

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol. 34 2023

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

原 著

Local Atomic Structures around Implanted Phosphorus Atoms in Diamond Analyzed by X-ray Absorption Near Edge Structure Yasushi Hoshino, Yuhei Seki and Kei Mitsuhara	1
PHASE を用いた (111) 二次元 Si のバンド計算の方法 青木 孝	9
C 言語のポインタ教育で用いるコードと説明図の同時作成を補助するシステム 栗原優太、永松礼夫	13
一重項酸素りん光の近赤外分光計測を利用したイオン液体中の二酸化炭素吸着機構の解明 渡邊 諒、田村麻美、吉田 剛、河合明雄	19
進化するベシクル型人工細胞の基盤となるカチオン性自己生産ベシクルの集団計測 阿部真也、松尾宗征、菅原 正、鈴木健太郎	25
有尾目両生類イベリアトゲイモリの外鰓の形態形成における Sonic hedgehog シグナル伝達 経路の役割について 桃井 環、豊泉龍児	31
減数分裂期染色体ライブ観察用のシロイヌナズナ形質転換体の作成とその染色体の動態解析 小柴雅史、落合 優、本村和佳奈、小林 達、古賀皓之、安積良隆	45
性機能を調節する脊髄射精発生器ニューロンの脳への投射 越智拓海、篠崎和歌子、石割隆輔、立石沙也加、坂本浩隆、小谷 享	49
植物の茎に亀裂が生じる動態の定量的解析 浅岡真理子、西谷和彦	55
相模川河口域における長期環境変動のモニタリング 10 (河口域生態系マイクロプラスチックの実態の検討) 高橋ひよの、荻野湧矢、鈴木祥弘、西本右子	61
相模川河口域における長期環境変動のモニタリング 10 海況と植物プランクトン分布 2023 年 1 月 西條光河、川延京子、西本右子、鈴木祥弘	65

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 (11) 加部義夫	71
---------------------------------------------	----

2022 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	85
Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	89
Author Index	93
編集後記	94

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

Local Atomic Structures around Implanted Phosphorus Atoms in Diamond Analyzed by X-ray Absorption Near Edge Structure

Yasushi Hoshino^{1, 2, 4}, Yuhei Seki² and Kei Mitsuhashi³

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

³ Ritsumeikan Global Innovation Research Organization, Ritsumeikan University, Kusatsu City, Shiga 525-8577, Japan

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

Abstract: Formation of highly controlled p-type and n-type conductive layers in diamond by ion implantation technique has been strongly desired for realizing diamond-based electronic devices for decades; however practically available doping condition has not been found especially in n-type doping. In this study, we comprehensively determined the local structures and depth profiles of implanted P atoms as n-type dopant to find out the origin of inactivation of implanted P atoms. The local structure around the implanted P atoms was analyzed by X-ray absorption fine structure using synchrotron-radiation-light and the first-principle calculation based on density functional theory. We found at least four components for all prepared samples in the near edge X-ray absorption structure, suggesting that implanted P atoms locate in four different chemical environments. We eventually assigned all the components by comparing the simulated X-ray absorption with the first-principle theoretical calculation: one of the components corresponds to active phosphorus atom in the substitutional site, and others are the elemental P-P bonds and some defect complexes probably acting as inactive species for n-type dopant. These facts suggest that the knowledge of local structure of implanted P atoms and control of them are substantially important to reduce the inactivation factors of the implanted dopants.

Keywords: ion implantation doping, chemical bonding structure, synchrotron radiation light, X-ray absorption fine structure, DFT calculation

Introduction

Effective impurity doping in diamond especially by ion implantation technique has been one of the crucial issues for realizing electronic power devices. The advantage of ion implantation doping is that the degree of freedom for device design is significantly expanded since one can dope almost all impurity atoms in designated area and depth with an accurate concentration. This fact finally results in short process time, large area doping, and low financial cost in fabricating integrating devices. The ion implantation doping has been therefore successfully used in device fabrications of Si- and GaAs- based semiconductor technology today¹⁻³. In the case of diamond semiconductor fabrication, there are so far

some reports on ion implantation doping focused on substrate quality, ion implantation conditions, and activation annealing processes; however, electrical activation of doped impurities in diamond by ion implantation has not been sufficiently accomplished yet⁴⁻⁷. Quite recently, we succeeded in high-efficient heavy B doping around 10^{19} cm⁻³ concentration by B ion implantation at room temperature (RT) followed by activation annealing at 1150 to 1450 °C⁸⁻¹⁰. We consequently realized excellent p-type conductivity and confirmed a typical ionization energy of acceptor B in a wide temperature range from 150 K to 1073 K. The doping efficiency progressed remarkably and reached 78 %, and the Hall mobility at RT was real-

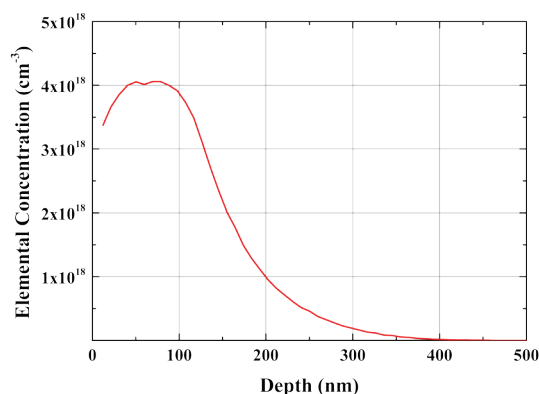


Fig. 1. Observed depth profile of implanted phosphorus atom measured by SIMS.

ized to be $108 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. We also succeeded in fabrication of p-type Schottky barrier diode by all-ion-implantation doping process recently^{11, 12)}.

On the other hand, n-type doping in diamond is the most difficult issues today. It is recognized that phosphorus atom with an ionization energy of about 0.6 eV is now the most probable dopant candidate for n-type impurity in diamond. Gas-phase CVD doping especially on the (111) diamond surface is today the probable way that the practically available properties are somehow realized¹³⁻¹⁷⁾. In the case of ion implantation doping, however, the electrical activation of implanted P atoms has not succeeded yet¹⁸⁾. Therefore, the investigation of true origin for the electrical inactivation of implanted donor P atoms should be important to realize the effective n-type doping into diamond. Recently, Shikata *et al.* reported local structure of phosphorus atom in (001)- and (111)- oriented diamond by gas-phase doping in CVD analyzed by X-ray absorption spectra; however, they could not narrow down the local structure of doped P atom definitely^{19, 20)}.

In this study, we comprehensively studied the local structures near the implanted impurity P atoms. We carried out P implantation at RT with doping concentrations of 5×10^{18} and $2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$, which almost the same condition that we succeeded in the electrical activation of implanted boron. The local structure around the implanted P atoms was analyzed by X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectrum using synchrotron-radiation light and the first-principle calculation base on density functional theory (DFT) for electronic structures.

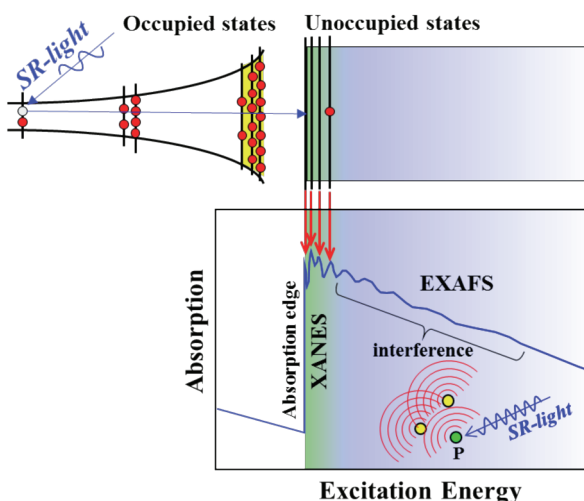


Fig. 2. Schematical concept of X-ray absorption mechanism in an atom and absorption spectrum.

Materials and methods

(001)-oriented type IIa diamond substrates with a typical size of $3 \times 3 \times 0.25 \text{ mm}^3$ purchased from Element Six Ltd were first treated by a typical wet chemical process for diamond surface: dipping in the mixture of sulfuric acid and hydrogen peroxide at $200 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min followed by diluted ammonia and hydrogen peroxide solution at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. The sample was then introduced in a vacuum chamber for P ion implantation. We performed P ion implantation at eight multiple incident energies from 10 to 150 keV to obtain flat doping concentration from near surface to 150 nm with doping concentrations of 5×10^{18} and $2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$ ²¹⁾. The total fluences were 6.2×10^{13} and $2.5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$, respectively. The observed depth profile of implanted P atom for the former case evaluated by secondary ion mass spectroscopy (SIMS) method is shown in Figure 1. We then deposited thin SiO_2 film with about 100 nm thick to prevent the degradation of diamond surface and anomalous diffusion of atmospheric species in the following high-temperature activation annealing at $1300 \text{ }^\circ\text{C}$ for 2 h²²⁾. After the activation annealing, the cap layer was completely eliminated from the surface by dipping diluted HF solution, and the surface was cleaned up again by the typical wet chemical treatment.

Local structure around the implanted P atoms in diamond was analyzed by XANES spectrum using synchrotron-radiation-light. As shown in Fig. 2, XANES spectrum strongly reflects the electronic

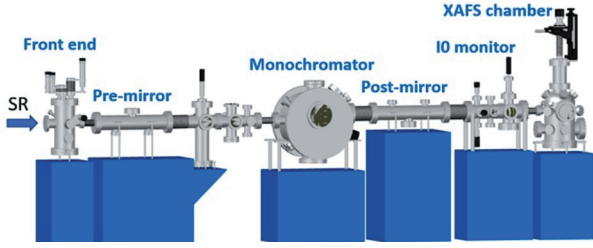


Fig. 3. Schematic view of compact XAFS measurement system in BL-13 at SR-CENTER, Ritsumeikan University.

structure of unoccupied states involving local atomic structure and chemical environment around the excited atom. The XANES spectrum was measured at beam line 13 (BL-13) at SR center, Ritsumeikan University shown in Fig. 3. This beam line mainly consists of three optical systems of front toroidal mirror, Si(111) double crystal monochromator, and post toroidal mirror. One can utilize monochromated SR-light with photon energies from 1200 to 5000 eV, in which the K-shell electron of P with binding energy of ~ 2100 eV can be effectively excited. The chamber for X-ray absorption measurement is closely set within only 2 m distance from the electron storage ring, allowing us to measure the spectra with excellent statistics: the typical photocurrent on the I_0 monitor mesh was ~ 100 pA. The energy calibration was carried out by the energy of K absorption edge for the standard FePO_4 compound material. The absorption spectra were recorded with two detection modes of total electron yield (TEY) and partial fluorescence yield (PFY) by integrating emitted secondary electrons and characteristic X-ray photons, respectively. The former detection mode is sensitive from surface to ~ 100 nm depth by integration of photocurrent from the sample. The latter mode provides the information from deeper layers until several μm by a silicon drift detector.

Experimentally obtained XANES spectra were analyzed by comparing with simulated spectra by first-principle calculation by assuming probable local atomic structures. Today, some DFT calculation packages include an option of XANES spectrum calculation. In this study, WIEN2k package was used for self-consistent DFT calculations²³. The WIEN2k package is known as the most accurate calculation for electronic states especially in core electrons due to all-electron full potential calculation without pseudo-potentials. We employed the generalized

gradient approximation by Perdew-Bruke-Ernzerhof (PBE) functional for exchange and correlation potential in Hamiltonian^{24, 25}. A Brillouin zone sampling with $4 \times 4 \times 4$ grid for wave vectors were used in the present calculations. In structure optimization, we repeatedly carried out the calculation until the Hellmann-Feynman force and energy were well converged. It took typically several days with a high-performance workstation for sequential simulation of each local structure.

Results

Figure 4 shows XANES spectra detected by TEY (a) and PFY (b) mode for the samples with different doping concentrations of 5×10^{18} and $2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$. For reference, simulated XANES spectrum of substitutionally doped P is also shown in Fig. 4. Here, we focus on the near-edge absorption structure appearing between 2140 to 2160 eV, which is strongly influenced from the local atomic structure of doped P atom. It is clearly found that four components denoted by A, B, C, and D are observed in all spectra, suggesting that implanted P atoms locate in four

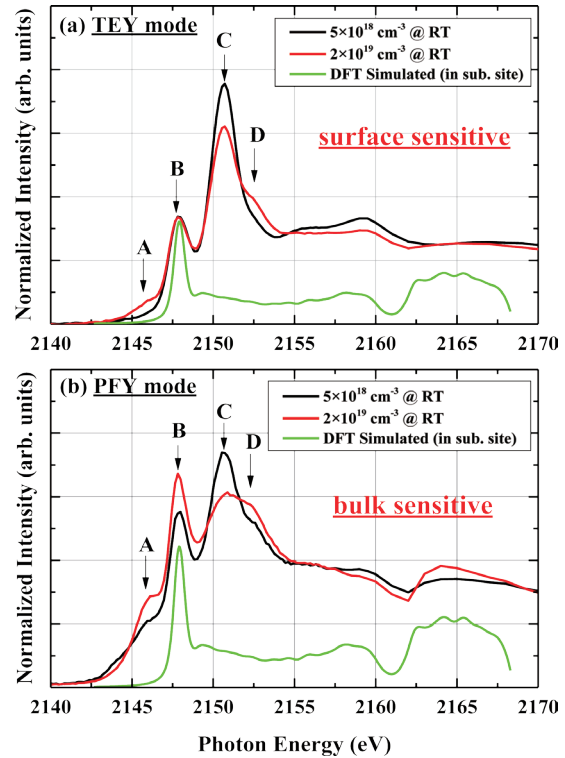


Fig. 4. Experimentally observed XANES spectra of the K-absorption edge observed for the samples in various implantation conditions. The curve drawn with green color denotes simulated spectra by DFT calculation assumed by the local structure of substitutionally doped P atom.

different chemical environments. Comparing the peak and dip structures observed in the experimental spectrum to those in the simulated spectrum assumed by substitutional P structure (green curve), the component B is assigned to the substitutional P atom. The relative peak intensity for the component C at the surface sensitive condition (TEY mode) is

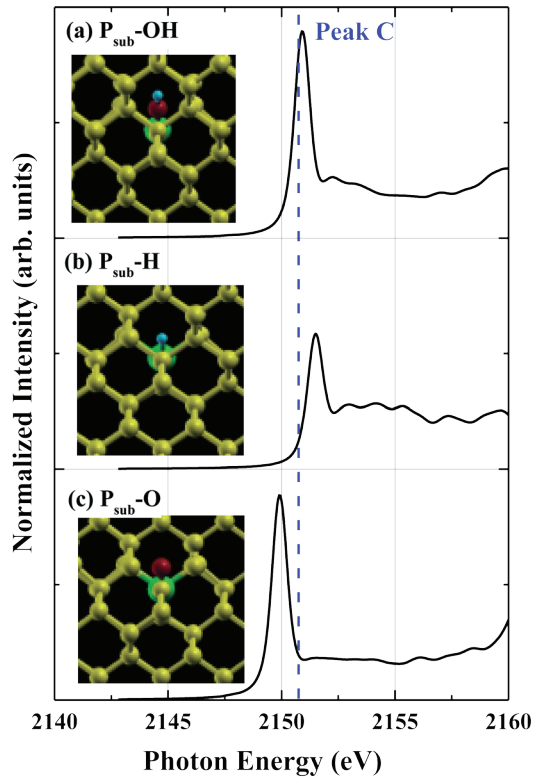


Fig. 5. Simulated XANES spectra assumed by the most probable hydroxyl complexes of (a) $P_{\text{sub}}\text{-OH}$, (b) $P_{\text{sub}}\text{-H}$, and (c) $P_{\text{sub}}\text{-O}$. The blue dashed line denotes the energy position of observed peak C component.

found to be strongly increased. On the other hand, peak A and D are apparently bulk sensitive. As increasing the doping concentration, the intensities of A and D components are increased and that of C is decreased. The origin of XANES spectra and depth profiles of these components are discussed below.

In order to precisely interpret the XANES spectra,

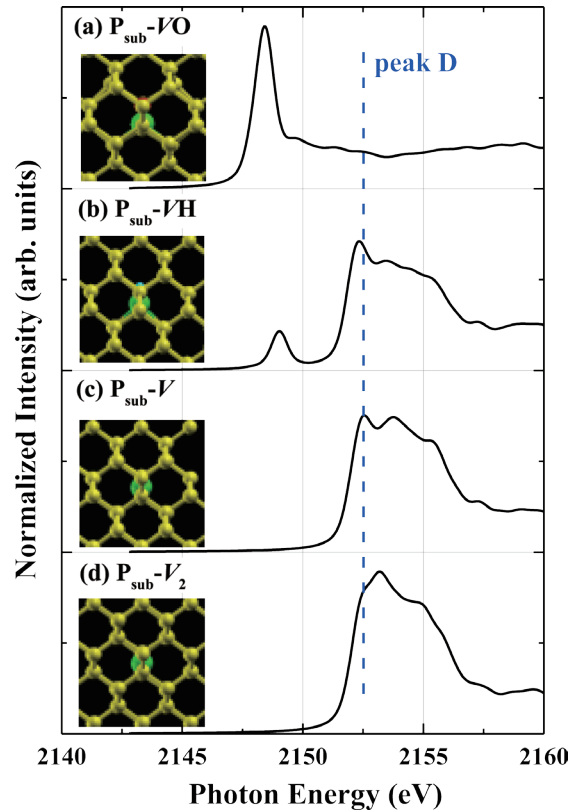


Fig. 6. Simulated XANES spectra for three typical vacancy complex structures of (a) $P_{\text{sub}}\text{-VO}$, (b) $P_{\text{sub}}\text{-VH}$, (c) $P_{\text{sub}}\text{-V}$, and (d) $P_{\text{sub}}\text{-V}_2$. The blue dashed line denotes the energy position of observed peak D component.

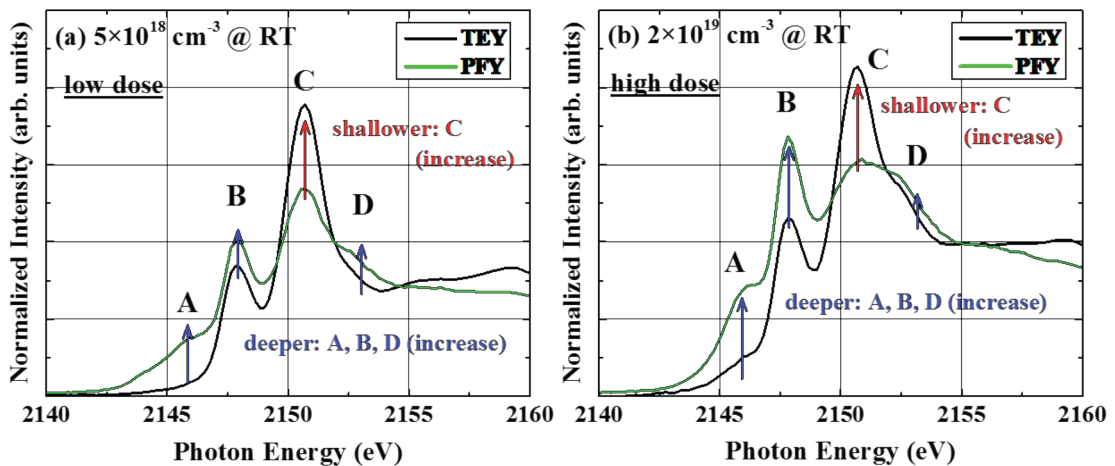


Fig. 7. Depth profile analysis by comparing XANES spectra observed for the sample at RT implantation measured by two detection modes of TEY and PFY.

we performed DFT calculations and compared the experimentally observed spectrum structures to simulated ones. Figure 5 shows simulated XANES spectra assumed by some probable hydroxyl complexes of (a) OH bonded with substitutional P ($P_{\text{sub}}\text{-OH}$), (b) H bonded with substitutional P ($P_{\text{sub}}\text{-H}$), and (c) O bonded with substitutional P structures ($P_{\text{sub}}\text{-O}$). The atomic configuration images after energetically minimized final structures projected along [110] axis are also shown in this figure. It is clearly seen that the energy position of peak C in the experimental XANES spectra (2150.5 eV) is very close to that of the $P_{\text{sub}}\text{-OH}$ structure or mixture of $P_{\text{sub}}\text{-H}$ and $P_{\text{sub}}\text{-O}$ structure, suggesting that the peak C component probably consists of hydroxyl complexes.

Figure 6 shows simulated XANES spectra for four typical vacancy (V) complex structures of (a) VO complex bonding with substitutional P ($P_{\text{sub}}\text{-VO}$), (b) VH complex bonded with substitutional P ($P_{\text{sub}}\text{-VH}$), (c) V bonding with substitutional P ($P_{\text{sub}}\text{-V}$), and (d) divacancy (V_2) bonding with substitutional P ($P_{\text{sub}}\text{-V}_2$). The energy positions of the main peak for $P_{\text{sub}}\text{-VH}$, $P_{\text{sub}}\text{-V}$ and $P_{\text{sub}}\text{-V}_2$ are found to be significantly close to that of peak D. This small component at the highest energy corresponds to phosphorus and vacancy complexes.

As already mentioned above, we measured XANES spectra by two detection modes of TEY and PFY. TEY mode is surface sensitive and detects the information within about 100 nm in depth and PFY mode detects the information in deeper region until several μm depth, which allows us to analyze the depth profiles of the local structures. Figure 7 shows XANES spectra observed by TEY and PFY modes for the samples with (a) low doping concentration ($5 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$) and (b) high doping concentration ($2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$) formed by P implantation at RT. It is clearly found that the relative intensity of peak C increased significantly in shallower region for both samples of low and high dosages. On the other hand, the intensities of peak A and B significantly increased in the deeper region. The intensity of peak D was slightly increased in the deeper area and also by higher dosage. On the other hand, K-absorption edge for black and red phosphorus was observed around 2145–2147 eV according to the previous reports, indicating that peak A locating at the lowest energy can be assigned to P-P bonds^{26, 27}. Finally,

estimated peak energy and probable local structure of each component are summarized in Table 1.

Discussion

According to the XANES spectra and DFT calculation, most of implanted P atoms are existent in the substitutional site, though most of them preferably

Table 1. Estimated peak energy and probable local structure for observed components in XANES spectra

component	energy (eV)	local structure
A	2145.7	P clusters
B	2147.8	Substitutional site
C	2150.5	OH complex
D	2152.3	Vacancy complex

form defect complexes. Since the peak intensities of B and C were respectively decreased and increased in the shallower area alternatively, it is suggested that substitutionally arranged P atoms near the surface region were preferably bonded with interstitial hydroxyl defects. These hydroxyl species locating near surface region are probably diffused from surface during annealing process via irradiation defects. Furthermore, vacancy-complex structures are distributed around deeper area and significantly increased with increasing ion fluence. It is quite reasonable that ion implantation of heavy elements with higher dosage generally creates many defects and self-clusters in deeper area.

It is readily predicted that termination of impurity P in substitutional site by such interstitial defects of hydroxyl and vacancy complexes should electrically inactivate the function of donor. It is suggested in the previous reports on P doping by CVD method that incorporations of a large amount of H as well as induced vacancies fatally inactivate donor atoms^{28, 29}. These facts suggest that the control of local structure around implanted P atoms is substantially important to reduce the inactivation effect of donor properties of dopant. In addition, we show that the technique of synchrotron-radiation X-ray absorption spectroscopy is one of the powerful tools for determine the local structure of doped atoms.

We in summary investigated the local structures and depth profiles of phosphorus atoms doped by ion implantation in various doping conditions. The P implantations were performed at RT with doping concentrations of 5×10^{18} and $2 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$. The local

structure around the implanted P atoms was analyzed by XANES using synchrotron-radiation light and the most reliable first-principle DFT calculation with WIEN2k code. In the XANES spectra, four components were clearly observed for all prepared samples, indicating that implanted P atoms locate in four different chemical environments. We eventually assigned all the components by comparing the absorption energies between experimental and simulated XANES spectra. As a result, four components are assigned to be P in substitutional site, P bonded with hydroxyl defects, P bonded with vacancies and P clusters. The depth profiles of these components are quite consistent with the features of ion implantation with heavy atoms. The present study strongly suggests the importance of not only the control of local structures around implanted dopants but also the establishment of methodology for determining local atomic structures of dopants.

Acknowledgments

We sincerely appreciate Mr. Yasunao Saito for their special supports in the maintenance of experimental apparatuses. This research was partly supported by a grant from the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University (RIIS202201).

References

- 1) Wolf S and Tauber RN (1986) *Silicon Processing for the VLSI Era, Vol. 1*. Lattice Press, Sunset Beach, California.
- 2) Nebel CE and Ristein J (2003) *Thin-film Diamond I, Semiconductors and Semimetals, Vol. 76*. Elsevier Academic Press.
- 3) Koizumi S, Umezawa H, Perot J and Suzuki M (2018) *Power Electronics Device Applications of Diamond Semiconductors*. Woodhead Publishing, Duxford.
- 4) Prins JF (2000) Electrical conduction in diamond after vacancy generation by means of carbon-ion implantation. *Appl. Phys. Lett.* **76**: 2095-2097.
- 5) Vogel T, Meijer J and Zaitsev A (2004) Highly effective p-type doping of diamond by MeV-ion implantation of boron. *Diamond Relat. Mater.* **13**: 1822-1825.
- 6) Tsubouchi N and Ogura M (2008) Enhancement of Dopant Activation in B-Implanted Diamond by High-Temperature Annealing. *Jpn. J. Appl. Phys.* **47**: 7047-7051.
- 7) Ueda K and Kasu M (2008) High-pressure and high-temperature annealing effects of boron-implanted diamond. *Diamond Relat. Mater.* **17**: 502-505.
- 8) 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**: 072103/1-5.
- 9) 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 electrical conduction. *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**: 021003/1-8.
- 10) Seki Y, Hoshino Y and Nakata J (2021) Extremely high-efficient activation of acceptor boron introduced by ion implantation at room temperature with various doping concentrations in epitaxially synthesized diamond films by chemical vapor deposition. *J. Appl. Phys.* **129**: 195702/1-10.
- 11) Shigematsu S, Oishi T, Seki Y, Hoshino Y, Nakata J and Kasu M (2021) Schottky barrier diodes fabricated on high-purity type-IIa CVD diamond substrates using an all-ion-implantation process. *Jpn. J. Appl. Phys.* **60**: 050903/1-4.
- 12) Seki Y, Saha CH, Shigematsu S, Hoshino Y, Nakata J, Oishi T and Kasu M (2023) The improvement of Schottky barrier diodes fabricated only by B ion implantation doping accomplished by refinement of the electrode structure. *Jpn. J. Appl. Phys. in press*.
- 13) Koizumi S, Kamo M, Sato Y, H. Ozaki and Inuzuka T (1997) Growth and characterization of phosphorous doped {111} homoepitaxial diamond thin films. *Appl. Phys. Lett.* **71**: 1065-1067.
- 14) Kato H, Yamasaki S and Okushi H (2005) n-type doping of (001)-oriented single-crystalline diamond by phosphorus. *Appl. Phys. Lett.* **86**: 222111/1-3.
- 15) Penot J, Tavares C, Gheeraert E, Bustarret E, Katagiri M and Koizumi S (2006) Hall electron mobility in diamond. *Appl. Phys. Lett.* **89**: 122111/1-3.
- 16) Kato H, Yamasaki S and Okushi H (2007) Carrier compensation in (001) n-type diamond by phosphorus doping. *Diamond. Relat. Mater.* **16**: 796-799.
- 17) Ohtani R, Yamamoto T, Janssens SD, Yamasaki S and Koizumi S (2014) Large improvement of phosphorus incorporation efficiency in n-type chemical vapor deposition of diamond. *Appl. Phys. Lett.* **105**: 232106/1-3.
- 18) Tsubouchi N, Ogura M, Watanabe H, Chayahara A and Okushi H (2009) Diamond Doped by Hot Ion Implantation. *Mater. Sci. Forum* **600-603**: 1353-1356.
- 19) Shikata S, Yamaguchi K, Fujiwara A, Tamenori Y, Yahiro J, Kunisu M and Yamada T (2017) X-ray absorption fine structure study of heavily P doped (111) and (001) diamond. *Appl. Phys. Lett.* **110**: 072106/1-4.
- 20) Choudhury S, Colnak R, Schulz C, Lieutenant K, Tranchant N, Arnault J-C, Pinault-Thaury M-A, Jomard R, Knittel P and Petit T (2021) Impact of Nitrogen, Boron and Phosphorus Impurities on the Electronic Structure of Diamond Probed by X-ray Spectroscopies. *J. Carbon Res.* **7**: 28/1-10.
- 21) Ziegler JF, Biersack JP, and Littmark U (1985) *The Stopping and Range of Ions in Solids*. Pergamon, Oxford.
- 22) Hoshino Y, Seki Y and Mitsuhashi K (2022) Local Structures of Phosphorus atoms implanted in Crystalline diamond. *J. Appl. Phys.* **132**: 165704/1-11.
- 23) Blaha P, Schwarz K, Tran F, Laskowski R, Madsen

- GKH and Marks LD (2020) *J. Chem. Phys.* **152**: 074101/1-30.
- 24) Perdew JP, Burke K and Ernzerhof M (1996) Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **77**: 3865-3868.
- 25) Perdew JP, Burke K and Ernzerhof M (1997) ER-RATA: Generalized Gradient Approximation Made Simple [Phys. Rev. Lett. 77, 3865 (1996)]. *Phys. Rev. Lett.* **78**: 1396.
- 26) Nicotra G, Politano A, Mio AM, Deretzis I, Hu J, Mao ZQ, Wei J, La Magna A and Spinella C (2016) Absorption edges of black phosphorus: A comparative analysis. *Phys. Status Solidi B* **253**: 2509-2514.
- 27) Li M, Li W, Chen N, Liang J, Liu Y, Banis MN, Li J, Xiao Y, Gao X, Hu Y, Xiao Q, Doyle-Davis K, Liu Y, Yiu YM, Li D, Liu S, Li R, Brandys F, Divigalpitiya R, Sham T-K and Sun X (2021) Revealing Dopant Local Structure of Se-Doped Black Phosphorus. *Chem. Mater.* **33**: 2029-2036.
- 28) Hayashi K, Yamanaka S, Watanabe H, Sekiguchi T, Okushi H and Kajimura K (1997) Investigation of the effect of hydrogen on electrical and optical properties in chemical vapor deposited on homoepitaxial diamond films. *J. Appl. Phys.* **81**: 744-753.
- 29) Mizuochi N, Watanabe H, Isoya J, Okushi H and Yamasaki S (2004) Hydrogen-related defects in single crystalline CVD homoepitaxial diamond film studied by EPR. *Diamond. Relat. Mater.* **13**: 765-768.

■原 著■

PHASE を用いた (111) 二次元 Si のバンド計算の方法

青木 孝^{1,2}

PHASE Band Calculation for Two-Dimensional (111) Silayers

Takashi Aoki^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

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

Abstract: Band structures in two-dimensional (111) Si layers were simulated by first principles calculation: PHASE. The results of PHASE calculations can be predicted following measurement of photo luminescence.

Keywords: two-dimensional Si PHASE band structure calculation, photo luminescence

序論

2015年に、PHASE バンド計算を使って、(100)Si で、1 nm 程度の薄膜化によって、3D-Si の間接遷移型から直接遷移型へ、バンド構造が変調することを示した¹⁾。この結果は、励起光 532 nm レーザー (2.3 eV) による二次元 Si の PL (Photo Luminescence) 発光実験で確認されている。(110) Si では、薄膜化しても発光せず、バンド構造も直接型には変調しないことも示した。また、Ts = 0.5 (nm) 薄膜において、表面に 120 nm ついた酸化膜を取り除くと、10 % 程度、PL 発光ピークフォトンエネルギーからみたバンドギャップが大きくなることが分かっている。この差は、Si 薄膜の熱応力からの変調による。

酸化膜なしの実際のバンドギャップは、PHASE 計算とよく合う。そこで、PHASE 薄膜計算で使うスラブモデルの水素 H 終端を、酸素 O を入れた OH 終端で模擬的に酸化膜を作ってやると、酸化膜がある実験値とほぼ合い、バンドギャップは下がることも示した。本論文では、薄膜化による (111) Si に対するバンド構造の変調を、PHASE により調べる。まず、(111) bulk の計算を行い、次に、薄膜化し、OH 終端による変化も見る。

方法

(111)Si の bulk のバンド計算

PHASE を用いた (111) Si の bulk のバンド計算をする。[111] 方向から見た xy 面の原子配列は、図 1 となる。右半分の 12 原子で結晶を表現できる。これを yz 面から見ると、図 2 となる。座標で表わすと、次

になる。

格子定数 $a = 10.26(\text{a.u.})$

$\Delta x = 14.5098(\text{a.u.})$

$\Delta y = 12.5658(\text{a.u.})$

$\Delta z = 18.7708(\text{a.u.})$

No. (x,y,z) =

1. (7.2549, 6.2829, 2.2213)
2. (7.2549, 6.2829, -2.2213)
3. (7.2549, 2.0943, -8.1449)
4. (7.2549, -2.0943, 8.1449)
5. (3.6274, 4.1886, 8.1449)
6. (3.6274, -4.1886, -8.1449)
7. (7.2549, -2.0943, 3.7022)
8. (3.6274, 4.1886, 3.7022)
9. (3.6274, 0.0(12.5658), 2.2213)
10. (7.2549, 2.0943, -3.7022)
11. (3.6274, -4.1886, -3.7022)
12. (3.6294, 0.0(12.5658), -2.2213)

この格子モデルを使い、PHASE により、(111) bulk-Si のバンド構造計算 (G-X) をすると、図 3 となる。同じ方向に原子が重なるために、バンド構造の冗長が起り、バンドの折り返しが起る。(100) bulk-Si の場合も同じであった¹⁾。本来の X 点が、G 点軸側に折り返して出てしまう。(111) bulk-Si を計算した G (ガンマ Γ) 点は、2.57 (eV) で、X 点は、折り返った一番下のバンドの 0.73 (eV) である(図 3)。同様の問題が、(111) bulk-Si でも起る。(110) の場

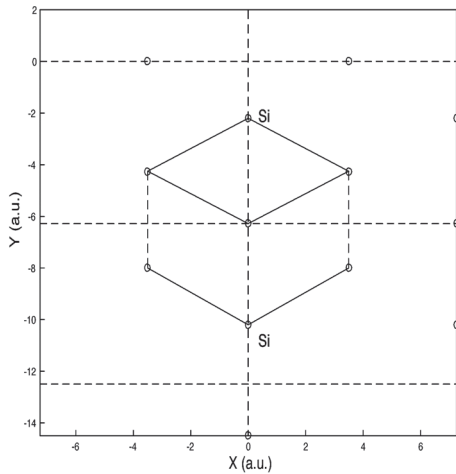


図 1. Atom arrangement of [111]xy axes.

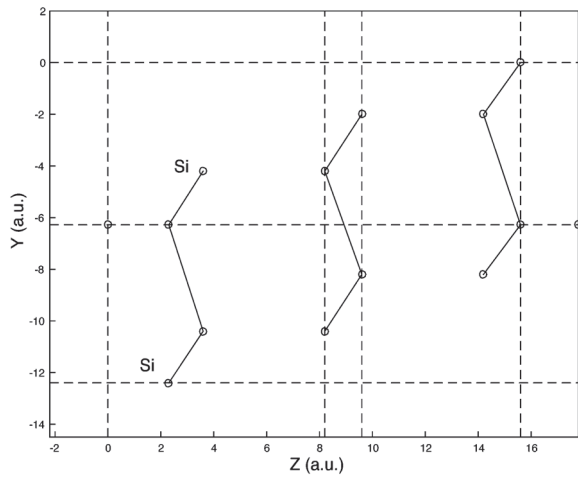


図 2. Atom arrangement of [111]zy axes.

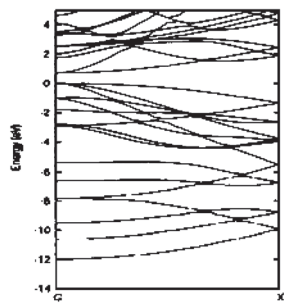


図 3. (111)NL12-bulkSi.

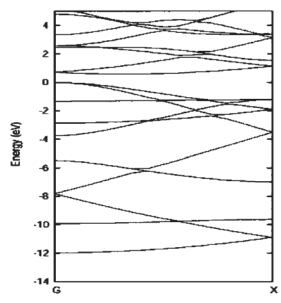


図 4. (110)NL8-bulkSi.

合は、図 4 となる。

(110)Si8: G 点 = 2.59(eV), X 点 = 0.77(eV)

(111)Si12: G 点 = 2.57(eV), X 点 = 0.73(eV)

結果と討論

(111) 薄膜 2D-Si:1 層

Si(111) の基本格子は、NL6 ((100) の NL4 に相当) となり、これをスラブモデルで薄膜化すると、図 5 のようになる。膜厚は、 $8.1449 \times 2 = 1.5877a.u. =$

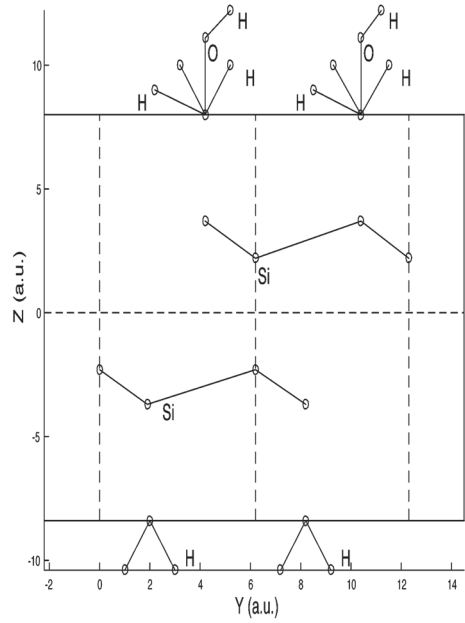


図 5. Unit of (111)NL6 Slab model.

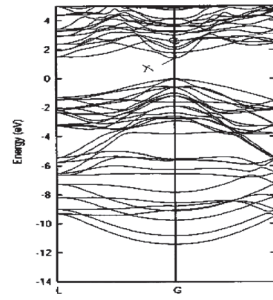


図 6. (111)NL4-Si12.

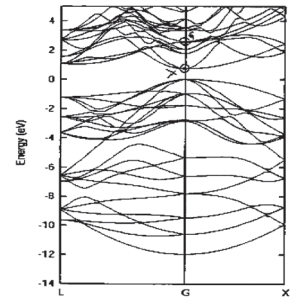


図 7. (111)-bulkSi12

0.862 nm である。外側の Si に対し、それぞれ 3 つの H を付け、終端する。

(111) Si2 の膜厚 NL4 に対して、PHASE で計算したバンド図は、図 6 となる。同じ、(111) bulk-Si におけるバンド図は、図 7 となる (LGX 点軸)。両者を比較すると、折り返された bulk の G、X 点が表 1 となり、薄膜 0.8 nm でも、バンドは間接遷移のままであることがわかる。

(111) 2 層 NL8 のバンド構造計算は、図 8 となり、1 層を 2 層のスーパーセルにして、Bulk 計算して折

表 1. Band gap (Γ , X) for (111) Si NL

	G (Γ)	X
(111)bulk	2.46	0.729
(111)NL4	2.57	1.408
(111)NL8	2.6057	0.8881
(111)NL8-bulk	2.5696	0.729
(111)NL4-2HOH	2.5289	1.3875

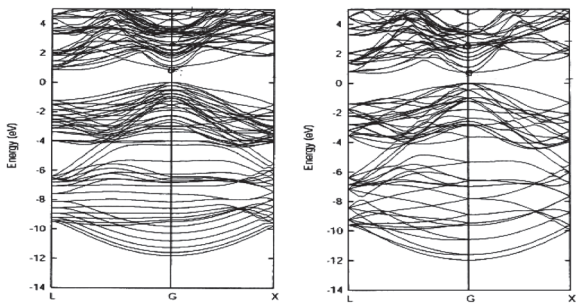


図 8. (111)NL8-Si12.

図 9. (111)-NL8bulkSi12.

り返しの出方を見て (図 9)、G 点をさがし選ぶ。

次に、1 層において、H 終端の片側の 3H のうち (図 6 再掲)、1 つの H を OH にして、2H1OH 終端を作りバンド計算を行う (図 10)。HOH 終端が、(111) NL4-HOH:G 点 = 2.53 (eV), X 点 = 1.39 (eV) となる。H 終端が、(111) NL4-H:G 点 = 2.57 (eV), X 点 = 1.408 (eV) であったものが、G 点、X 点とも下がる。(100) では、OH 終端が、酸化膜を模擬的に表したものに近く、OH 終端が H 終端より、バンドが下がるが、(111) でも、同様に下がるのが分かる。(100) 片側 1OH (自然酸化膜に相当) で、5% 程度バンドが下がるが、(111) 片側 1OH では、2% 下がる。

図 11 に、これまでの結果をまとめる。(100) 薄膜の G、X データの上に (111) 薄膜のデータを重ねる。(100) 薄膜で、繊維の構造変化が起きたが、(111) 薄

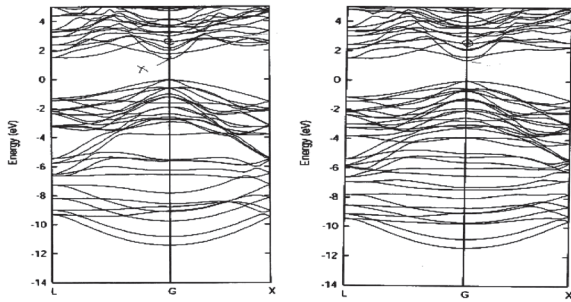


図 6. (111)NL4-H.

図 10. (111)-NL4Si12-2HOH.

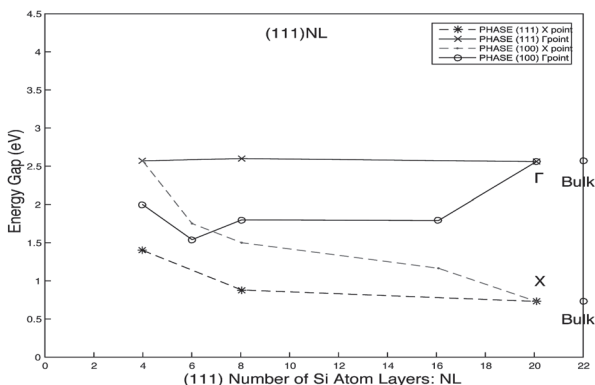


図 11. Dependence of band gap for (111)NL.

膜では、(100) 薄膜同様に、構造変化は起きないことが分かった。また、2H1OH 終端の、酸化膜を模擬的に表したモデルの値も、ほぼ変わらない (2%)。(110) も、1OH 終端は、Si 層間隔が疎になるために、OH 終端の効果は小さかったが、(111) では、もっと疎であるので、同様に OH 終端の効果は小さい。

まとめ

- (1) (111)bulk バンド計算は、Si12 基本格子で計算できることが分かった。
- (2) (111) 薄膜 NL4、NL8 のバンド計算により、(110) 同様に、(111) 薄膜は、間接遷移の構造のまま、PL 発光はしないだろうと考える。
- (3) (111) のスラブモデルの H 終端を、片側 OH 終端として、酸化膜のひずみの効果を模擬的に入れて計算したところ、構造の層間が疎のため、(100) のようには下がらず、2% 程度に留まることがわかった。

謝辞

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

文献

- 1) 青木 孝 (2015) PHASE を用いた二次元 Si のバンド計算と実験比較. *神奈川大学理学誌* 26: 17-21.

■原 著■

C言語のポインタ教育で用いるコードと 説明図の同時作成を補助するシステム

栗原優太¹ 永松礼夫^{1,2}

A support System for Co-Creation of Code and Explanatory Figure Used
in Education on C Programming Language Pointers.

Yuta Kurihara¹ and Leo Nagamatsu^{1,2}

¹ Department of Computer Science, Faculty of Informatics, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

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

Abstract: A support system was developed to assist in the preparation of lecture handouts and assignment materials. This system is able to co-generate a target program source code and an explanatory figure used in the teaching of C language pointers. Targeted class activities are "write explanatory figure from the code" and "write code from the explanatory figure". We developed the system for some typical exercises – follow the steps of a linear list operation and draw a figure that represents the structure of the list. The system consists of two parts – a generator and a viewer. The generator forms connection patterns between structures, C language codes, and data for displaying an explanatory figure based on specified settings. The viewer displays/ edits/saves the explanatory figure of data structures. The viewer includes simple editing and saving features. As a result of actual use of the system, issues such as the lack of quality control of connection patterns that can be generated and the lack of an explanatory figure of the steps in the code emerged. We are able to effectively create code and an explanatory figure useful in the exercises.

Keywords: C programming language, programming education, pointer, linear list, source code generation, explanatory figures

序論

本学科を始めとする情報/CS系の学部では、コンピュータの動作原理や基幹技術の知識体系を深く学習するために、高水準言語の中でハードウェアに近い機能を扱うことが可能なC言語の学習をカリキュラムに取り入れることが多い。C言語はポインタやメモリ管理の部分が難しく、挫折する学生の割合が高い。

先行研究としては、これを解決するための試みとして、金子らが開発したVIEシステム^{1,2)}、小池らが開発したSuZMe³⁾がある。両者ともコードを学習者がステップごとに実行して、ポインタの関係を図から理解する補助システムである。VIEシステムは変数のブロック構造(型・変数名・値)の可視化、SuZMeはメモリ空間(値とアドレス)を可視化とい

う機能も備えている。

これらのシステムでの可視化とは、作成済みプログラムの動作のポインタで指し示す関係の変数を表す長方形とそれらを結ぶ矢印として図示を行うもので、主なユーザは学習者(学生)を想定する。ポインタの教育では教員が授業資料などを手早く作成することも大事であり、対象とするソースコードと解説図をペアで生成したいと考えた。

本研究では、主たるユーザを課題作成者(教師)とし、教材や課題に使用できるコードや図の作成補助を行う課題作成補助システムの開発を目指した。

目標

ポインタをわかりやすく教える方法として、コード

とメモリの状態の解説図を関連付けて理解してもらう方法がある。それを行うため「コードから解説図を書く」「解説図からコードを書く」という演習を実施することが想定される。

これらを支援するための「教員が演習問題の設定を入力すると、そのコードと解説図の生成を行うシステム」の開発を目標とした。また、「事前の説明に使用する例題」や「学生に解いてもらう演習問題」、「難易度を変更した類似する演習問題」といった、複数の類似する問題の作成を可能にすることも目標とした。参考とした例題⁴⁾の形式をベースとし、主に線形リストを対象にするシステムとした。

先行研究のシステムとの違いを、表1に整理した。構造体や自己参照構造体（構造体へのポインタ）について、先行研究では論文内に記載がないため未対応と推定している。

表1. 先行研究のシステムとの違い

	VIE	SuZME	本研究
ポインタ変数の指す先を矢印で繋ぐような形式での、コードの図示	○	○	○
メモリ空間をアドレスと値の表として図示	×	○	×
教材に使用する新規コードの生成	×	×	○
システム単体での、コードの実行とデバッグ	○	×	×
コードの実行ステップ毎の状態の図示	○	○	×
図示された図を操作すると、対応するコードの提案を行う	○	×	×
構造体や自己参照構造体を使うコードの図示	?	?	○
「コードから図」「図からコード」という例題への対応	○	○	○

方法

ベースとする演習の形式⁴⁾は、本学科の2年生を対象とした授業内演習のものである。実際の授業では以下の流れで実施していた。

最初に教師は、自己参照的ポインタと構造体で線形リストを表現するコード、具体的には値とポインタの2つのメンバを持つ構造体が複数あるものについて、コードとリストの構造を表す解説図を掲載し

た講義資料(サンプルは図1と図2)を作成する。コードはステップ毎にラベルが付いている。解説図は、構造体を表す箱と、ポインタのリンクを表す矢印で構成されている。矢印はコードの処理が進むと生成・削除される過程をステップの記号を付記して示してある。

```
int main(void){ //以下の代入ステップを追う
t = mk_item(4,&n3); //※1 --a
p1=(struct item*)malloc(sizeof(struct item)); //a1
p1->num=4; //a2
p1->nxt=&n3; //a3
t=p1; //a4 4ステップに分解
s = &n2; //--b
n3.nxt = s; //--c
s->nxt = &n1; //--d
s->num = 5; //--e
s = mk_item(6,t); //※2 --f
p2=(struct item*)malloc(sizeof(struct item));
p2->num=6; //f2
p2->nxt=t; //f3
s=p2; //f4 4ステップに分解
for( ; s!=NULL; s=s->nxt)
printf("%d\n",s->num);
}
```

図1. 対象とする演習で用いる C 言語コード。

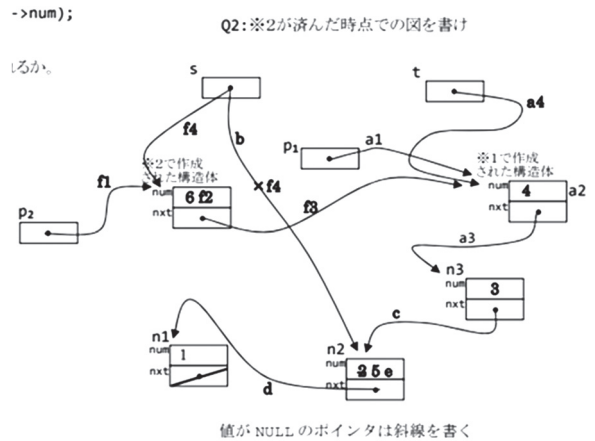


図2. 対象とする演習で用いるリスト構造の図。

この資料を印刷して学生に配布し、教師はコード実行中のリンクの生成・削除や値の変更の動きを、話しながら赤ペンでなぞるなどしてステップごとの動作を解説する。その後、学生に別のコードと構造体を表す箱だけの解説図の雛形が書いてある用紙を配布し、約10分間でポインタのリンク（矢印）と対応するステップの番号を書きこむ演習を行った。

システムの機能と生成物の要件

先述したような形式の演習問題の設定（構造体のメンバ・宣言する構造体の変数等）を入力すると、コードとそれが表現する線形リストの解説図を生成するようなシステムの開発を行った。

コードはステップ毎に値の書き換えを行うものとする。類似問題の量産を行うために、ポインタの指

す先のランダム変更ができるようにする。実行過程の解説用に、コードのステップ毎にコメントで番号を振るようにする。構造体は静的確保（事前に宣言）と動的確保（mallocで確保）から選択できるようにし、それぞれの違いの教育にも使用できるようにする。解説図で構造体変数を表す箱は、図2のように上から順番にメンバが並ぶような形とする。

システムの構成と開発環境

システムは、2つのGUIアプリケーションで構成する方針とした。一つ目は、構造体間の繋がりパターンとC言語コード・解説図表示用データを生成/保存を行うWindows専用デスクトップアプリ（以下、ジェネレータ）であり、二つ目はデータ構造の解説図の表示/編集を行うウェブアプリ（以下、ビューワ）である。

システムの設計：各種データのジェネレータ

ジェネレータには、先述したような形式の課題に使用するコードと解説図を作成する上で手間となる、①構造体間の繋がりパターン②データ構造の解説図表示用データ（JSON）、③線形リストを表現するコードの3つを生成する役割を持たせる。

操作は、「保存済み設定のインポート（任意）」、パートA「使用する構造体の設定決定」、パートB「構造体変数の設定と、繋がり生成」、パートC「解説図表示用データとC言語コードの生成、それらと構造体間の繋がりパターン設定の保存」の順番で行う。各パートの具体的な仕様について述べる。パートA「使用する構造体の設定決定」（図3）では、使用する構造体の設定を決める。今回は一つの課題で利用できる構造体の種類は一個のみとする。利用できるメンバの型は「int, float, double, char, char（文字列）」および同じ構造体へのポインタとする。メンバのポインタの数は複数個設定できるようにした。コードのプレビュー機能により、意図している構造体になったかどうかを確認できるようにする。

パートB「構造体変数の設定と、繋がり生成」（図4）では宣言する構造体変数を一つずつ入力し、それらの中の繋がりパターンの生成を行う。生成は現時点をシード値とする乱数で行う。左側のパネルに宣言する構造体変数の名前とメンバの初期値（必須）を入力する。構造体変数は「実体、構造体へのポインタ、新規作成した構造体へのポインタ」の三種類の中から選択できるようにする。ポインタであるメンバのうち、他の構造体に繋がりたいポインタはNONEと入力する（後の処理でランダムに選択された他の構造体へのポインタまたはNULLポインタが

割り当てられる）。「新規作成した構造体へのポインタ」は、mallocで動的確保した構造体と、それへのポインタのセットのことである。繋がりパターンは、ループする繋がりを含むか否かを切り替えることができるようにした。右側パネルの「繋がりランダム生成」ボタンを押すと、構造体変数とメンバの値のリスト（繋げる前と繋げた後）をそれぞれ生成して表示する。動的確保した構造体は【nn】、それへのポインタは【np】と右側に表記する。

パートC「解説図表示用データとC言語コードの生成、それらと設定の保存」（図5）ではパートBで作成した繋がりパターンに基づき、解説図表示用

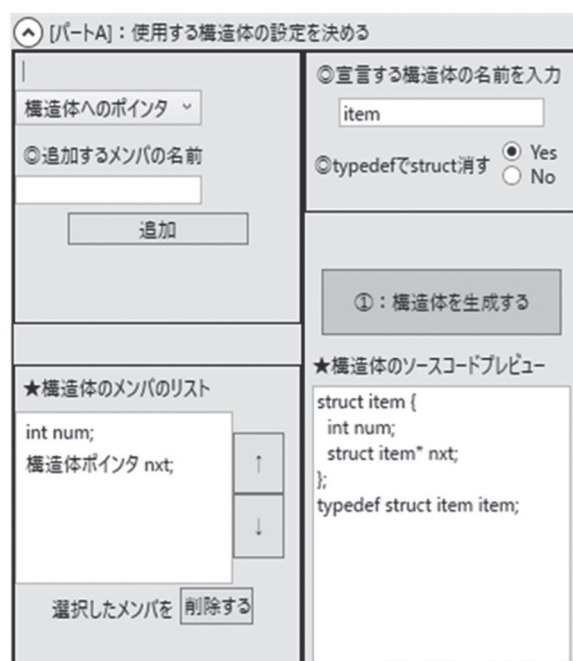


図3. パートA「使用する構造体の設定決定」.

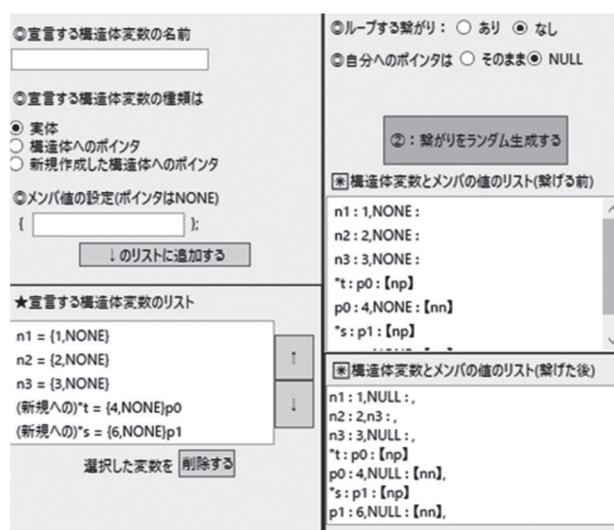


図4. パートB「構造体変数の設定と繋がり生成」.



図5. パートC「解説図表示用データとC言語コードの生成, 構造体間の繋がりパターン設定の保存」.

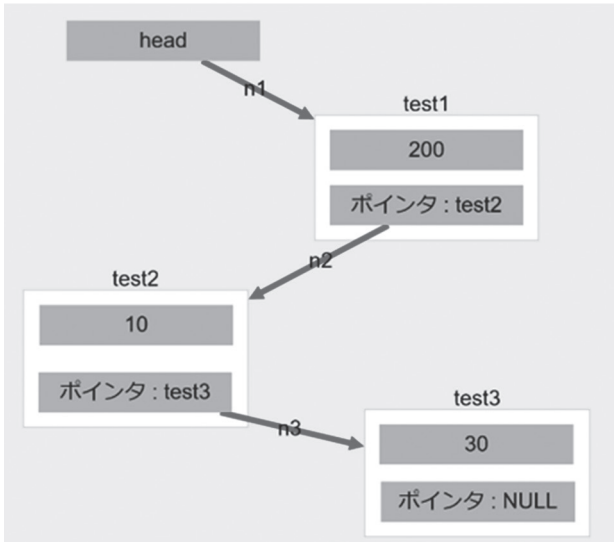


図6. 最も簡単なパターンでの解説図の例.

データとC言語コードを生成する。名前を入力し保存ボタンを押すと、保存用フォルダにそれらと、インポート用の設定を保存する。解説図表示データは「.graph.json」、設定は「config.json」の拡張子のファイルに保存する仕様とする。解説図表示データに関して、迅速な開発を行うため、今回の版ではノードの座標情報を含まない仕様とする。

「保存済み設定のインポート (任意)」について、ここではパートCで保存した「config.json」を、インポート部分で読み込み、構造体/変数の設定が再利用できるようにする。

システムの設計：解説図のビューワ

ビューワには、各種データのジェネレータで生成された解説図表示用データ「.graph.json」から、各構造体とそれらのメンバ変数の値を示す解説図を表示する役割を持たせる。

構造体とメンバは四角形の箱型ノードで表現する。ポインタはメンバから構造体に伸びる矢印で表現する。また、簡易的な編集機能を持たせ、ノードや矢印の削除、矢印の付け直しをできるようにする。

図の表示には JavaScript のネットワーク図描画ライ

ブラリの Cytoscape.js⁵⁾ と、その機能の拡張を行うライブラリ群⁶⁾を使用する。ノードをグループでまとめる機能を持っていることから、線形リストの解説図を表現することに適していると考え、採用した。今回の版では、迅速な開発を行うために、ビューワ上で編集可能な要素は図のみとする。そのため、ビューワの時点でコードを修正しなくなった場合は、ジェネレータに戻って生成をやり直すことになる。また、今回はジェネレータの項で述べたように解説図表示用データ「.graph.json」には、ノードの座標情報を含まないため、読みこみを行った時点では、全ての構造体のノードは横並びに配置されている。そのため手動でノードを移動させる編集を行って整える操作が必要である。移動後の解説図の例を図6に示す。

結果

「システムの機能と生成物の要件」の項で定義したようなシステムを開発することができた。生成物のサンプルは図7と図8である。ステップ毎に番号があるため、実行過程の解説を行うことができる。類似問題の量産について、構造体間の繋がりを乱数でランダムに決定する形式にしたため、教材として適切なパターンをうまく生成できなかった。具体的には、ポインタの指す先が1つの構造体に集中せず分散しているまたはポインタでの繋がりが断断された孤立している構造体が無いようなパターンが望ましい。また、繋がりがノードAから始まり、ノードBで終了するといった特定のノードに着目したようなパターンを選んで生成したい。しかしランダム生成の結果からこういったパターンが出てくるまで

```

int main(void) {
    n2.nxt = &n3; // f1
    n1.nxt = &n2; // f2
    n3.nxt = NULL;

    t = make_node(4, &n2);
    // p = (item *)malloc(sizeof(item));
    // p->num = num;
    // p->nxt = nxt; //f4
    // t = p; //f3

    s = make_node(6, &n2); //
    // p = (item *)malloc(sizeof(item));
    // p->num = num;
    // p->nxt = nxt; // f6
    // s = p; //f5
}
  
```

図7. 例題に近い設定で生成したコード.

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

一重項酸素りん光の近赤外分光計測を利用した イオン液体中の二酸化炭素吸着機構の解明

渡邊 諒¹ 田村麻美¹ 吉田 剛^{2,3} 河合明雄^{1,3,4}

Dissolution and Solvation Nature of Carbon Dioxide in Ionic Liquids as Studied by Time-Resolved Near Infrared Spectroscopy for Singlet Oxygen Phosphorescence

Ryo Watanabe¹, Asami Tamura¹, Tsuyoshi Yoshida^{2,3} and Akio Kawai^{1,2,4}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

³ Department of Electrical and Electronic Engineering, National Defense Academy, 1-10-20, Hashirimizu, Yokosuka, Kanagawa 239-8686, Japan

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

Abstract: This study focused on dissolution and solvation of CO₂ in ionic liquids to understand the mechanism of its highly soluble nature in ionic liquids. We considered that the internal structure of the void in ionic liquids accommodates small gas molecules such as CO₂ and O₂. To understand the voids, time-resolved near infrared spectroscopy of singlet oxygen was performed in ionic liquids. Regarding peak shift values of singlet oxygen phosphorescence from that in the gas phase, the size of voids in ionic liquids was estimated. Even in the presence of a large amount of dissolved CO₂ in ionic liquids, no further spectral shift of singlet oxygen was observed. This spectroscopic information suggests that no voids are occupied by coexisting CO₂ and O₂ molecules. Voids are rather occupied with either CO₂ or O₂ and, therefore, spectral shift of singlet oxygen does not occur. This model was well rationalized by estimation of the dissolved CO₂ concentration using reported Henry constant values of CO₂ in ionic liquids. We considered that a much higher concentration of CO₂ under higher pressure of CO₂ in the order of 10 atm will cause unusual spectral shifts of singlet oxygen.

Keywords: time-resolved near IR spectroscopy, singlet oxygen, ionic liquid, carbon dioxide spectral shift, solvation

序論

近年、イオン分子のみからなる常温常圧で安定な液体の物質が知られるようになり¹⁾、イオン液体と呼ばれるようになった²⁻⁴⁾。イオン液体は通常の分子性溶媒とは異なる物性を示すことが多いため、様々な分野でその特異性を活かした利用が期待されている。イオン液体は、発見当初からその電気伝導性および不揮発性の2つの特徴を生かした応用として、電池の電解液への利用が注目されている⁵⁾。確かにイオン液体にはこれらの優れた性質があるため、不燃性の電解液としての利用が期待されるが、問題点としてイオン液体の価格の高さが挙げられる。そのため、

現在の研究においては、真に分子性溶媒の代替が必要な場合が主流である。その代表例として、宇宙開発における利用が挙げられる。宇宙で使われる素材は、もともとコストが高いことが避けられないケースが多く、高価なイオン液体を用いることに大きなデメリットはない。近年では、イオン液体をバッテリー電解液に用いた人工衛星の試験的運用が始まっている⁶⁾。

イオン液体の興味深い特徴の一つとして、液体内部構造中の空隙の存在が挙げられる。このような物性を示唆した研究として、例えば牧野らは、イオン

液体の CO_2 溶解に伴う体積膨張率が分子性溶媒よりも遥かに小さいことを報告した⁷⁾。このような物性が現れる要因として、 CO_2 がイオン液体中の空隙を占有するため、元の液体体積をほとんど変化させないことが、分子動力学シミュレーションに基づいて説明されている⁸⁾。液体の内部構造としての空隙は、液体中への分子の溶解性に関わり、また溶解した溶存分子の拡散挙動にも重要な役割を持つと考えられる。しかしながら、空隙の情報を実験的に調べることは非常に困難である。そこで本研究においては、空隙のプロブとして微弱な近赤外線光を示すことが知られる一重項酸素を用いる方法に着目した。

酸素の基底状態 $\text{O}_2(X^3\Sigma_g^-)$ およびその励起状態である $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ は、いずれも双極子モーメントを持たず、四重極子モーメントも極めて小さい。そのため、液体中に溶存した O_2 とその周囲の溶媒分子との間には、電気的な力による局所的な溶媒和がほとんど無い。このような場合、分子性溶媒中における $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ の発光ピーク波数は溶媒の屈折率にのみ依存し、これらの間には1次の良い相関がみられる⁹⁾。これに対し、液体の内部構造として空隙を多くもつとされるイオン液体中では、 $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ の発光ピーク波数に対し、溶媒の屈折率および液体中の空隙の両方の影響が現れると予想される。吉田らは、様々なイオン液体中における $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ 発光ピーク波数をレーザー同期の時間分解近赤外分光法で計測し、空隙の影響を調べた。各イオン液体中での発光ピーク波数は、単純に屈折率に比例するのではなく、各イオン液体中の密度から見積もられたイオン液体内の自由体積への依存性も、同様に示すことが分かった¹⁰⁾。

本研究では、イオン液体が特異的によく溶解することが知られる CO_2 に着目し、その溶解に関する情報を一重項酸素をプロブとする空隙の測定法を応用して得ることとした。イオン液体に多量に溶解した CO_2 が、溶存 O_2 の溶媒和にどのように影響し、どのような効果をもたらすか、一重項酸素のピーク波長シフト量にもとづいて考察し、 CO_2 や O_2 の溶解機構の理解を目指す。

実験

本研究では、試料として2種類のイオン液体 [Bmim] [Tf₂N] および [Bmim][Nf₂N] (関東化学)、光増感剤として有機色素であるメチレンブルーあるいはローズベンガル (関東化学) を用いた。図1にこれらのイオン液体を構成するイオン分子の構造式と略称を示した。使用したイオン液体には、空隙サイズの違いを指標として、同じイミダゾリウムカチオンに対して体積の異なるアニオンを組み合わせたものを選

んだ。

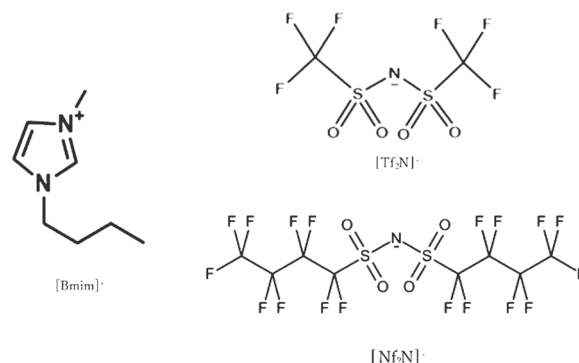


図1. 実験に用いたイオン液体を構成するイオン分子の構造式. (左) カチオン, (右) 2種類のアニオン.

試料の調整では、溶媒として用いるイオン液体のみを入れたサンプル管、および一重項酸素を発生させるために光増感剤をイオン液体に溶解させたサンプル管を別々に用意し、いずれも真空オーブンで 60°C に保温して乾燥させた。その後カールフィッシャー水分計 (京都電子工業, MKC-610) で液体中に残留する水分量を測定し、イオン液体の水分量が 300 ppm 以下であることを確認した。分光計測に適した光増感剤の濃度を定めるため、光増感剤を加えたイオン液体を石英セルに入れ、一重項酸素の強度が最も強くなるように溶媒用のイオン液体を加えた。試料溶液に気体を溶解させて近赤外発光スペクトルを測定する実験では、溶存酸素を除く場合にはアルゴンガスによるバブリングを10分間行った。溶存酸素ありの実験では、アルゴンバブリングしたあとの試料溶液に対し、 CO_2 と O_2 の混合比が 1:1 および 1:0 で全圧 1 atm のガスを10分間バブリングし、測定した。

図2にレーザー分光測定に用いた自作の装置概念図を示す。Nd³⁺:YAG レーザー (Continuum, PL8000) の第二高調波 (10ns パルス, 532 nm) を繰り返し 1Hz でサンプルの入ったセルに照射し、光増感剤であるメチレンブルーあるいはローズベンガルを光励起した。光増感剤は三重項状態となり、溶液中の溶存酸素にエネルギー移動を起こすことで一重項酸素 $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ を生成した。一重項酸素が基底状態に遷移する際に放射されるりん光は、レンズで

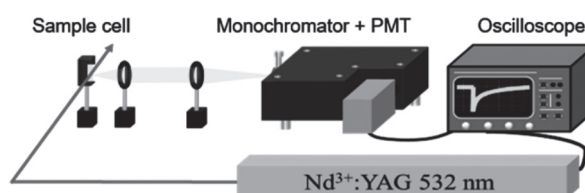


図2. レーザー同期の時間分解近赤外分光装置の概念図.

集光して分光器 (SOLAR TII, MS3504i) に導入した。分光器で波長選別されたりん光は、近赤外用光電子増倍管 (HAMAMATSU, H10330-45) まで導いて検出した。出力の電圧信号は、オシロスコープに取り込んで、デジタルデータとして保存した。一重項酸素の生成は 1275 nm で発光を観測することで確認し、測定は一重項酸素の発光ピーク波長付近 1220 nm-1340 nm の範囲において行った。また、波長ごとに強度時間変化を積分した強度を波長に対してプロットし、発光スペクトルを得た。得られたスペクトルのバンド線型をローレンツ関数によってフィッティングすることでピーク波数を決定し、一重項酸素の発光ピークシフト値を求めた。

イオン液体中の O_2 ($a \rightarrow X$) りん光スペクトル

図 3 に UV-Vis 分光光度計を用いて測定した [Bmim][Tf₂N] 中におけるメチレンブルーの吸収スペクトルを示す。Nd³⁺:YAG レーザーの第二高波長 (532 nm) の波長は、メチレンブルーの $\pi\pi^*$ 遷移による 653 nm の強い吸収バンドから外れているが、532 nm の吸光度 0.03 程度の値が確保されていることがわかる。これより、メチレンブルーの濃度を適切に調整すればレーザーで光励起が十分可能なことを確認した。ローズベンガルを用いた試料でも同様の確認実験を行った。

図 4 に、[Bmim][Tf₂N] 中において観測した 1275 nm での近赤外発光強度の時間変化曲線を示す。強度は、検出器の電圧の符号に合わせて表示されており、負の数値が大きいほど強度が強くなるように作図している。この時間変化の実験では、信号の強度が溶存気体に依存して大きく異なることが分かる。アルゴンガスにてバブリングした場合は、レーザー照射後も信号が発生していない。一方、空気飽和 (バブリング無し) および、 O_2 と CO_2 の混合ガスでバブリングした場合、レーザー照射後に強い発光信号が瞬間的に立ち上がり、その後数 10 μs の時定数で強度減衰が起こっている。この信号は、(1) 一重項酸素の典型的な発光波長である 1275 nm で現れていること、(2) 溶液中に酸素がある時のみ信号が現れること、の 2 点から一重項酸素の発光によるものと合理的に解釈できる。以上より、イオン液体 [Bmim][Tf₂N] 中においては、溶存酸素が存在すれば、532 nm レーザーによる光増感反応によって一重項酸素が生成すると結論した。同様の実験は [Bmim][Nf₂N] の試料でも行い、一重項酸素の光増感反応による発生を認めた。

次に、図 4 のような時間変化曲線を様々な波長で測定し、各々の積分強度を波長に対してプロットす

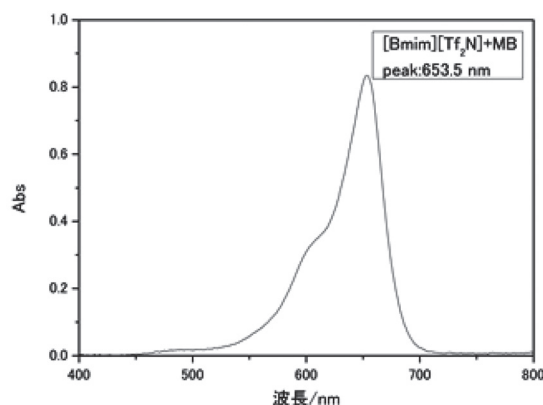


図 3. [Bmim][Tf₂N] 中におけるメチレンブルーの吸収スペクトル。

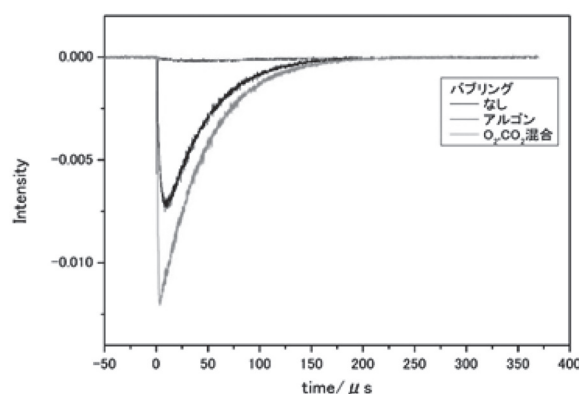


図 4. 各バブリング条件における一重項酸素からの 1275 nm の発光強度時間変化。

ること分散りん光スペクトルを得た。図 5 に、(a) [Bmim][Tf₂N]、および (b) [Bmim][Nf₂N] 中で得られた一重項酸素の近赤外分散発光スペクトルを示す。図には、空気飽和および O_2/CO_2 混合気体のバブリング、の 2 条件で測定したものを示した。いずれの試料においても、得られた発光スペクトル形状はローレンツ関数によってフィッティングすることができ、この操作によって発光ピーク波長を決定した。

いずれの試料のスペクトルにおいても、 CO_2 がある場合のピーク波長は、0.2 ~ 0.3 nm 程度のわずかなブルーシフトを示すだけで、ほとんど変化がなかった。ピーク波長その他、バンド幅や発光寿命でも変化はみられなかった。

溶媒の屈折率と発光ピーク波数シフト

つぎに、ピーク波長がイオン液体の溶媒和によってどのように変化したかを考察するため、ピーク波長と溶媒屈折率の関係を検討した。図 6 は、今回用いた 2 種類のイオン液体サンプルに対し、空気飽和、 O_2 バブリング、および O_2/CO_2 混合気体のバブリング、の 3 つの条件で測定した一重項酸素の発光ピー

クシフト量を、溶媒の屈折率の2乗分の1に対してプロットしたものである。ピークシフト量は、気相における発光ピークとの差を波数 cm^{-1} で示した。図には、過去に報告された分子性溶媒中でのシフト量もプロットされ、それらに対する直線フィットが表示されている。分子性溶媒中では $1/n^2$ に対して良い相関がみられ、屈折率がシフト量を決めていることが確認できる⁹⁾。一方、今回測定した2種類のイオン液体中の発光ピークシフトは、屈折率とピークシフトの相関(図中の直線)からシフト量が小さくなる方向、すなわち気相の発光により近くなる方向へ大きくズレていた。特にその傾向は $[\text{Bmim}][\text{Nf}_2\text{N}]$ 中で大きくなっている。2つのイオン液体では、密度から見積もった液体中の自由体積がいずれも酸素分子体積よりも大きく、特に $[\text{Bmim}][\text{Nf}_2\text{N}]$ 中の値が大きい。このことは、過去の吉田らの研究結果と同じように解釈できる。すなわち、今回のイオン液体中においても、酸素分子は大きな隙間にトラップされて溶存しており、溶媒の屈折率の影響が弱くなってより気相に近いシフト量を示す、と理解できる。

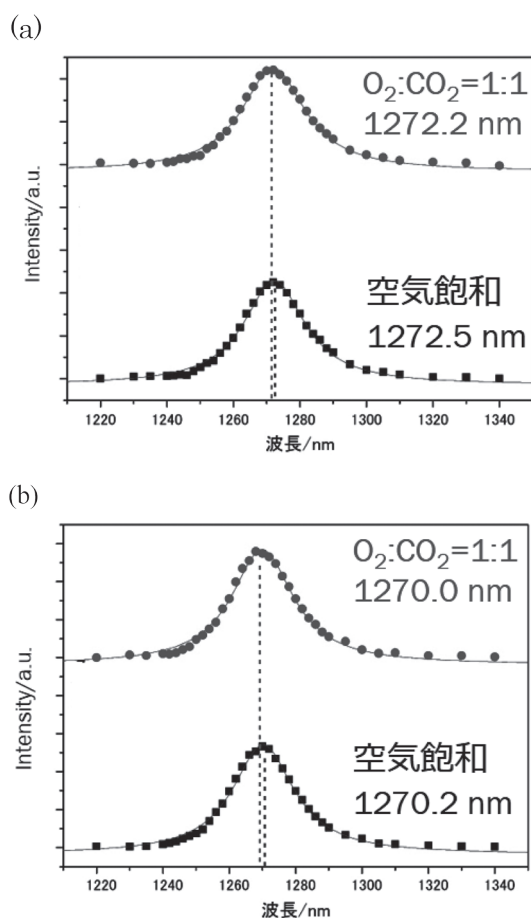


図5. (a) $[\text{Bmim}][\text{Tf}_2\text{N}]$, (b) $[\text{Bmim}][\text{Nf}_2\text{N}]$ 中における一重項酸素の近赤外発光スペクトル。

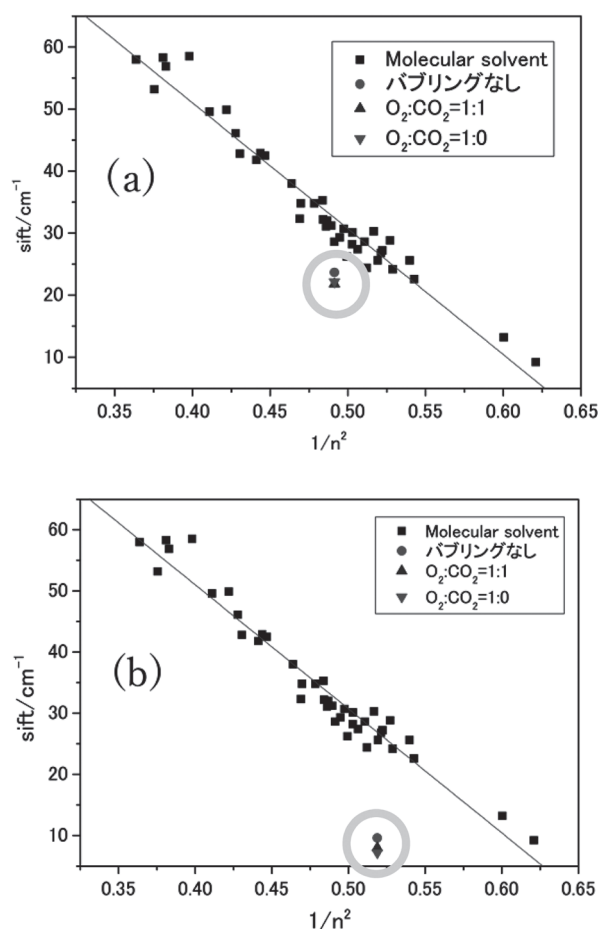


図6. (a) $[\text{Bmim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ および (b) $[\text{Bmim}][\text{Nf}_2\text{N}]$ の各溶媒中における一重項酸素ピークシフト量と屈折率の相関。

溶存 CO_2 によるピークシフト量の変化は、2つのイオン液体でいずれも小さく、波数で 3 cm^{-1} 以内程度であった。これは、分子性溶媒の相関直線からのズレが $10 \sim 20 \text{ cm}^{-1}$ ほどあることに比べれば、ほとんど変化がなかったと考えられる。

現在のイオン液体への CO_2 溶解のモデルでは、 CO_2 はイオン液体中の隙間を埋めると推測される⁸⁾。このモデルでは、隙間の概数がイオン対数個に対して1つと見積もられる。その場合、隙間の数を経物質で考えると、数 mol/dm^3 程度は存在すると考えられる。この濃度を、本研究での溶存 CO_2 濃度と比較するため、ヘンリー定数に基づいた溶存気体の濃度推測を行なった。 $[\text{Bmim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ 中においては、323 Kにおけるヘンリー定数 kH/MPa は、 O_2 が 111、 CO_2 が 4.87 であり、 CO_2 が圧倒的に溶解しやすいことが分かる¹¹⁾。 CO_2 が 0.5 気圧条件下では、35.7 mmol 程度の CO_2 が溶存していることになる。この値は、上述のイオン液体内の空隙の濃度に比べかなり少なく、空隙の大部分は CO_2 が入っていないと考えてよい。

本研究のピークシフト量に溶存 CO_2 の影響がほと

んどなかったとする分光計測結果は、CO₂ 溶解が O₂ の溶解状態に対してほとんど影響を与えないことを示唆する。実験で用いた二つのイオン液体のうち、[Bmim][Tf₂N] は液体中に隙間がほとんどないと見積もられている。その場合、溶存 CO₂ が液体構造に大きく影響し、一重項酸素のスペクトルシフトに影響が現れやすいと仮定したが、その効果はほぼ見られなかった。もう一つのイオン液体 [Bmim][Nf₂N] 中では、隙間が大きいいため、O₂ と CO₂ が同時に入るような場合にピークシフトに異常が現れると推察したが、計測結果ではシフト量に変化はなかった。このことから、気体分子を2つ同時に取り込むような大きな隙間は無いと考えられ、発光する一重項酸素の溶媒和環境には影響がなく、スペクトルシフト量に CO₂ 添加の効果が現れなかったと解釈した。

ここまでの研究では、CO₂ の分圧 0.5 atm での影響について調べた。今後は、CO₂ 溶存濃度がイオン液体中の隙間の数に相当するような条件となる CO₂ 分圧 50 atm 程度での近赤外分光計測を行い、CO₂ の空隙への溶解の影響を一重項酸素の発光をプローブとして解明する。

おわりに

本研究では、液体内に空隙をもつと考えられる2種類のイミダゾリウム系イオン液体 [Bmim][Tf₂N] および [Bmim][Nf₂N] について、その空隙を理解するに資する情報を一重項酸素の近赤外発光ピークシフトに基づいて収集した。2種類のイオン液体のうち、比較的小さい [Bmim][Tf₂N] では、もともと液体中の隙間が小さいため、溶存 CO₂ による一重項酸素りん光のピークシフトへの影響はわずかしき起こらないと予測した。一方で隙間の大きな [Bmim][Nf₂N] では、ピークシフトの屈折率に対する相関からのズレに大きな変化があると予測した。しかしながら、溶存 CO₂ による酸素分子の溶媒和への影響は、どちらのイオン液体でもほとんど見られなかった。この結果を踏まえ、今回の実験条件ではイオン液体中の溶存 CO₂ は O₂ と同じ隙間にはほとんど入らず、空隙中に O₂ が半ばガス状で存在しているとするモデルに変化がない、と考察した。

本研究ではアニオンの分子サイズによる溶存 CO₂ の影響は見られなかったが、CO₂ 濃度を上げるなど今後も隙間に着目した研究を進めることで、イオン液体中の溶質分子の運動や、O₂ や CO₂ などの気体分子のイオン液体への溶解に関する理解が深まるであろう。

謝辞

本研究は、2022 年度総合理学研究所の共同研究助成 (RIIS202202) によって行なわれた。

文献

- 1) Wilkes JS and Zaworotko MJ (1992) Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Chem. Commun.* 965-967.
- 2) Welton T (1999) Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. *Chem. Rev.* **99**: 2071-2083.
- 3) Wasserscheid P and Keim W (2000) Ionic liquids -New "Solutions" for transition metal Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3772-3789.
- 4) Weingartner H (2008) Understanding Ionic Liquids at the Molecular Level: Facts, Problems, and Controversies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**: 654-670.
- 5) Armand M, Endres F, MacFarlane DR, Ohno H and Scrosati B (2009) Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nat. Mater.* **8**: 621-629.
- 6) Yamagata M, Tanaka K, Tsuruda Y, Sone Y, Fukuda S, Nakasuka S, Kono M and Ishikawa M (2015) The First Lithium-ion Battery with Ionic Liquid Electrolyte Demonstrated in Extreme Environment of Space. *Electrochemistry*. **83**: 918-924.
- 7) Makino T, Sakurai M and Kanakubo M (2013) Solubilities of gases in ionic liquids and its applications to separation processes. *J. Vac. Soc. Jpn.* **56**: 88-96.
- 8) Huang X, Margulis CJ, Li Y and Berne B (2005) Why Is the Partial Molar Volume of CO₂ So Small When Dissolved in a Room Temperature Ionic Liquid? Structure and Dynamics of CO₂ Dissolved in [Bmim]⁺[PF₆⁻]. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 17842-17851.
- 9) Wessels J.M and Rogers M.A.J (1995) Effect of Solvent Polarizability on the Forbidden ¹Δ_g → ³Σ_g⁻ Transition in Molecular Oxygen: A Fourier Transform Near-Infrared Luminescence Study. *J. Phys. Chem.* **99**: 17586-17592.
- 10) Yoshida T, Okoshi M and Kawai A (2021) O₂ solvation cavity in voids of ionic liquids studied by the solvatochromic red shift of O₂(¹Δ_g) phosphorescence. *J. Chem. Phys.* **155**: 234503.
- 11) Anderson JL, Dixson JK and Brennecke JF (2007) Solubility of CO₂, CH₄, C₂H₆, C₂H₄, O₂ and N₂ in 1-Hexyl-3-methylpyridinium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide: Comparison to Other Ionic Liquids. *Acc. Chem. Res.* **40**: 1208-1216.

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

進化するベシクル型人工細胞の基盤となる カチオン性自己生産ベシクルの集団計測

阿部真也¹ 松尾宗征^{2,3} 菅原 正⁴ 鈴木健太郎^{1,4,5,6}

Population Analysis of Self-reproducing Giant Vesicle Consisting of
Cationic Amphiphiles towards Model-protocell Providing Evolvability

Sinya Abe¹, Muneyuki Matsuo^{2,3}, Tadashi Sugawara⁴ and Kentaro Suzuki^{1,4,5,6}

¹ Graduate School of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

² Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan.

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima City, Hiroshima 739-8526, Japan.

⁴ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

⁵ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

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

Abstract: Using Z-stack observations of laser scanning confocal fluorescence microscopy, population analysis of self-reproducing cationic giant vesicles (GVs) dispersing into buffered saline for an enzymatic reaction, which is the major component of GV-based model-protocell, was performed. After addition of the precursor of the membrane molecule, the number of GVs showed a 4-times increase, and the diameters of GVs increased from 1-2 to 3-4 μm before addition of the precursor. This behavior can be explained by a cell-like auxesis and self-division of the self-reproducing GVs caused by the chemical reaction to produce the membrane molecule constructing GV themselves from the membrane precursor assisted by the lipophilic catalyst placed into the vesicular membrane. This interpretation is consistent with a previous report employing a combination of optical microscopy observation and flow-cytometry (FCM). This new analysis, which can be performed using only optical microscopy and not FCM, which requires special experimental conditions optimizing GV, facilitates rapid measurement for optimization of the conditions for construction of the GV-based model protocell, which can evolve spontaneously.

Keywords: giant vesicle, self-reproduction, model-protocell, amphiphile, laser scanning confocal fluorescence microscope

序論

脂肪酸やリン脂質のような両親媒性分子は、水中での自己集合化により、細胞膜によく似た脂質二分子膜構造を構築する。これが袋状に閉じたものはベシクルと呼ばれ^{1,2)}、なかでも、細胞と同程度の数十マイクロメートルの大きさを持つものは、ジャイアントベシクル (GV) とよばれる。GV 内部には、膜によって隔てられた内水相があり、さまざまな物質を封入できる。内部に有用な化学反応を内封し、自ら増殖する人工の GV を構築できれば、細胞として

の最低限の機能を備えたモデル人工細胞の構築につながる³⁾。高倉は、膜内に酸触媒を担持したカチオン性 GV に、酸触媒の作用によってカチオン性膜分子へと変換される膜分子前駆体とを利用して、自ら肥大・分裂して数を増やす「自己生産 GV」の構築に成功した^{4,5)}。さらに、ここで用いたカチオン性膜分子を含む GV 内部で情報分子としての DNA を自己複製することで「ベシクル型人工細胞」⁶⁾が開発された。内封 DNA の持つ情報を活用し、現実の細

胞のように競争による進化可能なモデル人工細胞⁷⁾を実現するためには、基盤となる自己生産 GV の持つ特性の、より詳細な理解が不可欠である。

分子と比較して遙かに巨大な GV を対象とする研究においては、個別の GV を対象とした光学顕微鏡による実時間計測が必要である。しかしながら、一回の測定で数時間が必要な自己生産 GV では、統計的な評価に必要な計測数を稼ぐことが難しい。多数の生体細胞の集団的な基礎情報を引き出すために開発されたフローサイトメーター (FCM) を利用することで、短時間のうちに数万もの多数 GV に関する情報を引き出すことも可能ではある⁸⁻¹¹⁾。しかしここから得られる情報は、散乱光や蛍光強度に帰属されるものに限られるので、その解釈には、顕微鏡計測をはじめとする別種の計測が不可欠である。

最近我々は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSCM) の持つ、焦点面内だけでなく、奥行き方向に対しても補償される高い空間分解能に着目し、個別計測と集団計測の双方の特徴を併せもった測定法を開発しつつある⁷⁾。本共同研究では、この測定法を応用し、ベシクル型人工細胞を構築するうえで基礎となるベシクル型人工細胞に、外部から膜分子前駆体を添加した際のダイナミクスについて測定および解析を行い、これに DNA のような情報分子を組み合わせた進化するベシクル型人工細胞に繋がる情報を引き出すことを目指した。

材料と方法

試料

膜分子前駆体 V*、膜分子 V および膜親和性触媒 C (図 1) は、すでに報告した方法により合成し⁴⁾、その純度は、観測前に ¹H NMR 測定により確認した。LSCM に必要とされる蛍光色素として、市販の蛍光性リン脂質 BODIPY-HPC (B) (D3792, Invitrogen) をそのまま利用した。ベシクル分散媒として用いた緩衝液は、KOD-plus[®] 用緩衝液 (東洋紡) を用いた。

ベシクル分散液の調製

ガラス容器表面に、V、C、B をそれぞれ 9:1:0.1 のモル比で含む乾燥薄膜を調製し、これに、膜全体の濃度が 1 mM となるような体積の KOD-plus[®] 用緩衝液を加えた。軽く振盪後、室温に設定した恒温器中で一時間以上静置し、顕微鏡観察用の GV 分散液を得た。なお、得られた試料の一部を位相差顕微鏡観察することで、観察に適したベシクルが形成されていることを確認した。

また、GV 分散液に加える V* 溶液として、V* を KOD-plus[®] 用緩衝液にとかした溶液 (4 mM) も別途

調製した。

プレパラートの調製

エッペンドルフチューブ中に、前項で調製した GV 分散液と V* 溶液を 1:1 の体積比であわせ、良く攪拌した。この混合液を、9 mm × 9 mm の矩形孔を持った、容積 25 uL のスぺーサー (フレーム密閉スライドチャンバー #SLF0201, BIO-LAD) を貼付したカバーガラスに満量加え、もう一枚のカバーガラスで封じて、観察用プレパラートとした。また、V* 溶液を含まない緩衝液を 1:1 で混合した対照試料もあわせて調製した。

観察と解析

恒温器内で 15 時間静置したプレパラートを、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss) のステージ上に置き、プレパラート内のベシクルについて観察を行った。スぺーサー中央付近およびスぺーサーの四隅近傍の 160 μm × 160 μm を観察領域とし、それぞれに対して、プレパラート底面から、最上部までの約 300 μm を、5 μm の間隔で Z-stack 測定した (図 2A)。画像解析ソフト Image J Fiji¹²⁾ を利用した画像解析については、本文中に示した。また、顕微鏡観察におけるサイズに関する情報は、LSM700 の制御ソフト ZEN (Carl Zeiss) から得られる情報を利用した。

結果

試料調製条件の選定

自己生産 GV を構築する分子群を図 1 に示す³⁾。

はじめに自己生産 GV を開発した高倉は、分散媒として純水 (イオン交換水) を用いている³⁾。一方で、これを発展させたベシクル型人工細胞⁶⁾ では、GV 内部で酵素反応 (PCR) による DNA 複製を行う都合から、重合酵素の至適条件に合わせた緩衝液 (KOD-plus[®] 用緩衝液 : pH8-9 程度の Tris[®] 塩酸緩生理食塩水) が用いられる。そこで、ベシクル型人工細胞系

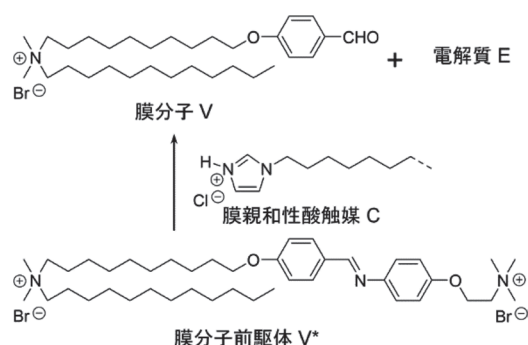


図 1. 自己生産ベシクルを構成する主要な分子. 図中で省略されている触媒 C のアルキル鎖の炭素数は 18.

への展開を視野に入れた本研究で用いる分散媒として、同緩衝液中を選択した。緩衝液中に含まれる、生理食塩水に近い濃度の電解質の効果により、純水中で調製したGVと性状が大きく異なる可能性がある。そこで、同緩衝液中でカチオン性膜分子VからなるGVを調製し、光学顕微鏡で観察した結果、純水中で調製した場合と類似した、ミエリン状GV（タマネギ状に多層の膜が積層したGV）の形成を確認した。

レーザー走査型共焦点顕微鏡観察

緩衝液中で調製された、Cを含むカチオン性Vからなるミエリン状GV分散液に、膜前駆体であるV*溶液を添加後15時間経過した試料について、LSCMにより観察した(図2A)。なお、今後時点でのGV構成分子と、添加したV*の濃度は、それぞれ、0.5 mMと2 mMである。

これまでの研究から、本条件に近い実験条件では、反応は半日以内に平衡状態に至っていることから、観測時点で試料中におけるGVダイナミクスは終了しており、一時間程度を要する観測中に計測に影響を与えるような大きな状態変化は起こらないものと考えられる。

画像解析によるGVの計数

材料と方法に示した方法で、同一プレパラート内の、5箇所(底面(160 μm \times 160 μm)および高さ(300 μm)の四角柱状の観測領域に対し5 μm の高さ間隔で、Z-stack測定を行った。これにより得られた、LSCM画像(各試料あたり、300枚程度)それぞれに対し、Image J Fiji¹⁾により、以下のような解析を

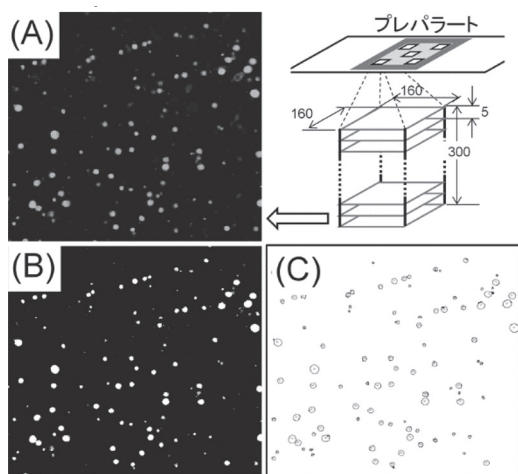


図2. (A) LSCMによる自己生産GVの集団計測の概念図(右、図中の単位は μm)と、観測された顕微鏡像の例(左、画像の一边は160 μm)。 (B) 二値処理後の顕微鏡像。 (C) 計数を行う画像。

行った。

得られた蛍光画像を二値処理し(図2B)、得られた粒状の構造体に対し、その数およびサイズに関する情報を獲得した(図2C)。ここで、粒径1 μm を下回るGVは、その直径から期待される内部体積は小さく、人工細胞を視野に入れた研究では、酵素反応に必要な十分な場を確保できない¹⁾。本系で対象とするGVは明確な内水相は持つものではないが、従来の研究に倣い、1 μm を下回るGVについては計数対象にしないこととした。また、画像の外周をまたぐ位置に存在するGVについては、正しいサイズを求めることが出来ないため、これらを除外するオプションを利用した。

討論

膜分子前駆体添加によるGVサイズ分布の変化

V*添加によるGVの個数変化について図3に示す。V*を添加した試料では、一視野あたり平均99個のGVが観測された。これに対し、V*を含まない緩衝液を加えた試料での平均個数は25個であった。次項で議論するように、分散液中に含まれるGVの主要なサイズは、Z-stackの測定間隔より小さいため、四角柱状の観測領域に含まれるすべてのGVを計数するものではないが、長時間の静置により、両試料とも類似した沈降平衡に至っていると見なせるので、この個数は、試料に含まれるGV全数を反映した量であると見なせる。

自己生産ダイナミクスによるGVサイズ変化

変化前後のGVサイズに着目すると、V*を添加しなかった試料で観測されたGV直径の最頻値は1-2

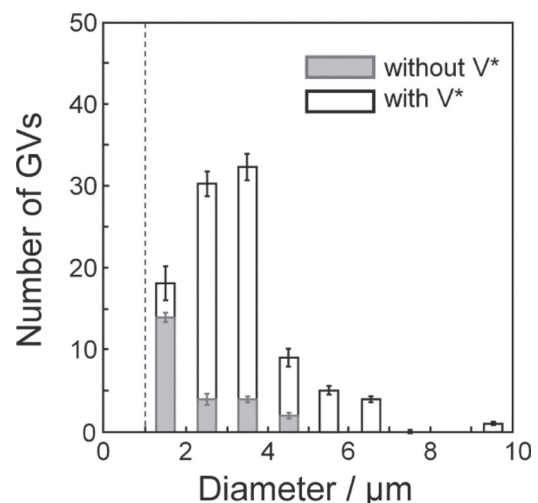


図3. 自己生産GV分散液に、V*溶液あるいはV*を含まない緩衝液を添加し、15時間経過した試料の顕微鏡視野内に含まれるGVのサイズ分布。図中のエラーバーは標準誤差を表す。

μm であった。一方、 V^* を添加した試料では3-4 μm に増大し、さらに、 V^* を添加しなかった場合にはほとんど観測されることがなかった5 μm を超えるGVも、十分な頻度で観測されるようになった。

分散液中のGVは、その中心で焦点面を跨ぐとは限らないので、観察された直径は、そのままGV粒径と見なすことは出来ない。しかし、GV粒径が増せば、それに比例して観測されるGV半径も増加するので、ここで得られた変化は、 V^* によるGV粒径増大に関連した量として取り扱うことが出来る。

集団計測結果から読み取るGVダイナミクス

もし、肥大することなくGVが分裂した場合、新たに出現したGVの粒径はもとより小さくなる。それに対し、個数増加と同時にサイズ増大も観察される(図3)ことから、本GVは肥大と分裂が共に起こったと解釈される。GVに V^* を添加すると、膜内の酸触媒Cの効果により V^* のイミン結合部位が加水分解が効率的に進み、膜構成分子であるVとなる(図1)。これがGVに取り込まれGVを構成する膜分子Vの総数が増やし、GVのサイズ増大(肥大)の原因となる⁴⁾。GVが肥大した後で分裂したのか、あるいは、分裂後に肥大したのかについては本研究の結果からは判断できないが、どちらの可能性も起こりうることは、すでに報告している¹⁰⁾。

自己生産過程において、初期試料にみられる稠密なミエリン状GVのまま、ほぼ倍の大きさとなり、それと同時にその数が約4倍にまで増加すると、全GV内部体積の総和は初期の30倍以上と見積もられる。しかしながら、本実験で加えた膜分子前駆体 V^* の総量は、GVを構成する膜分子Vの4倍にすぎない。薄膜法により人工的に形成されたGVと、化学反応を介して自己集散的に形成されるGVとの間には性質に違いがあり¹⁰⁾、 V^* 添加後に生じるGVには、初期にはあまり含まれない、明確な内水相を持った多層膜GVが含まれることが知られている⁹⁾。従って、今回得られたGVの個数増大とサイズ変化は、まさに自己生産GVの特徴を捉えたものであると解釈できる。

おわりに

今回の研究では、DNA複製とベシクル自己生産が連動して引き起こされるベシクル型人工細胞において重要な構成要素である、カチオン性自己生産ベシクルの集団挙動を、空間分解能に優れたLSCMを利用して、簡便に解析することを目指した研究を行った。組成や形状に小さくない揺らぎを内在するGVを対象とする観察では、ある瞬間の画像から、撮影より

前のGVの経歴を知ることは難しい。そのため、実験開始直後から終了までの連続観察や、FCMによる集団計測が不可欠であった。それに対し、LSCMの優れた空間分解能を利用することで、変化前と変化後の二点の観測測定のみからでも、従来の観測結果に矛盾しないGVの変化の様子を引き出せることが、今回の研究から示された。

今後、多様な条件検討が必要とされる、ベシクル型人工細胞の研究を進める上で、研究の遂行速度の向上に繋がる重要な実験結果と言えるだろう。

謝辞

本研究は、研究課題「進化能の実装を目指した混合DNA内封ベシクル型人工細胞」に対する2022年度総合理学研究所の共同研究助成(RIIS202203)によって行われた。

文献

- 1) Dimova R and Marques CM (2019) *The Giant Vesicle Handbook*. CRC Press, Boca Raton.
- 2) Walde P, Cosentino K, Engle H and Stano P (2010) Giant Vesicles: Preparation and Applications. *Chem-BioChem* **11**: 848-865.
- 3) Szostak JW, Bartel DP and Luisi PL (2001) Synthesizing Life. *Nature* **409**: 387-390.
- 4) Takakura K and Sugawara T (2004) Membrane Dynamics of Myelin-like Giant Multilamellar Vesicle Applicable to a Self-Reproducing System. *Langmuir* **20**: 3832-3834.
- 5) Suzuki K, Toyota T, Takakura T and Sugawara T (2008) Sparkling Morphological Change and Spontaneous Movements of Self-assemblies in Water Induced by Chemical Reaction. *Chem. Lett.* **38**: 1010-1015.
- 6) Kurihara K, Tamura M, Shohda K, Toyota T, Suzuki K and Sugawara T (2011) Self-reproduction of Supramolecular Giant Vesicles Combined with the Amplification of Encapsulated DNA. *Nat. Chem.* **3**: 775-781.
- 7) Matsuo M, Hirata Y, Kurihara K, Toyota T, Miura T, Suzuki K and Sugawara T (2020) Environment-Sensitive Intelligent Self-Reproducing Artificial Cell with a Modification-Active Lipo-Deoxyribozyme. *Micromachines* **11**: 606-623.
- 8) Sato K, Obinata K, Sugawara T, Urabe I and Yomo T (2006) Quantification of Structural Properties of Cell-sized Indivisual Liposomes by Flow Cytometry. *J. Biosci. Bioeng.* **102**: 171-178.
- 9) Toyota T, Takakura T, Kageyama Y, Kurihara K, Maru N, Ohnuma K, Kaneko K and Sugawara T (2008) Population Study of Size and Components of Self-Reproducing Giant Multilamellar Vesicles. *Langmuir* **24**: 3037-3044.
- 10) Kurihara K, Takakura K, Suzuki K, Toyota T and Sugawara T (2010) Cell-sorting of Robust Self-reproducing Giant Vesicles Tolerant to a Highly Ionic Medium. *Soft Matter* **6**: 1888-1891.

- 11) Shohda K, Tamura M, Kageyama Y, Suzuki K, Suyama A and Sugawara T (2011) Compartment Size Dependence of Performance of Polymerase Chain Reaction inside Giant Vesicles. *Soft Matter* **7**: 3750-3753.
- 12) Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P and Cardona A, (2012) Fiji: An Open-source Platform for Biological-image Analysis. *Nat. Methods* **9**: 676-682.

■原 著■

有尾目両生類イベリアトゲイモリの外鰓の 形態形成における Sonic hedgehog シグナル伝達経路の役割について

桃井 環^{1,3} 豊泉龍児^{1,2}

Study on the Role of the Sonic hedgehog Signaling Pathway in the
Morphogenesis of Urodelan External Gills

Tamaki Momoi^{1,3} and Ryuji Toyozumi^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: tmk.momotaro@gmail.com

Abstract: Developing external gill of the urodelan larva is a good model for the study of the organogenesis of vertebrate respiratory organ. We can observe the entire process of the branching morphogenesis of the newt external gills non-invasively, so the newt gills are amenable to experimental manipulations and/or pharmacological treatments. In this study we examined the role of sonic hedgehog signaling for the external gill branching morphogenesis using an emerging model organism, Iberian ribbed newt (*Pleurodeles waltl*). We found that administration of the sonic hedgehog inhibitor SANT-1 markedly reduced the number of fine gill filaments (fimbriae), and the direction of the protrusion of the gill stems (rachises) shifted toward the anterior more than the intact ones, resulting in the radial expansion of the three pairs of the gill stems. Immunohistochemistry targeting the striated muscles revealed that the fasciculation of the gill muscles in the posterior portion within the gill stems in normal larvae was impaired after the administration of the sonic hedgehog inhibitor. Based on these results, we propose that gill primordia develop to protrude the fine gill filaments in their posterior portions in reference to the sonic hedgehog signaling-dependent antero-posterior polarity within developing gills.

Keywords: newt, larva, external gill, branching morphogenesis, sonic hedgehog, FGF

序論

脊椎動物の鰓は咽頭弓由来の構造であり、水生生物が外環境から酸素を取り入れるために必要な呼吸器官である。魚類の鰓は咽頭部の膨出とそれに応じた体表の陥入によって形成され、左右に5-7対ある鰓裂と呼ばれる開口の境界には咽頭嚢、そして鰓弓が発達する。各々の鰓弓の外側には多数の細かなひだである鰓弁が2列に並び、ここがガス交換の場となる。軟骨魚類では、その一部を除き、各鰓弓の鰓弁の間に鰓隔膜が介在し、これが長く伸び体表まで達することで複数の鰓孔を形成する。硬骨魚類においては鰓隔膜は退化し、鰓が収納される鰓腔の外側を鰓蓋が覆って1つの鰓孔を形成、鰓は内在化する¹⁻⁵⁾。

両生類において鰓は主に幼生期でみられる。無尾両生類の場合、例えばアフリカツメガエル *Xenopus laevis* は st. 23 までに鰓部が顎から溝によって完全に分離したのち、個々の鰓がおそらくは細胞増殖の主導によって突出をする。伸長した鰓は st. 37/38 には分枝し始めるが、st. 42 に鰓蓋形成が始まってからは内鰓化する⁶⁾。一方で有尾両生類の鰓は内在化せず、変態によって鰓を消失するまでは外鰓を持つ(図1)。有尾両生類イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* は st. 27 で鰓部が3対の鰓原基に応じた隆起に分かれ、st. 30 で突出し、両側面の斜め後方へと

伸長を始める。st. 31 以降には血液循環を伴いながら外鰓の発生が進み、st. 33 で外鰓主枝 (rachises) の後方で細く長い細枝 (fimbriae) の形成が始まり、細枝はその数を増やしていく (図 2)⁹⁾。鰓が内在化する真骨魚類や無尾目両生類とは異なり、鰓が外鰓として外側に突出するイベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* の外鰓の様態は、人工淡水内での顕微鏡観察により実験室内で容易に長期間の観察が可能である。

肺の複雑な形態形成は、上皮と間充織の相互作用により成り立つ

一方、私たちヒトは肺呼吸をする動物である。肺の原基は、内胚葉と内臓中胚葉 (visceral mesoderm) からなる消化管前腸部の食道・呼吸器形成領域の腹壁の憩室として出現する。そして内胚葉由来の呼吸上皮の起源組織と、それを覆う内臓中胚葉由来の間充織は左右に膨出し、マウス胚においては 9.5 dpc (交配後 9.5 日目) で肺芽を形成する。その後、pseudoglandular stage (偽腺 (状) 期) と呼ばれる 9.5–16 dpc に肺芽の伸長ならびに肺上皮の最初の細枝が生じ、以降の canalicular stage (管状期) と次の saccular stage (嚢状期) と呼ばれる時期には、複数回の分枝と終末部での毛細血管の並置が生じ、機能的な肺へと発達する⁸⁾。

この肺の形態形成には上皮と間充織の相互作用が関わっている。肺の器官形成期の胎仔では、気管の

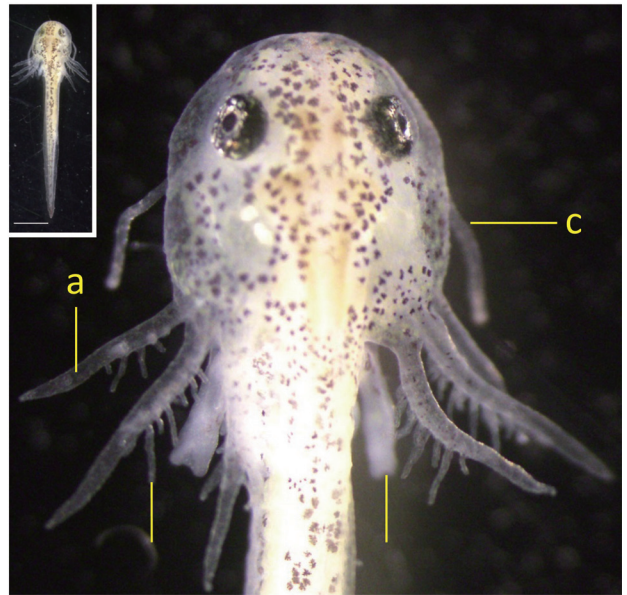


図 1. イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* 幼生 (st. 37) の正常発生個体の頭部写真。左右 3 対の外鰓主枝 (a) の後方からは多くの細枝 (b) が形成される。外鰓よりも前方には平衡を保つためのバルンサー (c) が形成され、胴体部前方からは前肢 (d) が発達する。呼吸器官である外鰓の形態形成は人工淡水中で非侵襲的に観察可能であり、哺乳類の肺が子宮内の胎仔の深部で発生するのは対照的である。Bar, 2mm.

周辺の間充織は肺上皮先端部の成長と分枝を抑制する一方、気管の上皮は、肺の先端間充織との相互作用により、分枝形成が誘導されることが移植実験により示されている⁹⁻¹¹⁾。

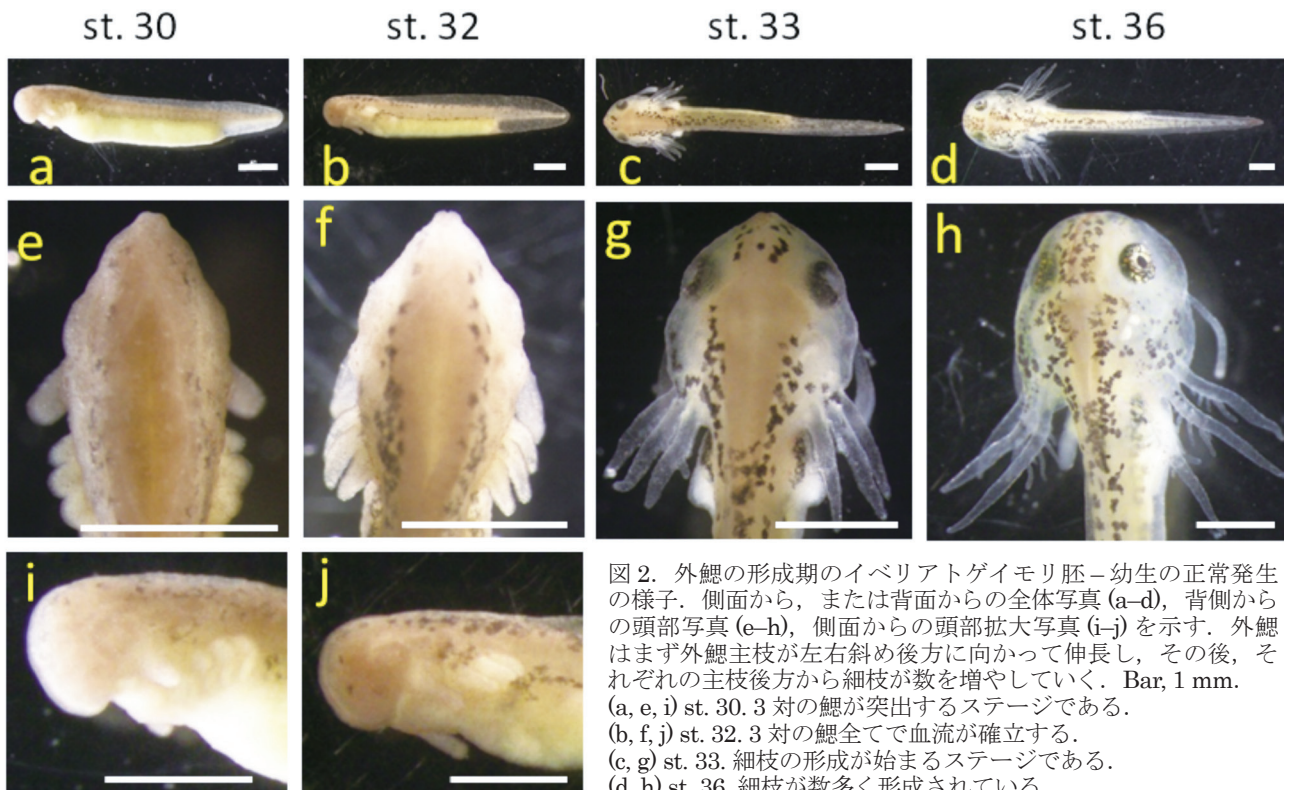


図 2. 外鰓の形成期のイベリアトゲイモリ胚-幼生の正常発生の様子。側面から、または背面からの全体写真 (a-d)、背側からの頭部写真 (e-h)、側面からの頭部拡大写真 (i-j) を示す。外鰓はまず外鰓主枝が左右斜め後方に向かって伸長し、その後、それぞれの主枝後方から細枝が数を増やしていく。Bar, 1 mm. (a, e, i) st. 30. 3 対の鰓が突出するステージである。(b, f, j) st. 32. 3 対の鰓全てで血流が確立する。(c, g) st. 33. 細枝の形成が始まるステージである。(d, h) st. 36. 細枝が数多く形成されている。

哺乳類の肺原基において、上皮間充織相互作用を主に仲介するのはペプチド性シグナル伝達分子である。例えば、FGF10（繊維芽細胞増殖因子 10）は肺原基中胚葉（肺間充織）に特異的な発現をする。*fgf10* がノックアウトされたマウス胎仔では肺芽が形成されないことが報告されている¹²⁾。また、肺上皮単独の器官培養系において、FGF10 を含ませた微小なビーズを単離した肺原基から少し離れたところに置くと肺上皮はビーズに向かう伸長を示し、*fgf10* は上皮の細胞増殖と細胞移動、すなわち肺上皮の間充織側への突出を促すことが示唆された。一方、*bmp4*（骨形成因子 4）は肺の先端上皮とその周辺の間充織で発現するが、*fgf10* の肺先端部間充織での発現によって誘導される。複雑なことに、この肺上皮の単離培養系において、FGF10 によって誘導された BMP4 は FGF10 の作用を抑制するフィードバック的な働きを持つことが示されている。このように、肺間充織に局所的に発現する FGF10 が隣接する上皮の伸長を誘導し、後述のように BMP4 や他の分泌因子である Wnt や Shh とともに遺伝的カスケードを形成することで、正確な分枝が制御される^{13,14)}。

マウス肺上皮に発現する *shh* は、有尾目外鰓でもその形態形成に役割を担うか

bmp4, *fgf10* に加えて、マウスの肺上皮には *sonic hedgehog (shh)* が発現し、特に肺上皮の終末部先端で強い発現を示すことが知られている^{14,15)}。肺の器官培養系において Shh を投与すると肺間充織での *fgf10* 発現が抑制される。肺の先端上皮で発現する *surfactant protein-C (SP-C)* のプロモータ領域を用いて肺上皮終末部で *shh* を過剰発現させると、間充織細胞の増殖が増加し、それに付随した上皮拡張の欠落が生じたことが報告されている¹⁶⁾。一方 *shh* をノックアウトしたマウスでは、気道と消化管が瘻孔様の融合を伴って不分離となり、更には肺葉形成の欠落、上皮の分枝形成の欠落等の表現型が生じたことが報告されている¹⁷⁾。また *shh* ノックアウトマウスにおいては、肺間充織での *fgf10* の発現がその基部側にまで拡張することから、*shh* が *fgf10* を先端間充織内に限局する可能性が示されている¹⁷⁾。

shh はショウジョウバエから見つかった *hedgehog (hh)* の脊椎動物における相同遺伝子 (ortholog) であり、脊索前板で発現することによって眼予定領域を 2 つに分けるほか、脊索、ついで神経管の底板に発現することによって細胞の運動ニューロンや介在ニューロンなどへの分化運命を決定するといったモルフォゲン（形原）としての役割を持つ。さらに四肢動物の発生の後期には枝芽において後方間充織の

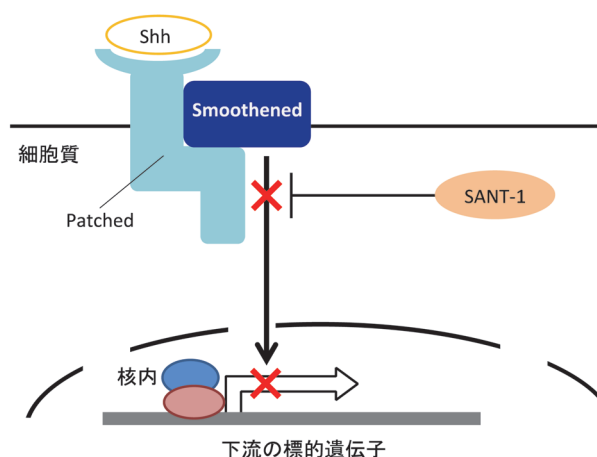


図 3. Shh シグナル伝達経路と Shh シグナル特異的の阻害剤 SANT-1 の作用機序の概要。本研究で阻害剤として使用した SANT-1 は、Shh 受容体である膜貫通型蛋白質の Smoothened に特異的に結合し、その働きを抑制する。Shh リガンド存在下では、下流の細胞内シグナルトランスデューサーとして機能する転写因子 Gli は核内に移行し転写活性化因子として働く。しかし、SANT-1 によって Smoothened の働きが抑制されると、Gli は転写抑制因子として働く。

領域である ZPA (zone of polarizing activity; 極性化活性帯) で働くことで、枝芽の前後軸を規定する¹⁸⁾。枝芽の指骨のパターン形成にも Shh は関与する。

Shh 分子はペプチド性の細胞間コミュニケーション分子であり、そのシグナル伝達経路は細胞膜上の受容体である Patched に受容されることで機能する (図 3)。Patched は Shh リガンド不在下では 7 回膜貫通蛋白質の Smoothened の抑制因子として働く。Shh が Patched に結合してない状態では下流の Gli は Cos2 と Fused によって微小管に繋留している。繋留された Gli は PKA と Slimb により切断 (shedding) を受け、切断された Gli は下流の標的遺伝子のシスエレメントに結合して転写抑制因子として働く。しかし Shh が Patched に結合すると Patched の立体構造が変化し、Patched と Smoothened は解離し、結果として Smoothened は抑制を解除される。Smoothened はおそらく Fused や Cos2 をリン酸化することにより Gli を微小管から解離させ、PKA と Slimb による Gli の分解を抑制する。切断されないフルサイズの Gli は核内に移行後、CBP と結合することで、下流の標的遺伝子に対して今度は転写活性化因子として働く。

ゼブラフィッシュにおいて *shh* は咽頭弓の分節前の発生段階である約 30 hpf (受精後 30 時間後) から咽頭内胚葉から派生する口腔上皮を含む咽頭上皮で広く発現する。*Xenopus laevis* においても脊索や中枢神経系の腹側領域のほか、咽頭弓で発現がみられることが知られている¹⁹⁾。

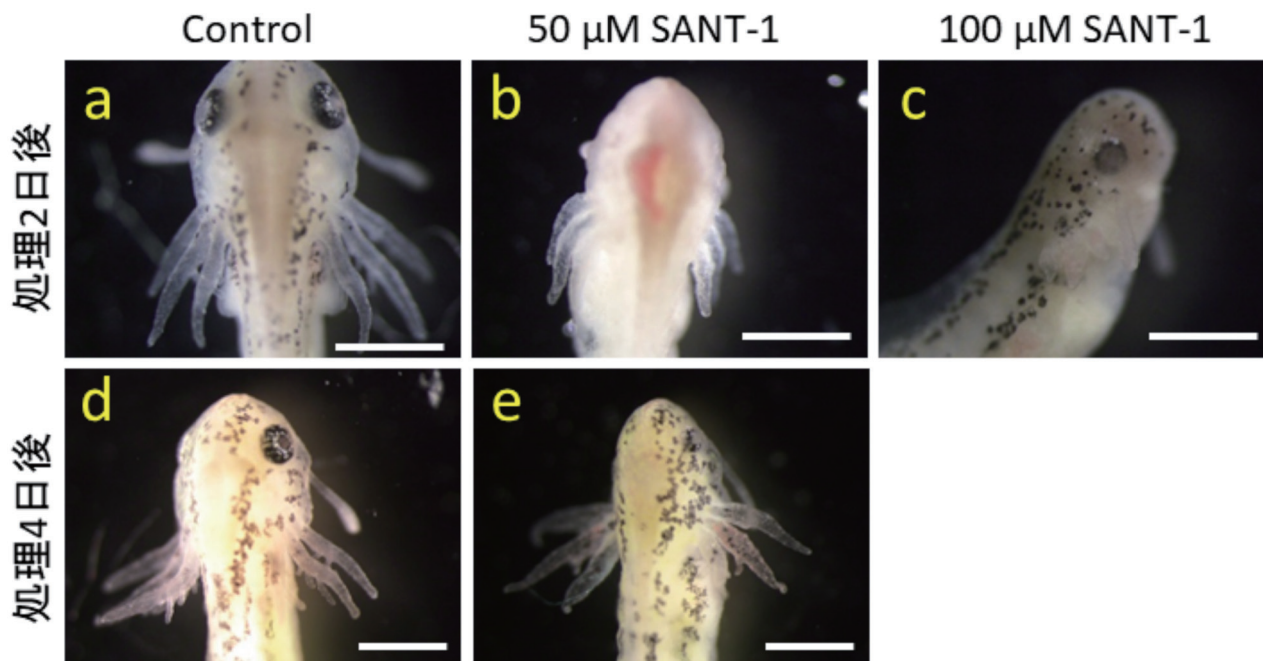


図 4. 外鰓伸長期から Shh シグナル伝達経路特異的阻害剤 SANT-1 を投与したイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓の形態形成の変化. Bar, 1 mm. SANT-1 を外鰓伸長期の st. 30 から 2 日間、幼生に投与し、2 日後 (b, c) と 4 日後 (e) に撮影した。実験を通じて 24°C で飼育した。

(a, d) 対照群となる 1% DMSO (中間溶媒) のみで処理した同腹幼生. (b, e) 50 μ M SANT-1 処理後の幼生. 外鰓主枝の伸長がやや抑制された. 外鰓主枝は太く形成され、より前方に向かって伸長し、結果的に放射状に形成された. 鬱血が外鰓や頭部で見られたほか、細枝数の大幅な減少が見られた. (c) 100 μ M SANT-1 処理後の幼生. 外鰓の伸長の抑制がさらに強く表れた. この濃度の処理では、全ての処理個体が 3 日後には死亡した。

イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* は 20 世紀半ばに発生段階表が発表された²⁰⁾。その後の発生段階表の改訂⁷⁾を経つつ、*Pleurodeles waltl* は、四肢再生研究等において、古くから実験発生学的研究に用いられてきた古典的なモデル有尾両生類である。しかし有尾目の外鰓の形態形成に関する研究はほとんど行われておらず、未解明な点が多い。また、有尾目の外鰓における *shh* の発現パターンは知られていない。本研究は *Pleurodeles waltl* の外鰓の形態形成について、特に Shh 経路に焦点を当ててその役割を解明することを目的とした。外鰓形成期の *Pleurodeles waltl* 胚を Shh 経路の特異的な阻害剤に暴露することによってその影響を調査した。得られた実験結果をもとに、有尾目両生類外鰓の形態形成における細胞間コミュニケーション分子である Shh の役割について議論する。

更に、イベリアトゲイモリ外鰓の形態形成に阻害剤が及ぼす薬理活性のスクリーニングの過程で、FGF シグナル伝達経路阻害剤として有名な SU5402 に鬱血等をもたらす作用を見いだしたので、これについても報告する。上述のように肺において、また唾液腺においても、FGF はそれらの上皮の分枝形態形成において主導的な役割を担う分子である^{21, 22)}。有尾目の外鰓において FGF シグナル伝達経路の果た

す役割についても考察の項で議論した。

材料と方法

実験動物

実験材料であるイベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltl*) 胚は、雌雄の成熟個体を同一水槽内に入れ、ペアリングをすることで得た。得られた胚は 2.5% メルカプト酢酸ナトリウム (チオグリコール酸ナトリウム, pH9.0; FUJIFILM-Wako) 水溶液で脱ゼリーし、人工淡水 (10% Steinberg 氏液) 中で 16–24°C で飼育し、目的の発生段階になるまで発生させた。発生段階は Shi and Boucaut (1995) の発生段階表により同定した⁷⁾。

免疫染色に用いるサンプルは 4% ホルマリン / リン酸緩衝液 (PBS) により固定し、使用するまで 4°C で保存した。

イベリアトゲイモリ胚の SANT-1 への暴露

Shh 経路の阻害剤として SANT-1 [(4-Benzylpiperazin-1-yl)-(3,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-amine](C₂₃H₂₇N₅, MW 373.49, CAS Number 304909-07-7, Sigma-Aldrich) を用いた (図 3)。SANT-1 は膜貫通型蛋白質である Smoothened を阻害することで Shh 経路の働きを抑制する。

SANT-1 を両親媒性分子である DMSO (dimethyl sulfoxide) に溶解したのち、DMSO が終濃度 1% 未満かつ SANT-1 が目的の濃度になるまで人工淡水 (10% Steinberg 氏液) で希釈した。この操作により、100 μ M と 50 μ M の SANT-1 溶液を作成した。これらの濃度は我々の先行研究で使用され、実際に効果が得られた条件をもとに決定した。Organ culture dish 内に SANT-1 溶液を 2 mL 分注し、さらに st. 30 または st. 32 まで発生させたイベリアトゲイモリ胚を 8 個体ずつ投入した。また、1% DMSO/人工淡水による処理を対照群とした。これらの胚を 24°C インキュベータ内の湿箱に置き、40 rpm 程度で 2 日間振盪したのち SANT-1 処理の影響を観察した。観察後、他の器官への影響を避けるために洗浄し、6 穴プレート内の人工淡水に処理胚を移行した。その後さらに 2 日経過した処理開始後 4 日目に SANT-1 処理の影響を再び観察した。

12/101 抗体による筋肉の免疫染色

免疫染色用に固定したサンプルを 100% メタノールに置換し、5 分間振盪した。これを 2 回繰り返した。その後 75%、50%、25% のメタノールを含む PBST (0.1% Tween20/PBS) に順に置換、各々 5 分間振盪してから PBST に置換し 5 分間、2 回振盪することで水和した。3% スキムミルクを含む PBST 中に 1 時間静置したのち 100 倍希釈した 12/101 抗体と 3% スキムミルクを含む PBST によって一次抗体反応を 4°C で一晩行った。翌日 PBST により 20 分間 5 回の振盪しながら洗浄したのち、3% スキムミルクを含む PBST 中に 1 時間静置し、200 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体と 3% スキムミルクを含む PBST によって二次抗体反応を 4°C で一晩行った。翌日 PBST による 20 分間 5 回の振盪と PBS による 5 分間 2 回の振盪で洗浄した。

抗リン酸化ヒストン H3 抗体による免疫染色

一次抗体として抗リン酸化ヒストン H3 (PHH3) 抗体を、二次抗体として FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。一次抗体、二次抗体共に 50 倍希釈とし、12/101 抗体による免疫染色と同様の工程で染色した。

イベリアトゲイモリ胚の SU5402 への暴露

FGF 経路の阻害剤として SU5402 [3-[4-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidene)methyl]-1H-pyrrol-3-yl]-propionic acid] (C₁₇H₁₆N₂O₃, MW 296.32, CAS Number 215543-92-3, TOCRIS) を用いた。DMSO に溶解した SU5402 を SANT-1 処理

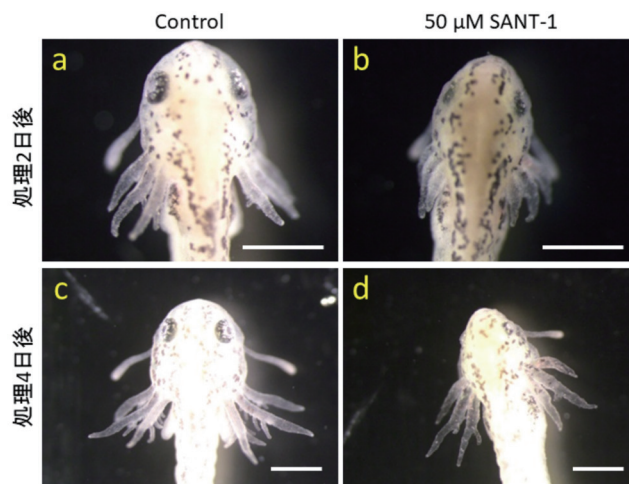


図 5. 細枝形成直前の発生段階から Shh シグナル伝達経路特異的阻害剤 SANT-1 を投与したイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓の形態形成の変化。Bar, 1 mm. SANT-1 を細枝形成直前の st.32 から 2 日間、幼生に投与し、2 日後 (b) と 4 日後 (d) に撮影した。実験を通じて 24°C で飼育した。(a, c) 対照群となる、1% DMSO (中間溶媒) のみで処理した同腹幼生。(b, d) 50 μ M SANT-1 処理後の幼生。細枝数の減少が顕著である。それでも形成された細枝は対照群と同程度に長い。st.30 からの投与の場合と同様に、外鰓の伸長の抑制や放射状の外鰓主枝の形成、外鰓での鬱血が観察される。ツメガエル胚やニワトリ胚などでは *shh* が発現することが知られる前肢芽は、低形成となった (ほとんど見えない)。

と同様に人工淡水で希釈し、25 μ M と 50 μ M の SU5402 溶液と、対照群として 1% DMSO/人工淡水を作成した。これらの溶液に st. 30 のイベリアトゲイモリ胚を SANT-1 処理と同じ工程で浸漬し、観察を行った。

結果

イベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* 幼生の外鰓の形成機構を理解するために、外鰓形成期の胚をシグナル伝達経路特異的な阻害剤に暴露し、その影響を観察した。Shh 阻害剤の SANT-1 により、高い再現性で外鰓細枝の欠落の表現型が得られた。この表現型を研究上の出発点としてさらに分析をし、外鰓の構造の形成にかかわるシグナル経路の役割を調査した。

st. 30 からの Shh 阻害剤 SANT-1 の投与

外鰓伸長期のイベリアトゲイモリ胚 (st. 30) を Shh 経路を抑制する SANT-1 に 2 日間浸漬し、その影響を調べた。この時、対照群は中間溶媒の DMSO のみで処理した。対照群が st. 33 に達した時、対照群と比較して実験群の鰓は太く短く形成された (図 4)。この低形成は 100 μ M SANT-1 の実験群で特に強く、外鰓はほとんど伸長しなかった (図 4c)。また、鬱血のような状態が鰓や頭部にみられ、網状に赤くな

る個体がみられた。

浸漬開始 2 日目の観察後、処理幼生を洗浄し人工淡水中に移行し、さらに 2 日後の浸漬開始から通算で 4 日目に再度観察を行った。100 μ M の実験群は洗浄の翌日に死亡したため、50 μ M の実験群と対照群の比較となった。この時の対照群は st. 34/35 に達していた。実験群の外鰓主枝は対照群と同程度の長さか、それより短く太く形成された (図 4 e)。さらに外鰓主枝はより前方に向かって突出し、3 対の外鰓の配置は放射状となった。浸漬開始 2 日目と同様、鬱血が外鰓や頭部で見られた。対照群では細く長い細枝が腹側後方に多く形成されていたが、実験群の細枝は少なく、また短縮していた。

st. 32 からの Shh 阻害剤 SANT-1 の投与

前項の st. 30 からの浸漬処理によって、外鰓の細枝の数が減少したことから、Shh 経路が細枝の形成に関わるのではないかと考えた。そこで細枝が出現し始める直前の発生段階である st. 32 のイベリアトゲイモリ胚を SANT-1 に浸漬しはじめ、2 日後に洗浄をし、浸漬開始から 2 日目と 4 日目に観察を行った (図 5)。SANT-1 を溶解した中間溶媒である DMSO のみによる対照群の発生段階は 2 日目には st. 33/34 に、4 日目には st. 35/36 に達していた。実験群では、2 日目の時点で st. 30 からの処理と同様、太く短い鰓を形成し、一部は鬱血を生じていた。4 日目には、ほとんどの個体で細枝が形成されていなかった。細枝が少数形成されている個体でも、各鰓に 1 本生えている程度であった (図 5 b, d)。さらにこの時形成された細枝の形成位置は、対照群の外鰓細枝の位置と比較すると、主枝の最も先端部側または最も基部側に生える細枝の位置に相当していた (図 5 d)。一方で生き残った細枝の長さは、個体差はあるものの、対照群の同箇所のそれとほぼ同じであった。これらの結果から、Shh 経路は細枝形成において、細枝の伸長ではなく形成開始に関わることが強く示唆された。その他の影響としては、肢芽の形成の抑制が観察されたほか、小眼や体の背側への屈曲も観察された。

リン酸化ヒストン H3(PHH3) 抗体による細胞増殖領域の調査

外鰓の細枝の形成は局所的な細胞増殖に依存するかどうかを調査するために、細胞分裂期のマーカーとなる PHH3 の抗体を用いて whole-mount で免疫染色を行った。その結果、陽性シグナルは外鰓を含む全身で見られ、この抗体がイベリアトゲイモリ胚に交差することが示された (図 6 a)。

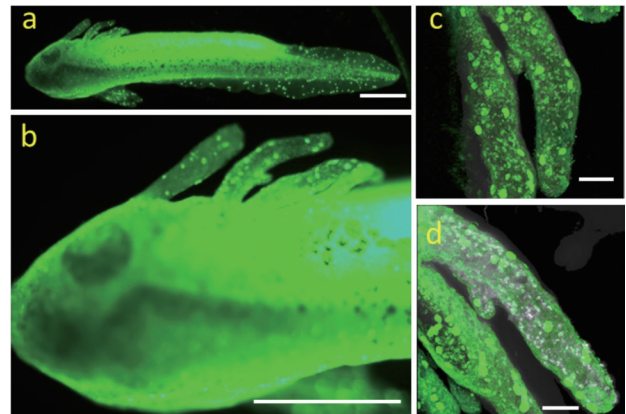


図 6. イベリアトゲイモリ幼生 (無処理で正常発生した個体) の分裂期の細胞の局在を示す、抗-PHH3 抗体による免疫染色像。蛍光実体顕微鏡 (a, b) または共焦点レーザー顕微鏡 (c, d) により観察した。枝分かれの先端や枝分かれが形成される予定の箇所では細胞増殖が盛んであると予想したが、実際の観察像はそのようには見えない。(a, b) 全体像 (a) と頭部拡大図 (b)。Bar, 1 mm。(c, d) 鰓部拡大図。形成途中の細枝の分枝が見える。Bar, 100 μ m。

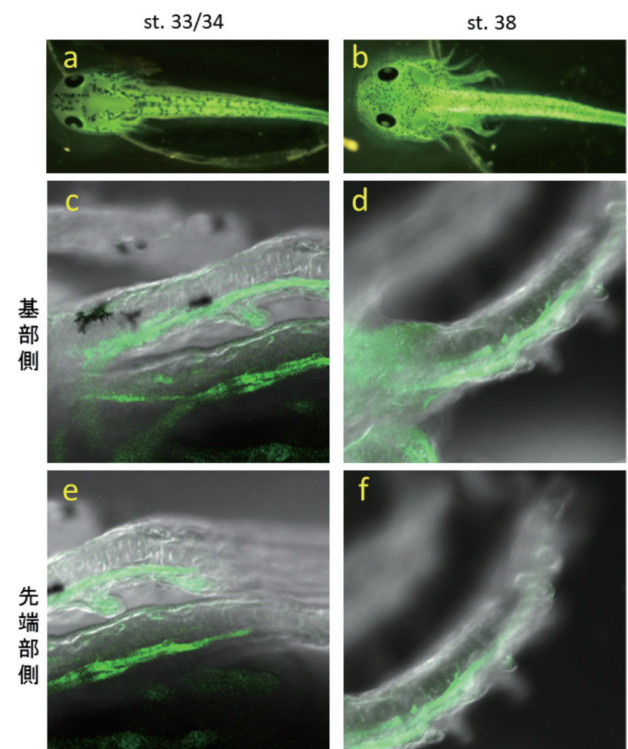


図 7. 正常発生した無処理のイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓における筋肉の分布。st. 33/34 または st. 38 で固定した無処理の幼生の筋肉の分布を、骨格筋を染める 12/101 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡 (a, b) と共焦点顕微鏡 (c-f) で観察した。(a, c, e) st. 33/34 幼生。筋肉は主枝の中で、細枝が形成される後方に偏って形成されている。形成途中の細枝の中にもシグナルが見えることがあった。(b, d, f) st. 38 幼生。st. 33/34 の個体の場合と同様に、筋肉は後方に偏って形成されている。

st. 33/34 の外鰓において細胞増殖を示すシグナルは鰓全体に一様に見られた (図 6 b)。この発生段階は外鰓の細枝の形成が始まり、その数を増やしていく発生段階である。しかしながら、予想に反して細枝の突出の先端または付け根に集中した増殖シグナルは見られなかった (図 6 c, d)。また細枝は外鰓主枝の腹側後方に形成されるが、主枝の側にも、その後方領域に特異的にシグナルが集中した様子もなかった (図 6 b-d)。よって細枝の形成は細胞増殖のみに拠るのではなく、表皮細胞の変形や再配列の要素も含めた形態形成運動の産物であることが示唆された。

12/101 抗体を用いた免疫染色による筋肉の分布の調査

Shh 経路は筋形成に関与することが知られている。正常発生ではやや後方 (尾側) に向けて突出する外鰓主枝が、本研究の SANT-1 処理においては、前方 (頭側) にも拡がり放射状に形成された。SANT-1 処理幼生では、Shh 経路が阻害されたために主枝の筋形成に異常が生じて放射状に突出したのではないかと考え、それを検証するために筋肉に対する抗体を用いた免疫染色を SANT-1 処理幼生に施した。用いた 12/101 抗体は骨格筋に結合し、平滑筋と心筋には結合しない抗体で、おそらく筋小胞体の膜構成要素をエピトープとして認識するとされる。12/101 抗体は間充織細胞には交差しない。

免疫染色の結果、無処理胚の筋肉のシグナルは各外鰓主枝の後方に位置する筋組織で見られ、内部の紡錘状の細胞群 (これらは主枝に対して長軸方向を直交するように配向する) には見られなかった (図 7)。このことからイペリアトゲイモリの形成期の外鰓の筋肉は、後方に偏って位置していることが分かった。さらに細枝の中にも一部のシグナルは見られたが、細枝の先端の表皮にはシグナルは見られず、筋肉は外鰓の最も先端部分にも分布していなかった (図 7 e, f)。主枝の中の筋肉組織の分布に関して、これらの観察結果は st. 33/34 と st. 38 の双方の発生段階の幼生で共通して得られた。

SANT-1 投与後の幼生での筋肉の局在分析

次に、筋肉を染める 12/101 抗体による免疫染色を、st. 30 から SANT-1 処理した個体に適用し、SANT-1 投与の筋形成への影響について調べた (図 8)。その結果、実験群では対照群と比較して筋形成領域がより前方にも拡がり、1 本の密な筋肉帯としてではなく、間隙の目立つ細網状に形成された (図 8 b, d)。しかしながら、筋肉の外鰓の後方への偏りは概ね維

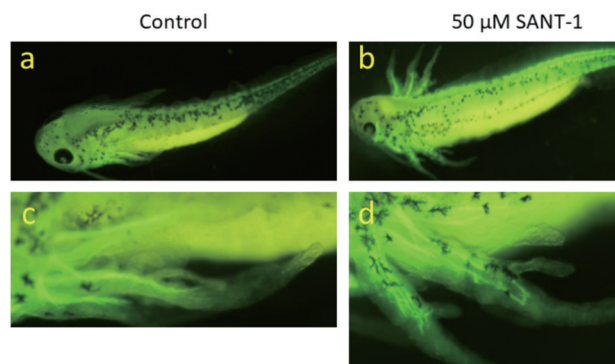


図 8. SANT-1 投与後のイペリアトゲイモリ幼生の、筋肉の分布の変化. st. 30 から SANT-1 処理を 2 日間行い、その 2 日後に固定したサンプルに対して、骨格筋を染める 12/101 抗体を用いて免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(a, c) 1% DMSO 処理 (中間溶媒のみ) の同腹幼生の、全体像 (a) と鰓部の拡大図 (c)。(b, d) 50 μ M SANT-1 処理後の幼生の、全体像 (b) と鰓部の拡大図 (d)。対照群に比べ、SANT-1 投与群の鰓部の筋肉は、外鰓の前方寄りにも形成領域を広げ、なおかつ網目状に形成されている。

持されたままであった。これらの結果から、Shh が外鰓において筋形成領域を後方に制限する働きを持っていたところに、SANT-1 の阻害効果によって Shh の筋肉への後方局在化作用が弱まることで、処理群の外鰓では前方に筋肉形成領域が拡大したと考えられる。

st. 30 からの FGF 阻害剤 SU5402 の投与

イペリアトゲイモリ胚を FGF の阻害剤である SU5402 を含んだ人工淡水に st. 30 から 2 日間浸漬し、SANT-1 処理の場合と同様に経時変化を観察した (図 9)。その結果、浸漬 2 日目の時点で腹部には水泡化が見られ、ヒレには白い縁取りができて体長が短くなった。外鰓は背側に反り返っていた。濃度効果については、最終濃度 25 μ M SU5402 の実験群より 50 μ M の実験群の方が重篤な症状を示した (それぞれ、図 9 b, e, g と図 9 c, f)。この時の対照群の発生段階である st. 33 は、外鰓内部の血流が 3 対の外鰓全てで確立されている時期である。しかし実験群では 25 μ M, 50 μ M 処理群の双方で血流が観察されなかった。そして鬱血が観察された。一方で、外鰓の細枝は生じていた (図 9 g)。

SU5402 を含まない人工淡水に移行して 2 日後の、処理開始から通算 4 日目の観察でも血流は回復していなかった。また、細枝は突起程度であり、同じ st. 34/35 の同腹対照群のような細く長い細枝は見られなかった。SU5402 のその他の影響としては、処理開始 2 日目と同様に処理開始から通算 4 日目の観察でも、腹部水泡化、ヒレでの白い縁取り、体軀の短縮が見られた。外鰓の背側への反り返りも観察され

たが、25 μM 実験群ではほとんどの個体で回復していた。また、SU5402 洗浄後の4日目、すなわち処理開始から通算6日目には、実験群の個体はすべて死亡した。

討論

分枝構造は肺上皮や唾液腺、乳腺など多くの器官においてみられる構造であり、特にマウス胎仔のこれらの原基の器官培養系を用いてその形態形成の研究が行われてきた。その分野は長い研究の歴史があり、胎仔内の奥深くで発生する肺原基や唾液腺原基の形態形成を可視化するために、これらの原基の上皮のみの単独培養などの方法が確立されている²³⁾。これまでの報告により、肺上皮の分枝形態形成は、主にペプチド性シグナル分子を介した、上皮とその周囲の間充織との間の相互作用によって進むことが解明されてきた。本研究で注目し研究材料としたイベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl* の幼生の外鰓も、分枝構造としてその腹側後方に多くの細枝を持つ。外鰓はその名の如く外側に突出した構造であるので、人工淡水中で飼育しながら、長期間にわたる経時的な器官形成の観察が可能である。イベリアトゲイモリ初期胚を用いた原腸形成運動などの古典的研究は一定数あるが、対照的に、外鰓の形態形成、特にそのシグナル経路の解明を志向した研究はほとんどない。本研究は、イベリアトゲイモリの外鰓が、分枝形態形成する器官における特定のシグナル伝達経路の役割を長期にわたり非侵襲的に調べるための新しいモデルになる可能性を示した。

Shh 経路特異的阻害剤 SANT-1 実験の実験結果についての考察；外鰓の細枝の分枝形成は Shh 経路依存的吗

神経堤細胞の細胞移動やそれらの分化をコントロールするシグナル伝達分子は、脊椎動物の頭部発生や、鰓を生み出す胚性器官である咽頭弓を含めた咽頭領域の分節性に富んだパターンニングに重要である²⁴⁻²⁷⁾。神経堤細胞は、遊走前の前後-背腹軸に沿った出現位置により特異的なコミットメントを受け、更に移動経路の微小環境との相互作用の影響も受けて、その後の分化運命が特定化されてゆく。そのような神経堤細胞像は、Dr. Nicole LeDouarin らのグループによるノーベル賞受賞研究となる、ニワトリ胚とウズラ胚間の交換移植によるキメラ実験によって創始された²⁸⁾。頭部神経堤細胞を特定化する転写因子はおもに菱脳において発現するホメオボックス遺伝子 (*hox* 遺伝子) であり、神経堤細胞が遊走することによってその経路特有の位置情報が咽頭弓にホーミン

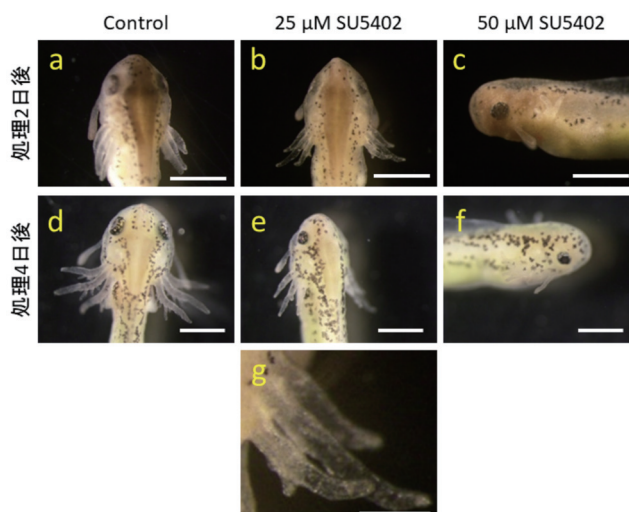


図9. FGFシグナル伝達経路抑制剤SU5402を投与したイベリアトゲイモリ幼生の、外鰓の形態形成の変化。SU5402を外鰓伸長期のst. 30から2日間幼生に投与し、2日後(b, c, g)と4日後(e, f)に撮影した。実験を通じて24°Cで飼育した。

(a, d) 1% DMSO 処理の同腹幼生。

(b, e) 25 μM SU5402 処理幼生。主枝の形、太さと長さは対照群と大きな相違はない。小眼が生じている。

(c, f) 50 μM SU5402 処理幼生。主枝が背側に跳ね上がるように反っている。小眼も生じている。

(g) 25 μM SU5402 処理 2 日後の幼生の主枝の拡大図。血流が観察されず血管もない。

Bars, a-f, 1 mm; g, 250 μm .

グする神経堤細胞に伝達される²⁹⁻³⁴⁾。ゼブラフィッシュ胚において咽頭内胚葉で発現する *shh* は、神経堤細胞と口蓋外胚葉の間で相互に伝達される誘導シグナルを仲介する役割を果たす³⁵⁻³⁶⁾。その後、内胚葉の移植実験によって、咽頭弓の間充織から分泌される *Shh* が直接内胚葉にシグナル伝達することで咽頭弓の初期の形態変化が生じることが示された。さらに、内胚葉から神経堤由来間充織へのシグナリングによって、咽頭弓での背腹マーカーの適切な発現が確立される³⁷⁾。内胚葉からの誘導シグナルに対する神経堤からの応答が咽頭領域での *shh* の遺伝子発現を維持することが、神経堤の移植実験により示されている³⁷⁾。

これらの先行研究を元に、SANT-1 投与群の外鰓の形態形成の変化について考察する。まず、SANT-1 を含む人工淡水への浸漬により、外鰓主枝や細枝に影響が生じたことから、*Shh* は有尾目において、外鰓の形態形成とその内部の組織形成に関与していることが強く示唆された。*shh* は四肢動物の前後肢において肢芽後方の間充織領域である ZPA で発現する^{18, 38)}。ZPA を肢芽前方の間充織中に移植すると鏡像肢が形成されることが古典的な ZPA 領域の移植実験から知られており、これは肢芽の前後軸についての軸性が前方 (A) から後方 (P) へ P-A-P と鏡像的に反

復されたことの反映であると考えられている³⁹⁾。これと同様の鏡像肢形成が、本来 *shh* を発現しない肢芽前方間充織において *shh* 遺伝子のみを単独で過剰発現させた場合でも生じた¹⁸⁾。これらの実験から、*shh* が肢芽の後方間充織で ZPA の活性を仲介し、肢芽の前後軸を規定することが解明されている。また、この *shh* 発現は肢発生の初期に限定された一過性のものである。無尾目両生類のアフリカツメガエルにおいても、Shh が肢芽の軸性のパターンの特定化に関わることが、ツメガエル後期幼生における正常な後肢、切断して 180 度回転後に再結合した後肢、ならびに再生中の後肢での *shh* 発現の解析から示唆されている⁴⁰⁾。本研究の SANT-1 処理によって、外鰓において後方特異的な構造である細枝が減少した(図 4 と図 5)。このことは、肢芽形成の場合と同様に、*shh* が外鰓においても前後軸に沿ったパターン形成に関与する可能性を示し、これが抑制されることで細枝がなくなった可能性が考えられる。また、処理開始の発生段階を st. 32 に遅らせての SANT-1 投与では、外鰓のほとんどの細枝形成を抑制したが、それでも生き残り形成された細枝は対照群の同箇所の細枝と同程度の長さであった(図 5d)。このため *shh* は、細枝形成においてその長軸方向の伸長に関与するのではなく、細枝の形成の開始場所の指定や、細枝形成するように主枝後方の表皮ないし間充織を運命づけるような役割を果たすことが示唆された。恐らくは、細枝形成するか否かの予定運命の選択には臨界期があり、そのタイミングまでに成長抑制を免れた細枝のみが *shh* 発現あるいは Shh 経路依存的に分枝形成を開始し、あとは比較的 normally 伸長をするようである。後期肢芽の指骨の形や *hox* 発現を調べた研究において、Shh は四肢形成後の指のパターンを指定するという報告がある。*shh* の役割において、肢芽全体と指の関係、外鰓全体と細枝の関係を見比べると、本研究で示唆される内容と上記の四肢形成の研究の結論とは良い対応関係を示している。更に詳細に見ていくと、SANT-1 処理をくぐり抜けて形成された少数の細枝は、外鰓主枝の基部先端部軸に沿った両端のいずれかに位置していた(図 5d)。基部側または先端部側のいずれかから、軸に沿って順に細枝が形成される可能性が考えられる。

SANT-1 処理において短くなった外鰓主枝はやや太く形成されていた(図 4 と図 5)。このことは、SANT-1 は外鰓の細胞増殖活性にはあまり影響せず、実験群と対照群の間で外鰓主枝の細胞数はそれほど変わらないことを示唆しているのかもしれない。今後は、外鰓を構成する細胞、特にその表皮細胞が基部先端部軸方向に伸張することが、どの程度外鰓の

形態形成に寄与するのかを評価する実験を組む必要がある。その一つの方策として、外鰓表皮の細胞境界を F-actin 特異的に結合する蛍光標識 Phalloidin で染色し、外鰓表皮細胞の頂端側から見た上皮形態を定量することを計画している。

分裂期細胞マーカーのリン酸化ヒストン H3 抗体による外鰓の免疫染色像について

クロマチンを構成するヒストンは、その tail 部分のアミノ酸残基がメチル化やアセチル化などの化学修飾を受けることで構造変換し、その結果クロマチンが局所でリモデリングされ、局所の遺伝子領域の転写活性が調節される。ヒストン H3 の 10 番目のセリンや 28 番目のセリンがリン酸化を受けることで、クロマチン凝縮や細胞分裂が生じる。本研究で使用した PHH3 抗体(抗・リン酸化ヒストン H3 抗体)は、セリン 10 残基かセリン 28 残基がリン酸化された時にもみヒストン H3 に結合し特異的に検出される抗体であり、これらのリン酸化は細胞分裂の際のクロマチン凝縮のフェーズで特に盛んになることから、分裂期の核のマーカーとなる。一方、これらのリン酸化は間期には殆ど生じないので、信頼性の高い細胞周期マーカーだといえる。

PHH3 抗体を用いた外鰓の免疫染色像は、外鰓全体で一様なシグナルを示している、細胞分裂が外鰓の特定の領域に集中してるとは言えない染色像ばかりが得られた(図 6)。従って、筆者らの研究当初の作業仮説とは反対に、細枝の形成は集中的な細胞増殖によるものではないことが示唆された。マウス肺上皮において分枝芽が形成されるまでの間、分枝が形成する領域とされない領域の間の細胞増殖率の差は見られず、分枝形態形成は細胞増殖パターンの差異が原因となるのではないことが報告されている²¹⁾。本結果は外鰓の分枝が肺上皮と類似した形成メカニズムを持つ可能性を示す。今後、外鰓を構成する細胞の移動や変形にも着目し、分枝形成の引き金となるイベントの解明を行いたい。また、PHH3 抗体による免疫染色は、当然のことながら、固定サンプルにしか適用できない。生きたままの状態に分枝構造が観察できるという外鰓の特徴を生かし、今後はライブイメージングを行う必要がある。そのためにはヒストンに GFP タグをつけたトランスジェニックイベリアトゲイモリの作出が必要である。近年、有尾目のイベリアトゲイモリやアカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* においてはトランスジェニック技術が確立されている^{41, 42)}。有尾目の研究の発展を後押しする成果として、最近、メキシコサンショウウオ *Ambystoma mexicanum* のゲノムが解読され⁴³⁾、発

生生物学的、進生物学的研究に必要な遺伝情報の基盤のリソースになるとして期待される。今後、メキシコサンショウウオを外鰓研究に積極的に取り込むことを視野に入れ、様々なシグナル伝達経路の外鰓形成における役割の研究に拡張し、本研究のこれまでの実験結果とともに、相互に比較検討したい。

筋肉がイペリアトゲイモリ外鰓の後方マーカーになることの発見と、そこに Shh 経路が関与することの発見の意義

12/101 抗体を用いた本研究において、有尾目イペリアトゲイモリ外鰓の筋肉は外鰓の後方に位置することが分かり、外鰓の軸性において後方マーカーとなることが示された (図 7)。外鰓は斜め後方に向けて突出するように形成される構造であることから、筋肉が主枝の後方に位置することで、外鰓の伸長方向を後方寄りに維持する役割を持つのかもかもしれない。この見解を支持する観察結果としては、外鰓の筋肉形成領域が主枝前方にも広がった SANT-1 処理胚において、外鰓はより前方に向かった放射状の伸長を見せた (図 4 e, 図 8b)。今後、外鰓の筋肉形成のみを特異的に抑制する方法を開発し、形成期の外鰓の形態形成における筋肉の役割を解明したいと考えている。筋肉組織の分泌する栄養因子 (trophic factor) ないし細胞間コミュニケーション分子が、外鰓内部の秩序だった組織構造を構築するように働いていると予想している。本研究は、内在性の Shh が外鰓での筋形成領域を後方に制限する役割を持つことを示唆したが、ゼブラフィッシュ胚やマウス胚においては *shh* が筋形成に関わることは解明されているものの、特定の器官の筋肉の大局的なパターンニングに Shh が関与することを示唆する研究はとて少なく、本研究で得られた知見には、外鰓研究の枠を超えた新しさがある。SANT-1 処理下での外鰓の筋肉は、領域が広がった分、網目状に間隙を持って形成されたため、総筋肉量は変化していないかもしれない。これを解明するために筋肉特異的な遺伝子の発現を定量する必要がある。

FGF 受容体阻害剤 SU5402 を投与した実験の結果についての考察

本研究で用いた SU5402 は FGF 受容体阻害剤として広く認知されており、そのチロシンキナーゼ活性を抑制する⁴⁰⁾。一方で、VEGF 受容体や PDGF 受容体をもつチロシンキナーゼ活性をも抑制することも報告されている。そのような阻害作用を持つ SU5402 をイペリアトゲイモリ胚に投与したところ、対照群が st. 33 となる 2 日目の時点で、投与群にお

いて外鰓の血流が全く観察されなかった。

血管は臓側中胚葉由来の血管芽細胞が分化することで形成され、その過程には FGF、VEGF、アンギオポエチンなどの因子が関わっている。外鰓での血流は st. 31 から生じ始め、st. 32 には外鰓の 3 対全てで確立する。丁度その発生段階で投与した SU5402 が、おそらくは血管形成を抑制することで、実験群の外鰓での血流の欠如を導いたと推察される。また投与開始から通算 4 日目の観察でも血流が観察されなかったことから、投与開始 2 日目の血流の欠如は単なる発生の遅延の結果によるものではないことが示された。一方、血流が確認されないにも関わらず、細枝の形成は生じた。このことから、細枝の形成は血管形成とはかなり独立しており、細枝の出芽位置で血管が広がるもしくはピンポイントで蛇行することによって細枝ができるのではないと考えている。現在、イペリアトゲイモリ幼生の血管に交差する抗体を探しているところである。そうした血管マーカー分子による免疫染色によって SU5402 処理幼生での血管の有無を明らかにする必要がある。

SU5402 処理開始 4 日目の幼生においては、対照群や SANT-1 処理の生き残り細枝で観察されたような長い細枝は観察されず、あくまで突出程度の細枝形成に留まった。これは SU5402 処理によって、細枝を構成する表皮細胞の伸長の抑制か、増殖抑制か、またはアポトーシスの促進のいずれかが生じたためと予想している。FGFR3 を過剰発現する細胞に対する SU5402 の投与は、アポトーシスを促進するという報告がある⁴⁵⁾。本研究においても今後、正常幼生や SU5402 処理幼生に対して、TUNEL 法などを適用してアポトーシスを起こした細胞の分布を把握する必要があると考えている。

総括; 有尾目発生生物学研究に対する本研究のインパクト

四肢上綱 (Tetrapoda) の脊椎動物は、体幹部から四肢を突出させるボディプランをもつ。これが一般的な陸棲の脊椎動物のイメージであろう。四肢は、その肢芽期から、背腹軸、前後軸、基部・先端部軸の 3 つの軸性をもち、肢芽期においては、それらの軸性は領域特異的に発現する *hox* などの遺伝子の発現セットにもとづく組織分化のコミットメントとして、潜在的に表現されている。では、外鰓はどうか。これは一部の水生の脊椎動物が、一生のうちで一過的に形成する *appendage* (中軸に接続する構造物) であり、その最終的な分化形態においては、四肢と同じく、背腹軸、前後軸、基部・先端部軸の 3 つの軸性をもつことは明らかである。しかしながら、(i) モ

ルフォゲン(形原)などの大局的な濃度勾配によって、その軸性が成熟していくのか、それとも(ii)肺原基や唾液腺原基のような上皮の細胞間相互作用に間充織からの誘導シグナルが影響を及ぼす様式の、背腹軸や前後軸なしの、いってみれば基部・先端部だけの軸性しか備えない原基からの局所の相互作用の集積・総和として発生するのか、(i)なのか(ii)なのかの問題であった。本研究の実験結果の全体は、このテーゼに対して(i)を支持し、少なくとも体軸をリファレンスした軸性が形成期の外鰓にはある、という回答を与える。具体的には、本研究によって、イペリアトゲイモリ幼生の外鰓は鰓全体で軸性を持っており、それらに沿った形態形成を行うことが示唆された。イペリアトゲイモリ外鰓の細枝や筋肉は、今回の観察により、外鰓後方の構造であることが示され、前後軸に沿ったパターン形成の産物であることが示唆された。また細枝形成期のSANT-1処理により形成された細枝の位置の調査から、細枝形成の順序には、主枝の基部先端部軸に沿ったパターンがある可能性も示唆された。この後方特異的な細枝はShh経路を抑制した際には形成が抑制され、外鰓後方は前方部のような平滑な表皮を示した。このため、鰓の前後に沿ったパターンを形成する分子実体は、四肢の前後肢芽と同様に、Shhであると予想される。後方のマーカーとなる筋肉の局在もShh経路の抑制によって前方に拡がったので、このことから、Shhが外鰓の前後軸を規定するモルフォゲンとしての機能を持つことが示唆された。背腹軸、前後軸、基部・先端部軸の3軸に沿った形態形成をする器官としての四肢では、前後軸形成のためにZPAでShhが働き、基部先端部軸形成のためにAER(apical ectodermal ridge、外胚葉性頂堤)でFGF8やFGF4が働き、またこれらを発現する領域間で構成細胞が相互作用することで軸性の確立が進むと理解されている。本研究は、外鰓も肢芽のように軸性に基づいてパターン形成を行い内部が分化成熟する器官であるとのアイデアをもたらし、そのうち少なくとも前後軸はShhによって規定されることを示唆した。

今後は、*shh*の発現領域を同定するとともに、外鰓において背腹軸や基部・先端部軸の軸性や軸性に沿って組織分化を規定する分子群を探っていく。その方法論としては、例えば*in situ* hybridization法などにより幼若な外鰓先端部で特異的に発現する*fgf*のメンバーを同定し、これの発現をRNAiなどの翻訳阻害技術で特異的に抑制することでパターン形成のメカニズムを解明したい。今回の浸漬処理は胚全体でシグナル伝達経路を抑制してしまったため、より、「外鰓特異的に」特定の遺伝子発現を抑制する

方法を見いだしていきたいと考えている。

謝辞

神奈川大学理学部の小笠原強名誉教授には研究上のご助言を賜り、泉進名誉教授、大平剛教授には分子生物学の基盤的な技術についてのご助言も賜りました。感謝致します。教務技術職員の鶴岡慎哉氏、豊泉研究室の秋永薫博士、市川麗子博士には研究上の議論を重ねて頂きましたので、感謝します。研究活動ならびに研究発表の場をご提供くださいました総理研所長の川本達也先生ならびに所員各位に感謝いたします。筆頭著者である桃井環の神奈川大学理学研究科の博士前期課程への進学を後押しし、研究活動を経済面と精神面の両面から支えてくださいました父母に深謝します。

文献

- 1) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B and Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
- 2) Kimmel, CB, Miller CT and Keynes RJ (2001) Neural crest patterning and the evolution of the jaw. *J. Anat.* **199**: 105-120.
- 3) 岩井保 (2005)「魚学入門」恒星社厚生閣, 東京. pp. 123-130.
- 4) Jonz MG and Nurse CA (2008) New developments on gill innervation: insights from a model vertebrate. *J. Exp. Biol.* **211**: 2371-2378.
- 5) Schilling TF and Le-Pabic P (2009) Fishing for the signals that pattern the face. *J. Biol.* **8**(11): 101. doi: 10.1186/jbiol205.
- 6) Nieuwkoop PD and Faber J (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York ISBN 0-8153-1896-0.
- 7) Shi DL and Boucaut J-C (1995) The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **39**: 427-441.
- 8) Ten-Have-Opbroek AA (1991) Lung development in the mouse embryo. *Exp. Lung Res.* **17**: 111-130.
- 9) Alescio T and Cassini A (1962) Induction *in vitro* of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *J. Exp. Zool.* **150**: 83-94.
- 10) Wessells NK (1970) Mammalian lung development: interactions in formation and morphogenesis of tracheal buds. *J. Exp. Zool.* **175**: 455-466.
- 11) Goldin GV and Wessells NK (1979) Mammalian lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis. *J. Exp. Zool.* **208**: 337-346.
- 12) Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N and Kato S (1999) Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat. Genet.* **21**: 138-141.
- 13) Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S and Hogan BL (1999) Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung

- development. *Development* **126**: 4005-4015.
- 14) van Tuyl M, Post M (2000) From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir. Res.* **1**(1): 30-35. doi: 10.1186/rr9.
 - 15) Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T and Hogan BL (1996) Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* **122**: 1693-1702.
 - 16) Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G and Hogan BL (1997) Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* **124**: 53-63.
 - 17) Pepicelli CV, Lewis PM and McMahon AP (1998) Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol.* **8**: 1083-1086.
 - 18) Riddle RD, Johnson RL, Laufer E and Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**: 1401-1416.
 - 19) Koide T, Hayata T, Cho KW (2006) Negative regulation of Hedgehog signaling by the cholesterol enzyme 7-dehydrocholesterol reductase. *Development* **133**: 2395-2405.
 - 20) Gallien L and Durocher M (1957) Table chronologique du developpement chez *Pleurodeles waltlii* (Michah) *Bull. Biol. Fr. Belg.* **91**: 97-114.
 - 21) Nogawa H, Morita K and Cardoso WV (1998) Bud formation precedes the appearance of differential cell proliferation during branching morphogenesis of mouse lung epithelium *in vitro*. *Dev. Dyn.* **213**: 228-235.
 - 22) Kera H, Yuki S and Nogawa H (2014) FGF7 signals are relayed to autocrine EGF family growth factors to induce branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Dev. Dyn.* **243**: 552-559.
 - 23) Nogawa H and Takahashi Y (1991) Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development* **112**(3): 855-861. doi: 10.1242/dev.112.3.855.
 - 24) Lumsden A, Sprawson N and Graham A (1991) Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**: 1281-1291.
 - 25) Schilling TF and Kimmel CB (1994) Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* **120**: 483-494.
 - 26) Sechrist J, Scherson T and Bronner-Fraser M (1994) Rhombomere rotation reveals that multiple mechanisms contribute to the segmental pattern of hindbrain neural crest migration. *Development* **120**: 1777-1790.
 - 27) Köntges G and Lumsden A (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**: 3229-3242.
 - 28) Noden DM (1983) The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev. Biol.* **96**: 144-165.
 - 29) Hunt P and Krumlauf R (1991) Deciphering the Hox code: Clues to patterning branchial regions of the head. *Cell* **66**: 1075-1078.
 - 30) Lumsden A, Sprawson N and Graham A (1991) Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* **113**: 1281-1291.
 - 31) Couly GF, Coltey PM and Le Douarin NM (1993) The triple origin of skull in higher vertebrates: A study in quail-chick chimeras. *Development* **117**: 409-429.
 - 32) Rijli FM, Mark M, Lakkaraju S, Dierich A, Dolle P and Chambon P (1993) A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. *Cell* **75**: 1333-1349.
 - 33) Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**: 191-201.
 - 34) Köntges G and Lumsden A (1996) Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* **122**: 3229-3242.
 - 35) Eberhart JK, Swartz ME, Crump JG and Kimmel CB (2006) Early Hedgehog signaling from neural to oral epithelium organizes anterior craniofacial development. *Development* **133**: 1069-1077.
 - 36) Eberhart JK, He X, Swartz ME, Yan Y-L, Song H, Bolin TC, Kunerth AK, Walker MB, Kimmel CB and Postlethwait JH (2008) MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis. *Nat. Genet.* **40**: 290-298.
 - 37) Swartz ME, Nguyen V, McCarthy NQ and Eberhart JK (2012) Hh signaling regulates patterning and morphogenesis of the pharyngeal arch-derived skeleton. *Dev. Biol.* **369**: 65-75.
 - 38) Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, and McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**: 1417-1430.
 - 39) Honig LS and Summerbell D (1985) Maps of strength of positional signaling activity in the developing chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**: 163-174.
 - 40) Endo T, Yokoyama H, Tamura K and Ide H (1997) Shh expression in developing and regenerating limb buds of *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn.* **209**: 227-232.
 - 41) Casco-Robles MM, Yamada S, Miura T and Chiba C (2010) Simple and efficient transgenesis with I-SceI meganuclease in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Dev. Dyn.* **239**: 3275-3284.
 - 42) Hayashi T, Takeuchi T (2016) Mutagenesis in Newts: Protocol for Iberian Ribbed Newts. *Methods Mol. Biol.* **1338**: 119-126. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_10.
 - 43) Nowoshilow S, Schloissnig S, Fei JF, Dahl A, Pang AWC, Pippel M, Winkler S, Hastie AR, Young G, Roscito JG, Falcon F, Knapp D, Powell S, Cruz A, Cao H, Habermann B, Hiller M, Tanaka EM and Myers EW (2018) The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature* **554**(7690): 50-55.
 - 44) Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR and Schlessinger J (1997) Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**: 955-960.
 - 45) Paterson JL, Li Z, Wen XY, Masih-Khan E, Chang

H, Pollett JB, Trudel S and Stewart AK (2004)
Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor

3 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **124**: 595-603.

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

減数分裂期染色体ライブ観察用のシロイヌナズナ形質転換体の作成とその染色体の動態解析

小柴雅史¹ 落合 優¹ 本村和佳奈¹ 小林 達¹ 古賀皓之² 安積良隆^{1,3}

Construction of *Arabidopsis* Transformants for Live Cell-imaging of Meiotic Chromosomes and Analysis of their Dynamics

Masashi Koshihara¹, Yu Ochiai¹, Wakana Motomura¹, Taduru Kobayashi¹
Hiroyuki Koga² and Yoshitaka Azumi^{1,3,4}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Graduate School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Previously, we developed a line of *Arabidopsis thaliana* transformant for live cell-imaging of meiotic chromosomes by introducing the fusion gene of the histone H2B gene and GFP gene under the control of the *AtDMC1* promoter (DHG). Using a transformant (DHG1 line), we were able to observe meiotic chromosomes in living pollen mother cells (PMCs). In the DHG1 line, the fusion gene was transferred into chromosome 3, and DHG expression was not specific to PMCs, but also observed in also other cells constituting its anther. We need more DHG lines, which are transferred DHG gene into chromosomes other than chromosome 3, and show more PMC-specific expression. We introduced DHG into *A. thaliana* again, and obtained new DHG lines as survivors on selective media. Some lines were actually confirmed to be transformants by PCR analysis for the GFP gene. Three lines were further examined using confocal scanning laser microscopy, and meiotic chromosomes in several stages were clearly observed in their PMCs.

Keywords: *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), meiosis, chromosome, green fluorescent protein (GFP), live cell-imaging

序論

有性生殖を行う生物の細胞は通常、核内に2組の染色体を有する。これは母方由来の1組の染色体と父方由来の1組の染色体が合わさったものである。この2組の染色体を1組に半減させる減数分裂は、有性生殖生物が半数体である配偶子を生み出すのに必須の過程である。生物種はそれぞれ固有のゲノムを有するが、それは正確に保持されなければならない。染色体数を半減する時に染色体が1本でも過剰であったり不足したりしてはならない。ヒトでは一番小さな染色体である21番染色体が1本余分にあるだけでダウン症が発症することが知られて

いる。減数分裂はそれぞれ前期、中期、後期、終期からなる減数第一分裂と減数第二分裂から構成されるが、染色体数の半減は減数第一分裂の前期に起こる。機構的に染色体の正確な半減を可能にしているのが相同染色体の対合である。全ての相同染色体同士を一度対合させて、それぞれの対に含まれる相同染色体を2つの異なる極に向かって引き離すことで正確に1組の染色体を有する染色体集団が2つできあがる。この時の一番の課題はどのようにして相同染色体同士はお互いを見つけ出し、対をつくるかである。この現象を解析するために多くの研究が行わ

れてきた。古い研究では減数分裂期の染色体の顕微鏡観察が主たるものであったが、分子遺伝学手法の発達により、酵母菌やマウスなどの様々な生物で相同染色体の分配到異常が生じる変異体が数多く単離され、その多くは原因遺伝子も突き止められている。植物でもゲノムが小さなことでシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がモデル生物に選定されて以来、*Atspo11-1*¹⁾、*Atspo11-2*²⁾、*solo dancers*³⁾ などの多くの減数分裂変異体が単離・解析されている。シロイヌナズナでは古くから減数分裂期染色体の顕微鏡観察が行われていたが⁴⁾、減数分裂期染色体の光学顕微鏡による精細かつ簡便な観察法が開発されて以来⁵⁾、この方法は減数分裂変異体の解析に盛んに活用されている。その結果、これらの変異体では原因遺伝子が同定され、その遺伝子が減数分裂期の染色体の形態変化や動態にどのように関わっているかが解明されつつある。しかし、これらの研究では染色体の形態変化・動態は固定された試料を用いて行われてきた。そのため、相同染色体がどのように接近していくかなどの実態は不明であった。近年、シロイヌナズナの生きている花粉母細胞での減数分裂期染色体の観察結果が報告された^{6,7)}。我々は先の研究で、減数分裂時に発現する *AtDMC1* 遺伝子の発現調節領域 (pAtDMC1) とヒストン H2B 遺伝子 (H2B) と緑色蛍光蛋白質の遺伝子 (GFP) とを連結して作製した融合遺伝子 (DHG) をシロイヌナズナに導入して、花粉母細胞の減数分裂時の染色体のライブ観察に成功している⁸⁾。これまでに得られている唯一の DHG 導入性質転換体はゲノム解析の結果、第3染色体に DHG が挿入されたものであることが判明している⁸⁾。これを我々は DHG1 系統と呼んでいる。DHG 形質転換体と減数分裂変異体とを交配することによって、減数分裂変異体の染色体を可視化することができるが、DHG1 系統の場合、第3染色体に原因遺伝子がある変異体に DHG 遺伝子を導入することは効率が良くないため、他の染色体に DHG 遺伝子が導入された系統を作出することにした。

材料と方法

シロイヌナズナ形質転換体の作出

既報⁷⁾の通り、形質転換体の作出を行った。植物育成棟にて、野生型シロイヌナズナの種子を園芸用の土に播種し、3日間4℃に置いた後、肥料としてハイポネックスを与えながら、気温22℃、16時間明期・8時間暗期の光環境下で、5週間ほど栽培した。一度摘芯を行った後、Tiプラスミド中にDHG遺伝子を有するアグロバクテリウムを減圧浸潤法により感染させた。このシロイヌナズナから種子を採集し、

ハイグロマイシンとカナマイシンをそれぞれ 50 µg · mL⁻¹ の濃度で含むムラシゲ・スクーグ培地で栽培・選抜した。選抜された T1 世代の植物から得られた種子を同じ組成の選抜培地で栽培し、得られた植物体を用いて、染色体の観察を行った。

PCR 解析

シロイヌナズナのゲノム DNA は葉から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用して精製した。GFP 遺伝子を増幅する PCR では、このゲノム DNA を鋳型とし、GFP 遺伝子増幅用のプライマーとして 730 sGFP Fw Primer (AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG) と 731 sGFP Rv Primer (GGTGTCTCTGCTGGTAGTGGTC) とを、酵素としては PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TAKARA BIO) を使用した。PCR プログラムとしては、94℃ 5 分の後、94℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒のサイクルを 30 回行い、最後に 72℃ で 10 分間保温して、反応を終了した。

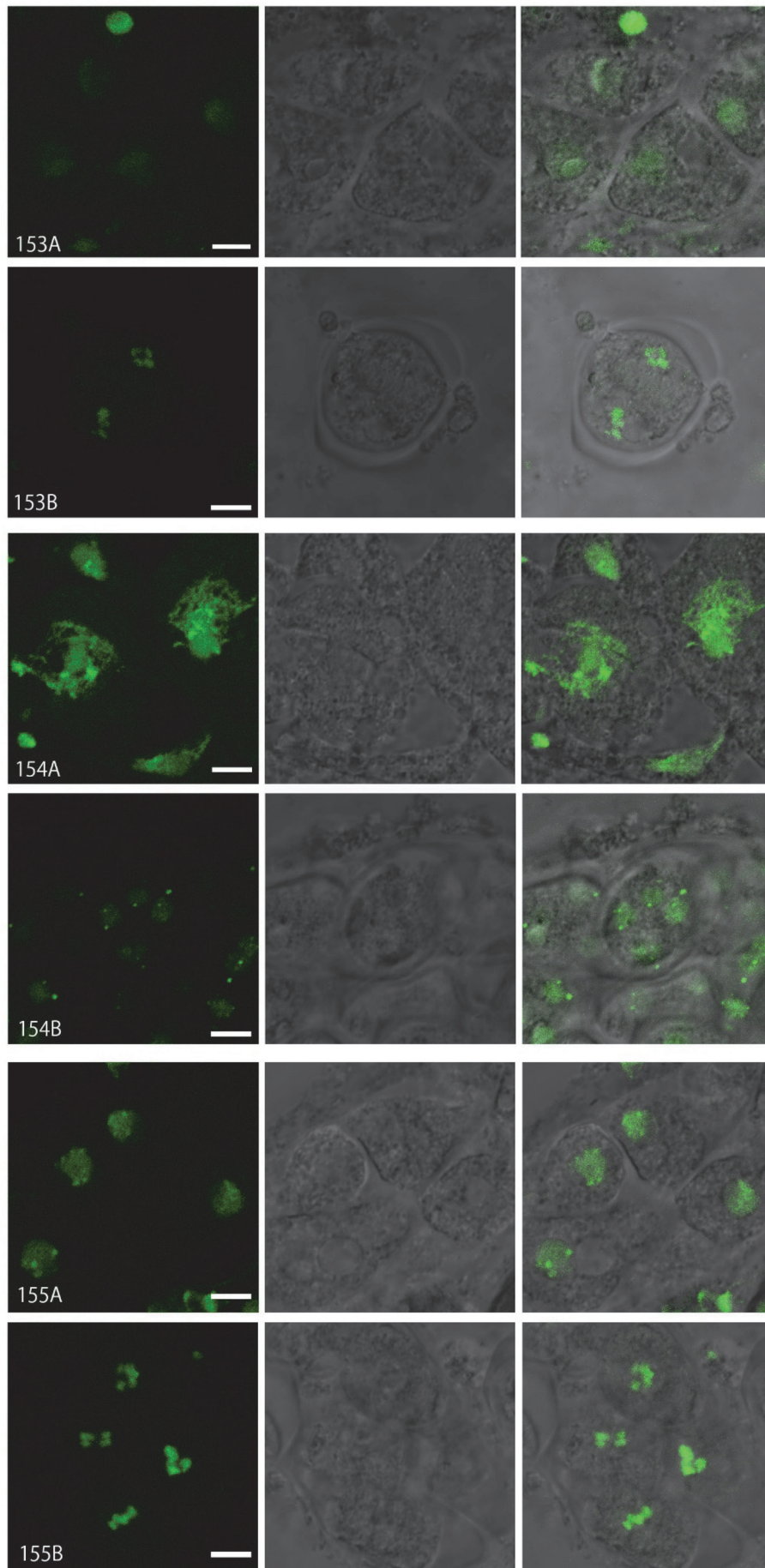
染色体の観察

選抜されたものの中から DHG 遺伝子の存在が確認されたシロイヌナズナの花序を切り取り、実顕微鏡で観察しながら、花序から適当な大きさの蕾を取り出し、蕾からがくを取り除いた。残りの部分をスライドガラスに載せ、水道水を 0.1 mL 程度、蕾の周りに滴下した後、カバーガラスを被せ、ろ紙で挟み、転圧ゴムローラーを引くことで葯の中から花粉母細胞を押し出した (押し出し法)。GFP からの緑色蛍光は共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM700) で取得し、Photoshop と Image J を用いて、作図を行った。

結果

遺伝子組換えシロイヌナズナの花粉母細胞の減数分裂期染色体の観察

すでに報告した通り、DHG 遺伝子が導入されたシロイヌナズナで減数分裂期染色体のライブ観察に成功している。その形質転換体系統 (DHG1) では DHG 遺伝子は第三染色体に挿入されていた。これ以外の染色体に DHG 遺伝子が導入された形質転換体の作成が望まれたため、新たに形質転換体の作成を行った。形質転換体を選抜する培地で、21 の個体が生き残り、それらを土壌に移しかえて栽培した。生育した個体ごとに分けて種子を収集した。暫定的に DHG151 から DHG171 の系統名を与えた (DHG160 は栽培中に枯死し、種子は得られなかった)。枯死した 1 個体以外は順調に成長し、現在、それらの種子 (T2 世代) が保存されている。枯死したもの以外は



栄養成長段階においても、生殖成長段階においても、肉眼で見る限り形態的異常は認められなかった。これらのうち、DHG151～158からゲノムDNAを調製し、GFP遺伝子に対するPCR解析を行ったところ、どれもGFP遺伝子を有することが判明した。これらの8つの個体から得られた種子から植物を育て、本研究では順調に成長した3つの系統の染色体観察の結果を報告する。

DHG153、154、155の3つの系統のT2世代で、それぞれ複数の植物体で観察を行った。いずれの個体でもFig.1が示すように、GFP融合ヒストンにより減数分裂期染色体が共焦点レーザー顕微鏡画像として明確に捕捉された。また、花粉母細胞から四分分子を経て花粉となるまでの過程において、顕微鏡観察的にも形態に異常は認められなかった。Fig.1の153Aでは細糸期、153Bでは第二分裂中期の染色体が観察されている。154Aでは複糸期、154Bでは四分分子期の染色体が観察されている。155Aでは細糸

Fig. 1. DHG 遺伝子導入シロイヌナズナ系統 DHG153, 154, 155 の花粉母細胞の染色体観察. 押し出し法により得られた各 DHG 系統の植物の花粉母細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した. 右端はヒストン H2B:GFP により可視化された染色体像. 中央は明視野観察による花粉母細胞像. 右端は染色体像と花粉母細胞像を重ねたもの. 153A, B: DHG153 系統の植物の花粉母細胞の観察像. A: 細糸期, B: 第二分裂中期. 154A, B: DHG154 系統の植物の花粉母細胞の観察像. A: 複糸期, B: 四分分子期. 155A, B: DHG155 系統の植物の花粉母細胞の観察像. A: 細糸期, B: 第一分裂中期. スケールバー: 5 μ m

期、155Bでは第一分裂中期の染色体が観察されている。Fig.1に示した以外にも、各系統、様々なステージで染色体が観察されている。いずれの系統においても、細糸期から染色体が強い蛍光が発せられるようになり、四分子期まで観察された。染色体の凝縮度が増す、第一分裂中期と第二分裂中期では、特に明るい染色体像が得られた。いずれの系統においても、花粉母細胞以外の葯の細胞の染色体も蛍光を発しているのが観察された。

討論

先に得られていた DHG1に加えて、本研究によって20の系統(DHG151~171)が、選抜培地で生き残った形質転換体として得られた。DHG151~158については、GFP遺伝子を対象とするPCR解析によって、実際にDHG遺伝子が導入された形質転換体であることが確かめられている。残りの系統についても、形質転換体であるかどうかを調べる必要がある。遺伝子導入が確認された系統のT2世代の植物をそれぞれで数個体栽培し解析を行ったが、そのうち比較的成長状態が良く、まとまった観察結果が得られたのはDHG153、154、155だけで、本研究ではこれらについて報告したが、今後、他の系統も順次解析を進めていく予定である。T2世代には導入遺伝子をホモ接合型に有する場合とヘテロ接合型に有する場合があるが、現在のところ、それぞれの植物がDHG遺伝子をホモ接合型で有するかヘテロ接合型で有するかは調べられていない。系統間の違いを議論する上で、DHG遺伝子の導入部位の情報は重要である。その導入部位を明らかにするには、各系統のゲノム解析を行い、導入部位に対するPCR解析を行って、導入部位を確認しなければならない。導入部位が決定されれば、何番染色体に挿入されているのが判明し、各植物体がホモ接合かヘテロ接合かを調べられるようになる。ホモ接合個体同士を比較することで、減数分裂期染色体がGFPにより、よりよく可視化されているものを選抜できる。DHG1は第3染色体にDHGが組み込まれているが、第3染色体以外に組み込まれた系統を選別できれば、今後の交配実験に役立つものと考えられる。AtDMC1遺伝子の第1イントロンを加えた遺伝子上流域約2000塩基対の領域は花粉母細胞特異的な遺伝子発現を誘導すると報告されているが⁹⁾、その領域を用いたDHG遺伝子の発現はどの系統においても、花粉母細胞でも発現するが花粉母細胞特異的ではない。解析精度・感度を高めるために、発現の花粉母細胞特異性を高めることも今後の課題である。

謝辞

本研究は、研究課題「減数分裂期染色体ライブ観察用のシロイヌナズナ形質転換体の作成とその染色体の動態解析」に対する2022年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS 202205)を受けて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001) AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589-600.
- 2) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**: 206-216.
- 3) Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* **21**: 3081-3095.
- 4) Albini SM, Jones GH and Wallace BM (1984) A method for preparing two-dimensional surface-spreads of synaptonemal complexes from plant meiocytes for light and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **152**: 280-285.
- 5) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in Arabidopsis thaliana. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
- 6) Prusicki, M. A., Keizer, E. M., van Rosmalen, R. P., Komaki, S., Seifert, F., Müller K., Wijnker, E., Fleck, C. and Schnittger A. (2019) Live cell imaging of meiosis in Arabidopsis thaliana. *Elife* **8**: e42834.
- 7) Valuchova S, Mikulkova P, Pecinkova J, Klimova J, Krumnikl M, Bainer P, Heckmann S, Tomancak P and Riha K (2020) Imaging plant germline differentiation within Arabidopsis flowers by light sheet microscopy. *Elife.* **9**: e52546.
- 8) Shibata M, Nakagawa S, Shimizu M, Koga H, Fujita M, Nakagawa T and Azumi Y (2022) Time-Lapse Analysis of chromosome behavior in arabidopsis thaliana pollen mother cells using pAtDMC1:H2B:GFP fusion gene showed chromosome movement and conformational change at meiosis. *Cytologia.* **87**(4): 313-318.
- 9) Klimyuk VI and Jones JD (2002) AtDMC1, the Arabidopsis homologue of the yeast DMC1 gene: characterization, transposon-induced allelic variation and meiosis-associated expression. *Plant J.* **11**(1):1-14.

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

性機能を調節する脊髄射精発生器ニューロンの脳への投射

越智拓海^{1,2,3,4} 篠崎和歌子¹ 石割隆輔¹ 立石沙也加² 坂本浩隆² 小谷 享^{1,2}

Projection of Spinal Ejaculation Generator Neurons to the Brain

Takumi Oti^{1,2,3,4}, Wakako Shinozaki¹, Ryusuke Ishiwari¹, Sayaka Tateishi²,
Hirotaka Sakamoto² and Susumu Kotani^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

³ Ushimado Marine Institute (UMI), Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Setouchi City, Okayama 701-4303, Japan

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

Abstract: A spinal ejaculation generator (SEG) exists in the X layer of the rat spinal cord (lumbar spinal cord) at the L3-L4 level. SEG neurons express gastrin-releasing peptide (GRP) and oxytocin receptor (OXTR). We have previously reported that sexual experience induced the expressions of GRP and OXTR in SEG neurons. While SEG neurons project to the thalamic region and are thought to signal the completion of sexual behavior to the brain, it is still unclear where SEG neurons project to in the brain. The purpose of this study was to clarify the projection area of SEG neurons in the brain. Firstly, we analyzed the localizations of GRP-positive fibers in the brains of sexually experienced and naïve male rats. GRP-positive fibers were observed in the parafascicular nucleus (PF), subparafascicular nucleus (SPF), and medial amygdala nucleus, posterodorsal part (MePD). In all cases, more GRP fibers were observed in sexually experienced males than in naïve males. Secondly, we specifically lesioned SEG neurons using OXTR human diphtheria toxin receptor (Dtxr)-2A-channelrhodopsin-2-(ChR2)-EYFP transgenic rats. The number of SEG neurons was reduced by half compared with controls. GRP- and YFP-positive fibers in the MePD were significantly reduced in rats with a loss of SEG neurons compared with controls. No differences were found in other brain regions, suggesting that SEG neurons project to the MePD and that sexual experience enhances input from the SEG neurons to the MePD. In addition, sexual experience might increase the GRP expression not only in the SEG neurons but also in GRP neurons of the brain.

Keywords: lumbar-spinothalamic, gastrin-releasing peptide, oxytocin receptor, spinal cord, male sexual function

序論

ラット脊髄（腰髄）L3-L4 レベルの X 層に存在するガラニン発現ニューロンを特異的に破壊すると射精のみがなくなることから、腰髄には脊髄射精発生器 (SEG) ニューロンが存在することが知られている¹⁾。SEG ニューロンではガラニン、コレスチキニン、エンケファリン、ガストリン放出ペプチド (GRP) といった神経伝達物質が発現する^{2,3)}。我々はこれまでに SEG ニューロンにおける GRP 発現が男性ホルモ

ン・アンドロゲン依存的に調節され、下部腰髄で放出される GRP が勃起や射精といったオスの性機能を制御することを報告している⁴⁾。GRP ニューロンは雄優位な性的二型を示し、下部腰髄に存在する仙髄副交感神経核や球海綿体脊髄核へと投射する^{4,5)}。球海綿体脊髄核 (SNB) はペニスの基部に存在し勃起に関わる筋肉（球海綿体筋）を支配する運動ニューロンで、脊髄での代表的な性的二型核として知られる。我々は、

超高圧電子顕微鏡技術や経シナプスのなウイストレーザーを用いて、GRPニューロンがSNBや脊髄自律神経核にシナプス入力することを明らかにしている^{5,7)}。また、脊髄GRP線維は胸髄に存在する交感神経系にも投射する⁸⁾。そのため、SEGニューロンは胸髄(側角)においても末端からGRPを放出し、同時に腰一仙髄では勃起を制御する運動神経や副交感神経系を調節し、胸髄では射精に関わる交感神経系を調節する脊髄内局所神経ネットワークを構築すると考えられている^{8,9)}。最近、我々はSEGニューロンがオキシトシン受容体(OXTR)を発現し、オキシトシンによるSEGニューロンの活性化が雄の性行動を促進することを発見した¹⁰⁾。また、性経験を積んだ雄ではSEGニューロンにおけるGRP発現とOXTR発現が増加することも明らかにしている¹¹⁾。一方で、腰髄L3-L4レベルに存在するガラニン発現ニューロンは視床領域、特にmedial portion of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus (mSPFp)にも投射することから腰髄視床路(LSt)ニューロンとしても知られる^{1,12)}が、視床領域への投射が雄の性行動をどのように制御しているかはよくわかっていない。そこで本研究では性経験によるGRP発現の変化と、SEGニューロンの特異的な破壊による脳のGRP線維の変化に着目し、LStニューロンの投射先を調べることを目的とした。

材料と方法

実験動物

雌雄成熟ラット(Wistar系統; 7-11週齢)とOxtrヒトジフテリア毒素受容体(hDTR)・チャンネルロドプシン(ChR2)トランスジェニック(Oxtr-YFP Tg)ラット雄¹⁰⁾(Wistar系統; 8-10週齢[岡山大学より供与])を用いた。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。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、岡山大学動物実験委員会、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管理委員会の承認を受けて実施した。

性行動試験

先行研究に従い¹⁰⁾、人為的に発情させた雌ラットと雄ラットを性行動観察ケージに入れ、30分間の性行動実験を行い、複数週の射精(交尾)経験を持つ群を経験雄、飼育ケージに雄のみを入れた群を未経験雄とした。

腰髄L3-L4レベルX層へのジフテリア毒素投与

ヒトジフテリア毒素受容体を介した標的細胞ノックアウト法(toxin receptor-mediated cell knockout: TRECK法)を用いて、腰髄L3-L4レベルX層(図1)に局在するOXTR発現ニューロンの特異的な破壊を試みた。OXTR-YFP Tgラットをイソフルラン(1.5%, 1L/min)で吸入麻酔後、脳定位固定装置(ST-7R-HT, Narishige, Tokyo)および脊髄固定装置(STS-B, Narishige)に保定し、椎弓切除術を行い、脊髄表面を露出させた。脊髄正中線上の脊髄表面から1-1.5mmの位置にマイクロシリンジを刺入し、ジフテリア毒素(10 ng/ μ l)(01-517, Cosmo Bio CO.LTD, Tokyo, Japan)を0.4 μ l投与した。

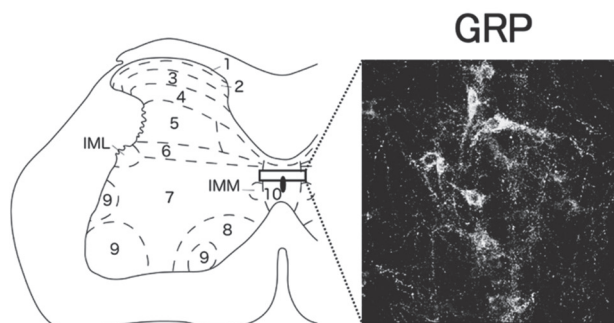


図1. ラット脊髄L3レベル横断面の模式図と脊髄GRPニューロン。脊髄は10の層に分けられ、性機能を制御する脊髄GRPニューロンは10(X)層の中心管背側部(四角)に存在する。IML, 中間質外側柱。IMM, 中間質内側柱。

免疫染色

ラットに三種混合麻酔(ドミトール0.3 mg/kg、ミダゾラム4.0 mg/kg、ベトルファール5.0 mg/kg)を腹腔内投与し、深麻酔下で左心室から生理食塩水を灌流して脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Phosphate-buffer (PB) (pH 7.4) 溶液を灌流し、固定した。脳と脊髄を摘出した後、4% PFA in 0.1 M PBを用いて4°C、一晩で後固定を行なった。25%スクロース in Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) 溶液に移し、4°C、48時間以上かけて置換し、凍結保護を行った。トリミング後、炭酸ガスで急速冷凍し、クリオスタット(CM1850, Leica, Nussloch, Germany)を用いて、30- μ m厚の凍結切片を作製した。切片をPBSで洗浄した後、内因性ペルオキシダーゼを失活させるために、1.0%過酸化水素/60%メタノール溶液に20分間浸漬し、その後PBSで洗浄した。さらに、0.3% Triton X-100、1%正常ヤギ血清、1%ウシ血清アルブミン、0.05% Na₃Nを用いて室温で30分反応させ、ブロッキングした。抗ラット Neuromedin-C (GRP) 抗体(ウサギ、11081; AssayPro, St. Charles, MO, RRID:

AB_2571636 ; ブロッキングバッファーで 1:2,000 に希釈) を用いて室温で 1 時間反応させたのち、4°C で 1 晩反応させた。免疫反応産物は streptavidin-biotin kit (Nichirei, Tokyo, Japan) と 3-3' -ジアミノベンジジン (DAB) を用いて可視化した。脱水透徹を行ったのち、マウントクイック (Daido Sangyo CO., LTD. Japan) で封入した。光学顕微鏡 (BX53; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて画像を取得した。

YFP シグナルと GRP 免疫蛍光を検出する目的で、green fluorescent protein (GFP) に対する抗体 (chicken, 600-901-215; Rockland, Gilbertsville, PA, RRID: AB_1537402, 1:2000 希釈) と抗 GRP 抗体 (1:1000 希釈) を使用し、Alexa Fluor 488-linked anti-chicken IgG raised in goats (1:1,000 希釈; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) と Alexa Fluor 555-linked anti-rabbit IgG raised in goats (1:1,000 希釈; Molecular Probes) を用いて室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) を用いて封入した。染色した切片は蛍光顕微鏡 (BX53, Olympus) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察し、画像を取得した。

画像解析

未経験雄 (n = 5) と経験雄 (n = 6) の横断脳切片に対し、GRP に対する免疫染色を行い、束傍核 (parafascicular nucleus: PF)、視床中心傍核 (subparafascicular nucleus: SPF)、扁桃体内側核尾部腹側部 (medial amygdala nucleus, posterodorsal part: MePD) の写真を 1 個体当たり 10 枚撮影した。撮影した画像を白黒反転させ、画像解析ソフト ImageJ (Version1.45p; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて GRP 免疫陽性を黒色、それ以外の部分を白色化して表した。黒色のシグナルのみを検出し、そのピクセル数を数値化し、未経験雄の GRP 免疫陽性強度の平均を '1' とした相対値を用いて GRP 免疫陽性強度を比較した。また、蛍光画像の解析では、PBS を投与した OxTR2 ラット (コントロール; 3 匹) およびジフテリア毒素投与を投与した OxTR2 ラット (3 匹) の横断脳切片に対し、GRP と GFP に対する免疫染色を行い、MePD 領域の写真を 1 個体あたり 10 切片撮影した。撮影した画像を白黒反転させ、画像解析ソフト ImageJ (Version1.45p; National Institutes of Health) を用いて GRP あるいは GFP 免疫陽性を黒色、それ以外の部分を白色化して表した。黒色のシグナルのみを検出し、そのピクセル数を数値化し、PBS を投与したコントロール群の GFP 免疫陽性強

度を '100%' とした相対値を用いてジフテリア毒素投与群での GFP 免疫陽性強度を比較した。

定量解析

各群のデータを平均値±標準誤差で示し、対応のない *t* 検定を用いて解析した。

結果

性経験による視床・視床下部領域での GRP 線維の変化

性経験のない雄ラットと性経験を積んだ雄ラットの前脳において、GRP 陽性線維の局在を解析した (図 2)。その結果、束傍核 (parafascicular nucleus: PF)、視床中心傍核 (subparafascicular nucleus: SPF)、扁桃体内側核尾部腹側部 (medial amygdala nucleus, posterodorsal part: MePD) において GRP 陽性線維が観察され、3 領域全てにおいて経験雄の方が未経験雄に比べて GRP 線維が多く観察された (図 1)。これらを定量的に解析した結果、GRP 陽性

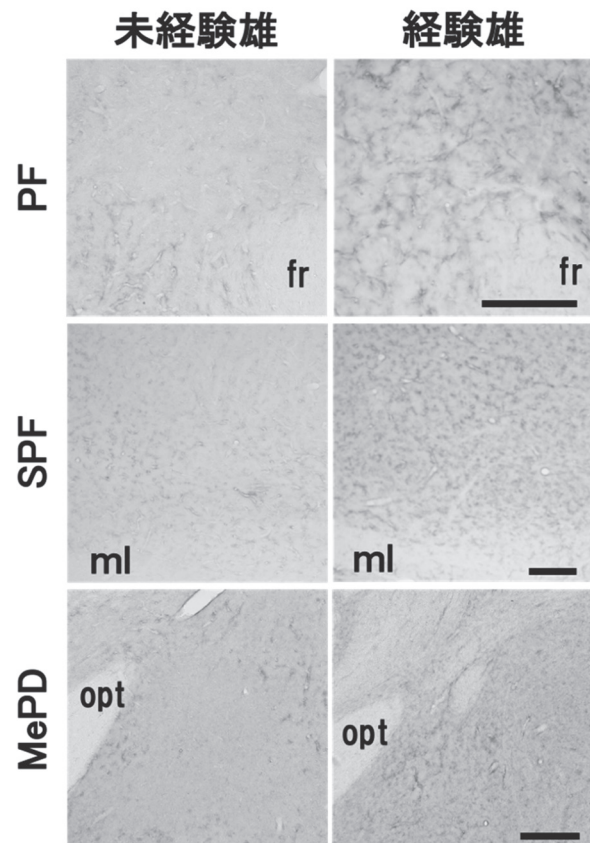


図 2. 雄ラット前脳におけるガストリン放出ペプチド (GRP) 線維の局在と交尾経験差。束傍核 (parafascicular nucleus: PF)、視床中心傍核 (subparafascicular nucleus: SPF)、扁桃体内側核尾部腹側部 (medial amygdala nucleus, posterodorsal part: MePD) において GRP 陽性線維が観察され、3 領域全てにおいて経験雄の方が未経験雄に比べて GRP 線維が多く観察された fr: 反屈束, ml: 内側毛帯, opt: 視索。スケールバー, 200 μ m。

強度は、PFにおいて未経験雄 ($n=5$) で 1.00 ± 0.12 、経験雄 ($n=6$) で 3.90 ± 0.58 、SPF では未経験雄で 1.00 ± 0.08 、経験雄で 2.72 ± 0.51 、MePD では未経験雄で 1.00 ± 0.05 、経験雄で 2.65 ± 0.23 と有意に増加し ($P < 0.05$)、交尾経験により、各領域における GRP 陽性線維は 2 倍から 4 倍に増化することを明らかにした (表 1)。

領域	未経験雄 ($n=5$)	経験雄 ($n=6$)	P値
PF	1.00 ± 0.12	3.90 ± 0.58	0.0034
SPF	1.00 ± 0.08	2.72 ± 0.51	0.033
MePD	1.00 ± 0.05	2.65 ± 0.23	0.0012

PF: 束傍核, SPF: 視床中心傍核, MePD: 扁桃体内側核尾部腹側部.

表 1. 各脳領域における未経験雄の GRP 陽性強度を '1' とした時の経験雄の GRP 染色強度.

SEG ニューロン破壊後の MePD における GRP 線維と OXTR 線維の変化

ジフテリア毒素投与による SEG ニューロンの破壊を確認する目的で、脊髄において GRP に対する免疫染色を行った。脊髄における YFP 陽性ニューロンはコントロール群で 518 ± 36 個、毒素投与群で 289 ± 24 個と毒素投与により YFP ニューロンが半減した。また、GRP 陽性ニューロン数はコントロール群で 520 ± 18 個、毒素投与群で 265 ± 26 個と、毒素投与により GRP 陽性ニューロンも半減した。次に、脳において、GRP に対する免疫染色を行い、ジフテリア毒素投与により GRP 線維が減少する領域を調べた。その結果、MePD において YFP 陽性線維、GRP 陽性線維が観察され、毒素投与群ではコントロール群に比べて YFP 陽性線維、GRP 陽性線維が減少していた (図 3)。これらの画像をもとに MePD における YFP 蛍光強度と GRP 陽性強度を定量化した。結果、YFP 蛍光強度は毒素投与群ではコントロール群の約 75% まで減少していた (図 4)。同様に、GRP 陽性強度は毒素投与群ではコントロール群の約 52% まで減少していた (図 4)。また、今回観察した限りでは、MePD 以外の領域で YFP 陽性線維、GRP 陽性線維の変化はみられなかった。

討論

今回、交尾経験雄ラットを用いることで、これまで交尾未経験雄ではほとんど観察されなかった前脳領域における GRP 線維の投射を明らかにすることに成功した。脊髄に存在する GRP ニューロンも交尾経

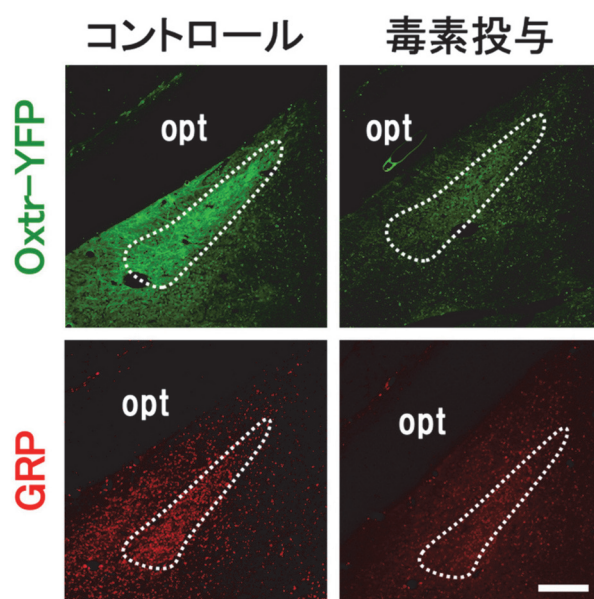


図 3. SEG ニューロンの破壊と脳における SEG ニューロン線維. MePD において、脊髄に毒素を投与した群ではコントロール群に比べて、YFP 陽性 (OXTR) 線維と GRP 陽性線維が減少した. Opt, 視索. スケールバー, 200 μ m.

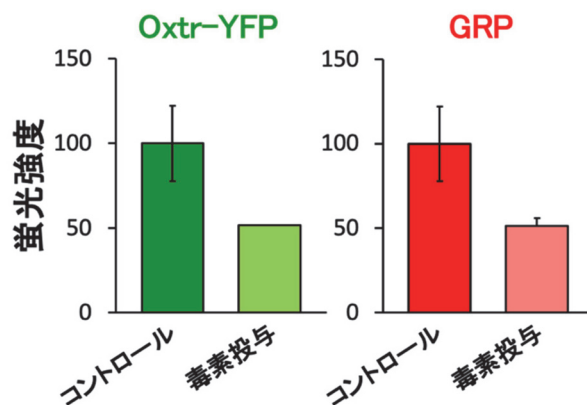


図 4. 毒素投与による YFP 陽性 (OXTR) 線維と GRP 陽性線維の蛍光強度の変化. コントロール群の蛍光強度の平均を 100 とし、平均土標準誤差で示した.

験により GRP 発現が増加する¹¹⁾ことから、今回発見した PF、SPF、MePD の GRP 線維は脊髄 GRP ニューロン由来である可能性が高い。また、ジフテリア毒素により、脊髄 GRP ニューロンが半減し、MePD における GRP 陽性線維が減少した。YFP 陽性 (OXTR) ニューロンでも同様の結果が得られたことから、MePD が脊髄 GRP ニューロンの投射先である可能性が高い。

交尾経験を積んだ雄では性行動が活発になる¹³⁾。また、交尾経験は、視床下部の性行動に関わる視床下部視索前野に存在するニューロン樹状突起の棘突起を成熟させることが知られている¹⁴⁾。また、脊髄 GRP ニューロンにおいて、交尾経験は GRP や

OXTR の発現を増加させる¹¹⁾。今回、交尾経験がない雄では GRP 線維がほとんどみられない脳領域においても交尾経験を積んだ雄では GRP 線維が多数観察された。これらのことから、交尾経験による変化着目して解析を行うことで、新規の神経投射や行動制御メカニズムを明らかにできるかもしれない。

今回 GRP 線維が観察された PF、SPF、MePD では射精後に神経活性化マーカーの発現が増加することが知られている^{15,16)}。また、交尾経験のある雄ラットにおいて、MePD は発情雌の匂いに応答する領域としても知られている¹⁵⁾。射精に至ったシグナルを脊髄 GRP ニューロンが MePD へと伝えることで、雌へのモチベーションを抑制し、性行動の完了を定義するのかもしれない。今後、MePD の GRP 受容体ニューロンを特異的に破壊したラットで脊髄 GRP ニューロンを活性化し、雄の性行動がどのように変化するかを解析することで、LSt ニューロンによる性行動時のフィードバックメカニズムを明らかにできると考えている。

謝辞

本研究は、2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202206) を受けて行われた。記して感謝する。

文献

- 1) Truitt WA and Coolen LM (2002) Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* **297**: 1566-1569.
- 2) Coolen LM (2005) Neural control of ejaculation. *J. Comp. Neurol.* **493**: 39-45.
- 3) Sakamoto H (2012) Brain-spinal cord neural circuits controlling male sexual function and behavior. *Neurosci. Res.* **72**: 103-116.
- 4) Sakamoto H, Matsuda K-I, Zuloaga DG, Hongu H, Wada E, Wada K, Jordan CL, Breedlove SM and Kawata M (2008) Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. *Nat. Neurosci.* **11**: 634-636.
- 5) Sakamoto H, Arai T and Kawata M (2010) High-voltage electron microscopy reveals direct synaptic inputs from a spinal gastrin-releasing peptide system to neurons of the spinal nucleus of bulbocavernosus. *Endocrinology* **151**: 417-421.
- 6) Dobberfuhl AD, Oti T, Sakamoto H and Marson L (2014) Identification of CNS neurons innervating the levator ani and ventral bulbospongiosus muscles in male rats. *J. Sex. Med.* **13**: 664-677.
- 7) Oti T, Satoh K, Saito K, Murata K, Kawata M, Sakamoto T and Sakamoto H (2012) Three-dimensional evaluation of the spinal local neural network revealed by the high-voltage electron microscopy: a double immunohistochemical study. *Histochem. Cell Biol.* **138**: 693-697.
- 8) Kozyrev N, Lehman MN and Coolen LM (2012) Activation of gastrin-releasing peptide receptors in the lumbosacral spinal cord is required for ejaculation in male rats. *J. Sex. Med.* **9**: 1303-1318.
- 9) Sakamoto H (2014) Sexually dimorphic nuclei in the spinal cord control male sexual functions. *Front Neurosci.* **8**: 184 eCollection 2014.
- 10) Oti T, Satoh K, Uta D, Nagafuchi J, Tateishi S, Ueda R, Takanami K, Young LJ, Galione A, Morris JF, Sakamoto T, and Sakamoto H (2021) Oxytocin Influences Male Sexual Activity via Non-synaptic Axonal Release in the Spinal Cord. *Curr Biol.* **31**: 103-114 e105.
- 11) Oti T, Ueda R, Kumagai R, Nagafuchi J, Ito T, Sakamoto T, Kondo Y, and Sakamoto H (2021) Sexual Experience Induces the Expression of Gastrin-Releasing Peptide and Oxytocin Receptors in the Spinal Ejaculation Generator in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 10362.
- 12) Coolen LM, Veening JG, Wells AB, and Shipley MT (2003) Afferent connections of the parvocellular subparafascicular thalamic nucleus in the rat: evidence for functional subdivisions. *J. Comp. Neurol.* **463**: 132-156.
- 13) Nutsch VL, Will RG, Hattori T, Tobiansky DJ, and Dominguez JM (2014) Sexual experience influences mating-induced activity in nitric oxide synthase-containing neurons in the medial preoptic area. *Neurosci. Lett.* **579**: 92-96.
- 14) Jean A, Bonnet P, Liere P, Mhaouty-Kodja S, and Hardin-Pouzet H (2017) Revisiting medial preoptic area plasticity induced in male mice by sexual experience. *Sci. Rep.* **7**: 17846.
- 15) Hosokawa N, and Chiba A (2005) Effects of sexual experience on conspecific odor preference and estrous odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in male rats. *Brain Res.* **1066**: 101-108.
- 16) Veening JG, and Coolen LM (1998) Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav. Brain Res.* **92**: 181-193.

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

植物の茎に亀裂が生じる動態の定量的解析

浅岡真理子¹ 西谷和彦^{1,2}

Visualization and Quantification of Mechanical Conflict on Plant Stem Organ

Mariko Asaoka¹ and Kazuhiko Nishitani^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

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

Abstract: The stem of vascular plants is a fundamental organ that sustains both aspects of vegetative and reproductive growth. Although the morphology itself and process of stem development have been extensively investigated, it remains unknown how mechanical forces and stem organogenesis are coordinated. Good examples to advance our understanding of the mechanical properties of the stem organ are the recently identified mutant lines of *Arabidopsis thaliana*, which display spontaneous cracks in the stem. In these mutant lines, the morphologies at certain fixed time-points are becoming clearer. However, morphologies at the time-point when the stem begins to crack, and those at the time of its extending process are still unclear. Accordingly, in this research, we set up a method to acquire timelapse images and succeeded in capturing the process of stem cracking from the beginning to extending stages. Using these methods, we revealed that the extension of stem cracks did not progress proportionally with time, but rather proceeded like a random wave of rapid and slow extending.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, inflorescent stem, mechanical forces, organ breakage, time lapse imaging.

序論

維管束植物の茎は、外側から表皮、皮層、内皮、維管束といった細胞群が整列されて構成される。モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は真正双子葉植物であり、道管、形成層、師部細胞などから成る維管束は茎内で環状に並んで配置され、その束同士をつなぐように繊維細胞が複数層存在する。シロイヌナズナの成長過程は、ロゼット葉を展開する栄養成長期と、花序茎 (Inflorescence stem) を伸長させて花芽を形成する生殖成長期に分けられる。花序茎には初めに形成される主茎に加え、遅れて傍から形成される側茎があるが、それぞれの茎の基本的な構造は同一である。本研究では主茎を解析の対象としている。

維管束を構成する細胞である道管細胞と繊維細胞は、最外層の一次細胞壁の内側には二次細胞壁とよばれる強固な細胞壁が形成される。繊維細胞におけ

る二次細胞壁形成が抑制されると、茎は直立ができなくなることから、維管束は茎の姿勢の制御に重要であることがよく知られている¹⁾。一方でごく最近、私たちは維管束が茎の力学的な整合性維持にも重要な役割を担うことを証明した²⁾。茎の力学的な完全性というのは、言い換えると茎が形状を保って機能を発揮するための仕組みのことである。近年、茎に亀裂が生じるシロイヌナズナの変異体や形質転換系統がいくつか見出されており、これらの系統ではこの仕組みが破綻していることで、茎に亀裂が生じると考えられている²⁻⁵⁾。これらの系統に関して、なぜ亀裂が生じてしまうのか、その原因を探ることで、茎の力学的な完全性維持に必要な要素が明らかになってきている。そのうち *clavata3 de-etiolated3* 変異体系統では表皮細胞の細胞壁の力学的強度の減少が、*pNST:IDD9:SRDX* 系統では茎内部の細胞の過

度な肥大が、亀裂発生と関連することが示唆されてきている^{2,5)}。

しかし、なぜ亀裂が生じるかを解析する以前に、亀裂はどのようにして茎に生じるかといった情報は現段階で限定的である。これまでの解析では、亀裂が生じる前後の2つの時期で、茎の決まった箇所組織切片の形態を解析するのが中心であったため、茎に亀裂が実際に生じる瞬間や、それらが広がる過程は捉えられていない。そのため、今後茎の力学的完全性が保たれる機構の解明に向けた研究土台の拡大には、亀裂が生じるという現象自体の高解像度での理解が必要と考えた。

生物界の中で動き回る動物に比べ、基本的に固着性である植物は、動的な存在としてあまり捉えられていない。しかし、屈性による比較的早い運動に加え、基本的な成長運動によって、植物は絶えず動き続けている。近年ではそれらの動きを高い分解能で再現性をもって捉える研究が進みつつある^{6,7)}。本研究では、まず亀裂が生じる過程をタイムラプスで捉え、器官の破綻がどのような過程で進行していくかを明らかにすることを目指した。

材料と方法

実験植物と生育条件

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *pNST3:IDD9:SRDX* 系統²⁾の種子を、ハイポネックス溶液を加えたロックウール (Rockwool B.V., Grodan) に蒔き、22℃長日条件 (16時間明期、8時間暗期) 下 ($45 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で育生した。

タイムラプス撮影

茎が12-3 cm程度まで伸長したシロイヌナズナの、茎頂から数cm下を、ロックウールに刺した竹串と針金で固定し、22℃連続光に設定した人工気象器 (LPH-411SPC、日本医化器械) に移した。人工気象器内に、植物一個体あたりカメラ (WG-6、RICOH) を2台設置し、インターバル撮影モードで、茎の基部側を5分間隔で48時間の連続撮影を行なった。ImageJ (NIH) を用いて、撮影画像から亀裂のサイズを測定した。個体番号 (#1 - 10) は Figure を通して共通している。

結果

茎に生じる亀裂のタイムラプス撮影

シロイヌナズナの茎は、抽薹し始めは3-4日程度かけて2 cm程度まで伸張すると、その後最大で1日3 cm程度の伸長速度で伸長した後、20 cmを過ぎたあたりから伸長速度は徐々に緩やかになる。茎に亀裂

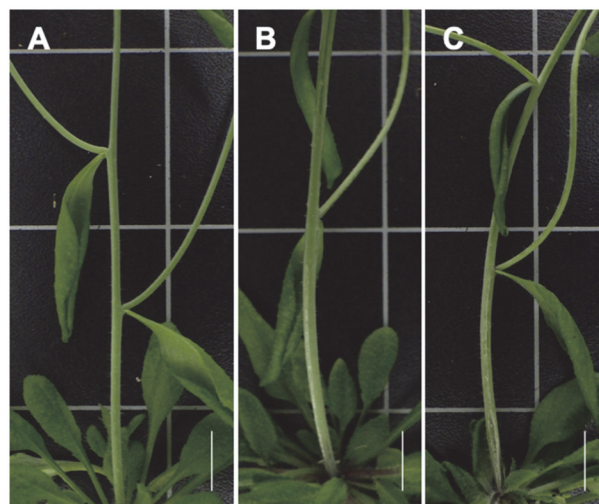


Fig. 1. 本研究対象の茎に亀裂が生じるシロイヌナズナの形質転換系統 (*pNST3:IDD9:SRDX*) の茎の様子の写真。(左) 野生型, (中央, 右) 形質転換系統. スケールバー = 1 cm.

が生じる *pNST3:IDD9:SRDX* 系統の主茎も、20 cm程度になるまでは野生型とよく似たような伸長模様を示す。亀裂は主茎長が15-20 cmあたりで主に第一節に生じることが確認されている²⁾ (Fig.1)。

これらの情報を参考に、今回の実験では、茎が12-3 cm以上に伸長した個体を用いて撮影を行なった。カメラを2方向からセットすることで、茎の周囲のおおよそ270°の範囲の撮影を可能とした。撮影を継続的に繰り返し、10個体について亀裂の生じる過程の撮影を行なうことができた。撮影した画像から Movie も作成しているが、紙面の都合で1時間ごとのコマ撮り写真を示す (Fig. 2A, B)。ごく小さな亀裂が生じた一例を除いて、亀裂は初めに生じた箇所から茎の頂端軸の両方向に広がっていく過程が観察された。

亀裂の連続画像から、最終的な亀裂の長さを計測し、亀裂発生時からその長さに至るまでにかかった時間を算出した (Fig. 3)。亀裂が広がる速度は、速い個体 (#9, #10) では約0.1 mm/minで、3時間程度で観察された最終的なサイズに至っていた。一方で0.01 mm/min以下の個体も3例 (#2, #3, #5) あった。これらの個体では、1日以上をかけて亀裂が徐々に広がる様子を示した。

一旦茎に生じた亀裂は、不規則的な速さで拡大した

さらに観察をすすめると、亀裂が拡大する様子は一定ではないことが分かった。亀裂の様子の撮影10例のうち、亀裂が拡大する期間と、変化がない期間が目立って観察された個体に関して、亀裂の拡大動態が変化した複数の時点での亀裂の大きさを計測した

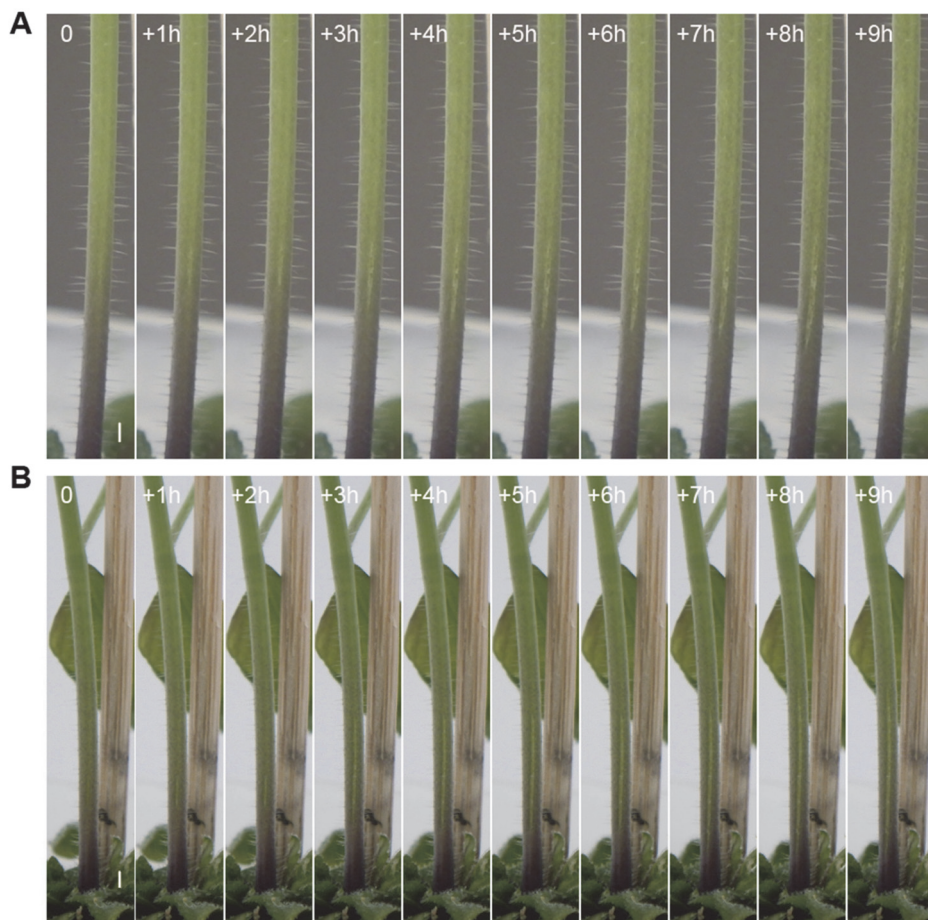


Fig. 2. 亀裂が生じる過程を捉えた同一茎の連続画像 (A, 個体#3, B, 個体#8). 写真は主茎の第一節を5分おきに撮影した画像の中から、亀裂が生じる直前を起点として1時間ごとの写真を選択して左から右に示している. スケールバー = 1 mm.

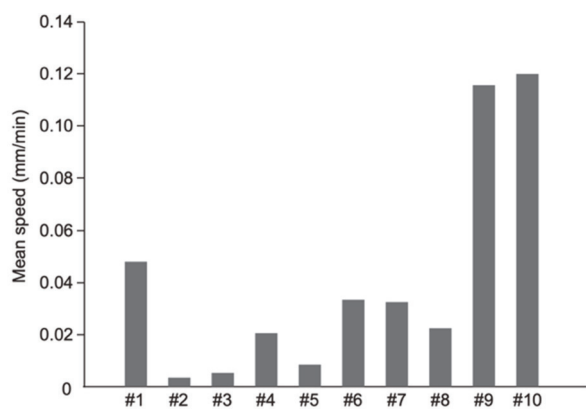


Fig. 3. 亀裂が拡大速度の平均値を示している. 最終的な亀裂の大きさ (茎の軸と平行方向の亀裂の長さ) を、亀裂が生じ始めたタイミングから拡大が終了した時間で割ることで算出している.

(Fig. 4). その結果、亀裂が一気に拡大した後に、その後も徐々に広がる様子や (#6, #9, #10)、反対に小さい亀裂が生じた後にしばらく変化はないが、数時間後にさらに一気に亀裂が拡大する様子も観察された (#7, #8)。亀裂の急激な拡大はなくとも、時間をかけて徐々に広がる様子も観察された (#2)。

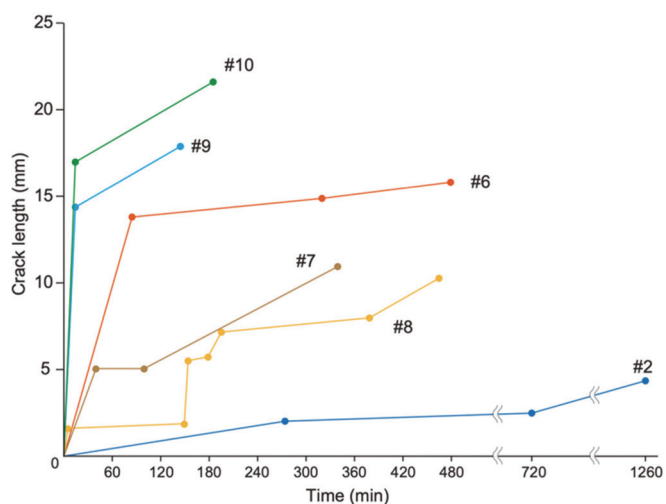


Fig. 4. 亀裂の拡大の経過観察結果. 亀裂が生じる過程の連続画像の中から、亀裂の拡大の様子に変化がみられた (拡大, または一時休止) 時点における亀裂の長さをプロットした.

討論

亀裂が生じる過程のタイムラプス撮影の結果、亀裂が広がる速度や過程にはパターンがいくつかあることがわかった。これらに関する規則性を見出すには、

さらに多くの観察例が必要であるといえるが、今回の研究で、茎の亀裂が生じる過程を捉えることができたのは大きな成果である。観察例を増やすとともに、今回は亀裂が生じる過程で顕著な変化がみられた点を中心に数値の定量化を行なったが、今後の解析では撮影した全点において解析することで、より細かな波についても理解が可能となることが期待される。一見単調に見える亀裂の拡大過程においても、変化がある可能性も考えられる。また、本研究では一個体の撮影時間 48 時間のうち、撮影開始後、比較的早期に亀裂が生じ始めたものもあれば、撮影期間の後半（特に #9, #10）から亀裂が生じ始めたものがあった。それらの個体に関して、撮影期間内の亀裂の拡大の終息は確認したが、終息後、しばらくした後に個体 #8 のように再度亀裂が広がる可能性も考え得る。48 時間以上の撮影に関してはカメラのバッテリーの限度に加え、茎へのピントのずれが大きくなることが問題であるが、亀裂が生じてからの十分な時間の観察ができるようにするために、これらは今後改善を検討したい。

茎に亀裂が生じる過程は、一定の速度ではなく、最終的な亀裂の大きさの大部分は 10-20 分程度で生じ、その後徐々に両側の裾が広がっていく様子が見られた。今回解析対象とした茎の基部側は、伸長成長はすでに完了している時期と想定される。そのため、茎の亀裂は内部の成長に外側組織が耐えきれなくなることによって生じたと考え、亀裂が生じることで内部組織から外側組織にかかる過剰な力の大部分は解消されれば、その後亀裂はそれ以上に広がらないといえる。しかし、本研究で観察されたように亀裂の拡大が持続したことは、亀裂付近の細胞がまだ成長をしていることを示唆している。もしくは遠位の細胞の伸長が伝播している可能性も考えられる。実際に切り離れた植物組織は、周囲からの干渉がなくなることによって拡大することが古くから知られている⁸⁾。

1. 亀裂が生じることで亀裂付近の細胞が制限から解放されて伸長する、
2. それによりさらに亀裂が拡大する、

とすると、この 1, 2 の過程が局所的に続くことで、亀裂の拡大が持続することが考えられる。これらはわずかに数十分～数時間に起きている現象であることから、全体的な伸長が完了している器官でも、細胞は即時にさらに伸長するポテンシャルを秘めていることが推測される。

本研究では茎に亀裂が生じる瞬間を撮影することができたが、今回撮影した亀裂の様子は、これまで筆者らがこの系統の研究に携わる中で、別の生育環境で観察してきた亀裂とは様子が異なる。今回は茎

の表面に少し傷が入るような亀裂が多くみられたが、他の研究においては、fig. 1C の基部側のような、いわゆる完全に裂けてしまったような（90 度以上に広がる）亀裂も多くみられていた。これまでにこの亀裂の様子の違いは定量性をもって調べられていないが、経験的には直感に反して茎が太いほど亀裂が小さい傾向がみられている。一般的にシロイヌナズナでは茎の太さは栄養成長期の長さと同比例する傾向があり、生育に不適と判断すると早く次世代を残そうと生殖成長への切り替えが早くなるが、生育に好都合の環境では栄養成長期間が長くなり、その結果形成される茎も肥大する傾向にある。実験室内でごく近くで生育させている個体でも、室内の空気の流れの違いからか生育程度が異なることも多い。今後は、このような環境のゆらぎも理解して生育環境を整備することで、茎の亀裂が生じる現象の自在な制御につなげていきたい。

謝辞

本研究で用いたシロイヌナズナの系統は、東京学芸大学 Ferjani 研究室を主体とした研究において見出されたものです。本研究にあたり、種子の使用をお認めいただき感謝申し上げます。本研究の一部は 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202207) を受けて行われました。

文献

- 1) Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K and Ohme-Takagi M (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 270-280.
- 2) Asaoka M, Sakamoto S, Gunji S, Mitsuda N, Tsukaya H, Sawa S, Hamant O and Ferjani A (2023) Contribution of vasculature to stem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **150**: dev201156.
- 3) Hentrich M, Sánchez-Parra B, Alonso M-M P, Loba VC, Carrillo L, Vicente-Carbajosa J, Medina J and Pollmann S (2013) *YUCCA8* and *YUCCA9* overexpression reveals a link between auxin signaling and lignification through the induction of ethylene biosynthesis. *Plant Signal Behav.* **8**: e26363.
- 4) Maeda S, Gunji S, Hanai K, Hirano T, Kazama Y, Ohbayashi I, Abe T, Sawa S, Tsukaya H and Ferjani, A. (2014) The conflict between cell proliferation and expansion primarily affects stem organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1994-2007.
- 5) Asaoka M, Ooe M, Gunji S, Milani P, Runel G, Horiguchi G, Hamant O, Sawa S, Tsukaya H and Ferjani A (2021) Stem integrity in *Arabidopsis thaliana* requires a load-bearing epidermis. *Development* **148**: dev198028.
- 6) Kunita I, Morita MT, Toda M and Higaki T (2021) A three-dimensional scanning system for digital archiving and quantitative evaluation of Arabidopsis

- plant architectures. *Plant Cell Physiol.* **62**: 1975-198.
- 7) Yokoyama T, Watanabe A, Asaoka M and Nishitani K (2023) Germinating seedlings and mature shoots of *Cuscuta campestris* respond differently to light stimuli during parasitism but not during circumnutation. *Plant Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.14575>.
- 8) Niklas KJ (1992) *Plant biomechanics. An engineering approach to plant form and function.* The University of Chicago Press, Chicago, London.

■原 著■ 2022 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 10 (河口域生態系マイクロプラスチックの実態の検討)

高橋ひよの¹ 荻野湧矢¹ 鈴木祥弘^{1,2} 西本右子^{1,2,3}

Long-term Monitoring of Environmental Change
in Sagami Bay Estuary 10
- Basic Study of Microplastics in Sagami River Estuary -

Hiyono Takahashi¹, Yuya Ogino¹, Yoshihiro Suzuki^{1,2}
and Yuko Nishimoto^{1,2,3}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: y24moto@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: As part of the long-term monitoring of environmental changes in the Sagami River mouth, microplastics were investigated along the riverbanks of the Sagami Bay Estuary. Most of the plastics recovered were polyethylene and polypropylene. The FT-IR (ATR) technique was effective to identify the polymer species in the samples.

Keywords: microplastics, Sagami River estuary, FT-IR, plastic pollution

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。著者らは継続して相模湾の平塚市周辺の海域に着目し、採取した海水及び相模湾への流入河川である、相模川及び金目川（花水川）の河川水の測定を行ってきた。同日にサンプリングした両河川水の分析結果より、上流から下流にいくに従って各元素濃度が増加する傾向は共通するが全体的に金目川の方が元素濃度が高いことがわかった¹⁾。また相模湾河口域の海水では、冬期に流入した河川水の影響で、表層に塩濃度の低下が観測されている^{2,3)}。さらに近年の大型台風の直撃が相模湾の平塚市周辺海域や相模湾への流入河川に大きな影響を与えており、大型台風による元素濃度の変化が少なくとも半月程度はみられること、相模川河口付近では、河口から 500 m 程度までは河川の流入の影響で海水の元素濃度が低くなるが、1 km 以上でほぼ一定となることも報告してきた³⁾。近年、海洋におけるプラスチック汚染が問題となり、5 mm 以下の大きさのマイクロプラスチック、特に、プラスチック製品やプラスチックごみが光（紫外線）や摩耗等により微細化した二次プラスチックが問

題視されている。二次プラスチックではもともと 5 mm 以下で用いられる一次プラスチックに比較して、プラスチックに含まれる添加剤や環境中で吸着した有機汚染物質による影響も無視できない。本研究では相模川河口域における長期環境変動のモニタリングの研究の一環として、相模川河口の河岸でプラスチック片を採取し、測定した。

材料と方法

サンプリング

相模川河口の河岸で冬期にプラスチック片を採取し



Fig. 1. Map of the sampling point.

た。試料は水洗後風乾し、測定試料とした。
 Fig. 1 にサンプリング地点の地図を示した。採取した 66 サンプルは Table 1-1, 1-2 に示した。背景はグラフ用紙であり、マス目は 1 mm である。

測定

IR スペクトルは Thermo Fisher Scientific Nicolet iS

10 を使用して、ATR 法（ダイヤモンドクリスタル、潜り込み深さ：2~3 μm）で洗浄した試料表面を測定した。

結果

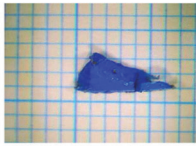
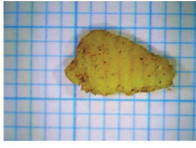

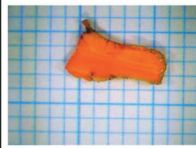
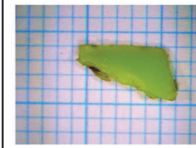


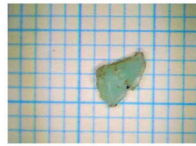

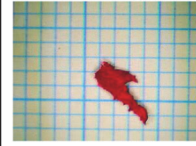

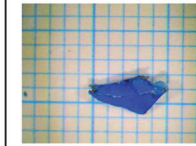
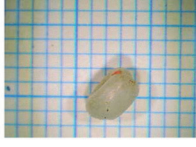
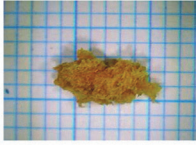
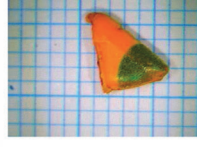
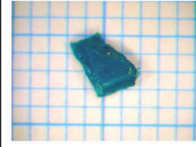



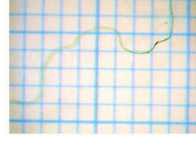
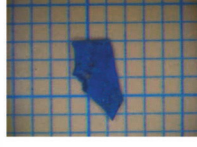
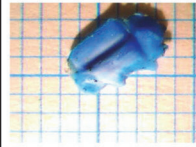
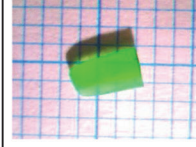
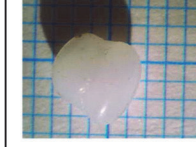
FT-IR 測定結果

Fig. 2 に試料 7 の IR スペクトルを示した。スペクト

Table 1-1. Appearance of sample 1-42

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42

Table 1-2. Appearance of sample 43-66

43	44	45	46	47	48
					
49	50	51	52	53	54
					
55	56	57	58	59	60
					
61	62	63	64	65	66
					

ルパターンから、試料はポリエチレンであることがわかる。ほぼ同様のスペクトルを示した試料は試料 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 20, 23, 28, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 48, 49, 50, 52, 56, 59, 60, 61, 65 の計 31 試料であった。Fig. 3 には試料 42 の IR スペクトルを示した。スペクトルパターンから、試料はポリプロピレンであることが分かる。ほぼ同様のスペクトルを示した試料は、試料 4, 5, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 51, 53, 54, 55, 57, 58, 63, 64, 66 の計 33 試料であった。Fig.4 には試料 26 の IR スペクトルを示した。スペクトルパターンから試料はポリエス

テルであることが分かる。また試料 62 はノイズが多く、明瞭なスペクトルは得られなかった。

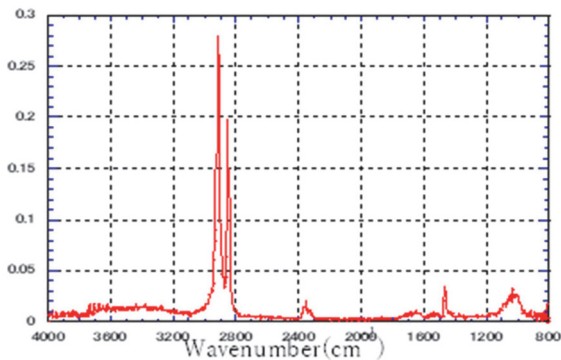


Fig. 2. IR spectrum of sample 7.

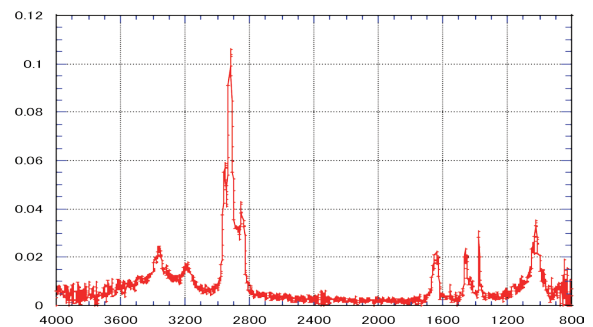


Fig. 3. IR spectrum of sample 42.

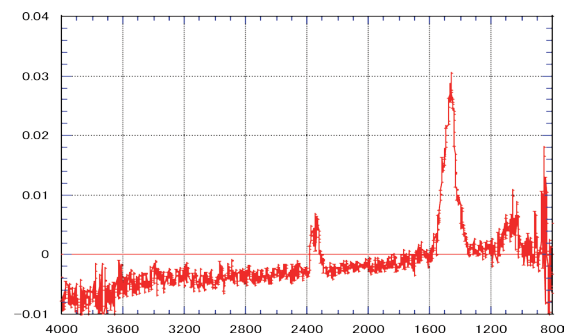


Fig. 4. IR spectrum of sample 26.

討論

採取試料

相模湾河口域で冬期に採取した 66 試料について IR スペクトルのみで 65 試料を同定することができた。47%がポリエチレン、50%がポリプロピレンであった。またポリエステルは 1 試料のみであった。FT-IR 特に ATR 法は 0.1 mm 程度の平滑面があれば測定でき、前処理も不要である。環境中のマイクロプラスチックの同定に有効であることが確認できた。得られた試料やスペクトルも環境省のガイドラインと一致するものであった⁴⁾。スペクトルが得られなかった試料 62 については TG (熱重量分析) より無機物と思われた。

環境におけるマイクロプラスチックの測定の報告は海洋がほとんどであり、河川は多くないが、ポリエチレン、ポリプロピレンが多くを占める本結果はこれまでの報告を一致する結果であった⁵⁾。

謝辞

本研究は、2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202204) を受けて行った。ここに謝意を表します。

文献

- 1) 野木大輔, 平賀義路, 金澤謙一, 西本右子, 武井尊也, 鈴木祥弘 (2015) 相模川河口域プランクトン生物量の周年変化. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 91-96.
- 2) 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2016) 相模川河口域海水及び流入河川水の元素濃度. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **27**: 81-84.
- 3) 荒井 健, 島川涼太, 武井尊也, 鈴木祥弘, 金澤謙一, 西本右子 (2017) 相模川河口域における長期環境モニタリング 4 - 流入河川水の元素濃縮. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**: 109-112.
- 4) 河川・湖沼マイクロプラスチック調査ガイドライン, 環境省 (2023) .
- 5) 工藤功貴, 片岡智哉, 二瓶泰雄, 日向博文, 島崎穂波, 馬場大樹 (2017) 日本国内における河川水中のマイクロプラスチック汚染の実態とその調査手法の基礎的検討. *水工学論文集*. **73**: 1225-1230.

■原 著■ 2022 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 10 海況と植物プランクトン分布 2023 年 1 月

西條光河¹ 川延京子² 西本右子^{2,3} 鈴木祥弘^{1,2,4}

Long-Term Monitoring of Environmental Changes
in the Sagami River Estuary X
Distribution of Phytoplankton Biomass in January 2023

Koga Nishijo¹, Kyoko Kawanobe², Yuko Nishimoto^{2,3} and Yoshihiro Suzuki^{1,2,4}

¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry and Biochemistry, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

² Graduate School of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

³ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuki03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: In the Sagami River Estuary, a brackish water mass extending up to 5000 m offshore at the surface and a homogeneous water mass below the brackish water mass were observed in January 2023. Three types of water masses are often observed in this area: brackish, coastal, and open ocean water masses, but coastal and open ocean water masses were not clearly distinguished in the homogeneous water mass in this season, where water temperatures were generally at least 1 °C lower. Vertical mixing estimated in homogeneous water masses averaged the distribution of algal biomass. Species diversity and biomass by chlorophyll a concentration observed in the homogeneous water mass were significantly lower than in 2019 and 2021. Algal biomass accumulated near the seafloor at about 1000 m offshore.

Keywords: biomass, Sagami River estuary, species diversity, vertical mixing

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、太平洋に向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⁾。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する平塚市周辺の海域は、中でも、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、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様々な生物が生息していることに変わりはない。この海域で植物プランクトンを解析し、生息環境と対応づ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、2023年1月に植物プランクトン現存量とその種組成について調査を実施し、この海域の非生物的環境（海況）と対応づけて検討した。

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2023年1月13日に行った。相模川河口から南に向かって沖合に0～5000 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した。決定した位置からの移動を小さくするため、位置決定後、できる限り速やかに測定を実施した。水深50

m 以浅の観測点では、着底した観測器の示す水深から、水深 50 m 以深の観測点では、音響測定器の示す水深から測定点の水深を求めた。各観測点では、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、クロロフィル蛍光強度を測定した。電気伝導度と圧力から、測定器付属のソフトウェアにより塩分濃度 (%) と水深 (m) を求めた。海水の密度指標 (σ) は、塩分濃度と温度、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。観測と同時に採水した海水試料をガラス濾紙 (GF/F, ワットマン) 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 (富士フィルム和光純薬株式会社) でクロロフィル a (Chla) を抽出した。溶液中の Chla 濃度は蛍光分光器 (TD-700, Turner Designs) を用いて蛍光法で求めた⁵⁾。この Chla 濃度で校正して直読式総合水質計で測定したクロロフィル蛍光強度を Chla 濃度 ($\mu\text{g l}^{-1}$) に換算した。各測点で直読式総合水質計により求められた温度、塩分濃度、海水密度指数、Chla 濃度は、同時に求められた水深および各観測点の河口からの距離と対応づけ、海中の空間的分布を推定した。測定点の海底水深を境界条件として設定した上で、温度、塩分濃度、海水密度指数、Chla 濃度の分布を示すコンターマップを作成した (G-sharp, 日本電子株式会社)。

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

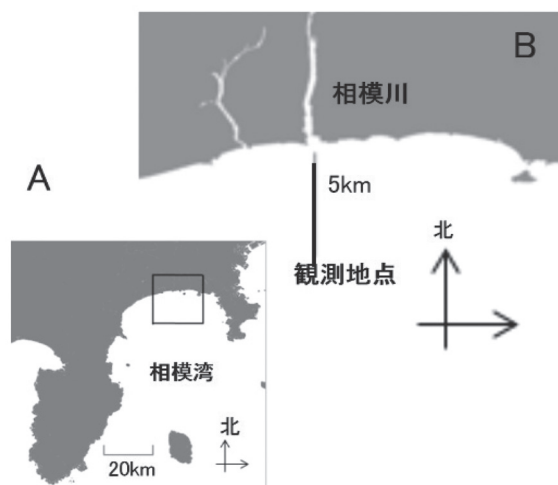


図 1. 観測海域。相模川河口から南方沖合 5000 m の線上に測点を設けた。A. 相模湾全景 図中の四角形は図 B の位置を示す。B. 観測海域。図中直線は調査した観測点を設けた南北の線を示す。

色ポリびんに入れ、速やかに 0.1% 中性パラホルムアルデヒド - 0.025% グルタルアルデヒド固定液 (最終濃度) を添加した⁶⁾。静かに攪拌して固定した試料は、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 °C、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 (Eder and Elbrächter 2010)⁷⁾に従い高倍率の対物レンズで細胞を観察し、低倍率の対物レンズで全視野面積を確認する方法で各種の密度を求めた。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

海水の温度は水深 2 m 以浅の表層とそれ以深の層で異なっていた。表層の温度は河口付近で 16.0 °C で、沖合に向かって上昇し、沖合 1000 ~ 2000 m で 16.6~16.8 °C となった。さらに沖合に向かうと表層の水温は徐々に低下し、沖合 3000 m で 16.5 °C、4000 m で 16.3 °C、5000 m で 16.0 °C となった (図 2A)。水深 5 m 以深の温度は表層より高かった。このため、河口付近では表層の水温が最も低く、水深とともにわずかに上昇し、海底付近で 16.5 °C となった。沖合 1000 m 以遠では、水深 5 m 以深の層で温度の変化は小さかった。水深 5 m では、沖合 1000 ~ 2500 m で 16.9 °C に上昇した後に低下し、3000 m で 16.6 °C となった。水深 20 m 以深では、温度の変化はわずかで 16.5 ~ 16.7 °C の範囲にあった。各観測点の鉛直方向の変化を見ると沖合 2000 m では、表層で 16.7 °C であった水温は 5 ~ 10 m で 16.9 °C となり、それ以深で低下し、水深 45 m の温度は 16.7 °C となった。沖合 3000 m では表層で 16.5 °C であった温度が、水深 5 ~ 20 m で 16.7 °C となり、それ以深で再び 16.5 °C となった。5000 m では表層で 16.1 °C であった温度が、水深 5 ~ 20 m で 16.7 °C となり、それ以深で再び低下し 16.5 °C となった (図 2A)。沖合 2000 m 以遠の水深 50 m 以深の水温も考慮すると (データ未掲載)、沖合 3000 m 以遠の 16.5 °C の均一な水温の水塊に対し、沖合 0 ~ 1000 m と 4000 ~ 5000 m の表層に低温の水塊、沖合 1000 ~ 3000 m の水深 50 m 以浅に比較的暖かい水塊が存在した。塩分濃度は、水深 1 ~ 2 m の表層では沖合 5000 m までの全ての測定点で 32.0 ~ 34.0‰ となり、2 m 以深に比べて低い値を示した。特に河口と 5000 m 地点では 32.0‰ 以下の低い値が認められた。水深

2 m 以深では 34.0 ~ 34.5‰ でほぼ一定であった (図 2B)。密度の指標 σ は、表層で 25.0 未満の低い値となり、特に、河口付近、沖合 3000 m の前後、沖合 4000 ~ 5000 m では 23.0 ~ 24.0 となった。塩分濃度同様に 2 m 以浅の表層とそれ以深で σ は異なった。2 m 以深の層では、 σ は 25.0 ~ 26.0 と比較的高い値であったが、それ以深では水深にともなわずかな上昇を除くと、ほぼ一定であった (図 2C)。Chla 濃度は海域の多くの部分で $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ 以下であったが、河口から沖合 1500 m までの範囲では $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ 以上の比較的高い値を示した。この比較的高い値を示す範囲は水深 30 m 付近を中心に沖合に向かって伸長していた。さらに、河口から沖合 1000 m の範囲で水深 2 m 以浅の表層と沖合 1000 m 付近の海底で Chla 濃度は $1.5 \sim 1.7 \mu\text{g l}^{-1}$ の値を示した (図 2D)。

藻類の群集構造

相模川河口 (0 m) と沖合 1000 m と 5000 m の 3 測点で表層の海水試料を採集し、光学顕微鏡を用いて微細藻類を同定し、各種の密度から藻類群集の群集構造を求めた。微細藻類には、珪藻、クリプト藻、渦鞭毛藻、緑藻に属する藻類が認められた。クリプト藻、渦鞭毛藻、緑藻の細胞は、珪藻に比較して小型であり、細胞当たりのバイオマスが小さいことが予想された。また、これらの藻類の多くは光学顕微鏡観察による種レベルでの同定に限界があった。さらに、固定処理により細胞の変形が生じやすい種もあり、種レベルでの同定が限られていた。このため、クリプト藻、渦鞭毛藻、緑藻に属する細胞を鞭毛藻とし、比較的種同定の容易な珪藻類とは区別して扱った (表 1)。全 3 測点の海水試料中に観察された珪藻類は 32 種群で、鞭毛藻は 10 種群であった。同定が難しく上位の分類群で不明種としてまとめた種群には、採水した測点により異なる種が含まれていた可能性がある。珪藻類の細胞密度が平均 8200 細胞 l^{-1} であったのに対し、鞭毛藻類は 14000 細胞 l^{-1} であり、細胞密度で見ると珪藻類は鞭毛藻類の約 60% に過ぎなかった。珪藻類の細胞密度が $9700 \sim 7300 \text{ 細胞 l}^{-1}$ の範囲で測点による密度の違いがわずかであるのに対し、鞭毛藻類の密度は $8900 \sim 22000 \text{ 細胞 l}^{-1}$ の広い範囲にあり、沖合 1000 m の海水試料中の密度は沖合 5000 m 試料中の 2.4 倍に達した (表 1)。珪藻類 32 種のうち 1/4 にあたる 8 種が暖海性かその傾向を示す種であった。そのうち 5 種は沖合でのみ認められたが、3 種は河口でも認められた。全細胞数に占める暖海性珪藻の細胞数は 3.0% に過ぎなかったが、調査海域に広く分布していることが示された。

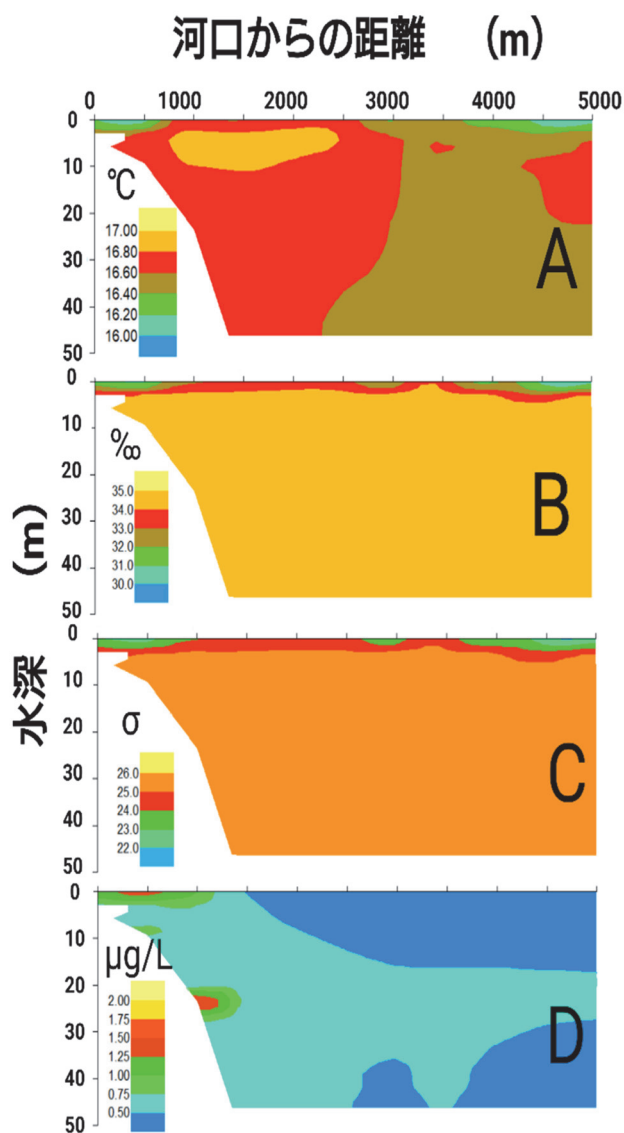


図 2. 測点海域の海況と植物プランクトン現存量 (Chla 濃度) の分布。相模湾河口より南方沖合 5000 m の線上に設けた 13 測点の測定結果より算出した。A. 温度, B. 塩分濃度, C. 密度指標 σ , D. Chla 濃度をそれぞれ示す。

一方、冷海性の珪藻種は *Chaetoceros constrictus* のみであった。珪藻類の中で最大の細胞密度を示した優占種は *Skeletonema costatum* であった。同種には細胞の直径が $10 \mu\text{m}$ 以下で 2 ~ 3 細胞で構成されたものと、細胞の直径が $10 \mu\text{m}$ 以上で 20 ~ 30 細胞で構成された群体を形成するものがあり、表 1 中では、前者を Type1、後者を Type2 とした。0 m と沖合 1000 m では殆どが Type1 に属したが、沖合 5000 m では Type2 が 65% を占めていた。両タイプを合わせた *S. costatum* の細胞数は、0 m、1000 m、5000 m で珪藻類全細胞数の 64、51、78% を占めていた。優占種 *S. costatum* 以外で、河口から沖にかけて全ての測点で確認できた種は 5 種であった。一方、0 m、1000 m、5000 m でのみ確認された種が 3、9、

表 1. 相模湾河口域表層の植物プランクトン群集の種組成. 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)			Species	表層 (0m)		
	0m	1000m	5000m		0m	1000m	5000m
Diatoms				Flagellates			
<i>Skeletonema costatum</i> type 1	6013	3865	2004	Cryptophyceae	573	1575	573
<i>Skeletonema costatum</i> type 2	197		3722	Dinophyceae			
<i>Thalassiosira anguste-lineata</i> type			36	<i>Prorocentrum micans</i> i	18		
<i>Thalassiosira</i> spp.	859	1002	429	Gymnodiniaceae	36	716	286
<i>Corethron pelagicum</i> wo			4	<i>Ceratium</i> spp.		4	4
<i>Pseudoguinaridia recta</i> w			143	Peridinales		143	143
<i>Asteromphalus</i> sp.	36		72	Haptophyceae			
<i>Rhizosolenia decipiens</i> w		18	36	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	9019	15604	6872
<i>Rhizosolenia pungens</i> i			18	Dictyochophyceae			
<i>Dactyliosolen fragilissimus</i>		429		<i>Dictyocha fibla</i> o		36	
<i>Bacteriastrum elongatum</i> <w	286		143	<i>Dictyocha speculum</i>	72	72	107
<i>Bacteriastrum furcatum</i>		56		Chlorophyta			
<i>Chaetoceros atlanticus</i>		179		Euglenophyceae S type	143		
<i>Chaetoceros danicus</i>	14	143	286	Euglenophyceae L type	358		
<i>Chaetoceros affinis</i>			4	<i>Pyramimonas</i> sp.	2004	3722	1002
<i>Chaetoceros constrictus</i> <c	358		54				
<i>Chaetoceros debilis</i> <w		36					
<i>Chaetoceros pseudocurvis</i> w			36				
<i>Chaetoceros</i> spp.	716	286	72				
<i>Ditylum sol</i> w	18		4	Total (cell l⁻¹)	12,222	21,871	8,987
<i>Thalassionema nitzschioides</i>		18					
<i>Thalassiothrix</i> spp.		4	4	注) w: warm water region, <w is tended to have that personality.			
<i>Navicula</i> spp.	716	36	143	c: cold water region.			
<i>Haslea</i> sp.		4		i: inshore or coastal region.			
<i>Amphypleura</i> spp.	18			o: open water region.			
<i>Pleurosigma / Gyrosigma</i> sp.		18		blank: cosmopolitan or world wide, and unknown.			
<i>Cylindrotheca closterium</i>	143	573	143				
<i>Fragilariopsis doliolus</i> w	36						
<i>Fragilariopsis</i> spp.		644					
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> complex		286					
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.			36				
<i>Nitzschia</i> spp.	286						
Total (cell l⁻¹)							
	9,695	7,597	7,387				

7種で、約半数の種が1測点で認められた。珪藻類は測点毎に異なる種が出現する傾向にあった(表1)。鞭毛藻10種群には生息環境と対応づけられる種群はわずかで、沿岸性種と外洋性種が1種ずつしか認められず、全体に占める細胞数もわずかであった(0.1%と0.2%)。鞭毛藻の中で最大の細胞密度を示した優占種は渦鞭毛藻類 *Gephyrocapsa oceanica* で、0 m、1000 m、5000 m で鞭毛藻全細胞数73、71、76%を占めていた。これに次いで緑藻の *Pyramimonas* sp. が16、17、11%を占めており、全ての測点で2種群が90%近い細胞数を占めていた。3測点すべて

で確認できた種は全種群の半数5種で、0 m地点でのみ観測されたのは3種、1000 m地点のみ観測されたのは1種、5000 m地点でのみ観測された種はいなかった。優占する2種群を中心に多くの種群が測点に依らず普遍的に分布していた(表1)。

**考察
海況**

2023年1月13日に測定された塩分濃度と密度指標σは、海面から水深2m以浅に塩分濃度が低く、低密度の水塊が存在することを示していた(図2B, C)。

河口から続くこの水塊は相模川から流入した淡水により形成されたものであると推察される。この海域の最近の測定^{10, 11)}でも、冬季に河口周辺 1000 m までの範囲で、低い塩分濃度 (34.0‰以上)、低密度 (24.0 以上) の水塊が認められた。しかし、冬季の河川水の流入はわずか¹¹⁾で、明瞭な塩分成層が沖合 5000 m 以遠まで維持される本研究のような海況はこれまで認められなかった。観測前の長期間、穏やかな気象条件が続き、成層が攪乱されなかったことを示唆していた。この水塊の下には、海底まで続く塩分濃度が 34‰で、密度指標 σ が 25.0 の均質な水塊が認められた。この時期には大気により冷却された表層水の沈降にとまなう鉛直混合が生じる。本研究の測定で認められた均質な塩分濃度や密度の水塊は鉛直混合が 50 m 以深まで及ぶことを示していた。水温の分布を詳しくみると、塩分濃度や密度で均質に見える鉛直混合層内で、沖合 1000 ~ 2500 m の範囲に、周辺より水温の高い水塊が区別される (図 2A)。相模川河口周辺海域には、淡水の流入により形成される河口付近の低い塩分濃度の水塊と、沿岸域の水塊、外洋からの高温・高塩分濃度の水塊の異なる 3 つの水塊が区別されることが多い^{3, 4, 10, 11)}。本研究で認められた周辺より水温の高い水塊は、沿岸域の水塊が認められる位置にあった。一方、3000 m 以遠の沖合には、明瞭な特徴を示す水塊は認められず、本研究では外洋からの水塊を確認できなかった。これと対応して、測定された時期の水温が、2019、2021 年に測定された同じ時期の水温より 1 °C 以上低下していた^{10, 11)}。これらの結果は、2023 年 1 月の海況が例年の海況とは大きく異なっており、1. 表層に数 m の厚さの塩分成層、2. 水深 50 m に及ぶ鉛直混合、3. 弱い外洋水塊の影響、によって特徴づけられていることを示していた。

藻類のバイオマス

河川水の流入により栄養塩が供給されたと考えられる河口 1000 m 以内の限られた範囲の表層では周辺に比べて高い Chla 濃度が確認できた (図 2A)。しかし、測定された藻類バイオマスは海域全体で低かった。温度分布で確認できた沿岸水塊に対応する部分を中心にわずかに高い Chla 濃度 ($0.5 \sim 0.75 \mu\text{g l}^{-1}$) が観測されたが、多くの部分で $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ 以下であった (図 2A,D)。2021 年 1 月に観測された藻類生物量が 2019 年 12 月に観測された生物量に比較して大きく低下していることが報告されている¹¹⁾。本研究の結果は、この海域の生物量は 2021 年 1 月に観測された藻類生物量から、さらに低下していることを示していた。海域全体の Chla の分布とは別に、河口

から 1000 m 付近の海底にも高い Chla 濃度が確認できた。この付近の海底には高い Chla 濃度の分布がしばしば認められる^{10, 11)}。この現象の究明は今後の課題である。海況の変化は、生物量の違いのみならず、植物プランクトン群集の群集構造にも大きな違いを生じさせた。優占種である *S. costatum* の表層海水試料中の細胞密度は 2019 年 12 月と 2021 年 1 月にも測定されている^{10, 11)}。光学顕微鏡の観察から *S. costatum* として判別される種は、ゲノム解析によって多様な種から構成されていることが知られている¹²⁾。相模川河口域では分類指標に違いはないが、細胞サイズ、コロニー形状の異なる複数のタイプが認められる¹¹⁾。本研究では 2 つのタイプを合わせて扱った。近年の測定結果と本研究で 2023 年 1 月に測定された結果を比較すると、大きな違いが認められた。河口から 100、1000、5000 m 沖合で採水された海水試料中の密度は 2019 年には、それぞれ 57038、13437、12458 cells l^{-1} であった¹⁰⁾ のに対し、2021 年にはそれぞれ 2938、3590、27418 cells l^{-1} で¹¹⁾、2023 年にはそれぞれ 6013、3865、5726 cells l^{-1} であった (表 1)。2019 年の密度は河口から沖合 100 m 付近で最も高く、2021 の密度は 5000 m で高くなっていた。これに対し、2023 年にはいずれの地点でも高い細胞密度は観測されず、平均密度は 2019 年、2021 年のそれぞれ 19.1% と 46.5% であった。この結果は、今回測定された低い生物量 (Chla 濃度) とよく対応していた。一方、鞭毛藻類の優占種であるハプト藻類 *G. oceanica* も 2019 年 12 月と 2021 年 12 月に優占していた。その密度を比較すると 2019 年と 2021 年の差異はわずかであった。しかし、2019 年、2021 年の結果と 2023 年の本研究の結果を比較するとハプト藻優占種の細胞密度は 41.7% と 52.9% に大きく減少していた。これらの結果は先ず珪藻類で低下したバイオマスの減少が、さらに広く様々な藻類種に及んでいることを示唆している。藻類種への影響は優占種のみならず様々な種の出現にも影響している。2021 年の観測では、珪藻類 72 種、鞭毛藻類 23 種群が認められたが、2023 年の測定では、珪藻類 32 種、鞭毛藻類 10 種群しか認められず、種多様性の減少も確認された。冬季の継続的観測から明らかになった相模川河口域の藻類バイオマスの減少と種多様性の低下が一時的なものか、さらに進行するかについて、これらの測定結果から断言できることはない。しかし、継続的観測により実態を記載し続けることは、原因を究明する第一歩となりうる。本研究は継続的な記載の重要性を示唆していた。

結論

本研究では2023年1月、相模川河口付近の海況の測定を実施した。この海域では河川水の流入による汽水水塊と沿岸水塊と外洋水塊の3つの水塊がしばしば認められる。本研究では表層に明瞭な低塩分濃度の汽水水塊が形成されていたが、鉛直混合により表層より50 m以深の深層まで均質であった。温度のわずかな違いで沿岸水塊を捉えられたが、高温高塩分濃度の外洋水塊は捉えられなかった。これと対応してChla濃度を指標とした藻類バイオマスが明瞭に低下していた。バイオマスの低下と同時に種多様性も低下し、珪藻種と鞭毛藻類の種数が減少していた。このような長期的変化は、継続した観測によってはじめて捉えられる。本研究の結果は継続観測の重要性を示すものである。

謝辞

本研究は、2022年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成(RIIS202204)を受けて行った。

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 Measure Ments (1994UNESCO).
- 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 uter möhl 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 To mas (ed.) (1997) Identifying marie phytoplankton. Academic press. Inc., San Diego, CA.
- 9) O mura T (ed.) (2012) Marin Phyotoplanknyon 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.
- 11) 酒井駿輔, 川延京子, 金沢謙一, 西本右子, 鈴木祥弘(2021). 相模湾河口域における長期環境変動モニタリング 8 降雨量が非生物的・生物的環境へ与える影響. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **32**: 73-79.
- 12) 山田真知子(2013)珪藻 *Skeletonema* 属の最近の分類と生理生態特性(総説). 日本プランクトン学会報. **60**(1): 18-28.

■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 (11)

加部義夫^{1,2}

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdote of Discoveries (11)

Yoshio Kabe^{1,2}

¹ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-0802, 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 19 century and have been widely used to influence synthetic transformation in modern organic chemistry. It is suggested that many educational benefits could result from the use of reaction types and discoveries for undergraduates and graduate classes in organic and organometallic chemistry. Organometallic reactions are categorized into several types of metathesis reactions, 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 cycloaddition reactions and thereafter, reactions of which consist of σ - π bond metathesis, i.e., oxidative insertion of π -bond into a metallacyclopentadiene complex as an intermediate. In 1948, Ni-catalyzed cyclooligomerization of acetylene to benzene as well as cyclotetraene (COT) was first reported by Reppe of BASF. The theoretician proposed the cyclobutadiene complex to be a stable intermediate in these reactions. However subsequent studies revealed that instead of the cyclobutadiene complex, a cyclopentadiene complex is intermediate for the Reppe reaction. Cyclobutadiene and cyclopentadiene complexes will be also discussed in relation to 4 π antiaromaticity as the well as synthetic [2+2+2] cycloaddition reaction.

Keywords: Reppe reaction, cyclobutadiene complex, [2+2+2]cycloaddition, metallacyclopentadiene

はじめに

前回からは遷移金属の反応をメタセシス反応（結合組換え）反応で分類して解説してきた。今回は σ - π 結合メタセシスについて、ヒドロメタル化反応とカーボメタル化反応（図1.1), 2))はすでにたくさんの例を見てきたので、まだ取り上げていない環化付加反応（図1.3), 4))を取り上げる。環化付加反応の例としてReppe反応を取り上げ、アセチレンの金属触媒によるオリゴメリゼーション反応が、環状共役系ポリエンの化学を開き、さらにはシクロブタジエン錯体や非ベンゼン系芳香族化学につながったことを述べる。一方合成化学としては、[2+2+2]環化付加反応による縮合多環化合物の合成（図1.4）、テッターを用いた置換ベンゼン合成（図1.5）や

環化異性化反応（図1.6）にも発展したことについても言及する。

環化付加反応（Reppe 反応）

これまでメタラサイクルへのアルケン、アルキンの挿入反応として取り上げてきた反応である。カーボメタル化反応（図1.3）の1つでもあるが、環状化合物を与えることが特徴的である。そしてそれは、1948年、BASFのReppeがニッケルカルボニルホスフィン触媒を用いてアセチレンからベンゼンとビニル化合物を合成を報告したことに始まる（式1）¹⁻⁴。同じ論文でReppeは触媒をシアン化ニッケルに変えるとシクロオクタテトラエン（COT）が

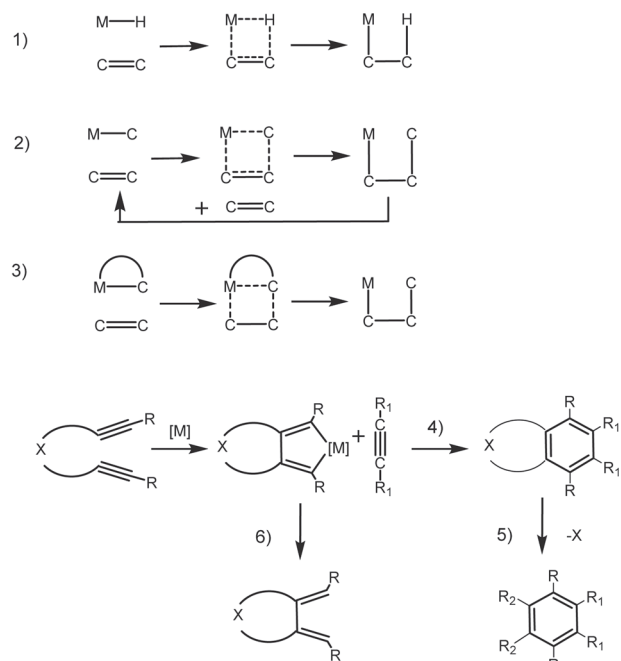
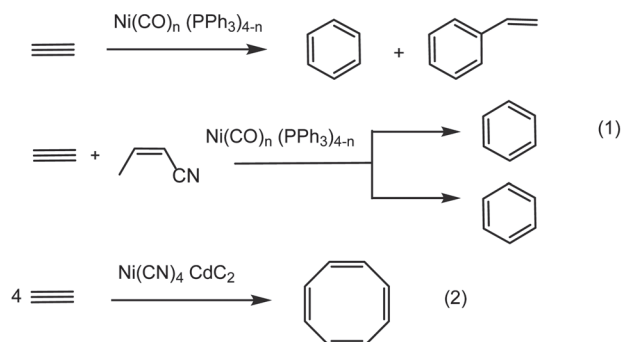
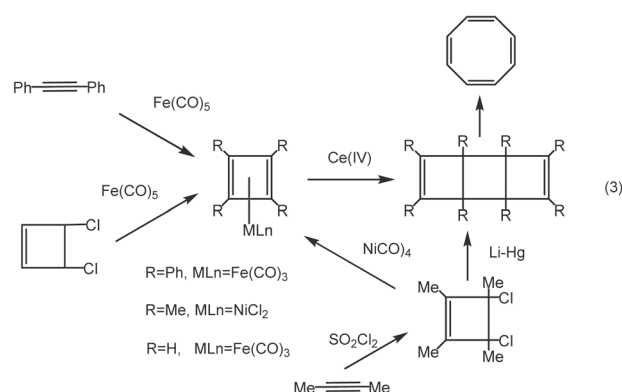


図1. 遷移金属の σ - π メタセシス(結合組換え)反応. 1) ヒドロメタリ化, 2) カーボメタリ化, 3) 環化付加反応, 4) [2+2+2]環化付加反応, 5) 置換ベンゼン合成, 6) 環化異性化反応.



生成することも報告している(式2)⁴⁾。このCOTは環状8 π 系でありReppeの先生であるWillstätterがすでに1911年に合成したことは以前に紹介した⁵⁾。COTはベンゼンと同じく2つの等価な共鳴構造を描けるにもかかわらず安定でなくポリオレフィンに近いことが明らかにされていた。環状4 π 系についてもWillstätterはじめ多くの研究者が合成を試みていたが成功していなかった。こうした中1931年にHückelが分子軌道法により $[4n+2\pi]$ 系と $[4n\pi]$ 系の性質の違いを明らかにし、1956年にはLonguet-Higginsらは4 π 系のシクロブタジエンでも遷移金属が配位すると安定になる可能性を示唆した^{6,7)}。そしてReppeの遷移金属触媒によるCOTの合成はシクロブタジエン錯体を経由していると提案した(式3, R=H)⁸⁾。その3年後2つのグループがシクロブタジエン錯体の生成を報告した。1つはヨーロッパ研究協力機構の研究者Hübelらである。彼は

München大学のHieber⁴⁾のドクターの学生であった。アセチレンなどとメタルカルボニルの反応を精力的に研究した。ユニオンカーバイド社をスポンサーにジフェニルアセチレンと $\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}$ または $\text{Fe}(\text{CO})_5$ と反応させると初めてシクロブタジエン錯体(式3, R=Ph, $\text{ML}_n=\text{Fe}(\text{CO})_3$)の合成単離に成功した。構造はニューヨーク・Union Carbide社の研究陣によりX線結晶構造解析により確認された。この辺りのところは前述のSeyferthによるOrganometallics誌のエッセイに紹介されているので一読をおすすめする⁹⁾。エッセイのサブタイトルはA case of Theory before ExperimentとありLonguet-Higginsの理論屋

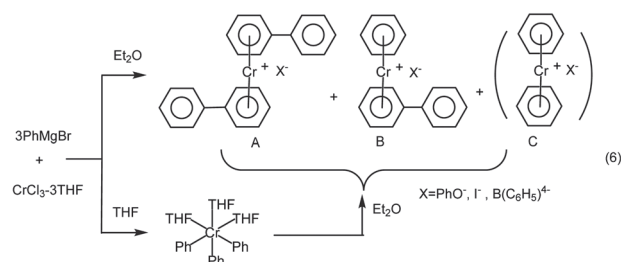
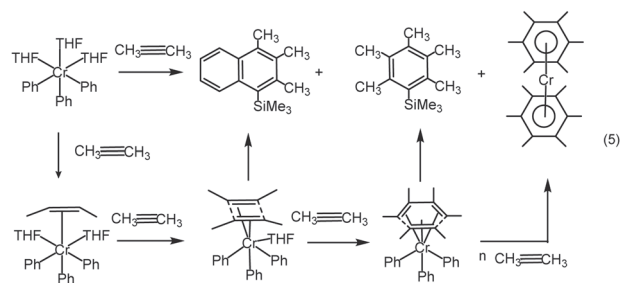
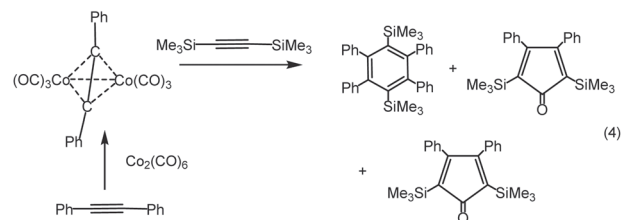


の予測が実験を誘導したことをテーマにしている。

もう一つのグループはオキソ錯体のところで紹介したオゾ酸化でよく知られているCriegeeらのグループである⁹⁾。Criegeeらはメチル置換体だとシクロブタジエンも安定だろうと考えシクロブタエンの塩化物に脱ハロゲン化剤としてLi-Hgを作用させたところシクロブタジエン二量体しか生成しなかった。次に $\text{Ni}(\text{CO})_4$ を作用させることでシクロブタジエン錯体を単離した(式3, R=Me, $\text{ML}_n=\text{NiCl}_2$)^{1,2,9)}。ところで無置換のシクロブタジエン(R=H, $\text{ML}_n=\text{Fe}(\text{CO})_3$)はどのようにして合成されたのか。Seyferthのエッセイによると米国テキサス・オースチンのPettitが実現した。彼はオーストラリア出身の秀才で英国のクイーンズカレッジの理論家Dewarのところに奨学生として留学し、2つ目の学位の口述試験の審査員が、例のLonguet-Higginsであった。おそらくLonguet-Higginsのシクロブタジエン錯体の予想がそこで議論になったことは想像に難くない。すでに1951年にフェロセンがPausonらにより初めて合成され、 π 共役系を配位子とする有機金属錯体が注目されると、同じくPausonらにより、かつて30年近く前にReihlenらにより合成されていたブタジエン鉄カルボニル錯体が平面 π 共役系配位子であることが再発見された。Pettitも渡米し独立すると π -アリル、 π -ペンタジエニル、 π -ヘキサジエニ

ル鉄カルボニルカチオン錯体の研究に着手した。そうした中同僚が Crigee らの脱ハロゲン化法によりベンゾシクロブテン二臭化物と $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ からベンゾシクロブタジエン錯体を試みたが失敗した。そこで Pettit の学生にやってみようといふことがうまくいった。そのついでに Pettit の学生はシス-3, 4-ジシクロブテンと $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$ の反応を試みることで無置換のシクロブタジエン鉄カルボニルが初めて合成できたというわけである。シクロブタジエン錯体は安定な MO を形成しフェロセンと同様に Friedel-Craft アシル化反応などの求電子置換が起きる一方、適当な酸化剤で酸化するとシクロブタジエンが遊離することからシクロブタジエンの発生剤として芳香族性とその付加反応の研究が大きく発展した。

それでは Longuet-Higgins らによる提案による Reppe 反応の中間体としてシクロブタジエン錯体が関与しているのだろうか。Hübel らはトランとジコバルトオクタカルボニルと反応してトランのコバルトヘキサカルボニル錯体を単離し、その錯体をさらにビストリメチルアセチレンと反応させると置換ベンゼンとシクロペンタジエノンを得ている (式 4)。生物の置換様式を見ると少なくともシクロブタジエンの対称性を有する中間体が含まれることを示唆している³⁾。一方 Crigee からも先に得たシクロブタジエン Ni 錯体を 250°C で熱分解するとシクロブタジエンの二量体になるが $188^\circ\text{C}/0.001\text{mmHg}$ で分解する

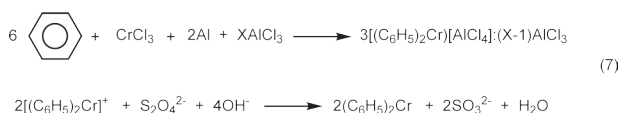


とその生成物の中に COT が得られた。シクロブタジエンの二量化で COT が生成することは確かに言えるが、上記の例はいずれもアセチレンそのものと金属錯体触媒の直接反応ではないため、その後反応を明らかにするためには、さらなる研究が続いた^{10, 11)}。その中でも Heint と Zeiss らによる $\text{Ph}_3\text{Cr}(\text{THF})_3$ 錯体とアセチレンの反応は注目された (式 5)。この反応についても以前簡単に紹介したが Seyferth らが *Organometallics* 誌のエッセイで紹介しているので内容を詳しく紹介する^{12, 13)}。

1918 年ドイツ・Leipzig 大学の Hein により PhMgBr と CrCl_3 からアリル遷移金属化合物の合成が試みられペンタフェニルクロム $(\text{C}_6\text{H}_5)_5\text{Cr}^+$ (式 6, $\text{A X} = \text{PhO}^-$)、テトラフェニルクロム $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{Cr}^+$ (式 6, $\text{A X} = \text{I}^-$) とトリフェニルクロム化合物 (式 6, $\text{B X} = \text{I}^-$) の合成が報告された。いずれも水に溶解する塩として単離された。その後しばらくして Yale 大の Zeiss と日本人学生の筒井は Hein の実験を追試した。以前に紹介したように同僚の Onsager (1968 年不可逆過程の熱力学でノーベル賞受賞) のアドバイスをもとにフェロセンと同じサンドイッチ化合物の構造を提唱して論文に投稿した。しかし論文の脚注によると、この研究は 1954 年アメリカ化学会で発表、1954 年 (フェロセンの発見 2 年後) に速報として論文に投稿したが、サンドイッチ構造の証拠不十分で却下された。この間 1955 年に後述する Fischer らのビスベンゼンクロムの論文が発表されると 1957 年に受理されたとのことである。1 回目の投稿で掲載されれば Zeiss と筒井がビスベンゼンクロムカチオン錯体の最初の報告者であったことになる。Zeiss は Doering のコロロンビア大 (後に Haverd 大、著名な有機化学者 Woodward は彼の学生) の時のドクターの学生で Yale 大学で助手を務めた後 Monsanto 社ダイトンオハイオ州に入社した。1961 年には Monsanto 社・チューリッヒのスイスで研究所長に栄転する。1957 年 Zeiss は Monsanto 社に移り、Hein の研究ではビスベンゼンクロム塩がまだ研究されていないことに気がつき水溶性の塩を沈殿させるために反応液を NaBPh_4 で処理するとビスベンゼンクロム塩 $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{Cr}^+$ を単離することに成功した (式 6, $\text{C X} = \text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4^-$)。同時に THF 溶液中で $\text{CrCl}_3 \cdot 3\text{THF}$ と PhMgBr を反応させると σ 結合を持つトリフェニル Cr の THF 錯体 $\text{Ph}_3\text{Cr}(\text{THF})_3$ を安定に単離することを見出している (式 6)。磁気モーメント $3.89 \mu_B$ で 3 つの対電子の存在が示唆され Cr(III) であり、そしてその構造は 26 年後に X 線結晶構造解析で確かめられた

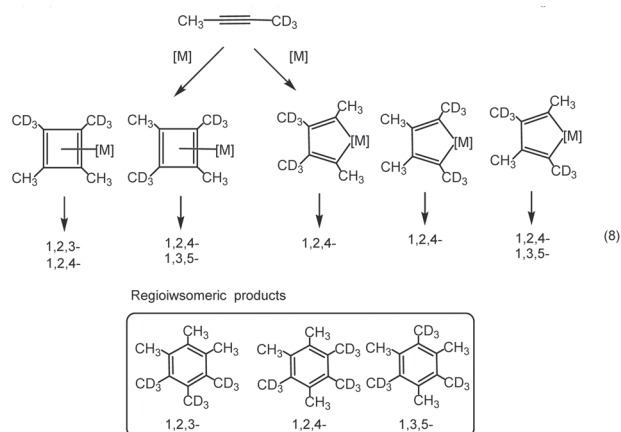
この $\text{Ph}_3\text{Cr}(\text{THF})_3$ と 2-ブチンとの反応が検討さ

れ加水分解すると 1,2,3,4-テトラメチルナフタリンとヘキサメチルベンゼン中間体のビスヘキサメチルベンゼンクロムが得られた。この生成機構としてはクロムに配位している THF が順次 2-ブチンと置換し、3 分子置換したものはベンゼン環になりやすい構造になっていて、加水分解するとヘキサメチルベンゼンを生成するものと考えられる。興味あるのはテトラメチルナフタリンの生成であって、これは THF と置換した 2 分子の 2-ブチンがクロムに σ 結合しているフェニル基と反応して生成したと考えなければならない。また 2 分子の 2-ブチンはシクロブタジエン環を形成して Cr に配位していると Zeiss らは推論している。この考えに従えば Cr 上でシクロブタジエンとフェニル基からナフタリン環が生成するというのである。Seyferth の Organometallics のエッセイではその後 Fischer と Hafner によりビスベンゼンクロムが合成される経緯が紹介されている。1955 年に Zeiss が Fischer の München 大学を訪れた時、筒井の研究が紹介され Hein の Grignard 法ではビスベンゼンクロム化合物の合成は難しく、新たな還元剤 Friedel-Craft 反応と呼ぶ反応を開発したことが紹介されている。得られたカチオン塩をチオ硫酸で還元すると初めて中性のビスベンゼンクロムを合成できた (式 7)。

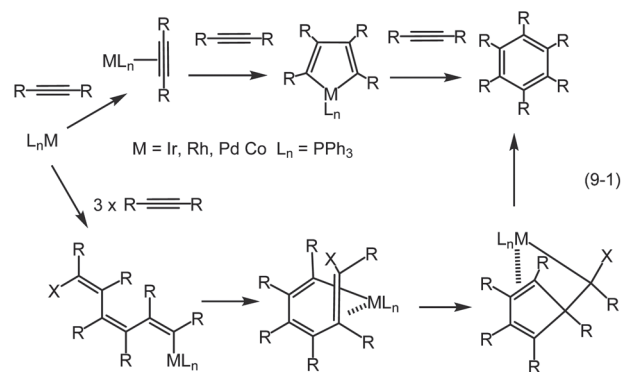


これはヨウ素 (式 6、C、X = I) に戻すと Hein から送られた化合物と全てのデータが一致し同一化合物であることが確かめられた。このように 1950 年代の Zeiss の研究でもアセチレンの三量化は反応によるベンゼンの生成はシクロブタジエン中間体が考えられている。

1969 年に Whitesides らはアセチレン三量化反応の同位体 (重水素) 標識実験を行い、この反応にシクロブタジエン錯体中間体が関与しているかどうかについて明らかにしている。すなわちに 1-ブチン-1,1,1-d₃ を Ph₃P Cr₃(II)(THF)₃, Mes₂Co(II), Co₂(CO)₈, (CH₂=CHCN)₂ Ni(0), TiCl₄-iBu₃Al, (PhCN)₂Pd(II)Cl₂, AlCl₃ などの各種触媒で三量化し生成物の置換異性体を分析した。その結果遷移金属ブタジエン錯体中間体からしか生成しない 1,2,3-トリメチル-4,5,6-トリス (メチル-d₃) ベンゼン (式 8、1,2,3 異性体) がクロム、コバルト、ニッケル、チタン (Ziegler-Natta) 触媒で確認されないことからシクロブタジエン錯体中間体の存在が否定され



た¹⁴⁾。対照的に AlCl₃ 触媒では異性体の生成比はシクロブタジエン錯体中間体を考えたものと一致した。一方 (PhCN)₂ Pd(II)Cl₂ 触媒の生成比はいずれのモデルにも一致しなかった。Maitlis はアセチレンジカルボン酸エステルと Pd(II)Cl₂ の反応ではシクロペンタジエニルメチル Pd 錯体を経由する機構を提唱している (式 9-1)¹⁵⁾。その後、アセチレンと遷移金属のメタラシクロペンタジエン錯体がいくつか合成されアセチレンと反応してベンゼンが生成することから、シクロブタジエン錯体説に反論する報告が発表され



るようになった。1968 年 Collmann はシクロペンタジエン Ir と Rh 錯体 (式 9-1、ML_n=IrCl(PPh₃)₂, RhCl(AsPh₃)₃)^{16, 17)} がさらにもう一分子のアセチレンと反応して置換ベンゼン誘導体を与えることからアセチレン三量化の反応中間体としてメタラシクロペンタジエン中間体の存在を提案した (式 9-1)。荻原と山崎は CpCo(PPh₃)₂ と iPrMgBr の反応系あるいは CpCo(PPh₃)₂ にアセチレンを加えるとアセチレン錯体が生成し、さらにアセチレンを反応させるとメタラシクロペンタジエン錯体を生成することを見出した (式 9-1)¹⁸⁻²¹⁾。

一方 Bergmann らもコバルトシクロペンタジエントリフェニルホスフィン錯体とジメチルアセチレンの反応によるベンゼンの生成の反応速度を研究し、トリフェニルホスフィンの解離とアセチレンの配位が

反応の律速段階であることを明らかにした (式 9-1)²²⁾。このような研究から現在受け入れられているメタラシクロペンタジエン錯体 (A) を中間体としたアセチレン三量化の反応機構の全体が確立された (図 2)。コバルトシクロペンタジエンアセチレン錯体 (B) がもう 1 分子のアセチレンと Diels-Alder 付加反応して生成するビスシクロメタラシクロペンタジエン中間体 (C) とアセチレンコバルト-炭素結合に挿入して生成するメタラシクロヘプタトリエン中間体 (D) の生成が考えられるが区別はつけられていない。

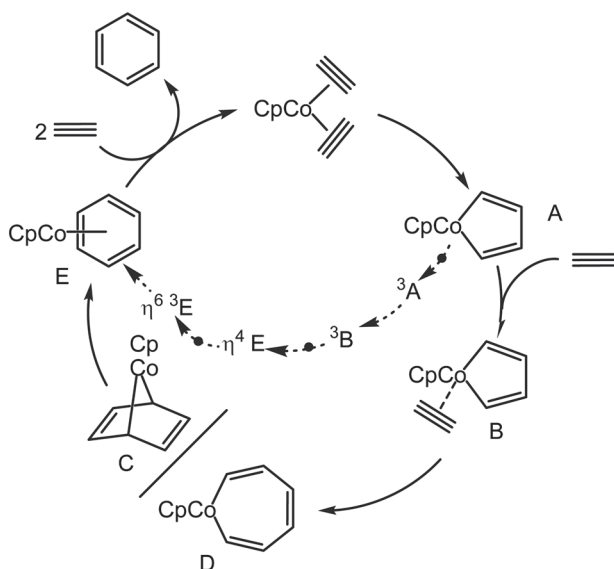
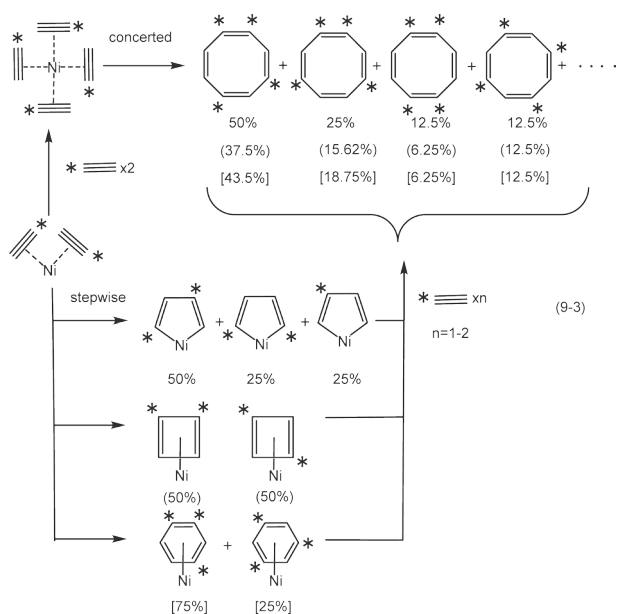
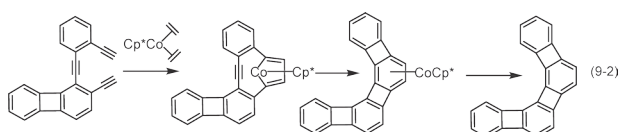


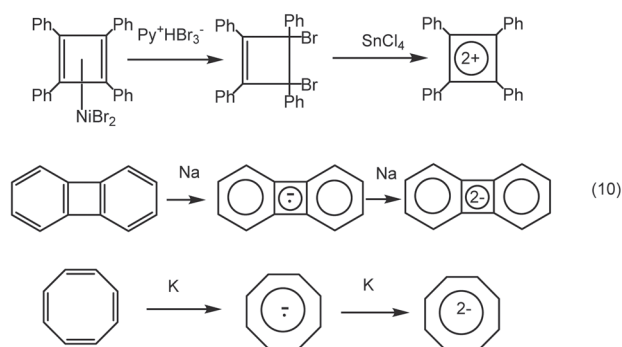
図 2. CpCo 触媒 [2+2+2] 環化付加反応。

しかし Diels-Alder 付加反応が不可能なコバルトシクロペンタジエン錯体もアセチレンやオレフィンと容易に反応することから環拡大した中間体 (D) を経由する可能性が高い (図 2. B, C, D)。コバルトシクロペンタジエンアセチレン中間体 (B) については後年 Vollhardt らがアンギュラーフェニレンの合成途中に単離に成功している (式 9-2)^{23, 24)}。さらに Vollhardt らと古賀らは独立に DFT 計算によりコバルトシクロペンタジエン (A) の 16e 配位不飽和錯体では一重項より三重項が安定であることから、反応が $^1A \rightarrow ^3A \rightarrow ^3B \rightarrow \eta^4-^1E \rightarrow \eta^{6,3}E$ と 2 つのスピ状態を交差して進行することを明らかにしている^{25, 26)}。

一方 Reppe が見出した COT の合成の反応機構はどうだろうか。アセチレンの三量体によるベンゼンの生成と同様に対称のシクロブタジエン錯体やベンゼン錯体を中間体として経由してしていないことが同じく Vollhardt らにより ^{13}C 同位体標識したアセチレン (エチン- $1-^{13}C$) を Ni 触媒で環化三量化で生成した COT の同位体標識を分析することから明らかにされている (式 9-3)^{27, 28)}。すなわちシクロブタジエンやベンゼン錯体のような対称な π 錯体が介在すると出現頻度の高い同位体標識化合物の生成割合が徐々に減少する (式 9-3, stepwise)。実験的に求められた同位体の相対比は協奏的または段階的な経路の理論的割合 (式 9-3, concerted) から計算された相対比と一致した。最近では理論計算からも支持されている²⁹⁾。

Reppe 反応のその後の展開

Reppe 反応で生成するシクロテトラエン COT は Willstätter の全合成でもわずかしか得られず物性値が合わせられず Cope はわざわざ再合成をしなければならなかった⁶⁾。戦時中はドイツ BASF 社の Reppe のもとでのみ研究が可能な化合物で戦後アメリカを始めとする連合軍により PB レポートとして世界中にその全容が明らかにされた。その後の展開としては 1 つは種々の非ベンゼン系芳香族化合物 (図



3)³⁰⁾の合成とその研究に大きく貢献し、2つは置換ベンゼン誘導体の合成化学を大いに発展させたことである。まずシクロブタジエンのジカチオンとジアニオン誘導体³¹⁾(Freedman 1962年、Bauld 1965年)とCOTのジアニオン^{6,32)}(Katz 1960年)が合成され、芳香族安定性を有する化合物であることが示された(式10)。すでに五員環の6 π 系シクロペンタジニルアニオンはシクロペンタジエンとGrignard試薬によるプロトン引き抜きで生成することが古くから知られていた。三員環2 π 系シクロプロペニルカチオン及び七員環6 π 系トロピニウムカチオンについては各々BreslowやDoeringの研究から前駆体のニトリル化合物や臭化物からCN⁻やBr⁻の脱離反応から生成することも知られており、後者の七員環については中性のヒノキチオールに関する野副の研究がその発端であることはよく知られていた(図3)³³⁾。その間、前述の四員環2 π 系ジカチオン、6 π 系ジアニオンと8員環6 π 系ジアニオンは一連の非ベンゼン系芳香族化合物を補完する研究となっている(式10)。

一方中性の芳香族化合物として、当初Reppé反応で副生する炭化水素でC₁₀H₁₀が10員環で10 π 系芳香族化合物シクロデカペンタエンに帰属され、同じく副生するナフタレンやアズレの前駆体と考えられた。しかし誤って同定され間もなくビニルオクタテトラエンと訂正された(式11)^{34,35)}。しかしこれをきっかけにTammlenらは十員環中性10 π 系シクロデカペンタエンの合成を検討した。trans-9,10-ジヒドロ

ナフタレン(A)の光反応(逆旋的開環反応)で多くの生物とともにcis-9,10-ジヒドロナフタレン(B)が生ずることを見出した。低温(-190°C)照射ではBは生成せずジイミンで還元するとシクロデカC₁₀H₁₀が40%で得られ、光反応物を室温まで加温すると再びBが生成することからAの光反応ではdi-transとall-cisシクロペンタエン(CまたはD)が生成し、Cの熱反応(同旋的閉環反応)でBに変換すると考えた(式12)。一方、正宗らはビシクロ[6,2,0]デカ-2,4,6,9-テトラエン(E)が熱的に異性化でAを生成することから中間にmono-transシクロデカペン(F)の存在を推定した。そしてTammlenらの結果が再現できないが、Bを-60°Cで照射し-80°Cの低温クロマトグラフィーで分離・生成し³⁶⁾2種のシクロデカペンタンFとDを結晶として単離した。FとDは各々熱的にAとBに異性化し、還元してC₁₀H₂₀を与えNMRなどからmono-trans体とall-cis体と帰属した。とくにその¹H-NMRはオレフィン領域に5.67ppmと5.86ppmに平均して1本観測され反磁性環電流がほとんどないことを示している(式13)。さらに比較としてSondheimerらにより合成された[18]アニユレンは環ひずみがなく完全に平面な化合物で環外オレフィン水素9.28ppm(12H)、環内オレフィン水素-2.99ppm(6H)の芳香環による反磁性環電流シフトが観測される(図3)。これに対してVögelが合成したメタノ[10]アニユレンは

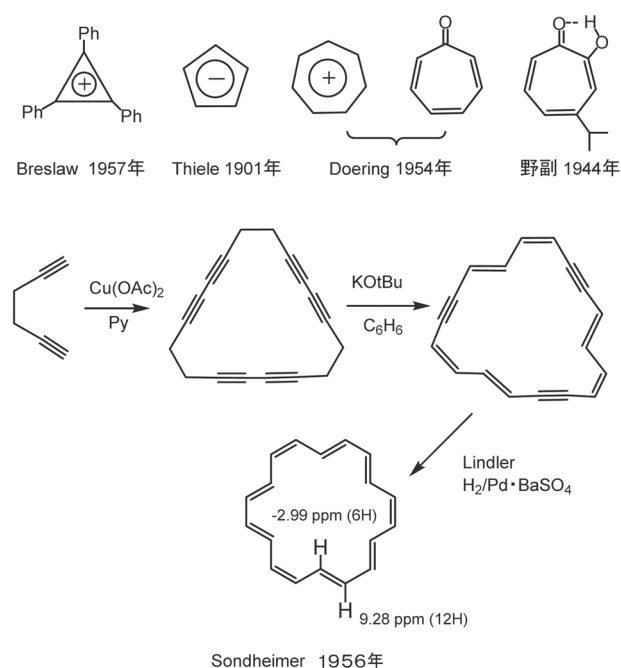
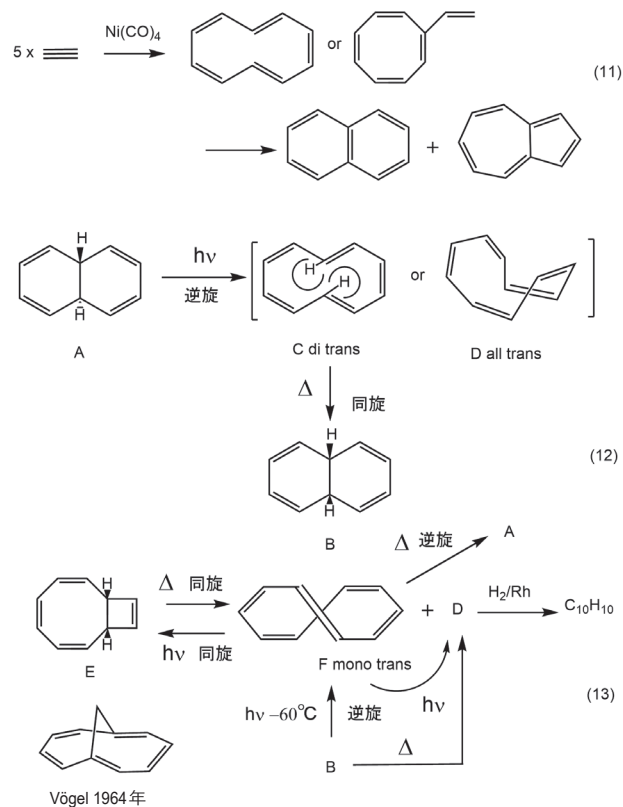
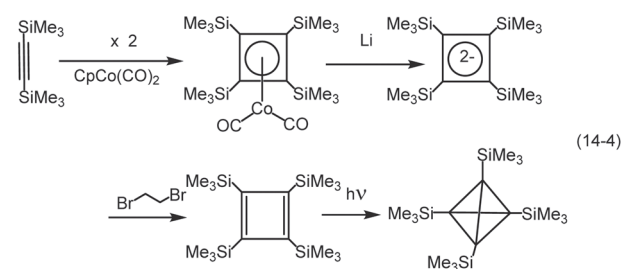
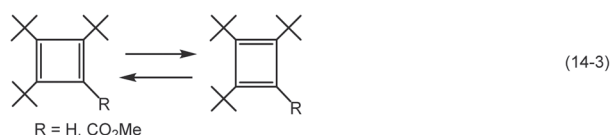
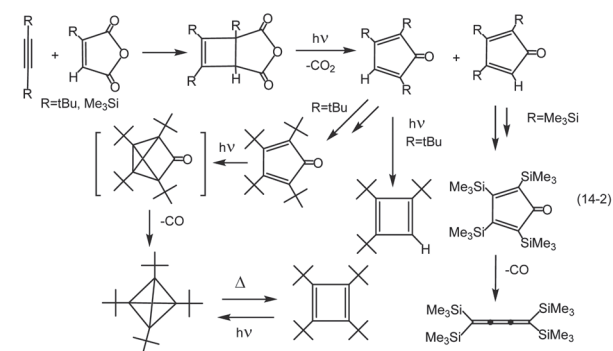
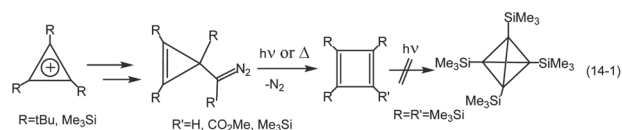


図3. 非ベンゼン系芳香族化合物。



極めて安定な化合物で、正宗らが「[10] アニュレンではなくナフタレンだ」と主張したのも橋頭位間のホモ共役を考慮すると誠に理にかなっていると考えられる (式 13)。シクロブタジエン錯体は反芳香族四員環 4π 系シクロブタジエンの前駆体として利用されたことはすでにいくつか例を示した (式 3)。遊離のシクロブタジエンを合成単離しようという試みが正宗と Maier らによりほぼ同時に 2 つのルートから検討された。

正宗らは嵩高い 3 つの *tert*-ブチルが置換したシクロプロペニウムイオンにジアゾ基を導入しその分解と環拡大によるシクロブタジエンを合成した (式 14-1、 $R=tBu$, $R'=H$)^{7, 37-40}。一方 Maier らはシクロペンタジエノンの光脱 CO 反応により同じシクロブタジエンを合成した (式 14-2、 $R=tBu$)。双方の生成物は ¹H-NMR でオレフィン領域に環 5.38 ppm に環内水素が確認され、正宗らのエステル誘導体 (式 14-1、 $R=tBu$, $R'=CO_2Me$) は X 線結晶構造解析に成功し、その構造はいわゆるヤーン・テラー効果により変形した長方形 (1.52 Å x 1.394 Å) であることが明らかになった。すなわちシクロブタジエンは 2 つの二重結合は共役せずに結合交替した反応性

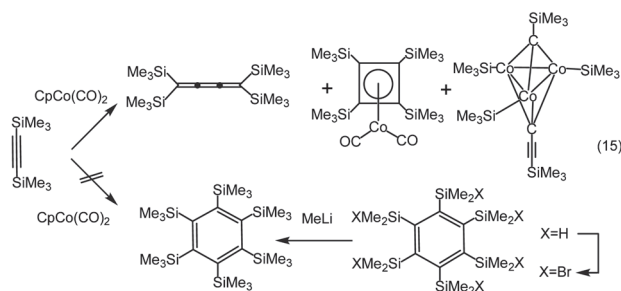


の高い環状ジエン構造をとっていることがわかる (式 14-3)³⁷。さらに Maier らはシクロペンタジエノンを経由する合成ルートに 4 つ目の *tert*-ブチル基の導入を試みたところ、驚くべきことにテトラ (*tert*-ブチルテトラヘドラン) が取れてきた (式 14-2)⁴¹。この異性化で生成するシクロブタジエンは同じ 4 つの *tert*-ブチル基が置換されているにもかかわらずその X 線結晶構造解析から長方形 (1.52 Å x 1.44 Å) であることが再び確認された⁴²。

次に Maier らはシクロペンタジエノンを経由するルートで *tert*-ブチル基に変えてトリメチルシリル基置換のテトラヘドランの合成を検討したが、トリエンの生成に終わった (式 14-2)⁴³。そのため正宗らのシクロプロペニルジアゾ化合物を経由するルートで合成を試みたが、低収率で複雑な副生成物と分離できず、混合物の光照射でテトラヘドランの生成を NMR で確認したにとどまっている (式 14-1)⁴⁴。

一方トリメチルシリル基コバルトシクロブタジエンの生成は古く櫻井らにより報告され⁴⁵、関口らはそのリチウム還元でトリメチルシリル基置換シクロブタジエンジアニオンの合成・単離に成功している⁴⁶。それを臭化エチレンにより温和に酸化することでトリメチルシリルシクロブタジエンの高い収率の合成を実現した。そして Maier らと共同でテトラキストリメチルシリルテトラヘドランの合成にも成功した (式 14-4)^{46, 47}。Maier がトリメチルシリル基置換体の合成に挑戦したのはプロト脱シリル化でいわゆる嵩高い置換基によるコルセット効果のない母体のテトラヘドランを合成することであった。関口らによると 1 つのシリル基を水素に置き換えたテトラヘドロンまでは安定に合成されている⁴⁸。

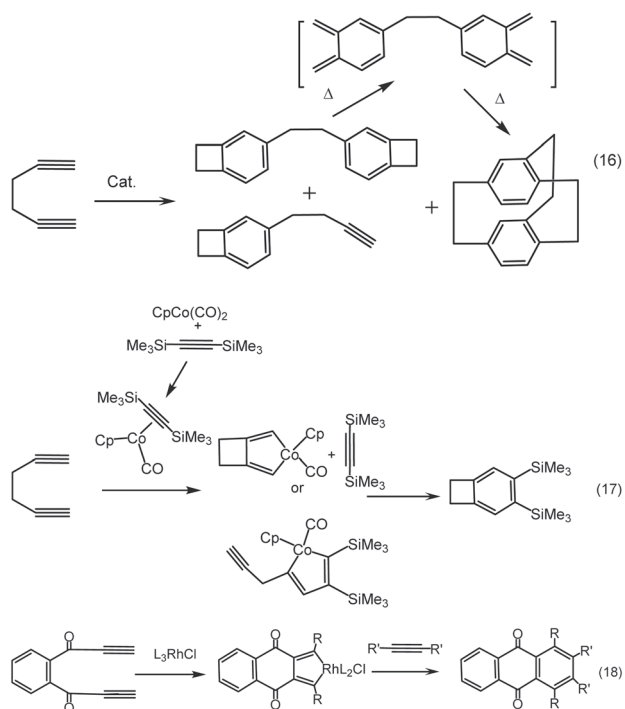
嵩高いトリメチルシリル基を有するビストリメチルシリルアセチレンは金属触媒で低収率でしかシクロブタジエン錯体を生成できない。まして三量化したヘキサトリメチルシリルベンゼンは全く Reppe 反応では合成できない。反応ではテトラキストリメチルシリルシクロブタジエン錯体以外にはトリインやジイン由来のシクロブタジエンやビスカルバインコバルト三核錯体が確認されている (式 15)⁴⁹。後年、櫻井らは嵩高いヘキサキストリメチルシリルベンゼ



ンを合成するのにより傘高さの小さいヘキサキシジメチルシリルベンゼンのケイ素上に後からメチル基を導入することで合成している (式 15)^{50, 51)}。

アセチレン類の Reppe 反応の基質として、1,5-ヘキサジインを用いるとベンゾシクロブタンやシクロファンが生成するとが知られていた (式 16)³⁾。Vollhardt はビストリメチルシリルアセチレンそれ自身の二、三量化が起きにくい性質を利用して、Reppe 反応のシクロペンタジエニル中間体の補足剤としてビストリメチルシリルアセチレンを溶媒として用い 1,5-ヘキサジインや CpCo(CO)₂ 触媒と反応することでトリメチルシリル基ベンゾシクロブタンの良好な合成法を開発した (式 17)⁵²⁻⁵⁴⁾。この時、すでに量論反応ではあるが Müller らのカルボニル基やフェニ基で活性化したアセチレンをロジアシクロペンタジエン錯体とし、もう 1 分子のアセチレンを作用させてキノン誘導体の合成を報告しているが⁵⁵⁾、Vollhardt らのアルキル置換ジアセチレンの CpCo 触媒系での反応はそれに比べて汎用性が高い (式 18)。

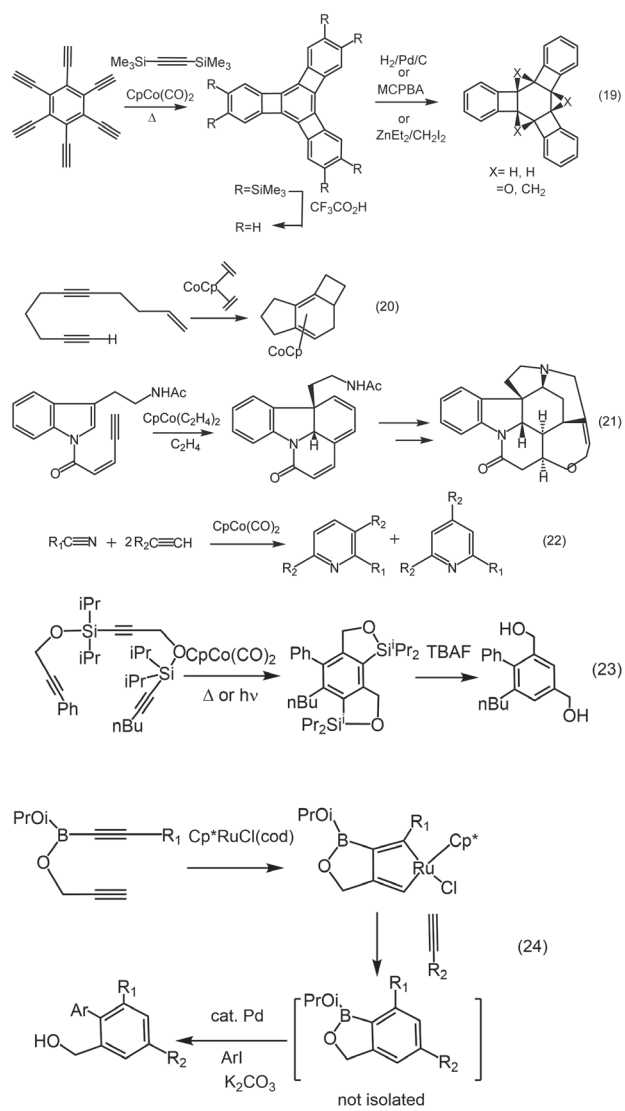
ここでは Vollhardt らのアンギュラー [4] フェニレンの合成について示す。ヘキサエチルベンゼンをビストリメチルシリルアセチレンを溶媒に三重 Reppe 反応を実行するとアンギュラー [4] フェニレンが 1 段階で合成できる (式 19)⁵⁶⁾。アンギュラー [4] フェニレンの中央のベンゼン環はそのシクロブタジエンの縮環により式に示す位置に局在化したシクロヘキサトリエン構造をとっている。その実験的証拠に水素添加が容易に起き、さら三重エポキシ化やメチレン化反応も容易に起きる^{57, 58)}。すでに解説し



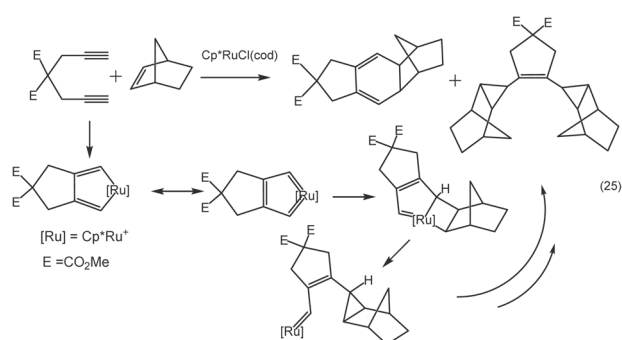
たアンギュラー [3] フェニレンについても同じく中央のベンゼン環はシクロヘキサトリエン構造をとっていることも明らかにされている (式 9-2)⁵⁹⁾。

コバルト触媒を用いた Reppe 反応はアルケンやニトリルも環化三量化し、シクロヘキサジエンやピリジンの骨格合成も可能である (式 20-22)^{60, 61)}。アルケンとしてインドール環も反応に組み込むことができ、インドール環を含む基質に CpCo 触媒とアセチレンガスを反応させて、ストリキニーネ骨格合成を可能にしている。ピリジン骨格合成は 1973 年に山崎らにより量論反応で見出され、翌年、Bonnemann と Vollhardt らにより独立に見出された複素環の触媒合成の優れた合成法である⁶²⁾。

このように Reppe 反応の 2 つ目の展開はベンゼン骨格を含む縮合多環化合物の一段階合成法である (図 1. 5))。もし縮環した環を開裂できると多置換ベンゼン誘導体の合成が可能になる。この場合環を形成する開裂可能な鎖を一般にテッターと呼びシロキサンとホウ酸テッターを用いた多置換ベンゼン誘導体

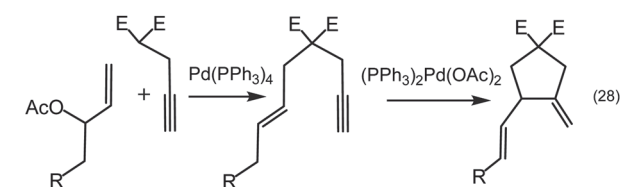
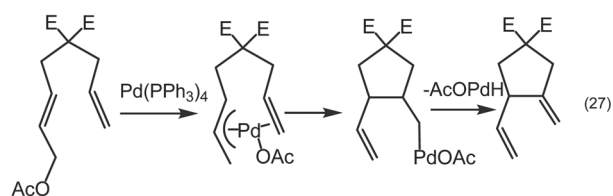


の合成で例を2つ示す(式23、24)⁶³⁻⁶⁶。シロキサンテッターはベンゼン誘導体ばかりでなく複雑なタキサン骨格の構築にも有用であることが **Malacria** の総説に紹介されている⁶⁴。ホウ酸テッターは生成するアリルホウ酸を Pd 触媒鈴木-宮浦カップリングで炭素-炭素結合形成ができる点が優れ、この時に使われる $\text{Cp}^* \text{RuCl}(\text{COD})$ 触媒は $\text{CpCo}(\text{CO})_2$ と等電子で同じ **Reppe** 反応を進行する触媒で、名大の山本らにより精力的に研究されている^{65, 66}。山本らは1,6-ジエンとノルボルネンの [2+2+2] 環化付加反応でシクロヘキセン以外にノルボルネンにシクロプロパン化した生成物が副生することを確認した。これはジ



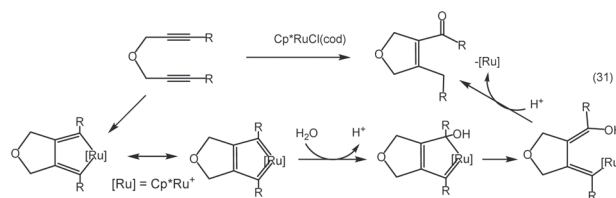
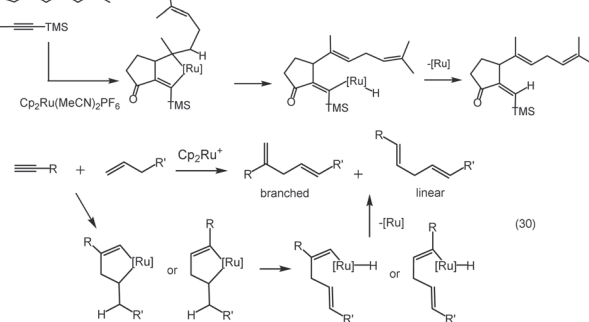
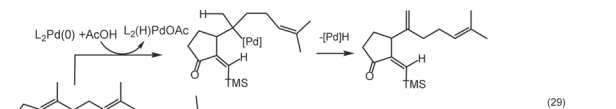
エンから生成したルテナシクロペンタジエンが環状ビスカルベン錯体として挙動したために生成したと考えられた(式25)^{66, 67}。

$\text{Cp}^* \text{Ru}(\text{II})$ 触媒の多様な反応性がジエン、エンイン、ジエン基質を用いた環化反応に大きな展開をもたらしている。例えば **Trost** らはエンイン基質を遷移金属触媒によりエン反応を行い触媒的に進行すれば **Atom Economy** な反応が実現すると考え Pd と Ru 触媒について検討した(式26)⁶⁸⁻⁷¹。Atom Economy は **Trost** の造語で、副生物 D を伴う $\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{C} + \text{D}$ の反応でなく、 $\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{C}$ の反応で、しかも反応が触媒反応の



ことである。エン反応は原料が全て生成物に組み込まれるが、高温・高圧反応のため触媒を用いて温和な条件で進行すれば確かに **Atom Economy** になる。一般にジエン化合物の **Reppe** 反応のメタラサイクル中間体の部分をジエンなどに変換できれば炭素五、六員環状化合物の合成法になる。いわゆるジエン、エンイン、ジエン基質を用いた環化異性化反応と呼ばれている反応である(図1.6)。その代表的な反応の例として **Oppolzer** により報告されているメタロエン反応という Pd や Ni 触媒による環化反応が知られている⁷²。Pd 触媒の場合には辻 - **Trost** 反応中間体の π -アリルパラジウム錯体が分子内でアルケンにカーボパラデーションし最後は β -水素脱離とヒドリドパラジウムが分解し、Pd(0)で進行する反応である(式27)。**Trost** らはプロパルギルマロン酸ジエステルを Pd(0) 触媒によりアリル化して分子内でアルキンとメタロエン反応により閉環させようとした(式28)。しかし、論文によると **unanticipated observation** と記載されているが、Pd(0) 触媒では全く進行しなかった⁷³。触媒を Pd(0) から Pd(II) に変えると室温で効率よく進行した。後年、酢酸などを添加すると反応が加速されることから Pd(II) でも AcOPdH がヒドロパラデーションし、還元的脱離する機構が考えられている。

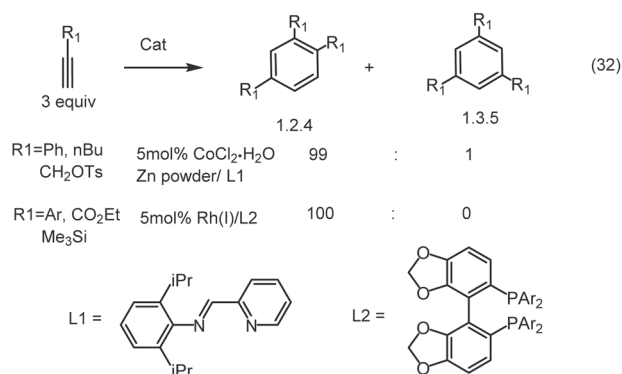
次に電子吸引基のケト基などで活性化されたエンイン基質を Pd(0) 触媒で環化異性化すると、即座にメチル基の水素が転移して反応生成物を与えた(式29)^{70, 74}。これに対して $\text{Cp}^* \text{Ru}$ 触媒では主鎖のメチレン水素が転移してエン反応生成物を与えた。Ru では環化付加と続く β -水素脱離と還元脱離で進行している(式29)^{75, 76}。さらに Pd では活性化され



た分子内エンインしか上手く行かないが、Ru では活性化されていない分子間エンイン反応も進行する(式 30)。このように多様な反応性を示す Cp^*Ru (II) カチオン触媒で Atom Economy な触媒を開発する中で Trost は水の存在下 1,6-ジインの反応を試みたところ、環状不飽和ケトンが生成することを見出した(式 31)⁷⁷⁾。これもルテナシクロペンタジエン中間体が環状ビスカルベン錯体として水和反応を誘発しルテナカルベンからビニルルテニウムに転移後、還元脱離して生成すると考えられる。その後の Cp^*Ru 触媒の [2+2+2] 環化付加と異性化については山本らの総説を参照されたい⁷⁸⁾。

金属を Co から Ru に変えると Reppe 反応も様変わりしたのを見てきた。2009 年に *Angew. Chem.* 誌上に BEYOND Reppe : Building Substituted Arenes by [2+2+2]cycloadditions of Alkynes というサブタイトルの短い総説 (Highlight) が発表された⁷⁹⁾。その総説では Vollhardt らのテッターを利用した置換異性体の制御をテッターなしで金属の配位子を変えることで制御しようといういくつかの試みが紹介されている。岡本らの Co 金属で市販のイミドピリジン (L1) を配位した例として 1,2,4 置換体と 1,3,5 置換体の生成比が 99 対 1 まで選択性が実現している(式 32)。さらに田中(健)らも金属を Rh に変え軸不斉のピフェニルホスフィン (L2) を用いることで 100 対 0 を達成している(式 32)。このほか $\{Ir(COD)_2Cl\}_2$ /diphospine 触媒(田中(健)、竹内)、 $MnBr(CO)_5$ 触媒(高井)、 $ReBr(CO)_3(thf)_4$ 触媒(國信)が紹介されているので詳しくは総説を参照されたい。

ホスフィン配位子が利用できると不斉ホスフィン配位子による不斉合成が可能になる。田中(健)らは不斉 Reppe 環化付加反応を用いて、軸性、面性、螺旋性光学活性化合物の合成を報告している^{80, 81)}。Reppe 反応と関連するエンイン基質の環化異性化反応にも不斉ホスフィン配位子を用いた Pd や Rh 触媒



による反応が報告され、残念ながら Ru 触媒ではホスフィン配位子で反応が失速するため Ru 触媒による不斉環化異性化反応は報告されていない⁸²⁾。

終わりに

今号の環化付加反応 (Reppe 反応) だけでも Longuet-Higgins によるベンゼンと COT 合成の中間体としてシクロブタジエン錯体中間体の提案に始まり、その反証としてのシクロペンタジエン錯体の提案、続く 4 π、10 π 芳香属性の問題、ジインカップリングによる縮合多環化合物や置換ベンゼンの合成化学、さらにエンイン基質の環化異性化反応への展開など内容が盛りだくさんとなってしまった。紙数の関係から前号で予告したオレフィンメタセシス (2) とオレフィン重合 (2) については次回 (12 回、最終回) で解説することに変更した。

文献

- 1) 荻原信衛 (1961) アセチレンの環化反応. *有機合成化学協会誌*. **19**: 20-28.
- 2) 近畿化学工業会 有機金属化学部会編集 (1961) *有機金属の化学と応用* 朝倉書店. 東京. pp.349-356.
- 3) Bird CW [櫻井英樹, 細見 彰, 吉良満男訳] (1971) 第 1 章 アセチレン類のオリゴメリ化. *遷移金属を用いる有機合成*. 廣川書店. 東京. pp.1-28.
- 4) Reppe W and Schweckendiek WS (1948) Cyclisierende Polymerization von Acetylen III. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **560**: 104-116.
- 5) 加部義夫 (2018) 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.
- 6) 吉田政幸 (1967) シクロオクタテトラエン. *有機合成化学協会誌*. **25**: 25-35.
- 7) 森尾和彦, 須田 稔, 正宗 悟 (1977) [4] アヌレン反 Hückel 系. *化学総説 No15 新しい芳香族系の化学* 学会出版センター 日本化学会. pp.135-154.
- 8) Seyferth D (2003) (Cyclobutadiene)iron. Tricarbonyl-A Case of Thoery before Expperiment. *Organometallics*. **20**: 2-20.
- 9) Hüisgen R and Gilde HG (1979) Rudolf Criegee (1902-1975). *J. Chem. Educ.* **56**: 369-374.
- 10) Schore NE (1988) Transition-Metal-Mediated cycloaddition Reactions of Alkynes in Organic Synthesis *Chem. Rev.* **88**: 1081-1119.
- 11) Roglans A, Pla-Quintana A and Sola M (2021) Mechanistic Studies of Transition-Metal-Catalyzed [2+2+2] cycloaddition Reactions. *Chem. Rev.* **121**: 1894-1979.
- 12) Seyfeth D (2002) Bis(benzne)chromium. 1. Franz Hein at University of Leipzig and Hard Zeiss and Minoru Tsusui at Yale. *Organometallics* **21**: 1520-1530.
- 13) Seyfeth D (2002) Bis(benzne)chromium. 2. Its Discovery by E. O. Fischer and W. Hafner and Subsequent Work by Research Groups of E. O. Fischer, H. H. Zeiss, F. Hein, C. Elschenbroich and others. *Organometallics* **21**: 2800-2820.

- 14) Whitesides GM and Ehmman WJ (1996) The Cyclotrimerization of 2-Butyne-1,1,1-d₃ by Transition Metal Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **91**: 3800-3807.
- 15) Maitlis PM (1976) The Palladium(II)-Induced Oligomerization of Acetylene: An Organometallic Detective Story. *Acc. Chem. Res.* **9**: 93-99.
- 16) Collman JP, Kang JW Little WF and Sulliyam MF (1968) Metalacyclopentadiene Complexes of Iridium and Rhodium and Their Role in the Catalytic Cyclotrimerization of Disubstituted Acetylene. *Inorg. Chem.* **7**: 1298-1303.
- 17) Collman JP (1968) Patterns of Organometallic Reactions Related to Homogeneous Catalysis. *Acc. Chem. Res.* **1**: 136-143.
- 18) Wakatsuki Y, Kuramitsu T and Yamazaki H (1974) Cobaltacyclopentadiene Complexes as Starting Materials in the Synthesis of substituted benzene - Cyclohexadiene, Thiophenes, Selenophenes and Pyrroles. *Tetrahedron Lett.* **1974**: 4549-4552.
- 19) Wakatsuki Y, Nomura O, Kitaura K, Morokuma K and Yamazaki H (1983) Cobalt Metalacycles 11. On the Transformation of Bis(acetylene)cobalt to Cobaltacyclopentadiene. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 1907-1912.
- 20) 山崎博史, 若槻康雄 (1986) 触媒的環化付加. *化学増刊 109 錯体触媒化学の進歩* 大塚・中村・山崎共編 東京化学同人, 東京. pp.87-97.
- 21) 山崎博史 (1987) 有機金属錯体に関する研究. *有機合成化学協会誌.* **45**: 244-257.
- 22) MacAlister DR, Bercaw JE and Bergman RG (1977) Parallel Reaction Pathways in the Cobalt-catalyzed Cyclotrimerization of acetylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 1666-1668.
- 23) Diercks R, Eaton EE, Gürtzgen S, Jalisatgi S, Matzger AJ, Radde RM and Vollhardt KPC (1998) The First Metallacyclopentadiene (Alkyne) Complexes and Their Discrete Isoimerization to η^4 -Bound Arenes: The Missing Link in the Prevalent Mechanism of Transition Metal Catalyzed Alkynes Cyclotrimerization as Exemplified by Cyclopentadienyl-cobalt. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 8247-8248.
- 24) Dosa PI, Whitener GD and Vollhardt KPC (2002) Cobalt-Mediated Synthesis of Angular[4]Pentylene: Structural Characterization of Metallacyclopentadiene(Alkyne)Intermediate and Its Thermal and Photochemical Conversion. *Org. Lett.* **4**: 2075-2078.
- 25) Agent N, Gandon V, Vollhardt KPC, Malacria M and Aubert C (2007) Cobalt-Catalyzed Cyclotrimerization of Alkynes: The Answer to the Puzzle of Parallel Reaction Pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 8860-8871.
- 26) Dahy AA and Koga N (2005) Theoretical Study on the Transformation of Bis(acetylene)cobalt to Cobaltacyclopentadiene and the Regioselectivity in this transformation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**: 781-791.
- 27) Colborn RE and Vollhardt KPC (1981) Mechanism of the Reppe Cyclotetraene Synthesis from Ethyne: A Labeling Experiment. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 6259-6261.
- 28) Colborn RE and Vollhardt KPC (1986) On the Mechanism of the cyclotetraene Synthesis from Ethyne Employing Nickel Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 5470-5477.
- 29) Straub BF and Gollub C (2004) Mechanism of Reppe's Nickel-Catalyzed Ethyne Tetramerization to Cyclotetraene: A DFT Study. *Chem. Eur. J.* **10**: 3081-3091.
- 30) 吉田善一 (1967) New Aromatics の化学. *有機合成化学協会誌.* **25**: 227-239.
- 31) 萩原信衛 (1964) 二三の有機金属錯体と有機合成. *有機合成化学協会誌.* **22**: 513-519.
- 32) 北原喜男, 浅尾豊信, 小田雅司 (1977) 10 π 化合物 化学総説 No15 新しい芳香族系の化学 学会出版センター 日本化学会. pp.124-133.
- 33) 野副鉄男 (1978) ヒノキチオール の発見からトロポノイドの化学へ. *化学教育.* **26**: 422-433.
- 34) Craig LE and Larrabee CE (1951) Eight-membered Carbocycles. Identification of the C₁₀H₁₀ Fraction from Cyclooctatetraene Preparation. *J. Am. Chem. Soc.* **73**: 1191-1195.
- 35) Cope AC and Fenton SW (1951) Cyclic Polyolefins. XII. Isolation of Vinylcyclooctatetraene and cis-1-Phenyl-1,3-butadiene from Acetylene Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **73**: 1195-1198.
- 36) 伊東 徹, 中平靖弘, 小林隆広 (1975) 不安定化合物を捕える—有機化学と低温— *現代化学.* **8**: 58-65.
- 37) Bally T and Masamune S (1980) CYCLOBUTADIENE. *Tetrahedron* **36**: 343-370.
- 38) 西谷 潔 (1975) [4]-Annulene の確証. *化学の領域.* **29**: 12.
- 39) Delbaere LTJ, James MNG, Nakamura N and Masamune S (1975) The [4]Annulene System. Direct Proof for Its Rectangular Geometry. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 1973-1974.
- 40) 戸田美三夫 (1978) シクロブタジエン類の最近の化学. *化学の領域.* **32**: 672-685.
- 41) Mair G, Pfriend S, Schäfer U and Matsusch R (1978) Tetra-tert-butyltetrahedrane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **17**: 520-521.
- 42) Mair G (1988) Tetrahedrane and Cyclobutadiene. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27**: 309-332.
- 43) Mair G, Lage HW and Reisenauer MP (1981) Trimethylsilylated Cyclopentadienone. *Angew. Chem. Int. Ed.* **20**: 976-977.
- 44) Mair G, Newdert J and Wolf O (2001) Tetrakis(trimethylsilyl)cyclobutadiene and Tetrakis(trimethylsilyl)tetrahedrane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 1674-1675.
- 45) Sakurai H and Hayashi J (1974) Preparation of (π -cyclopentadienyl)[π -tetrakis(trimethylsilyl)cyclobutadiene]cobalt. *J. Organomet. Chem.* **70**: 85-87.
- 46) Sekiguchi A, Tanaka M, Matsuo T and Watanabe H (2001) From a Cyclobutadiene Dianion to a Cyclobutadiene: Synthesis and Structural Characterization of Tetrakis(trimethylsilyl)-substituted Cyclobutadiene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 1675-1677.
- 47) Mair G, Newdert J, Wolf O, Pappusch D, Sekiguchi A, Tanaka M and Matsuo T (2002) Tetrakis(trimethylsilyl)tetrahedrane. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 13819-13826.
- 48) Sekiguchi A and Tanaka M (2003) Tetrahedranyl

- lithium: Synthesis, Characterization and Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12684-12685.
- 49) Fritch JR, Vollhardt KPC, Thompson MR and Day VW (1979) Apparent Concurrent Acetylene-Vinylidene Carbene Rearrangements, Silyl-Acetylide Metathesis and Alkyne Cleavage in the Interaction of Bis (trimethylsilyl) acetylene with (η^5 -C₅H₅)Co(CO)₂. Crystal and Molecular Structure of a Novel Biscarbene complex: [$\mu^3 \eta^1$ -CSi(CH₃)₃][$\mu^3 \eta^1$ -C₃Si(CH₃)₃][η^5 -C₅H₅Co]₃. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 2768-2770.
- 50) Sakurai H, Ebara K, Kabuto C and Sekiguchi A (1990) Chemistry of organosilicon compounds. 263. Synthesis, properties, and molecular Structure of Highly distorted hexakis (trimethylsilyl) benzene. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 1799-1803.
- 51) 櫻井英樹 (1990) ペルシリル置換 π 電子系化合物. *日本化学会誌*. **1990**: 439-450.
- 52) Vollhardt KPC and Bergman RG (1974) One step synthesis of Benzocyclobutenes involving Cooligomerization of Linear mono- and diacetylenes catalyzed by η^5 -5-cyclopentadienyl cobalt dicarbonyl. *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 4996-4998.
- 53) Aalbersberg WGL, Barkovich AJ, Funk RL, Hillard III RL and Vollhardt KPC (1975) Transition metal catalyzed acetylene cyclizations. 4,5-Bis (trimethylsilyl) benzocyclobutene, a Highly strained, versatile synthetic Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 5600-5602.
- 54) Hillard III PL and Vollhardt KPC (1977) Substituted Benzocyclobutenes, Indans and Tetralins, via a cobalt-catalyzed Cooligomerization of α , ω -Diyne with Substituted Acetylene. Formation and Synthetic Utility of Trimethylsilylated Benzocyclobutenes. *J. Am. Chem. Soc.* **99**: 4058-4069.
- 55) Müller E (1973) The Diyne Reaction of 1,4-, 1,5-, 1,6- and 1,7-Diyne via Transition Metal Complexes to New Compounds. *Synthesis*. **1973**: 761-774.
- 56) Diercks R and Vollhardt KPC (1986) Tris (benzocyclobutadiene) benzene, the triangular [4]phenylene with a completely Bond-Fixed Cyclohexatriene Ring: Cobalt-Catalyzed Synthesis From Hexaethynylbenzene and thermal Ring Opening to 1,2:5,6:9,10-Tribenzo-3,4,7,8,11,12-hexadehydro[12]-annulene. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 3150-3152.
- 57) Mohler DL, Vollhardt KPC and Wolff S (1990) Facile Hydrogenation of the Central Cyclohexatriene of Tris (benzocyclobutadiene) benzene: Synthesis, Structure and Thermal and Photochemical Isomerization of all-cis-Tris(benzocyclobuta)cyclohexane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **29**: 1151-1154.
- 58) Mohler DL, Vollhardt KPC and Wolf S (1995) Novel Structures from Triscyclopropanation and Trisoxacyclopropanation to the First [2.1.2.1.2.1]hexaannulenes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **34**: 563-565.
- 59) Kumaraswamy S, Jalisatgi SS, Matzger AJ, Miljanic S and Vollhardt KPC (2004) Anatomy of a cyclohexatriene: Chemical Dissection of the π and σ Frame of Angular[3]Phenylene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**: 3711-3715.
- 60) Cammack JK, Jalisatgi S, Matzger AJ, Negron A and Vollhardt KPC (1996) Room Temperature CpCo-Mediated Cyclization of α , δ , ω -Enedynes to Regarding Strained Tricyclic Dienes. Some Observation of Kinetic versus Thermodynamic Control. *J. Org. Chem.* **61**: 4798-4800
- 61) Eichberg MJ, Dorta RL, Grotjahn DB, Lamottke K, Schmidt M and Vollhardt KPC (2001) Approaches to the synthesis of (\pm)-Strychnine via the Cobalt-Mediated [2+2+2]cycloaddition: Rapid Assembly a Classic Framework. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 9324-9337.
- 62) Vollhardt KPC (1984) Cobalt-Mediated [2+2+2] Cycloadditions: A Maturing Synthetic Strategy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**: 539-556.
- 63) Chouraqui G, Petit M, Aubert C and Malacria M (2004) Totally Chemo- and Regioselective Cobalt(I)-Mediated Formal Intermolecular Cycloisomerization of Alkynes. *Org. Lett.* **6**: 1519-1521.
- 64) Gandon V, Aubert C and Malacria M (2006) Recent Progress in cobalt-mediated [2+2+2] cycloaddition reaction. *Chem. Commun.* **2006**: 2209-2217.
- 65) Yamamoto Y, Ishi J-i, Nishiyama H and Itoh K (2004) Ru(II)-catalyzed Chemo- and Regioselective cyclotrimerization of Three Unsymmetrical Alkynes through Boron Temporary Tethaer. One-pot Four-component coupling via cyclotrimerization/Suzuki-Miyaura coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 3712-3713.
- 66) 山本芳彦 (2005) 2 価ルテニウム錯体触媒を用いるアルキン類の環化三量化反応. *有機合成化学協会誌* **63**: 112-121.
- 67) Yamamoto Y, Arakawa T, Ogawa R and Itoh K (2003) Ruthenium(II)-catalyzed Selective Intramolecular [2+2+2] Alkyne Cyclotrimerization. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12143-12160.
- 68) Trost BM (1991) The Atom Economy-A Search for Synthetic efficiency. *Science* **254**: 1471-1477.
- 69) Trost BM (1990) Palladium-Catalyzed Cycloisomerization of Enynes and Related Reactions. *Acc. Chem. Res.* **23**: 34-42.
- 70) Trost BM, Frederiksen MV and Rudd MT (2005) Ruthenium-catalyzed Reactions-A Treasure Trove of Atom-Economic Transformations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**: 6630-6666.
- 71) Rouhi AM (1995) Atom economical reactions help chemists eliminate waste. *C&EN News June* **19**: 32-35.
- 72) Oppolzer W (1989) Intramolecular Stoichiometric (Li, Mg, Zn) and Catalytic (Ni, Pd, Pt) Metallo-Ene Reactions in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **28**: 38-52.
- 73) Trost BM and Lauten M (1985) Cyclization via Isomerization: A Palladium(2+)-Catalyzed Carbocyclization of 1,6-Enynes to 1,3- and 1,4-Dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 1781-1783.
- 74) Trost BM and Toste FD (2000) Ruthenium-catalyzed Cycloisomerization of 1,6- and 1,7-Enynes. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 714-715.
- 75) Trost BM and Indolese AF (1993) Ruthenium-catalyzed Addition of Alkene to Acetylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 4361-4362.
- 76) Trost BM, Martinez JA, Kulawiee RJ and Indolese AF (1993) Ruthenium-catalyzed addition of allyl alcohol and acetylenes. A simple synthesis of γ , δ -unsaturated ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 10462-10563.

- 77) Trost BM and Rudd MT (2003) A Mechanistic Dichotomy in Ruthenium-catalyzed Propargyl Alcohol Reactivity: A Novel Hydrateive Diyne Cyclization. of Alkene to Acetylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 11516-11517.
- 78) Yamamoto Y (2017) Recent topics of Cp*RuCl-catalyzed annulation reactions. *Tetrahedron Lett.* **58**: 3787-3794.
- 79) Galan BR and Rovis T (2009) Beyond Reppe: Building Substituted Arenes by [2+2+2] cycloaddition of Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 2830-2834.
- 80) 田中 健 (2012) 芳香環を組み立てて光学活性分子を合成する. *化学と教育*. **60**: 302-303.
- 81) 田中 健, 西田剛士, 須田健資 (2007) カチオン性ロジウム-BINAP系錯体触媒を用いた化学、位置エナント選択的 [2+2+2] 付加環化反応の開発. *有機合成化学協会誌*. **65**: 862-873.
- 82) Fairlamb IJS (2004) Asymmetric cycloisomerization of 1,6- and 1,7-Enynes by Transition-Metal Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**: 1048-1052.

2022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	小谷 享
	生物科学科	教授	藤原 研

(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	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	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、菅原 正
	中田穰治、野宮健司
	羽鳥尹承、日野晶也
	丸田恵美子
客員教授	尾中 篤、細谷浩史

客員研究員	秋永 薫、安部 淳
	市川麗子、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、今野 巧
	齋藤礼弥、櫻井英博
	佐藤 剛、柴田真太郎
	朱 留存、関 裕平
	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
	吉田 剛

2 講演会

(1) 講演会

演 題：「含ホウ素ナノグラフェン構造を活かした熱活性化遅延蛍光分子の開発」

講演者：吾郷友宏 准教授

(茨城大学大学院理工学研究科)

日 時：2022年4月8日(金)

15時00分～17時00分

会 場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館228室)

主 催：神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所

報 告：

有機ELが実用化され、身近なものになっている中、熱活性化遅延蛍光(TADF)分子は最先端の有機EL材料として世界的に注目されている。本講演では、有機合成的手法に基づいた含ホウ素ナノグラフェン構造を持つ新規TADF材料について講演いただいた。有機ELデバイスの仕組み、性能を表すグラフの見方、ロールオフと呼ばれている高輝度領域での性能の低下を解消するための科学的根拠に基づく分子設計を詳しく説明していただいた。こ

のため、大学院生や学部生、さらには分野外の教員からも非常に分かりやすい講演であったとの感想を聞いた。講演後の質疑応答セッションでは、合成から機能における幅広い質問が次々に出て、非常に活発な討論がなされた。

(報告者 辻 勇人 2022.4.11)

(2)講演会

演 題：「分子建築学に基づく機能性超分子材料の合成と物性」

講演者：寺尾潤 教授
(東京大学大学院総合文化研究科)

日 時：2022年7月26日(木)
15時00分～17時00分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
(6号館228室)

主 催：神奈川県総合化学研究所

報 告：

環状分子であるシクロデキストリン誘導体と共役分子からなるロタキサン構造を有し、単分子性を発現するnmスケールの機能性分子素子の合成と機能に関する研究について講演いただいた。化学の重要性、今後の日本を化学で元気づけるためのメッセージなども盛り込まれ、参加者からは非常に刺激적でおもしろかったとの感想を聞いた。講演後の質疑応答セッションでは活発な討論がなされた。

(報告者 辻 勇人 2022.7.30)

(3)講演会

演 題：「豊富な資源を活用するサステイナブル有機合成」

講演者：浅子壮美氏
(理化学研究所環境資源科学研究センター)

日 時：2022年9月28日(水)
15時00分～17時00分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
(6号館307室)

主 催：神奈川県総合化学研究所

報 告：

参加人数が多いために教室を変更して行った。豊富で入手しやすい有機物や金属資源を用いたサステイナブル合成と、芳香族炭化水素の位置選択的な直接官能基化の手法に関する最新の研究成果について講演いただいた。特に、最近入手が困難になりつつある有機リチ

ウム試薬に変わるものとして注目されている金属ナトリウム分散体を用いた有機合成について丁寧に説明して頂いた。講演後の質疑応答セッションでは活発な討論がなされた。

(報告者 辻 勇人 2022.9.30)

(4)講演会

演 題：「ナノサイズ分子キャビティを活用した活性化学種の反応制御」

講演者：後藤 敬 教授
(東京工業大学理学院化学系)

日 時：2022年10月11日(火)
15時00分～17時00分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
(6号館307室)

主 催：神奈川県総合化学研究所

報 告：

分子キャビティを活用した生体反応活性種の安定化、および生体反応機構の化学的検証への応用についてご講演いただいた。化学研究から生体现象の理解につながる実例を示していただき、ベーシックサイエンスの重要性を説かれ、理学部生をエンカレッジするメッセージなども盛り込まれた。講演後の質疑応答セッションでは活発な討論がなされ、終了後も多くの学生が質問に行くなど盛況であった。

(報告者 辻 勇人 2022.10.14)

(5)講演会

演 題：「アインシュタイン的転回する研究」

講演者：辻本和雄 名誉教授
(北陸先端科学技術大学院大学)

日 時：2022年11月2日(水)
15時30分～17時30分

会 場：神奈川県 湘南ひらつかキャンパス
(6号館204室)

主 催：神奈川県総合化学研究所

報 告：

化学科の力石助教および川本が世話人となり、上記講演会を6号館204号室で開催しました。ご専門の質量分析の話のベースにご自身のいくつかの研究とそれぞれの研究にまつわる体験談をご講演いただきました。また、本学でも教鞭をとられ、理事をも務められた大橋先生の業績についてもご紹介いただきました。さらに、ノーベル賞受賞者である福井謙一先生や吉野彰博士とのご関係、辻本先生との間のエピソードについてもお話しいただきまし

た。講演後の質疑応答では、研究におけるご自身の体験に基づき、研究者としての学生に向けた力強いメッセージをいただきました。

(報告者 川本達也 2022.11.4)

(6) 講演会

演題：「Chemical Reactions in Imidazolium Acetate: A Computational Study」

講演者：Professor Hyung J. Kim
(Department of Chemistry Carnegie Mellon University, USA)

日時：2022年10月24日(月)
14時30分～16時30分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(1号館242室)

主催：神奈川大学総合理学研究所

報告：

2022年10月24日(月)午後、1号館242講義室において、講師にHyung J. Kim教授(米国、Carnegie Mellon University)を迎え、英語による講演会を行った。イオン液体中における二酸化炭素分子のイミダゾリウムカチオンへの付加反応過程の反応軌跡について、Kim教授が誇る世界最先端レベルの非経験的分子動力学計算の手法を用いた研究成果の解説が行われた。地球温暖化ガスである二酸化炭素のイオン液体への効率的な吸着現象は、世界的に興味をもたれており、その吸着機構の理解を深める重要な理論研究結果であった。カチオンがカルベン生成を経て二酸化炭素を吸着する機構が想定されていた中で、Kim教授の研究はカチオンのプロトン脱離と二酸化炭素付加が協奏的に起こることを示した点が画期的であることが分かり易く解説された。

参加者は、神奈川大学学生15名の他、研究者4名であった。講演内容に対する質疑や議論が行われ、研究の理解のみならず、国際的な交流を深めることができた。

(報告者 河合明雄 2022.10.27)

(7) 講演会

演題：「Exploration of Sri Lankan Flora for Novel Pharmaceuticals and Other Applications」

講演者：Professor Vajira P. Bulugahapitiya
(University of Ruhuna, Sri Lanka)

日時：2022年11月22日(火)
17時10分～18時50分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館206室)

主催：神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所

報告：

Bulugahapitiya博士はルフナ大学(スリランカ)理学部化学科で長年に渡り天然物有機化学の研究と教育に携わり、スリランカ側の窓口となつて、ルフナ大学理学部化学科と神奈川大学理学部化学科との学術交流協定に基づく研究協力を推し進めてきました。今回、神奈川大学理学部の横浜移転を前に、学術交流協定の今後のあり方について打合せを行うために神奈川大学に招聘し、その機会に講演をお願いしました。研究成果と共に、スリランカという日本とは全く異なる環境下でどのように研究を行うかについての有意義な話を聞くことができました。当日は、教員1名(木原)の他、学生・研究員20名の参加がありました。

(報告者 木原伸浩 2022.11.23)

(8) 講演会

演題：「Enhancing solution state NMR sensitivity: optical pumping to overcome the Boltzmann limit」

講演者：Dr. Christopher J Wedge
(University of Huddersfield, U.K.)

日時：2023年1月13日(金)
14時00分～16時00分

会場：神奈川大学 湘南ひらつかキャンパス
(6号館228室)

主催：神奈川大学総合理学研究所

報告：

神奈川大学理学部では、2023年1月に英国王立協会の援助により来日されたChris Wedge博士(英国ハッダーズフィールド大学上席講師)を、神奈川大学研究員として平塚キャンパスに迎えた。この貴重な機会に臨み、2023年1月13日(金)午後、6号館228講義室において、総合理学研究所主催による同博士の英語講演会が開催された。講演は「Enhancing solution state NMR sensitivity: optical pumping to overcome the Boltzmann limit」と題し、前半の基礎的内容の解説、および後半の研究内容解説の2部からなつた。

講演の前半では、Wedge博士の研究の関連分野における世界の先端的研究内容を紹介し、初歩的な事項の説明を交えた解説を行った。

博士は、物理学や化学、医学分野における計測手法として汎用的に用いられている核磁気共鳴について、その弱点である測定感度の低さを克服する手法の開拓に挑んでいる。世界では同じ目的をもって様々な手法が開発途上にあり、固体常磁性種の電子磁化、パラ水素の付加反応、などを利用した核スピン分極生成法が具体例として紹介された。また、癌の検出につながるピルビン酸の微量分析法への応用などが始まっていることが述べられた。一方で、これら手法の問題点も指摘し、博士が開拓するに至った光誘起核スピン分極生成法の利用が重要であることを強調した。

休憩をはさんだ後半では、有機分子の光励起で生じる三重項が、溶液中でラジカル分子と衝突する際に生じる大きな電子スピン磁化を利用する方法について、具体的実験例を多用して解説した。特筆すべき成果として、キサント色素の光励起を用いた場合に大きな感度向上がみられたこと、さらにはアミノ酸の添加が著しい感度向上を助けることが示された。これら最新の研究結果をもとに、今後の研究の展望について論説し、講演を終了した。

その後、講演内容に対する質疑や討論が行われ、研究の理解のみならず、日英の国際的な交流を深めることができた。聴講者は、神奈川大学学生12名の他、英国大学院生1名、国内研究者2名であった。

(報告者 河合明雄 2023.1.16)

木原伸浩

- 5) 「パラジウム錯体、それからなる水分子に対する還元触媒前駆体、及びそれを含む触媒システム」
川本達也、山西克典、井上 哲
- 6) 「感光性表面処理剤、積層体、パターン形成用基板、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、ニコン(株)
- 7) 「感光性表面処理剤、パターン形成用基板、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、ニコン(株)
- 8) 「ポリマー化合物の分解方法、分解性接着剤組成物及びそれを用いてなる接合体の分離方法、分解性塗料組成物及びそれを用いてなる塗膜の除去方法、並びに繊維強化プラスチックに含まれる繊維を回収する方法」
木原伸浩
- 9) 「化合物、高分子化合物、感光性表面処理剤、積層体、パターン形成用基板、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、力石紀子、伊藤倫子、ニコン(株)
- 10) 「連結型ビニルポリマー化合物及びその製造方法、それを用いたプラスチック製品及びその分解処理方法、並びに接合体の分離方法」
木原伸浩

3 産官学 活動実績

(1) 特 許

(日本出願)

- 1) 「5員環の縮合した縮合多環化合物の製造方法、インダセン誘導体、並びにp-フェニレンビニレン誘導体及びその製造方法」
辻 勇人、岩田啓佑
- 2) 「情報提供システム、情報提供方法及びプログラム」
桑原恒夫、天願多加志
- 3) 「クラスタリング装置、クラスタリング方法及びプログラム」
斉藤和巳、日本電信電話株式会社
- 4) 「高分子化合物及びその分解方法、その高分子化合物を含むプラスチック製品、繊維強化プラスチックとそれに含まれる繊維を回収する方法」

Science Journal of Kanagawa University

投稿規定

1 編集方針

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

2 掲載論文の種類

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

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

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

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

(1) 頁数

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

(2) 原稿用紙サイズ

A4版の用紙を用いる。本文および図表の占める範囲 (紙面) は縦横 245 × 170 mm とす

る。この場合、余白は、上辺 30 mm、下辺 20 mm、左辺 20 mm、右辺 20 mm である。

(3) 段組み

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

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

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

(4) 使用文字 (フォントの種類)

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

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

(5) 論文構成

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

(6) 論文種の表示

第1頁、第1行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

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

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、MSゴシックで11P (ポイント) とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

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

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

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

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

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

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

次のAbstractまでは1行あける。

(8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切である。

見出し（Abstract :）からは1文字あけて要旨本文を書く。

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

(9) Keywords

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

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

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とし、句読点は和文「、」「。」、英文「,」「.」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 of 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、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

Abe, Sinya	阿部真也	25
Aoki, Takashi	青木 孝	9
Asaoka, Mariko	浅岡真理子	55
Azumi, Yoshitaka	安積良隆	45

H

Hoshino, Yasushi		1
------------------	--	---

I

Ishiwari, Ryusuke	石割隆輔	49
-------------------	------	----

K

Kabe, Yoshio	加部義夫	71
Kawai, Akio	河合明雄	19
Kawanobe, Kyoko	川延京子	65
Kobayashi, Taduru	小林 達	45
Koga, Hiroyuki	古賀皓之	45
Koshiha, Masashi	小柴雅史	45
Kotani, Susumu	小谷 享	49
Kurihara, Yuta	栗原優太	13

M

Matsuo, Muneyuki	松尾宗征	25
Mitsuhara, Kei		1
Momoi, Tamaki	桃井 環	31
Motomura, Wakana	本村和佳奈	45

N

Nagamatsu, Leo	永松礼夫	13
Nishijo, Koga	西條光河	65
Nishimoto, Yuko	西本右子	61, 65
Nishitani, Kazuhiko	西谷和彦	55

O

Ochiai, Yu	落合 優	45
Ogino, Yuya	荻野湧矢	61
Oti, Takumi	越智拓海	49

S

Sakamoto, Hirotaka	坂本浩隆	49
Seki, Yuhei		1
Shinozaki, Wakako	篠崎和歌子	49
Sugawara, Tadashi	菅原 正	25
Suzuki, Kentaro	鈴木健太郎	25
Suzuki, Yoshihiro	鈴木祥弘	61, 65

T

Takahashi, Hiyono	高橋ひよの	61
Tamura, Asami	田村麻美	19
Tateishi, Sayaka	立石沙也加	49
Toyoizumi, Ryuji	豊泉龍児	31

Y

Yoshida, Tsuyoshi	吉田 剛	19
-------------------	------	----

W

Watanabe, Ryo	渡邊 諒	19
---------------	------	----

編集後記

今年も、皆様に Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌) をお届けできることを大変嬉しく思います。当誌は、神奈川大学総合理学研究所の機関誌(年報)を経て、湘南ひらつかキャンパスを拠点に、理学部および大学院理学研究科の研究成果を発信し続けてきました。

湘南ひらつかキャンパスは、私たちにとって特別な場所です。多くの思い出が詰まっています。神奈川大学は最近、組織再編を行い、理工学系学部を横浜の六角橋キャンパスに集結させましたが、私たちは湘南ひらつかキャンパスでの活動に感謝し、その貢献を忘れることはありません。湘南ひらつかキャンパスでの研究活動は、私たちの学術的な成長と専門知識の獲得に重要な役割を果たしました。

新たな組織では、生物学、化学、物理学、数学、情報科学、天文学など、幅広い研究分野をカバーしています。これらの異なる専門分野の研究者が協力し合い、刺激し合いながら、豊かな学術環境を築く

ことができました。私たちは研究の質を向上させ、新たな発見や学術的なブレイクスルーを実現するため、さまざまな共同研究や国際交流を積極的に推進しています。新組織の形成によって、研究の成果を加速させることを期待しています。私たちはより高度な研究と知識の創造を目指し、社会や産業界への貢献を使命としています。また、今後はより広い国際的な視野を持ち、国内外の研究者との交流や共同研究を通じて、学問のグローバルなネットワークを構築していくことを目指します。

第34巻の刊行を迎えるにあたり、論文執筆者、査読者、編集委員、編集スタッフ、そして読者の皆様に心から感謝申し上げます。今後も Science Journal of Kanagawa University を通じて、高品質な科学研究の発信と学問の進展に貢献していきます。皆様のご支援とご協力に心より感謝いたします。

引き続き、神奈川大学理学誌へのご関心とご支援を賜りますよう、心からお願い申し上げます。

〔 神奈川大学総合理学研究所 〕
〔 情報学部 張 善俊 〕

神奈川大学理学誌編集委員会

委員長

川本達也 理学部

委員

安積良隆 理学部

阿部吉弘 理学部

井上和仁 化学生命学部

加部義夫 理学部

川東 健 理学部

桑原恒夫 情報学部

張 善俊 情報学部

堀 久男 理学部

Science Journal of Kanagawa University

Editor-in-Chief

Tatsuya Kawamoto Faculty of Science

Editors Faculty of Science

Yoshitaka Azumi Faculty of Science

Yoshihiro Abe Faculty of Science

Kazuhito Inoue Faculty of Chemistry and Biochemistry

Yoshio Kabe Faculty of Science

Ken Kawahigashi Faculty of Science

Tsuneo Kuwabara Faculty of Informatics

Shanjun Zhang Faculty of Informatics

Hisao Hori Faculty of Science

Science Journal of Kanagawa University Vol. 34 (Sci. J. Kanagawa Univ.)

発行日	2023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	〒221-8686 横浜市六角橋3-27-1 Tel. 045-481-5661 (内 4240) Fax. 045-481-2783
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