induced collapse of a large to a small radius self-trapped exciton in a permethylated polysilane chain, *Int. J. Quantum Chem.* **72**: 361-367.
 - 12) MacLeod MK and Michl J (2014) From ordinary to blue emission in peralkylated n-oligosilanes: The calculated structure of delocalized and localized singlet excitons, *J. Phys. Chem. A* **118**: 10538-10553.
 - 13) MacLeod MK, Kobr L and Michl J (2012) Fifth stereoactive orbital on silicon: relaxation of the lowest Singlet excited state of octamethyltrisilane, *J. Phys. Chem. A* **116**: 10507-10517.

■原 著■

器官培養系を用いたアフリカツメガエル幼生腸管の形態形成の研究

秋永 薫^{1,3} 安積良隆^{1,2} 茂木和枝¹ 豊泉龍児^{1,2}

In Vitro Approach to Decode the Mechanisms of Coiling Morphogenesis of *Xenopus* Larval Gut

Kaoru Akinaga^{1,3}, Yoshitaka Azumi^{1,2}, Kazue Mogi¹ and Ryuji Toyozumi^{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: akky0323biolaboratory@gmail.com

Abstract: *Xenopus laevis* is a good model organism for the study of gut morphogenesis during larval development. Because its larva has a very translucent abdominal epidermis, we can make noninvasive observations consistently during gut coiling morphogenesis for a long time. Recently, we developed an *in vitro* organ culture system that can recapitulate the early gut looping morphogenesis of *Xenopus* larvae. With a combination of *in vivo* and *in vitro* experiments, we have tried to elucidate the mechanisms of *Xenopus* larval gut coiling morphogenesis. In this study, we first observed the distribution of phosphorylated myosin (p-myosin) in the larval gut. Myosin-positive filamentous structures, which might correspond to gut smooth muscle cells, aligned in the transverse direction on the gut surface in the duodenum. Next, the cellular meshwork of the p-myosin-positive cells was organized by their circular and longitudinal orientations. Anisotropic twisting of the meshwork was observed at the center of the coiled gut. A pharmacological approach using a gut organ culture system suggested that contraction by actomyosin interaction is essential for gut coiling morphogenesis. Administration of inhibitors for myosin II ATPase and Rho-kinase significantly perturbed gut looping *in vitro*. Finally, we examined whether cell-to-cell communication by Wnt signaling is involved in the gut coiling. Administration of Wnt inhibitors also prevented successful gut looping. Taken together, we propose that reciprocal contraction by peristaltic movement of the nascent gut smooth muscle cells is needed for proper gut coiling morphogenesis in anuran amphibians.

Keywords: intestinal smooth muscle, myosin, actin, Wnt signaling, organ culture

序論

後生動物の様々な動物種において、種固有の左右非対称な器官形態がみられる。脊椎動物の内臓諸器官は左右非対称な配置や形態を示す。左右軸の向きは先行して決定される背腹軸、頭尾軸の情報をもとに決定され、後期胚期から幼生期にかけて、頭尾軸、背腹軸、左右軸の三つの体軸を参照しつつ内臓諸器官の左右非対称な形態とその左右極性が確立する。個々の内臓器官の左右非対称性の決定においては、持続的に左側板で発現する転写因子 *pitx2* が左右極性の確立に関与しており、その上流因子である成長

因子の *nodal* や *pitx2* をノックアウトまたはノックダウンすると内臓逆位の頻度が高くなり、器官によっては左右相称化が生じることが報告されている¹⁻³⁾。

本研究は、最もダイナミックに左右非対称な形態形成を行う腸管のぜんまい巻きの形態形成をテーマとする。当初は左右相称に形成される腸管が、胚発生の進行に伴って如何なる分子群が働くことで loop を描きそして腹腔内でコンパクトに種固有の複雑なコイル状のパターンで折りたたまれていくのかについて解明することを目的として行う。

細胞骨格構成分子が腸管の左右非対称性の確立に関与している場合が知られている。myosin ファミリーに属する myosin I がショウジョウバエの腸管および雄性生殖器の左右非対称性の確立に関与していることが知られている。ショウジョウバエが持つ3種類の myosin I のうち、Myo31DF が後腸の左右非対称性の確立に関与している⁴⁾。一方で、腸管の loop 形成の方向を決めるメカニカルな機構に、腸間膜の関与が報告されている。ニワトリ胚やマウス胚の腸管の loop 形成の左右性については、腹腔と腸管の背側を接続する背側腸間膜において、その左右で細胞の大きさが変わることによって腸管の loop 形成の方向が決定され、これは腸間膜の左側特異的に持続的に発現する転写因子 *pitx2* の制御下にある⁵⁾。一方、ゼブラフィッシュ胚においては、腸管の loop 形成の方向は左右の側板中胚葉 (LPM) の非対称な遊走により決定され、この LPM の遊走に細胞外マトリクスの構成因子である laminin が関与している⁶⁾。しかしながら、これらの研究をつなぎ合わせて、腸管における腸管の loop 形態形成を実現する機構を統合的に理解する状況には至っていない。*nodal* => *pitx2* の左側での発現を軸とした脊椎動物胚の左右極性の遺伝的カスケードの理解が進んでいる。しかし、器官の loop 形成に関わる力の発生機序と力の発生の主体の理解が充分進んでいるとは云えない。

各器官において、左右軸の位置情報を基に前駆細胞や器官原基の構成細胞が決まった方向性を維持して細胞増殖や細胞移動をすることで器官固有の左右非対称な形態を形成していく過程については不明な点が多い。この問題を解明するにあたり、幼生期のツメガエルの腸管は、腹側から見て反時計回りに loop 形成していく過程が観察でき、実験処理の左右極性や loop 形態への影響を容易に判定できる利点がある。本論文はツメガエル初期幼生の形態形成期の腸管において actomyosin の収縮が積極的に関与していると予想し、ツメガエル幼生の正常発生における myosin の分布について調査した。更に、筆者らの独自の *in vitro* 器官培養系を用いて、この予想を検証した。筆者らは、*in vitro* でツメガエル幼生腸管が loop 形態形成を示す実験系を構築した⁷⁾。この実験系において、幾つかの特異的な阻害剤を投与することで、腸管の loop 形態形成がどのように変化するかを調査すると共に、腸管平滑筋の配向性の変化についても調査した。最後に、どのような誘導因子が腸管の loop 形態形成に影響を及ぼしているのかを調査する端緒として、様々な器官形成系で多彩な役割を果たす Wnt シグナル伝達経路が腸管の loop 形態形成に関与しているのかについて調査した。

得られた実験結果をもとに、ツメガエル幼生の腸管の loop 形態形成の分子機構について考察した。

材料と方法

実験動物

本研究では実験動物として両生類無尾目ピパ科のアフリカツメガエル *Xenopus laevis* を使用した。本研究における利点として、初期のツメガエル幼生の腹側では黒色素が少なく非侵襲的に腸管を観察することができる点が挙げられる。ツメガエルの受精卵は、成体にヒト絨毛性 gonadotropin を雄 300 units、雌 500 units を皮下注射して得た。得られた受精卵はチオグリコール酸ナトリウム (pH=8.6) により脱ゼリーを行い、10% Steinberg 氏液により洗浄し、16°C または 24°C の恒温器内で飼育し、目的の発生段階まで飼育し、後期胚や初期幼生を実験に使用した。発生段階は Nieuwkoop & Faber (1967) の発生段階表に従って同定した⁸⁾。

免疫染色

免疫染色は以下の方法で行った。免疫染色で使用するサンプルは 4% パラホルムアルデヒド/PBS (-) で固定し、100%メタノールに置換した。メタノール下降系列により PBST にサンプルを置換後、Blocking を行い、一次抗体をサンプルに反応させた。一次抗体反応後、PBST で洗浄し、Blocking 後に二次抗体反応を行った。二次抗体反応後、サンプルを PBST で洗浄後、PBS (-) に置換し、蛍光実体顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡 (以下 CLSM) で観察を行った。

一次抗体として、平滑筋 actin の免疫染色には anti-alpha-Smooth Muscle actin (SM-actin) mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)、リン酸化 myosin 軽鎖の免疫染色には anti-phospho-Myosin Light Chain 2 (Ser19) rabbit polyclonal antibody (Cell signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA)、予備実験での骨格筋の免疫染色には 12/101 mouse monoclonal antibody known to recognize skeletal muscle (provided by the Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB]) の3種類を使用した。

蛍光標識二次抗体として、Alexa Fluor 488 - AffiniPure Fab Fragment goat anti-Mouse IgG H+L (ThermoFisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts, USA) と Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, DyLight 594 (ThermoFisher Scientific Co.) を使用した。

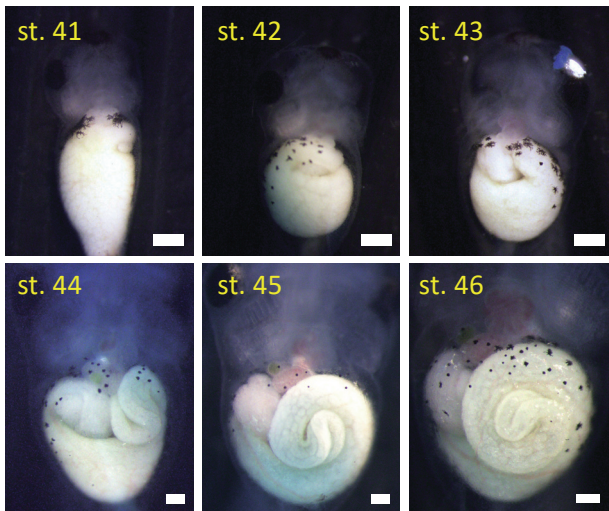


図 1. アフリカツメガエル初期幼生腸管の巻きの形態形成. stage 41-46 の正常発生している幼生の腹面から見た腸管の巻きの様子. 発生段階の同定は, Nieuwkoop & Faber (1967) に従った⁸⁾. stage 44 以降は, 腸管がぜんまいのように回転しながら伸長しつつ巻き, 長細い腸管が腹腔内にコンパクトに収まる. 上段の scale bar は 400 μm , 下段の scale bar は 200 μm である.

器官培養

ツメガエルの単離腸管の器官培養は以下の方法で行った. 腸管の coiling が開始される直前の st. 41 のツメガエル胚からウェッセルとピンセットを用いて腸管を単離した. 単離した腸管は抗生物質 (ペニシリン=ストレプトマイシン) を添加した 70% CO_2 -independent medium (Gibco) に投入し, 24°C の恒温器内で 1 日培養した. 培養した腸管の形態を looping, U-shape, No loop の 3 種の形態基準で排他的に判定した. 培養液には, actomyosin の収縮を阻害する薬剤をそれぞれ 1 種類ずつ, 0.01–0.1 μM (±)-Blebbistatin (1,2,3,3a-tetrahydro-3a-hydroxy-6-methyl-1-phenyl-4H-pyrrolo[2,3-b]quinolin-4-one; 非筋 myosin II ATPase 阻害剤⁹⁾、50 μM Y-27632 (*trans*-4-[(1*R*)-1-Aminoethyl]-*N*-4-pyridinyl-cyclohexanecarboxamide dihydrochloride; 細胞運動に關与する Rho-kinase の阻害剤¹⁰⁾ を調整し, 単離腸管の形態への影響を調べた. 同時に, 同腹由来で同じ温度履歴で培養した幼生の培養腸管を対照群として利用した. 一方, Blebbistatin の単離腸管への投与に關しては培養液として HBSS with 10 mM HEPES を使用した.

ツメガエルの腸管のぜんまい巻きの形態形成に Wnt signaling が關与しているのかを調べるために, 以下の実験を行った. 単離腸管の組織培養系を利用し, Wnt signaling を阻害する 10 μM Wnt C-59 (4-(2-Methyl-4-pyridinyl)-*N*-[4-(3-pyridinyl)-phenyl]-benzeneacetamide; Wnt ligand の分泌阻害剤で Wnt

受容体下流の細胞内 3 経路全てを阻害する)¹¹⁾ 処理を行い, 腸管の形態への影響を上記の 3 基準で判定した. さらに, wholemount の st. 38–39 のツメガエル胚に 10 μM Cardionogen-1 (6-Cyclohexyl-3-(2-furanyl)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4] thiadiazole; Wnt 古典経路阻害剤)¹²⁾ で浸漬処理を行い, 対照群が stage 46 に到達した段階で腸管の形態の判定を行った.

統計的判定

腸管の器官培養の系において, 実験群とその同腹幼生の対照群とに対して有意水準 1% または 0.1% で, 2X2 分割表の検定を行った. その際, それぞれの群で looping が成功した例数に対して U 字止まりか looping しない例数を比較した.

結果

ツメガエル幼生腸管の正常発生

ツメガエル初期幼生の腸管は, 当初はほぼ直線状であるが, 腹側からみて次第に C 字を描くように腹側臍臓を C 字の中を含むようなかたちで湾曲する (stage 42; 図 1). やがて腹側臍臓は腸管の捩れ運動に伴い幼生の左脇腹中央から右脇腹前方に向かって大移動し, 最初に括れて細くなる腸管領域である十二指腸と隣接するようになる (stage 43). その直後から, 腹側左前方領域の腸管が細く括れながら反時計回りに回転運動をしつつ, 薇 (ぜんまい) のような形状の長細い腸管をコンパクトに体腔内に収めていく形態形成運動を行う (stage 44 以降).

リン酸化 myosin フィラメントの格子形成

ツメガエルの腸管において actin と相互作用する myosin がどのように分布するのかについて, 抗リン酸化 myosin 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったツメガエル正常幼生を蛍光実体顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図 2).

蛍光実体顕微鏡による観察では, リン酸化 myosin 軽鎖は stage 41-46 で腸管全体に分布しており, 我々が以前調査した SM-actin の漸増する分布とは分布の仕方がやや異なっていた⁷⁾. 腸管のリン酸化 myosin 軽鎖をより高精細に観察するために, 共焦点レーザー顕微鏡で stage 41-46 までの腸管の coiling が行われる発生段階のツメガエル幼生を用いて観察した. stage 41-42 までのツメガエル幼生の腸管では, リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルはフィラメント状の分布を示さなかった. stage 43 幼生の腸管では, リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルは十二指腸領域で腸管に対して横断方向にフィラメント状の分布を示した

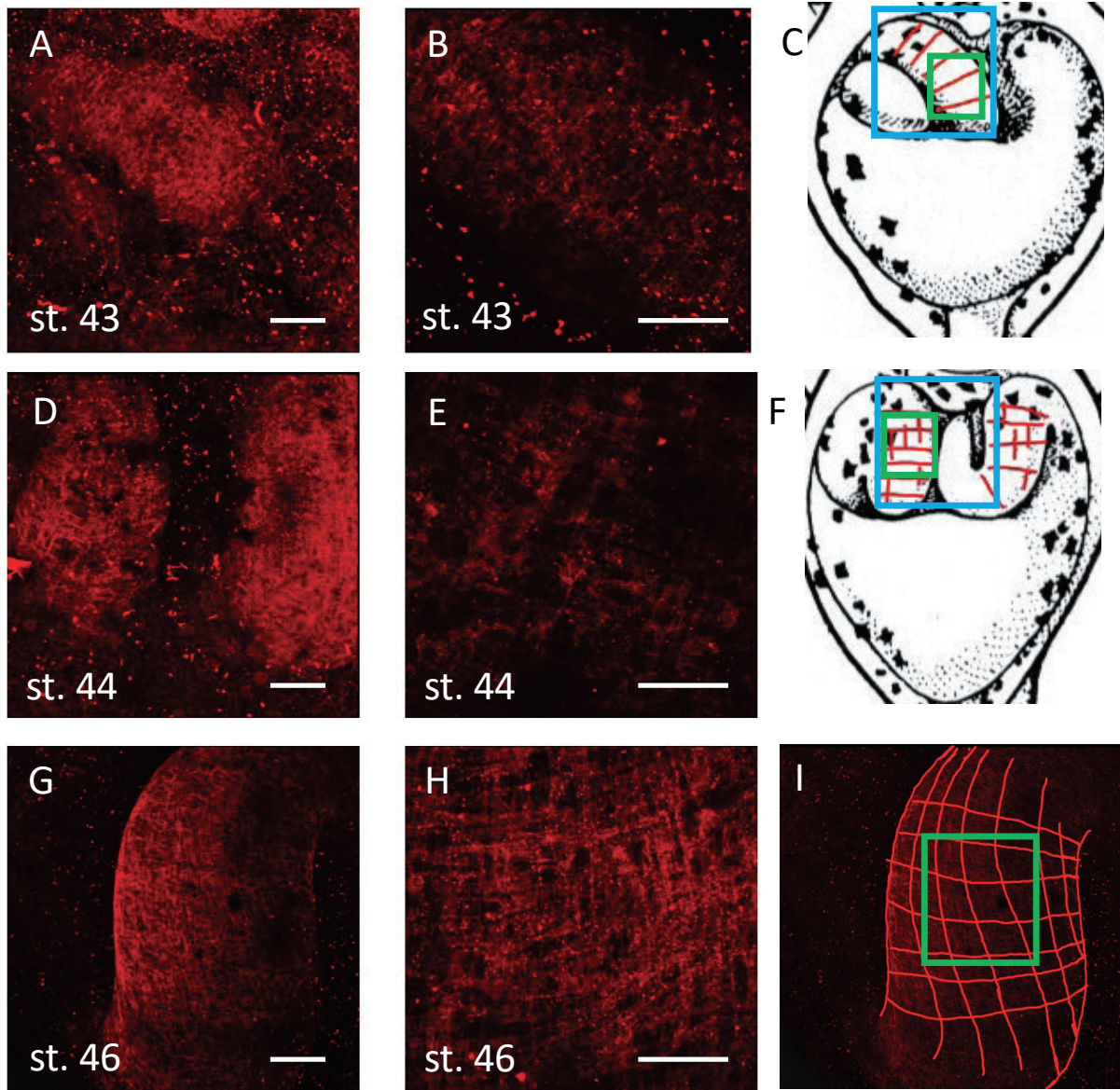


図 2. 腸管における抗リン酸化ミオシン抗体陽性細胞の発生段階依存的な分布の変化. 抗リン酸化ミオシン抗体を用いた蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察を組み合わせることによって、陽性細胞の染色像の 3D 再構築を行った. A–C) stage 43 の幼生腸管においては、他の領域に先行して、十二指腸領域において腸管の長軸と直交する陽性細胞の配向性がみられた. D–F) stage 44 の幼生腸管においては、十二指腸領域と coiling の中心領域において、腸管に横断する方向に加えて長軸方向にも陽性細胞の配向性がみられた. G–I) stage 45-46 の幼生腸管においては、陽性細胞の格子状の編み目が組織されており、巻きの中心領域では格子状の編み目に捩れがあった. 2C の水色の枠の領域は 2A の視野を、緑色の枠の領域は 2B の視野を示す. また、2F の水色の枠の領域は 2D の視野を、緑色の枠の領域は 2E の視野を示す. A, D, G の scale bar は 100 μm であり、B, E, H の scale bar は 40 μm .

(図 2A, B; それぞれ 2C の青と緑の□で囲まれた領域). stage 44 幼生の腸管では、リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルは一部の loop 領域で格子状に分布し始めていた (図 2D, E; それぞれ 2F の青と緑の□で囲まれた領域). stage 45 幼生の腸管では、リン酸化 myosin 軽鎖のシグナルは格子状に配向し、なおかつ coiling の中央部分では、腸管の長軸方向に沿って捩じれていた. ツメガエル stage 46 幼生の腸管では、リン酸化 myosin のフィラメント状のシグナルが腸管の coiling の中央で顕著に長軸方向に捩じれて配向していた (図 2G–I; I は G のフィラメントをトレ

ス像で、H は I の緑の□で囲まれた領域を撮影). これらのフィラメント状のシグナルは、我々が以前報告した幼生腸管の平滑筋特異的 actin の観察結果⁷⁾と比較参照すると、腸管平滑筋の分布を表していると思われる. 以上の抗リン酸化 myosin 抗体の免疫染色の結果から、腸管の巻きの形態形成に actomyosin の収縮が必要である可能性が示唆された.

actomyosin の収縮に対する Blebbistatin 処理の影響

筆者らはこれまでの研究で、stage 41 の loop 形成

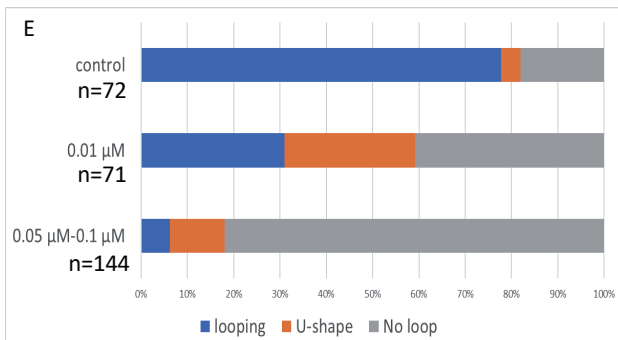
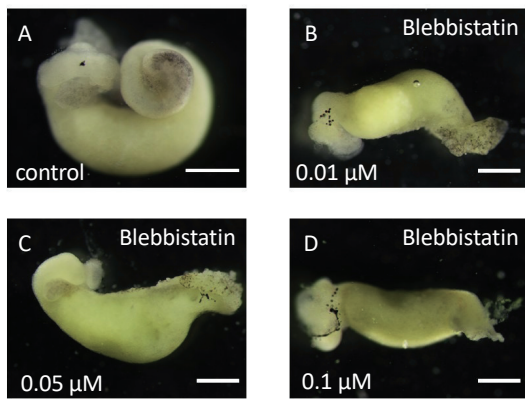


図 3. myosin II ATPase 阻害剤である Blebbistatin は, *in vitro* の単離腸管培養系において loop 形態形成を阻害した. scale bars, 500 μm. A) 図 4 の実験群と同じ温度で同じ時間培養した同腹対照群の単離腸管の loop 形態形成を示す. B-E) Blebbistatin は濃度依存的に loop 形態形成を阻害し, loop しない単離腸管の頻度が増加した.

直前の腸管を単離し, *in vitro* で stage 43 の loop 形成中期相当の形態まで loop 形成を再現する培養系を作出した. この実験系では, 単離腸管は組織自律的に looping するところが面白い. 一般的な細胞培養では 5% CO₂ (炭酸ガス) を用いて培養液を細胞増殖や機能発揮に最適な弱アルカリ性に保つ. 今回は普通の大气中で長期間 pH を弱アルカリに保つ, CO₂-independent medium (Gibco ブランド, ThermoFisher 社) を用いて, 両生類体液の浸透圧に合わせてこれを 70% に希釈することで, 比較的簡易なセットアップで腸管の loop 形態形成を再現することが出来た. stage 41 で切り出すところが要諦で, これよりも早い発生段階では, 未熟な表皮組織と側板中胚葉 (腸管を被う平滑筋の起源組織) との分離が悪く, 腸管原基を体表面の表皮からきれいに分離することが出来なかった.

腸管の looping に actomyosin の収縮が関与しているのか調べるために, *in vitro* の腸管の器官培養系を用いて単離腸管に Blebbistatin を投与した (図 3). 対照群においては, 腸管が looping しているサンプルの頻度が多数であった (n=56/72: 図 3A). 0.01 μM Blebbistatin 処理群では, 対照群と比較して U-shape や No loop を示すサンプルの頻度が増加し

た (n=49/71: $p < 0.001$: 図 3 B). 0.05 μM Blebbistatin 処理群の腸管では U-shape や No loop を示すサンプルが殆どであった (n=72/72: $p < 0.001$: 図 3C). 0.1 μM Blebbistatin 処理群でも腸管は U-shape や No loop の頻度が対照群と比較して増加した (n=63/72: $p < 0.001$: 図 3D).

ツメガエル幼生単離腸管に対する ROCK の効果

actin 細胞骨格は Rho kinase (ROCK) により細胞内に集積することが知られている¹³⁻¹⁴⁾. 今までの観察結果では腸管において平滑筋特異的 SM-actin が高度に配向していることから, この SM-actin の配向に ROCK が関与していると予想した. そこで我々は ROCK の機能を阻害する Y-27632 を単離腸管に投与した. その結果, 対照群では n=47/60 で腸管が looping を示し, n=9/60 で腸管が U 字形を示し, n=4/60 で腸管が No loop であった. 一方, 50 μM Y-27632 処理群では全ての腸管の looping が完全に停止していた (n= 57/57: $p < 0.01$: 図 4C). 対照群と実験群の単離腸管を抗 SM-actin 抗体を用いた免疫染色に供した. その結果, 実験群の単離腸管では対照群に較べて SM-actin のフィラメント形成の成功率が低かった. 対照群では n=17/23 で腸管に SM-actin フィラメントが生じており, 50 μM Y-27632 処理群では n=13/21 で SM-actin フィラメントは見られなかった (図 4B-B'). これらの結果から ROCK が腸管の SM-actin フィラメントの形成に関与していることが示唆された.

以上の *in vitro* 器官培養系を用いた実験結果からも, 腸管の coiling に actomyosin の収縮および適切な配向が必要であることが示唆された.

ツメガエル幼生単離腸管に対する Wnt 経路阻害剤の効果

分泌因子 Wnt がツメガエルの消化管で発現していることが先行研究で報告されている¹⁵⁾. 腸管の形態形成に Wnt シグナルが関与していると予想し, 単離した腸管において Wnt シグナルを阻害した場合に腸管の looping に影響を与えるのかを検討した. 阻害剤として Wnt シグナルの下流 3 経路全てを阻害する Wnt C-59 で単離した腸管を処理した. その結果, 対照群では n=49/60 で腸管の looping を示し, n=9/60 で腸管が U 字形を示し, n=2/60 で腸管は No loop を示した (図 5A, G). 10 μM Wnt C-59 処理群においては n=26/60 で腸管は looping を示し, n=28/60 で腸管が U 字形を示し, n=6/60 で腸管は No loop を示した (図 5B-D, G). この投与実験では対照群に比べて実験群で腸管の looping に支障をきたすサンプ

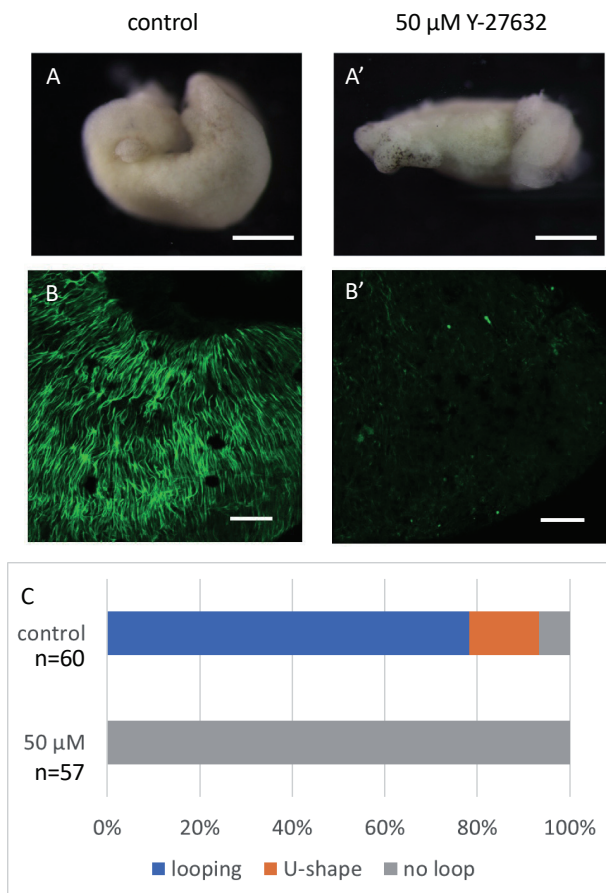


図 4. ROCK(Rho kinase)の阻害剤 Y-27632 の投与は、単離腸管の loop 形態形成を強力に阻害した。A, B は同腹対照群の単離腸管、A' と B' は投与群の単離腸管を示す。A', C) Y-27632 を投与しながら単離腸管を 1 日培養した後は、腸管は全く巻かなかった。B, B') 平滑筋特異的な SM(smooth muscle)-actin に対する免疫染色の結果。Y-27632 は SM-actin の発現を抑制し、その配向性が失われた標本が多かった。scale bar は A, A' では 500 μm, B, B' では 100 μm。

ルの頻度が上がった ($p < 0.01$)。この結果から、腸管の形態形成に Wnt シグナルが関与している可能性が示唆された。さらに、Wnt-C59 を投与したサンプルを用いて抗 SM-actin 抗体による免疫染色を行った。その結果、対照群は $n=8/12$ で腸管に SM-actin フィラメントが形成されていたが、10 μM Wnt C-59 処理群では $n=9/12$ で SM-actin フィラメントは形成されていなかった (図 5E, F)。この結果から、腸管の SM-actin フィラメントの形成に Wnt シグナルが関与する可能性が示唆された。

Wnt シグナルを構成する 3 種類の受容細胞内下流経路の中で古典経路 (Wnt/ β -catenin 経路) を阻害する Cardionogen-1 を用いてツメガエル後期尾芽胚期から wholemout で浸漬処理を行った。10 μM 処理群の多数の幼生で腸管の異常な looping を示した ($n=95/143$)。その中で、一部の個体の腸管では腸管の巻きに左右非対称性を示さない個体が生じた

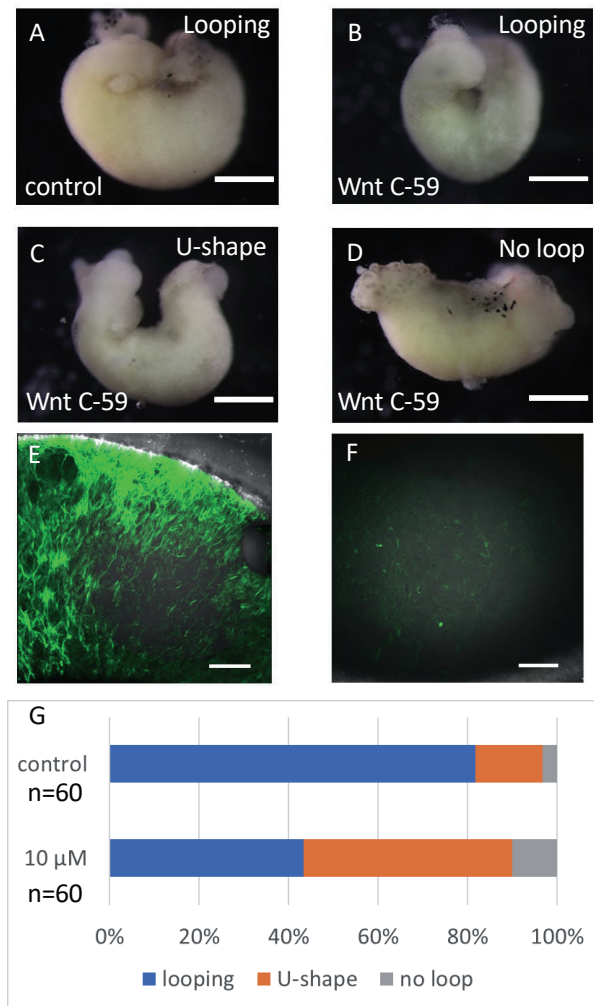


図 5. Wnt シグナル伝達経路特異的阻害剤である Wnt-C59 は単離腸管の loop 形態形成を阻害した。A) 図 5 の実験群と同じ時間培養した同腹対照群の単離腸管の loop 形態形成を示す。B-D, G) 10 μM Wnt-C59 を含む培養液中で 1 日培養した単離腸管においては、対照群と比べて loop 形態形成の成功率が大幅に低下した。E, F) *in vitro* の単離腸管培養系では、SM-actin 陽性細胞の腸管の円周方向の配向性は認められたが、10 μM Wnt-C59 存在下では配向性が認められず、SM-actin の発現量も大幅に低下した。図 5A-D の scale bar は 500 μm, E, F は 100 μm。

($n=44/143$: 図 6B)。この結果から、腸管の形態形成に Wnt シグナルの古典経路が関与している可能性が示唆された。さらに、Cardionogen-1 処理したサンプルを抗-smooth muscle actin 抗体 (抗 SM-actin 抗体) で免疫染色を行ったところ、対照群では腸管全体にシグナルが見られたが、10 μM 処理群では SM-actin が分布しない領域が生じていた (図 6E, F)。この結果から、腸管平滑筋の分布に Wnt シグナルの古典経路が関与している可能性が示唆された。

討論

脊椎動物の腸管は、消化吸収を担う消化管上皮構造と高度に組織化し蠕動運動を担う平滑筋による筋構造を有する。発生過程において腸管の消化管上皮が

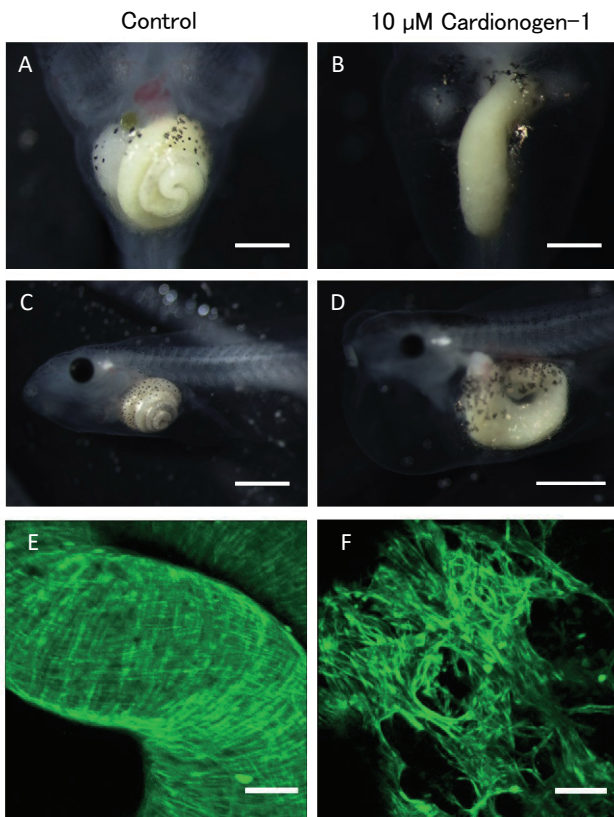


図 6. Wnt シグナル伝達経路のうち古典経路特異的阻害剤である *cardionogen-1* のツメガエル初期幼生への投与は腸管のぜんまい巻きの形態形成を阻害した。A-D) *cardionogen-1* に浸漬しながら 2 日間培養した幼生 (B, D) においては、同腹対照群 (A, C; stage 46) に比べて腸管の腹側からみて円周方向の巻きが大幅に低下し、背腹方向にのみ蛇行した。E, F) 抗-SM-actin 抗体を用いた免疫染色の結果から、*cardionogen-1* 投与によって捩れを伴った腸管平滑筋の格子状の配向が大幅に乱れた。E は対照群、F は *cardionogen-1* 投与群。scale bar は、それぞれ、A, B では 500 μm , C, D では 1 mm, E, F では 50 μm 。

その面積を拡充する際には、腸管は伸長しつつ、かつ同時に固有のパターンで巻いて折りたたまれ、左右非対称な形態形成を行う。筆者らは、高い透明性をもつアフリカツメガエル初期幼生を用いて、「幼若な腸管の形態形成にはその平滑筋の actomyosin 系の時空間的に制御された収縮活性が必要である」との作業仮説をもとに実験研究を行った。

筆者らの先行研究として、平滑筋特異的 actin (SM-actin) の分布と配向を可視化するために、wholemount のツメガエル幼生をサンプルとして抗-SM-actin 抗体による免疫染色を行った。その結果、ツメガエル初期幼生の腸管において SM-actin の発現領域が発生段階依存的に拡大していくことを見出した。さらに、腸管の長軸 (伸長方向) に直交する円周方向に腸管平滑筋がまずは配向し、次いで腸管の軸に沿った長軸方向に腸管平滑筋が配向することも発見した⁷⁾。こうして生成された腸管平滑筋がつくる縦横の格子には、腸管の巻きの中心のみで異方性

(anisotropy) を示す捻じれが生じることも新たに発見した⁷⁾。今回は、SM-actin と相互作用し物理的な力を発生する myosin の配向を、SM-actin と同様に免疫染色により可視化した。活性化した状態の myosin を検出する抗リン酸化 myosin 軽鎖抗体を用いた免疫染色により、ツメガエル正常胚の myosin については、SM-actin の場合と同様に、腸管においてまず横断方向にリン酸化 myosin 陽性細胞が配向し、次いで腸管の軸に沿った長軸方向にリン酸化 myosin 陽性細胞が配向した (図 2A-F)。リン酸化 myosin 陽性細胞の縦横の格子にも、抗-SM-actin 抗体で染めた場合と同様に、腸管の巻きの形態形成の中心のみで異方性を示す捻じれが生じていた (図 2G-I)。SM-actin ならびにリン酸化 myosin に対する 2 つの抗体で染まった細胞は、共に腸管平滑筋細胞であると思われる。これら二つの相互に符合する発見は、捩れを伴った機械的な力が腸管の左右非対称な巻きの形態形成に関与していることを示唆している。

我々の先行研究において、myosin II ATPase の阻害を通じて actomyosin の相互作用を阻害する Blebbistatin をツメガエル後期胚から初期幼生にかけて投与した。その結果、腸管は巻きの形態形成の程度が弱まるか、左右相称に背腹方向のみに蛇行し螺旋状には巻かなくなった⁷⁾。しかしながら、この wholemount の実験系では Blebbistatin 投与による他の組織への影響が副次的に腸管の巻きの影響をもたらして腸管の形態形成が阻害されたにすぎないとの虞があった。そこで今回筆者らは *in vitro* で腸管の巻きの形態形成を評価するモデル培養系の作出を行い、Blebbistatin を投与した。器官培養系での Blebbistatin 投与によっても著しく腸管の loop 形成が妨げられた結果からは Blebbistatin の wholemount への投与の系でも腸管平滑筋がその標的になっていたことが示唆され、腸管平滑筋の収縮は腸管の loop 形成に必要であることが示唆された。

筆者らの先行研究において、独自の腸管外植体培養系において薬剤投与実験を行った。actin 重合阻害剤 CK-666、myosin light chain kinase 阻害剤 ML-9、calmodulin アンタゴニスト W-7 の 3 薬剤をそれぞれ投与することで actomyosin の収縮を阻害し、外植体への影響を評価した。いずれの薬剤投与群でも、巻きの形態形成を行う外植体の頻度が対照群に比べて有意に低下した (いずれも $p < 0.01$)⁷⁾。今回、actin 細胞骨格の集積に関与する ROCK に特異的な阻害剤 Y-27632 を投与した単離腸管は全く巻かなかった (図 4)。この結果は、*in vitro* の器官培養系で Blebbistatin を投与した結果と符合する。従って、二つの実験を考え合わせると、腸管のぜんまい巻き

の形態形成において actomyosin の関与は非常に強く示唆されたといえる。

そこで次に筆者らは、actomyosin の作用の上流に位置する、腸管の巻きを司る細胞間シグナル伝達経路を探索することにした。筆者はここでツメガエル後期胚・幼生期・変態期の腸管においてリガンドや関連分子が発現している分泌因子 Wnt のシグナル伝達経路に注目した¹⁶⁻²¹⁾。Wnt リガンドの分泌を阻害する阻害剤 Wnt C-59 を単離腸管に投与したところ、腸管が巻く頻度が低下した。また、Wnt シグナルの受容細胞内 3 経路のうち古典経路 (canonical pathway) のみを阻害する Cardionogen-1 を wholemount の幼生に投与したところ、ツメガエル幼生の腸管の巻きは弱まるか、停止した。これらの結果から、腸管の巻きの形態形成に Wnt シグナル伝達経路、特に古典経路が関与していることが示唆された。ROCK は Wnt の主要な下流因子のひとつとして知られている²²⁻²³⁾。図 4 の実験結果において、Y-27632 投与で腸管の loop 形成は劇的に止まったので、今後は、腸管の形態形成において ROCK が Wnt の下流因子として機能するのかについて様々な角度から研究したいと考えている。

本研究は、(1) リン酸化 myosin を発現する腸管平滑筋の分布の *in vivo* での観察、ならびに、(2) 阻害剤投与を組み合わせた腸管外植体の *in vitro* 器官培養系 ... の二つの実験を有機的に組み合わせることでツメガエル初期幼生の腸管の形態形成の機構を解析した。得られた一連の実験結果から、腸管が巻き始める初期幼生期のツメガエル腸管では actomyosin の相互作用依存的に腸管が loop し、折りたたまれて巻くことが判った。腸管平滑筋が時空間依存的に格子状に配向し、そして振れることが、腸管の coiling を駆動することも判った。*in vitro* での実験系が構築できるようになり阻害剤実験が成立していること背景としては、ツメガエル幼生においては、巻きの形態形成はかなりの程度、腸管自律的に行われることが挙げられるであろう。

まとめると、初期幼生期での actomyosin の相互作用により生じる収縮力が、筋肉性器官である腸管の正常な巻きのパターンの確立に不可欠であることが本研究により明らかとなった。Nascone-Yoder らの研究グループは、ツメガエル幼生の消化管上皮の細胞間に発生する力が消化管の伸長に寄与すると主張している²⁴⁾。今後は、腸管平滑筋の収縮力ならびに消化管上皮の発生する力の大きさや方向性の測定などを通して、我々の実験結果と Nascone-Yoder らの研究とを包含した説明原理の構築が求められる。

今後の展望

今後の展望としては、actomyosin の蛋白質の合成と収縮の力が、時空間的にどのように制御され、遺伝的に種固有の折りたたみパターンにつながる loop 形態形成に統合されていくのかを解明することを目的に実験研究を行う必要がある。また、アフリカツメガエルは代表的なモデル両生類であるが、アフリカツメガエル幼生で知見が得られた腸管の loop 形態形成のメカニズムが無尾目両生類一般にとってどこまで保存されていて、適用可能なのかについて、本邦の在来種などの非・モデル無尾目の幼生を用いて明らかにしていきたい。更には、脊椎動物において最も再生力の強い有尾目のアホロートルやイモリの幼生の腸管は無尾目幼生ほどは巻かないが、遺伝的に決まった一定のパターンで湾曲することを踏まえて、有尾目の腸管の左右非対称な形態形成と無尾目のそれとの共通点と相違点を比較発生学的手法で明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、神奈川大学共同研究奨励助成金の助成を受けた研究課題「アフリカツメガエル幼生腸管のループ形態形成の研究」(2019 年度 No. 2; 2019 年度-2021 年度)による共同研究として実施されましたので、ここに感謝いたします。

図 1 の写真を撮影して下さった豊泉研卒研究生(当時)の嶽内あや氏に感謝いたします。ツメガエルの wholemount 免疫染色の技法のプロトコルを伝授して下さった横浜市立大学の内山英穂教授、小林剛氏(当時)に感謝いたします。また、我々の研究活動にご支援をいただきました神奈川大学総合理学研究所所長川本達也教授ならびに所員各位に感謝いたします。本研究の遂行にあたり、数々のご助言を賜りました泉進名誉教授、小谷享教授ならびに大平剛教授に深謝いたします。

文献

- 1) Hamada H, Meno C, Watanabe D and Saijoh Y (2002) Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* 3(2): 103-113.
- 2) Toyozumi R, Ogasawara T, Takeuchi S and Mogi K (2005) *Xenopus nodal related-1* is indispensable only for left-right axis determination. *Int. J. Dev. Biol.* 49(8): 923-938.
- 3) Toyozumi R and Mogi K (2018) Left-right specification in the embryonic and larval development of amphibians. In *Reproductive and Developmental Strategies* (Kobayashi K, Kitano T, Iwao Y, Kondo M, eds.) Springer. pp. 635-664.
- 4) Okumura T, Sasamura T, Inatomi M, Hozumi S, et al. (2015) Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric

- development in *Drosophila*. *Genetics*. **199**(4): 1183-1199.
- 5) Davis NM, Kurpios NA, Sun X, Gros J, et al. (2008) The chirality of gut rotation derives from left-right asymmetric changes in the architecture of the dorsal mesentery. *Dev. Cell* **15**(1): 134-145.
 - 6) Hochgreb-Hägele T, Yin C, Koo DE, Bronner ME and Stainier DY (2013) Laminin β 1a controls distinct steps during the establishment of digestive organ laterality. *Development* **140**(13): 2734-2745.
 - 7) Akinaga A, Azumi Y, Mogi K and Toyozumi R (2021) Stage-dependent sequential organization of nascent smooth muscle cells and its implications for the gut coiling morphogenesis in *Xenopus* larva. *Zoology* **146**: article no. 125905.
 - 8) Nieuwkoop PD and Faber J (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. Elsevier Science Publishing Co. pp. 1-258.
 - 9) Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A and Sellers JR (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* **279**(34): 35557-35563.
 - 10) Nakamura Y, Hashimoto R, Amano M, Nagata K, et al. (2000) Localized phosphorylation of vimentin by rho-kinase in neuroblastoma N2a cells. *Genes Cells*. **5**(10): 823-837.
 - 11) Proffitt KD, Madan B, Ke Z, Pendharkar V, et al. (2013) Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Res.* **73**(2): 502-507.
 - 12) Ni TT, Rellinger EJ, Mukherjee A, Xie S, et al. (2011) Discovering small molecules that promote cardiomyocyte generation by modulating Wnt signaling. *Chem. Biol.* **18**(12): 1658-1668.
 - 13) Kosako H, Yoshida T, Matsumura F, Ishizaki T, et al. (2000) Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*. **19**(52): 6059-6064.
 - 14) Wei Q and Adelstein RS (2002) *Pitx2a* expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling. *Mol. Biol. Cell.* **13**(2): 683-697.
 - 15) Damianitsch K, Melchert J and Pieler T (2009) XsFRP5 modulates endodermal organogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **329**(2): 327-337.
 - 16) Zorn AM, Butler K and Gurdon JB (1999) Anterior endomesoderm specification in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and TGF-beta signalling pathways. *Dev. Biol.* **209**(2): 282-297.
 - 17) Pilcher KE and Krieg PA (2002) Expression of the Wnt inhibitor, sFRP5, in the gut endoderm of *Xenopus*. *Gene Expr. Patterns* **2**(3-4): 369-372.
 - 18) McLin VA, Rankin SA and Zorn AM (2007) Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* **134**(12): 2207-2217.
 - 19) Zhang T, Guo X and Chen Y (2013) Retinoic acid-activated Ndr1a represses Wnt/ β -catenin signaling to allow *Xenopus* pancreas, Oesophagus, Stomach, and Duodenum Specification. *PLoS One* **8**(5): e65058.
 - 20) Ishizuya-Oka A, Kajita M and Hasebe T (2014) Thyroid hormone-regulated Wnt5a/Ror2 signaling is essential for dedifferentiation of larval epithelial cells into adult stem cells in the *Xenopus laevis* intestine. *PLoS One* **9**(9): e107611.
 - 21) Dush MK and Nascone-Yoder NM (2019) Vangl2 coordinates cell rearrangements during gut elongation. *Dev. Dyn.* **248**(7): 569-582.
 - 22) Katoh M and Katoh M (2020) Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation. *Int. J. Mol. Med.* **45**(2): 279-297.
 - 23) Rogers S and Scholpp S (2022) Vertebrate *wnt5a* - at the crossroads of cellular signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **125**: 3-10.
 - 24) Reed RA, Womble MA, Dush MK, Tull RR, et al. (2009) Morphogenesis of the primitive gut tube is generated by Rho/ROCK/myosin II-mediated endoderm rearrangements. *Dev. Dyn.* **238**(12): 3111-3125.

■原 著■

両生類アフリカツメガエルの心臓の形態形成における Actomyosin の役割

秋永 薫^{1,3} 茂木和枝¹ 安積良隆^{1,2} 豊泉龍児^{1,2}

The Role of Actomyosin Contraction Force in Heart Morphogenesis of *Xenopus* Tadpole Larvae

Kaoru Akinaga^{1,3}, Kazue Mogi¹, Yoshitaka Azumi^{1,2} and Ryuji Toyozumi^{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: akky0323biolaboratory@gmail.com

Abstract: Many researchers have long been investigating the mechanism of actomyosin contraction. Actomyosin is an interesting macromolecular complex, which enables energy conversion that generates mechanical force very efficiently at a temperature compatible for animals. Vertebrate embryos gradually develop striated muscles, and the embryos can make various body movements by muscular contraction as early as at the late embryonic stage before hatching. In lower vertebrates, pulsation of the heart is also observable in late stage embryos. Here, we examined whether active contraction of actomyosin is necessary for normal morphogenesis of the embryonic/larval heart.

Xenopus early larvae are very transparent, so they are suitable to observe the heart morphology and its contractile activities non-invasively. From such a viewpoint, the *Xenopus* larva is an ideal model organism. Thus, we first administered Blebbistatin, an inhibitor of actomyosin contraction, to *Xenopus* late stage embryos, and reared them until the early larval stage.

As the results, hypoplasia of heart morphogenesis was frequently induced. As a next step, we intended to perform a comparable experiment; we administered Omecamtiv, a cardiotonic reagent, to potentiate the actomyosin contraction of the developing heart. Unexpectedly, Omecamtiv also induced a dwarf heart at a high frequency. Immunostaining using the antibody for muscles revealed that both Blebbistatin and Omecamtiv caused changes of fine structures of the heart. Based on these complementary experiments, we concluded that moderate contraction of actomyosin is essential for the normal asymmetric morphogenesis of the heart. Finally we report that Phenylhydrazine significantly induced hyperplasia of the heart, and fasciculation of the ventricular muscles was disordered after Phenylhydrazine treatment.

Keywords: heart morphogenesis, actomyosin contraction, tadpole larva, *Xenopus laevis*

序論

動物は大きく分けて 2 種類のモーター蛋白質系をもつ。微小管と相互作用する kinesin・dynein 系と、actin と myosin の相互作用による actomyosin 系の二つである。これらのモーター蛋白質は ATPase をコードする領域を機能ドメインとして有しており、ATP を加水分解する前後でそのエネルギーによって

著しい構造転換を生じ、それぞれが相互作用するフィラメント上で運動を行う。本研究が注目する actin-myosin の相互作用による actomyosin 系は、細胞分裂や筋収縮などの生命現象に直接的に関与しているため、その研究は非常に活発に行われてきた。actin は球状 actin (G-actin) がサブユニットとして複数

鎖状に結合することで繊維状 actin (F-actin) を形成する。また、哺乳類と鳥類の actin では 6 種類のアイソフォームが存在し、その内の 4 種類は骨格筋、心筋、平滑筋にそれぞれ発現していることが知られている¹⁾。actin と相互作用する myosin は重鎖と軽鎖の 2 種類のサブユニットにより構成される蛋白質複合体であり、myosin が持つ ATP 結合部位で ATP を加水分解して得た化学エネルギーを首振り運動による運動エネルギーに変換して actin 上を移動することで、筋肉では筋収縮が生じる。myosin は多数の種類が存在し、大きな蛋白質ファミリーを形成している²⁾。また、myosin ファミリーは旧口動物と新口動物の間でも広く保存されている。例えば、節足動物のモデル生物であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* は 3 種類の myosin I 遺伝子を持ち、新口動物のモデル生物であるアフリカツメガエル *Xenopus laevis* は 7 種類の myosin I 遺伝子を持っている³⁾。

本研究は、両生類アフリカツメガエルの心臓における形態形成を研究テーマとし、そこに actin と myosin の複合体である actomyosin 系が積極的に関与するとの作業仮説をもとに、薬理的手法および免疫染色法により研究を行った。脊椎動物の胚期の心臓の血流は頭側から見て時計回りに流れる。心臓は原始心筒とよばれる一本の管状構造が捩じれることでルーピングし、形態形成を行う。しかし、この原始心筒がどのような要因で捩じれるのか、細胞力学的なプロセスはよく分かっていない。我々は、原始心筒の捩じれについて、遺伝的な制御に基づいて組織細胞群が方向性を保って収縮し、各細胞の収縮の連携が細胞間で厳密にコントロールされたアウトプットとして捩じれるのではないかと予想している。生体内で力学的な力を発生させる代表的な器官として筋肉が挙げられる。筋肉を構成する筋線維は myosin フィラメントと actin フィラメントの相互作用により力学的な力を発生させる。actin と myosin の挙動は *in vitro* での実験や細胞レベルでの研究が多く、組織・器官レベルでの研究は少ない⁴⁾。また、胚期や幼生期の未熟な筋性組織において、細胞骨格の構成因子がどのようにその形態形成に関与し、成熟していくのかは不明な点が多い⁵⁾。そのため、*in vivo* および wholemount での、actomyosin 系の挙動や形態形成への関与を実験発生学的に研究することは非常に意義深いと考えられる。心臓は収縮性器官としての機能を果たすために心筋や平滑筋を豊富に含んでおり、これらの筋肉を構成する actomyosin も当然のことながら minor isoform を含めて多分に含まれ、組織内でシステマティックに構造化されてい

る。そのため、胚発生における心臓の形態形成時のルーピングに actomyosin 系の収縮が関与していることが予想される。

本研究を行うにあたり、アフリカツメガエルを実験動物として選択した。アフリカツメガエルは体外受精により受精卵を得られるため、胚の初期発生から実験処理を行い、長期に亘り経過観察が出来ることが利点として挙げられる。また、ツメガエル幼生を腹側から観察した時に黒色素胞が少ないため、心臓を非侵襲的に観察できることが研究を行う上での利点として挙げられる。アフリカツメガエルの心臓は左右非対称な形態形成を胚発生の途中から行い、脊椎動物一般の心臓で見られる遺伝的にコントロールされた左右性を示す。そのため、研究で得られた知見は脊椎動物の心臓の形態形成にも普遍的に適用できる可能性がある。上述のように、アフリカツメガエル幼生の透明度を活用することで、心臓のルーピングに関する研究を行う上でモデル生物として最適である。そのため、本研究ではアフリカツメガエル胚を用いて心臓の形態形成における actomyosin 系の役割を研究することにした。

次に心臓の形態形成について述べる。心臓は心筋の絶え間なく律動的な収縮によって血液を全身に送ることで、身体の随所の組織細胞に栄養や酸素を供給する。心臓は予定心臓中胚葉から分化する。初めに胚の前方左右両側の心臓形成予定領域から造心中胚葉が分化し、次いで心内膜原基が形成され、これら左右一対の原基が胚の正中に移動する。その後、左右両原基は正中で融合し、一本の原始心筒を形成する。この原始心筒が種ごとに遺伝的に決まった向きにルーピングすることにより、心臓が正常に形成される。

心臓のルーピングに関する研究の多くはニワトリやマウスの胚を用いて行われている。その一つの例として *hand* とよばれる遺伝子がある。マウスの心臓において basic helix-loop-helix (bHLH) Factor 構造をコードするドメインを持つ *ehand* と *dhand* が原始心筒で局所的に発現することが発見され、マウスの心臓のルーピングに *ehand* が関与していることが示唆された⁶⁾。その後にニワトリの心臓においても、*ehand* と *dhand* が心臓のルーピングに関与していることが分かり、これらの遺伝子をノックアウトすると心臓のルーピング不全が生じることも分かった。また、この 2 種類の *hand* 遺伝子は心室形成にも関与しており、*dhand* (*hand2*) は左右両方の心室形成に、*ehand* (*hand1*) は左心室の形成のみに、それぞれ関わっていることが明らかになった⁷⁾。さらに、心臓のルーピングに特定の蛋白質が局所的に発現す

ることに関わっているとの報告が散発的になされている。心臓のルーピングにおいて、myosin II の関与が報告されている⁸⁾。Flectin と呼ばれる myosin 様蛋白質はマウスの原始心筒のルーピング中に局所的に発現していることが免疫染色法により分かり、心臓のルーピングに関与していることが示唆された⁹⁾。また、この Flectin が左右非対称性の確立に関与する *pitx2* の下流で予定心臓領域で発現していることがニワトリ胚で報告されている¹⁰⁾。その後、この Flectin が非筋 myosin II 蛋白質であることが示され、ニワトリ胚やマウス胚を用いた実験から、哺乳類の心臓のルーピングに actomyosin 系などの細胞骨格分子が必要であるとの方向性を示唆したことに、Linask ら (2002) のグループの研究の意義がある。さらに、心臓のルーピングの方向は脊椎動物で保存されており、ゼブラフィッシュやニワトリの心臓は腹側から見て右巻きを示す。この 2 種の動物種の心臓のルーピングにおいて、BMP4 シグナルの下流経路である *Prrx1* が原始心筒の右側で発現することで BMP シグナル依存的に心筒が右巻きにルーピングすることが示されている。同様の報告がマウス胚でもなされているので、心臓のルーピングの方向決定に関与するシグナル経路が脊椎動物の間で進化的に保存されていることが示唆されている¹¹⁾。

myosin ファミリーに属する *myosin I* が腸管および雄性生殖器の左右非対称性の確立に関与していることが知られている。ショウジョウバエは 3 種類の *myosin I* を持ち、その中の一種である *Myo31DF* が後腸 (背側から見たときに右に曲がる) の左右非対称性の確立に関与していることが、左右性の逆位を示す突然変異体の解析から明らかにされた¹²⁾。また、アフリカツメガエル胚においては、内臓の左右非対称性に *myosin I* が関与していることが示された¹³⁾。従って、前口動物と後口動物の双方にまたがって、内臓の左右非対称性の確立には *myosin I* が関与することが進化的に保存されている可能性が考えられる。

本研究で用いたアフリカツメガエルの心臓の形態形成は、非常によく観察されている。Kolker et al. (2000) の研究によると、アフリカツメガエル胚/幼生の心臓形成は、st. 27 (受精後 31 時間) で心臓原基が頭部側で狭くなる三角州状の形態を示す¹⁴⁾。st. 31 (受精後 38 時間) で、この三角州状の心臓形態は尾部側の領域が徐々に狭くなる。st. 33/34 (受精後 42 時間) で心臓は管が長軸に対して雑巾絞りのように捩じれ始め、st. 35 (受精後 50 時間) で遂に S 字状の形態になる。st. 41 (受精後 76 時間) から心筋が心室に密集し始める。st. 46 (受精後 106 時間) で心房が形成され、腹側から観察した時に心室と流出

路が見られる。

心臓の形態形成で特徴的な点は、一本の管構造が捩じれる形で管全体が蛇行しルーピングすることである。これらのルーピングに関与する遺伝子や機構は断片的にわかってきているが、組織細胞個々の形態やその相互作用の位置関係を加味した上で器官のルーピングが理解されているわけではなく、その機構には不明な点が多い。この器官のルーピングが着実に実行されるにあたり、遺伝的な発生プログラムの支配下で何らかの力学的な力が関与していることが予想される。心臓には心筋が豊富に含まれていることが自明のこととして扱われているが、我々は左右非対称性発生の一種の調節因子として心筋が機能しているのではないかと考えた。本研究では、その作業仮説を証明する手段として、心臓がループ形成する直前の発生段階で actomyosin の相互作用を調節する薬剤を投与することを出発点として実験研究を行った。

本研究では主に筋肉関連マーカーを抗原とする抗体を用いた免疫染色法と、3 種類の薬剤を用いた浸漬処理を主な方法として研究を行った。ツメガエル胚・幼生は体外発生なので、薬剤への浸漬による投与から洗浄まで、一定の発生段階の間だけに作用させることが出来る。薬剤実験の最初には、actomyosin を構成する myosin の機能を阻害した場合に心臓への影響を調べた。myosin の阻害剤として、Blebbistatin と呼ばれる非筋 myosin II ATPase 阻害剤を用いた。Blebbistatin は myosin II の ATPase によって生産された燐酸の放出を抑制することで myosin II の機能を阻害する¹⁵⁾。この Blebbistatin は細胞生物学の分野でよく用いられる薬剤であり、例えば、細胞のストレスファイバーの形成の阻害に用いられる。本研究の研究目的に適い、なおかつよく特徴付けられてその作用機序が詳細に解明されている利点があることから、myosin II の阻害剤として Blebbistatin を使用した¹⁶⁾。Blebbistatin を投与した実験群のツメガエル幼生では、心臓の低形成を示した。この観察結果をふまえて、次に myosin II の機能を逆に促進 (強縮) した場合にツメガエルの心臓の形態への影響を調べたいと考えた。myosin II の促進剤として Omecamtiv mecarbil を本研究で使用した。この薬剤は心筋 myosin II ATPase 促進剤であり、myosin II で生産されたリン酸の放出を促進する¹⁷⁾。つまり、Omecamtiv は効果として Blebbistatin と対極に位置しているため、Blebbistatin の実験結果と対比することができると考え、この薬剤を本研究で使用した。意外にも、myosin II の機能を促進した場合にも myosin を阻害した場合に似た心臓の低形

成を示した。これら2種類の、分子レベルでは相反する作用を示す薬剤を用いた研究により心臓の低形成がみられ、心筋の凝集がみられたことから、心筋の適切な収縮が心臓の正常な形態形成に必要であることが示唆された。そこで3番目に、心臓の低形成とは対照的に過形成を生じさせることでの心筋に及ぼす影響を調査した。心臓の過形成を誘起する薬剤として Phenylhydrazine hydrochloride を使用した。この薬剤はゼブラフィッシュの心臓において過形成を誘起することが先行研究により報告されており¹⁸⁾、両生類のアフリカツメガエルでも心臓の過形成を誘起できると予想して、この薬剤を本研究で使用した。Phenylhydrazine 処理により、心室および将来動脈円錐に分化する流出路の過形成が生じ、対照群に比べて実験群の心筋では束化が観察でき、心臓の正常な形態形成には適切な心筋の収縮が必要であることが示唆された。

これらの実験結果をもとに、心臓の形態形成における actomyosin 系の役割について考察する。さらに、器官の左右非対称性の確立における actomyosin 系の役割についても考察し、今後の本分野の展望を述べる。

材料と方法

実験動物

アフリカツメガエル *Xenopus laevis*

南～中央アフリカ原産のカエルである。生殖腺刺激ホルモン注射により通年で卵を得ることができる。体外受精で受精卵を得ることができ、発生段階の初期から観察できる。本研究における利点として、初期のツメガエル幼生の胸部腹側では黒色素が少なく非侵襲的に心臓を観察することができる点が挙げられる。

使用薬剤

(±)-Blebbistatin (1,2,3,3a-tetrahydro-3a-hydroxy-6-methyl-1-phenyl-4H-pyrrolo[2,3-b]quinolin-4-one)

分子式 $C_{18}H_{16}N_2O_2$, 分子量 292.3

非筋 myosin II ATPase 阻害剤である。actin 線維と myosin 線維の間で生じる収縮において、myosin 頭部にある ATPase に ATP が結合し、分解され、ADP と無機リン酸 Pi を放出することで機械的な力が生じる。Blebbistatin はこの相互作用において ADP の放出を阻害することにより、actin および myosin 線維の収縮を阻害する¹⁵⁾。光学異性体を持ち、(+)-Blebbistatin および (-)-Blebbistatin に分けられる¹⁵⁾。

Omecamtiv mecarbil(CK-1827452) (Methyl(2-fluoro-3-(3-(6-methylpyridin-3-yl)ureido)-benzyl)piperazine-1-carboxylate)

分子式 $C_{20}H_{24}FN_5O_3$, 分子量 401.43

心筋 myosin II ATPase 促進剤である。Blebbistatin とは対照的に、actin と myosin 線維による相互作用において ADP の放出を促進する作用を持つ¹⁷⁾。新たな心不全に対する治療薬として新規に合成された低分子化合物である。

Phenylhydrazine hydrochloride

(Monophenylhydrazine, Hydrazinobenzene)

分子式 $C_6H_5NHNH_2 \cdot HCl$, 分子量 144.60

ゼブラフィッシュの心臓においてこの薬剤で処理することにより心臓の過形成が生じることが報告されている¹⁸⁾。マウスにおいて貧血を誘起する薬理作用が報告されている¹⁹⁾。血液中のヘモグロビンと結合することが分かっている²⁰⁾。

受精卵の採取とゼリー層の除去

アフリカツメガエルの雌雄成体それぞれに、ヒト絨毛性 gonadotropin を雌 500unit, 雄 300unit ずつ注射した。注射翌日に得られた受精卵を採取した。受精卵は腰高シャーレに入れ、チオグリコール酸 (pH=8.6) を加えた。数分間攪拌し、ゼリー層を除去した。ゼリー層が剥離/溶解後ただちに、人工淡水として用いられる 10% Steinberg 氏液を用いてチオグリコール酸を洗い流し、受精卵を 10% Steinberg 氏液を入れたシャーレやタッパーなどに入れて目的の発生段階になるまで 16～24°C で飼育した。発生段階の同定には、Nieuwkoop and Faber (1967) の発生段階表を用いた²¹⁾。

(±)-blebbistatin の浸漬処理

Myosin II 阻害剤である Blebbistatin をアフリカツメガエルの後期胚に投与した¹⁶⁾。発生段階 st. 38-39 の後期胚を 0.05, 0.1 μM (±)-blebbistatin/0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液を 1 ml 入れた Organ Culture Dish に投入し、湿箱に入れたのちに 60 rpm で振盪した。対照群としては、0.1% DMSO/10% Steinberg 氏液に浸漬する同腹胚を用意した。6時間後、10% Steinberg 氏液で (±)-blebbistatin 処理胚を洗浄し、10% Steinberg 氏液を 2 ml 入れた 24 穴プレートに 1 個体ずつ投入し、24°C の恒温器で飼育した。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段階で実体顕微鏡を用いて観察を行い、形態のスコアをつけた。一部の実験群と対照群の胚と幼生は動画を撮影した。

Blebbistatin の各光学異性体への浸漬処理

発生段階 st. 38-39 のアフリカツメガエル後期胚に 0.05, 0.1 μM R-(+)-Blebbistatin/ 0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液 または 0.05, 0.1 μM S-(-)-Blebbistatin/ 0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液を 6 時間の浸漬処理で投与した。その溶液を 1 ml 入れた Organ Culture Dish に胚を投入し、湿箱に入れたのちに 60 rpm で振盪した。対照群としては、同量の 0.1% DMSO/ 10% Steinberg 氏液を用いた。6 時間後、10% Steinberg 氏液で処理胚を洗浄し、10% Steinberg 氏液を 2 ml 入れた 24 穴プレートに 1 個体ずつ投入し、24°C の恒温器で飼育した。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段階で実体顕微鏡を用いて観察を行い、形態のスコアをつけた。

Omecamtiv mecarbil (CK-1827452) への浸漬処理

発生段階 st. 26-27 のアフリカツメガエル尾芽胚を 0.1 mM Omecamtiv/0.1% DMSO-10% Steinberg 氏液を 1 ml 入れた Organ Culture Dish に投入し、湿箱に入れたのちに 60 rpm で振盪する形で投与した。対照群は 0.1% DMSO/10% Steinberg 氏液に投入した。24 時間後、10% Steinberg 氏液で処理胚を洗浄し、10% Steinberg 氏液を 2 ml 入れた 24 穴プレートに 1 個体ずつ投入し、24°C の恒温器で飼育した。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段階で実体顕微鏡を用いて観察を行い、形態のスコアをつけた。

心拍の測定

心拍は (±)-blebbistatin あるいは Omecamtiv への浸漬処理終了直後と 10% Steinberg 氏液で洗浄後 20 時間または 24 時間の時点で測定した。心拍の測定は 30 秒間の心拍数をカウンターにより計測した。1 個体につき 3 回計測した。統計学的な有意差の有無の判定は Welch の t 検定により判定した。

行動の観察

(±)-Blebbistatin および Omecamtiv の処理群は、それぞれ 6 時間または 24 時間の浸漬後に Organ Culture Dish 中の処理胚を、顕微鏡下でヘアループにより接触刺激を与えた。その間、動画撮影を行った。

Phenylhydrazine hydrochloride への浸漬処理

発生段階 st. 35-36 のアフリカツメガエル尾芽胚を 10 μM Phenylhydrazine/10% Steinberg 氏液に投入し、24°C に設定した恒温器で飼育した。薬剤については、1 穴に 2 ml 入れた多穴プレートを用いて浸漬を行った。対照群の発生段階が st. 46 に到達した段

階で、対照群および実験群を顕微鏡下で観察した。

心臓の免疫染色

心臓の心筋の actin 線維の配向を観察する目的で免疫染色を行った。一次抗体として心筋と骨格筋を認識する Anti-Myosin, Heavy Chain, Mouse-Monoclonal 抗体 (MF-20 抗体: R&D SYSTEMS 社製) を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure® Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG(H+L) (ThermoFisher 社製) を使用した。

主に st. 38-46 幼生期の免疫染色用サンプルを、4% パラホルムアルデヒド/PBS(-) により 1 時間 30 分以上、概ね 2 時間まで固定した後に 100% メタノールに置換、5 分間の振盪を 2 回行った。PBS(-) は、Phosphate-buffered Saline の略で、ここでは Mg^{2+} , Ca^{2+} を含まない pH 7.2-7.4 に pH を調整したものをを用いた。次に、75%、50%、25% メタノール/PBST の組成のメタノールの下降系列を用いて各 5 分間の振盪を行い、サンプルを水和した。PBST は、Tween20 を最終濃度 0.1% (V/V) 含む PBS である。その後、PBST へ置換し 5 分間の振盪を 2 回行った。PBST を捨て、3% Blocking reagent/PBST 400 μl に置換し、室温で最低 1 時間静置した。1 時間のインキュベーション後、Blocking/PBST を捨て、一次抗体を含んだ 150 μl の 3% Blocking Reagent/PBST を加えて、4°C の冷蔵庫で 1 晩または 2 晩反応させた。その後、PBST による 20 分間の試料の洗浄を 5 回を行い、再び 400 μl の 3% Blocking reagent/PBST に置換し、室温で 1 時間静置した。続いて、二次抗体を含んだ 150 μl の Blocking Reagent/PBST に置換し、4°C の冷蔵庫で 1 晩反応させた。その後、PBST による試料の 20 分間の洗浄を室温で 5 回を行い、PBS による 5 分間の洗浄を 2 回を行い、蛍光実体顕微鏡 (SZX16, Olympus 社製)、培養倒立蛍光顕微鏡 (IX-73, Olympus 社製) および共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss 社製) を用いて観察を行った。

心臓の面積測定

各薬剤処理群の個体について、MF-20 抗体を用いた上記の免疫染色法により、心臓領域 (心室と動脈球) を可視化した。次に IX73 で観察し、それぞれの個体の心臓領域の画像を取得した。この画像を用いて、画像処理ソフト GIMP2 (Windows 版フリーウェア) と Mac 版 Photoshop を用いて、心臓領域の占めるピクセル数を測定した。この測定したピクセル数を、予め対物マイクロメーターを撮影して測定した $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} = 10^4 (\mu\text{m})^2$ の占めるでのピクセル数で割り、実際の面積を $(\mu\text{m})^2$ ベースで算出した。同じ温

度履歴で飼育した実験群と同腹対照群の心臓領域の大きさの統計学的な有意差の有無の判定は、Welch の t 検定により判定した。

結果

st. 42 から st. 46 の幼生における心臓形態

はじめに、正常に発生している無処理の幼生の心臓について、骨格筋および心筋の myosin を抗原として認識する MF-20 抗体による免疫染色を施した上で観察した (図 1)。

心臓においては、st. 39 では腹側から見て三角形の形態を示し ($n=9$)、st. 40, 41 では三日月状の形態を示した (それぞれ、 $n=6$, $n=7$)。腹側から見て、動脈球 (aortic bulb) は心室の影に隠れがちであった。st. 42 の段階で心臓のループ形成は著しく蛇行し、心室の右前方に動脈球が位置し ($n=10$; 図 1A-A')、st. 43, 44, 45 でもこの相対的な位置関係は保持された形態を示した (それぞれ、 $n=10$, $n=9$, $n=10$)。st. 46 でループ形成の歪度は飽和し、右巻きの形態を示した ($n=10/10$; 図 1B-B')。これらの観察結果から、心臓については st. 39-40 の間で、少なくとも心室と動脈球 (後の動脈円錐、動脈幹) の位置関係において、心臓のループ形成は開始され、st. 46 で心臓のループ形成は完了することが観察された。

Blebbistatin 投与による心臓の矮小化

非筋 myosin II ATPase 阻害剤である (±)-Blebbistatin を用いた後期尾芽胚期における浸漬実験を

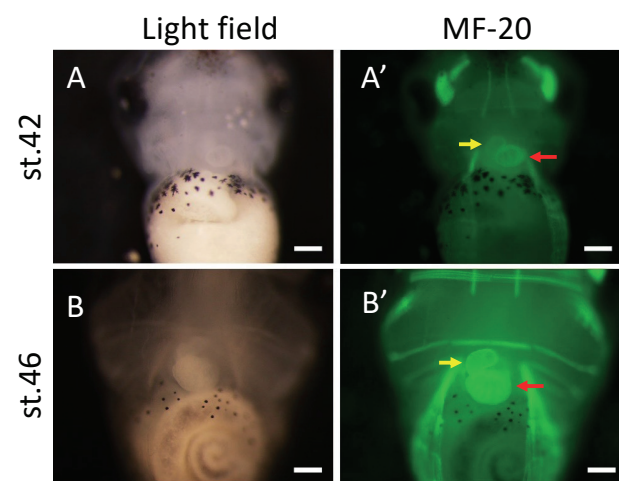


図 1. ツメガエル幼生心臓の正常発生. A-A') 心臓の形態形成は、22-24°C で培養 4 日後の st. 42 で頭側から見て心房-心室-動脈球 (後の動脈円錐、動脈幹、流出路ともいう) に至る血流が右巻き (頭側からみて時計回り) となる形態を示した. B-B') その後もこの右巻きの形態を示し、動脈球が心室に対して右前方 (向かって左前方) に位置し続け、st. 46 では st. 42 幼生と同様の心臓形態を示した. 全ての写真は腹側から撮影している. 赤矢印は心室を示し、黄色矢印は動脈球を示す. Bars, 200 μ m.

行った。その結果、実験群の心臓が対照群に比べて低形成であった (低形成は、同腹対照群 $n=0/60$; 0.05 μ M, $n=35/45$; 0.1 μ M, $n=41/51$ (分母は判定時の生存個体数); 図 2C-C')。また、特に心室の低形成が顕著であった。

Blebbistatin 処理による心筋の変化を観察するために、骨格筋および心筋の myosin に対する抗体である MF-20 を用いた免疫染色を行い、Blebbistatin 処理幼生の心筋を可視化した。その結果として、Blebbistatin 処理群の心臓は心筋が凝集し、同じ発生段階の対照群で見られるような心筋のメッシュ状の様態を示さなかった (0.05 μ M, $n=11/15$; 0.1 μ M, $n=14/15$; 図 2D-D')。心臓の低形成をより定量的に示すために、MF-20 抗体により免疫染色した個体の心臓の画像を基に Photoshop を用いて、画像上の心臓の面積を求めた。その結果、実験群の心臓領域は対照群に比べて腹側から見た面積の占有率が低下していた (対照群が 11.1 ± 0.9 、0.05 μ M 処理群で 6.7 ± 2.1 、0.1 μ M 処理群で $6.5 \pm 1.4 \times 10000 \mu\text{m}^2$; 図 4C)。また、1% の有意水準で統計学的に有意な差があった ($P < 0.01$)。胸腔内の心臓領域の占有面積が低

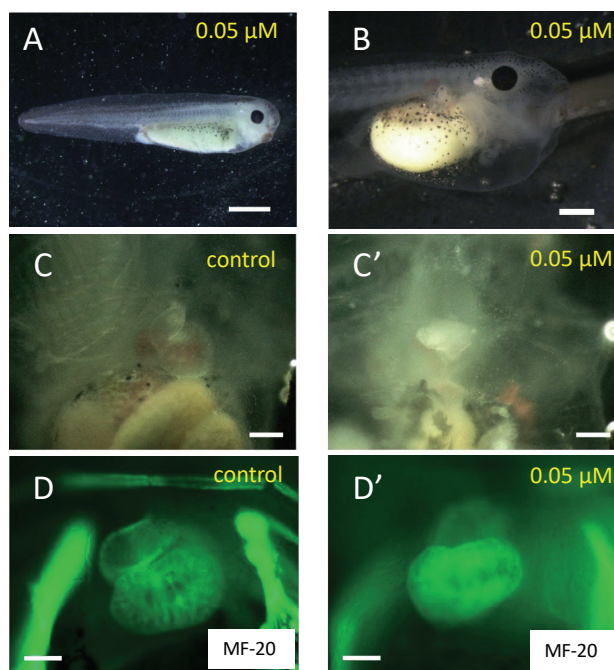


図 2. (±)-Blebbistatin 浸漬処理群の観察結果. A) 処理直後の幼生. 正常幼生と外形は殆ど変わらない. B) 0.05 μ M Blebbistatin 処理後に 2 日間にわたって飼育し同腹幼生が st. 46 に達した時の処理群の幼生. おそらくは心機能の低下に起因して胸部腹側に水疱化が生じた. C-C') myosin II の機能阻害剤である (±)-Blebbistatin 処理により心臓は低形成となった. D-D') 対照群 (D) と 0.05 μ M Blebbistatin 処理群 (D') の MF-20 抗体で染色した心臓を示す. Scale bars; A は 1mm, B は 0.5mm, C-C' は 200 μ m, D-D' は 100 μ m.

下していたことから心臓が低形成の状態を示していると言える。

myosin II の機能を阻害したことから、(±)-Blebbistatin 処理による心拍への影響を調べた。(±)-Blebbistatin に 6 時間浸漬した後に心拍を測定した。処理直後の心拍 (0 ± 0 回/30 秒) は同腹対照群 (53.8 ± 1.31 回/30 秒) に比べて顕著に低下した。また、 $P < 0.01$ の有意水準で帰無仮説は棄却され、対照群と処理群で統計学的に有意な差が生じていた。また、(±)-Blebbistatin の洗浄のために人工淡水に浸漬処理胚を移行して 20 時間後に再度心拍を測定したところ、同腹対照群 (78.5 ± 1.06 回/30 秒) と実験群 ($0.05 \mu\text{M}$; 66.6 ± 1.60 回/30 秒, $0.1 \mu\text{M}$; 67.1 ± 1.39 回/30 秒) で統計学的に有意な差があるものの ($P < 0.01$)、実験群の心拍は著しく回復した (図 4E)。また、(±)-Blebbistatin 処理による運動機能への影響を調べるために、薬剤処理直後にヘアーループによる接触刺激を浸漬処理中の胚に与えた。その結果、対照群では刺激を与えると逃避行動を示したが ($n=4/4$)、実験群では逃避行動を全く示さなかった ($0.05 \mu\text{M}$: $n=4/4$, $0.1 \mu\text{M}$: $n=4/4$)。以上の心拍の計測と逃避行動の観察結果から、(±)-Blebbistatin は myosin II による筋収縮を阻害していることが確認された。

前述の浸漬実験で使用した (±)-Blebbistatin は 2 種類の鏡像異性体 (光学異性体) が混在したラセミ体である薬剤を使用した。この 2 種類の光学異性体 (R-(+)-Blebbistatin と S-(-)-Blebbistatin) の内でどちらが実際に心臓の低形成を引き起こしたのかを調査するために、それぞれの異性体を溶解した溶液にツメガエル胚を浸漬した。その結果、S-(-)-Blebbistatin に浸漬した個体においては心臓の低形成が観察された ($0.05 \mu\text{M}$, $n=11/19$; $0.1 \mu\text{M}$, $n=22/29$)。しかし、もう一方の R-(+)-Blebbistatin に浸漬した個体では対照群と同様に全く正常に発生し、薬剤による影響は観察されなかった (低形成は、 $0.05 \mu\text{M}$, $n=0/36$; $0.1 \mu\text{M}$, $n=0/36$)。これらの観察結果から、2 種類の鏡像異性体の内で S-(-)-Blebbistatin の方が心臓の形態形成に影響を与えたことが分かった。

Omecamtiv 投与による心臓の矮小化

心筋 myosin II ATPase 促進剤である Omecamtiv mecarbil を中期尾芽胚に投与したところ、実験群の心臓は対照群に比べて低形成となった (0.1 mM で $n=58/62$; 図 3C-C', D-D')。特に心室の低形成が顕著であった。Omecamtiv 投与によるペースメーカー機能への影響を調べるために心拍を測定した。Omecamtiv を含む人工淡水に 24 時間浸漬した直後

に心拍を測定したところ、対照群と比べて実験群は著しく心拍が低下した (それぞれ、浸漬処理群 0 ± 0 回/30 秒、同腹対照群 34.9 ± 0.83 回/30 秒)。心拍は 5% の有意水準で統計学的に有意な差が対照群と実験群で見られた ($P < 0.01$)。さらに、人工淡水に浸漬個体を移行して洗浄し、24 時間後に再度心拍を測定したところ、依然として実験群と対照群とで統計学的に有意な差があったものの ($P < 0.01$)、実験群の心拍は著しく回復した (図 4F)。これらの観察結果から、予想外の結果ではあるが、myosin II の促進剤である Omecamtiv の投与でも myosin II に関連した心臓とその心拍の機能分化を阻害していることが判った。また、Omecamtiv 処理による処理個体の運動機能への影響を調べるために、処理直後にヘアーループを用いた処理個体への刺激実験を行った。ヘアール

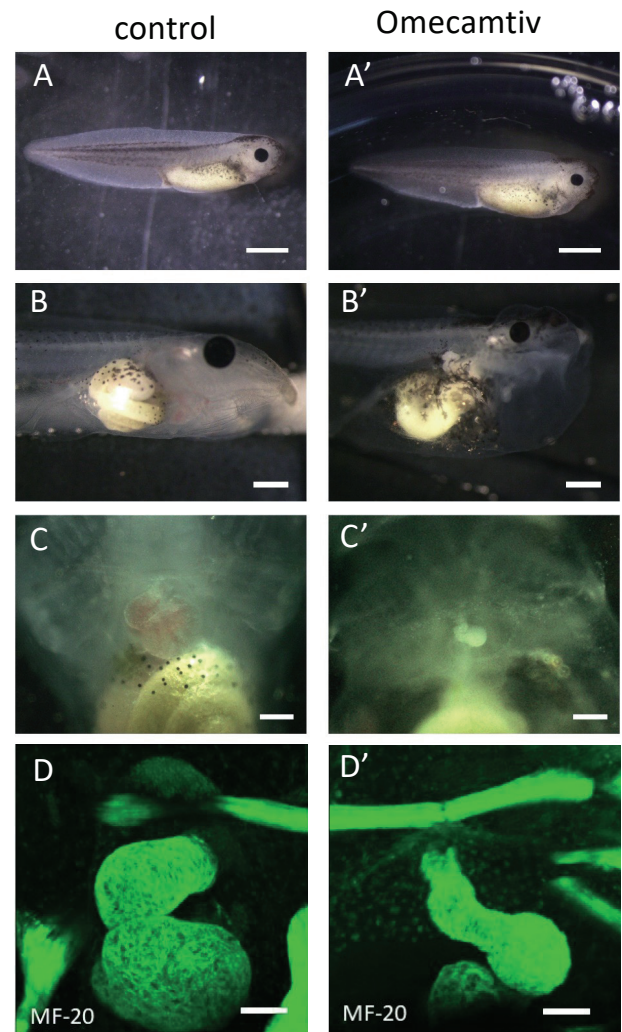


図 3. Omecamtiv 浸漬処理群の観察結果. A'-D' は処理群を、A-D は同腹対照群を示す. A-A') 処理直後の幼生 (A). 正常な幼生 (A) と外形は殆ど変化していない. B-B') 同腹幼生 (B) が st. 46 に達した時の処理群の幼生は胸部腹側に水疱化が生じていた (B'). C-C') 処理群では心臓の低形成 (C') が生じた. Scale bars; A-A' は 1mm, B-B' は 0.5mm, C-C' は 200 μm , D-D' は 100 μm .

ブにより刺激した st. 40-41 の処理個体は、対照群で全個体が逃避行動を示し (n=24/24)、実験処理個体においても逃避行動を示す個体が見られた (n=18/24)。この観察結果から、Omeacamtiv は運動に関係する骨格筋の収縮には影響を与えず、高い特異性を持って心筋 myosin II を標的としていることが示唆された。

Omeacamtiv 処理群においても、心筋への影響を、筋肉に対する抗体を用いた免疫染色を施した個体で調査した。心筋を認識する MF-20 抗体による免疫染色を行った Omeacamtiv 処理幼生の心臓においては、対照群に比べて心室の心筋の凝集が実験処理群でも観察された (0.1 mM, n=12/15)。共焦点レーザー顕微鏡による観察においても、対照群に比べて心室が凝集していた (n=5/5; 図 3D-D')。定量的に心臓の低形成の有無を示すために、心臓領域で MF-20 抗体による免疫染色で可視化される領域の面積を画像処理ソフトで測定した。その結果、腹側から見た実験群の心臓領域の占有面積 ($2.6 \pm 0.5 \times 10000 \mu\text{m}^2$) が、対照群のそれ ($10.4 \pm 1.1 \times 10000 \mu\text{m}^2$) よりも小さいことが示され、有意水準 1% で統計学的にも有意な差があった (P<0.01; 図 4D)。心臓領域の占有面積が低下していたことから、Omeacamtiv 処理で心臓が

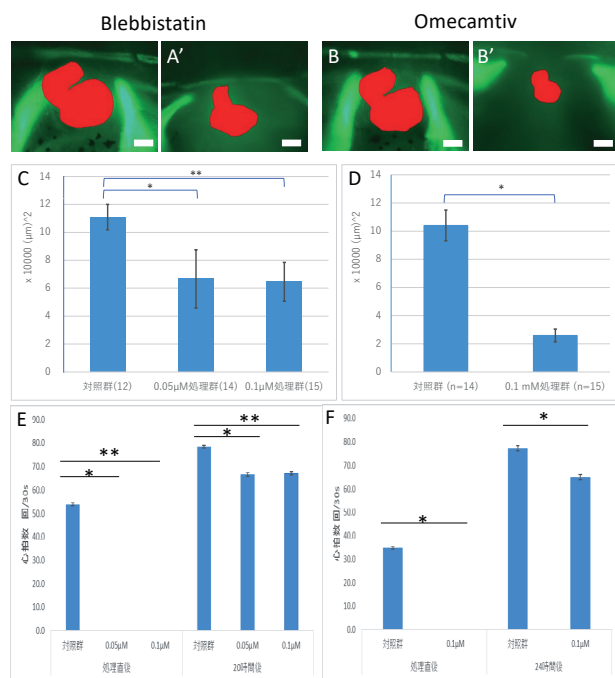


図 4. Blebbistatin 処理群と Omeacamtiv 処理群の心臓領域の面積と心拍数の定量。A-A', B-B') 腹側正中線からみた MF-20 抗体で染まった心臓領域の面積 (赤でハイライト; 心室と動脈球の面積) を画像処理ソフト Photoshop により測定した。C) Blebbistatin 処理により心臓領域の面積が有意に低下した (*, ** は、いずれも P<0.01)。D) Omeacamtiv 処理によっても心臓領域の面積が有意に低下した (* は P<0.01)。E, F) Blebbistatin 処理 (E) ならびに Omeacamtiv 処理 (F) により心拍数は著しく低下したが、飼育水に移行すると心拍数は回復した (*, ** は、いずれも P<0.01)。

低形成となったことが示された。免疫染色の観察結果からも、心臓の形態形成に心筋の正常な配列・組織化が必要であることが示唆された。

Phenylhydrazine 投与による心室と流出路の過形成

前述の myosin 阻害剤および賦活剤の浸漬実験の結果は、薬剤処理によって両生類幼生に心臓の低形成を極めて高頻度に出す実験系を構築することができたと見做すことが出来る。その状況を踏まえて、心臓の過形成の実験系を作出し、心筋への影響を観察することを試みた。この実験系の作出のために使用する薬剤として Phenylhydrazine に注目した。この薬剤をゼブラフィッシュの稚魚に投与することで、その心臓に過形成を生じさせることが報告されている¹⁸⁾。硬骨魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュでもこの薬剤の影響が見られたことから、両生類のモデル生物であるアフリカツメガエルでも影響が見られると予想し、この薬剤を後期尾芽胚期のツメガエル胚に投与した。その結果、心室部 (10 μM, n=34/39) および動脈幹 / 動脈円錐の予定領域である流出路 (outflow tract) で過形成が生じた (10 μM, n=33/39; 図 5A-A')。また、心拍においては、実験群において心室と流出路の非協調的な収縮が認められた。

MF-20 抗体による免疫染色個体の観察を行ったところ、Phenylhydrazine 処理群の心室部の心筋のクラスターの間隙のスペースは対照群に比べて広くなっており、心筋の束化が促進されているように見えた (10 μM, n=14/16; 図 5B-B')。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察においてもこの判断は支持され、心室に位置する心筋は対照群に比べて束化が促進されていた (n=5/5; 図 5C-C')。さらに、心臓の過形成の有無を定量的に示すために、MF-20 抗体を用いた免疫染色により可視化した心臓について、前述の 2 つの薬剤処理と同じ手順、同じソフトウェアで心臓領域の面積を測定した。その結果、対照群 ($10.8 \pm 1.2 \times 10000 \mu\text{m}^2$) に比べて実験群 ($13.5 \pm 3.0 \times 10000 \mu\text{m}^2$) の心臓の面積の占有面積は増加し、統計学的にも有意差があった (P<0.01; 図 5D)。これらの観察結果から、心臓の正常な形態形成において心筋の正常な分布や束化が、その器官の大きさの制御に必要であることが示唆された。

討論

筆者らは myosin II の機能を阻害および促進する薬剤を用いて、心臓の形態形成への影響を調べた。薬剤投与の結果、心臓の形態形成に影響が生じ、

actomyosin 系の収縮がこれらの器官の形態形成に必要であることを明らかにした。本研究で注目した心臓は後期胚で左右非対称な形態を示し、これらの器官の左右非対称性の極性の決定は、中期-後期胚で側板中胚葉 (lateral plate mesoderm: LPM) で発現する *nodal* => *pitx2* 経路によって確立される^{22, 23)}。

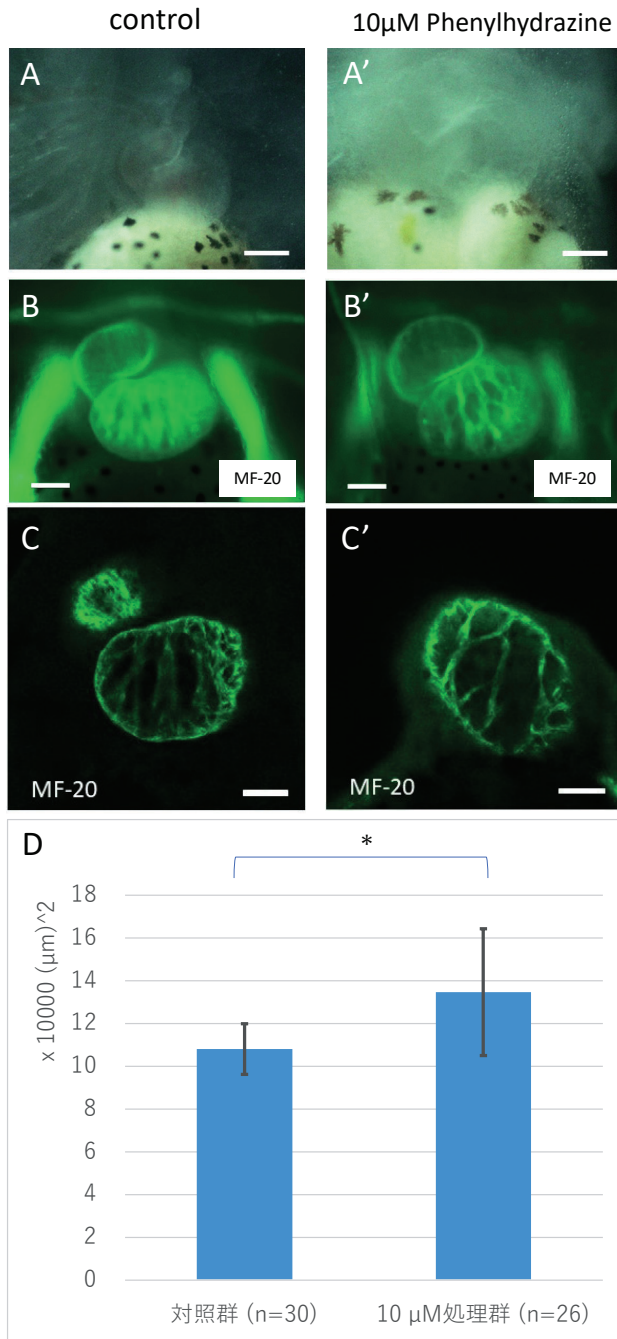


図5. Phenylhydrazine 処理群の心室における心筋の分布と心臓領域の面積の定量. A-A', B-B', C-C') Phenylhydrazine 処理群 (A', B', C') では、対照群 (A, B, C) に比べて心臓の過形成が生じていた. MF-20 抗体を用いた免疫染色により、実験群の心筋 (B', C') は対照群のそれ (B, C) に比べて束化が促進され、心筋同士の間隔が広がっていることが分かった. D) 心臓の面積は対照群に比べて処理群で増加していた (*は $P < 0.01$). 測定方法は図4と同じである. Scale bars: A-A', B-B', C-C' のいずれも 100 µm.

しかし、後期胚期から幼生期にかけての器官形成期に、咽頭胚期である初期尾芽胚期に発現する *pitx2* により決定した左右極性の情報をもとに実際に左右非対称な器官形態を構築する機構は不明な点が多い²⁴⁾。本研究では両生類の左右非対称な器官の形態形成に actomyosin の収縮が直接的に関与している可能性を見出した。

心臓の形態形成への心筋の影響

MF-20 抗体を用いた免疫染色により心筋を染色し、st. 42 から 46 にかけてのツメガエル幼生的心臓の形態を観察した。この st. 42-46 の間では心臓の形態は右巻き (腹側から見て、心室に対して動脈球が向かって左側に位置する、頭部側から見て、血流が時計回り) の形態を示しており、心臓のループ形成はほぼ完了していた。今回の観察では心室に隠れて見られなかった心房は、st. 46 には形成されていることが先行研究により明らかになっている¹⁴⁾。さらに、この Kolker ら (2000) の当該論文では st. 41 から心室に心筋が密集し始めることが報告されていることから、今回の観察で st. 42-46 での心臓形態の劇的な変化は見られなかったが、その内部では心筋の筋肉量が発生段階が進むにつれて増加傾向を示すことが考えられる。また、共焦点レーザー顕微鏡による観察から、心室の心筋は少なくとも st. 46 の段階で束化した形態を示すことが本研究でも示された (図 5C)。

myosin II の機能を阻害する Blebbistatin による処理により、心臓の低形成が生じた (図 2C-C')。Blebbistatin 処理群の心臓を MF-20 で免疫染色したところ、心筋の凝集 (占める体積の矮小化) を観察した (図 2D-D')。これらの結果から、心臓の形態形成に actomyosin 系の st. 42-46 の時期での収縮が必要である可能性が示唆された。この発生段階では、すでに幼生的心臓は活発に拍動している。この結果を踏まえ、Blebbistatin 処理とは逆に myosin II の機能を促進し、actomyosin の強収縮を生じさせた場合における心臓の形態への影響を調べるために、強心剤であり心筋の収縮を促進する Omecamtiv 処理を行った。その結果、意外なことに、Omecamtiv 処理においても心臓の低形成が生じ、MF-20 による処理群の免疫染色による観察では心室における心筋の凝集が観察できた。以上の結果から、心臓の形態形成にとって、強すぎず弱すぎない actomyosin 系の適度な収縮が必要である可能性が非常に高まった。

ツメガエルの場合、st. 33/34 から心臓の拍動が開始される。従って、適切な拍動の強さと律動の頻度が、後期胚 / 幼生の全身の酸素や栄養の供給のみならず、心臓自体の形態形成、特に心筋の増殖に寄与する

と予想される。器官形成期の心拍動が、心内膜から cardiac cushion への EMT (epithelial-mesenchymal transformation; 上皮間葉転換) を促進するのか、それとも、心筋分化後の増殖を促進するのかについて見極めることが、今後の重要な研究課題となる。Jackson ら (2017) は、初期の心臓原基に働く張力が EMT を経由したツメガエル初期尾芽胚期の心臓形成に重要であることを報告している²⁵⁾。Omecamtiv 処理は心筋の強縮を誘起し、その結果、リズムカルな拍動を阻害したと思われる。現在、Omecamtiv は臨床試験の進む、強く期待される強心剤であるが²⁶⁾、特に妊娠した女性においては慎重な投与量の決定が求められるであろう。以上をまとめると、2種の薬剤による実験結果から、心筋の適切な収縮が心臓の正常な器官形態と器官サイズの制御に必要であることが示唆された。

これら2種の処理群での心拍数が対照群と比較して双方とも大幅に低下していたことも、上記の「心臓の正常な形態形成に発生期の心筋の適切な収縮が必要である」との見解を支持した。収縮の強さが適切ではない場合には心臓の低形成が誘起された。そこで、心臓の低形成とは対照的に心臓の過形成を誘起した場合には心筋の分化への影響はどうなるのか、との問題意識から Phenylhydrazine による浸漬実験を行った。その結果、Phenylhydrazine 処理においては、いずれも心筋マーカーが陽性の領域である心室および動脈球(流出路)の過形成が生じた。さらに Phenylhydrazine 処理群の心筋を MF-20 抗体を用いた免疫染色により可視化した。その結果、同じ温度履歴で飼育しても、対照群に比べて Phenylhydrazine 処理群の心筋では束化が促進され、心筋束同士の間隔が広がった(図 5B-B', C-C')。Phenylhydrazine の拍動は対照群に比べて、心室と流出路とで相互に連携なくそれぞれバラバラに拍動していた。心筋束同士の間隔が広がったため、心筋の収縮の統御に異常が生じたと考えられる。Phenylhydrazine 処理胚の心臓の観察からも、心筋の適切な収縮が心臓の正常な形態形成に必要であることが示された。筋原性である心臓の正常な拍動の発達には、心筋の分化、特に束化のタイミングが適正であることが必要なのかもしれない。

Phenylhydrazine による処理によって、マウスで貧血症が生じることが報告されている¹⁹⁾。このことから Phenylhydrazine 処理がアフリカツメガエルに心臓の過形成を誘起した作用機序としては、ツメガエルにおいても貧血症に起因した可能性がある。筆者らは、貧血により血液量が低下したために心臓が単位時間あたりの血液循環量を上げることで貧血に

対応しようとしたと考えている。作業仮説としては、Phenylhydrazine 処理によって心臓に高い負荷がかかったことから、対象群に比べて心筋の束化が促進され、心筋の筋収縮パターンに異常が生じ、なおかつ心臓の過形成が生じたと考えている。今後は、この作業仮説を検証するために、Phenylhydrazine により貧血が生じているのか否かのエビデンスを得る必要がある。このエビデンスを得るために、貧血症の原因遺伝子の発現量の増減を定量 RT-PCR で調べたいと考えている。また、重篤度の高い貧血であれば血液中の赤血球の細胞数は単純に減少している可能性が考えられるため、Phenylhydrazine 処理群から血液をサンプリングし、血液中の赤血球密度を測定したいと考えている。

血管内皮細胞は血流による摩擦力により伸縮することが分かっている²⁷⁾。外力に対して血管内皮細胞はその形態を変化させる^{28, 29)}。心臓においても心室や動脈球の内壁が血流による強い流れずり応力(fluid shear stress)を受けているため、心臓を構成する細胞についても、この摩擦力に対し、細胞レベルで応力応答するために細胞の変形が生じると考えられる。また、本研究の3種類の薬剤による実験の結果から、心臓の形態形成には心筋の適切な収縮が必要であることが明らかになったので、この心筋の適切な収縮が心内膜細胞の形態を調節し、その後の心臓の発生プロセスに影響を及ぼして、最終的なアウトプットとして適切なサイズ(体積)の心臓になるよう導くのではないかと考えている。そのため、心臓の組織切片を作成し、あるいは心内膜層特異的に免疫染色を行い、可視化して共焦点レーザー顕微鏡による3D構築画像から、その上皮細胞形態を観察し定量する必要があると考えている。ラットの大動脈の血管平滑筋細胞の培養細胞を用いた研究では、層流(laminar flow)の有無により平滑筋 actin や smooth muscle protein 22 (SM22) などの平滑筋マーカーの発現の有無や発現量が変化することが報告されている³⁰⁾。本研究の実験系では、心臓の低形成ないし過形成に起因して心臓にかかる血流からの fluid shear stress の変化が生じていると予想され、Shi ら (2010) の報告が示唆するように、ツメガエルの形成初期の心臓大血管系においても、血流の速さや粘度に応じて流れずり応力が変化している可能性がある。そのため、アフリカツメガエルの心臓大血管系におけるこれらの平滑筋マーカーの発現量を、まずは定量 RT-PCR 法により調査したいと考えている。

今後は薬理的ないし分子生物学的なアプローチで、心臓のごく狭い領域で特異的に actomyosin の収縮運動を阻害することで、ループ形成がどのように

変化していくのかを追う必要がある。あるいは、光照射で開環して、例えば ATP など内部に閉じ込められた低分子を放出する caged 化合物を利用し、狭い領域だけで actomyosin の収縮運動を活性化すると興味深い知見が得られるであろう³¹⁾。

myosin は、大きなファミリーを形成する分子種である。そのファミリーメンバーである myosin I は actin フィラメントと相互作用し、細胞内小胞輸送や細胞膜の張力の制御に関与する³²⁾。ショウジョウバエの myosin I は胚期に消化管系に発現量が多い³³⁾。ショウジョウバエの消化管が内臓逆位になる *souther* 変異体が現大阪大学の松野健治博士らのグループにより同定され、この内臓逆位の原因遺伝子が myosin I をコードする *Myo31DF* であることが明らかになった³⁴⁾。さらに、後腸の曲がる方向は後腸上皮細胞の細胞形態の chirality により決まり、この chirality の形成に myosin I 遺伝子が関与していることが分かっており、anisotropic な後腸上皮の細胞形態の変形が後腸のループ形成に必要である可能性を示唆している³⁵⁾。脊椎動物のアフリカツメガエルにおいて、myosin I は心臓および腸管に発現している³⁾。最近松野博士らの研究は別グループにより脊椎動物胚に拡張され、アフリカツメガエルの myosin I をノックダウンすると、内臓逆位を示す個体の割合が増加したことが報告されている¹³⁾。このことから、アフリカツメガエルとショウジョウバエの間では腸管の左右非対称性の決定への myosin I の関与が進化的に保存されていることが考えられる。そのため、ツメガエルの心臓(原始心筒)においても細胞形態の chirality とその変化が生じる可能性が推察できる。

まとめると、本研究において、心臓の正常な形態形成にも actomyosin の適切な収縮が必要であることが示された。今後の展望として、生体内での actin や myosin II の動態を観察することが課題として挙げられる。そこで遺伝子導入法によって蛍光蛋白質を繋げた actin または myosin 遺伝子を導入したトランスジェニックツメガエル幼生を作出し、実際の生体内での actomyosin の滑り運動の動態を経時的に観察し、心臓の形態形成への actomyosin 系の収縮の関与を、直接的に、かつリアルタイムで明らかにしたい。心筋細胞の細胞増殖と細胞移動を追うためには、リン酸化 Histone に GFP タグをつけたイメージング手法も有用と思われる。

内臓の左右非対称性決定の遺伝的カスケード (*nodal* => *pitx2* 経路) の下流としてのループ形態形成

本研究で注目した心臓の左右非対称性の向き(左

右極性)の確立には、*nodal* と呼ばれる TGF- β superfamily に属する分泌因子をコードする遺伝子が関与していることが知られている。*nodal* は脊椎動物で共通して、原腸胚期にはオルガナイザー領域に、後期神経胚期(初期体節期)には、側板中胚葉(LPM)で左側特異的に発現する。この *nodal* の左右非対称な発現により、後期オルガナイザー領域(ツメガエル胚では神経胚原腸の後方天井蓋部)での繊毛運動が生成する液流による左右非対称性の破れが左右非対称な遺伝子発現として特異化され、内臓には左右性の情報が付加される^{36,37)}。さらに、臓側板中胚葉から原始心筒が形成される³⁸⁾。そのため、遺伝子発現による左右軸の確立から実際にその左右情報をもとに左右非対称に心臓がルーピングする一連の流れに対して、Nodal シグナルに対する心臓中胚葉の起源組織のコミットメントが関係する可能性は考えられる。実際、硬骨魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュの心臓のルーピングには actomyosin の収縮が必要であり、そのルーピングの方向は Nodal シグナルによる左右軸の情報をもとに行われると報告されている³⁹⁾。この研究は真骨魚類のゼブラフィッシュのものではあるが、Nodal シグナルの下流における心臓の左右非対称性の確立の実行者として actomyosin 系が関与していることを示唆している。*nodal* は脊椎動物間で広く保存されており、両生類であるアフリカツメガエルにおいても左側の LPM で *nodal* 関連遺伝子 *Xnr-1* (*Xenopus nodal related-1*) が発現し、左右非対称性決定に関与していることを我々は報告している^{40,41)}。

展望

actomyosin は脊椎動物の内臓進化のツールキットたり得るか

本論文の最後の論考として、心臓の発生を研究対象とした本研究の立脚点から、脊椎動物全般のそれを進化系統学的に展望する。今後は、脊索動物のうち、脊椎動物とは早期に分岐した頭索動物や、脊椎動物のプロトタイプたる円口類を用いて心臓や腸管などの円筒型の器官形成に actomyosin の収縮が関与しているのかとの問題意識をもとに研究を拡張し、器官形成期における actomyosin 系の構成因子のうち具体的に(マイナーな family member も含めて)どの構成分子が、どの程度、進化的に保存されているのかを研究したいと考えている。脊椎動物の心臓は右巻きにルーピングする。さらに、心臓は区画化される部屋の数は生物種によって異なるが、心室と心房により構成される⁴²⁾。脊椎動物でも早期に系統学的に分岐した円口類であるカワヤツメの心臓は原始心筒

を形成し、他の脊椎動物の心臓形成の区画化に関与する *tbx* を原始心筒に発現していることが分かっている^{43,44}。また、*nodal* の下流シグナルである *pitx* は、左側板中胚葉に加えて、心臓中胚葉にも左右非対称に発現している⁴⁴。これらの点から、脊椎動物の心臓の形態形成期における actomyosin 系の関与が円口類以前の祖先種で既に獲得されたものなのかを研究することは非常に興味深いと考えている。何故、myosin がこれほどに多様なのか？については、「様々な動物で、様々な発生プロセスに、その組織細胞内の微小環境で求められる役割に最適化すべく fine tuning されて関与するように分子進化してきたから」という作業仮説を抱えている。本研究を発展させれば、あまりにも有名な actomyosin というツールキットが、脊椎動物の進化と多様性を語る上でも欠かせぬツールキットでもあることが示されるかもしれない。

謝辞

研究を遂行する上で、数々の御助言を賜りました小笠原強名誉教授、日野晶也名誉教授、泉進名誉教授、小谷享教授、大平剛教授に厚く御礼申し上げます。実験方法を教えていただきました教務技術職員の鶴岡慎哉先生に感謝申し上げます。また、ツメガエル胚・幼生の wholemount 免疫染色の技法を教えてくださいました、横浜市立大学の内山英穂教授、小林剛氏に感謝いたします。私たちの研究をご支援して頂きました総合理学研究所所長川本達也教授ならびに所員各位に感謝いたします。

文献

- Perrin BJ and Ervasti JM (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton* (Hoboken). **67**(10): 630-634.
- Sebé-Pedrós A, Grau-Bové X, Richards TA and Ruiz-Trillo I (2014) Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol. Evol.* **6**(2): 290-305.
- Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, et al. (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*. **538**(7625): 336-343.
- Marston DJ and Goldstein B (2006) Actin-based forces driving embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**(4): 392-398.
- Ma X and Adelstein RS (2012) *In vivo* studies on nonmuscle myosin II expression and function in heart development. *Front. Biosci.* (Landmark Ed). **17**(2): 545-555.
- Biben C and Harvey RP (1997) Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* **11**(11): 1357-1369.
- McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, et al. (2005) The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* **132**(1): 189-201.
- Lu W, Seeholzer SH, Han M, Arnold AS, et al. (2008) Cellular nonmuscle myosins NMHC-IIA and NMHC-IIB and vertebrate heart looping. *Dev. Dyn.* **237**(12): 3577-3590.
- Tsuda T, Majumder K and Linask KK (1998) Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev. Genet.* **23**(3): 203-214.
- Linask KK, Yu X, Chen Y and Han MD (2002) Directionality of heart looping: effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Dev. Biol.* **246**(2): 407-417.
- Ocaña OH, Coskun H, Minguillón C, Murawala P, et al. (2017) A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature* **549**(7670): 86-90.
- Okumura T, Sasamura T, Inatomi M, Hozumi S, et al. (2015) Class I myosins have overlapping and specialized functions in left-right asymmetric development in *Drosophila*. *Genetics* **199**(4): 1183-1199.
- McDowell GS, Lemire JM, Paré JF, Cammarata G, et al. (2016) Conserved roles for cytoskeletal components in determining laterality. *Integr. Biol. (Camb)*. **8**(3): 267-286.
- Kolker SJ, Tajchman U and Weeks DL (2000) Confocal imaging of early heart development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **218**(1): 64-73.
- Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A and Sellers JR (2004) Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* **279**(34): 35557-35563.
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, et al. (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299** (5613): 1743-1747.
- Liu Y, White HD, Belknap B, Winkelmann DA and Forgacs E (2015) Omecamtiv mecarbil modulates the kinetic and motile properties of porcine β -cardiac myosin. *Biochemistry* **54**(10): 1963-1975.
- Sun X, Hoage T, Bai P, Ding Y, et al. (2009) Cardiac hypertrophy involves both myocyte hypertrophy and hyperplasia in anemic zebrafish. *PLoS One* **4**(8): e6596.
- Mirciov CS, Wilkins SJ, Dunn LA, Anderson GJ and Frazer DM (2017) Characterization of putative erythroid regulators of hepcidin in mouse models of anemia. *PLoS One* **12**(1): e0171054.
- Shetlar MD and Hill HA (1985) Reactions of hemoglobin with phenylhydrazine: a review of selected aspects. *Environ. Health Perspect.* **64**: 265-281.
- Nieuwkoop PD and Faber J (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. Elsevier Science Publishing Co. pp. 1-258.

- 22) Shen MM (2007) Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* **134**(6): 1023-1034.
- 23) Schweickert A, Ott T, Kurz S, Tingler M, et al. (2017) Vertebrate left-right asymmetry: What can Nodal cascade gene expression patterns tell us? *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **5**(1). pii: E1.
- 24) Pai VP, Willocq V, Pitcairn EJ, Lemire JM, et al. (2017) HCN4 ion channel function is required for early events that regulate anatomical left-right patterning in a *nodal* and *lefty* asymmetric gene expression-independent manner. *Biol. Open.* **6**(10): 1445-1457.
- 25) Jackson TR, Kim HY, Balakrishnan UL, Stuckenholtz C and Davidson LA (2017) Spatiotemporally controlled mechanical cues drive progenitor mesenchymal-to-epithelial transition enabling proper heart formation and function. *Curr. Biol.* **27**(9): 1326-1335.
- 26) Tariq S and Aronow WS (2015) Use of inotropic agents in treatment of systolic heart failure. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(12): 29060-29068.
- 27) Yamamoto K and Ando J (2015) Vascular endothelial cell membranes differentiate between stretch and shear stress through transitions in their lipid phases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**(7): H1178-1185.
- 28) Dick M, MacDonald K, Tardif JC and Leask RL (2015) The effect of simvastatin treatment on endothelial cell response to shear stress and tumor necrosis factor alpha stimulation. *Biomed. Eng. Online* **14**: 58.
- 29) Sugden WW, Meissner R, Aegerter-Wilmsen T, Tsaryk R, et al. (2017) Endoglin controls blood vessel diameter through endothelial cell shape changes in response to haemodynamic cues. *Nat. Cell Biol.* **19**(6):653-665.
- 30) Shi ZD, Abraham G and Tarbell JM (2010) Shear stress modulation of smooth muscle cell marker genes in 2-D and 3-D depends on mechanotransduction by heparan sulfate proteoglycans and ERK1/2. *PLoS One* **5**(8): e12196.
- 31) Weinreich F, Riordan JR and Nagel G (1999) Dual effects of ADP and adenylylimidodiphosphate on CFTR channel kinetics show binding to two different nucleotide binding sites. *J. Gen. Physiol.* **114**(1): 55-70.
- 32) McIntosh BB and Ostap EM (2016) Myosin-I molecular motors at a glance. *J. Cell Sci.* **129**(14): 2689-2695.
- 33) Morgan NS, Heintzelman MB and Mooseker MS (1995) Characterization of myosin-IA and myosin-IB, two unconventional myosins associated with the *Drosophila* brush border cytoskeleton. *Dev. Biol.* **172**(1): 51-71.
- 34) Hozumi S, Maeda R, Taniguchi K, Kanai M, et al. (2006) An unconventional myosin in *Drosophila* reverses the default handedness in visceral organs. *Nature* **440**(7085): 798-802.
- 35) Hatori R, Ando T, Sasamura T, Nakazawa N, et al. (2014) Left-right asymmetry is formed in individual cells by intrinsic cell chirality. *Mech. Dev.* **133**: 146-162.
- 36) Essner JJ, Amack JD, Nyholm MK, Harris EB and Yost HJ (2005) Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* **132**(6): 1247-1260.
- 37) Schweickert A, Weber T, Beyer T, Vick P et al. (2007) Cilia-driven leftward flow determines laterality in *Xenopus*. *Curr. Biol.* **17**(1): 60-66.
- 38) van den Berg G and Moorman AFM (2011) Development of the pulmonary vein and the systemic venous Sinus: An interactive 3D Overview. *PLoS ONE* **6**(7): e22055.
- 39) Noël ES, Verhoeven M, Lagendijk AK, Tessadori F, et al. (2013) A Nodal-independent and tissue-intrinsic mechanism controls heart-looping chirality. *Nat. Commun.* **4**: 2754.
- 40) Toyoizumi R, Ogasawara T, Takeuchi S and Mogi K (2005) *Xenopus nodal related-1* is indispensable only for left-right axis determination. *Int. J. Dev. Biol.* **49**(8): 923-938.
- 41) Toyoizumi R, Takeuchi S and Mogi K (2006) Subtilisin-like proprotein convertase activity is necessary for left-right axis determination in *Xenopus* neurula embryos. *Dev. Genes Evol.* **216**(10): 607-622.
- 42) Jensen B, Wang T, Christoffels VM and Moorman AF (2013) Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**(4): 783-794.
- 43) Koshiha-Takeuchi K, Mori AD, Kaynak BL, Cebra-Thomas J, et al. (2009) Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature* **461**(7260): 95-98.
- 44) Kokubo N, Matsuura M, Onimaru K, Tiecke E, et al. (2010) Mechanisms of heart development in the Japanese lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Evol. Dev.* **12**(1): 34-44.

■原 著■

ホワイトレグシュリンプの脱皮抑制ホルモンの探索

大平 剛^{1,5} 豊田賢治² Nguyen Thi Van Anh³ 高塚由美子⁴ 原富次郎⁴

Transcriptomic Characterization of Molt-inhibiting Hormones from the
Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*

Tsuyoshi Ohira^{1,5}, Kenji Toyota², Nguyen Thi Van Anh³, Yumiko Takatsuka⁴
and Tomijiro Hara⁴

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

² Marine Biological Station, Sado Center for Ecological Sustainability, Niigata University, Sado City, Niigata 952-2135, Japan

³ Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

⁴ Environmental Microbiology Research Section, Laboratory for Complex Energy Processes, Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto City, Kyoto 611-0011, Japan

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

Abstract: Molt-inhibiting hormone (MIH) is produced in the X-organ/sinus gland complex of the eyestalk. MIH negatively regulates molting hormone (ecdysteroids) synthesis in the Y-organ. Therefore, MIH is considered to be one of the most important molecules for growth regulation in crustaceans. In order to discover new MIH molecules from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*, RNA-seq analysis was conducted in this study. Total RNAs were extracted from the eyestalk, brain, thoracic ganglia, and abdominal ganglia, and were used for library preparation. Pair-end sequencing of the constructed cDNA libraries was performed (3.0 Mb for each library). As a result, five new MIH molecules were identified and one of them was expressed in all nerve tissues. This characteristic gene expression pattern was similar to that of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* MIH-B, so this molecule from *L. vannamei* was designated as Liv-MIH-B. Amino acid sequence comparison of Liv-MIH-B and known MIHs indicated that Liv-MIH-B must be a non-eyestalk type molecule. However, the expression level of Liv-MIH-B in the eyestalk was very high. Therefore, Liv-MIH-B was considered to be a unique MIH molecule that has never been reported.

Keywords: crustacea, eyestalk hormone, whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, molt-inhibiting hormone

序論

エビやカニなどの甲殻類は硬い外骨格を持つ。外骨格は主にキチンと炭酸カルシウムからなり、硬いだけでなく、しなやかで丈夫である。甲殻類が成長するためには、古い外骨格を脱ぎ捨てる必要があり、その現象を脱皮と呼ぶ。脱皮から脱皮までの期間は、外骨格の構造変化により脱皮前期、脱皮間期、脱皮期、脱皮後期に分けることができる。甲殻類の脱皮は、頭胸部に存在する Y 器官で合成される脱皮ホルモン（エクジステロイド）により制御されている^{1,2)}。

多くの甲殻類で、血中のエクジステロイドが脱皮前期に上昇することで脱皮が誘導される。

エクジステロイドによる脱皮の誘導が明らかにされるよりも遥か昔、甲殻類の眼柄を切除すると脱皮が早まることが示されていた³⁾。この現象から、眼柄の中には甲殻類の脱皮を抑制する因子が存在すると推測された。眼柄内には X 器官と呼ばれるホルモンを合成する神経分泌細胞群と、合成されたホルモンを一時的に貯蔵するサイナス腺が存在していた。

1990年、初めてアメリカンロブスターのサイナス腺から脱皮抑制ホルモン (molt-inhibiting hormone, MIH) が単離され、アミノ酸配列が決定された⁴⁾。アメリカンロブスターのMIHは、Y器官でのエクジステロイド合成を抑制する活性を有していた。アメリカンロブスターのMIHは、1989年に単離・構造決定されていたミドリガニの甲殻類血糖上昇ホルモン (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) と類似していた⁵⁾。さらに、アメリカンロブスターの卵黄形成抑制ホルモン (vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH) のアミノ酸配列も決定され、VIHもMIHやCHHと類似のアミノ酸配列を有していた⁶⁾。これらの眼柄ホルモンは生理活性が異なっているにもかかわらず、類似するアミノ酸配列を有していることから、1つのペプチドファミリー (CHH族) を形成していることが明らかとなった。

MIHは脱皮を制御することで、甲殻類の成長を制御している。そのため、MIHに関する情報は甲殻類の成長を理解する上で重要と考えられるようになり、世界中で盛んに養殖が行われているクルマエビ科のエビ類のMIHが次々と同定された。1996年にクルマエビのサイナス腺からMIHが精製・単離され⁷⁾、2005年には新たにMIHとよく似た分子 (MIH-B) が同定された⁸⁾。クルマエビMIH-BはMIHよりも活性は低いものの、有意にエクジステロイドの合成を抑制した。2002年、ウシエビにもMIHが2種類存在することがcDNAクローニングにより示された⁹⁾。それら2つのMIHは僅か2アミノ酸しか異なっておらず、一次構造がよく類似していた (同一率97.4%)。しかし、それら2つの遺伝子が1個体由来のゲノムDNAに別々に存在していたことから、個体差による違いではないことが明らかとなった。その後も複数のクルマエビ科のエビ類で研究がすすめられ、MIHが同一種に複数存在することが示された¹⁰⁾。

ホワイトレグシュリンブ (*Litopenaeus vannamei*) は世界で最も盛んに養殖されているクルマエビ科のエビ類である。そのため、MIHの研究も進んでいる。現在までに、ホワイトレグシュリンブからMIH1、MIH2、MIH like protein、MIH-1、MIH-2の5種類をコードするcDNAが単離され、報告されている¹¹⁻¹³⁾。近年、ホワイトレグシュリンブのゲノム配列が解析され、前述の5種類に加えてさらに多くのMIHが存在する可能性が示された¹⁴⁾。そこで本研究では、ホワイトレグシュリンブの神経組織 (眼柄、脳、胸部神経節、腹部神経節) のRNAシーケンス解析を行い、遺伝子発現している新規のMIHを探索することを目的とした。

材料と方法

ホワイトレグシュリンブ

奈良県の養殖業者が飼育していたホワイトレグシュリンブの成体エビを実験で使用した。神経ホルモンの産生器官である眼柄、脳、胸部神経節、腹部神経節を実体顕微鏡下で摘出した。摘出した4つの器官は別々にRNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) の入った1.5 mLチューブ中に入れ-80度で保存した。

Total RNAの抽出

眼柄はtotal RNAを抽出する前に解凍し、RNAlater™ Stabilization Solution中で殻と網膜を除去して眼柄神経節のみを外科的に切り出した。眼柄神経節、脳、胸部神経節、腹部神経節のTotal RNAはISOGEN II (ニッポンジーン) を使用して抽出し、RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて精製した (雌雄それぞれn=1)。Total RNAの濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

RNA-seq解析

抽出したtotal RNAをGene Nex社に送付し、RNAシーケンス解析を行った。ライブラリーはEukaryotic Transcriptome Libraryを用いて作製された。RNA-seqは101 bpのpaired-endで実施し、各サンプル約3.0 G bpのシーケンスを得た。シーケンスの品質チェックはFastQCプログラム (version 0.11.2) で実施した。ホワイトレグシュリンブは公共データベースからゲノムとトランスクリプトームデータが利用可能である (<http://www.shrimpbaseset.net/lva/download.html>)。リードカウントにはsalmon (version 1.4.0) を用いた。

結果

ホワイトレグシュリンブの神経組織で発現しているMIH

今回の解析により、5種類のMIH mRNAが神経組織で発現していた。それら5種類のMIHのアミノ酸配列は、ホワイトレグシュリンブのゲノム配列から推測されたMIHやMIH様分子のアミノ酸配列と完全に一致していた (アクセッション番号ROT81026, ROT81028.1, XP_027237983, XP_027237684.1, XP_027223582.1)。それらのうち、XP_027223582.1のみが特徴的な遺伝子発現をしていた。XP_027223582.1は今回調べた全ての神経組織で発現していたが (図1)、他の4種類は眼柄のみでしか発現していなかった (データ省略)。また、

XP_027223582.1 は眼柄、脳、胸部神経節で高発現していたが、腹部神経節の発現量は低かった (図 1)。この発現パターンは、クルマエビの MIH-B と類似していた⁸⁾。そのため本研究では、この特徴的な分子をホワイトレグシュリンプ MIH-B (Liv-MIH-B) と名付けた。

Liv-MIH-B

Liv-MIH-B の前駆体は 141 アミノ酸残基からなり、N 末端側から 25 アミノ酸残基のシグナルペプチド、41 アミノ酸残基の前駆ペプチド、2 アミノ酸残基のプロセシングシグナル、73 アミノ酸残基の Liv-MIH-B で構成されていた (図 2)。Liv-MIH-B と既知のホワイトレグシュリンプ MIH のアミノ酸配列を比較した結果、Liv-MIH-B は Liv-MIH-I と最もよく類似していた¹²⁾。しかし、Liv-MIH-B と Liv-MIH-I は C 末端側の 2 アミノ酸残基が異なっていた (図 2)。クルマエビの CHH やウシエビの MIH においても、僅か 1 から 2 アミノ酸違いの分子が同一個体で発現していることが明らかにされている^{9, 15)}。これらのことから、Liv-MIH-B と Liv-MIH-I も異なる分子と考えられた。

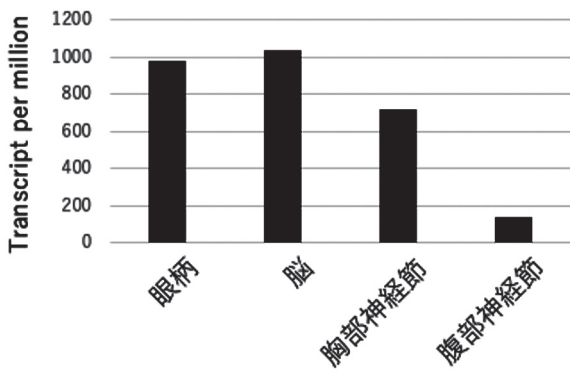


図 1. ホワイトレグシュリンプ MIH-B (Liv-MIH-B) の神経組織別の遺伝子発現。

討論

ホワイトレグシュリンプの神経組織で発現している MIH

本研究では神経組織で発現している 5 つの MIH を見出したが、それらは既知のホワイトレグシュリンプ MIH1、MIH2、MIH like protein、MIH-1、MIH-2 とはアミノ酸配列が異なっていた¹¹⁻¹³⁾。この結果より、ホワイトレグシュリンプには、未知の MIH 分子が多数存在していることが明らかとなった。また、本研究で発見した 5 つの MIH 分子は、神経組織で遺伝子発現していたことから、生体内で何かしらの機能を果たしていると考えられた。ホワイトレグシュリンプは、RNA 干渉による遺伝子ノックダウンが有効であることが報告されている¹³⁾。今後、これら 5 種類の MIH の機能を RNA 干渉による遺伝子ノックダウン実験で調べる予定である。

Liv-MIH-B

Liv-MIH-B と最も良く似ていた Liv-MIH-I にはスプライシングバリエーション (Liv-MIH-II) が存在する (図 2)。Liv-MIH-I と Liv-MIH-II は成熟ホルモンの 43 残基目のシステインまではアミノ酸配列が同一であるが、それよりも C 末端側のアミノ酸配列は異なっていた。これは、スプライシング様式の違いが原因で起きることが明らかとなっている。ミドリガニの CHH でも同様の現象が観察されており、成熟 CHH の C 末端側にアミド化シグナルが存在する分子は眼柄で発現し、アミド化シグナルが存在しない分子は囲心器官で発現していた¹⁶⁾。その後、同様の選択的スプライシングが幾つかの CHH 族ペプチドで報告され、アミド化シグナルが存在する分子は眼柄タイプ、アミド化シグナルが存在しない分子は非眼柄タイプということが分かった¹⁷⁾。Liv-MIH-B は C 末端側にアミド化シグナルが存在しないことから非眼柄タイプと考えられたが、眼柄で強く発現していた (図

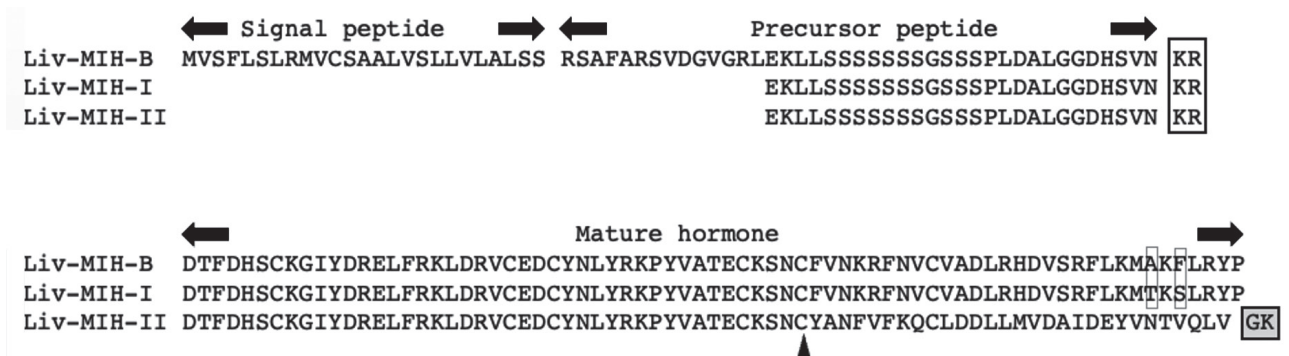


図 2. ホワイトレグシュリンプ MIH-B (Liv-MIH-B), Liv-MIH-I¹²⁾, Liv-MIH-II¹²⁾ のアミノ酸配列のアライメント。実線のボックスはプロセシングシグナルを、点線のボックスは Liv-MIH-B と Liv-MIH-I で異なるアミノ酸を、グレーのボックスはアミド化シグナルを示す。三角は 43 残基目のシステインを示す。

1)。この様に、Liv-MIH-Bは既知の知見とは異なる特徴を有していた。そのため、Liv-MIH-Bは新たな機能を有する可能性も考えられた。Liv-MIH-Bにはスプライシングバリエーションの眼柄タイプも存在すると考えられる。今後、Liv-MIH-Bだけでなく、スプライシングバリエーションの機能を解析していくことで、Liv-MIH-Bの生体内での役割を明らかにしていく予定である。

謝辞

本研究は、京都大学エネルギー理工学研究所・ゼロエミッションエネルギー研究拠点の2022年度共同研究「*Bacillus*属細菌胞子によるバナメイエビの成長促進機構の解明(課題番号ZE2022B-46)」の支援を受けて行われたものです。ここに謝意を表します。

文献

- 1) 長澤寛道 (1997) 甲殻類における脱皮の内分泌機構. *月刊海洋* **29**: 246-250.
- 2) 園部治之, 仲辻晃明 (2002) 甲殻類の脱皮を制御する内分泌機構. *化学と生物* **40**:101-108.
- 3) Zeleny C (1905) Compensatory regulation. *J. Exp. Zool.* **2**: 1-102.
- 4) Chang ES, Prestwich GD and Bruce MJ (1990) Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**: 818-826.
- 5) Kegel G, Reichwein B, Weese S, Gaus G, Peter-Katalinic J and Keller R (1989) Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas* FEES *Lett.* **255**: 10-14.
- 6) Soyez D, LeCaer 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.
- 7) Yang WJ, Aida K, Terauchi A, Sonobe H and Nagasawa H (1996) Amino acid sequence of a peptide with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Peptides* **17**: 197-202.
- 8) Ohira T, Katayama H, Tominaga S, Takasuka T, Nakatsuji T, Sonobe H, Aida K and Nagasawa H (2005) Cloning and characterization of a molt-inhibiting hormone-like peptide from the prawn *Macrobrachium japonicum*. *Peptides* **26**: 259-268.
- 9) Krungkasem C, Ohira T, Yang WJ, Abdullah R, Nagasawa H and Aida K (2002) Identification of two distinct molt-inhibiting hormone-related peptides from the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* **4**: 132-140.
- 10) Nakatsuji T, Lee CY and Watson RD (2009) Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. *Comp. Biochem. Physiol. A* **152**:139-148.
- 11) Chen HY, Watson RD, Chen JC, Liu HF and Lee CY (2007) Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **151**: 72-81.
- 12) Lago-Lestón A, Ponce E and Muñoz ME (2007) Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture* **270**: 343-357.
- 13) Zuo H, Yuan J, Niu S, Yang L, Weng S, He J and Xu X (2018) A molting-inhibiting hormone-like protein from pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* is involved in immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* **72**: 544-551.
- 14) Zhang XJ, Yuan J, Sun Y, Li S, Gao Y, Yu Y, Liu C, Wang Q, Lv X, Zhang X, Ma KY, Wang X, Lin W, Wang L, Zhu X, Zhang C, Zhang J, Jin S, Yu K, Kong J, Xu P, Chen J, Zhang H, Sorgeloos P, Sagi A, Alcivar-Warren A, Liu Z, Wang L, Ruan J, Chu KH, Liu B, Li F and Xiang J (2019) Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature commun.* **10**: 1-14.
- 15) Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* **6**: 49-90.
- 16) Dircksen H, Böcking D, Heyn U, Mandel C, Chung JS, Baggerman G, Verhaert P, Daufeldt S, Plösch T, Jaros PP, Waelkens E, Keller R and Webster SG (2001) Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem. J.* **356**: 159-170.
- 17) Webster SG, Keller R and Dircksen H (2021) The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* **175**: 217-233.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

扁形動物の微小管重合蛋白質遺伝子を同定する試み

越智拓海^{1,2} 石田汐里¹ ニエンタンフォン¹ 橋 友理香² 筒井直昭³
小谷 享^{1,2,4}

Identification of Primitive Microtubule-Associated Protein Genes using
the Marine Planarian, *Stylochoplana pusilla*

Takumi Oti^{1,2}, Shiori Ishida¹, Phuong Thanh Nghiem¹, Yurika Hashi²,
Naoaki Tsutsui³, Susumu Kotani^{1,2,4}

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

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

³ Department of Marine Bioresources, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu City, Mie 514-8507, Japan.

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

Abstract: Microtubule-associated proteins (MAPs) interact with microtubules and regulate cell division, cell morphogenesis, cell movement, spindle formation, and intracellular transport. Mammalian MAPs, MAP2, MAP4, and Tau, have a repeating site of the "AP (assembly-promoting) sequence" in the central part of the microtubule-associated site that directly binds to microtubules. Recently, genetic analysis revealed that molecules with repeated AP sequences exist throughout the animal kingdom, but it remains unclear whether these molecules function as MAPs. The purpose of this study was to identify the primordial MAP molecule using the marine planarian, *Stylochoplana pusilla*. First, we examined the breeding method to maintain *S. pusilla* in the laboratory. As a result of changing the diets, the *S. pusilla* chased and preyed on brine shrimp, and the body size and survival rate of the group that ate the brine shrimp were high. Furthermore, two *S. pusilla* MAP (SpMAP) molecules were identified based on RNA-seq data. The predicted amino acid sequences were analyzed based on the cloned sequences of SpMAP mRNA. As a result, the two types of SpMAPs had different numbers of AP sequence iterations, and there were SpMAP_4R with 4 repeating AP sequences and SpMAP_5R with 5 repeating AP sequences. SpMAP_4R was missing the 4th AP sequence of SpMAP_5R. Mammalian neural MAPs, MAP2 and τ , lack the second AP sequence of systemic MAP4, so SpMAPs may also show differences in localization and function such as neuronal and systemic. In the future, we will analyze the functional conservation and localization of these SpMAPs and clarify the evolutionary conservation of the MAPs family.

Keywords: microtubule-associated proteins (MAPs), assembly-promoting (AP) sequence, *Stylochoplana pusilla*

序論

微小管は真核生物の細胞骨格の一種であり、細胞分裂、細胞内輸送、細胞の複雑な形態の維持などの重要な細胞機能の発現に寄与する。これらの機能を発現するためには、微小管が様々な微小管結合タンパク質 (MAPs) と相互作用する必要がある。中でも、

微小管の形成や微小管の束化、他の細胞骨格との架橋などの微小管の基本構造に関わる哺乳類の MAPs として MAP2/MAP4/Tau スーパーファミリーが知られている。MAP2、MAP4、Tau はいずれも N 末端側に突起部位 (Projection domain)、C 末端側に微

小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもち、微小管結合部位はプロリンに富む Pro-rich 領域、繰り返し領域、尾部 tail に分けられる (図 1)¹⁾。繰り返し領域には、微小管結合活性をもつ 18 残基アミノ酸の基本構造 “Assembly-Promoting (AP) 配列” が複数個あり、選択的スプライシングにより AP 配列の繰り返し数に違いが生じる。哺乳類の MAP2 (AP 配列の繰り返し数; 3 個)、MAP4 (5 個)、Tau (4 個)の間では AP 配列の相同性が高く、分子進化の過程で、1 個の AP 配列をもつ祖先分子が重複し、繰り返しをもつ始原 MAP 分子が誕生し、その後、複数の分子に分岐したと考えられている¹⁾。哺乳類においては、MAP2 や Tau は神経特異的に発現する一方で、MAP4 は神経系も含めた全身で発現する。これらのことから、まず動物細胞の形態・機能維持のための MAP4 が獲得され、中枢神経系が獲得された以降に MAP2-like 分子や Tau-like 分子に分岐したと考えられるが、哺乳類以外の生物種における MAPs 機能の普遍性や進化的関連についてはほとんど研究されていない。近年、哺乳類以外の動物種にも AP 配列の繰り返しを持つ遺伝子が存在することが明らかになってきたが、MAPs としての機能を持つかどうかは不明である。我々はこれまでに、哺乳類 MAP4 の AP 配列のアミノ酸配列情報を元にタンパク質データベースから相同性検索を行い、相同性が高い 581 種類のタンパク質を見出している²⁾。また、AP 配列に類似した領域をもち、哺乳類 MAPs と類似する MAPs 遺伝子が硬骨魚類のゼブラフィッシュ、両

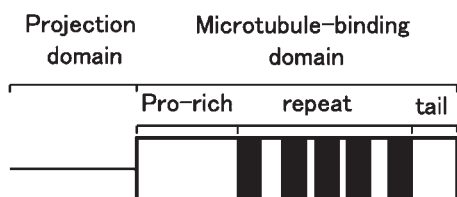


図 1. microtubule-associated protein (MAP) の基本構造。N 末端側に突起部位 (Projection domain)、C 末端側に微小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもち、Microtubule-binding domain はプロリンに富む (Pro-rich) 領域、微小管結合活性を持つ assembly-promoting 配列の繰り返し (repeat) 領域、尾部 (tail) 領域に分けられる。

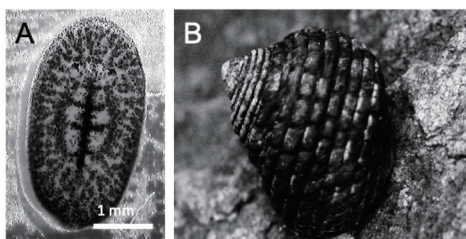


図 2. カイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) (A) と宿主のイシダタミ (*Monodonta confusa*)。スケールバー: 1 mm。

生類のアフリカツメガエル、軟体動物のジャンボアメフラシ、線形動物の線虫など様々な生物種に存在することを明らかにしている。特に、線虫の MAPs 遺伝子 (Ptl-1) に関しては、Ptl-1 が試験管内で微小管を重合させることも明らかにした³⁾。新口動物、旧口動物で共通して MAP ファミリーが存在したことから、MAPs の祖先分子は新口動物、旧口動物に分岐する前に出現し、その基本的な分子構造と機能は進化的に保存されている可能性が高い。

扁形動物カイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) は新口動物、旧口動物に分岐点近くに位置する最も原始的な左右相称動物で、中枢化された神経 (原型脳) をもち、カイヤドリヒラムシ (図 2A) は岩礁地帯に生息するイシダタミ (*Monodonta confusa*) (図 2B) に共生している。最近、左右相称動物に普遍的な下垂体後葉ホルモン (バソプレシン/オキシトシン) の祖先型ホルモンがヒラムシで発見された⁴⁾。そのため、左右相称動物に普遍的な分子の探索や中枢神経系のプロトタイプの研究に適していると考えられる。しかし、カイヤドリヒラムシの生態や食性には不明な点が多く、実験室での繁殖維持方法は確立されていない。そこで本研究では、扁形動物カイヤドリヒラムシの飼育系の確立と左右相称動物における始原 MAP の探索を試みた。

材料と方法

実験動物とサンプリング

神奈川県足柄郡真鶴町および神奈川県三浦郡葉山町芝崎海岸で採取したカイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) を用いて飼育実験を行った。また、岡山県瀬戸内市牛窓町周辺で採取したカイヤドリヒラムシを用いて MAPs-like 遺伝子の同定を行った。カイヤドリヒラムシはイシダタミ (*Monodonta confusa*) に片利共生している。採取したイシダタミをハンマーで割り、殻の入り口から内部に生息するカイヤドリヒラムシを採取し、プラスチックシャーレに海水を入れ飼育した。通常の飼育は、30°C、恒暗条件下で行い、餌としてブラインシュリンプを 3 日に 1 度与えた。また、マリンアート Hi (Osakayakken, Osaka, Japan) を用いて人工海水を作製し、飼育水とした。水換えは餌を与えた次の日に行った。

飼育水の検討

飼育水の影響を解析するため、神奈川県平塚市袖ヶ浜で採取した海水、人工海水 2 種 [細谷ら (2019, Marine Environmental Research) の海水⁵⁾、マリンアート Hi] を用いて、恒暗条件、30°C で 14 日

間飼育した。1週間に1度、倒立顕微鏡 (CKX-41, Olympus, Tokyo, Japan) でヒラムシの写真を撮影し、ImageJ (ImageJ 1.44p) を用いてヒラムシの大きさ (面積) を測定した。

餌の検討

人工海水 (マリンアート) 中でブラインシュリンプ、アカムシ、シアノバクテリアの餌を与えて28日間、恒暗条件、30°Cで飼育した。ブラインシュリンプ (動物性の餌) は週に2度与え、シアノバクテリアはプレートにマット状になるよう培養し、14日目に1度交換した。1週間毎にカイヤドリヒラムシの写真を撮影し、ImageJを用いてヒラムシの大きさ (面積) を測定した。

カイヤドリヒラムシ *Stylochoplana pusilla* MAP (SpMAP) 遺伝子の探索

カイヤドリヒラムシのRNAseqにより得られたトランスクリプトームの中から、他の動物のMAPファミリー遺伝子配列と相同性を持つものをBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて探索し、SpMAP候補遺伝子とした。これらの遺伝子の予測アミノ酸配列を用い、AP配列の繰り返しを持つ分子SpMAP (SpMAP 4R, SpMAP 5R) を同定した。

SpMAP 遺伝子のクローニング

先行研究に従って遺伝子クローニングを行った⁶⁾。具体的には次のように行った。カイヤドリヒラムシのtotal RNAをNucleoSpin RNA Kit (Takara bio, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。Total RNAの濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて測定した。このTotal RNAからOmniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Strassel, Germany) を用いて、最終濃度10 ng/μLになるように一本鎖cDNAを合成した。Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (Takara bio, Tokyo, Japan) とSpMAP遺伝子に特異的なプライマー (Forward: 5' -GTGCGGCC GCAAGCTATGGAAACCGTTGTGACCA-3', Reverse: 5' -AAGGAGATATACATATCAACCACCGCCTGGC TT-3', 産物サイズ; SpMAP 4R 684 bp, SpMAP 5R 774 bp) を用いてPCRを行った。PCRを行ったサンプルは1.5%アガロースゲルで泳動し、Ez-Capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。泳動後、目的のバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nihon Genetics, Tokyo, Japan) を用いて、アガロースゲルからDNAを抽出した。抽出したDNAをp-GEM-T Easy Vector System (Promega,

WI, USA) を用いてp-GEM-T Easy Vectorに組み込んだ。このベクターを*E. coli* DH5 α Competent Cells (Takara bio) のプロトコルに従い、*E. coli* DH5 αに組み込んだ。目的インサートをもつベクターが組み込まれた*E. coli* DH5 αをLB培地で培養し、増幅した大腸菌からFastGene Plasmid Mini Kit (Nihon Genetics) を用いてプラスミドDNAを精製した。このプラスミドDNAのシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

分子系統解析

既報²⁾を参照し、Gene Bankに登録されているMAPファミリー遺伝子とSpMAP遺伝子を用いて分子系統解析を行った。解析にはMEGA X (ver. 10.1.8) を用いた。

統計解析

カイヤドリヒラムシのサイズは平均±標準誤差で示した。GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、one-way analysis of variance (ANOVA) あるいはtwo-way ANOVAで有意差がみられたものはpost hoc Tukey's testを用いて多群比較を行った。

結果

海水の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響

海水と2種の人工海水を用いて飼育水の違いによるカイヤドリヒラムシの大きさの変化を解析した。飼育7日間で海水飼育群、人工海水2種 (マリンアート群、細谷らの人工海水群) の体サイズに差はみられなかった (図3A)。一方で、飼育14日目では、人工海水2種に比べ、海水飼育群で体のサイズが大きくなった (図3A)。これらを定量的に解析した結果、海水飼育群は7日目にかけて体が大きくなり (1.3倍)、その後14日目までサイズが維持されていた (図3B)。一方で、人工海水で飼育した群では、飼育7日で体のサイズはおおきく変わらず、飼育14日で飼育0日目よりも体サイズが小さくなる (マリンアート; 0.9倍、細谷らの人工海水; 0.8倍) 傾向を示した (図3B)。

餌の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響

カイヤドリヒラムシの食性と成長の関係を調べる目的で、ブラインシュリンプ (動物性の餌) を与えた群 (ブラインシュリンプ群)、シアノバクテリア (植物性の餌) を与えた群 (シアノバクテリア群)、ブラ

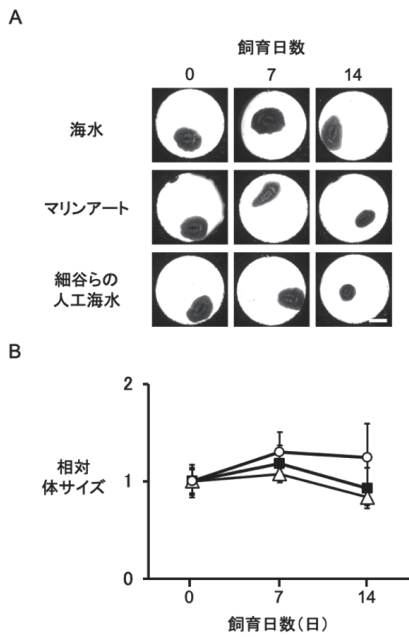


図3. 海水の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響. (A) 異なる海水で2週間飼育した時のカイヤドリヒラムシ. 平塚市袖ヶ浜で採取した海水で飼育した群(上段)に比べて、マリンアート(中段)、細谷らの人工海水(下段)で飼育した群では飼育2週間で対サイズが小さくなった. スケールバー: 1 mm. (B) 飼育0日目の各群の平均体サイズを'1'とした時の相対体サイズ. ○は海水、■はマリンアート、△は細谷らの人工海水.

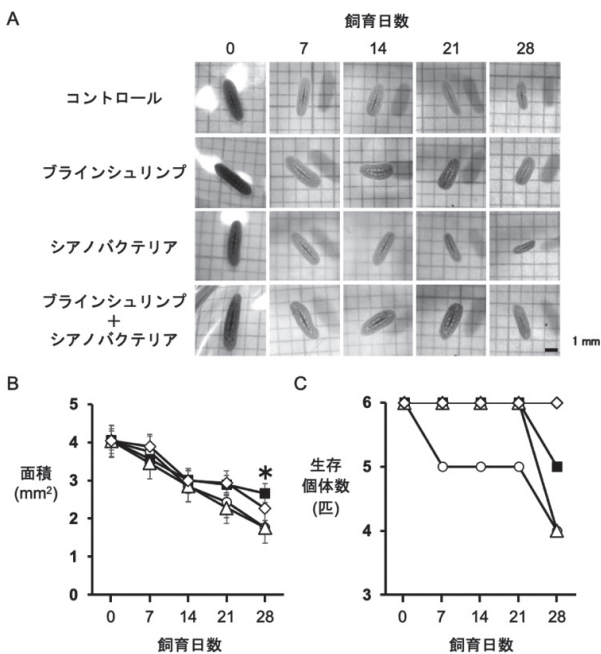


図4. 餌の違いがカイヤドリヒラムシの体のサイズに与える影響. (A) 異なる餌を用いて28日間飼育されたカイヤドリヒラムシ. 28日間絶食させた群(コントロール)とシアノバクテリア給餌群では、動物性の餌を与えたブラインシュリンプ群やブラインシュリンプ+シアノバクテリア群に比べて体サイズが小さくなった. スケールバー: 1 mm. (B) 体サイズの定量解析. * $P < 0.05$, vs ブラインシュリンプ. (C) 餌の違いによる生存個体数の違い. ○はコントロール、■はブラインシュリンプ、△はシアノバクテリア、◇はブラインシュリンプ+シアノバクテリア給餌群.

インシュリンプとシアノバクテリアを同時に与えた群(ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群)を用い、コントロールとして絶食群を用いた(コントロール群)。飼育14日目までは群間でサイズの違いはみられなかったが、飼育21日目以降、コントロール群とシアノバクテリア群ではブラインシュリンプ群、ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群に比べて、サイズが小さくなった(図4A)。これらを定量的に解析した結果、飼育21日目では、コントロール群とシアノバクテリア群はブラインシュリンプ群、ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群と比べて、サイズが小さくなる傾向を示した(図4B)。また、飼育28日目では、コントロール群、シアノバクテリア群ではブラインシュリンプ群に比べてサイズが有意に小さくなった($P < 0.05$)(図4B)。さらに、飼育期間での生存個体数を解析した結果、ブラインシュリンプ+シアノバクテリア群は28日間で全個体が生存していたのに対し、ブラインシュリンプ群では5個体、コントロール群とシアノバクテリア群では4個体の生存に留まった(図4C)。

カイヤドリヒラムシによるブラインシュリンプの捕食

カイヤドリヒラムシを飼育しているシャーレにブラインシュリンプを与え、カイヤドリヒラムシがブラインシュリンプを捕食する様子を観察した。カイヤドリヒラムシはブラインシュリンプへと近づき(図5A)、捕食を始める(図5B)。ブラインシュリンプから離れた場所にいたカイヤドリヒラムシがブラインシュリンプへと群がり捕食する様子が観察された(図5C)。

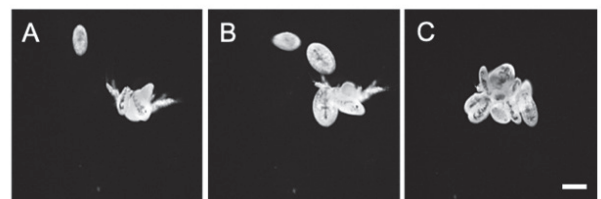


図5. カイヤドリヒラムシがブラインシュリンプを捕食する様子. カイヤドリヒラムシを入れたシャーレにブラインシュリンプを入れる(A)と、カイヤドリヒラムシがブラインシュリンプへと近づき(B)、群がって捕食する(C)様子が観察された. スケールバー: 200 μm.

SpMAPの分子構造と系統樹解析

SpMAP 遺伝子特異的なプライマーを用いてPCRを行った結果、700 bp付近にバンドが観察された(予想バンドサイズ: SpMAP 4R 684 bp, SpMAP 5R 774 bp)(図6A)。これらの塩基配列を解析し、既存のMAPファミリーのアミノ酸配列情報をもと

に SpMAP のアミノ酸配列を推定した (図 6B, C)。SpMAP 4R (図 6B)、SpMAP 5R (図 6C) とともにプロジェクトドメイン、プロリンリッチドメイン、AP 繰り返しドメインと想定される領域が確認された。SpMAP 4R では SpMAP 5R の 4 番目の AP 配列が欠落していた。次に、これら 2 つの SpMAP の予測アミノ酸配列と、既知の MAP ファミリーのアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った (図 7)。そ

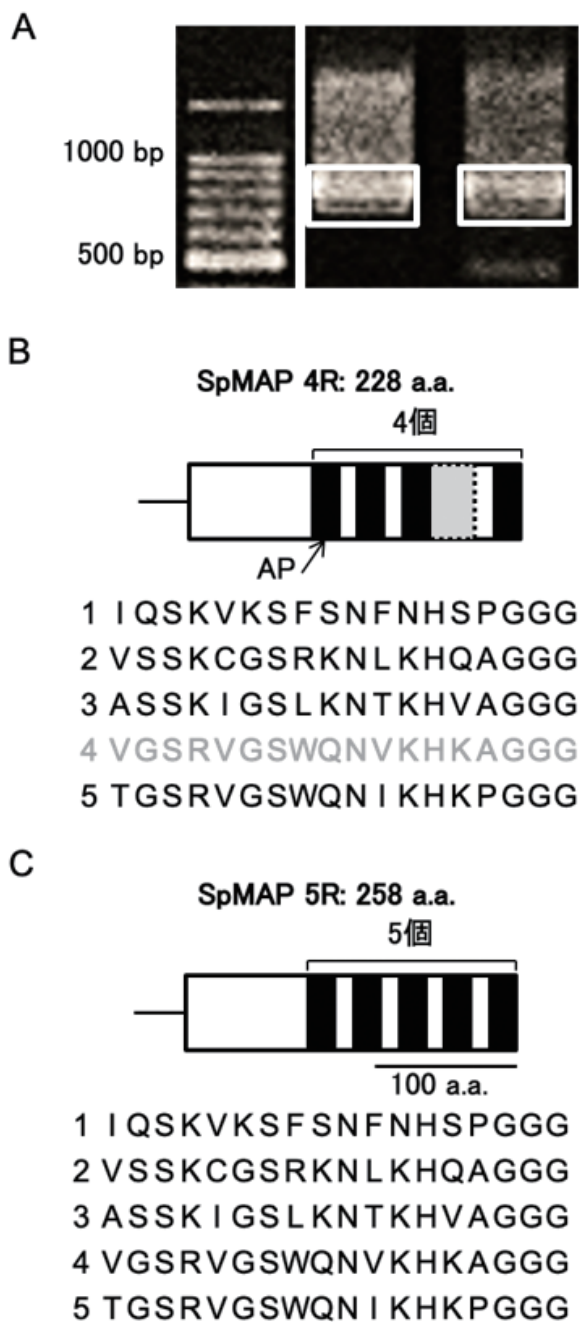


図 6. カイヤドリヒラムシ MAP-like 遺伝子 (SpMAP) のクローニングと AP 配列の予想アミノ酸配列. (A) SpMAP 特異的なプライマーを用いた RT-PCR により、800 bp 付近に 2 種のバンドが観察された. 左: マーカー、右: RT-PCR 産物. (B) SpMAP_4R の AP 配列の予想アミノ酸配列. (C) SpMAP_5R の AP 配列の予想アミノ酸配列.

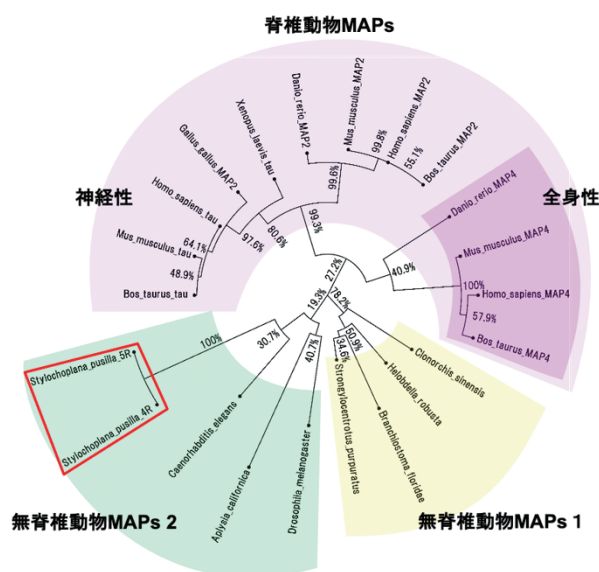


図 7. MAPs ファミリーの分子系統樹解析. 脊椎動物 MAPs ファミリー (紫) と 2 つの無脊椎動物 MAPs ファミリー (黄色、緑) に分かれた. 赤枠: SpMAP.

の結果、1 個の脊椎動物 MAPs のクレード (紫) と 2 個の無脊椎動物 MAP のクレード (黄色、緑) に分かれた。脊椎動物 MAPs ファミリーでは神経系特異的に発現する MAP2、tau のクレード (青) と全身性に発現する MAP4 のクレード (ピンク) があり、先行研究とも一致した。一方で、無脊椎動物 MAPs ファミリーでは線虫やカイヤドリヒラムシを含むクレード (緑) とアメリカムラサキウニや肝吸虫を含むクレード (黄色) に別れ、SpMAP_4R と SpMAP_5R のブートストラップ値は 100% であった (赤枠)。

討論

今回、カイヤドリヒラムシから AP 配列の数が異なる 2 種の MAP-like 遺伝子を同定した。SpMAP_4R では 5 個の AP 配列の繰り返しを持つ SpMAP_5R の 4 番目がなく、哺乳類における全身性 MAP (MAP4) と神経性 MAP (MAP2、Tau) の関係とよく似ていた。今後は、これらの SpMAP の機能的保存性や発現局在を解析し、MAP ファミリーの進化的保存性を明らかにしていく。

人工海水 2 種で飼育したカイヤドリヒラムシは平塚の海岸で汲んだ海水で飼育したカイヤドリヒラムシに比べ、体サイズが小さかった。人工海水は各種塩濃度と浸透圧が海水と等しくなるように作製されている。一方で汲み取った海水には微生物や有機物が含まれる。各群、ブラインシュリンプを餌として与えたにも関わらずカイヤドリヒラムシの体サイズに差が見られたことから、カイヤドリヒラムシはブ

ラインシュリンプだけでなく、海水中に含まれる微生物や有機物も餌として摂取している可能性がある。カイヤドリヒラムシにはフグ毒のテトロドトキシンが含まれることが知られており、餌によって体内に蓄積すると考えられている。そのため、ラインシュリンプ以外のテトロドトキシン含有プランクトンや藻類などを餌としているのかもしれない。宿主であるインダタミは微小藻類を削り取って食べていると考えられており、インダタミの糞を介して、カイヤドリヒラムシが藻類を摂取している可能性もある。板形動物センモウヒラムシの餌として知られるシアノバクテリアをラインシュリンプと混餌して与えるとラインシュリンプ単体給餌よりも4週間での生存個体数が多くなった。最近、カイヤドリヒラムシがインダタミの外に出て餌を食べることが報告された⁷⁾。また今回、カイヤドリヒラムシがラインシュリンプに近づき、群がって捕食する様子が観察された。カイヤドリヒラムシが餌(ラットの血)の匂いに誘引され、さらにその匂いを記憶することが報告されており⁴⁾、カイヤドリヒラムシはインダタミに依存せず、自由に選択的に餌を食べているのかもしれない。

ヒラムシやプラナリアといった扁形動物の組織学解析においては、固定前の1週間、絶食させるとS/N比(signal to noise ratio)が高くなることから、固定前に絶食させることが多い⁸⁾。今回、2週間絶食させてもカイヤドリヒラムシの体サイズは変わらなかったことから、恒常的に用いられる固定前1週間の絶食は実験結果にネガティブな影響を与えないと考えられる。

今回我々はカイヤドリヒラムシMAP(SpMAP)遺伝子を2種類同定した。推定アミノ酸配列を解析するとSpMAP_4RはSpMAP_5Rの4番目のAP配列がない構造をとっていた。哺乳類MAPファミリーでは各AP配列の相同性が高く、MAP4は5個のAP配列をもち、MAP2とTauは最大で4個のAP配列をもつ。哺乳類MAP2とTauはMAP4の2番目のAP配列がない構造をとる¹⁾。中間のAP配列が失われた構造をとるという点では、哺乳類MAPファミリーとカイヤドリヒラムシのMAPファミリーには共通性がある。哺乳類MAP4は全身の細胞で発現する一方で、MAP2とTauは神経細胞特異的に発現し、MAP2は樹状突起マーカー、Tauは軸索マーカーとして知られている。扁形動物は中枢化された神経系を初めて獲得した動物と考えられており、今回同定したSpMAP_5RとSpMAP_4Rは系統樹解析でもブートストラップ値が100であったことから、SpMAP_5RとSpMAP_4Rは哺乳類の全身性MAP

と神経性MAPの原型とみなせるかもしれない。今後、これらのSpMAPの発現局在を解析し、全身性と神経性のような局在の違いを明らかにすることで、左右相称動物における始原MAPの機能と神経性、全身性の分化を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、2021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われた。カイヤドリヒラムシのMAP候補遺伝子の情報は岡山大学理学部附属臨海実験所濱田麻友子准教授より頂いた。シアノバクテリアの提供や飼育方法の確立には、神奈川大学理学部生物科学科教務技術職員の鶴岡慎也氏、北島正治氏にご助力いただいた。また、神奈川県におけるインダタミの採集場所、方法のアドバイスを神奈川大学理学部生物科学科教務技術職員の大和田正人氏より頂いた。記して感謝する。

文献

- 1) 小谷 享, 松島一幸, 久永眞市(2006) 微小管結合蛋白質の構造と機能. *蛋白質 核酸 酵素* **51**: 535-542.
- 2) Hashi Y, Kotani S and Tokuraku K (2015) Molecular evolution of a group of microtubule-associated proteins sharing partial similarities in their primary structures. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 1-6.
- 3) Hashi Y, Kotani S and Adachi T (2016) A nematode microtubule-associated protein, PTL-1, closely resembles its mammalian counterparts in overall molecular architecture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**: 1107-1113.
- 4) Kobayashi A, Hamada M, Yoshida MA, Kobayashi Y, Tsutsui N, Sekiguchi T, Matsukawa Y, Maejima S, Gingell JJ, Sekiguchi S, Hamamoto A, Hay DL, Morris JF, Sakamoto T and Sakamoto H (2022) Vasopressin-oxytocin-type signaling is ancient and has a conserved water homeostasis role in euryhaline marine planarians. *Sci. Adv.* **8**: eabk0331.
- 5) Hosoya N, Motomura K, Tagawa E, Nagano M, Ogiwara C and Hosoya H (2019) Effects of the fungicide ortho-phenylphenol (OPP) on the early development of sea urchin eggs. *Mar. Environ. Res.* **143**: 24-29.
- 6) Hirooka A, Hamada M, Fujiyama D, Takanami K, Kobayashi Y, Oti T, Katayama Y, Sakamoto T and Sakamoto H (2021) The gastrin-releasing peptide/bombesin system revisited by a reverse-evolutionary study considering *Xenopus*. *Sci. Rep.* **11**: 13315.
- 7) 藤原悠太(2015) *カイヤドリヒラムシ(扁形動物)の宿主利用と生活史特性* 博士(生命科学) thesis, 東北大学.
- 8) Hosoda K, Morimoto M, Motoishi M, Nishimura O, Agata K and Umesono Y (2016) Simple blood-feeding method for live imaging of gut tube remodeling in regenerating planarians. *Dev Growth Differ* **58**: 260-269.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ナンキョクオキアミの発光器官制御ホルモンの探索

大平 剛^{1,5} 松田 乾² 豊田賢治³ 鈴木信雄⁴

Transcriptomic Characterization of Eyestalk Hormones Regulating Photophores from the Antarctic Krill *Euphausia superba*

Tsuyoshi Ohira^{1,5}, Tsuyoshi Matsuda², Kenji Toyota³ and Nobuo Suzuki⁴

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

² Port of Nagoya Public Aquarium, Minato-ku, Nagoya City, Aichi 455-0033, Japan

³ Marine Biological Station, Sado Center for Ecological Sustainability, Niigata University, Sado City, Niigata 952-2135, Japan

⁴ Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Division of Marine Environmental Studies, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan

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

Abstract: The Antarctic krill *Euphausia superba* has ten photophores, a single pair on the eyestalks, two pairs on the thorax, and four unpaired organs on the abdomen. The bioluminescence emitted by the photophores is used for camouflage from predators below and intraspecific communication. The photophores are considered to be regulated by the nervous and endocrine systems, but hormonal molecules that control the photophores have never been identified. In this study, transcriptome analysis of the eyestalk from *E. superba*, which is the biggest ganglion in the central nervous system and most important endocrine organ in crustaceans, was conducted. As a result, a transcript encoding red pigment-concentrating hormone (RPCH) was identified. RPCH is known to be secreted from nerve endings and act as a neurotransmitter and neuromodulator. Therefore, the Antarctic krill RPCH may regulate photophores on the thorax and abdomen. Moreover, ten transcripts encode pigment-dispersing hormone (PDH). PDH regulates the light-adapting migration of pigment granules in the distal pigment cells of the compound eye. The strong association between vision and bioluminescence suggests that some PDHs identified from the Antarctic krill may regulate photophores in addition to body color change. The transcriptomic data obtained in this study will contribute to further elucidation of the endocrine regulation of photophores in the Antarctic krill.

Keywords: Antarctic krill, *Euphausia superba*, eyestalk hormone, red pigment concentrating hormone, pigment dispersing hormone

序論

南極海に生息するナンキョクオキアミは、水深 200 m よりも浅い表層にパッチ(群)を形成する。ナンキョクオキアミの形態はエビ類と酷似しているものの、エビ類を含む軟甲綱、ホンエビ上目、十脚目とは異なり、軟甲綱、ホンエビ上目、オキアミ目に属している。ナンキョクオキアミは南極海に生息する多くの大型動物の餌生物であることから、南極の生態系全体に影響を持つキーストーン種と考えられている。ナンキョクオキアミの資源量は 6,000 万トンから 1.5

億トンと推測されており、単一種としては地球上で最大の生物量と考えられている¹⁾。

ナンキョクオキアミはオキアミ属 (genus *Euphausia*) の最大種で、体長は 50~60 mm に達する²⁾。ナンキョクオキアミの体は、頭胸部と腹部からなり、腹部の先端には尾節が存在する。頭胸部には 1 対の複眼、2 対の触角、6 対の胸脚がある。一般的に、オキアミの仲間は胸脚が 8 対存在するが、ナンキョクオキアミの胸脚は後方の 2 対が退化して

いる²⁾。オキアミ類は、胸脚の剛毛を使って植物プランクトンを海水から濾過し、摂食している。ナンキョクオキアミの腹部には5対の腹脚があり、それらは遊泳のために使われる。

ナンキョクオキアミは発光器を有しており、光を放つことができる。発光器は眼柄に1対、胸脚に2対、腹脚の基部に4個の合計10個が存在する³⁾。ナンキョクオキアミの発光器は、発光細胞層と反射細胞層からなり、前面には水晶体が発達している^{4,5)}。発光器は筋肉によって回転させることができる。この様に、発光器は光受容器である眼に匹敵する高度な構造を有している。発光器による発光はオキアミの影を打ち消し、捕食者から発見されにくくするカモフラージュシステムとして機能していると考えられている⁴⁾。また、同種間のコミュニケーションに使われているという説も唱えられている⁶⁾。

発光器の発光は神経により制御されている。オキアミ類の *Meganyctiphanes norvegica* では、腹部の神経に電気刺激を加えると発光器が発光することが示されている⁶⁾。また、セロトニンを注射すると発光器が発光することから、セロトニン作動性ニューロンの支配を受けていると考えられている⁷⁾。一方、サクラエビでは、眼柄を切除すると強い発光が誘導される⁸⁾。この結果より、発光器は眼柄で合成されるホルモンにより制御されていると考えられている⁸⁾。しかし、どの眼柄ホルモンが発光器を制御しているのかは明らかとなっていない。

活きたナンキョクオキアミを入手することは難しいことから、ナンキョクオキアミの眼柄ホルモンの知見は皆無であった。本研究では、ナンキョクオキアミの発光器を制御するホルモンを探索することを目的として、ナンキョクオキアミの眼柄で発現している遺伝子の網羅的な解析を行った。

材料と方法

ナンキョクオキアミ

名古屋港水族館で継代飼育されているナンキョクオキアミを実験に用いた。2019年6月12日から10月22日にかけてナンキョクオキアミの雌7尾と雄8尾から眼柄を摘出し、使用するまで RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて精製した (雌雄それぞれ n=1)。Total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

Total RNA の抽出

RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて精製した (雌雄それぞれ n=1)。Total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて精製した (雌雄それぞれ n=1)。Total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

RNA-seq 解析

抽出した total RNA を Gene Nex 社に送付し RNA シークエンスを行った。ライブラリーは Eukaryotic Transcriptome Library を用いて作製された。RNA-seq は 101 bp の paired-end で実施し、各サンプル約 3.0 G bp のシーケンスを得た。シーケンスの品質チェックは FastQC プログラム (version 0.11.2) で実施した。ナンキョクオキアミは利用可能なレファレンスがないため、Trinity (version 2.9.1) を用いて de novo assembly を行なった。さらに遺伝子モデルの冗長性を排除するため evidentialgene (<https://sourceforge.net/p/evidentialgene/discussion/general/thread/a4f0e29f/>) を用いて主要な transcripts の抽出を行なった。リードカウントには salmon (version 1.4.0) を用いた。さらに類似配列を有するコンティグに起因するマッピング率低下を改善するため、発現パターンに基づいてコンティグを階層的にクラスタリングする Corset (version 1.09) を実施した。Corset から集約したコンティグの fasta ファイル (ナンキョクオキアミの de novo assembly した遺伝子モデル) を出力し、高速 Blast ツールである DIAMOND (version 0.9.22) により BlastX 解析を実施した。

```

nt 1 ACAACTGTGCTGATATGAACCCGACA
nt 27 CAACCCGCGGCGAGCAACAGGTGAAGACACTGCTCCGCGCTGCAGACAGATACAG
aa 1 M R V S I T M M S A M V V A V L A F C A
nt 87 ATGCGTGTGAGTATTACCATGATGTCTGATGGTGGCCGTGTGGCTTCTTCGCGC
aa 21 I C V S A Q L N F S P S G K R N S D D
nt 147 ATCTGTGTGCTGCGACAGCTCAACTTCTCACCAGGATGGGCGAAGCCGAATTCAGATGC
aa 41 S M S L R P H H S I R S S S G G I N G A
nt 207 TCTATGAGCCTGCGCCCTCATATAGCATAGAAGCAGCAGTGGTGGCATCAATGGCCGC
aa 61 L P P P I R G L V D N C A D M N R V A T
nt 267 CTCTCCGCCCATCCGAGGCTTGTGAACAATGTGCTGATATGAACCGGTATGCAAC
aa 81 V M H I Y N L I K N E A A R M I Q C Q D
nt 327 GTCATGCACATCTACAACCTCATCAAGAATGAGGCTGCCCGTATGATCAGTGTCAAGAT
aa 101 E D L N *
nt 387 GAAGATCTCAACTGATTACTACCACAACATAATCATCGTGTCTCTTCCCTAAACCATT
nt 447 CCCTAAACCATGCAACTGCTGAAACTAATATAGTGTCTTATAGTAAACAAGTGTTCGAA
nt 507 CCCTGCACAGCTCTGTGGATTGGGCATCGGATAGGTTAAAGCATCGTTTCTCTTCC
nt 567 CTAAACCATGCAACTGCTGAAACTAATATAGTGTCTTATAGTAAACAAGTGTTCGAAAC
nt 627 ACTGCACAGCTCTGTGGATCTTGGCATCGGATAGGTTAAAGTATCGCATTCATCATCATT
nt 687 AAAATCATGCAACTGCTCGGAGACAATATATTTAAAATATATACCTTTTGTAAACTTTT
nt 747 GTATGACATTATGTGTCGGTTTATAAAGAACTCATTATATATATAAATGGTGTATAT
nt 807 GATTAAGATGATCAGATATGTGATAATATATACAAATGATTTCTCTCATGTCAGTGG
nt 867 AATGTACAATTTATATAGCTTTTAAATATTCATATATATGATATACATCAATGATATATATA
nt 927 TGTATACATATATATA

```

図1. ナンキョクオキアミの赤色素凝集ホルモン(RPCH)をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列。下線はシグナルペプチドを、太字は RPCH を、ボックスはアミド化シグナルを、斜体は RPCH precursor-related peptide を示す。

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | | |
|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|--------|--------|
| <i>Pandalus boreali</i> | N | S | G | M | I | N | S | I | L | G | I | P | - | - | - | - | - | R | V | M | T | E | A | amide | α-type | |
| <i>Pandalus jordani</i> | N | S | G | M | I | N | S | I | L | G | I | P | - | - | - | - | - | K | V | M | A | D | A | amide | | |
| <i>Uca pugilator</i> | N | S | E | L | I | N | S | I | L | G | L | P | - | - | - | - | - | K | V | M | N | D | A | amide | β-type | |
| <i>Callinectes sapidus</i> II | N | S | E | L | I | N | S | L | L | G | I | S | - | - | - | - | - | A | L | M | N | E | A | amide | | |
| <i>Romalea microptera</i> | N | S | E | I | I | N | S | L | L | G | L | P | - | - | - | - | - | K | L | L | N | D | A | amide | | |
| <i>Marsupenaeus japonicus</i> I | N | S | E | L | I | N | S | L | L | G | I | P | - | - | - | - | - | K | V | M | T | D | A | amide | | |
| <i>Marsupenaeus japonicus</i> II | N | S | E | L | I | N | S | L | L | G | L | P | - | - | - | - | - | K | F | M | I | D | A | amide | | |
| <i>Euphausia superba</i> I | N | S | E | T | I | N | A | M | L | G | L | P | Q | T | L | R | V | Q | K | L | M | S | K | L | amide | γ-type |
| <i>Euphausia superba</i> II | N | S | E | T | I | N | A | M | L | G | L | P | Q | T | L | R | A | Q | K | L | M | A | K | L | amide | |
| <i>Euphausia superba</i> III | N | A | E | T | I | N | A | M | L | G | L | P | Q | T | L | R | A | Q | Q | L | M | A | K | L | amide | |

図2. ナンキョクオキアミの色素拡散ホルモン (PDH) と既知 PDH のアミノ酸配列のアライメント. 実線のボックスは全てのタイプで保存されているアミノ酸を, 斜線のボックスはαタイプに特徴的なアミノ酸を, グレーのボックスはγタイプに特徴的なアミノ酸を示す. *P. borealis* 13), *P. jordani* 14), *U. pugilator* 15), *C. sapidus* 16), *R. microptera* 17), *M. japonicus* 19).

結果

ナンキョクオキアミの眼柄で発現している遺伝子の網羅的解析

RNA-seq 解析で得られた配列の新規アセンブルにより, 39,611 個のコンティグが構築された。そのうち BlastX により 19,031 遺伝子にアノテーションが付与された。

ナンキョクオキアミの赤色色素凝集ホルモン (RPCH)

ナンキョクオキアミ RPCH cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列を図1に示す。ナンキョクオキアミ RPCH の cDNA は 942 bp からなり, 312 bp の Open reading frame (ORF) を持ち, 104 アミノ酸残基からなるナンキョクオキアミ RPCH の前駆体をコードしていた (図1)。ナンキョクオキアミ RPCH の前駆体は N 末端側から, 25 アミノ酸残基からなるシグナルペプチド, 8 アミノ酸残基からなるナンキョクオキアミ RPCH, 3 アミノ酸残基 (Gly-Lys-Arg) からなるアミド化シグナル, 68 アミノ酸残基からなる RPCH precursor-related peptide と呼ばれる機能不明のペプチドにより構成されていた (図1)。ナンキョクオキアミ RPCH の N 末端の Gln はピログルタミル化され pGlu に, C 末端の Trp はアミド化されると推測されたことから, 成熟型のナンキョクオキアミ RPCH の一次構造は「pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH₂」と推定された。

ナンキョクオキアミの色素拡散ホルモン (PDH)

今回の解析で得られたコンティグの中には 10 個のナンキョクオキアミ PDH 前駆体と推測される配列が存在した。それらの塩基配列から推測した成熟型のナンキョクオキアミ PDH は 3 種類であった (図2)。それらをナンキョクオキアミ PDH-I から PDH-

III と名付けた。3 種類のナンキョクオキアミ PDH はいずれも 24 アミノ酸残基からなり, C 末端の Leu はアミド化されると推測された。3 種類のナンキョクオキアミ PDH は, N 末端側 12 残基目までのアミノ酸配列は既知の PDH と良く似ていたが, 13 残基目以降の配列には相同性は見られなかった。3 種類のナンキョクオキアミ PDH には, 既知の PDH には存在しない特徴的な 6 アミノ酸残基が挿入されていた (図2)。

討論

ナンキョクオキアミ RPCH

RPCH は甲殻類の赤色色素胞内の色素顆粒を凝集させる作用を持ち, 体色調節に関わっていると考えられている⁹⁾。また, 神経終末から分泌され神経伝達物質や¹⁰⁾、神経調節物質としても働く¹¹⁾。これらのことから, RPCH は発光器を制御している可能性があると考えた。本研究により明らかにしたナンキョクオキアミ RPCH のアミノ酸配列は, 既知の RPCH と完全に一致していた (図1)。この結果とナンキョクオキアミにも赤色色素胞が体表に存在することを考慮すると, 眼柄で発現するナンキョクオキアミ RPCH は既知の甲殻類と同様に体色調節に関わっていると考えられた。一方, RPCH は眼柄以外の神経組織でも発現していることが明らかとなっている。ホワイトレグシュリンプの RPCH は眼柄に加えて, 脳, 胸部神経節, 腹部神経節でも遺伝子発現が観察された¹²⁾。ナンキョクオキアミでも RPCH が胸部神経節や腹部神経節で発現しているのなら, 胸脚や腹脚基部に存在する発光器を制御している可能性も考えられる。今後, ナンキョクオキアミ RPCH の組織別遺伝子発現を調べることからスタートする必要がある。

ナンキョクオキアミ PDH

PDH は甲殻類の色素胞内の色素顆粒を拡散させる作用を持ち、RPCH と同様に体色調節に関わっていると考えられている⁹⁾。また、複眼に存在する遠位色素細胞に含まれる色素顆粒の移動も制御している⁹⁾。発光器は周囲の光環境の影響を受けていることから、光受容に関わる遠位色素細胞を制御している PDH は発光器を制御している可能性があると考えた。本研究により明らかにしたナンキョクオキアミ PDH のアミノ酸配列は、既知の PDH とは異なり特徴的なアミノ酸配列を有していた (図 2)。ナンキョクオキアミの PDH には 6 アミノ酸残基が挿入されており、これまでに明らかにされている PDH の 2 つのサブグループ (α タイプと β タイプ) とは明らかに異なっていた。そのため、本研究で明らかにしたナンキョクオキアミの PDH は 3 つめのサブグループ (γ タイプ) を形成すると考えられた。この結果より、ナンキョクオキアミの PDH は、既知の PDH とは異なる新規の生物活性を持つ可能性が考えられた。3 種類のナンキョクオキアミ PDH は化学合成が可能なサイズのため、今後、合成ナンキョクオキアミ PDH を用いて発光器の発光を誘導するかどうかを試みる予定である。

謝辞

本研究は 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「ナンキョクオキアミの発光器官制御ホルモンの探索」(RIIS202107) で行われたものです。RNA-seq のデータ解析は基礎生物学研究所の生物情報解析システムを用いて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Nicol S and Foster J (2003) Recent trends in the fishery for Antarctic krill. *Aquat. Living Resour.* **16**: 42-45.
- 2) 国立極地研究所 (1983) *南極の科学 (7) 生物*. 古今書院, 東京.
- 3) Grinnell AD, Narins PM, Awbrey FT, Hamner WM and Hamner PP (1988) Eye/photophore coordination and light following in krill *Euphausia superba*. *J. Exp. Biol.* **134**: 61-77.
- 4) Herring PJ (1985) Bioluminescence in the Crustacea. *J. Crustac. Biol.* **5**: 557-573.
- 5) Michael L (1995) Physiological mechanisms in the control of bioluminescent countershading in a midwater shrimp. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* **26**: 207-218.
- 6) Fregin T and Wiese K (2002) The photophores of *Meganectiphanes norvegica* (M. Sars) (Euphausiacea): mode of operation. *Helgol. Mar. Res.* **56**: 112-124.
- 7) Herring PJ and Locket NA (1978) The luminescence and photophores of euphausiid crustaceans. *J. Zool.* **186**: 431-462.
- 8) Omori M, Latz MI, Fukami H and Wada M (1996) New observations on the bioluminescence of the pelagic shrimp, *Sergia lucens* (Hansen, 1922). In: *Zooplankton: sensory ecology and physiology*. Lenz PH, Hartline DK, Purcell JE and Macmillan DL, eds., Gordon and Breach publishers, Amsterdam. pp.175-184.
- 9) Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* **6**: 49-90.
- 10) Sarojini R, Nagabhushanam R and Fingerman M (1995) A neurotransmitter role for red-pigment-concentrating hormone in ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Biol.* **198**: 1253-1257.
- 11) Sherff CM and Mulloney B (1991) Red pigment concentrating hormone is a modulator of the crayfish swimmeret system. *J. Exp. Biol.* **155**: 21-35.
- 12) Chen HY, Kang BJ, Sultana Z and Wilde MN (2018) Molecular cloning of red pigment-concentrating hormone (RPCH) from eyestalks of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Evaluation of the effects of the hormone on ovarian growth and the influence of serotonin (5-HT) on its expression. *Aquaculture* **495**: 232-240.
- 13) Fernlund P (1976) Structure of a light-adapting hormone from the shrimp *Pandalus borealis*. *Biochem. Biophys. Acta* **439**: 17-25.
- 14) Rao KR and Riehm JP (1993) *Ann. NY Acad. Sci.* **680**: 78-88.
- 15) Rao KR, Riehm JP, Zahnow CA, Kleinholz LH, Tarr GE, Johnson L, Norton S, Landau M, Semmes OJ, Sattelberg RM, Jorenby WH and Hintz MF (1985) Characterization of a pigment-dispersing hormone in the eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5319-5322.
- 16) Klein JM, Mohrherr CJ, Sleutels F, Riehm JP and Rao RK (1994) Molecular cloning of two pigment dispersing hormone (PDH) precursors in the blue crab, *Callinectes sapidus* reveals a novel member of the PDH neuropeptide family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 410-416.
- 17) Rao KR, Mohrherr CJ, Riehm JP, Zahnow CA, Norton S, Johnson L and Tarr GE (1987) Primary structure of an analog of crustacean pigment-dispersing hormone from the lubber grass-hopper *Romalea microptera*. *J. Biol. Chem.* **262**: 2672-2675.
- 18) Rao KR, Mohrherr CJ, Riehm JP, Zahnow CA, Norton S, Johnson L and Tarr GE (1987) Primary structure of an analog of crustacean pigment-dispersing hormone from the lubber grass-hopper *Romalea microptera*. *J. Biol. Chem.* **262**: 2672-2675.
- 19) Yang WJ, Aida K and Nagasawa H. (1999) Characterization of chromatophorotropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **114**: 415-424.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

胎生ラット下垂体原基におけるレチノアルデヒド脱水素酵素の発現

藤原 研^{1,2,3,5} 藤原葉子² 堀口幸太郎⁴

Expression of Retinaldehyde Dehydrogenase
in the Pituitary Primordium of Rats

Ken Fujiwara^{1,2,3,5}, Yoko Fujiwara² and Kotaro Horiguchi⁴

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

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

³ Division of Histology and Cell Biology, Department of Anatomy, Jichi Medical University, School of Medicine, Shimotsuke City, Tochigi 329-0498, Japan

⁴ Laboratory of Anatomy and Cell Biology, Department of Health Sciences, Kyorin University, Mitaka City, Tokyo 181-8612, Japan

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

Abstract: Retinoic acid (RA) is a lipid-soluble bioactive substance, which is not only an essential factor in organogenesis, but is also involved in the regulation of cell functions in adult tissues. RA is synthesized from retinoids through oxidation processes, in which the retinaldehyde dehydrogenase (RALDH) family converts from retinal to RA. We previously reported that RALDH2 and RALDH3 were expressed in the developing anterior pituitary gland of rats. However, these RALDH-expressing cells have not been characterized. The present study aimed to clarify the spatiotemporal relationship between mRNA expressions of RALDHs and pituitary-specific transcription factors (Prop1 and Pit-1) in the pituitary primordium of rat embryos. By in situ hybridization using digoxigenin-labeled cRNA probes, we successfully detected mRNA expressions for RALDH2, RALDH3, Prop1, and Pit-1. The results showed that RALDH2 and RALDH3 were expressed specifically in Rathke's pouch on embryonic day 11.5 (e11.5), and were subsequently distributed in the pituitary primordium. On the other hand, the expression of Prop1 was observed from e12.5, and then was decreased after e15.5. Pit-1 mRNA was first detected on e15.5, and became distributed throughout the entire pituitary primordium during development. Moreover, Pit-1-positive cells expressed RALDH2 and RALDH3 in the pituitary primordium on e17.5. These results suggest that stem/progenitor cells of the anterior pituitary gland express RALDH2 and RALDH3. RA may act in an autocrine and/or paracrine manner to induce hormone-producing cells in the pituitary.

Keywords: retinoic acid, retinaldehyde dehydrogenase, Prop1, Pit-1, embryo, rat

序論

レチノイン酸は、発生過程での様々な器官形成に必要な因子であるばかりでなく、成体組織で細胞機能調節に関わる脂溶性の生理活性物質でもある。レチノイン酸は細胞内でビタミンAであるレチノールから代謝を経て合成される。レチノールからアルコール脱水素酵素によりレチナールが生じ、続いてレチノアルデヒド脱水素酵素 (RALDH) によりレチ

ナールからレチノイン酸が生じる¹⁾。哺乳類では、RALDHファミリー分子としてRALDH1、2、3、4が存在する。細胞内で合成されたレチノイン酸は核内に移行し、核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) とレチノイドX受容体 (RXR) に結合する。RARとRXRはヘテロダイマーを形成し、レチノイン酸とRAR/RXRの複合体は、遺伝子調節領域に存

在するレチノイン酸応答配列に結合することで遺伝子発現を調節する。

下垂体前葉は口腔外胚葉由来のラトケ嚢から生じる。発生過程でラトケ嚢の細胞は、増殖と分化を通して下垂体前葉ホルモン産生細胞へと成る。この際、多くのシグナル分子が下垂体発生を誘導する。例えば、間脳から分泌される線維芽細胞増殖因子 (FGF8、FGF10、FGF18)、骨形成因子 4 (BMP4)、wingless-type MMTV integration site 5a (WNT5a) およびラトケ嚢から産生される BMP2、WNT4 や口腔上皮で産生される Sonic hedgehog が時期・空間特異的に協調して下垂体の形成に関与する^{2,6)}。しかし、下垂体形成や細胞分化の誘導メカニズムはまだ十分には明らかになっていない。

マウス胎生の下垂体前葉原基では RALDH2⁷⁾ が、ラットでは RALDH2 と RALDH3 が発現していることが報告されている⁸⁾。これらのことから、下垂体前葉原基でレチノイン酸が合成されていると考えられている。また、マウス^{9,10)} およびラット下垂体前葉原基で RAR、RXR の発現が報告されており¹¹⁾、下垂体前葉原基の細胞はレチノイン酸を受容すると考えられる。さらに、ラット下垂体プロラクチン腫瘍から樹立された非ホルモン産生細胞株である MtT/E 細胞にレチノイン酸を処理することで、成長ホルモン産生細胞への分化を誘導することができる¹²⁾。これらのことから、下垂体の形成過程でレチノイン酸は局所で産生され、傍分泌もしくは自己分泌を介して下垂体前葉細胞の分化誘導因子として作用していると考えられる。しかし、下垂体形成過程においてどのようなタイプの下垂体前葉細胞が RALDH を発現しているのかは分かっていない。そこで本研究では、下垂体原基におけるレチノイン酸合成細胞を同定することを目的とし、In situ hybridization 及び免疫組織化学を用いて RALDH と下垂体前葉前駆細胞で発現する転写因子である Prop1 と Pit-1 との発現パターンを比較した。

材料と方法

実験動物

成熟ラット (Wistar 系統; 9 - 12 週齢) を日本 SLC 社 (Shizuoka, Japan) より購入した。動物は明期 12 時間/暗期 12 時間の環境で、餌と水は自由に摂取できる状態で飼育した。雌雄を交配させ、膣スメアにより精子を確認した日を胎生 0.5 日 (embryonic day: e0.5) と定めた。動物実験は、文部科学省の「研究機関における動物実験に関する基本指針」に基づいて行い、自治医科大学医学部動物実験委員会、神奈川大学理学部動物実験安全要綱、神

奈川大学理学部動物実験委員会の承認をうけて実施した。

組織固定および凍結切片作製

妊娠動物にペントバルビタールナトリウムを過剰に腹腔内投与し安楽死させたのち、胎仔を取り出した。胎仔もしくは胎仔の頭部を速やかに 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.05 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) に移し、4°C、一晩で浸漬固定を行った。その後、組織を 30% sucrose in 0.05 M PB に移し、4°C で 2 晩以上かけて置換した。そして、組織を Tissue Tek compound (Sakura Finetech Co., Tokyo, Japan) に包埋し、急速凍結した。凍結包埋ブロックをクリオスタット (CM3000, Leica Inc., NY, USA) を用いて、8 μm 厚の凍結切片を作製した。作製した凍結切片は MAS コートスライドガラスに張り付け、風乾後、-80°C で保存した。

In situ hybridization

ラット下垂体前葉 cDNA から PCR 法を用いて以下の遺伝子断片を増幅した。用いたプライマーは RALDH2 (NM_053896; 1488-2079) は forward primer (5' -ATG GGT GAG TTT GGC TTA CG-3') および reverse primer (5' -CCT GCT GGA AGG ACT CAA AG-3')、RALDH3 (NM_153300; 396-1002) は forward primer (5' -CGA CCT GGA GGG CTG TAT TA-3') および reverse primer (5' -CTC TTC TTG GCG AAC TCC AC-3')、Prop-1 (NM_153627.1; 1-612) は forward primer (5' -GCC ATG GAA GCT CAA AGA AG-3') および reverse primer (5' -CAG ATG ACC AGT GTG GGT TG-3')、Pit-1 (NM_013008.2; 135-706) は forward primer (5' -TTT CAC CTC GGC TGA TAC CT-3') および reverse primer (5' -CCT CCA GCC ACT TGG ATA AA-3') である。増幅した遺伝子断片は、pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) に挿入し、クローンを得た。得られたクローンを鋳型として、各遺伝子に特異的な digoxigenin (DIG) ラベルしたアンチセンスもしくはセンス一本鎖 RNA プローブを DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) を用いて合成した。In situ hybridization は既報の通りに行った⁸⁾。切片を proteinase K (5 μg/ml) で 37°C、3 分間処理した後、4% PFA in 0.1 M PB で 1 分間固定した。0.25% 無水酢酸を含んだ 0.1 M triethanolamine で 10 分間処理した。DIG ラベルした RNA プローブを 50% formamide, 10% dextran sulfate (Wako Pure Chemical Industries,

Ltd., Osaka, Japan), 3xSSC, 120 mM PB (pH 7.4), 1x Denhardt solution (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan), 125 µg/ml tRNA (Invitrogen, CA, USA), と 100 µg/ml sonicated sperm DNA (Invitrogen) を含むハイブリダイゼーションバッファーに加え、切片に滴下し、55°C で一晩反応させた。切片を 55°C の 5xSSC、2xSSC、そして 0.2xSSC で洗浄した。切片に alkaline phosphatase-conjugated 抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics GmbH; 1:1000 希釈) を滴下し、1 時間反応させた。切片に 4-nitroblue tetrazolium chloride と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Roche Diagnostics GmbH) を滴下し、一晩反応させた。流水にて反応を停止させ、蒸留水で洗浄後、Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany) で封入した。

In situ hybridization と免疫染色による二重染色

RALDH2 または RALDH3 の In situ hybridization の後に、切片を PBS で洗浄し、2% 正常ウマ血清を含んだ PBS を室温、30 分間、処理した。その後、切片を PBS で洗浄し、抗 Pit-1 ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA; 1:100 希釈) を滴下し、室温で一晩反応させた。PBS で洗浄し、ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (BA-1000, Vector Laboratories, CA, USA; 1:150 希釈) を滴下し、室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄した後、avidin-biotinylated HRP-complex (PK-4000, Vector Laboratories) を滴下し、室温で 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、DAB 溶液 (0.02% 3,3-diaminobenzidine-tetrachloride, 0.006% 過酸化水素水 in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6) で 5 分間発色させた後、流水にて洗浄した。蒸留水で洗浄後、Aquatex で封入した。光学顕微鏡 (BX53, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察し、画像はデジタルカメラ (DP74, Olympus) を用いて取得した。

結果

Prop1 と RALDH の発現領域の解析

In situ hybridization によりラット胚における RALDH2、RALDH3 および Prop1 の mRNA 発現を観察した (図 1)。下垂体前葉原基は口腔上皮の陥入により生じたラトケ嚢より形成される。ラットの e11.5 ではラトケ嚢が観察された (図 1A-C)。その後の経過を観察すると、ラトケ嚢は次第に肥厚し、口腔上皮との連絡がなくなり、下垂体が形成されていった。RALDH2、RALDH3 および Prop1 の遺伝子発現領域は下垂体原基に限局していたが、発現時期に違いがみられた。e11.5 では、RALDH2、RALDH3 はラトケ嚢全域で強い発現が確認された (図 1A, B)。

さらに e12.5 から e15.5 にかけて、RALDH2 (図 1D, G, J, M) と RALDH3 (図 1E, H, K, N) は下垂体前葉原基で発現し続けていることが分かった。一方、Prop1 は e11.5 のラトケ嚢では僅かにしか発現しておらず (図 1C)、e12.5 のラトケ嚢で明瞭な発現が確認され (図 1F)、その発現強度は、e14.5 を境に減弱した (図 1I, L, O)。

Pit-1 発現細胞と RALDH 発現細胞の解析

次に、e15.5 から e17.5 における胚での RALDH2、RALDH3 および Pit-1 の mRNA 発現を In situ hybridization により解析した。RALDH2 と RALDH3 は e17.5 にかけて下垂体前葉原基で強い発現が観察された (図 2)。Pit-1 mRNA は e15.5 の下垂体前葉原基で僅かに発現が認められた (図 2C)。その後、e16.5 から e17.5 にかけて発現細胞の増加が観察された (図 2F, I)。Pit-1 が発現する領域に一致するように RALDH2 と RALDH3 の発現も確認された。さらに、Pit-1 発現が増加した e17.5 の胎仔下垂体前葉原基において、RALDH2、RALDH3 mRNA 発現細胞と Pit-1 発現細胞との局在を調べた (図 3)。RALDH2 mRNA を In situ hybridization で、また Pit-1 を免疫組織化学で検出したところ、細胞質に RALDH2 mRNA が発現し、核に Pit-1 陽性を示す細胞が検出された (図 3B)。同様に、細胞質に RALDH3 mRNA シグナルが検出され、核に Pit-1 免疫陽性となる細胞も観察された (図 3D)。一方、Pit-1 陰性の RALDH2 発現細胞や RALDH3 発現細胞も観察されたが、これらは Pit-1 を発現する前の未分化の細胞であるか、もしくは非 Pit-1 系譜の細胞であると考えられる。

討論

本研究から、ラットの胎生期では、RALDH2 と RALDH3 は Prop1 の出現より早期に e11.5 のラトケ嚢で発現していることが明らかとなった。また、Prop1 発現が減少し、Pit-1 発現が増加する e15.5 でも RALDH2 と RALDH3 の発現は維持されていた。さらに、e17.5 では Pit-1 産生細胞で RALDH2、RALDH3 が発現していることも明らかとなった。これらのことから、ラット下垂体前葉原基において未分化細胞は RALDH2 と RALDH3 を発現し、レチノイン酸を合成していると考えられる。そして、レチノイン酸は自己分泌もしくは傍分泌により下垂体前葉前駆細胞に作用し、段階的に Prop1 発現細胞、Pit-1 発現細胞への分化を促進する因子として働いていることが考えられた (図 4)。

Prop1 は下垂体前葉前駆細胞で特異的に発現する転写因子であり、Prop1 欠損マウスは下垂体形成異

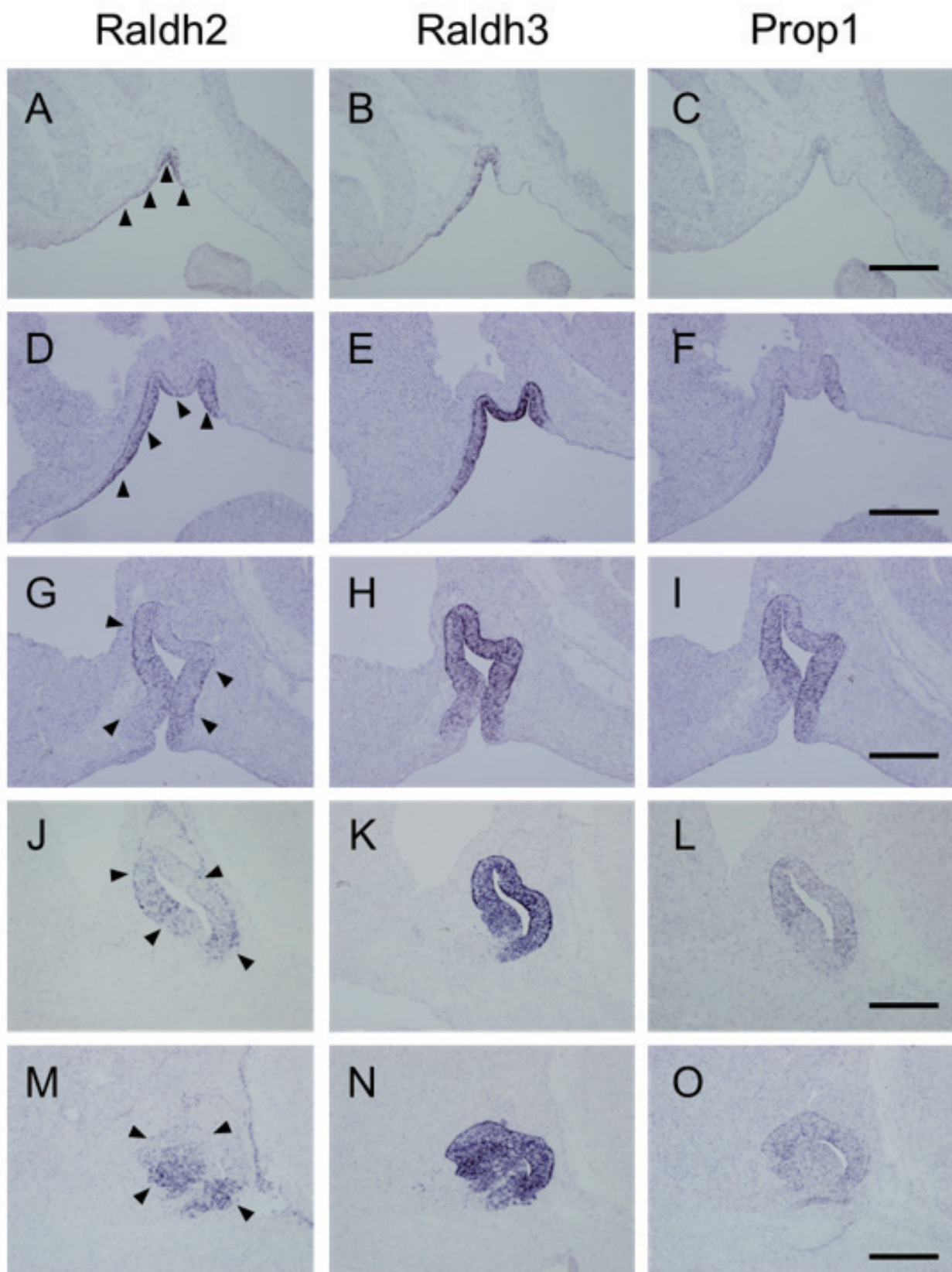


図1. ラット胎生期e11.5からe15.5の下垂体前葉原基におけるRaldh2, Raldh3, Prop1発現. A, B, C. e11.5. D, E, F. e12.5. G, H, I. e13.5. J, K, L. e14.5. M, N, O. e15.5. 矢尻は下垂体前葉原基を示している. スケールバー: 200 μ m.

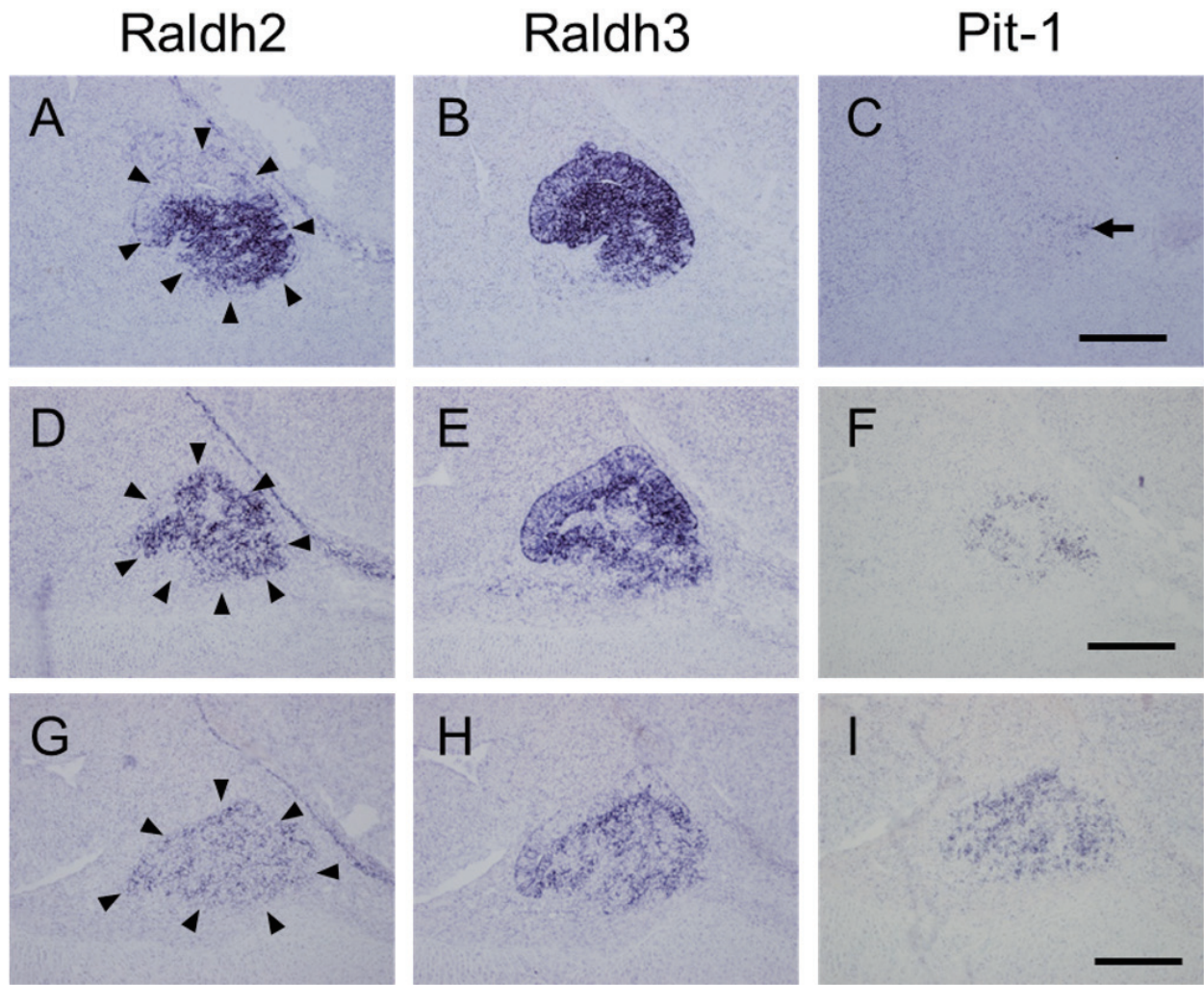


図2. ラット胎生期e15.5からe17.5の下垂体前葉原基におけるRaldh2, Raldh3, Pit-1発現. A, B, C. e15.5. D, E, F. e16.5. G, H, I. e17.5. 矢尻は下垂体前葉原基を示している. e15.5で僅かにPit-1発現が確認される(C: 矢印). スケールバー: 200 μ m.

常となる¹³⁾. また、Prop1変異は複合下垂体ホルモン欠損症 (combined pituitary hormone deficiency) を引き起こす^{14, 15)}. これらのことから、Prop1は下垂体前葉細胞の発生、細胞分化に必須な転写因子であると考えられている。我々は、レチノイン酸がProp1の発現を誘導する分子である可能性を報告している¹¹⁾。ラット胚を用いて、下垂体前葉原基でのProp1 mRNA発現領域に一致して、RALDH2、RALDH3およびレチノイン酸受容体 (RAR α 、RAR β 、RAR γ) が発現していることを観察している¹¹⁾。また、Prop1遺伝子上流にレチノイン酸受容体結合領域があり、下垂体原基の器官培養にレチノイン酸を添加することで、Prop1発現を増加させることを明らかにした¹¹⁾。本研究により、Prop1が発現する以前からRALDH2とRALDH3はラトケ嚢で発現していたことから、下垂体発生初期に局所で合成されたレチノイン酸がProp1の発現を引き起こす誘導因子としての働きがあることが予想される。すなわち、下垂体前葉原基の局所で合成され

るレチノイン酸は下垂体細胞の分化の初期から働く因子であることが考えられる。一方、本研究から、RALDHの発現は発生を通して維持されていたが、Prop1の発現は減少していったことから、レチノイン酸はProp1の発現維持に必須ではないと推測される。下垂体前葉原基でレチノイン酸が合成され続けても、Prop1が減少していくメカニズムについては今後明らかにすべきである。

Prop1は転写因子Pit-1の発現を誘導する転写因子でもある^{16, 17)}。Prop1はPit-1の発現を誘導すると発現が消失することから、両者が共存することはない¹⁸⁾。本研究でも、e15.5でPit-1発現が増加し始めると、Prop1の発現が減少していくことが確かめられた。本研究から、Pit-1が発現する以前から下垂体前葉原基ではRALDH2とRALDH3が発現していることが観察できたが、我々のこれまでの研究でも同様の観察結果を報告している⁸⁾。先行研究で、Pit-1遺伝子上流にレチノイン酸応答配列が存在し、レチノイン酸はPit-1発現を促進することが報告され

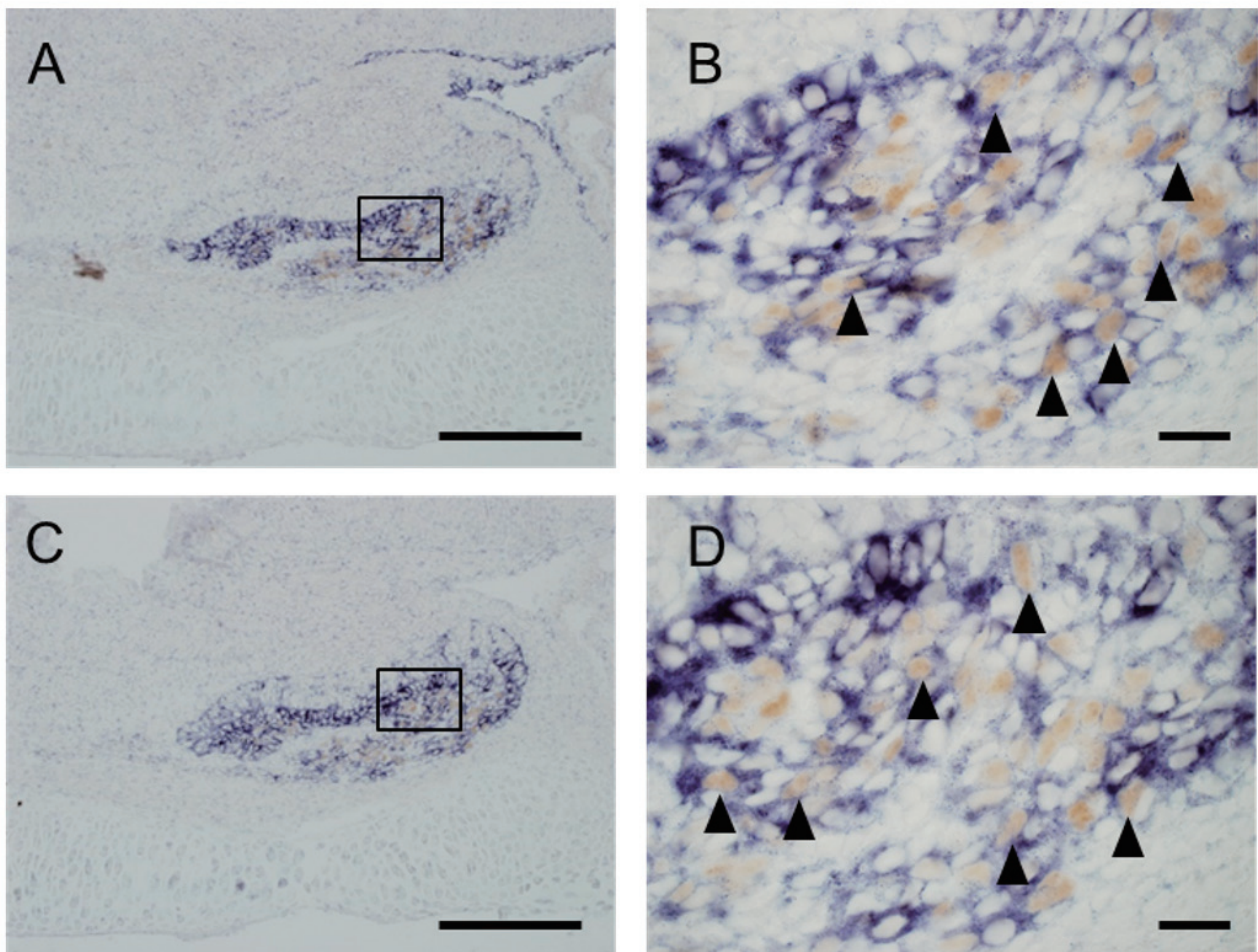


図 3. ラット胎生期 e17.5 の下垂体前葉原基における Raldh2, Raldh3 と Pit-1 の二重染色. 右図は左図の線で囲った領域を拡大した. A, B. Raldh2 の ISH と Pit-1 の免疫組織化学による二重染色. 核に Pit-1 免疫陽性反応 (褐色) が認められる細胞の細胞質に, Raldh2 mRNA シグナル (紫色) が確認される (矢尻). C, D. Raldh3 の ISH と Pit-1 の免疫組織化学による二重染色. 核に Pit-1 免疫陽性反応 (褐色) が認められる細胞の細胞質に, Raldh3 mRNA シグナル (紫色) が確認される (矢尻). スケールバー (A, C) : 200 μ m, (B, D) : 20 μ m.

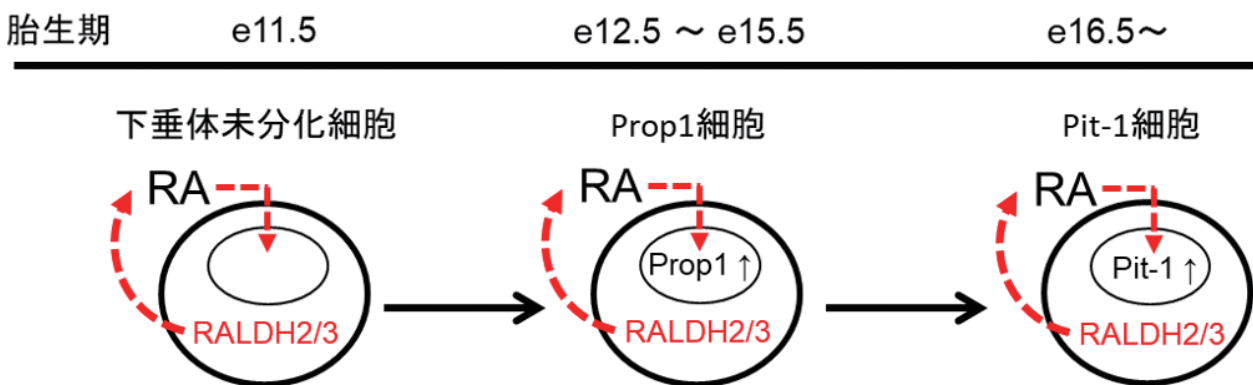


図 4. 下垂体前葉細胞の分化過程におけるレチノイン酸の作用メカニズム. RALDH2 と RALDH3 は下垂体未分化細胞で発現し, レチノイン酸 (RA) を合成していると考えられる. RA は自己分泌/傍分泌により作用し, 段階的に Prop1, Pit-1 の発現を誘導することで下垂体前葉細胞の分化を促進することが予想される.

ている^{19, 20)}. これらのことから, レチノイン酸は発生過程の下垂体前葉前駆細胞で Pit-1 の発現を誘導する作用が推測される. また, 本研究から Prop1 発現が減少した以降も, Pit-1 陽性の RALDH2 発現細胞と RALDH3 発現細胞が観察できた. このことから,

下垂体前葉原基の Pit-1 陽性細胞はレチノイン酸を合成し, 自己分泌もしくは近傍の Pit-1 陽性細胞に対する傍分泌により, Pit-1 発現を促進していると考えられる.

Pit-1 発現細胞からは, 下垂体前葉ホルモン産生細

胞のうち成長ホルモン (GH) 産生細胞、プロラクチン (PRL) 産生細胞、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 産生細胞が分化してくる。このうち少なくとも GH 産生細胞の分化にレチノイン酸が関与することが知られている。GH 遺伝子上流にはレチノイン酸応答配列が存在し、レチノイン酸は GH 遺伝子発現を促進する²¹⁾。また、ラットのエストロゲン誘発プロラクチン産生腫瘍から樹立された細胞株である MtT/E 細胞は、Pit-1 陽性ではあるが、ホルモンを産生しない。この MtT/E 細胞にレチノイン酸を処理することで GH を産生するようになる¹²⁾。さらに、Cheng らは、ラットの下垂体原基から細胞を分散し、レチノイン酸を加えて培養すると、レチノイン酸を添加しない群に比べて GH 産生細胞が多く出現し、培養上清中の GH 量が増えることを報告している²²⁾。これらのことから、レチノイン酸は GH 産生細胞の分化を促進する因子として作用すると考えられる。しかし、下垂体前葉原基でレチノイン酸が自己分泌により Pit-1 産生細胞から GH 産生細胞に分化するかどうかは不明である。ラットにおいて、Pit-1 は e15.5 で発現し始め、続いて e17.5 から GH が発現する²³⁾。すなわち、本研究で Pit-1 と RALDH との共存が確認された e17.5 の時期に GH 産生細胞が出現してくる。下垂体前葉原基の GH 産生細胞の出現と RALDH2 や RALDH3 発現の関連性を解明することは今後の課題である。また、レチノイン酸が Pit-1 発現細胞から PRL 産生細胞や TSH 産生細胞に分化する際への影響についても未解明であり、今後レチノイン酸の機能解析を詳細に検討することで下垂体形成の理解へ繋がることが期待される。

謝辞

本研究は、研究課題「下垂体前葉における細胞間情報伝達物質の解析」(RIIS202108) に対する 2021 年度神奈川大学総合理学研究所研究助成を受けて行った。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Duyster G (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**: 4315-4324.
- 2) Ericson J, Norlin S, Jessell TM and Edlund T (1998) Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* **125**: 1005-1015.
- 3) Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S and Mahon KA (1998) Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* **125**: 4835-4840.
- 4) Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP and Rosenfeld MG (1998) Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12**: 1691-1704.
- 5) Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahon AP and Rosenfeld MG (2001) Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* **128**: 377-386.
- 6) De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajhosseini M, Rosewell I and Dickson C (2000) An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**: 483-492.
- 7) Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P and Dolle P (1997) Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* **62**: 67-78.
- 8) Fujiwara K, Maekawa F, Kikuchi M, Takigami S, Yada T and Yashiro T (2007) Expression of retinaldehyde dehydrogenase (RALDH)2 and RALDH3 but not RALDH1 in the developing anterior pituitary glands of rats. *Cell Tissue Res.* **328**: 129-135.
- 9) Dolle P, Ruberte E, Leroy P, Morriss-Kay G and Chambon P (1990) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* **110**: 1133-1151.
- 10) Dolle P, Fraulob V, Kastner P and Chambon P (1994) Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech. Dev.* **45**: 91-104.
- 11) Yoshida S, Fujiwara K, Nishihara H, Kato T, Yashiro T and Kato Y (2018) Retinoic acid signalling is a candidate regulator of the expression of pituitary-specific transcription factor Prop1 in the developing rodent pituitary. *J. Neuroendocrinol.* **30**: e12570.
- 12) Mogi C, Goda H, Mogi K, Takaki A, Yokoyama K, Tomida M and Inoue K (2005) Multistep differentiation of GH-producing cells from their immature cells. *J. Endocrinol.* **184**: 41-50.
- 13) Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA (2006) Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. *Mol. Endocrinol.* **20**: 1378-1390.
- 14) Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3rd and Rosenfeld MG (1998) Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* **18**: 147-149.
- 15) Li S, Crenshaw EB 3rd, Rawson W, Simmons D, Swanson L and Rosenfeld M (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* **347**: 528-533.
- 16) Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carrière C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B,

- Beamer WG and Rosenfeld MG (1996) Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* **384**: 327-233.
- 17) Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Krones A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, Taketo MM, Kemler R, Grosschedl R, Rose D, Li X and Rosenfeld MG (2006) Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* **125**: 593-605
- 18) Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai LY, Nakayama M and Kato Y (2009) Prop1 coexists with sox2 and induces pit1-commitment cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **385**: 11-15.
- 19) Sanchez-Pacheco A, Palomino T and Aranda A (1995) Retinoic acid induces expression of the transcription factor GHF-1/Pit-1 in pituitary prolactin- and growth hormone-producing cell lines. *Endocrinology* **136**: 5391-5398.
- 20) Cohen LE, Zanger K, Brue T, Wondisford FE, Radovick S (1999) Defective retinoic acid regulation of the Pit-1 gene enhancer: a novel mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *Mol. Endocrinol.* **13**: 476-484.
- 21) Palomino T, Baretino D and Aranda A (1998) Role of GHF-1 in the regulation of the rat growth hormone gene promoter by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.* **273**: 27541-27547.
- 22) Cheng Y, Xiang Y, Lin Y, Fu S, Jia W, Zhang G, Lv W, Mi S and Zhao Q (2011) Retinoic acid and dexamethasone induce differentiation and maturation of somatotroph cells at different stages in vitro. *Endocr. J.* **58**: 177-184.
- 23) Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG and Swanson LW (1990) Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* **4**: 695-711.

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

相模川河口域における長期環境変動のモニタリング 9 夏季高水温の 海況と植物プランクトン分布

浅井泰地¹ 川延京子² 磯野柊太¹ 西本右子³ 鈴木祥弘^{1,2,4}

Distribution of Phytoplankton Biomass in the Sagami River Estuary
at High Water Temperatures in Summer

Taichi Asai¹, Kyoko Kawanobe², Syuta Isono¹, Yuko Nishimoto³
and Yoshihiro Suzuki^{1,2,4}

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

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

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: r201170216pp@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The physical and chemical conditions in the Sagami River estuary were measured during the high-temperature summer season of 2021, and the results were correlated with the distribution of phytoplankton. The results showed that thermal stratification was clearly observed from the mouth of the river to 5000 m offshore, and that saline stratification was observed in the thin surface layer from the mouth of the river to 2000 m offshore due to the inflow of fresh water from the Sagami River. The low-salinity water contains high concentrations of nitrate, which corresponds to the relatively high biomass of phytoplankton, mainly in the surface layer at 1500 m offshore. Relatively high concentrations of unconsumed phosphate remained in this water mass, indicating that phytoplankton growth in this region may be rate-limited by nitrogen nutrients. This study suggested the structure of the phytoplankton community in this high-temperature season to predict the structure after global warming in the future, and showed that measurements with improved spatial resolution were able to detect water mass structures in this area that were missed by normal resolution measurements.

Keywords: biomass, *Gephyrocapsa oceanica*, sagami river estuary, *skeletonema costatum* complex, species composition

序論

相模湾は伊豆半島から三浦半島を経て房総半島に至る、太平洋にむかって開かれた湾である。この湾の沖合には黒潮が流れる一方で、複数の河川から淡水が流入し、湾内には複雑な環境が形成されている¹⁾。中でも平塚市周辺の海域は、相模川からの淡水の流入にくわえて、平塚海谷と呼ばれる特異な海底地形が存在し、環境が複雑に変動している²⁾。この変動する環境にあっても、様々な生物が植物プランクトンの行なう光合成・一次生産に支えられて棲息していることには変わりはない。この海域で植物プランク

トン解析し、生息環境と対応付けて考えることはこの海域の生態系を理解するために重要である²⁻⁴⁾。近年の地球温暖化とそれに伴う気候変動は、この海域にも様々な影響を与えることが予想される。海域に普遍的な特性と地球温暖化にともなう生じる現象とを分けて捉え、影響を正確に把握するためには、この海域での複数年にわたる測定が重要である。我々は、神奈川大学総合理学研究所の助成を受け、2010年以来継続した調査を実施してきた。本研究では、これまでの調査で実施されたことの少なかった夏季

に植物プランクトン現存量の調査を実施し、物理的環境（海況）と対応付けて検討することを目指した。さらに、本研究では100 mごとに測点を設けて測定を行い、高い空間解像度での測定が可能であるかを検証した。水塊の移動が少なく海況を把握しやすい小潮の時期（8月30・31日）に観測を実施した。

材料と方法

環境要因と植物プランクトン生物量の測定

非生物的環境要因と植物プランクトン生物量の測定を2021年8月30・31日に行った。相模川河口から南に向かって沖合に0 m、100 m、200 m、300 m、400 m、500 m、600 m、800 m、1000 m、1500 m、3000 m、5000 mの14測点を南北直線上に設定して測定した（図1）。GPSを用いて緯度経度を測定することで調査船の位置を正確に決定できた。この位置からの移動を小さくするため、測定は位置決定後できる限り速やかに実施した。測点の水深は音響測定器で測定し、沿岸の水深50 m以浅の観測点では、海底に着底した観測器で測定した水圧から求めた。各測点では、調査船舷側より直読式総合水質計（AAQ126, JFEアドバンテック株式会社）を垂下して、電気伝導度、温度、圧力、光強度、さらに、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力は、測定器付属のソフトウェアにより塩濃度（‰）と水深（m）に換算した。海水の密度指標（ σ ）は、塩濃度と温度、圧力から算出した海水密度（ kg m^{-3} ）より1000を引いて求めた。クロロフィル蛍光強度は、観測と同時に採水した海水試料から求めたクロロフィルa濃度で校正し、クロロフィルa濃度（ $\mu\text{g l}^{-1}$ ）に換算した。海水試料をガラス濾紙（GF/

F, Whatman）で濾過し、濾紙上に残った粒子よりN,N'-ジメチルホルムアミド（富士フイルム和光純薬株式会社）でクロロフィルaを抽出した。溶液中のクロロフィルa濃度は蛍光分光器（TD-700, Turner Designs）を用いて蛍光法で求めた⁵⁾。同時に測定された圧力から測定点の水深をもとめ、これと対応付けて、各測点での塩濃度、海水密度指数、クロロフィルa濃度の鉛直分布を求めた。さらに、観測点の河口からの距離とあわせて計算し、測定点の水深を境界条件として設定した上で、コンターマップを作成した（G-sharp, 日本電子株式会社）。

栄養塩濃度

沖合0 m、100 m、200 m、500 m、700 m、1000 m、1500 m、5000 mの南北直線上の合計8測点（図1）で採水を行なった。採水バケツを用いて表層水を採取、バンドーン採水器（OSK12XL010, オガワ精機株式会社）を用い水深1 mと10 mから採水し、遮光した保冷庫に入れて実験室まで輸送した。試料は測定まで5℃、暗所で保存した。試料中の硝酸態窒素の濃度はカドミウム還元法による呈色反応で（Marine Checker HI781, HANA Ins.）、リン酸塩の濃度はモリブデンブルー法による呈色反応で求めた（Marine Checker HI774, HANA Ins.）。

植物プランクトン群集の解析

相模川河口から南に向かって沖合に0 m、1000 m、5000 mの南北直線上の3測点（図1）で表層水を採水バケツにより採水した。海水試料は250 ml 黒色ポリびんに入れ、速やかに0.04% 中性ホルマリン-0.025% グルタルアルデヒド固定液（最終濃度）を添加した⁶⁾。固定した試料は、遮光した保冷庫に入れて実験室まで輸送した。試料は測定まで5℃、暗所で保存した。この試料250 mlを、引圧せずに膜フィルター（孔径0.2 μm ）（ISOPORE, Millipore）で約30 mlまで濃縮後、utermöhl法により倒立光学顕微鏡（DMIL, Leica社）を用いて観察した。プランクトンマニュアル（Edler and Elbrächter 2010）⁷⁾に従い高倍率の対物レンズで細胞密度分割して観察し、低倍率の対物レンズで全視野面積を確認した。プランクトンの同定（属名と種名）は、Carmelo R. T.(ed.) (1997)⁸⁾ および Omura T. (ed.) (2012)⁹⁾ に従った。

結果

海況

河口から500 mごとの測定結果から分布を求めると、水深の浅い河口付近の温度は水深に依らず26.3℃であった。河口から沖合5000 mまで表層の温度はほ

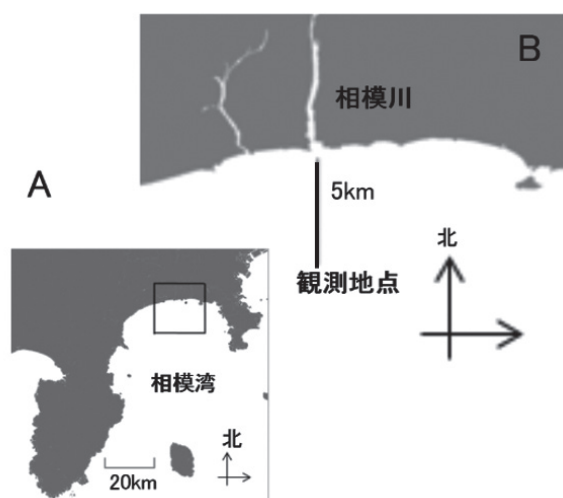


図1. 観測海域。相模川河口から南方沖合5 kmの線上に測点を設けた。A. 相模湾全景 図中の四角形は図Bの位置を示す。B. 観測海域 図中直線は調査した観測点を設けた南北の線を示す。

ば一定で 26 °C であった。10 m 以上の水深をもつ観測点では、どの観測点でも同じように水深とともに水温が低下し、水深 15 m 付近で 25 °C、30 m 付近で 23 °C、40 m 付近で 21 °C となった (図 2A 右)。河口から 1000 m までの沿岸の温度を 100 m ごとの観測結果で求めると、24 ~ 26.5 °C の範囲で複雑に変化していることが明らかになった。河口付近では水深に依らず 26 °C 以上で一定の水塊が認められた。水温は沖合に向かって少しずつ低下し、沖合 700 m 以遠では 26 °C 未満に低下した (図 2A 左)。さらに水温の分布を 0.1 °C の精度で検討すると (Data 未記載)、水温は 26.2 °C から沖合 500 m 付近で 26.0 °C に、650 m 付近で 25.5 °C、700 m 付近で 25.2 °C に低下した。沖合 800 m 付近では表層水温は 24.5 °C にま

で低下したが、900 m 以遠では水深 5 m 以浅の表層に最大 26.0 °C の水塊が認められ、水深 40 m 以深の海底付近には 24.0 °C の低温の水塊が認められた。この結果は、河口付近と外洋に高水温の水塊が存在し、その中間に僅かだが明らかに低水温の水塊が存在することを示していた。

河口から 500 m ごとの測定結果から分布を求めると、本海域では塩濃度は表層から水深 5 ~ 10 m で 32.5‰、それ以深 20 ~ 25 m で 33.5‰、25 m 以深で 34.5‰ となる成層が認められた。さらに、河口から沖合 1800 m の範囲には 32‰ 以下の低い塩濃度の水塊が表層から水深 5 m 以浅に認められ、これに加えて沖合 4500 m ~ 5000 m の表層にも、小規模であるがこれと類似した低い塩濃度の水塊が認められた (図 2B 右)。河口から 1000 m までの沿岸の塩濃度を 100 m ごとの観測結果で求めると、河口から沖合 100 m の範囲では表層から海底まで均質で低い塩濃度であり、河口から離れるにつれて 31.8 から 33.2‰ に急激に上昇していた。沖合 100 m ~ 1000 m の範囲では塩濃度の上昇は緩やかになり、沖合 100 ~ 700 m で 33.3 から 33.4‰、さらに 700 ~ 1000 m で 33.4 ~ 33.5‰ の濃度が維持された。沖合 150 から 550 m の範囲では海底付近に塩濃度の低い (33.1 ~ 33.3‰) の水塊、さらに沖合 900 ~ 1000 m の範囲には、表層直下に塩濃度の低い (33.3 ~ 33.4‰) の水塊が認められた (図 2B 左)。

塩濃度、水温、圧力から各測点の密度指標 σ を求めた。河口から 500 m ごとの測定結果から分布を求めると、河口から沖合 5000 m の範囲で均一な成層が認められた。表層から水深 10 m では σ は 20.5 ~ 22.0 の範囲にあり、水深 10 から 30 m で 22 ~ 23.5、30 m 以深で 23.5 ~ 25.0 となった。これに加えて河口から 2000 m の沿岸の水深 5 m 以浅と 4500 m ~ 5000 m 付近の表層には σ が 19.0 ~ 20.5 の比較的低密度の水塊が認められた (図 2C 右)。河口から 1000 m までの沿岸の温度を 100 m ごとの観測結果で求めると、500 m ごとの測定で求めた分布とは異なり、各観測点では表層から海底まで密度がほぼ一定であり、河口から離れるにつれて密度が上昇した。河口から 50 m 沖合では σ は 19.0 未満、50 m から 100 m の範囲では 19.0 ~ 20.5 の範囲にあった。それ以遠、沖合 700 m までは σ は 20.5 ~ 22.0 の範囲にあった。沖合 800 m 以遠では σ は 22.0 ~ 23.5 の範囲となったが、沖合 900 ~ 1000 m の範囲の水深 5 m 以浅には σ が 20.5 ~ 22.0 となり、複雑な海況が形成されていることが示された (図 2C 左)。

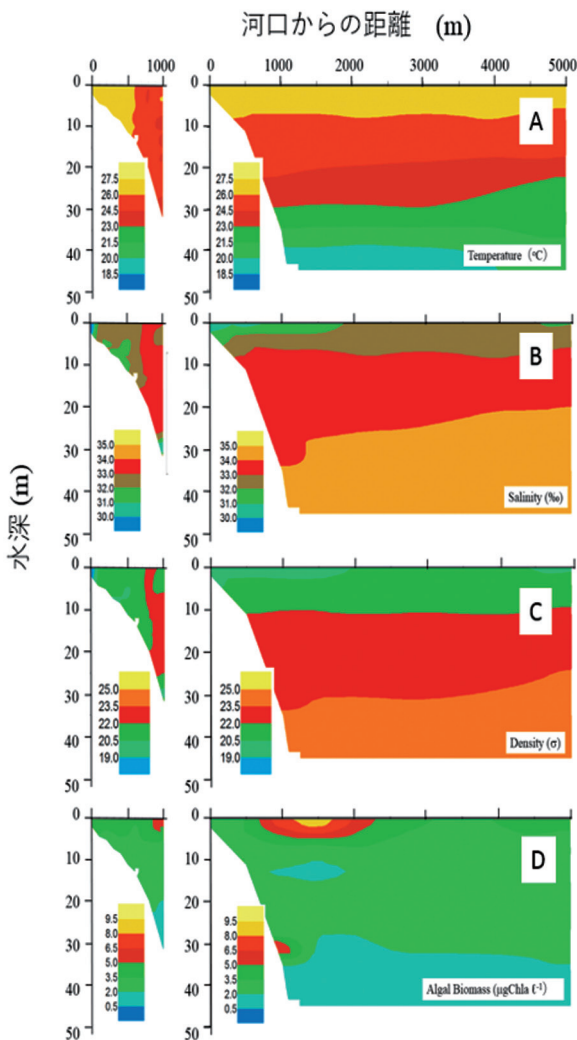


図 2. 相模川河口域の海況と植物プランクトン生物量の分布. 河口からの距離と水深による水温 (A)、塩濃度 (B)、密度 (C) のクロロフィル a 濃度 (D) の分布. 0 ~ 500 m の範囲で 100 m ごと、500 ~ 1000 m の範囲で 200 m ごとに測定した結果に基づいて描いた詳細な分布 (左) と 0 ~ 1500 m の範囲で 500 m ごとに測定した結果と 3000 m と 5000 m の結果から求めた海域全体の分布の概略 (右) を個別に求めた。

植物プランクトンの分布

測定した蛍光強度からクロロフィル *a* 濃度を推定し、植物プランクトンの分布を求めた。本研究で測定を行った沖合 0 ~ 5000 m の範囲では水深 30 m 以深で $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g l}^{-1}$ で、30 m 以浅では $2.0 \sim 3.5 \mu\text{g l}^{-1}$ の濃度であった。これに加えて、沖合 500 ~ 3000 m、4000 ~ 5000 m の表層に $3.5 \mu\text{g l}^{-1}$ 以上の濃度で植物プランクトンが分布していた。特に 1500 m 付近を中心とした海域では $8.5 \mu\text{g l}^{-1}$ をこえるの濃度で植物プランクトンの分布が認められた。さらに沖合 1000 m 付近の水深 30 m の海底付近には $6.5 \sim 8.0 \mu\text{g l}^{-1}$ の高い濃度で植物プランクトンの分布があきらかになった (図 2D 右)。河口から 1000 m までの沿岸の濃度を 100 m ごとの観測結果で求めると、表層 5 m 以浅で $3.5 \sim 5.0 \mu\text{g l}^{-1}$ 、水深 5 ~ 25 m で $2.0 \sim 3.5 \mu\text{g l}^{-1}$ 、沖合 900 m 以遠の水深 25 m 以深で $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g l}^{-1}$ となり、表層で高く、水深とともに低下する植物プランクトンの分布が認められた (図 2D 左)。沖合 850 ~ 1000 m の表層には $5.0 \sim 6.5 \mu\text{g l}^{-1}$ の周囲に比べて高い濃度で植物プランクトンの分布が認められた。これは 1500 m 付近を中心に高密度で存在した植物プランクトンの一部であると推定された。

栄養塩 (硝酸態無機窒素とリン酸) 濃度

水深 1 m と 10 m から採水した海水 (海水試料) 硝酸態無機窒素濃度とリン酸濃度を測定した。水深 1 m の海水試料中の硝酸態無機窒素濃度は沖合 200 m で 1.4 mg l^{-1} であったものが、沖合 500 m で 0.32 mg l^{-1} に急激に低下し、沖合 2000 m ではさらに 0.06 mg l^{-1} まで低下した (図 3 黒丸)。水深 10 m の海水試料中の硝酸態無機窒素濃度は沖合 200 m で 0.11 mg l^{-1} と水深 1 m の海水試料の 7.9% であり、沖合 500 m でも 0.08 mg l^{-1} と低い濃度を示し、沖合 2000 m では 0.05 mg l^{-1} となり、僅かずつであるが低下した (図 3 白丸)。沖合 2000 m と 5000 m の硝酸態無機窒素濃度は水深に依らず低い値を示した。水深 1 m の海水試料中のリン酸濃度は沖合 200 m で 0.11 mg l^{-1} であったものが、河口から離れるにつれて低下し、沖合 500 m で 0.08 mg l^{-1} 、沖合 1000 m 以遠ではさらに 0.05 mg l^{-1} に低下した (図 3 黒四角)。しかし、沖合 1000 m 以遠ではその値はほとんど変わらず、河口 500 m の海水試料の 45% の濃度が維持された。一方、水深 10 m の海水試料中のリン酸濃度は河口から離れても変化せず沖合 500 m で 0.05 mg l^{-1} であり、沖合 2000 m では 0.05 mg l^{-1} 、5000 m で 0.03 mg l^{-1} であった。この値は沖合 1000 m 以遠の水深 1 m の海水試料とほぼ等しかった (図 3 白四角)。

植物プランクトン種組成

河口から 0 m (河口域)、1000 m、5000 m の表層水を採水し、海水試料中の藻類細胞を計数した (表 1)。計数された細胞の 99% が珪藻類であり、これくわえて比較的少数の渦鞭毛藻が認められた。45 種類認められた珪藻類のうち 20 種類が暖海性の珪藻種であった。また、珪藻類のうち 19 種類が *Chatoceros* 属であった。特に河口域では *C. socialis* が優占しており、珪藻類全細胞数の 87.5% を占めていた。本種の割合は 1000 m で 23.6%、5000 m で 3.7% であり、沖合で低下した。1000 m と 5000 m では同属の *C. compressus* が優占していた。河口で 3.4% であった割合が、1000 m と 5000 m では 24.7% と 51.8% となった。*Chatoceros* 属以外では、河口域で *Skeletonema costatum* と *Thalassionema nitzschioides* がともに 0.7% を占めていた。*Bacteriastrum spp.* は河口からの距離に関わらず同程度の密度でみとめられ、0 m、1000 m、5000 m で珪藻類全細胞数の 1.4%、4.1%、9.5% を占めていた。全藻類の細胞密度は河口海水試料で 280000 細胞 l^{-1} で最大で、1000 m で 83000 細胞 l^{-1} 、5000 m で 40000 細胞 l^{-1} で、河口域では 1000 m の 3.4 倍、5000 m の 7.0 倍であった。しかし、河口域で顕著に優占していた *C. socialis* を除いて考えると、河口域、1000 m、5000 m でそれぞれ 36000、63000、38000 細胞 l^{-1} となり、採集点による差は 2 倍以内で、河口域の密度が最も低くなった。また、河口域だけに認められた種は 45 種中 8 種、

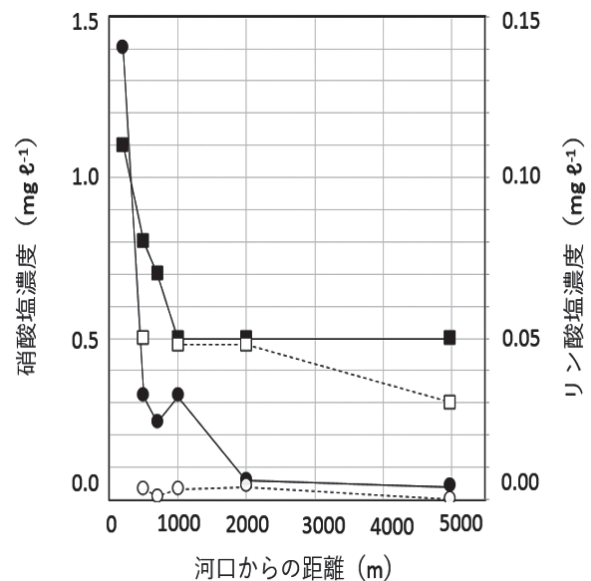


図 3. 相模川河口域の栄養塩濃度の分布。水深 1 m と水深 10 m から採水した海水中の硝酸塩濃度 (1 m 試水黒丸と 10 m 試水白丸) とリン酸塩濃度 (1 m 試水黒四角と 10 m 試水白四角) を測定し、採水地点の河口からの距離で表示した。

表 1. 植物プランクトン種組成. 河口 (0 m) と河口から 1000 m、5000 m で採水した試水中の細胞密度を光学顕微鏡により計数した.

| Species | 表層 (0m) | | |
|--------------------------------------|---------|----------------|---------------|
| | 0m | 1000m | 5000m |
| diatoms | | | |
| <i>Lauderia annulata</i> | w | 245 | 41 |
| <i>Skeletonema costatum</i> | | 1,958 | |
| <i>Thalassiosira</i> spp. | | 163 | 653 |
| <i>Leptocylindrus danicus</i> | | | 1,469 |
| <i>Leptocylindrus minimus</i> | | | 122 |
| <i>Coscinodiscus</i> spp. | | 4 | 76 |
| <i>Pseudoguinaradia recta</i> | w | 245 | |
| <i>Rhizosolenia acuminata</i> | w | 8 | 4 |
| <i>Rhizosolenia crassispina</i> | w | | 20 |
| <i>Rhizosolenia formosa</i> | w | | 36 |
| <i>Rhizosolenia robusta</i> | w | | 4 |
| <i>Rhizosolenia striata</i> | w | | 61 |
| <i>Proboscia alata</i> | | | 41 |
| <i>Pseudosolenia calcar-avis</i> | w | 41 | 41 |
| <i>Guinaradia flaccida</i> | | 122 | 530 |
| <i>Guinaradia striata</i> | | 979 | 1,142 |
| <i>Dactyliosolen fragilissimus</i> | | | 163 |
| <i>Climacodium frauenfeldia</i> | w | 82 | |
| <i>Bacteriastrum</i> spp. | | 3,917 | 3,427 |
| <i>Hemiaulus membranaceu.</i> | w | 163 | |
| <i>Chaetoceros denticulatus</i> | w | 163 | 326 |
| <i>Chaetoceros eibonii</i> | w | 32 | |
| <i>Chaetoceros peruvianus</i> | <w | | 204 |
| <i>Chaetoceros rostratus</i> | w | 163 | |
| <i>Chaetoceros affinis</i> | | 2,122 | 979 |
| <i>Chaetoceros anastomosar</i> | <w | | 490 |
| <i>Chaetoceros compressus</i> | | 9,792 | 20,400 |
| <i>Chaetoceros constrictus</i> | <c | 2,285 | 5,059 |
| <i>Chaetoceros curvisetus</i> | <w | 3,672 | 5,875 |
| <i>Chaetoceros diadema</i> | | 1,877 | 1,632 |
| <i>Chaetoceros didymus</i> | <w | 1,387 | 979 |
| <i>Chaetoceros furcellatus</i> | c | 1,632 | 5,059 |
| <i>Chaetoceros lacinosus</i> | c | 653 | 653 |
| <i>Chaetoceros lorenzianus</i> | w | 1,550 | 4,243 |
| <i>Chaetoceros messanensis</i> | w | | 286 |
| <i>Chaetoceros pseudocurvis</i> | w | | 2,938 |
| <i>Chaetoceros radicans</i> | | | 1,142 |
| <i>Chaetoceros socialis</i> | | 247,738 | 19,421 |
| <i>Chaetoceros tortissimus</i> | | | 204 |
| <i>Thalassionema nitzschioides</i> | | 1,958 | 3,101 |
| <i>Thalassiothrix</i> spp. | | 8 | |
| <i>Meuniera membranacea</i> | | | 979 |
| <i>Navicula</i> spp. | | | 326 |
| <i>Pleurosigma/Gyrosigma</i> sp. | | 163 | 816 |
| <i>Cylindrotheca closterium</i> | | 163 | 163 |
| Total (cell · l⁻¹) | | 283,286 | 82,263 |

| Species | 表層 (0m) | | |
|--------------------------------------|---------|-----------|------------|
| | 0m | 1000m | 5000m |
| flagellates | | | |
| Dinophyceae | | | |
| <i>Prorocentrum compressum</i> | | 163 | 82 |
| <i>Prorocentrum micans</i> | | 82 | |
| <i>Prorocentrum minimum</i> | | 41 | |
| <i>Prorocentrum triestinum</i> | | 41 | |
| <i>Ceratium furca</i> | i | 24 | 326 |
| <i>Ceratium fusus</i> | | 36 | 4 |
| <i>Ceratium humile</i> | | | 12 |
| <i>Ceratium inflatum</i> | wo | | 4 |
| <i>Ceratium massiliense</i> | <w | | 32 |
| <i>Ceratium trichoceros</i> | <w | 12 | 16 |
| <i>Ceratium tripos</i> | | | 16 |
| <i>Protoperidinium divergen</i> | i | | 41 |
| Peridinales | | 12 | 82 |
| Total (cell · l⁻¹) | | 84 | 859 |

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

5000 m だけに認められた種は 45 種中 3 種で、13 種は河口から 5000 m まで共通して認められた。渦鞭毛藻は 1000 m の海水試料で 15 種認められ、5000 m の海水試料でも 9 種類が認められた。一方、河口域では 4 種類のみが認められ、その密度は 1000 m 海水試料の渦鞭毛藻類細胞密度の 10%、5000 m 海水試料の渦鞭毛藻類細胞密度の 19%であった。

考察

本研究では、河口から沖合 5000 m まで 500 m 以上の間隔を明けて測定した結果と、河口から沖合 1000 m まで 100 ~ 200 m の間隔で測定した結果を比較しながら海況を検討した。河口から沖合 5000 m まで 500 m 以上の間隔をあけて測定した結果から求めた広域の解析では、明瞭な成層を伴う均一な水塊として海域を把握することが出来た (図 2A ~ C 右)。この成層は主として高い気温に伴う海洋表層の高い水温と対応していた (図 2A 右)。さらに、河口から 2000 m 沖合までの表層には塩濃度の低い水塊が認められた (図 2B 右)。これは相模川から流入した淡水

に起因すると考えられる。この水塊の温度はそれ以遠の表層水と変わらずに高く (図 2A 右)、より密度の低い水塊を形成し、成層を強固なものにしていただけられる (図 2C 右)。この水塊に対応して、硝酸塩濃度は沖合 5000 m の濃度の 20 倍以上であった (図 3)。また、この水塊の存在しない水深 10 m では、沖合 500 ~ 5000 m の範囲で低い濃度が維持されていた。流入した淡水は河口域の表層を高い栄養塩濃度にして示していたことを示していた。同時に測定したリン酸塩の濃度も河口付近で高く沖合でも低下したが、リン酸濃度は沖合でも河口の半分ほどの濃度が維持されていた (図 3)。硝酸態窒素とリン酸濃度の変化の違いは、硝酸態窒素が最後まで消費されているのに対し、リン酸塩の消費は途中で停止していることを示しており、観測をおこなった海域では、藻類の増殖が硝酸塩により律速されていることを示していた。淡水流入により形成された水塊の先端、海洋表層との接点付近の沖合 1500 m を中心に高いクロロフィル濃度が認められ、高い植物プランクトンバイオマスが示されていること (図 2D) は、測定により示された上述の海況と良く対応していた。また、相模川からの淡水の流入に伴う栄養塩の供給が、成層により海洋深層からの栄養塩の供給の乏しいこの時期、この海域での藻類の増殖に重要であることを示唆していた。表層で高い植物プランクトンバイオマスが示された地点の海底には、高い濃度でクロロフィルの分布が認められた。本海域の沖合 1000 m 前後の海底にはしばしばこのような植物プランクトンバイオマスの集積が観察される¹⁰⁾。この観測点の海底付近での光強度は表層の 1% 未満であり、酸素濃度は高く無かった (データ未記載)。このため、海底で植物プランクトンが光合成を行い、増殖していることは考え難かった。植物プランクトンの集積は、表層で増殖した植物プランクトンに由来することが推定された。

河口付近、河口から 1000 m と 5000 m の 3 測点の表層水試料中のプランクトンの細胞数を計数した。その結果、計数された細胞の 99% が珪藻類であり、これ以外に渦鞭毛藻が僅かに認められたこと、45 種類認められた珪藻類のうち 20 種類が暖海性種であることが示された。この結果は、採集した海域の水温が 26°C に達する高温であったことと対応していた。珪藻種の中でも *Chatoceros* 属が特に多く、河口域では *C. socialis* が全細胞数の 87.5% を占める特徴的な群集組成を示した。最も水温の高くなるこの時期の植物プランクトン群集は、進行する地球規模の気温上昇により、今後大きく変化することが予想される。こうした変化を明らかにする上で、植物プランクト

ン群集組成の記録は極めて重要であると考えている。本研究では、河口付近の浅海で測定間隔を狭めて、より詳細な海況測定も行なった (図 2 左)。その結果、河口付近での複雑な水塊構造が存在する可能性を示すことが出来た。空間解像度を高めたこの測定では、潮の干満などの水塊の時間的変動などの影響が大きく反映されることが予想される。しかし、観測時期 (小潮) と観測時間に十分に配慮して測定を行なったところ、河口付近の低塩濃度の水塊と外洋の水界の間に明らかに異質な水塊が存在することも示すことが出来た。この海域では河口付近の汽水水塊と外洋の水塊、さらに沿岸を流れる水塊の 3 種類の水塊から構成される状況がしばしば観察されてきた^{2,4,10)}。この時期、高水温による明瞭な温度成層により水界の判別が難しくなったが、より詳細な測定により、これらの水塊を判別可能であることが、本研究により明らかに出来た。測定結果が潮汐の影響を強く受けえることは、本海域を対象とした研究でも明らかになっている⁴⁾。空間解像度を高めたこの測定では、潮の干満などの水塊の時間的変動などの影響が大きく反映されることが予想された。実際、空間解像度を高めた測定 (図 2 左) と通常の解像度での測定 (図 2 右) の結果が、完全には一致しなかった。空間解像度を上げた海峡の測定には、様々な配慮が必要であることをこの結果は強く示唆していた。

結論

本研究では相模川河口付近の海況の測定を夏季の高温水温期に実施した。その結果、夏季河口域には、河口から沖合 5000 m まで明瞭な温度成層が認められ、さらに、相模川から流入する淡水により、河口から沖合 2000 m の範囲の表層に塩分成層が認められることを明らかにした。塩分成層を形成する低塩濃度の水塊は比較的高い濃度の硝酸態窒素を含んでおり、これと対応して沖合 1500 m の表層を中心に、比較的高いバイオマスで植物プランクトンが存在することを示した。この水塊中には消費されること無く残ったリン酸塩が比較的高い濃度で保たれていることから、海域の植物プランクトンの増殖は、窒素栄養塩により律速されている可能性が示された。空間解像度を高めた浅海での海況の測定は、通常の見落とされたこの海域の水塊構造を確認できることが示された。

謝辞

相模川河口域の継続的調査研究の一環として、夏季高温期の海況とプランクトン群集形成の解析を行

なった本研究は、神奈川大学理学部総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202109) をうけて実施された。研究にご理解を頂き、支援いただいた神奈川大学理学部総合理学研究所の所員の皆さんに深くお礼申し上げます。

文献

- 1) 日本海洋学会編 (1985) *日本全国沿岸海洋誌*. 東海大学出版会, 東京.
- 2) 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2010) 相模川河口域の海況と植物プランクトンの分布. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **21**: 65-69.
- 3) 平賀義路, 児玉壮史, 鈴木祥弘 (2011) 相模川河口域の植物プランクトンの分布への淡水流入の影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **23**: 59-66.
- 4) 栗飯原海人, 平賀義路, 鈴木祥弘 (2014) 相模川河口域海況の日変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **25**: 111-116.
- 5) Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements (1994 UNESCO).
- 6) 川延京子, 池谷 透 (2016) 海洋植物プランクトン計数試料の品質管理と保存管理策にもとづく固定・保存法の検討. *日本プランクトン学会報* **63**: 55-65.
- 7) Edler L and Elbrächter M. (2010) The utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. IN: *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Bengt K, Caroline C, And Eileen B. eds, UNESCO. pp. 13-20.
- 8) Carmelo R and Tomas (ed.) (1997) Identifying marine phytoplankton. *Academic press. Inc., San Diego, CA*.
- 9) Omura Takuo (ed.) (2012) Marine Phytoplankton of the Western Pacific. *Kouseisha Kouseikaku Co., Ltd., Tokyo*.
- 10) 酒井駿輔, 川延京子, 多田雅章, 金沢謙一, 西本右子, 鈴木祥弘 (2020) 相模川河口域における長期環境変動のモニタリング (冬期相模川河口域の特徴的水塊中に認められた植物プランクトンの群集構造). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **31**: 83-88.

■テクニカルノート■

化学実験科目のオンデマンド教材の作成と評価

東海林竜也^{1,2,3}

Teaching Materials for On-demand System of Chemical Experiments

Tatsuya Shoji^{1,2,3}

¹ Department of Chemistry, 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: t-shoji@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The author introduced technical preparation tips for on-demand teaching materials of chemical experiments.

Keywords: webclass, zoom, microsoft powerpoint

序論

大学には、講義・演習・実験・実習・実技など様々な授業形式がある。実験科目において、学生は事前学習としてテキストや参考書をもとに実験原理や操作を実験ノートにまとめてから当日の実験に臨む。授業当日は、ノートに記した操作手順をもとに集中して実験を進め、それと同時に実験中の現象や計測値などの結果をつぶさにノートに記録する。事後学習として、得られた結果を解析し実験レポートを作成する。この一連の過程は、対面授業において最も教育効果を発揮するであろう。このような実験科目を遠隔授業で実施するに際し、いかに教育の質を保てるか各担当教員は試行錯誤を重ねてきた。筆者は本学理学部化学科物質科学実験 I を担当している。本稿では、この実験科目の遠隔授業用教材の作成法について実例とともに紹介する。

遠隔教材として、実験動画、オンデマンド授業動画、配布資料を用意した。配布資料には、オンデマンド授業用に Microsoft PowerPoint にて作成したスライドの一部を PDF 化し、本学の学習管理システム (Learning Management System; LMS) である WebClass にて配布した。WebClass を通じて実験動画およびオンデマンド授業動画も配信し、実験レポートの提出もこのシステムを利用した。本稿では、筆者の実験動画およびオンデマンド授業動画の作成方法について主に述べる。

材料と方法

実験動画の作成

実験動画の作成のために筆者が実験し、その様子を自ら撮影した。撮影には自前のスマートフォン、デジタル一眼カメラ、三脚を用意した。化学実験では、繊細な操作が要求されるので、そのような操作を理解できるように、スマートフォンを三脚で固定し、実験者(筆者)の手元がよく映るように動画撮影した。それと同時に実験操作の肝所では、写真撮影も行った。

取得した動画および写真を使い実験動画を作成する際に、動画編集ソフトウェアである Adobe Premiere Pro を使用した(図 1)。動画の倍速・スロー再生、シーン切り替え、文字テロップの挿入、実験解説の音声や背景音源などの挿入を行い、Mpeg-4 形式の動画として出力した。実験解説の音声は、Zoom のローカルレコーディングの機能を利用した。Zoom には動画ファイル出力と同時に音声ファイルも別途出力するオプションがあるので、これを利用しシーン毎に音声ファイルを作成した。

なお、神奈川大学はアドビ システムズの高等教育機関向け包括ライセンス契約 (ETLA) を結んでいる¹⁾。そのため、Premiere だけでなく Photoshop, Illustrator などの Adobe 社製最新版ソフトウェアを学生・教職員(非常勤含む)は別途購入することなく利用できる。本論と離れるため詳細は省略するが、編集利用可能な無料音源を提供サイトからダウンロードし²⁾、Adobe Audition を使い動画用の背景

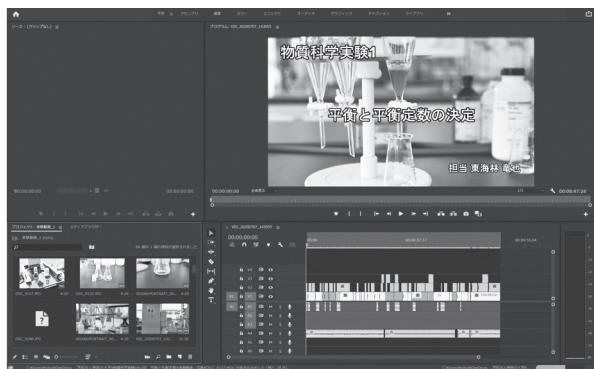


図 1. Adobe Premiere を用いた実験動画の編集例。

音楽も作成し、実験動画に挿入した。

授業動画の作成

実験の原理や背景知識、実験方法の概要、データ解析の解説などを学習するオンデマンド授業用の動画を作成した。PowerPoint で授業スライドを作成した。動画作成には、Zoom または PowerPoint を使用した。作成時には、ディスプレイ 2 枚、マイク、カメラ、ポインター（ロジクール、R1000SL）、ペンタブレットを使用した（図 2）。

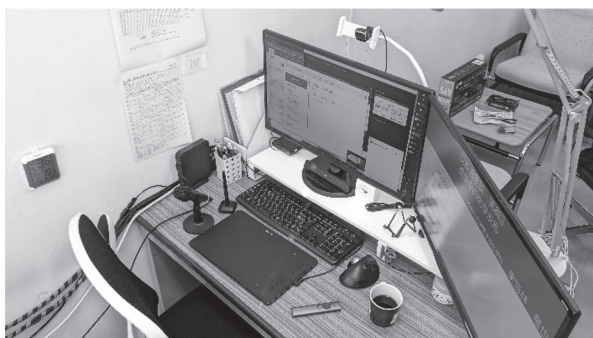


図 2. 筆者のオンデマンド授業動画の作成環境。

結果と討論

実験動画の評価

筆者が担当する実験テーマを学生が実施すると、3~4 時間程度要する。実験の中には、同じ操作の繰り返しや、試料を静置させたり、慎重に行う操作があったりする。そのような時間のかかる操作については、倍速再生や省略し、時間短縮を図った。その一方で、中和滴定の終点判定のような一瞬だけ起こる現象はスローモーション再生にして印象付けた。このような編集作業の結果として、実験動画は 10 分以内の再生時間になった。

受講生からの感想を一部抜粋すると、「実験動画が編集されていたのでとても見やすかったです。」「動画も見やすく、見返してさらに理解できました。動画見ている時にも BGM のおかげで楽しくできまし

た。」「実験の要点が的確にまとめられていたので理解しやすく見ていて苦痛に感じませんでした。」「字幕などでの説明もありすごくわかりやすい。」など、再生時間の短い点、繰り返し見ることが可能な点、見やすい編集などが高い評価に繋がったと考えられる。遠隔授業のための実験動画であるが、実験概要を理解するためにも役立つと考え、実験を行う対面授業の受講生のためにも予習教材として現在も提供している。

授業動画の評価

授業動画の作成には Zoom の録画機能と PowerPoint の録画機能の両方を試み、その機能と特徴について把握した。Zoom は、録画の停止ないし Zoom を終了すると自動的に動画ファイルの生成作業が始まる。Mpeg-4 形式の動画が自動的に生成するので、あとは WebClass にアップロードするだけで授業動画を提供できる。簡単な操作で教材を用意できるが、その反面、編集ができないデメリットがある。例えば、録画途中で言い間違いやスライドに誤りを見つけた場合、受講生の利便性を考慮すると、録画を停止し修正し、再度はじめてから録画をしない必要がある。対面授業を録画し、後日オンデマンド配信する方法であれば、Zoom は適したツールであろう。

PowerPoint を利用した動画作成は、Zoom のデメリットを解決できる。PowerPoint 上で「スライドショーの記録」を選択すると、録画面面に移行する（図 3）。Zoom とは違い、PowerPoint の録画機能の特徴は、スライド毎に動画を保存する点にある。つまり途中のスライドで録画を一時停止したり、修正したりしたい場合、そのスライドだけを録画し直すことが可能になる。一連のスライドの録画が終わった後に PowerPoint のエクスポート機能で、Mpeg-4 形式の動画を出力できる。

このように作成した授業動画について、受講生からの感想を一部抜粋すると、「テンポ良く説明がありわからないところも何回も聞き直せとてもレポート

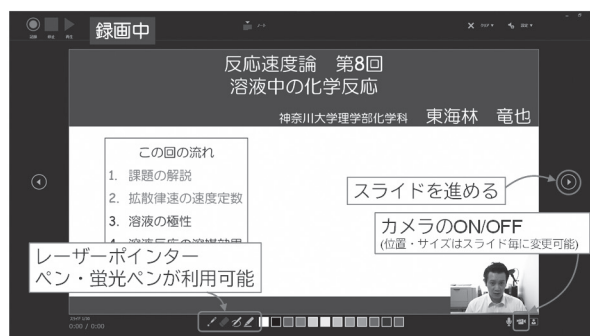


図 3. PowerPoint のスライドショー録画の画面。

も書きやすかった。」「何度も動画で確認できるため曖昧な部分が無くなりとても分かりやすかった。」など、繰り返し視聴できることが受講生にとって役立つと考えられる。

以上、実験科目のオンデマンド教材の作成と評価について述べた。緒言でも述べたが実験科目は、対面すなわち実際に受講生が手を動かし、現象をつぶさに観察し、ノートに記録、得られた結果を解釈するために文献をもとに考察してレポートを書く、という一連の過程を経験することが最も教育効果を

発揮する。そのような対面授業の補助教材としてオンデマンド教材も役立てると筆者は考えている。COVID-19の脅威が失せ、コロナ前の状況が再開したとしても、この状況下で進展したオンデマンド教材は今後も受講生の有力なサポートになるであろう。

文献

- 1) 神奈川大学、Adobe ETLA 契約について、<http://mns.kanagawa-u.ac.jp/2014/service/Adobe/1.html>.
- 2) フリー BGM DOVA-SYNDROME、<https://dova-s.jp/>.

■教育論文■

反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (10)

加部義夫^{1,2}

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdote of Discoveries (10)

Yoshio Kabe^{1,2}

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

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

Abstract: Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since the 19th century and have been widely used to influence synthetic transformation in modern organic chemistry. It is considered that many educational benefits could result from the use of reaction types and discoveries for undergraduates and graduates of organic and organometallic chemistry. Organometallic reactions were categorized into several types of metathesis reaction, depending on the combination of σ - and π -bonds, such as σ - σ bond, σ - π bond and π - π bond metathesis. This article is organized into C-H and C-C-bond activation, which consists of traditional oxidative addition mechanisms and σ - σ bond metathesis using either early- or late transition metals. The first example of late transition metal-mediated C-H activation was reported by Chatt and Davidson in 1965, in which naphthalene was found to form Ru(0) complexes and undergo C-H activation to give an Ru(II) hydride/alkyl product via an oxidative addition mechanism. On the other hand, Watson and Pharrshall at Dupont Company for the first time reported that an early transition metal catalyzed methane exchange at Cp^*_2LuMe via a four-centered σ -bond metathesis mechanism. New mechanisms such as 1,2-addition as well as an σ -complex-assisted mechanism (σ -CAM) were also described. The remaining σ - π and π - π bond metathesis such as cycloaddition, olefin metathesis, and olefin polymerization will be discussed the next time in the final article of this series.

Keywords: C-H activation σ -bond metathesis oxidative addition

はじめに

いよいよこのシリーズ¹⁻⁹⁾も今回と次回をもって最終回の予定である。前半に典型金属元素の解説から始まり¹⁻⁴⁾、関連の深い硫黄⁵⁾や酸素の化学⁷⁾についても紹介した。その後遷移金属に入り遷移金属錯体の種類に沿って各種遷移金属錯体の発見とその反応性を紹介した^{5,6)}。その上で反応を中心に解説し、とくにオキシ法、Ziegler-Natta法、Wacker法の工業的触媒反応にルーツをもつカルボニル化反応、オレフィン重合、 π 結合メタセシス反応についてすでに見てきた。有機化学をすっかり一変させてしまったパラジウム触媒 Heck 反応とクロスカップリングがすでに失われた水銀の化学に由来することを紹介した^{8,9)}。

この二つの反応はカルボニル反応を加えるとこれまでの有機合成化学では実現できなかった三つのタイプの反応を形式的に実現させていることを理解した⁹⁾。今回と最終回ではこれまでの内容を振り返りながら、遷移金属に関する全体の反応をメタセシス反応(結合を組み替え反応)として四つに分類して俯瞰する。そのうち今回は C-H 結合活性化 (σ 結合メタセシス) について解説する (図 1)。

前周期遷移金属による C-H 活性化 (σ 結合メタセシス)

炭素 - 金属 (M-C) 結合と炭素 - 水素結合 (C-H) の結

合組み換え（メタセシス）反応は一般に C-H 活性化と呼ばれる反応である¹⁰。金属 (M) が高周期金属のときは d 電子を使った酸化付加・還元脱離をともなう触媒反応になり、C-H 活性化と言うとむしろこちらを指すことが多い(図 1, 2))。一方で d 電子をもたない前周期金属でも C-H 活性化は起きる¹¹。1983 年 Dupont 社の有機金属部門の Watson と Pharshall は電子不足の 3 族金属錯体のメチル錯体がメタン、プロペン、イソブテン、テトラメチルシランの C-H を活性化することを見出し、四中心遷移状態を考えた(式 1)¹²⁻¹⁴。この例は C-H 活性化というよりはシグマ結合メタセシス反応として紹介されることが多い。この当時 Dupont 社の Pharshall はナイロン中間体の合成研究後、米国 Harvard 大から英国に帰国した Wilkinson の元で一時的有機金属化学を学んだ。その後、Dupont 社に復帰し有機金属部門を立ち上げた。この研究グループからは多くの有機金属化学者が育っている。たとえば Schrock は Wilkinson の Harvard 大の弟子 Osborn のところで学位を取得した。

Schrock は Dupont 社の有機金属部門にて研究後 MIT に転出した。そして後述する Tebbe 試薬の Tebbe も Schrock の共同研究者である。Pharshall は高周期金属による C-H 活性化を長年研究し¹⁵ 有機金属触媒の工業的応用を探索した^{16,17}。一方 Watson は女性の研究者で後節で紹介するアルカンの高周期有機金属錯体による C-H 活性化錯体の単離に初めて成功した California 大 Berkeley 校の Bergman のところでポストドクを務めた。その後 Dupont 社の研究グループに採用され、その結果得られた研究成果

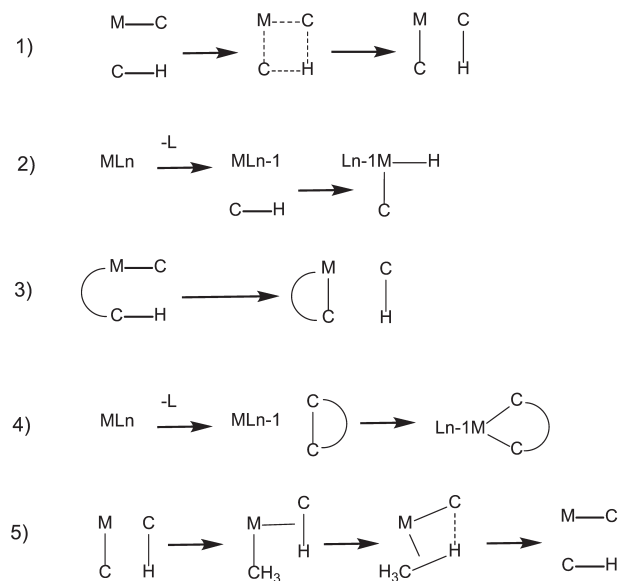
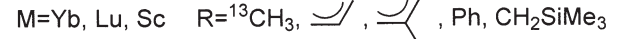
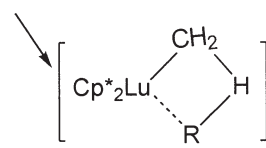
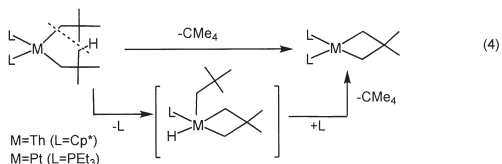
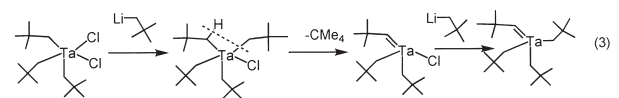
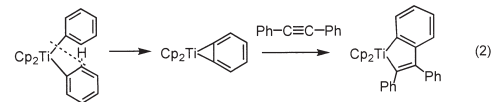


図 1. 遷移金属の σ - σ 結合メタセシス (結合組換え) 反応. 1) C-H 活性化 (前周期金属 σ ボンド結合メタセシス), 2) C-H 活性化 (後周期金属酸化付加), 3) C-H 活性化 (シクロメタル化), 4) C-C 活性化 5) σ -CAM.

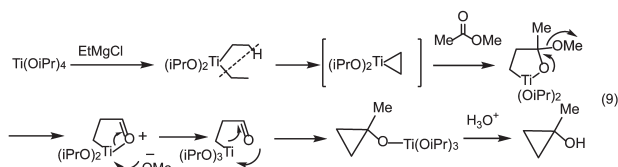
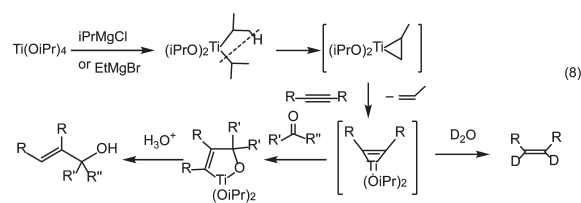
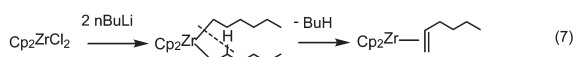
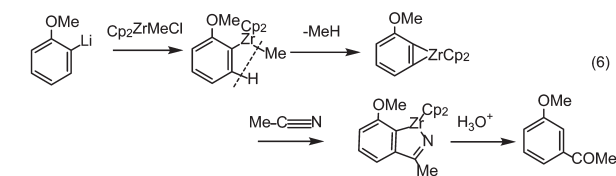
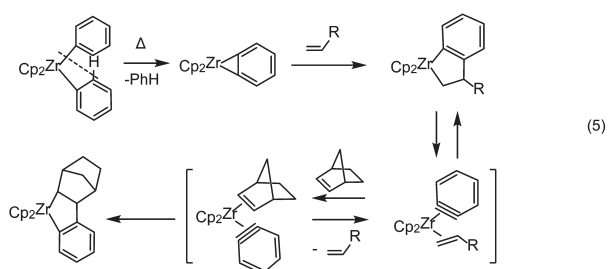


がこの 3 族金属錯体による全く新しい σ 結合メタセシス (C-H 活性化) 反応であった。彼女は 1984 年当時 35 才で科学雑誌の 40 才以下の有望な科学者 100 人の一人として Vollhardt (当時 38 才) とともに選ばれている¹⁹。

上記の反応は分子間反応であるが分子内 σ 結合メタセシス (C-H 活性化) とみなせるいくつかの前周期金属の反応が以前から知られている。一般にシクロメタル化反応と呼ばれている (図 1, 3))。分子内反応で水素が引き抜かれ炭化水素が脱離する反応である。 β -水素引き抜き反応としては古く萩原・菌頭により Cp_2TiPh_2 の熱分解をトランの存在下で行うとチタニウム錯体が得られることが報告されている (式 2)²⁰。途中でフェニル基の σ -位すなわち金属から β -位の水素引き抜きが起こり、ベンゼンが脱離して Ti ベンザイン錯体を経て生成するものと考えられる。 α -水素を引き抜かれるとカルベン種の発生が可能になる。すでに Schrock は Ta カルベンの生成とネオペンタンが生成することを見出していることを遷移金属アルキル錯体のところで紹介した (式 3)⁵。 β -水素がないと今度は γ -水素の引き抜きが起きるようになる。Marks はアクチノイドの Th 錯体は 50°C に加熱すると分子内反応を起こしてメタラシクロブタンとネオペンタンが脱離することを報告している (式 4)²¹。全く同じタイプの反応が Pt でも起こる事が Whiteside により報告されており、この場合は配位不飽和中間体での酸化付加が考えられている²²。このように C-H 活性化反応では σ

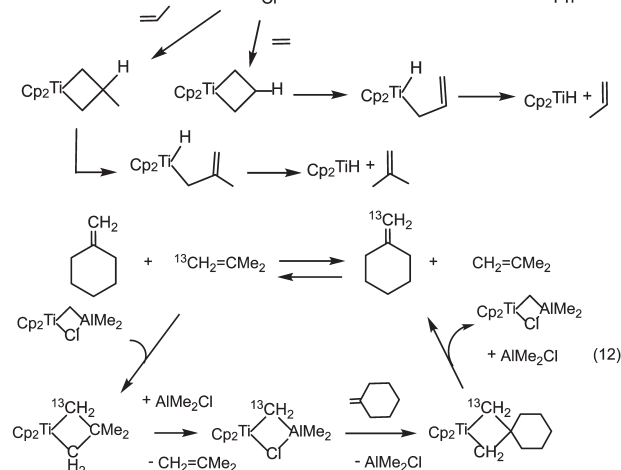
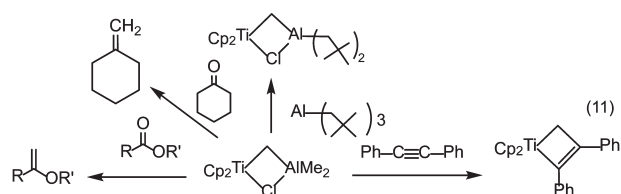
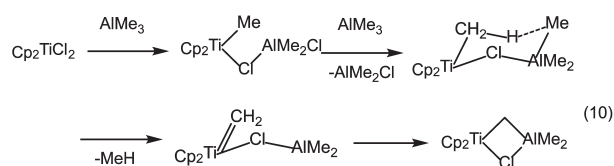


結合メタセシスまたは水素引き抜き反応なのか、さらには酸化付加反応なのか両方を考慮しなければならず、それらの区別するのは一般に難しい。ドイツの **Erker** 等は金属を同族のジルコノセン (Cp_2ZrPh_2) にかえて生成するジルコノセンベンザイン中間体にオレフィンを反応させることに成功した (式 5)²³。生成するメタラインダンは系中で生成するビスオレフィン錯体と平衡にありノルボルネンなどと置換されることが示された。MIT の **Buchwald** らは **Erker** らの仕事に刺激されて **Zr** ベンザイン錯体を PMe_3 錯体として単離することに成功し、さらに脱離する炭化水素をメタンにかえた発生活を開発し (式 6)、インドール誘導体の合成に応用している^{24, 25}。ちなみに **Buchwald** は **Harvard** 大の **Knowles** のところで学位を取得し、後述する **Grubbs** のところでポストドクをして若干 29 歳で MIT に教授として赴任している。**Buchwald** の方法はベンザインばかりではなくアルケンやアルキン錯体に適用できるが、さらに簡便な **Zr** アルケン錯体の調製法が根岸と高橋等により開発されたことはすでに紹介した (式 7)^{4, 26}。得られたメタラサイクルの **Zr** 金属と典型元素が交換する **Fagan** 反応は五員環へテロ化合物の新しい合成法になっていることも述べた。この **Fagan** も実は **Dupont** 社の有機金属化学者である。一方佐藤史衛らは、これまでに既に紹介しているアセチレンのチタン触媒ヒドロマグネシウム化反応に用いるチタノセン Cp_2TiCl_2 を安価なテトライソプロポキシチタン $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ にかえることで実用化を試みた。アセチレンに $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ と $i\text{PrMgBr}$ を加えて D_2O で加水分解すると **D** が取り込まれた *cis*-オレフィンが生成することを確認した (式 8)^{27, 28}。調査をして



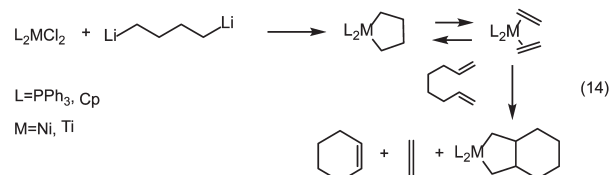
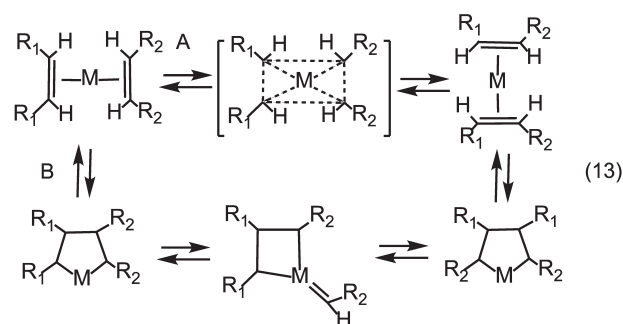
みるとロシアの **Klinkovich** がすでに $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ と EtMgBr をエステルに反応させてシクロプロパノールを与えるユニークな反応を報告していた (式 9)^{29, 30}。**Grignard** 試薬として $i\text{PrMgBr}$ を用いたことも幸いして、カルボニル化合物と反応させることで広くチタノセン 2 価種等価体として有機合成に応用できることが見出された。**Klinkovich** の論文が 1991 年に専門誌に掲載されると佐藤らの研究グループ以外に米国の **Corey** のグループ、ドイツの **de Meijere** のグループが $\text{Ti}(\text{OiPr})_4/\text{EtMgBr}$ 試薬を研究し始め、開発競争が激しくなった。

4 族チタノセンとジルコノセンの研究は **Ziegler-Natta** 触媒と関連した研究動機に端を発していることが多い。前述の **Dupont** 社の有機金属グループの **Tebbe** と **Parshall** が 1978 年にチタノセンとアルキルアルミの反応の研究したのも同じ研究動機と思われる。実際に Cp_2TiCl_2 と Et_2AlCl_2 を作用させて得られる二核錯体は可溶性のエチレン重合触媒となることから **Ziegler-Natta** 触媒の反応機構研究に用いられ、多くの成果が上げられたこともよく知られている³¹。**Dupont** 社の **Pharashall** と **Tebbe** は先行研究の **Ti** とアルキルアルミからメチレン錯体が生成するという事実に注目し、 Cp_2TiCl_2 を種々のメチルアルミニウムでメチル化を検討した。その結果メチレン架橋錯体の生成を確認した (式 10)³²。メチレン架橋錯体の生成反応は後年 **Grubbs** らにより詳細に反応機構が検討された³³。**Tebbe** の初めの報告のように途中 Me_3Al の添加が必要で中間体 $\text{Cp}_2\text{Ti}(\text{CH}_3)\text{ClAlMe}_2$ における TiCH_3 の α 水素引き抜きとメタン脱離で進行していると考えられる。メチル基の重水素同位体効果 $k\text{H}/k\text{D} = 2.9$ と大きく、反応の活性化エントロピーが -26 eu と小さいことから四員環よりむしろ六員環遷移状態の σ 結合メタセシスを提唱している (式 10)。メチレン錯体 (**Tebbe**) 試薬は各種アルケンをメチレン化する。さらにケトンとは **Wittig** 型の反応をしてケトンのメチレン化反応が生じる。さらに特異な点としてはエステルのカルボニ



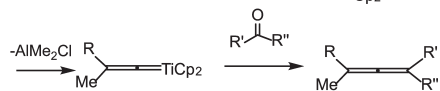
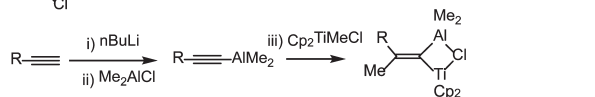
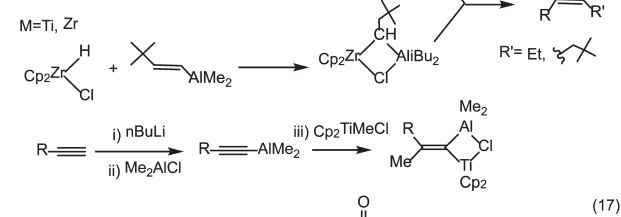
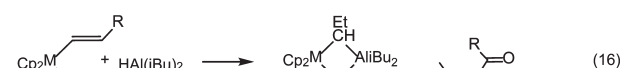
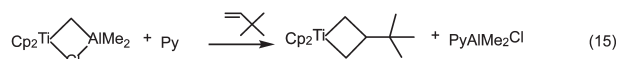
ルとも反応してエノールエーテル類を与え、これは新しいタイプの反応で有機合成に大いに役立つところである^{34, 35}。メチレン錯体はネオペンチルアルミニウムと交換し得られたメチレン錯体のX線構造解析でその構造が確認された(式11)³²。このTebbe試薬自身も結晶性であるが、長年X線結晶解析がうまく行かず、近年 $\text{Cp}_2\text{Ti}(\mu\text{-Cl})_2\text{AlMe}_2$ との共結晶として構造が決定された³⁶。このようにTebbe試薬は一種の安定化されたチタナカルベン($\text{Cp}_2\text{Ti}=\text{CH}_2$)錯体と考えられる。中間に予想されたチタシクロブタンに β -水素がないときはメタセシス反応が起きる。それは標識実験により末端メチレンの交換が起こっていることから証明された(式12)^{31, 34-35}。チタナカルベン等価体としてのチタシクロブタンについての研究は、この後Grubbsらにより発展させられるが、なぜGrubbsはこの研究に入ったのだろうか。それはオレフィンメタセシスの反応機構に興味があったからである。Grubbsは彼のノーベル賞受賞講演で述べているが³⁷、Columbia大学の著名なBreslow教授のところで学位を取得し反応機構を叩き込まれ、その後Stanford大のCollmannのところでポストドクに従事した。1960年代Phillips・Petroleum社でトリオレフィン法(WO_2/SiO_2 触媒)でプロペンをエチレンと2-ブテンにメタセシスする反応が開発された。Collmann教授がPhillips・Petroleum社の訪

問から帰国するといち早くこの情報がもたらされ、その反応機構が研究室で議論された。のちに不斉酸化でノーベル賞を受賞するSharplessもCollmannのグループのポストドクとして参加していたとのものである。以来Grubbsはオレフィンメタセシスの反応機構の解明は研究に値する理想的なテーマとして独立後研究を開始した。Phillips・Petroleum社の研究者のBanksとBailyらは協奏的な準シクロブタン機構としてオレフィン2対がペアで反応するpairwise機構(A)を提唱した(式13)。これに対してすでに紹介したChauvinら⁵⁾が金属カルベンとメタラシクロブタン中間体を経由するnon-pairwise機構を提唱した(式13)³⁸。しかしながら当時は知られている金属カルベンにはFischer型カルベンのみでアルケンとの反応はシクロプロパンのみを与えた。CaseyとKatzが $(\text{CO})_5\text{W}=\text{CPh}_2$ カルベンがイソブテンなどとメタセシス反応する数例を報告しているのみであった³⁸。Grubbsは宮下晃とNiメタラサイクルの研究から³⁹ジオレフィン錯体とメタラシクロペンタンを経由するもう一つのpairwise機構(B)を提唱した(式13)⁴⁰。Grubbsらはメタラシクロペンタンがジオレフィンに異性化し、1,7-オクタジエン共存下ではオレフィンメタセシスでシクロヘキササンとビスクロ錯体が生成することを見出した(式14)。シクロヘキササンはさらなるオレフィンメタセシスは起きず、反応を複雑化させないオレフィンである。1,7-オクタジエンの重水素化同位体のオレフィンメタセシスで生成する d_4 , d_2 , d_0 エチレンを分析す



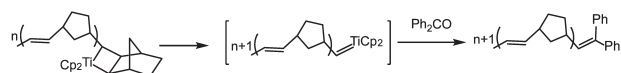
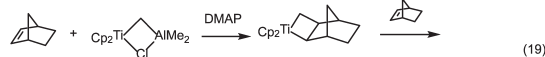
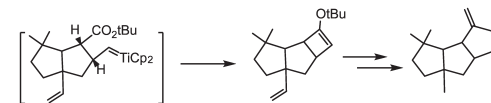
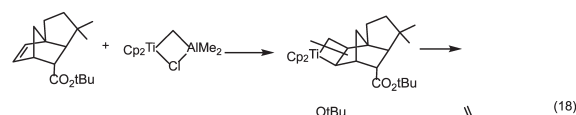
| | Product Ratio | |
|----------------------------------|------------------------|----------|
| | Non pairwise (Chauvin) | Pairwise |
| $\text{D}_2\text{C}=\text{CD}_2$ | d_4 | 1 |
| $\text{H}_2\text{C}=\text{CD}_2$ | d_2 | 0-1.6 |
| $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ | d_0 | 1 |

ることで、pairwise 機構か non-pairwise 機構を区別することを試みた。各種メタセシス触媒で必ず d_2 オレフィンが統計的割合 ($d_4:d_2:d_0=1:2:1$) で生成することから pairwise 機構は否定された。宮下の後に Grubb 研に留学した碓屋らが Grubbs のノーベル賞受賞を祝う記事で紹介しているが⁴¹⁾、そのとき Ni メタラサイクルを研究していたが、ある出来事をきっかけで、チタナサイクルの研究もしていたので、一気に Ni メタラサイクルからチタナシクロブタンの化学に研究を切り替えることになった⁴¹⁾。学生の Harrod がネオペンタンと Tebbe 試薬を反応させると intaractable(手に負えない)生成物しか得られないと論文には書いてある⁴²⁾。たぶん彼が間違っ

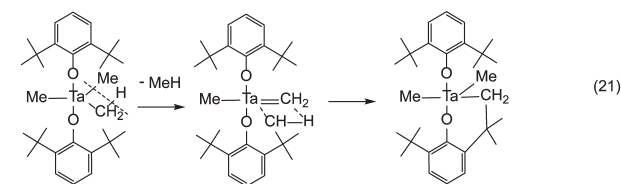
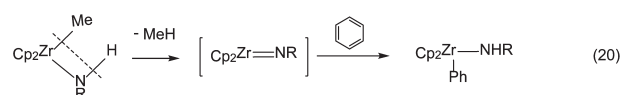


生しケトンとの Wittig 型の反応でアレンの合成を報告している。この場合ジルコノセン触媒はカーボアルミ化反応ではうまく行かない⁴⁵⁾。Grubbs は Ti カルベン等価体である各種チタナシクロブタン類を巧妙に使い分けながら複雑な天然物の合成や環状オレフィンの開環重合 (ROP) を実現させた (式 18, 式 19)^{43, 46)}。

前周期金属による C-H 活性化 (σ 結合メタセシス)

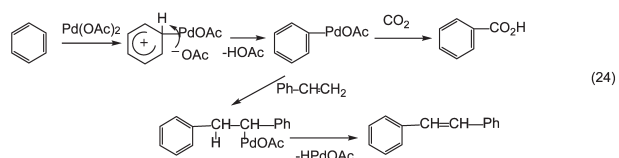
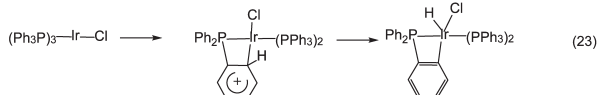
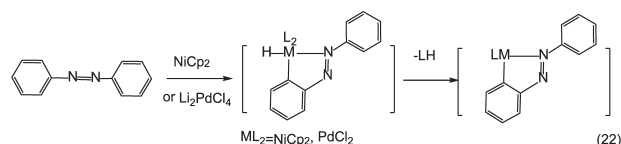


47) の節でさらに該当する反応をいくつか紹介する。Bergmann らは Zr とヘテロ原子二重結合化合物を脱メタン反応で合成している。生成した不飽和化合物にベンゼンの C-H が 1, 2 付加することが見出されている (式 20)⁴⁸⁾。さらに Rothwell らはアリアルオキシ基置換の Ta カルベン錯体が脱メタン反応で生成すると同時に分子内の C-H 活性化により 1, 2 付加することを報告している (式 21)⁴⁹⁾。後者の反応は典型的なシクロメタレーション (図 1, 3)⁵⁰⁾ の反応で tBu の重水素同位体の効果が -5.2 と大きく活性化エネルギーも負の値を示すことから、四中心遷移状態を経由する σ -結合メタ反応と考えられている⁵⁰⁾。



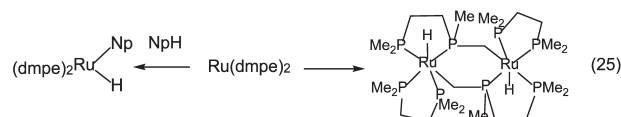
高周期金属により C-H と C-C 活性化

後周期金属により酸化付加を伴う C-H 活性化 (図 1, 2) もシクロメタレーション (図 1, 3) またはオルトメタル反応のタイプから見つかった。1963 年 Ethyl Corporation 社の Kleinman はニッケロセンとアゾベンゼンを反応させることにより五員環メタラサイクルを単離した (式 22)⁵¹⁾。反応はニッケルがアゾ基に配位した後にベンゼン環のオルト C-H に酸化付加し、シクロペンタジエンが還元脱離して進行する。トリフェニルホスフィン配位子もオルトメタル化反応し芳香環の置換基が $\text{CH}_3 > \text{OCH}_3 > \text{H} \gg \text{F}$ の順に反応が遅くなることから Ir 金属が求電子的に置換反応していると考えられる (式 23)⁵²⁾。これらの発見以

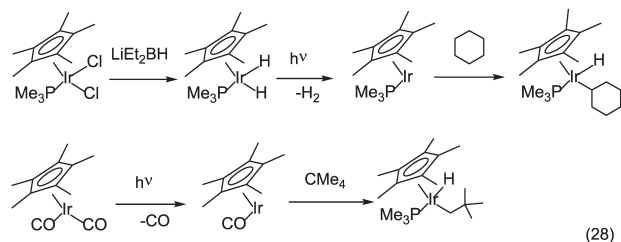
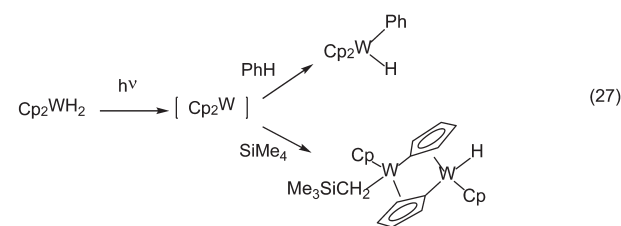
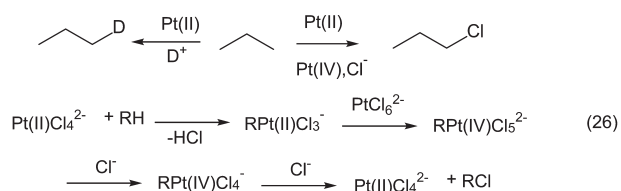


来多くの研究者が同様の報告をした⁵³⁻⁵⁶⁾。パラジウム触媒の反応としては、以前ベンゼンがアルケニル C-H に置換する藤原反応を解説したが⁶⁾、Pd 金属がベンゼン環を分子内で求電子置換反応する点では共通している。これも形式的には高周期金属の分子内 C-H 活性化を経由して反応する。

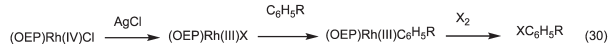
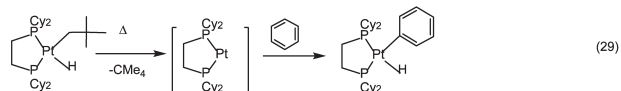
分子間の直接 Sp^3 C-H 活性化反応とアルキル配位の Sp^3 C-H 結合の活性化は同時に偶然に発見された⁵⁷⁾。当時 $Ni(CO)_4$ の Ni-C 結合距離が短く Ni=C 二重結合の寄与が推測されていた。英国 ICI 社の Chatt と Davidson は Dewar が Ag^+ のエチレン錯体に多重結合を提唱していることから Pt のジオレフィン錯体 $PtCODCl_2$ にも同じモデルを適用した。さらに $Ni(PF_3)_4$ も Ni-P 結合長が短いことから金属から逆供与を考えるに至った (Dewar-Chatt-Duncanson モデル)⁵⁸⁾。この考えをもとに新しいホスフィン配位子としてジメチルホスフィノエタン $dmpe$ を合成し、各種金属のハロゲン化物と反応させて得られた錯体をナトリウムナフタレン $NaNpH$ で還元し 0 価の錯体 $M(dmpe)_3$, $M = V, Cr, Mo, W$ と $M(dmpe)_2$, $M = Fe, Co$ を調製した。1962 年に Ru 金属の $Ru(dmpe)_2$ を報告したが、IR で RuH の吸収が $1802cm^{-1}$ に確認され、NMR 測定も可能になり、NMR でも RuH の吸収を確認した。それによると還元剤の NpH が Ru 金属に酸化付加したと考えられた (式 25)。しかしさらに付加体を熱分解すると IR で $1791cm^{-1}$ にある RuH が確認され、X 線構造解析により二量体であることが判明した (式 25)。これはシクロメタル化による Sp^3 C-H 活性化の初めての例である。 $dmpe$ 配位子は金属に対する逆供与の強度が小さいため 0 価は大変反応性が高くなり、不活性な C-H 結合に酸化



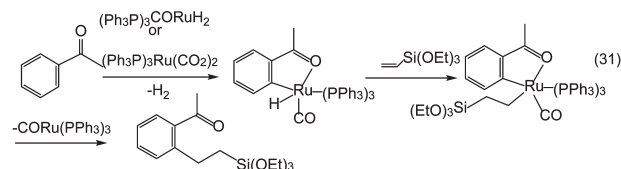
付加が起きたものと思われる。その後 1980 年代に入り分子間の Sp^3 C-H の活性化が飛躍的に進歩するが、70 年代にもロシアの Shilov⁵⁹⁾ らと英国の Green^{60, 61)} によって先駆的な研究がなされた。Shilov は芳香族炭化水素が Pt(II) 触媒 H/D 交換することからアルカンについても検討したところ H/D 交換が進行し、その反応の選択性は一級 C-H > 二級 C-H と通常の求電子的反応やラジカル反応と逆であることから遷移金属触媒による C-H 活性化反応の特徴であると考えた (式 26)。反応はプロトン脱離が駆動力になっている C-H 活性化である。続いて Green はタングステノセンジヒドロ錯体を分解し、配位不飽和タングステノセンを発生させるとベンゼンや Me_4Si のメチル基の C-H にタングステノセンが挿入した生成物を確認している (式 27)^{60, 61)}。この水素化物の光分解の方法論が 1982 年 Bergman, Graham, Jones により Ir と Rh 金属配位不飽和錯体の発生に使われ、単純なアルカンの Sp^3 C-H 結合活性化が独立に実現された (式 28)⁶²⁻⁶⁵⁾。この他 Cp 配位子以外の金属錯体による C-H 活性化としては Whiteside がビスホスフィン Pt 錯体を炭化水素中で熱分解するとネオペンタン脱離により配位不飽和種が系中に中間体として発生、炭化水素の C-H 活性化が起きる事を報告している (式 29)⁶⁶⁾。青山と生越らはさらにオクタエチルポルフィリン (OEP) の Rh(III) の ClO_4 塩がベンゼンおよび置換ベンゼンと温和な条件で反応しアリアル



Rh(III) 誘導体を与えることを確認した (式 30)⁶⁷⁾。このアリール Rh(III) 誘導体はハロゲンにより容易に C-Rh 結合が開裂してパラ置換ハロベンゼンをほぼ定量的に与える。



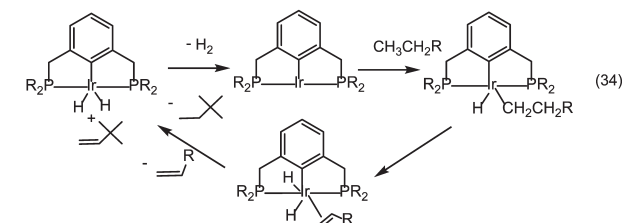
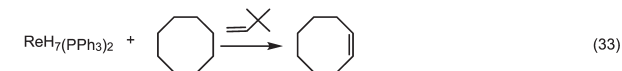
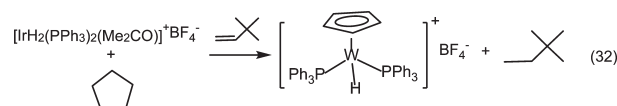
以上見てきた遷移金属により C-H 活性化は化学量論的反応に関するものであり、合成に応用するには還元的脱離をともなって金属錯体が触媒的に作用する必要がある。1993 年村井と垣内は Ru 金属錯体触媒を用いる芳香族 C-H 結合の C=C 結合への付加反応の開発に成功した (式 31)⁶⁸⁻⁷¹⁾。この反応はアセフェノンなどのカルボニル基に Ru の配位より芳



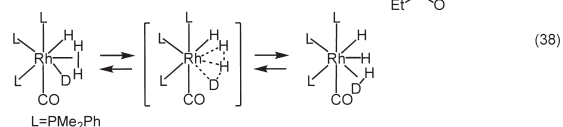
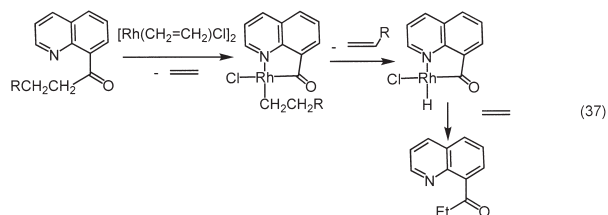
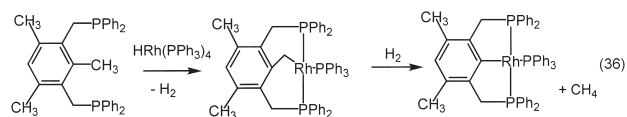
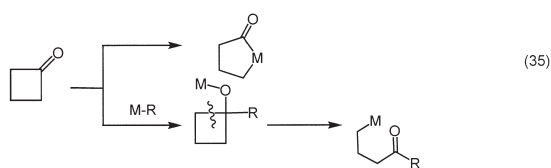
香環のオルト位の C-H 結合の選択的活性化が起こり RuH 結合を有するメタラサイクル中間体を生ずる。この中間体からビニルシランにヒドロメタル化し、続いて Ru 金属が還元的脱離することで触媒活性種が再生し触媒サイクルが完結している。この村井と垣内の報告が Nature 誌に発表されると触媒的 C-H 活性化反応が一躍注目された。その結果 C-H 活性化反応が選択的に官能基を導入する触媒反応として有機合成に広く応用された。詳しくは専門書を参照されたい^{72, 73)}。それにしても C-H 活性化の研究には多くの日本人研究者が草創期から寄与している^{56, 72)}。たとえば 1995 年村橋はシッフ塩基やアゾベンゼンを Co(CO)₄ 触媒、CO 加圧下で反応すると、ベンゼン環の o-位 C-H 活性化でカルボニル化され複素環化合物の生成を報告している。すでに述べた藤原反応によるベンゼン環の脱水素アルケニル化は 1969 年の報告であるが、酸化的カルボキシ化にも適用された。1978 年山崎・萩原はケテンへのヒドロアリール化を報告し、1987 年田中正人らは Vaska 錯体触媒を光励起することで脂肪族および芳香族化合物の両方に C-H 活性化し、カルボニル化合物の合成を報告している。

一方、C-H 活性化による触媒反応として他に例を見ない反応がアルカンの脱水素によるアルケンの合成反応である。その開発者で米国 Yale 大の Crabtree がその研究の経緯を総説として残してくれている⁵⁷⁾。彼は Oxford 大の Green の学生として Cp₂W の化学に

触れ、ICI 社から Sussex 大の窒素固定会部門の責任者に転出した Chatt のところで大学院の研究を行った。dmpe 配位子で最初の C-H 活性化を行った Chatt いわく「窒素固定が解決したら、その次は C-H 活性化だ」との言葉に Crabtree は C-H 活性化を独立する時のテーマに決めた。折からモスクワの Shilov が Pt(II) のアルカン C-H 活性化を見出していた (式 26)。ポストドクとしてフランスの Felkin のところで水素化触媒の研究を Rh より空气中で安定な Ir 触媒を用いて研究し水素化反応の逆の脱水素の考え方のヒントを得た。渡米し Yale 大に助手として採用され、最初の女子学生が Ir 触媒によるシクロペンタンの脱水素反応を見つけてくれた (式 32)。水素受容体としてネオペンテン存在下反応を行うと錯体が高収率で生成することを見出し、1979 年に報告できた。この金属配位が弱く脱水素の邪魔にならない水素受容体の発見は彼女の成果であると評価した。この水素受容体はその後 Felkin らにより Re 錯体でも、さらに Goldman らのピンサー Ir 錯体でも初期に使用された (式 33、式 34)⁵⁷⁾。



ところで、これら C-H 活性化の方法論が応用されて C-C 結合活性化も可能になっている^{74, 75)}。安定な C-C 結合 (90kcal/mol) を切断して不安定な M-C 結合 (20-30kcal/mol) を生成するには以前から高エネルギーを持つ歪み化合物を利用されてきた (図 1, 4))。村上らはシクロブタノン類への遷移金属による C-C 結合活性化を研究しカルボニル基の α 結合開裂や β 炭素脱離を報告している (式 35)^{74, 76, 77)}。C-H 結合活性化のように生成する M-C 結合をピンサー型メタラサイクルや配位補助基で安定化させることで C-C 結合の活性化が Milstein⁷⁸⁾ や Jun⁷⁵⁾ により実現されている (式 36、式 37)。今まで後周期金属の C-H や C-C 活性化は酸化付加反応で考えてきたが酸化付加を経由しなくても起きる可能性が出てきた。それはあの Green が Brookhardt とともに 1983 年に分子内



の C-H 結合の水素が金属と至近距離にある相互作用いわゆる Agostic (hold to oneself の意味) 水素を提案したことに始まる⁶¹⁾。その後 Si-H や B-H 結合についても Agostic 水素なものが見つかり、ついには H₂ 分子錯体やシクロペンタン錯体などが報告されるに及んで一般に σ 結合錯体として理解されるようになった⁷⁹⁾。そうした中、ヒドリド錯体により脱水素反応を研究していた Crabtree は Re(CO)(PMePh)₃ の H₃ 錯体が fluxional なプロトン交換をすることを重水素同位体の実験から見出した (式 38)⁷⁹⁾。この反応の発見は高周期の金属でも必ずしも酸化付加で還元脱離しなくても σ 結合を組み替える C-H 活性化の 3 番目の反応機構を見出したことにつながる。Perutz は Crabtree の結果に基づいて Si-H, B-H などの高周期金属による活性化は σ -complex-assisted メタセシス (σ -CAM) として呼ぶことを提案している (図 1, 5)⁸⁰⁾。

おわりに

今回は遷移金属の反応を四つのメタセシスに分類し、そのうちのまだ見ていない σ 結合メタセシス反応、すなわち C-H 結合活性化反応について解説した。 σ 結合錯体の登場で後周期金属でも単純に酸化付加とは限らなくなっている。次回最終回はすでに解説してきたメタセシス反応のうち σ - π 結合メタセシスとして、環化付加反応とオレフィン重合を解説し、 π - π 結合メタセシスとしてアルケンメタセシス反応のその後の展開を解説し、このシリーズを完結する予定である。

文献

- 1) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (1). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 261-265.
- 2) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (3). *Sci. J. Kanagawa Univ.*, **28**(2): 267-270.
- 3) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (3). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**(2): 271-275.
- 4) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (4). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 107-111.
- 5) 加部義夫 (2017) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (5). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 113-119.
- 6) 加部義夫 (2019) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (6). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **30**: 111-118.
- 7) 加部義夫 (2020) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (7). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **31**: 93-102.
- 8) 加部義夫 (2021) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (8). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **32**: 87-96.
- 9) 加部義夫 (2021) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (9). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **32**: 97-105.
- 10) Lin Z (2007) Current understanding of σ -bond metathesis reactions of LnMR + R'-H \rightarrow LnMR' + R-H. *Coordination Chem. Rev.* **251**: 228-229.
- 11) Waterman R (2013) σ -bond methathesis: A 30 year retrospective. *Organometallics* **32**: 7249-7263.
- 12) Watson PL and Parshall GW (1985) Organolanthanides in Catalysis. *Acc. Chem. Res.* **18**: 51-56.
- 13) Watson PL (1983) Methane exchange reactions of lanthanide and early-transition-metal methyl complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 6493-6495.
- 14) 藤原祐三 (1986) ランタナイド触媒. 化学増刊 109 触媒化学の進歩 大塚・中村・山崎編 東京化学同人, 東京. pp.35-49.
- 15) Parshall GW (1975) Homogeneous catalyst activation of C-H bonds. *Acc. Chem. Res.* **4**: 113-117.
- 16) Parshall GW (1986) Organometallic chemistry and catalysis in industry. *J. Chem. Educ.* **63**: 189-191.
- 17) Tolman CA and Parshall GW (1999) Fifty-year trends in chemical industry: What do they mean for chemical education? *J. Chem. Educ.* **76**: 178-189.
- 18) Moore O (1984) America's top 100 young scientists. *science digest* **92**: 36-71.
- 19) Mindiola DJ (2020) Pioneer and influencers in organometallic chemistry: Dr Patricia Watson and molecular dance of M-C and C-H bonds. *Organometallics* **39**: 1135-1138.
- 20) Masaki H, Sonogashira K and Hagihara N (1968) Some reactions of Di- π -cyclopentadienyl diphenyl titanium. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**: 750-751.
- 21) Brano JW, Smith GM, Marks TJ, Fair CK, Schultz AJ and Williams JM (1986) C-H activation mechanisms and regioselectivity in cyclometalation reaction of bispentamethylcyclopentadienyl thorium dialkyl complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 40-56.

- 22) Whitesides GM (1981) The mechanisms of thermal decomposition of diaryl bis(triethylphosphine)-platinum complexes. *Pure & Appl. Chem.* **53**: 287-292.
- 23) Erker G and Kropp K (1979) Equilibrium between metallainanes and aryl olefin-metal complex. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 3659-3660.
- 24) Buchwalds SL and Nielsen RB (1988) Group 8 metal complexes of benzyne, cycloalkynes, acyclic alkynes. *Chem. Rev.* **88**: 1047-1058.
- 25) Bronene RD and Buchwald SL (1993) Zirconocene complexes of unsaturated organic molecules. new vehicles for organic synthesis. *Science* **261**: 1696-1701.
- 26) Negishi E and Takahashi T (1994) Patterns of stoichiometric and catalytic reactions of organozirconium and related complexes of synthetic interst. *Acc. Chem. Res.* **27**: 124-130.
- 27) 佐藤史衛 (2002) 有機チタン化合物を用いる実践的合成反応の開発. *有機合成化学協会誌* **60**: 891-896.
- 28) 佐藤史衛, 占部弘和, 岡本専太郎 (1998) 二価チタン錯体を用いる合成反応 *有機合成化学協会誌* **56**: 424-432.
- 29) Kulinkovich OG (2003) The chemistry of cyclopropanols. *Chem. Rev.* **103**: 2597-2632.
- 30) Kulinkovich OG and de Meijere A (2000) 1,n dicarbanionic titanium intermediates from monocarbanionic organometallics and their application in organic synthesis. *Chem. Rev.* **100**: 2789-2834.
- 31) 佐藤史衛 (1982) チタノセン誘導体を用いる合成反応 *有機合成化学協会誌* **40**: 744-751.
- 32) Klabunde U, Tebbe F, Parshall GW and Harlow GW (1980) Methylene exchange reactions catalyzed by alkylidene derivatives of titanium and phosphorous. *J. Molecular Cat.* **8**: 37-51.
- 33) Ott KC, de Boer JM and Grubbs RH (1984) An investigation of the reaction of biscyclopentadieny titanium dichlorides with trimethyl aluminum. mechanism of α -hydrogen abstraction. *Organometallics* **3**: 223-230.
- 34) 辻 二郎 (1981) チタノセン誘導体を用いる有機合成. *化学* **36**: 153-156.
- 35) 淵上高正 (1983) Tebbe 試薬と IV 族金属カルベン錯体. *化学と工業* **36**: 580-581.
- 36) Thomson R, Nakamura-Ogiso E, Chen C.-H., Pink M and Mindiola DJ (2014) Structural elucidation of the illustrious tebbe reagent. *Organometallics* **33**: 429-432.
- 37) Grubbs H (2006) Olefin-metathesis catalysts for preparation of molecules and materias (nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 3760-3765.
- 38) Astruc D (2005) The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. *New J. Chem.* **29**: 42-56.
- 39) Grubbs RH and Miyashita A (1979) Reactions and metallacycles of nickel, metallacyclopentane, hexanes. in *fundamental research in homogeneous catalysis eds by Tsusui M, Plenum Press, New York*, pp.151-163.
- 40) Grubbs RH, Bark PL and Carr DD (1975) Consideration of olefin metathesis reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 3265-3267.
- 41) 碓屋隆雄 (2006) Grubbs 教授の業績と人柄. *化学* **61**:15.
- 42) Howard TR, Lee JB and Grubbs RH (1980) Titanium metallacarbene - metallacyclobutane reactions: stepwise metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 6876-6878.
- 43) Grubbs RH and Tumas W (1989) Polymer synthesis and organotransition metal chemistry. *Science* **243**: 907-915.
- 44) Hartner FM, Clift SM, Schwartz J and Tulip TH (1987) Synthesis and characterization of alkylidene-bridged zirconium-aluminium complexes. *Organometallics* **6**: 1346-1350.
- 45) Yoshida T, and Negishi E. (1981) 1,1-Dimetalla alkenes containing aluminum as well as tainanium or zirconium. Their structures and use as novel alkylidene and alkynyl transfer reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 1276-1277.
- 46) Stille JR and Grubbs RM (1986) Synthesis of (\pm) - Δ (9,10)-Capnellene Using Titanium Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 855-856.
- 47) Huang W and Diaconey P (2015) C-H bond activation of hydrocarbons mediated by rare -earth metals and actinoids: beyond σ -bond metathesis and 1,2-addition. *Adv. in Organomet. Chem.* **64**: 41-75.
- 48) Walsh PJ Hollander FJ and Bergman RG (1988) Generation, alkyne cycloaddition. arene C-H activation N-H activation and dative ligand trapping reactions of first monomeric imidozirconocene ($Cp_2Zr=NR$) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 8279-8731.
- 49) Rothwell IP (1988) Cyclometalation in chemistry of aryl oxide ligation. *Acc. Chem. Res.* **21**: 153-159.
- 50) Albrecht M (2010) Cyclometalation using d-block metals: fundamental aspects and recent trends. *Chem. Rev.* **110**: 576-623.
- 51) Kleiman JP and Dubeck M (1963) The preparation of cyclopentadienyl[o-(phenylazo) penyl]nickel. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 1544-1545.
- 52) Parshall GW (1970) Intramolecular aromatic substitution in transition metal complexes. *Acc. Chem. Res.* **3**: 139-144.
- 53) Cope AC and Friedrich EC (1968) Electrophilic aromatic substitution reactions by platinum (II) and palladium(II) chlorides on N,N-dimethylbenzylamines. *J. Am. Chem. Soc.* **90**: 909-913.
- 54) Ryabov AD (1990) Mechanisms of intramolecular activation of C-H bonds in transition-metal complexes. *Chem. Rev.* **90**: 403-424.
- 55) 藤原祐三 (1988) C-H 結合 activation. *化学* **43**: 461-466.
- 56) 垣内史敏 (2011) 新展開を見せる C-H 活性化研究 - 勃興と転機そして C-functionalization - *化学* **66**: 24-29.
- 57) Crabtree RH (2004) Organometallic alkane CH activation. *J. Organomet. Chem.* **689**: 4083-4091.
- 58) Wentrup C (2020) Zeise, Liebig, Jensen, Hükel, Dewar and the olefin π -complex bonds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**: 8332-8342.
- 59) Crabtree RH (2015) A. E. Shilov's influence on early work in organometallic CH activation and functionalization. *J. Organomet. Chem.* **793**: 41-46.
- 60) Green MLH (1978) Studies on synthesis, mechanism

- and reactivity of some organo-molybdenum and tungsten compounds. *Pure & Appl. Chem.* **50**: 27-35.
- 61) 伊藤健児 (1985) グリーン 遷移金属による C-H 結合活性化. *化学増刊106 オルガノメタリック* 野崎, 山本, 辻, 野依 1985, 化学同人, 東京, pp.87-94.
- 62) Haggin J (1983) Alkane C-H bond activation: new hope for catalysis research. *C&EN New February* **14**: 9-12.
- 63) Bergman RG (1984) Activation of alkanes with organotransition metal complexes. *Science* **223**: 902-908.
- 64) Jones WD and Feher FJ (1989) Comparative reactivities of hydrocarbon C-H bonds with a transition-metal complex. *Acc. Chem. Res.* **22**: 91-100
- 65) Peruz RN (1991) Activating alkanes the light way. *Chem. & Ind. July* **1**: 462-466.
- 66) 山田順一 (1989) 可溶性白金錯体を用いた C-H 結合の活性化. *化学と工業* **42**: 489-491.
- 67) 青山安宏、生越久晴 (1983) 遷移金属による C-H 結合の活性化. *化学* **38**: 736-737.
- 68) Murai S, Kakiuchi F, Sekine S, Tanaka Y, Kamatani A, Sonoda M and Chatani N (1993) Efficient catalytic addition of aromatic carbon-hydrogen bonds to olefins. *Nature* **366**: 529-531.
- 69) Borman S (1993) Organometallic synthesis. aromatic added to alkenes in one step. *C&EN New December* **13**: 6-7.
- 70) 村井真二, 垣内史敏 (1995) C-H 結合を直接利用する合成反応. *化学と工業* **48**: 178-180.
- 71) Kakiuchi F and Murai S (2002) Catalytic C-H/Olefin coupling. *Acc. Chem. Res.* **35**: 826-834.
- 72) 茶谷直人, 垣内史敏 (2011) C-H 活性化研究の流れ, 研究の歴史. *CSJ Current Review 05 不活性結合・不活性分子の活性化* 日本化学会編 化学同人 pp10-19.
- 73) Hartwig JF [小宮山三四郎, 亀田宗隆, 岩澤伸治訳] (2015) ハートウィグ 有機遷移金属化学 (上) (下) 東京化学同人, 東京. 18 章 C-H 結合の触媒的官能基化反応 pp765-810.
- 74) 村上正浩, 松田学則 (2011) 炭素-炭素結合の活性化. *CSJ Current Review 05 不活性結合・不活性分子の活性化* 日本化学会編 化学同人 pp96-106.
- 75) Jun C.-H. (2004) Transition metal-catalyzed carbon-carbon activation. *Chem. Soc. Rev.* **33**: 610-618.
- 76) Murakami M, Emii H and Ito Y (1994) Selective activation of carbon-carbon bonds next to a carbonyl group. *Nature* **370**: 540-541.
- 77) Murakami M and Ishida N (2021) Cleavage of carbon-carbon σ -bonds of four-membered rings. *Chem. Rev.* **121**: 264-299.
- 78) Dagan R (1993) Unactivated C-C bond selectively cleaved. *C&EN News August* **23**: 5-6.
- 79) Crabtree RH (1993) Transition metal complexation of σ bonds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **32**: 789-805.
- 80) Peruz RN and Sabo-Etienne S. (2007) The σ -CAM mechanism: σ complexes as the basis of σ bond metathesis at late-transition-metal centers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**: 2578-2592.

2021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 酒井政美
 数理・物理学科 教授 水野智久
 情報科学科 教授 桑原恒夫
 情報科学科 教授 張 善俊
 化学科 教授 辻 勇人
 化学科 教授 西本右子
 生物科学科 教授 泉 進
 生物科学科 教授 小谷 享

(2) 編集委員

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

(3) 産官学委員

委員 長： 数理・物理学科 教授 水野智久
 運営委員： 数理・物理学科 准教授 松澤 寛
 情報科学科 教授 桑原恒夫
 情報科学科 教授 張 善俊
 化学科 教授 辻 勇人
 化学科 教授 堀 久男
 生物科学科 教授 岩元明敏
 生物科学科 教授 大平 剛

(4) 顧問・特別所員・客員教授・客員研究員

顧 問： 門屋 卓
 特別所員： 紀 一誠、 鈴木季直
 野宮健司、 羽鳥尹承
 丸田恵美子、 日野晶也
 客員教授 菅原 正、 本間正明
 客員研究員： 秋永 薫、 安部 淳

井上 哲、 内田英伸
 大石不二夫、 川上義輝
 菊地原愛、 岸 康人
 忽那周三、 河野 優
 齋藤礼弥、 関 裕平
 櫻井英博、 佐藤 剛
 篠原直貴、 柴田真太郎
 高橋広奈、 滝ヶ平智博
 田中輝彦、 田仲二郎
 辻本和雄、 堤 一統
 豊泉和枝、 豊田賢治
 永島賢治、 永島咲子
 西井かなえ、 付 哲斌
 藤原葉子、 村下 達
 山崎淳也、 八柳祐一
 横山隆亮、 吉田 剛

2 産官学 活動実績

(1) 「イノベーション・ジャパン 2021 ～大学見本市 Online」

日 時：2021年8月23日(月)～9月17日(金)

会 場：オンライン開催

発表者：神奈川大学理学部化学科

堀 久男 教授

テーマ：「低温の亜臨界水を用いた機能性フッ素材料の分解・再資源化」

主 催：国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST)

(2) 「神大テクノフェスタ 2021」

日 時：2021年11月19日(金)

会 場：オンライン開催

発表者：神奈川大学理学部化学科

木原伸浩 教授

テーマ：「使用中は安定な高速分解性ポリマー」

発表者：神奈川大学理学部化学科

川本達也 教授

テーマ：「太陽光を用いた水素製造システムの開発」

主 催：神奈川大学工学部・大学院工学研究科・工学研究所

(3)「2021年度 新技術説明会」

日 時：2021年12月7日(火)

会 場：オンライン開催

発表者：神奈川大学理学部化学科

木原伸浩 教授

テーマ：「不要になったら直ちに分解できる、難分解性で高耐熱性のポリマー材料」

発表者：神奈川大学理学部化学科

川本達也 教授

テーマ：「光エネルギーを利用した新規水素製造システム」

主 催：国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST)、神奈川大学

(4)特 許

(日本出願)

1)「感光性表面処理剤、積層体、トランジスタ、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

2)「乳化組成物、化合粒および化合物の製造方法」

山口和夫、田嶋和夫、今井洋子、宮坂佳那

3)「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

4)「光ファイバ部材、光ファイバプローブ、接着加工部材の製造方法、筒状物の製造方法、及び、治具」

村下 達、中田穰治、星野 靖、関 裕平

5)「繊維強化プラスチック、及びそれに含まれる繊維を回収する方法」

木原伸浩

Science Journal of Kanagawa University

投稿規定

1 編集方針

Science Journal of Kanagawa University は、神奈川県総合理学研究所の事業および研究の成果を公表する科学誌であり、事業報告、公募研究の成果報告論文、数学、物理学、情報科学、化学、生物学その他理学全般にわたる所員による一般研究論文、所員が所外の研究者と行なった共同研究に関する論文等を掲載する。投稿者は原則として神奈川県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、和名は神奈川県理学誌である。

2 掲載論文の種類

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

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

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

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

(1) 頁数

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

(2) 原稿用紙サイズ

A4版の用紙を用いる。本文および図表の占める範囲 (紙面) は縦横 245 × 170 mm とす

る。この場合、余白は、上辺 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

(3) 段組み

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

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

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

(4) 使用文字 (フォントの種類)

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

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

(5) 論文構成

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

(6) 論文種の表示

第1頁、第1行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

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

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、MSゴシックで11P (ポイント) とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

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

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

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

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

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

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

次のAbstractまでは1行あける。

(8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切である。

見出し（Abstract :）からは1文字あけて要旨本文を書く。

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

(9) Keywords

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

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

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

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

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で12P、本文は10Pとする。

各項目の第1段落の出だしは左寄せではじ

め、第2段落から出だしを1文字（英文では2文字）あける。

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で10.5Pとする。

小見出しの文章の出だしは左寄せとする。

(11) 文献

文献の項目見出しは左揃えとする。

文献は本文に引用した順に番号を付し、記載する。

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

文字サイズは、項目の見出しは太字で12P、各文献は9Pとする。

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

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

- 1) Fawcett DW and Revel J-P (1961) The sarcoplasmic reticulum of a fast-acting fish muscle. *J. Cell Biol.* **10** Suppl: 89-109.
- 2) Suzuki S, Hamamoto C and Shibayama R (2005) X-ray microanalysis studies on the calcium localization along the inner surface of plasma membranes in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus 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 [西谷和彦, 島崎研一郎 監訳] (2003) *テイツダイガー植物生理学 第3版*. 培風館, 東京.
- 7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料

の元素分析法. *微生物* **5**: 34-44.

- 8) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版, 東京.
- 9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. よくわかる電子顕微鏡技術. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
- 10) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川大学総合理学研究所年報* 2003. pp.41-80.

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

(12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

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

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

なお、本文への挿入の他に各表の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。
図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

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

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

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

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

なお、本文への挿入の他に各図の抜粋も作成

し、電子媒体として原稿に添付する。これらの図は、あまり圧縮せず、電子密度 300dpi 程度 の原図とする。

(14) 単位

SI unit を用いる。和文であっても、原則的に、数値および単位には半角文字を用い、%および°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、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、著作権のうち、複製権および公衆送信権については神奈川大学図書館に許諾を与えるものとする。論文内に使用した他者の著作物（図版や写真など）の転載許可は著者の責任において投稿前に行う。

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

Author Index

A

Akinaga, Kaoru 秋永 薫 57, 67
 Aoki, Takashi 青木 孝 5, 15
 Asai, Taichi 浅井泰地 103
 Azumi, Yoshitaka 安積良隆 57, 67

F

Fujii, Sho 藤井 翔 47
 Fujiwara, Ken 藤原 研 95
 Fujiwara, Yoko 藤原葉子 95

H

Hara, Tomijiro 原富次郎 81
 Hashi, Yurika 橋友理香 85
 Hirano, Yui 1
 Hirotsu, Masakazu 廣津昌和 47
 Horiguchi, Kotaro 堀口幸太郎 95
 Hoshino, Yasushi 星野 靖 21
 Hosoya, Hiroshi 1

I

Inoue, Kazuhito 1
 Ishida, Shiori 石田汐里 85
 Isono, Syuta 磯野柗太 103
 Ito, Akitaka 伊藤亮孝 47
 Iwanaga, Miyu 1

K

Kabe, Yoshio 加部義夫 115
 Kawanobe, Kyoko 川延京子 103
 Komiya, Mahiro 1
 Kondo, Natsuko 1
 Kotani, Susumu 小谷 享 85

M

Matsuda, Tsuyoshi 松田 乾 91
 Matsushima, Yuri 1
 Mizuno, Tomohisa 水野智久 15
 Mogi, Kazue 茂木和枝 57, 67

N

Nakajima, Hiroshi 中島 洋 47
 Nakata, Jyoji 中田穰治 21
 Nghiem Thanh Phuong ニエンタンフォン 85
 Nguyen Thi Van Anh 81
 Nishimoto, Yuko 西本右子 103

O

Ohira, Tsuyoshi 大平 剛 81, 91
 Ominato, Yuka 1
 Oti, Takumi 越智拓海 85

S

Seki, Yuhei 関 裕平 21
 Shioya, Naoki 塩谷直樹 47
 Shoji, Tatsuya 東海林竜也 41, 111
 Suzuki, Nobuo 鈴木信雄 91
 Suzuki, Soushun 1
 Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘 103

T

Takatsuka, Yumiko 高塚由美子 81
 Toyozumi, Ryuji 豊泉龍児 57, 67
 Toyota, Kenji 豊田賢治 81, 91
 Tsuboi, Yasuyuki 坪井泰之 41
 Tsuji, Hayato 辻 勇人 53
 Tsutsui Naoaki 筒井直昭 85

Y

Yokoyama, Masaki 1
 Yoshida, Masashi 吉田匡志 41

編集後記

去る3月、鈴木季直先生が他界されました。こんな日が来るなんて夢にも思っておりませんでした。あのヒョイと現れ、みんなを笑顔にして、そしてスーと居なくなる、そんなお姿を拝見できなくなる日が来るとは。総合理学研究所の事務室に、今にもニコニコしながらヒョイと現れるような、そんな気がしてなりません。先日、長年お世話になっている印刷所の方が、打ち合わせの中で「季直先生の手紙がないのが寂しい」とおっしゃられていました。それが気になって、私の手元にあった2008年以降の「Science Journal of Kanagawa University」を見てみたところ、すべての巻に先生の論文が掲載されていました。ご定年後、「卒業生の残した研究成果を少しずつまとめるんだ」とおっしゃっていたことは覚えていたのですが、それ以前から、毎年、「Science Journal of Kanagawa University」に、共同研究助成論文としてではなく、ご自身の研究成果を発表されていたことは知りませんでした。長きに亘って総合理学研究所の所長、そして、さらに長きに亘って「Science Journal of Kanagawa University」の編集委員長を務められ、多くの皆様もご存じのように定年退職後も実質的な編集委員長でした。2005年、総合理学研究所の機関誌としてスタートした「Science Journal of Kanagawa University」が、掲載論文の体裁を整えるなどの改編を重ねることで学術雑誌として認められるに至ったのは、ひとえに鈴木季直先生のご尽力によるものです。そんな先生を失った後に完成した本巻を、「Science

Journal of Kanagawa University」の生みの親であり、育ての親でもある鈴木季直先生に捧げ、改めて感謝申し上げます。心よりご冥福をお祈り申し上げます。

ここからは、鈴木季直先生がご定年の年に記された編集後記(26, 2015)からの抜粋です。

さて、これまでの本誌の編集について振り返りますと、書式や投稿規程の策定から始まり、その後の点検と改訂、論文範疇の追加、電子媒体化、なによりも各巻ごとの編集実務などなど、大変なことが続きました。しかし、昨今では、原稿書式が電子配信され、皆さんが注意深く書式に則り原稿を作成して下さるようになり、投稿論文の体裁を規定に沿うように整える編集作業もかなり容易になりましたので、最早、実務的な面については何も問題ありません。10年を経て、なお気になることは論文の審査制度であります。一時は、編集委員会で制度について検討致しましたが、ある程度の自己責任において研究成果を埋もれさすことなく公表できる科学誌があることは所員にとって貴重であるとの判断から、今しばらくは現状維持を進めるということになりました。当初から、本誌が若手研究者や大学院生の研究発表の場となることも目標の一つでありましたが、「まずは原稿作成と論文発表に取り組んでみる」ということが比較的容易にできる現在の編集制度は、後進に対する教育的側面においても有意義に作用しているのではないかと思います。

〔 神奈川大学総合理学研究所 〕
〔 理学部・化学科 川本達也 〕

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

Science Journal of Kanagawa University Vol. 33 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日 2022年7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