

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL **OF** KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol. 35 2024

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

目 次

原 著

IV 族半導体量子ドットの発光特性の解明

水野智久、青木 孝 1

光崩壊性リポソームの単粒子分光分析法の開発

東海林竜也、乙黒優那、鈴木健太郎、坪井泰之 9

キラルサレン型ニッケル (II) 錯体の電解重合による高分子膜の合成と円偏光二色性

廣津昌和、岡西一真、力石紀子、栗村直人 13

両生類アフリカツメガエル幼生の正中鰭のサイズと形状は環境水中のマグネシウム濃度に
影響される

胡 継楠、豊泉龍児 19

扁形動物の微小管結合蛋白質の同定

ミンイゴウ、越智拓海、小谷 享 25

両生類幼生を用いたマイクロプラスチックの誤食による環境汚染の研究

吉本茉歩、内藤 凱、深野 元、神山風鳴、薩摩 透、原 和也、秋永 薫
茂木和枝、藤田深里、藤原 研、豊泉龍児 31

ラベルム形成に注目したミョウガ (*Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe) の花発生に関する
形態学的研究

山田大樹、濱田拓見、西井かなえ、Louis P. Ronse De Craene、岩元明敏 37

相模川河口域における長期環境変動のモニタリング 11

海況と植物プランクトン分布 2023年12月

水田眞輝、川延京子、西本右子、西條光河、鈴木祥弘 41

単 報

コンテナ変数を用いたデータ圧縮とそれによる検索時間のニュース記事とその構成単語の
関係データでの評価実験

桑原恒夫、斉藤和巳 49

N₂S₂-アミド配位子を有するパラジウム (II) 錯体の合成と構造

原田 宝、川本達也 53

報 告 書

一般講演会「ギンナンと人間の関わり」報告書

内田英伸、吉田 洋、内田美重 57

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 (12) 加部義夫	63
シリカ膜カラムによる米ゲノム DNA 抽出実験の大学生向け動画教材の開発 内田美重、コンタウィクリスティンアイコ、呂 虹橋、内田英伸	77
2023 年度神奈川大学総合理学研究所事業報告	81
Science Journal of Kanagawa University 投稿規定	87
Author Index	91
編集後記	92

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

IV 族半導体量子ドットの発光特性の解明

水野智久^{1,2} 青木 孝¹

Physical Properties for Photon Emission
from Group-IV Semiconductor Quantum Dots

Tomohisa Mizuno^{1,2} and Takashi Aoki¹

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

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

Abstract: We developed very simple and ultra large scale integration ULSI compatible fabrication processes for group-IV ($\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ and Si) semiconductor quantum dots (QDs) to apply hybrid ULSIs with photonic and electron devices, using double Ge^+/Si^+ hot-ion implantation into an SiO_2 layer with larger bandgap E_G and post-furnace annealing. We successfully demonstrated near-infrared (IR) photoluminescence (PL) from $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ -QD. Transmission electron microscopy observations of single crystallized $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ -QDs revealed that the diameter and QD density were 3.6 ± 0.9 nm and $(2.6 \pm 0.4) \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$, respectively. The PL spectrum of $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ -QDs was fitted by PL components of two QD structures containing $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ and Si materials. The PL intensity and PL-peak photon energy of $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ -QDs markedly depended on the Ge fraction. $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ -QDs achieved maximum PL intensity at $x \approx 0.13$. High PL-peak photon energy (~ 1.31 eV) of $\text{Si}_{1-x}\text{Ge}_x$ -QDs is attributed to the quantum confinement effect of carriers in QDs. Secondly, we studied the PL intensity increase of Si-QD, using the novel process of hot N^+ -ion implantation at 800 °C into Si quantum dots (Si-QDs). We experimentally demonstrated that the PL intensity (I_{PL}) of Si-QDs increased with increasing N^+ -ion dose, because N atoms trapped within Si-QDs terminate the dangling bonds within Si-QDs and at the Si/ SiO_2 interface. Additionally, I_{PL} of Si-QDs showed the maximum value at the optimal N^+ -ion dose of $5 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$, which was 1.4-fold higher than that observed without hot N^+ -ion implantation.

Keywords: group-IV-semiconductor, quantum-dot, Si, SiGe, SiO_2 , photoluminescence, hot-ion implantation

序論

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

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

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

以上のように、2D-Si を含めた低次元 Si 研究は、微細素子実現のための実用的な目的のみならず、

種々の量子的閉じ込め効果の実証という物性研究にとっても非常に重要である。我々は、2D化による間接遷移型から直接遷移型への変調効果による PL (Photoluminescence) 発光及び Raman 分光測定より、大きなフォノン閉じ込め効果及び E_G 増大効果を実験的に実証してきた⁶⁻¹⁴。

この PL 発光を利用した可視域から近紫外までの発光素子を目指すには、更なる半導体の E_G の増大が必須である。そこで、単結晶 Si (c-Si) からアモルファス Si (a-Si) までの基板に C ホットイオン注入法を用いて E_G の大きな SiC ドットを作製し、その大きな PL 発光を実証してきた¹⁵⁻²²。しかし、 E_G の小さい Si 層 ($E_G \approx 1.1\text{eV}$) 中の大きな E_G を持つ SiC ドット ($E_G \geq 2.4\text{eV}$) は量子ドット (QD) ではないため、励起電子の量子閉じ込め効果による寿命増大が期待できず小さく PL 発光効率低下の原因となる。

そこで、 E_G の大きな Si 酸化膜 ($E_G \approx 9\text{eV}$) へのホットイオン注入により注入した原子のクラスター効果によって作製した IV 属半導体の C、SiC、及び Si-QD において、励起電子の閉じ込め効果によって励起電子の拡散を抑制しその寿命の増大化が起こり、PL 発光効率の増大化を実現してきた²³⁻²⁶。しかも、各半導体の E_G の違いにより、紫外から可視域までの PL 発光を実現できた²⁶。

本報告においては、従来の C、SiC、及び Si-QD では実現できなかった近赤外の PL 発光を目指して、より小さな E_G を持つ SiGe-QD をホットダブル Ge⁺/Si⁺ 注入法により実現し、その赤外 PL 特性について報告する²⁷。また、Si-QD への N 原子添加による PL 発光増大効果とその物理機構についても言及する²⁸⁻²⁹。

材料と方法

SiGe-QD 形成法

本研究において、SiGe 半導体の E_G より大きい Si 酸化膜中での SiGe-QD 形成を目指した。

図 1 に SiGe-QD 作製法を示す。Si 基板に形成した熱酸化膜層 (OX) (約 150nm) (図 1(a)) への基板温度 600°C のダブルホット Ge⁺/Si⁺ イオン注入法 (図 1(b)/(c)) により、SiGe-QD の形成を行った²⁷。なお、Ge⁺/Si⁺ の加速エネルギーはそれぞれ 120 及び 60 keV である。Ge⁺ ドーズ量 D_G は 2×10^{15} から $8 \times 10^{15}\text{cm}^{-2}$ の範囲で条件変更を行い、Si⁺ ドーズ量 D_S は $3 \times 10^{16}\text{cm}^{-2}$ である。その後、図 1(d) に示すように、SiGe-QD 形成促進とイオン注入後の結晶性回復のための N₂ アニール (アニール温度 $T_N = 1000^\circ\text{C}$) と、SiGe のダングリングボンド低減化のためのフォーミ

ングガス (ミックス H₂(3%) / N₂ ガス:H₂ アニール)²⁶ を行った。

SiGe-QD の PL 特性は、キセノンランプの 2.3eV 励起光を用いて室温で測定した。

結果及び討論

SiGe-QD の構造解析

図 2 に SRIM (stopping and range of ions in matter) シミュレータ³⁰を用いた Ge ($D_G = 5.3 \times 10^{15}\text{cm}^{-2}$) 及び Si 原子の深さ分布のシミュレーション結果であり、深さ 80nm 付近にそれぞれ 7.4×10^{20} 及び $3.6 \times 10^{21}\text{cm}^{-3}$ のピーク濃度を持ち、その結果 Ge 濃度比 x は約 0.17 であることがわかる。

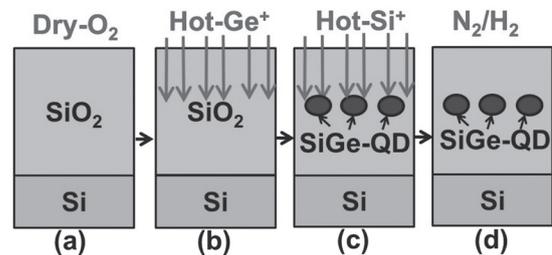


図 1. OX へのダブルホット Ge⁺/Si⁺ イオン注入法を用いた SiGe-QD の製造方法. (a) 熱酸化膜を 150nm 形成後、(b)(c) ダブルホット Ge⁺/Si⁺ イオンを行い SiGe-QD を形成. その後、(d) ポスト N₂ アニール (1000°C) と追加の H₂ アニール (600°C) を行う。

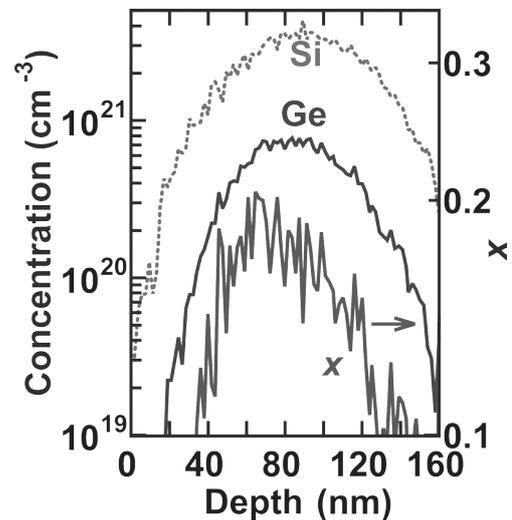


図 2. SRIM による Ge (実線) 及び Si (破線) 深さ濃度分布のシミュレーション結果. $D_S = 3 \times 10^{16}\text{cm}^{-2}$, $D_G = 5.3 \times 10^{15}\text{cm}^{-2}$. 右縦軸は Ge 濃度比 x .

次に、図 3(a) は、SiGe-QD の HAADF-STEM (高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡) 観察結果である。多数ある白色のドットが SiGe-QD である。図 3(b) は図 3(a) の四角内を拡大した CsTEM (球面収差補正走査透過型電子顕微鏡) 像であり、丸内の格子が規則正しく配列した SiGe-QD が観測でき、その直

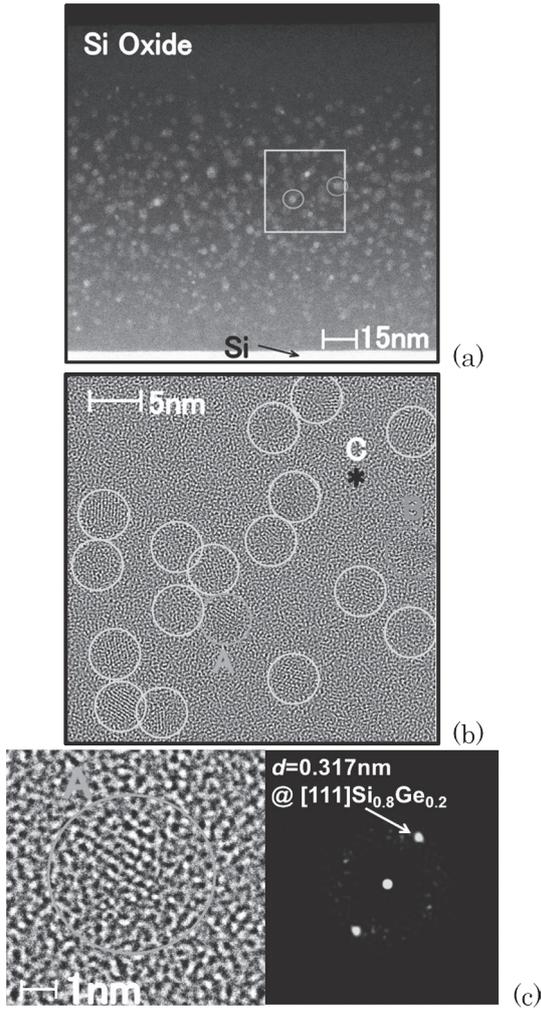


図 3. (a)HAADF-STEM による OX 中 SiGe-QD (白いドット). (b)(a) 図四角内の CsTEM による SiGe-QD (丸内の規則正しい格子配列). (c) 図 (b) の A 領域の SiGe-QD 高解像度 CsTEM 像 (丸内), 及び電子パターン. $D_S = 3 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$, $D_G = 5.3 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$, ホットイオン注入温度 $T = 600^\circ\text{C}$, N_2 アニール時間 $t_N = 210$ 分, H_2 アニール時間 $t_H = 120$ 分.

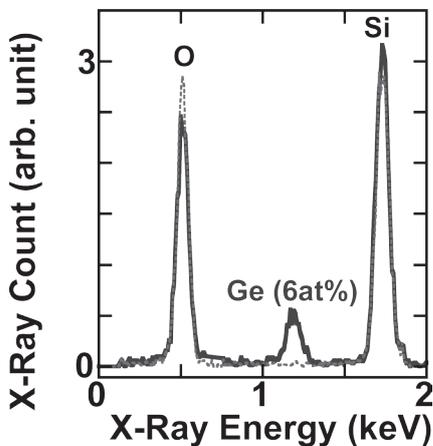


図 4. EDX における X 線スペクトル. 実線は SiGe-QD (図 3(b) の B 領域), 破線は SiO_2 領域 (図 3(b) の C 領域). 0.5, 1.25, 1.75eV のピークは, それぞれ, O, Ge, 及び Si からの X 線強度.

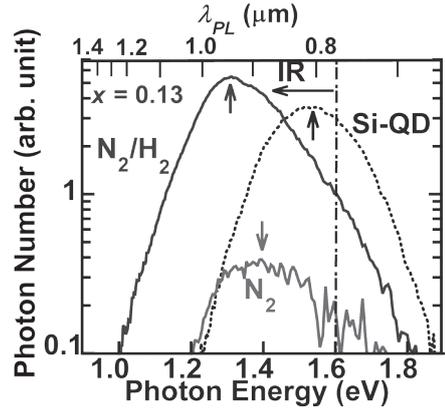


図 5. 追加 H_2 アニール (N_2/H_2) による PL 強度増大効果. $x = 0.13$, $t_N = 210$ 分, $t_H = 90$ 分. 矢印は PL ピークエネルギーを示す. 追加 H_2 アニール無し (N_2) と比較して, PL 強度は約 15 倍に達する. なお, 点線は Si-QD 結果 ($t_N = 150$ 分, $t_H = 90$ 分).

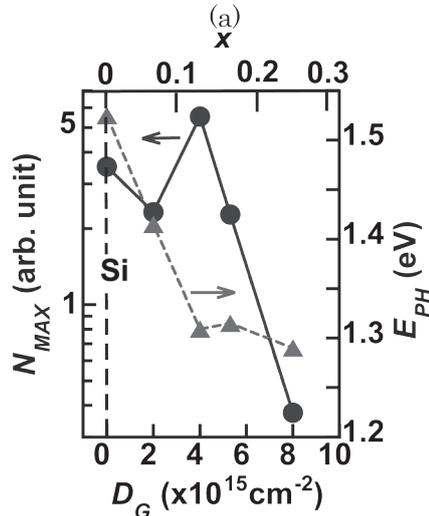
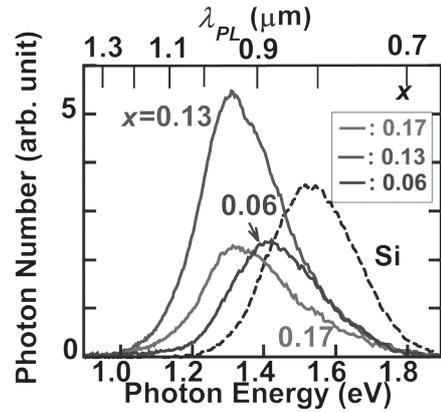


図 6. (a)PL スペクトルの x (D_G) 依存性. (b) N_{MAX} 及び E_{PH} の x (D_G) 依存性. プロセス条件は図 5 と同じ.

径 $\Phi \approx 3.6 \pm 0.9 \text{ nm}$, QD 密度 $2.6 \pm 0.4 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ であることがわかった. 更に, 図 3(c) は, 図 3(b) の A 領域の高解像度 CsTEM 像とその電子線回折パターンであり, 後者の電子線スポットからの格子スペース $d = 0.317 \text{ nm}$ から $\text{Si}_{0.8}\text{Ge}_{0.2}$ であることが判

明し、今回のホットイオン注入法により SiGe-QD 形成が確認できた。

図 4 は、図 3(b) の SiGe-QD の B 地点 (実線) と SiO₂ の C 地点 (破線) における EDX 分析 (エネルギー分散型 X 線分光法) の X 線スペクトルである。SiGe-QD のみに 1.2eV ピークの Ge を検出し、Ge がクラスター化していることが判明した。

SiGe-QD からの PL 発光

図 5 に、H₂ アニール後の SiGe-QD ($x = 0.13$) からの近赤外/可視域の PL スペクトルを示す。追加 H₂ アニール無し (N₂) と比較して、PL 強度は約 15 倍に達し、SiGe-QD においても Si-QD 同様²⁶⁾、H₂ アニールによる PL 強度増大効果が確認できた。また、Si-QD (破線) と比較しても、1.6 倍増大していることも実証できた。更に、SiGe-QD の PL ピークエネルギー E_{PH} (0.95eV) は、予測通り、Si-QD より約 0.15eV 低下し、近赤外領域で PL 発光していることも確認できた。

次に SiGe-QD の PL スペクトルの x 依存性を図 6(a) に示す。PL スペクトルは大きな x 依存性をもつことがわかる。図 6(b) は PL 光子数の最大値 N_{MAX} と E_{PH} の x 依存性を示す。 N_{MAX} を増大化する最適 x が 0.13 であることが判明した。一方、 E_{PH} は、予測通り、 x の増加とともに低下し、 $x = 0$ の約 1.5eV から $x = 0.24$ では約 1.3eV まで約 0.2eV 低下させることが可能である。

図 7 は、SiGe-QD の PL スペクトル成分分離の結果である。PL スペクトルは低い E_{PH} (E_{SG}) の N_{SG} 及び高い E_{PH} (E_S) の N_S の 2 成分に分離可能であることがわかる。 E_S は Si-QD の E_{PH} にほぼ一致していることから、 N_{SG} 及び N_S は、それぞれ SiGe 及び Si 由来の PL スペクトルと考えられる。これは、ダブル Ge⁺/Si⁺ 注入時に、Ge と Si のクラスタの空間分布が完全に一致していないためと思われる。

更に、 N_{SG} 及び N_S のピーク値の x 依存性を図 8(a) に示す。ピーク N_{SG} は、 x の増加とともに増大し $x = 0.13$ で最大値になる。これは x の増加とともに SiGe 形成が増加するためと思われる。しかし、 $x > 0.13$ ではピーク N_{SG} は、 x の増加とともに劣化するのは、Ge 注入ダメージによる SiGe-QD 結晶性の劣化によると考えられる。一方、 N_S のピーク値は、予想通り x の増加とともに低下し、 $x = 0.24$ でほぼ 0 になる。一方、図 8(b) に E_{SG} 及び E_S の x 依存性を示す。 x 増加とともに、 E_{SG} は予想通り低下し 1.3eV 辺りで一定となる。一方 E_S は Si 成分のため x に依存しない。3 次元 SiGe の E_G ; E_G^{SG} は、3 次元 Ge 及び Si のそれぞれの E_G 、 E_G^{Ge} (0.66eV) 及び E_G^{Si} (1.12eV) を用い

て x の関数で次式で表され、 x とともに低下する³¹⁾。

$$E_G^{SG}(x) = (1-x)E_G^{Si} + xE_G^{Ge}. \tag{1}$$

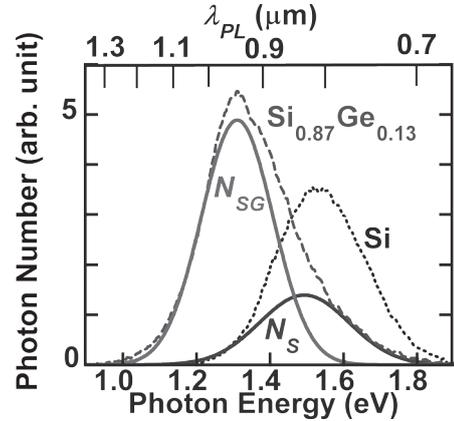


図 7. SiGe-QD の 2 つの PL スペクトル成分 (実線). プロセス条件は図 5 と同じ. N_{SG} 及び N_S はそれぞれ SiGe 及び Si 由来の PL スペクトル. 破線及び点線は SiGe- 及び Si-QD の PL スペクトル実験値.

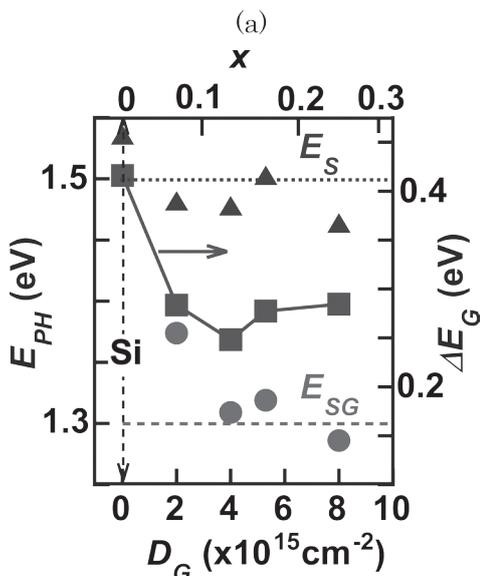
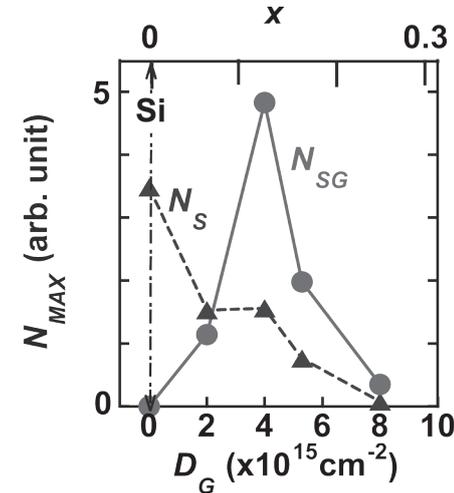


図 8. (a) ピーク N_{SG} (丸印) 及び N_S (三角) の x 依存性. (b) E_{SG} (丸印), E_S (三角), 及びの ΔE_G (四角) の x 依存性. プロセス条件は図 5 に同じ.

また、QDにおいては、電子の量子閉じ込め効果により、その E_G は Φ^{-2} には従い増大する³²⁾。従って、SiGe-QDの E_G 増大効果 ΔE_{SG} は E_{SG} の実験値と式(1)より、次式で与えられる。

$$\Delta E_{SG}(x) = E_{SG}(x) - E_G^{SG}(x). \quad (2)$$

図8(b)における $E_{SG}(0.13) = 1.31\text{eV}$ と式(1)における $E_G^{SG}(0.13) = 1.06\text{eV}$ 、及び式(2)より、SiGe-QDの E_G 増大効果 $\Delta E_G(0.13) = 0.25\text{eV}$ となる。図8(b)の四角が ΔE_G の x 依存性であり、SiGe-QDの ΔE_G (約 0.27eV)は x に依存しないが、Si-QD($x=0$)の $\Delta E_G(0.43\text{eV})$ より小さい。これはSiGe-QDの $\Phi = 3.6\text{nm}$ がSi-QDの $\Phi = 2.4\text{nm}$ ²⁷⁾より大きく、電子の量子閉じ込め効果が小さいためと思われる。以上のように、SiGe-QDにおいても、電子の量子閉じ込め効果による E_G の増大を確認したが、Ge濃度比依存性は無いことも確認できた。

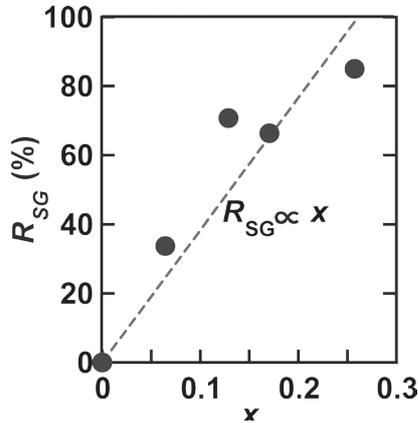


図9. 式(1)の R_{SG} の x 依存性. プロセス条件は図5に同じ.

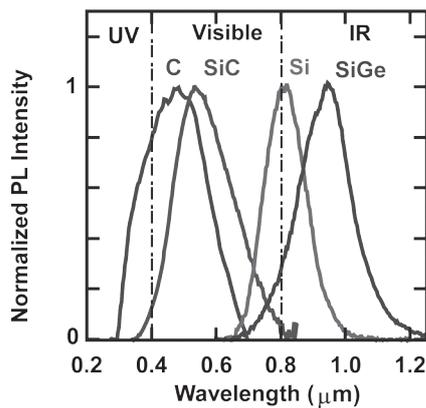


図10. 四三種のIV-QD(C-, SiC-, Si-, 及びSiGe-QD)のPLスペクトル比較.

ここで、PLスペクトルの実験結果 N_{PL} に対する N_{SG} (SiGe成分)比 R_{SG} を次式で定義する。

$$R_{SG}[\%] = \frac{\int N_{SG}(E) dE}{\int N_{PL}(E) dE} \times 100. \quad (3)$$

R_{SG} の x 依存性を図9に示す。予想通り、 R_{SG} は x

とともに増加し、しかも次式のように x に比例することが判明した。

$$R_{SG} \propto x. \quad (4)$$

従って、 $x \geq 0.25$ において R_{SG} はほぼ100%になることがわかる。

以上のように、近赤外発光するSiGe-QDの実証より、従来のIV-QDのPL結果を図10に示す。SiO₂への簡単なホットイオン注入法により形成されたIV-QDにおいて、 E_G の違いによる近紫外から近赤外域までのPL発光が実現できた。

トラップN原子のSi-QDのPL発光への影響

次に、Si-QDへのトラップN原子によるPL強度増大効果について述べる²⁸⁻²⁹⁾。この節でのPL計測の励起は 2.3eV のレーザーを使用した。

ホットイオン注入法によるQD作製には、ポストN₂アニールによってQD結晶性の改善されPL強度の増大が実現できている²⁰⁻²⁹⁾。

図11は、Si-QDにおけるSIMS(二次イオン質量分析法)による注入Si原子濃度(破線)及びN₂アニール後(N₂アニール温度 $T_N = 1000^\circ\text{C}$ 、 $t_N = 150$ 分)のSi-QDでのトラップN原子(実線)濃度の深さ分布ある。一方、Si-QD形成無しの場合のN₂アニール後($T_N = 1000^\circ\text{C}$ 、 $t_N = 150$ 分)のN濃度分布(点線)は、SIMS検出限界以下であった。その結果、実線のN原子はSi-QDにトラップされており、ピーク濃度 $2.5 \times 10^{20} \text{cm}^{-3}$ の高濃度で、Si濃度の約1/10にも達しているのが判明した。

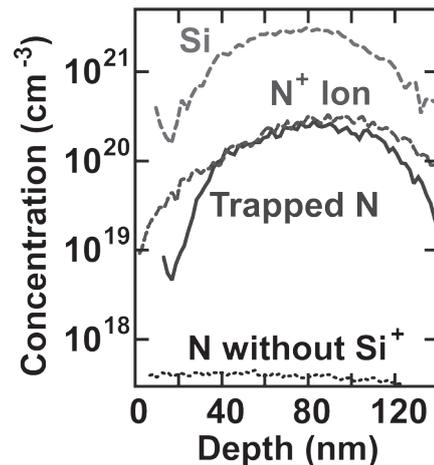


図11. SIMS分析によるSi-QDの注入Si原子濃度(破線)及びN₂アニール後($T_N = 1000^\circ\text{C}$ 、 $t_N = 150$ 分)のトラップN原子(実線)濃度の深さ分布. 点線は、Si-QD形成無しの場合のN₂アニール後($T_N = 1000^\circ\text{C}$ 、 $t_N = 150$ 分)のN濃度分布でSIMS検出限界以下であり、N原子はSi-QDにトラップされているのが判明した。又、N⁺IonはSRIMによるN⁺イオン注入濃度分布(加速エネルギー 29keV 、ドーズ $2.5 \times 10^{15} \text{cm}^{-2}$)のシミュレーション結果。

図 12 は N 原子の Si-QD へのトラップによるダングリングボンド低減化のモデル図である。背景の CsTEM 像より、Si-QD には点欠陥及び Si/SiO₂ 界面でのダングリングボンド ("X" 印) が存在し、そこに N 原子がトラップし (丸印) ダングリングボンドを終端していると考えられる。その結果、励起電子の寿命が延び N₂ アニール後の PL 発光強度が向上すると思われる。

そこで本研究では、新たにホット N⁺ 注入による N 原子の Si-QD へのトラップを試みた。図 11 の N⁺ Ion は SRIM による N⁺ イオン注入濃度分布 (加速エネルギー 29keV、ドーズ 2.5 × 10¹⁵ cm⁻²) のシミュレーション結果であり、ほぼ N₂ アニール後のピーク N 濃度と一致する。

図 13 に、追加ホット N⁺ 注入法による Si-QD 形成法を示す。Si-QD 形成後 (図 13(b)) にホット N⁺ イオン (加速エネルギー 29keV、ドーズ量は表 1) を行い (図 13(c))、ポストアニールは N₂ アニール (1000°C) の代わりに Ar アニール (1000°C) を行った後、さらに H₂ アニール (600°C) を追加した (図 13(d))。表 1 は、今回作製した 3 種類の Si-QD のプロセス条件である。N⁺ イオン注入した QD は [N⁺]、N⁺ イオン注入せず Ar アニールのみの QD を [Ar]、N₂ アニールのみの QD を [N₂] である。N⁺ イオンドーズ量は 5 × 10¹⁵ cm⁻²、その時の基板温度は 800°C である。

図 14 は、H₂ アニール前の PL スペクトルの構造

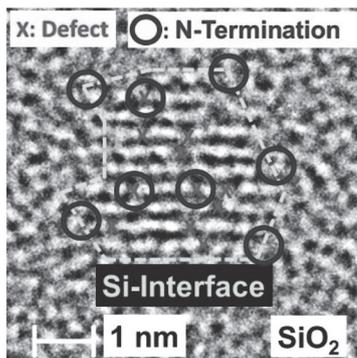


図 12. Si-QD での N 原子トラップモデル。背景は一つの Si-QD の CsTEM 画像。"X" は点欠陥、破線は Si/SiO₂ 界面、丸印は点欠陥及び界面への N 原子トラップの概念。

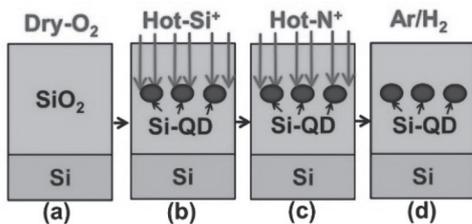


図 13. Si-QD 形成後、OX への追加 N⁺ イオン注入 (c) を用いた Si-QD への N 原子トラップ法。

表 1. 3 つの Si-QD 構造のプロセス条件

構造	N ⁺ (cm ⁻²)	T _{N⁺} (°C)	Ar	N ₂
[N ⁺]	2.5-7.5×10 ¹⁵	800	有	無
[Ar]	0	-	無	有
[N ₂]			有	無

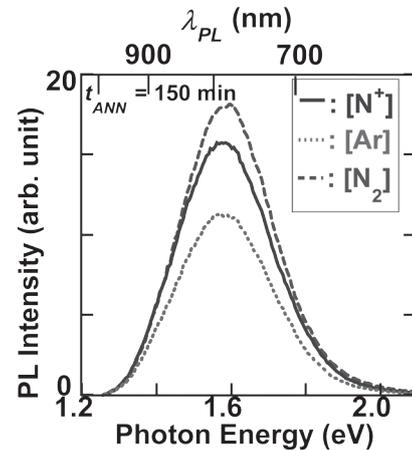


図 14. H₂ アニール前の PL スペクトルの構造依存性。ポストアニール温度及び時間は 1000°C 及び 150 分。

依存性である。ここで、[N⁺] は [Ar] より PL 強度 (約 1.4 倍) が増大し、ホット N⁺ 注入による N 原子の Si-QD へのトラップによる PL 強度増大効果が実証された。しかし、[N₂] の PL 強度より約 13% 低く、ホット N⁺ 注入法の低い N 原子トラップ率が課題であることがわかる。

次に、1000°C、210 分のポストアニール後の追加 H₂ アニール (600°C) による PL 強度のピーク値 I_{MAX} 増大効果の Si-QD 構造依存性を図 15(a) に示す。ポストアニールまでの I_{MAX} は構造依存性を示しているが、追加たった 5 分の H₂ アニールにより、I_{MAX} は約 2.6 倍に増大し、しかも、構造によらず一定値になっている。H₂ アニールによる I_{MAX} 増大効果が顕著である。しかし、ポストアニール無しで H₂ アニールすると、逆に I_{MAX} は劣化することがわかっている²⁹⁾。従って、H₂ アニールによる飛躍的な I_{MAX} 増大効果を実現するには、そのプレアニールが必須であることがわかる。

そこで、ホット Si⁺ 注入直後の Si-QD の PL 強度の増大効果の要因分析を行う。それは次の 3 つの要因が考えられる。1) H 原子 (H-Termination) による Si-QD のダングリングボンド終端、2) N 原子 (N-Termination) による Si-QD のダングリングボンド終端、3) アニール熱履歴による Si-QD 結晶性の向上 (Crystallization)。3) の要因は、[Ar] 構造の Ar アニールによる I_{MAX} 増大から求められる。2) の要因は、[N⁺] 及び [N₂] の I_{MAX} 増大から 3) 要因を差し引いて求められる。1) の要因は、H₂ アニール

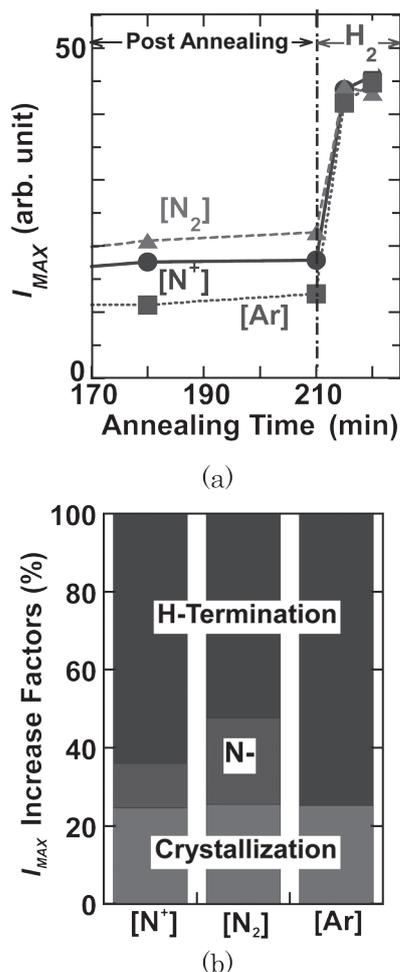


図 15. (a)210 分のポストアニール後の H₂ アニールによる I_{MAX} 増大効果. 丸、四角、三角印は、それぞれ [N⁺], [Ar], 及び [N₂] の結果である. (b)15(a) の結果より求めた I_{MAX} 増大に影響するパラメータ成分の各構造依存性. I_{MAX} 増大は H 原子 (H-Termination) 及び N 原子 (N-Termination) による Si-QD のダングリングボンド終端とアニール熱履歴による Si-QD 結晶性の向上 (Crystallization) の 3 要素.

後の I_{MAX} 増大から 2) と 3) の要因を差し引いて求められる。図 15(b) にその結果の構造依存性を示す。どの構造も H 原子終端効果が 50-75%程度を占め一番大きく (プレアニールが必須)、QD 結晶性回復は 25%程度であり、N 原子終端効果は 10-20%程度であった。

結論

近赤外域 PL 発光を目指した SiGe-QD を、Si 酸化膜中へのダブル Ge⁺/Si⁺ ホットイオン注入法を用いて直径約 3.6 ± 0.9 nm、QD 密度 $2.6 \pm 0.4 \times 10^{12}$ cm⁻² で形成に成功した。ピーク波長 0.95 μm の近赤外域の大きな PL 発光も実現した。PL 発光強度及びピーク波長は Ge 成分比 x に大きく依存し、 $x = 0.13$ に最大 PL 発光強度を達成できた。

一方、Si-QD の PL 強度増大化には N 原子の QD

へのトラップによるダングリングボンド低減化が重要であることが判明した。それには、QD 形成後のポスト高温 N₂ アニール法とホット N⁺ イオン注入法の両方法により達成できた。

謝辞

本研究は、村川洸紀氏 (現、加賀東芝) との共同研究の結果である。また、本研究の一部は、総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202301) を受けた。

文献

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

- Nagata Y, Aoki T, and Sameshima T (2015) Impurity doping effects on impurity band structure modulation in two dimensional n+ and p+ Si layers for future CMOS. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**: 1-6.
- 14) Mizuno T, Suzuki Y, Nagamine Y, Nakahara Y, Nagata Y, Aoki T, and Maeda T (2015) Surface-oxide stress induced band-structure modulation in two-dimensional Si layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **54**: 1-6.
 - 15) Mizuno T, Nagamine Y, Omata Y, Suzuki Y, Urayama W, Aoki T, and Sameshima T (2016) C-atom-induced bandgap modulation in two-dimensional (100) silicon carbon alloys. *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**: 1-8.
 - 16) 水野智久, 前田辰郎, 青木 孝, 鮫島俊之 (2016) 可視域シリコン発光素子の開発. *神奈川大学理学誌* **27**: 15-21.
 - 17) Mizuno T, Omata Y, Nagamine Y, Aoki T, and Sameshima T (2017) Material structure of two-/three-dimensional Si-C layers fabricated by hot-C⁺-ion implantation into Si-on-insulator substrate. *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**: 1-8.
 - 18) Mizuno T, Nakada S, Yamamoto M, Irie S, Omata Y, Aoki T, and Sameshima T (2017) SiC Nano-Dots in Bulk-Si Substrate Fabricated by Hot-C⁺-Ion Implantation Technique, In: Ext. Abstr. Solid State Devices and Materials. 597-598.
 - 19) Mizuno T, Omata Y, Kanazawa R, Iguchi Y, Nakada S, Aoki T, and Sasaki T (2018) Nano-SiC region formation in (100)Si-on-insulator substrate: Optimization of hot-C⁺-ion implantation process to improve photoluminescence intensity. *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**: 1-9.
 - 20) Mizuno T, Kanazawa R, Aoki T, and Sameshima T (2019) SiC nano-dot formation in amorphous-Si and poly-Si substrates using hot-C⁺-ion implantation technique. *Jpn. J. Appl. Phys.* **58**: 1-10.
 - 21) Mizuno T, Yamamoto M, Nakata S, Irie S, Aoki T, and Sameshima T (2019) SiC nano-dot formation in bulk-Si substrate using hot-C⁺-ion implantation process. *Jpn. J. Appl. Phys.* **58**: 1-12.
 - 22) Mizuno T, Aoki T, and Sameshima T (2022) Si surface-orientation dependence of SiC-dot formation in bulk-Si substrate using hot-C⁺-ion implantation technique. *J. Appl. Phys.* **131**: 1-13.
 - 23) Mizuno T, Kanazawa R, Aoki T, and Sameshima T (2020) SiC Quantum Dot Formation in SiO₂ Layer using Double Hot-Si⁺/C⁺-Ion Implantation Technique. *Jpn. J. Appl. Phys.* **59**: 1-12.
 - 24) 水野智久, 鮫島俊之, 青木 孝 (2020) 低次元シリコンカーバイドのSi結晶構造依存性. *神奈川大学理学誌* **31**: 33-39.
 - 25) Mizuno T, Kanazawa R, Yamamoto K, Murakawa K, Yoshimizu K, Tanaka M, Aoki T, and Sameshima T (2021) Group-IV-semiconductor quantum-dots in thermal SiO₂ layer fabricated by hot-ion implantation technique: different wavelength photon emissions. *Jpn. J. Appl. Phys.* **60**: 1-11.
 - 26) Mizuno T, Murakawa K, Yoshimizu K, Aoki T, and Sameshima T (2022) Physical mechanism for photon emissions from group-IV-semiconductor quantum-dots in quartz-glass and thermal-oxide layers. *Jpn. J. Appl. Phys.* **61**: 1-10.
 - 27) Mizuno T, Murakawa K, and Sameshima T (2023) Near infrared photoluminescence of Si_{1-x}Ge_x quantum dots fabricated by double hot Ge⁺/Si⁺ implantation into SiO₂ layer. *J. Appl. Phys.* **133**: 1-9.
 - 28) Murakawa K, Mayama N, and Mizuno T (2022) Influence of High Temperature N₂ Annealing on Photoluminescence of SiC and Si Quantum Dots in SiO₂ Layer, In: Proc. in Proceedings of the International Symposium on Semiconductor Manufacturing (IEEE, Tokyo, 2022), YD-20, 1-4.
 - 29) Mizuno T and Murakawa K (2024) Photoluminescence enhancement from hot nitrogen-ion implanted Si quantum dots embedded within SiO₂ layer. *J. Appl. Phys.* **135**: 1-12.
 - 30) J. F. Ziegler, <http://www.srim.org>
 - 31) Y. Shiraki and N. Usami, Silicon-germanium nanostructures (Woodhead, Cambridge, 2011).
 - 32) Takeoka S, Fujii M, and Hayashi S (2000) Size-dependent photoluminescence from surface-oxidized Si nanocrystals in a weak confinement regime. *Phys. Rev. B.* **61**: 16820-16825.

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

光崩壊性リポソームの単粒子分光分析法の開発

東海林竜也^{1,2,3} 乙黒優那¹ 鈴木健太郎^{1,2} 坪井泰之⁴

Development of Single Particle Analysis of a Light-triggered Molecular Release Process from a Liposome

Tatsuya Shoji^{1,2,3}, Yuna Otoguro¹, Kentaro Suzuki^{1,2} and Yasuyuki Tsuboi⁴

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: t-shoji@kanagawa-u.ac.jp

⁴ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University, Osaka City, Osaka, 558-8585, Japan

Abstract: We studied the rate constant of molecular release from single liposome particles using optical tweezers and fluorescence microspectroscopy. Photoresponsive liposomes were prepared by introducing photoreactive lipids into micrometer-sized liposomes. UV light irradiation caused lipid degradation, leading to deformation of the trapped liposomes. The release process of fluorescence molecules from inside the liposome was successfully traced by fluorescence microspectroscopy. The time constant of the release rate was determined by fitting the time-dependent fluorescence intensity with a first-order exponential decay curve.

Keywords: liposome, lipid, light responsive molecular release, optical tweezers, fluorescence microspectroscopy

序論

リン脂質の二分子膜からなる球形の小胞（ベシクル；vesicle）であるリポソームは、内部に水相を有する。そのため、親水性分子をリポソームの水相に取り込むことができるとともに、疎水性分子は脂質膜の内部に封入することが可能である。このような分子カプセルの機能を備えたリポソームに、熱や pH、光などの外部刺激に応答する分子やナノ物質を導入することで、外部刺激に応じて封入した分子を放出するシステムを作ることができる。封入する分子に薬剤や遺伝子、核酸などを選べば、必要なタイミングに必要な量を必要な場所（例えば患部）に届けるドラッグデリバリーシステム（Drug delivery system; DDS）のナノキャリアとして利用が期待されている。

このような DDS ナノキャリアの性能評価の一つに、外部刺激に応じた内包分子の放出速度が挙げられる。D. Volodkin らは、金ナノ粒子をリポソームに導入することで光を外部刺激とした DDS ナノキャリアを開発した¹⁾。作製したリポソームの粒径はおよそ 800 nm であり、このリポソームの分散水溶液

に近赤外光を照射すると、内包分子を放出することができる。このときの放出過程を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察することに成功している。

このような外部刺激応答性リポソームの分子放出速度は、統計学的平均値で求められてきた。これは吸光分光法や NMR などの機器分析手法を用いているためであり、溶液中に分散するリポソーム単粒子の放出速度を決定することは従来法では容易ではない。放出速度はリポソームの化学組成・粒径・形状などにより変化すると考えられるため、リポソーム粒子一粒毎に放出速度を決定できれば、リポソーム単粒子の物性と関連付けて議論できるようになる。

そこで本研究では、光ピンセット・顕微分光分析法を用いて光応答性リポソームからの分子放出速度を決定する手法を開発する。光ピンセットは光電場の力学作用である光圧を用いた粒子操作法である²⁾。光ピンセットにより光応答性リポソームを捕捉し、光刺激により内包した蛍光分子が放出する過程を顕微蛍光分光法により追跡することで、放出速度の時

定数を決定する。これまでに我々は金ナノ粒子の光熱効果をリポソームの崩壊に利用した金ナノ粒子内包リポソームを調製し、パルスレーザー照射による分子放出過程の顕微蛍光計測に成功した。本研究では、LED 照射による光化学反応によりリポソームの崩壊を促す系を構築し、光捕捉したリポソームからの分子放出速度を決定する手法を確立する。

材料と方法

光応答性リポソームの作製

リン脂質として 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)、1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG) を使用した。コレステロール (Chol) を加え、POPC: POPG: Chol = 4:1:1 のモル比となるように調製した。さらに光応答性分子としてオレイン酸-2-ニトロベンジル (NBO, 図 1)³⁾ を 3 mol% 相当加えて NBO 導入リポソームを作製した。蛍光分子としてローダミン B をリポソームに内包させ捕捉対照試料とした。

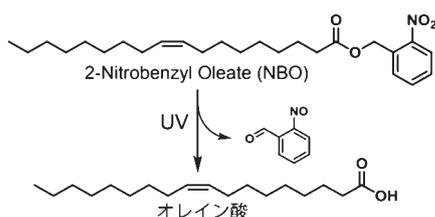


図 1. NBO の光分解反応スキーム [3].

集光レーザー型光ピンセット・顕微蛍光分光システムの構築

光ピンセットの光源として連続発振型の近赤外レーザー光 (波長 1064 nm) を、顕微蛍光分光法として可視レーザー光を倒立顕微鏡に導入した。さらに、リポソームの崩壊を促すための光源としてナノ秒パルスレーザーまたは紫外線 LED 光 (UV 光) を顕微鏡に導入することにより、リポソームの光崩壊による蛍光分子の放出過程を、蛍光強度の経時変化として計測するシステムを構築した。

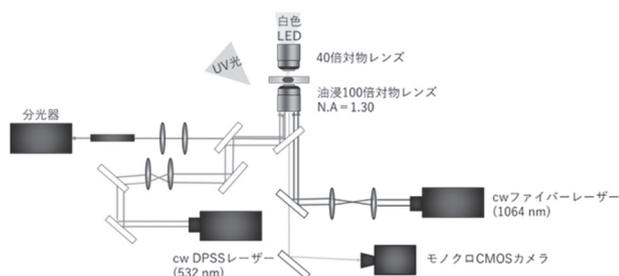


図 2. 光学系概略図.

結果

光反応性リポソームの光捕捉

図 3 に光捕捉したリポソームの顕微鏡像を示す。リポソームの輪郭が明瞭に確認できることから、得られたリポソームは脂質が何層にも重なった構造 (Multilamellar vesicle; MLV) である可能性が高い。光出力 5.0 mW の近赤外レーザー光をリポソームの分散水溶液に集光すると、直径 3.7 μm のリポソーム単粒子をレーザー集光付近で捕捉することに成功した。溶液中のリポソームの数密度やレーザー光出力を調整することで、リポソーム単粒子の光捕捉を 5 分以上安定的に維持することができた。光捕捉したリポソームに照射している近赤外レーザー光や可視レーザー光の出力を増加させても、形状に変化は見られなかったことから、リポソームに導入した NBO が二光子吸収により反応しないことがわかった。

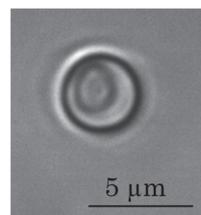


図 3. 光捕捉した光反応性リポソームの光学顕微鏡像.

近赤外レーザー照射により安定的に光捕捉したリポソームに紫外線を照射した際の形態変化を図 4 に示す。LED 光源を顕微鏡ステージ上方から斜め約 45 度の角度に設置し、UV 光が試料溶液全体に照射した。NBO を導入していないリポソームの場合、UV 光を照射しても形状に変化は見られなかった。一方、NBO を内包したリポソームに UV 光を照射すると、球形だったリポソームに歪みが生じるとともに、粒径が徐々に小さくなる現象が観察された。2 分間の UV 光の照射では形態変化したリポソームの光捕捉を維持できたが、それ以上の照射時間になるとリポソームが消失あるいは捕捉から外れることがわかった。そこで本研究では、2 分間の UV 照射により変形するリポソームからの分子放出速度を顕微蛍光分光法により追跡した。

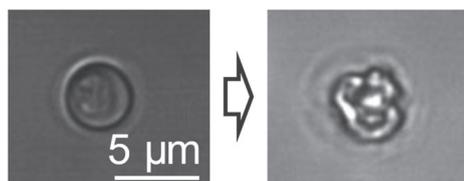


図 4. NBO 導入リポソームの UV 照射過程の顕微鏡像.

蛍光分光法による分子放出過程の追跡

UV 光照射に伴う NBO 導入リポソームの蛍光スペクトル変化を図 5 に示す。UV 光照射前では、リポソームに内包されたローダミン B 由来の蛍光が観測された。UV 照射を開始すると蛍光強度は徐々に減少し、溶液中に残存するローダミン B の蛍光強度と一致した。このような変化は UV 光照射なしでは観測することができず、また NBO を導入していないリポソームでは UV 光照射をしても蛍光強度が減少しなかった。このことから NBO 導入リポソームの蛍光強度の減少は、励起光照射による色素の光退色ではなく NBO の分解反応に伴う色素分子のリポソームの放出過程を反映していると考えられる。

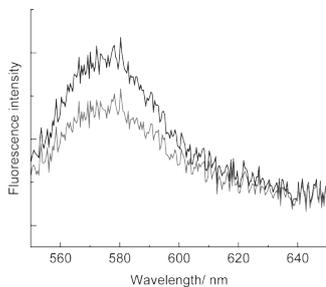


図 5. 顕微蛍光スペクトル；(黒線) UV 照射前, (赤線) UV 照射後.

極大波長における蛍光強度の経時変化を図 6 に示す。このときのリポソームの粒径 (直径) は UV 光照射前で $3.1 \mu\text{m}$ あった。UV 光照射開始時点をも 0 秒とし、縦軸を UV 光照射直前の蛍光強度を 1 とした相対値で表す。NBO を導入していないリポソームは蛍光強度に変化が見られなかったが、NBO を導入すると蛍光強度が徐々に減少した。20 秒経過すると蛍光強度はほぼ一定の値となった。同様の操作を粒径の異なるリポソームでも実施したところ、UV 光照射とともに蛍光強度が減少する結果が得られた。

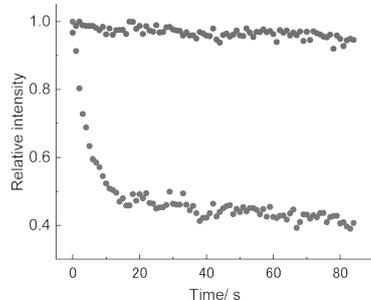


図 6. 蛍光強度の経時変化；(黒) NBO を導入していないリポソーム, (赤) NBO 導入リポソーム.

討論

リポソームの光捕捉メカニズム

光ピンセットによるマイクロメートルサイズの微粒

子捕捉は、ポリスチレンやガラスなどの透明固体微小球、空気中の水滴や水中の油滴をはじめ、生細胞や赤血球などの生体物質、細菌や孢子などの微生物などさまざまな系を対象に研究が進められており、リポソームも例外ではない。これらマイクロ微粒子に作用する光圧は、捕捉対象物と周辺媒質の屈折率差が大きくなるほど強くなる性質がある。そのため脂質二重層が単層のマイクロメートルサイズのリポソーム (giant unilamellar vesicle; GUV) を光捕捉する場合、屈折率差が単分子膜のみで決まるため (リポソームの内相は周辺媒質と同じ水)、高強度のレーザー光が必要となる。実際に先行研究によると、GUV リポソームを光捕捉するには数十 mW オーダーのレーザー光が必要であることがわかっている。それに対し、本研究で調製したリポソームの光捕捉は 5 mW 程度で実現することができた。これは脂質が多層膜で形成されているため GUV よりも大きな屈折率差が生じたことによるものと考えられる。

NBO 導入リポソームの分子放出速度の決定

図 6 の赤線の蛍光強度の経時変化は、NBO の光反応によりリポソームが崩壊したことで、内包されていた蛍光色素分子が放出したことに起因する。崩壊メカニズムは検討中であるが、NBO の光分解反応により得られるオレイン酸がリポソームの膜の表面張力を弱くしたため崩壊したものと考えられる。蛍光強度の経時変化を一次の指数関数減衰曲線 $I(t) = A \exp(-t/\tau)$ で精度良く再現することができ、分子放出速度を一次の反応速度とした時定数 τ [s] を決定することができた。光捕捉した NBO 導入リポソームの時定数を粒径に対してプロットしたものが図 7 になる。

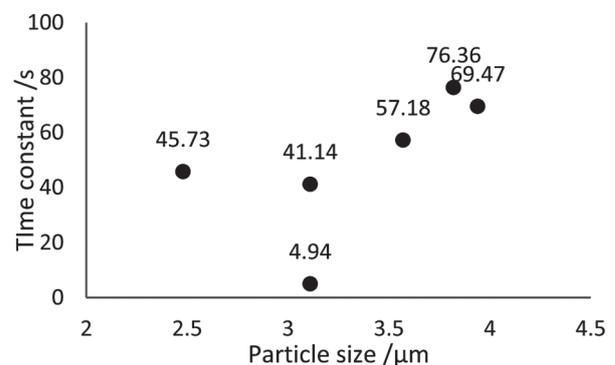


図 7. 時定数の粒径依存性.

本研究では 6 個の NBO 導入リポソーム単粒子に UV 光を照射し、各粒子の時定数を決定することに成功した。図 7 をみると、粒径増加に伴い時定数が増加する傾向が見られた。本手法を用いてより多くのリポソームの時定数を取得することで、分子放出

速度の粒径依存性だけでなく、化学組成依存性、構造依存性などを単粒子レベルで明らかにすることが可能になるだろう。

謝辞

本研究の一部は、2023年度神奈川県総合科学研究共同研究助成（RIIS202302）を受けて実施した。

文献

- 1) Volodkin DV, Skirtach AG and Möhwald H (2009) Near-IR Remote Release from Assemblies of Liposomes and Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**: 1807-1809.
- 2) Ashkin A (1970) Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24**: 156-159.
- 3) Suzuki K and Sugawara T (2016) Phototaxis of Oil Droplets Comprising a Caged Fatty Acid Tightly Linked to Internal Convection. *ChemPhysChem.* **17**: 2300.

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

キラル salen 型 ニッケル (II) 錯体の電解重合による 高分子膜の合成と円偏光二色性

廣津昌和^{1,2,4} 岡西一真¹ 力石紀子^{1,2} 栗村直人³

Synthesis of Polymer Films by Electropolymerization of Chiral Salen-Type Nickel(II) Complexes and Their Circular Dichroism

Masakazu Hirotsu^{1,2,4}, Kazuma Okanishi¹, Noriko Chikaraishi^{1,2}
and Naoto Kuwamura³

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 Division of Liberal Arts, Center for Promotion of Higher Education, Kogakuin University, Tokyo 192-0015, Japan

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

Abstract: Electrochemical properties of two chiral nickel(II) complexes with salen-type Schiff base ligands derived from (1*S*,2*S*)-1,2-diphenylethylenediamine and salicylaldehyde or 2-hydroxyacetophenone were investigated by cyclic voltammetry. Both complexes were electropolymerized on glassy carbon electrodes in the oxidation processes. The methyl groups on the C=N carbon atoms, which affect the orientation of the phenyl groups and N-N chelate ring conformation, accelerated the formation of the electropolymerized films. To investigate the polymer structures, circular dichroism of the polymer films prepared on indium tin oxide (ITO) electrodes was investigated.

Keywords: salen-type nickel complex, chiral Schiff base ligand, cyclic voltammetry, circular dichroism

序論

サリチルアルデヒドとエタン-1,2-ジアミンが 2:1 の比で脱水縮合して生じる Schiff 塩基は salen (H₂salen) と呼ばれ、金属イオンに対して O,N,N,O-四座配位子として作用する。salen 型錯体は置換基やキラリティーの導入に適しているため、分子触媒として広く利用されている^{1,2}。salen 型ニッケル(II)錯体 ([Ni(salen)] および誘導体) を弱いドナー性溶媒中で電解酸化すると重合し、電気活性なフィルムを形成することが報告されている(図 1)^{3,4}。このフィルムはエレクトロクロミック材料、電極材料、不均一触媒としての利用が期待されている⁵⁻¹⁰。

フィルム形成の過程では、フェノール酸素のパラ位で反応が進行し、ラジカルカップリングにより C-C 結合が生成すると考えられている^{11,12}。しかし、その重合機構の詳細は明らかにされておらず、配位

子上の置換基が重合過程やポリマー構造に与える影響も未解明である。それらを明らかにすることは、錯体ポリマーの電解合成法を確立する上で重要である。

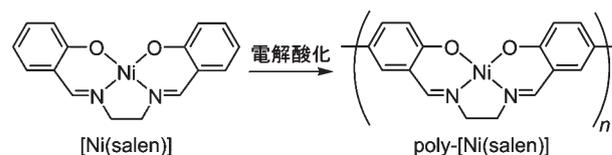


図 1. salen 型ニッケル(II)錯体 ([Ni(salen)]) の電解酸化反応により生じる錯体ポリマー (poly-[Ni(salen)])。

本研究では、salen 型ニッケル錯体の電解酸化重合における置換基の効果を明らかにするために、(1*S*,2*S*)-1,2-ジフェニルエチレンジアミンから誘導され

る2種類の光学活性サレン型ニッケル(II)錯体を用いた(図2)。一つはサリチルアルデヒドとの反応により得られる錯体**1**、もう一つは2-ヒドロキシアセトフェノンとの反応により得られる錯体**2**であり、両者はC=Nの炭素上の置換基が異なる。これらの電解酸化特性をサイクリックボルタンメトリーにより明らかにすると同時に、生成したポリマーフィルムの特徴を円偏光二色性(CD)分光法により調査した。

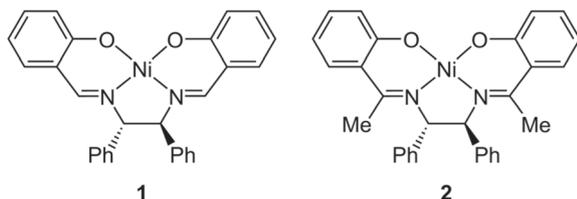


図2. (1*S*,2*S*)-1,2-ジフェニルエチレンジアミンから誘導される光学活性サレン型ニッケル(II)錯体。

材料と方法

実験手法と測定機器

(1*S*,2*S*)-1,2-ジフェニルエチレンジアミンは富士フィルム和光純薬工業株式会社から、2-ヒドロキシアセトフェンは東京化成工業株式会社から、酢酸ニッケル(II)四水和物は関東化学株式会社から購入し、精製することなくそのまま使用した。錯体**1**および錯体**2**は文献の方法を参考に合成し、IRおよび¹H NMR スペクトルにより同定した¹³⁻¹⁶。IR スペクトルは、KBr錠剤法を用いて JASCO FT/IR-4600 分光光度計により測定した。NMR スペクトルは JEOL ECA-400 FT-NMR 分光計により測定した。UV-Vis-NIR 吸収スペクトルは JASCO V-770 分光光度計を用いて測定した。CD スペクトルは JASCO J-820 円二色性分散計を用いて測定した。

電気化学測定

電気化学測定には ALS/DY2325 バイポテンショスタットを用いた。支持電解質として Bu₄NPF₆ (0.1 M, 1 M = 1 mol dm⁻³) を含むジクロロメタン溶液を用いて錯体**1** (5.0 × 10⁻⁴ M) および錯体**2** (5.0 × 10⁻⁴ M) の試料溶液を調製し、測定前に窒素ガスでバブリングして脱酸素した。サイクリックボルタモグラムの測定では作用電極にグラッシーカーボン電極(直径: 3 mm)、対極に白金線、参照電極に Ag/Ag⁺ 電極 (0.01 M AgNO₃) を使用した。測定結果の電位は同じ条件で測定したフェロセンの酸化還元電位 (Fc⁺/Fc) を基準として補正した。

CD 測定用のポリマーフィルムは、サイクリックボルタンメトリーの多重掃引により Indium Tin

Oxide (ITO) 透明電極上に作製した。走査範囲は 0–1.4 V (vs. Ag/Ag⁺) として、走査速度 100 mVs⁻¹ で 30 サイクル掃引した後、ジクロロメタンでリンスした。

結果と討論

ニッケル(II)錯体**1**および**2**の電気化学的性質

サレン型ニッケル(II)錯体のジクロロメタン溶液の電気化学的性質をサイクリックボルタンメトリーにより調査した。グラッシーカーボン電極を作用電極として測定した錯体**1**と錯体**2**のボルタモグラムを図3に、酸化波と還元波の電位を表1に示す。1回目のサイクルでは、いずれの錯体も二段階の酸化過程を示すが、二段階目の酸化は錯体**2**の方が大きく正側に現れており、電流値も大きい。

掃引回数が増えるにつれて電流値の増大が見られ、還元波のピークも明瞭になっている。このことは、多重掃引によって電極表面に錯体ポリマーが生成することを示唆している^{3,4}。二段階目の酸化過程より

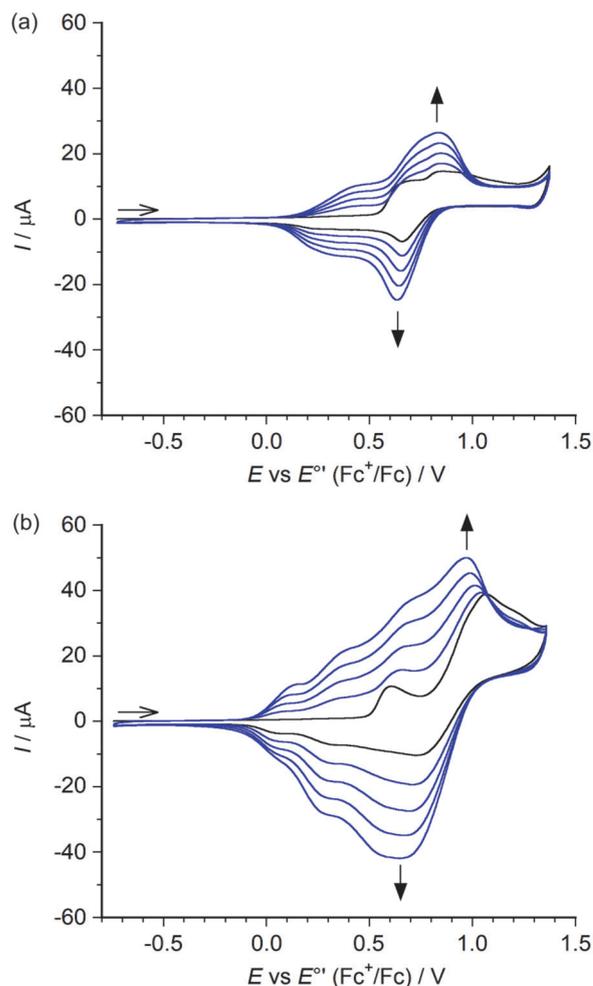


図3. (a) 錯体**1**および(b) 錯体**2**のサイクリックボルタモグラム(溶媒: CH₂Cl₂, 濃度: 5.0 × 10⁻⁴ M, 走査速度: 100 mVs⁻¹, サイクル数: 5回)。

も前に折り返して掃引を繰り返しても電流値の増大は見られなかった。したがって、二段階目の酸化過程が重合反応に必須であると予想される。

表 1. 錯体 **1**, **2** の酸化波と還元波の電位

化合物	サイクル	酸化波 (V)	還元波 (V)
1	1	0.66 ^{sh} , 0.86	0.66
1	5	0.83	0.64
1	50	0.86	0.44
2	1	0.60, 1.07	0.72
2	5	0.97	0.65
2	50	0.88	0.39

多重掃引において電流値が増大する速さを比較すると、錯体 **1** よりも錯体 **2** の方が速いことが分かる。サイクル数を 50 回として多重掃引したボルタモグラムを図 4 に示す。いずれも最終的な酸化波のピーク電位は約 0.9 V、還元波のピーク電位は約 0.4 V となっている (表 1)。ただし、ピーク電流値は錯体 **2** の方が大きい。これらの結果は、錯体 **2** の方が錯体 **1** よ

りも膜形成の速度が大きいことを示している。この要因としては、重合反応に対するメチル基の電子的効果や、吸着に対するフェニル基の影響が考えられる。

次に、50 回多重掃引した後のグラッシーカーボン電極をジクロロメタンでリンスした後、電解質溶液中でサイクリックボルタンメトリー測定を行うことで吸着種の性質を調べた。錯体 **1** から生成した吸着種を **poly-1**、錯体 **2** から生成した吸着種を **poly-2** とする。サイクル数を 50 回として測定したボルタモグラムを図 5 に示す。

また、1 回目と 50 回目のサイクルにおける酸化波と還元波のピーク電位を表 2 に示す。**poly-1**、**poly-2** ともに掃引回数が増えるにつれて電流値の減少が見られる。また、0.4–0.5 V 付近にショルダーとして現れていた酸化波の電流値は次第に減少しており、**poly-1** と **poly-2** の最終的な波形は類似している。これは多重掃引の過程で吸着種の性質が変化するこ

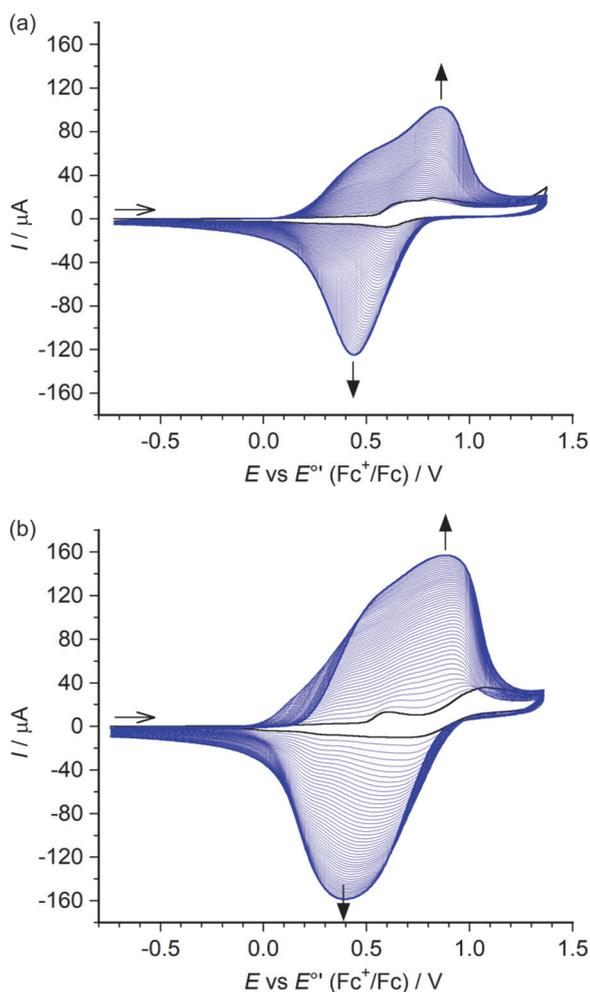


図 4. (a) 錯体 **1** および (b) 錯体 **2** のサイクリックボルタモグラム (溶媒: CH_2Cl_2 , 濃度: 5.0×10^{-4} M, 走査速度: 100 mV s^{-1} , サイクル数: 50 回)。

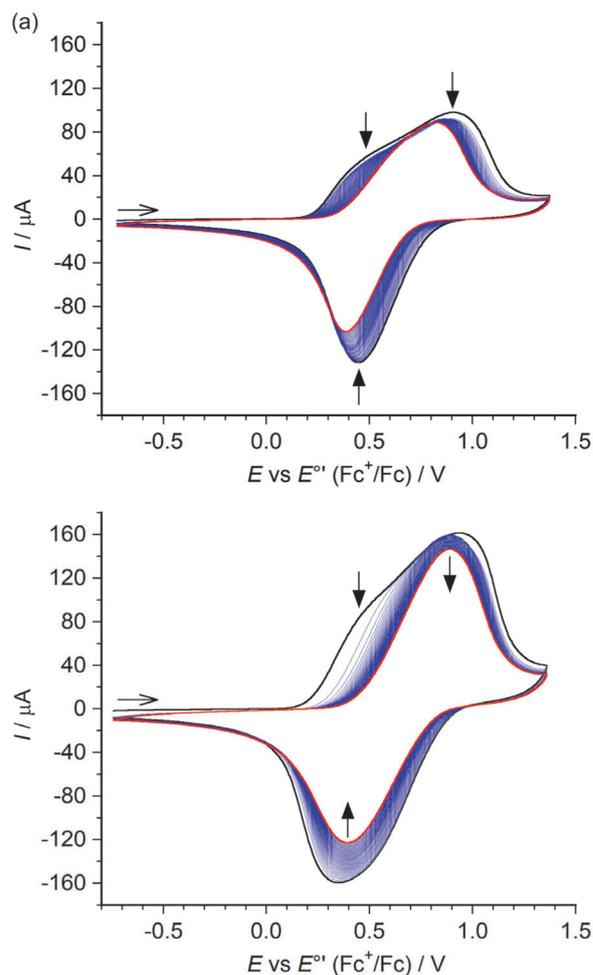


図 5. サイクリックボルタンメトリー (50 サイクル, 図 4) により生成した (a) 錯体 **1** の表面吸着種 **poly-1** および (b) 錯体 **2** の表面吸着種 **poly-2** のサイクリックボルタモグラム (溶媒: CH_2Cl_2 , 走査速度: 100 mVs^{-1} , サイクル数: 50 回)。

とを示している。

表 2. グラッシーカーボン電極上の吸着種の酸化波と還元波の電位

化合物	サイクル	酸化波 (V)	還元波 (V)
poly-1	1	0.91	0.45
poly-1	50	0.82	0.39
poly-2	1	0.94	0.35
poly-2	50	0.89	0.39

ニッケル (II) 錯体 1 および 2 の構造

本研究で使用したニッケル (II) 錯体 1 および 2 は、いずれも結晶構造が決定されている^{14, 16)}。ここでは密度汎関数法 (DFT) により構造最適化を行うことで得られたモデルを用いて説明する (図 6)。

DFT 計算は、6-311G (d,p) を基底関数として、B3LYP 混成汎関数を用いて Gaussian16 プログラムにより行い、いずれも結晶構造に近い構造を得た。錯体 1 と錯体 2 では、N-N キレート環の安定な配座が異なる。錯体 1 では N-N キレート部分の 2 つのフェニル基は錯体平面と同じ方向 (エクアトリアル) に配向しており、キレート環の配座は δ である。これに対し錯体 2 では、2 つのフェニル基は錯体平面に対して垂直 (アキシアル) に配向しており、キレート環の配座は λ である。錯体 2 の λ -配座では、C=N の炭素上のメチル基と N-N キレート部分のフェ

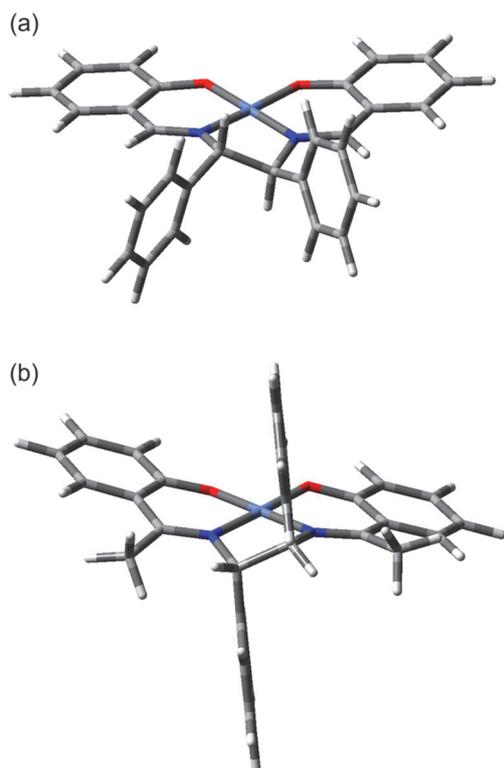


図 6. DFT 計算により最適化した (a) 錯体 1 および (b) 錯体 2 の構造。

ニル基の立体反発を避けることができるため、 δ -配座よりも安定になると考えられる。

サレン型錯体では、N-N キレート環の配座と金属周りの歪みが連動しており、 δ -配座と λ -配座の違いが円偏光二色性 (CD) に反映される¹⁶⁻¹⁸⁾。CD スペクトルに基づいた溶液中の構造は錯体 1, 2 のいずれも λ -配座と推定されており、錯体 1 の結晶構造とは異なる^{16, 17)}。そこで錯体 1 の λ -配座についても DFT 計算による構造最適化を行い、エネルギーを比較したところ、 δ -配座よりも λ -配座の方が安定であることが示唆された。本研究では電気化学測定に使用した溶液を用いて CD スペクトルを測定した (図 7)。560 nm 付近の CD の符号が錯体 1 は負、錯体 2 は正、420 nm 付近は共に負となっており、それぞれ 1 のクロロホルム溶液と 2 のメタノール溶液に対して報告された CD パターンと一致している^{16, 17)}。このことから、支持電解質を含むジクロロメタン溶液中においても、錯体 1 と錯体 2 は λ -配座が安定であると推定した。

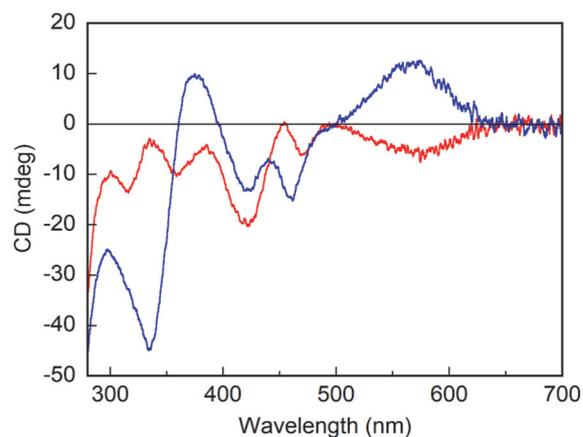


図 7. 電気化学測定に用いた錯体 1 (赤) および錯体 2 (青) のジクロロメタン溶液の CD スペクトル。

高分子膜の作製と CD スペクトル

キラルサレン型ニッケル (II) 錯体の電解酸化重合により生成する高分子膜の分光学的性質を調べるために、ITO 透明電極上にフィルムを作製した。錯体 1 から生成したフィルムを **poly-1'**、錯体 2 から生成したフィルムを **poly-2'** とする。これらはいずれも黄色～褐色であった。**poly-1'** および **poly-2'** の紫外可視近赤外吸収スペクトルを図 8 に示す。両者のスペクトルは類似しており、メチル基の影響は見られない。紫外可視領域の吸収帯は溶液のスペクトルにおいても見られるが、近赤外領域の吸収帯はフィルムに特有のものである。

次に、上記と同一のフィルムを用いて紫外可視領域の CD スペクトルを測定した (図 9)。強度は弱い

ものの、全領域にわたってパターンの違いが見られ、金属周りの構造の違いを反映していることが示唆される。そこで、CD パターンの違いを、モノマーとして用いたニッケル錯体の溶液の CD スペクトル(図 7) と比較した。300–350 nm の CD は、溶液でもフィルムでも比較的大きな差が見られ、400–450 nm には共通して負の CD が現れている。

一方、500 nm より長波長側では、溶液の CD スペクトルにはミラーイメージが見られるが、フィルムの CD スペクトルはいずれも正の符号を示している。後者については、フィルムの吸収スペクトルで見られた近赤外領域の新たな吸収帯が影響している可能性がある。このように、溶液とフィルムの CD スペクトルには類似点と相違点が混在しており、構造情報を得るためには、多量体に特徴的な遷移の帰属が不可欠と考えている。

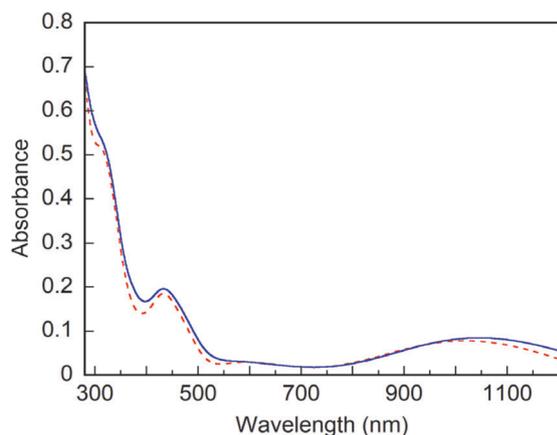


図 8. 錯体 1 および錯体 2 の電解酸化により ITO 電極上に作製した高分子膜 **poly-1'** (赤) および **poly-2'** (青) の吸収スペクトル。

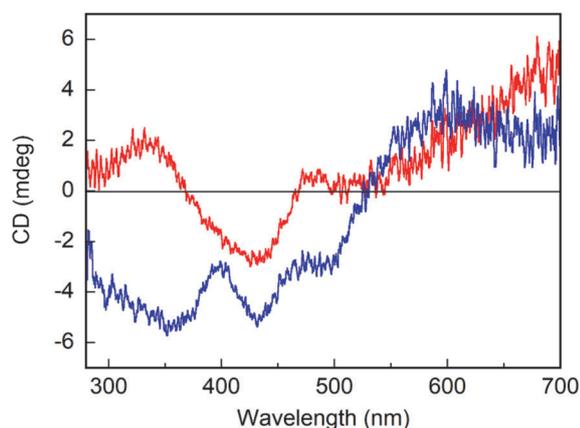


図 9. 錯体 1 および錯体 2 の電解酸化により ITO 電極上に作製した高分子膜 **poly-1'** (赤) および **poly-2'** (青) の CD スペクトル。

結論

(1*S*,2*S*)-1,2-ジフェニルエチレンジアミンから誘導

される 2 種類のキラルサレン型ニッケル(II) 錯体の電解酸化重合により、電極表面上に高分子膜を作製した。C=N の炭素上にメチル基を導入すると、フィルムの生成が促進されることが明らかとなった。電気化学測定に使用した溶液と ITO 電極上に作製したフィルムの CD スペクトルから、そのメチル基は溶液のみならずポリマーフィルムにおいても金属周りの構造に影響を与えていることが示された。しかしフィルムの CD から N-N キレート部分の配座を推定することは困難であった。フィルムを形成するポリマーの構造を議論するには、今後、二量体や三量体を合成して CD スペクトルを調査する必要がある。

謝辞

本研究の一部は、研究課題「シッフ塩基ニッケル錯体の電解酸化反応における結合形成機構の解明」に対する 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202303)、一部は JSPS 科研費 JP23K04895 の支援を受けて行われました。深く感謝いたします。

文献

- 1) Canali L and Sherrington DC (1999) Utilisation of homogeneous and supported chiral metal(salen) complexes in asymmetric catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **28**: 85-93.
- 2) Shaw S and White JD (2019) Asymmetric Catalysis Using Chiral Salen-Metal Complexes: Recent Advances. *Chem. Rev.* **119**: 9381-9426.
- 3) Vilas-Boas M, Freire C, Castro B de, Christensen PA and Hillman AR (1997) New Insights into the Structure and Properties of Electroactive Polymer Films Derived from [Ni(salen)]. *Inorg. Chem.* **36**: 4919-4929.
- 4) Vilas-Boas M, Freire C, Castro B de and Hillman AR (1998) Electrochemical Characterization of a Novel Salen-Type Modified Electrode. *J. Phys. Chem. B* **102**: 8533-8540.
- 5) Łepicka K, Pieta P, Shkurenko A, Borowicz P, Majewska M, Rosenkranz M, Avdoshenko S, Popov AA and Kutner W (2017) Spectroelectrochemical Approaches to Mechanistic Aspects of Charge Transport in meso-Nickel(II) Schiff Base Electrochromic Polymer. *J. Phys. Chem. C* **121**: 16710-16720.
- 6) Nunes M, Araújo M, Fonseca J, Moura C, Hillman R and Freire C (2016) High-Performance Electrochromic Devices Based on Poly[Ni(salen)]-Type Polymer Films. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**: 14231-14243.
- 7) Banasz R and Wałęsa-Chorab M (2019) Polymeric complexes of transition metal ions as electrochromic materials: Synthesis and properties. *Coord. Chem. Rev.* **389**: 1-18.
- 8) O' Meara C, Karushev MP, Polozhentceva IA, Dharmasena S, Cho H, Yurkovich BJ, Kogan S

- and Kim J-H (2019) Nickel – Salen-Type Polymer as Conducting Agent and Binder for Carbon-Free Cathodes in Lithium-Ion Batteries. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**: 525-533.
- 9) Tomczyk D, Bukowski W, Bester K, Urbaniak P, Seliger P, Andrijewski G and Skrzypek S (2017) The mechanism of electropolymerization of nickel(II) salen type complexes. *New J. Chem.* **41**: 2112-2123.
 - 10) Mierzejewska M, Łepicka K, Kalecki J, Lisowski W and Sharma PS (2022) Ni(OH)₂-Type Nanoparticles Derived from Ni Salen Polymers: Structural Design toward Functional Materials for Improved Electrocatalytic Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **14**: 33768-33786.
 - 11) Tomczyk D, Bukowski W, Bester K, Urbaniak P, Seliger P, Andrijewski G and Skrzypek S (2017) The mechanism of electropolymerization of nickel(II) salen type complexes. *New J. Chem.* **41**: 2112-2123.
 - 12) Yankin AN, Lukyanov DA, Beletskii EV, Bakulina OY, Vlasov PS and Levin OV (2019) Aryl-Aryl Coupling of Salicylic Aldehydes through Oxidative CH-activation in Nickel Salen Derivatives. *ChemistrySelect* **4**: 8886-8890.
 - 13) Zhang W, Loebach JL, Wilson SR and Jacobsen EN (1990) Enantioselective Epoxidation of Unfunctionalized Olefins Catalyzed by Salen Manganese Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 2801-2803.
 - 14) Ding S (2013) Crystal structure of (N,N'-bis(salicylidene)-(1S,2S)-1,2-diphenyl-1,2-ethanediaminato)-nickel(II) hemihydrate, C₁₁₂H₉₃N₈Ni₄O₁₂. *Z. Kristallogr. NCS* **228**: 53-54.
 - 15) Hoshina G, Tsuchimoto M and Ohba S (2000) [N,N'-Bis(salicylidene)-1,2-diphenyl-(RS,SR)-1,2-ethanediaminato]-nickel(II). *Acta Cryst.* **C56**: e122.
 - 16) Wang F, Zhang H, Li L, Hao H-Q, Wanga X-Y and Chen J-G (2006) Synthesis and characterization of chiral nickel(II) Schiff base complexes and their CD spectra-absolute configuration correlations. *Tetrahedron: Asymmetry* **17**: 2059-2063.
 - 17) Pasini A, Gullotti M and Ugo R (1977) Optically Active Complexes of Schiff Bases. Part 4. An Analysis of the Circular-dichroism Spectra of some Complexes of Different Co-ordination Numbers with Quadridentate Schiff Bases of Optically Active Diamines. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 346-356.
 - 18) Hirotsu M, Kojima M, Nakajima K, Kashino S and Yoshikawa Y (1996) Stereochemistry and Electrochemistry of Cobalt(II) and Cobalt(III) Complexes Containing Optically Active Tetradentate Schiff Base Ligands. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **69**: 2549-2557.

■原 著■

両生類アフリカツメガエル幼生の正中鰭のサイズと形状は 環境水中のマグネシウム濃度に影響される

胡 継楠^{1,3} 豊泉龍児^{1,2}

Magnesium ion concentration in environmental water is effective for the
size and shape of *Xenopus* larval median fin

Jinan Hu^{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: kokeinan@gmail.com

Abstract: The median fin is a membranous structure that develops on both the dorsal and ventral sides along the midline in amphibian larvae and teleost fry for swimming. In anuran (frogs and toads) and urodelan (newts, axolotl, and salamanders) tailbud embryos, the median fin starts to expand along the midline. Importantly, the shape and size of the developing median fin are highly species-specific and stage-dependent, reminiscent of the fine tuning of genetic control to realize the species-specific morphology of the median fin. Here, we hypothesized that ionic composition of environmental water of the larval habitat is essential for adaptation and optimization of the developing fin morphology. Therefore, in the present study, using amphibian model organism *Xenopus laevis* embryos, by depleting the magnesium ions from culture saline, we reared *Xenopus* late-stage tailbud embryos for several days until the early larval stage, and morphometric analysis was performed to assess several parameters regarding global fin morphology and its individual epidermal cells. Magnesium-free treatment induced shortening of the early larval axial structure, and the effects on the ventral fin and its epidermal cells were significant. Based on these results, we discuss the possible mechanism that affects the fin morphology via sensing of the environmental magnesium concentration.

Keywords: *fin morphogenesis, epidermis, morphometry, tadpole larva, Xenopus laevis*

序論

正中鰭は魚類の仔魚やその他の水棲動物の幼生の体から突出した膜状の構造物で、背腹両面において頭尾軸の正中に沿って伸びている。両生類幼生においては、正中鰭は主たる遊泳器官として機能し、体の駆動、バランスや舵の役割を果たす¹⁾。正中鰭の形成は主に尾芽胚期から始まり、その形やサイズは種ごと、発生段階ごとに一定である。無尾目両生類のアフリカツメガエルの正中鰭の場合には、尾芽胚の段階で発達を始め、変態が始まるまで成長し、その後後退を始める。

無尾目両生類の正中鰭の構造は比較的単純で、竜骨のような構造に隆起した平らな表皮細胞で構成さ

れていて、二枚の表皮に挟まれた基部側の間隙は間葉細胞と細胞外マトリックスからなる。細胞は細胞外マトリックスに囲まれ、これによって骨格的な支持を提供する。鰭の外周側の周縁部は表皮2枚が融合して単層の上皮構造を形成する²⁾。その表皮は多繊毛細胞や粘液細胞など多くの細胞タイプで構成される。正中鰭に関連する重要な構造は尾芽である。尾芽は成長する尾の先端に位置する細胞の集まりであり、神経板の二つの領域と後方中胚葉領域の間の相互作用によってその形成が開始され、lunatic fringe と Notch を発現する背側領域と、Notch リガンド Delta を発現する腹側領域との相互作用に依存

して尾芽は形成される^{3,5)}。

両生類の胚発生において、尾芽と正中鰭の相互作用は、適切な幼生の形態形成において不可欠である。尾芽の発生と正中鰭の形成は胚発生の初期段階から同時に起こり、その相互連携が鰭の適切な形成とサイズ制御に重要な役割を果たす⁶⁾。アフリカツメガエル幼生の正中鰭は概ね背側膜鰭(以下、背鰭)と腹側膜鰭(以下、腹鰭)に区分され、それぞれの由来は異なる。背鰭の間充織はその直下にある神経堤細胞と背側体節細胞に由来し、これらによって誘導される。腹鰭の間充織は、主に中胚葉由来とされるが、一部は神経堤細胞にも由来するとされてきた^{6,7)}。一方、トランスジェニック個体を用いた最近の研究により、アフリカツメガエル幼生の尾芽領域における鰭の間充織は、神経堤ではなく完全に中胚葉から由来することが報告されている⁸⁾。正中鰭は尾芽から分化する細胞によって形成されるため、尾芽の発達は正中鰭の形成に直接影響を及ぼす。

尾芽の再生に関しては様々な研究があるにもかかわらず、正中鰭のサイズを制御する遺伝子カスケードや細胞挙動は完全には解明されていない。筆者らは、ツメガエルの初期発生には、環境水に溶け込んだ一定濃度の様々なイオンが必要な筈であると考えた。環境は常に変化しており、生物はそれに適応する必要がある。筆者らは、水棲動物にとってマグネシウム不足は水環境に由来する発生拘束要因の一つとなり得るであろうから、オタマジャクシがマグネシウム不足の環境変化にどのように適応しようとするかを理解することは、ヒトの発達医学にも役立つ知見をもたらすと考えた。本研究は、ヒトの低マグネシウム血症の病態解明の基礎医学的モデルを確立する第一歩として、マグネシウムイオン欠乏がツメガエル幼生の正中鰭のサイズや形状に及ぼす影響を調べ、鰭の形成を制御するメカニズムの一端を解明することを目指した。

材料と方法

実験材料

主な実験動物として野生型のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の胚と幼生を用いた。

方法

1. 人工授精

適齢のツメガエル成体の1ペアを用意し、三日間絶食させて採卵に用いた。オスに400 unit、メスに600 unitの性腺刺激ホルモン gonadotropin を注射し、一晩放置して翌日に卵を得た。メルカプト酢酸ナトリウムで卵ゼリー層を除去して、神経胚に達した段

階で実験群と対照群を設けた。

2. Mg²⁺-free の 10% Steinberg 氏液での飼養

Mg²⁺-free の Steinberg 氏液と通常の Steinberg 氏液を調製して10倍希釈して飼育液とした。実験群は Mg²⁺-free の 10% Steinberg 氏液で2回洗浄し、6穴プレートの各 well に満たした Mg²⁺-free の 10% Steinberg 氏液中で飼養した。対照群は通常の 10% Steinberg 氏液中で飼養した。両群はイオン濃度を維持するため、毎日水替えをして、16°Cの恒温器中で飼養した。

3. ファロイジン染色

st. 43 に達したところで幼生の外形と筋節の拡大写真を撮って、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定した幼生を PBST (PBS-Tween20) で5分間1回洗って、200 nM の Acti-stain™ 670 Phalloidin で1時間染色した。その後、1×PBS で5分間2回洗浄し、正中鰭細胞を共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss 製 LSM730) で光波長 680 nm で観察した。

4. 免疫組織化学染色

筋節を観察しやすくするために MF20 抗体を用いた間接法により、筋節を緑の蛍光に染めた。

st. 43 に達した幼生を4%パラホルムアルデヒドで固定して組織や細胞の形態を保持した。その後、一次抗体としてサルコメア構造の myosin heavy chain を認識するマウスモノクローナル抗体である MF20 を反応させた。一晩反応させて洗浄後、蛍光標識付きの anti-mouse IgG 二次抗体を追加し、再度一晩反応させて、洗浄した。最後に、筋節を共焦点レーザー顕微鏡で光波長 520 nm で観察した。

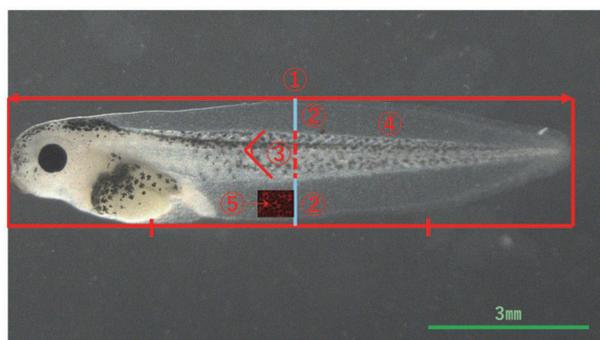


図1. ツメガエル幼生とその鰭の形態データの測定と検定。Image J で以下の①～⑤の数値を測定、計算した。①ツメガエル幼生の体長。②背鰭と腹鰭の高さ(水色の縦棒部分)。③「く」の字型の筋節のなす角。④左側面から見た外形の全体写真における鰭が占有する面積の割合。⑤鰭表皮細胞の面積を、鰭表皮細胞境界のファロイジン染色をもとに測定。測定データは、t-検定を用いて実験群と対照群の①～⑤の有意差の有無を検定した。

5. 鰭面積データの定量的解析

オープンソースの画像解析ソフトウェアである Image J でツメガエル幼生の体長、背鰭と腹鰭の高さ、「く」の字型の筋節のなす角、左側面から見た外形の全体写真における鰭が占有する面積の割合、鰭表皮細胞の面積を計測して、これらのパラメータについて、t 検定を用いて実験群と対照群の有意差の有無を算出した (図 1)。

結果と考察

st.43 に達したツメガエル幼生は一定の運動能力を持っているが、 Mg^{2+} -free の Steinberg 氏液で飼養したオタマジャクシは対照群より運動能力が弱くなって、あまり遊泳しなかった。最初に、 Mg^{2+} -free 状態下での生存率を調査した。対照群の生存率は 1 日目で 56/60 (93%)、4 日目で 48/60 (80%)、6 日目で 41/60 (68%) であった。一方、 Mg^{2+} -free 処理した実験群の生存率は 1 日目で 56/60 (93%)、4 日目で 54/60 (90%)、6 日目で 26/60 (43%) であった。4 日目

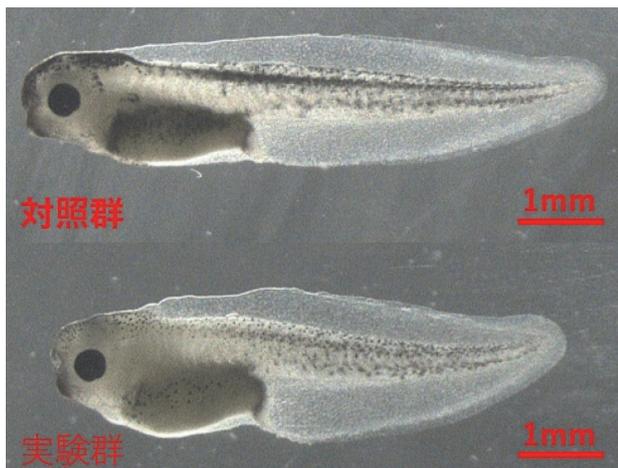


図 2. 後期尾芽胚期から Mg^{2+} -free の人工淡水 (10% Steinberg 氏液) で飼養した実験群 (下段) と同腹対照群 (上段) の左側面図。実験群では短躯となり、特に正中鰭の腹側の鰭の丈が高くなる現象が認められた。Scale bars, 1 mm.

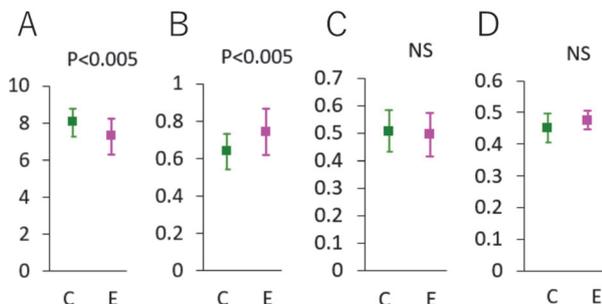


図 3. Mg^{2+} -free 人工淡水で飼育した実験群 (E) と同腹対照群 (C) の体長 (A, 縦軸の単位 mm), 腹鰭の高さ (B, 単位 mm), 背鰭の高さ (C, 単位 mm), 側面から見た総面積における鰭面積 (D, 背側鰭+腹側鰭) の割合。NS, 有意差なし (P > 0.1)。

までの実験群の生存率は対照群と較べて遜色はなく、体内に蓄積した Mg^{2+} イオンで生存が担保されたと考えられる。光学顕微鏡で観察した結果、実験群では色素細胞が減少し、実験群の体色は、体全体が対照群より白くなった。

側面から見ると、実験群の体は対照群よりより太く短い形状であった (図 2)。また、尾芽は実験群の方が比較的広がった。腹鰭では、対照群では滑らかな曲線をしていていたが、実験群の肛門の部分は凹んだ波状をしていた。撮影した写真をもとに Image J でツメガエル幼生の体長 (図 3A)、腹鰭の高さ (図 3B)、背鰭の高さ (図 3C)、側面から見た鰭の占有面積の割合 (図 3D)、個々の鰭表皮細胞の面積 (図 4) を測定して、データを有意水準 1% の t 検定で有意差を計算した。その結果、実験群の体長は対照群の体長より有意に短かった (実験群 7.25 ± 0.96 mm, 対照群 8.01 ± 0.76 mm; $P < 0.005$, それぞれ $n=60$, 図 3A)。実験群の背鰭の高さと個々の背鰭表皮細胞面積は対照群のそれらに対して有意差がなかったが、腹鰭では有意差があり、対照群より丈が高かった (実験群 0.74 ± 0.12 mm, 対照群 0.64 ± 0.09 mm; $P < 0.005$, 図 2、図 3B と図 4, それぞれ $n = 60$)。個々の腹鰭表皮細胞面積は対照群のそれより大きかった (実験群 $549.6 \pm 163.1(\mu m)^2$, 対照群 $292.2 \pm 96.2(\mu m)^2$; $n =$ それぞれ 100, $P < 0.005$, 図 4)。しかし、側面積に占める鰭の占有面積の割合には有意差がなかった (図 3D, $P > 0.1$)。

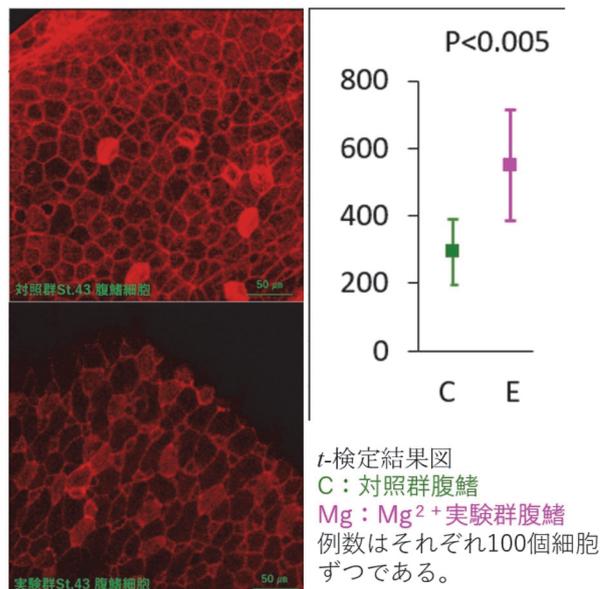


図 4. 後期尾芽胚期から Mg^{2+} -free の人工淡水 (10% Steinberg 氏液) で飼養した実験群の腹鰭細胞 (下段) と同腹対照群の腹鰭細胞 (上段) を、それぞれ蛍光標識 phalloidin で染色した染色像。焦点面は正中鰭の表皮に合っている。グラフの縦軸の単位は、 $(\mu m)^2$ 。Scale bars, 50 μm 。

更に、筋節の角度にも大きな差があり（それぞれ $n=20$ ）、実験群（平均値 102.3° ）の方が対照群（平均値 69.5° ）のそれより角度が開いていた（図5）。他に、実験群には様々な畸形が出た。一部のオタマジャクシの腹部には水泡が生じた。その中の腸管も正常に発生できず奇形になった。一部のオタマジャクシの鰭には欠陥や白濁した組織が出てきた。st. 43 前の実験群と対照群の死亡率は同程度に低かったが、st.43 を過ぎると、実験群の死亡率が急に上昇した。

以上の結果から、 Mg^{2+} -free 中で発生したツメガエル幼生では総じて短軀化という現象が起こったことがわかった。それが何に起因するのか、現時点のデータからは判断できない。以下に本研究の Mg^{2+} -free 処理の結果として引き起こされた鰭形態の著しい変化について、その原因について考察する。

ツメガエルの神経管の閉鎖について、TRPM チャネル (melastatin-related transient receptor potential channels) のファミリーに属する TRPM6, TRPM7 が関与することが報告されている。これらの分子は後期神経胚の radial intercalation (TRP6 が担当), mediolateral intercalation (TRP7 が担当) に関与しており、異所的な Mg^{2+} -ion transporter SLC41A2 の発現で神経管閉鎖不全から救済される^{9,10}。これに関連して、TRPM6 のホモ接合ノックアウトマウスは、高マグネシウム食で生存率が改善することも報告されている¹¹。ツメガエル原腸胚では、Wnt シグナルの非古典経路と TRPM7 とが協奏して、原腸形成時の収斂伸長運動 (convergent extension movement) を GTPase の Rac 依存的に制御していることが報告されており、そこに Mg^{2+} イオンが関与することが示唆されている¹⁰。筆者らは、腹側化因子 BMP-2, 4 (bone morphogenetic protein-2,4) によって誘導され、原腸胚や神経胚の初期中胚葉の腹側・後方マーカー遺伝子として知られ、尾芽の伸長や神経のパターニングに関与することが報告されている *Xhox3* の発現が環境水中の Mg^{2+} -free に影響され、正しく前後軸に延長できない可能性も考えている¹²⁻¹⁴。そして、核マトリックスの laminin をコードする *lmbn1* 突然変異を持つオタマジャクシの尾は、野生型と比較して統計的に有意に短く、狭いことが報告されている¹⁵。従って、 Mg^{2+} イオンが適切な濃度範囲に収まることで *lmbn1* に依存する（ツメガエル幼生の鰭の細胞核に特徴的な）核の多分岐と適切な尾の形成と機能に必要なかもしれない。また、ツメガエルの原腸胚において、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor) とその受容体の PDGFA /PDGFR α シグナル伝達が阻害されると、中胚葉細胞の方向性が喪失され、中軸伸長の減少が引き起こされる^{16,17}。 Mg^{2+} -

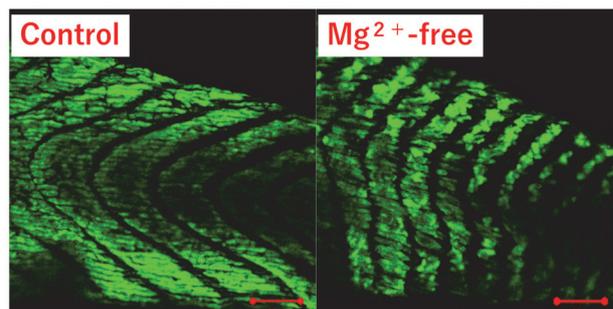


図5. 神経胚期から Mg^{2+} -free の人工淡水（10% Steinberg 氏液）で飼養した実験群（右図）と同腹対照群（左図）の左側面の筋節。横紋筋を認識する MF20 モノクローナル抗体を1次抗体とする、免疫染色の間接法で可視化した。実験群の筋節は、「く」の字型の筋節のなす角が開いていた。頭尾軸に平行な筋繊維群は多くの領域で形成されていて、一部の領域では崩れていた。Scale bars, 100 μ m.

free 処理によって、PDGF シグナルも影響を受けているのかもしれない。ツメガエルの尾芽の伸長、鰭および色素細胞の発達には Notch シグナルが必要と報告されている⁹。本実験で観察された色素の消失と短軀化は、Notch シグナルが阻害された現象に対応している可能性もある。

総じて、マグネシウム不足は細胞活性、および組織形成に必要なシグナル伝達経路に重大な影響を及ぼし、これが最終的に発達過程における短軀化へと繋がることを示された。マグネシウム不足の影響が背鰭よりも腹鰭に大きく出たのは序論で述べた両者の細胞系譜の違いに起因する可能性がある。腹鰭の形状の変化は表皮細胞の面積の増大に起因すると思われる（図2, 図3B, 図4）。低 Mg^{2+} イオン濃度の状況下では、鰭以外に様々な組織が影響を受けて正常に発生できなかった。特に腸管と筋節に大きな影響を与え、運動能力と死亡率に影響が出ることが分かった。

現在のデータを統合的に考えると、 Mg^{2+} 不足の環境で発生した幼生は頭尾軸方向に伸長する力が弱くなって、背腹軸方向に伸長する力が強くなることで強く示唆された。尾芽胚の伸長は脊索の伸長によって駆動される¹⁸⁻²¹。今後は脊索の伸長力に Mg^{2+} 濃度が影響するのかを検定したい。また、 Mg^{2+} -free 処理途中で通常の Steinberg 氏液に戻すと発生がどうなるかを試みる。更に、硬骨魚類、特に真骨魚類の仔魚の膜鰭の発生に、環境水中のマグネシウム濃度が影響するかについても検討したい。

謝辞

本研究を遂行する上で、示唆的な御助言を頂きました。豊泉研究室の加藤泰裕さん、中野潮李さん、金海香さん、吉本茉歩さんに感謝します。ツメガエル胚・幼生の wholemount 免疫染色の技法を教えてください。

いただきました、横浜市立大学の内山英穂教授、小林剛氏に感謝いたします。私たちの研究をご支援して頂きました総合理学研究所所長川本達也教授ならびに所員各位に感謝いたします。

文献

- 1) Nieuwkoop PD and Faber J (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. Elsevier Science Publishing Co. pp. 1-258.
- 2) Tucker AS and Slack JMW (2004) Independent induction and formation of the dorsal and ventral fins in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **230**(3): 461-467. doi: 10.1002/dvdy.20071
- 3) Tucker AS and Slack JM (1995) Tail bud determination in the vertebrate embryo. *Curr. Biol.* **5**(7):807-13. doi:10.1016/s0960-9822(95)00158-
- 4) Beck CW and Slack JM (1998) Analysis of the developing *Xenopus* tail bud reveals separate phases of gene expression during determination and outgrowth. *Mech. Dev.* **72**(1-2): 41-52. doi: 10.1016/s0925-4773(98)00015-x.
- 5) Beck CW and Slack JM (2002) Notch is required for outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Int. J. Dev. Biol.* **46**(2): 255-258. doi: 10.1387/ijdb.011489.
- 6) Garriock RJ and Krieg PA (2007) Wnt11-R signaling regulates a calcium sensitive EMT event essential for dorsal fin development of *Xenopus*. *Dev. Biol.* **304**(1): 127-140. doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.020.
- 7) Garriock RJ, Warkman AS, Meadows SM, D'Agostino S, Krieg PA (2007) Census of vertebrate Wnt genes: Isolation and developmental expression of *Xenopus* Wnt2, Wnt3, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, and Wnt16. *Dev. Dynam.* **236**: 1249-1258.
- 8) Taniguchi Y, Kurth T, Medeiros D et al. (2015) Mesodermal origin of median fin mesenchyme and tail muscle in amphibian larvae. *Sci. Rep.* **5**: 11428.
- 9) Runnels LW and Komiya Y (2020) TRPM6 and TRPM7: Novel players in cell intercalation during vertebrate embryonic development. *Dev. Dyn.* **249**(8): 912-923. doi:10.1002/dvdy.182.
- 10) Komiya Y, Su LT, Chen HC, Habas R and Runnels LW (2014) Magnesium and embryonic development. *Magnes. Res.* **27**(1): 1-8. doi: 10.1684/mrh.2014.0356.
- 11) Walder RY, Yang B, Stokes JB, et al. (2009) Mice defective in Trpm6 show embryonic mortality and neural tube defects. *Human Mol. Genet.* **18**(22): 4367-4375. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp392>.
- 12) Ruiz i Altaba A (1990) Neural expression of the *Xenopus* homeobox gene Xhox3: evidence for a patterning neural signal that spreads through the ectoderm. *Development* **108**(4): 595-604. doi: 10.1242/dev.108.4.595.
- 13) Larkin K and Danilchik MV (1999) Ventral cell rearrangements contribute to anterior-posterior axis lengthening between neurula and tailbud stages in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **216**(2): 550-560. doi:10.1006/dbio.1999.9495.
- 14) Beck CW and Slack JM (1999) A developmental pathway controlling outgrowth of the *Xenopus* tail bud. *Development* **126**(8): 1611-1620. doi: 10.1242/dev.126.8.1611.
- 15) Arbach HE, Harland-Dunaway M, Chang JK and Wills AE (2018) Extreme nuclear branching in healthy epidermal cells of the *Xenopus* tail fin. *J. Cell Sci.* **131**(18): jcs217513. doi: 10.1242/jcs.217513.
- 16) Nagel M, Tahinci E, Symes K and Winklbauer R (2004) Guidance of mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula requires PDGF signaling. *Development* **131**(11): 2727-2736. doi: 10.1242/dev.01141.
- 17) Nagel M and Winklbauer R (2023) Polarized contact behavior in directionally migrating *Xenopus* gastrula mesendoderm. *Int. J. Dev. Biol.* **67**(3): 79-90. doi: 10.1387/ijdb.230123rw.
- 18) Weliky M, Minsuk S, Keller R and Oster G (1991) Notochord morphogenesis in *Xenopus laevis*: simulation of cell behavior underlying tissue convergence and extension. *Development* **113**(4):1231-1244. doi: 10.1242/dev.113.4.1231.
- 19) Goto T and Keller R (2002) The planar cell polarity gene strabismus regulates convergence and extension and neural fold closure in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **247**(1):165-181. doi: 10.1006/dbio.2002.0673.
- 20) Ezin AM, Skoglund P and Keller R (2003) The midline (notochord and notoplate) patterns the cell motility underlying convergence and extension of the *Xenopus* neural plate. *Dev. Biol.* **256**(1):100-114. doi: 10.1016/s0012-1606(02)00130-6.
- 21) Goto T and Keller R (2021) Preparation of three-notochord explants for imaging analysis of the cell movements of convergent extension during early *Xenopus* morphogenesis. *Dev. Growth. Differ.* **63**(8):429-438. doi: 10.1111/dgd.12748.

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

扁形動物の微小管結合蛋白質の同定

ミンイゴウ¹ 越智拓海^{1,2} 小谷 享^{1,2,3}

Identification of microtubule-binding proteins in flatworms

Yihao Min¹, Takumi Oti^{1,2} and Susumu Kotani^{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: kotani-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Microtubule-associated proteins (MAPs) interact with microtubules and regulate cell division, cell morphogenesis, cell motility, spindle formation, and intracellular transport. Mammalian MAPs, MAP2, MAP4, and tau, have a repeat of the assembly-promoting (AP) sequence at the center of their microtubule-associating sites that bind directly to microtubules. Recently, genetic analysis revealed that molecules with repeating AP sequences exist throughout the animal kingdom, but it remains unclear whether these molecules function as MAPs. The purpose of this study was to identify primitive MAP molecules and examine species of the universality of their function in the animal kingdom using a primitive bilateria, the flatworm. First, protein expression vectors were created based on *Stylochoplana pusilla* MAPs (SpMAP_4R and SpMAP_5R) cDNA that differs in the number of AP sequence repeats. Next, we cloned the MAP-like gene of *Dugesia ryukyuensis*, which belongs to the same phylum of flatworms as *Stylochoplana pusilla*. Finally, the protein structures were compared based on the predicted amino acid sequences of SpMAPs and *Dugesia* MAPs. We found that the tail site of MAPs, which is present in *Dugesia* MAP-like protein and mammalian MAPs, is absent in SpMAPs. It has been reported that the tail site of MAPs is involved in microtubule polymerization and stability, but the details are unknown. Future studies of the functions MAPs in *Stylochoplana pusilla* and *Dugesia* might clarify the effect of the presence or absence of the tail site on microtubule polymerization.

Keywords: microtubule-associated proteins (MAPs), assembly-promoting (AP) Sequence, tail, flatworm

序論

微小管は真核生物の細胞骨格の一種であり、細胞分裂、細胞内輸送、細胞の複雑な形態の維持などの重要な細胞機能の発現に関わる。これらの機能を発現するためには、微小管が様々な微小管結合タンパク質 (MAPs) と相互作用する必要がある。中でも、微小管の形成や微小管の束化、他の細胞骨格との架橋など、微小管の基本構造に関わる哺乳類 MAPs として MAP2/MAP4/Tau スーパーファミリーが知られる。MAP2、MAP4、Tau はいずれも N 末端側に突起部位 (Projection domain)、C 末端側に微小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもち、微

小管結合部位はプロリンに富む Pro-rich 領域、繰り返し領域、尾部 tail に分けられる (図 1)¹⁾。繰り返し領域には、微小管結合活性をもつ 18 アミノ酸残基の基本構造 “Assembly-Promoting (AP) 配列” が複数個あり、選択的スプライシングにより AP 配列の繰り返し数に違いが生じる。哺乳類の MAP2 (AP 配列の繰り返し数; 3 個)、MAP4 (5 個)、Tau (4 個) の間では AP 配列の相同性が高く、分子進化の過程で、1 個の AP 配列をもつ祖先分子が重複した結果、繰り返しをもつ始原 MAP 分子が誕生し、その後、複数の分子に分岐したと考えられる¹⁾。哺乳

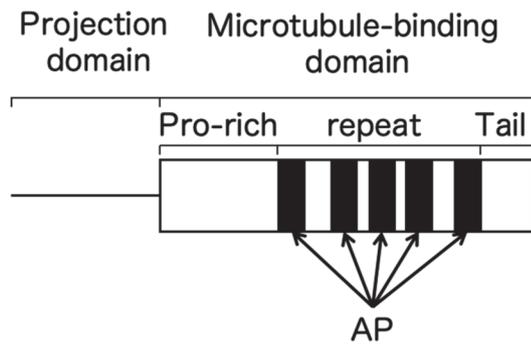


図1. microtubule-associated protein (MAP) の基本構造。N 末端側に突起部位 (Projection domain), C 末端側に微小管結合部位 (Microtubule-binding domain) をもつ。Microtubule-binding domain はプロリンに富む (Pro-rich) 領域, 微小管結合活性を持つ assembly-promoting 配列の繰り返し (repeat) 領域, 尾部 (tail) 領域に分けられる。

類 MAP4 の AP 配列のアミノ酸配列情報を元にした相同性検索により、AP 配列に類似した領域をもち、哺乳類 MAPs と類似する MAPs 遺伝子が硬骨魚類ゼブラフィッシュや両生類アフリカツメガエル、軟体動物ジャンボアメフラシ、線形動物の線虫など様々な生物種に存在することを明らかにしてきた¹⁾。新口動物、旧口動物で共通して AP 配列をもつ分子が存在したことから、MAPs の祖先分子は新口動物、旧口動物に分岐する前に出現し、その基本的な分子構造と機能が進化的に保存されている可能性は高い。

我々はこれまでに、新口動物、旧口動物の分岐点近くに位置する最も原始的な左右相称動物で、中枢化された神経 (原型脳) をもつ扁形動物カイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) を用いて AP 配列を含む MAP-like 遺伝子 (SpMAP) を同定している²⁾。SpMAPs は AP 配列の数が異なる 2 種が同定され、

SpMAP_4R は SpMAP_5R の 4 番目の AP 配列がない構造をとっていた²⁾。扁形動物は最も原始的な左右相称動物であることから、扁形動物の MAPs が左右相称動物における始原 MAPs である可能性が高い。しかし、SpMAPs の AP 配列の繰り返し数の違いが機能にどのような影響を与えるのかはわかっていない。また、SpMAPs を含む動物界 MAPs ファミリーの分子系統樹解析では無脊椎動物の MAPs が 2 つのクレードルに分かれるなど、同定した SpMAP の妥当性には不明な点が残っている。そこで、カイヤドリヒラムシと同じ扁形動物門に属し、より飼育・繁殖が容易で、系統が確立されているリュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) から AP 配列をもつ分子をクローニングし、左右相称動物における始原 MAP を同定し、SpMAPs とリュウキュウナミウズムシ MAP-like 蛋白質の機能を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

実験動物とサンプリング

神奈川県足柄郡真鶴町および神奈川県三浦郡葉山町芝崎海岸で採取したカイヤドリヒラムシ (*Stylochoplana pusilla*) からクローニングした SpMAPs のクローニングベクターを用いて実験を行った。また、慶應義塾大学 松本 緑 准教授から分与いただいたリュウキュウナミウズムシ (*Dugesia ryukyuensis*) を用いた。

SpMAP 蛋白質発現ベクターの作製

先行研究²⁾で作製した SpMAP_4R と SpMAP_5R の cDNA を制限酵素認識配列を付加するプライマー

プライマー配列		AP配列	
RNAseq	ATGGAAACCGTTGTGACCAGCGTATCCGATCTG	33	
SpMAP_4R	GAAGGAGATATAGTACCATGGAAACCGTTGTGACCAGCGTATCCGATCTG	50	
SpMAP_5R	GAAGGAGATATAGTACCATGGAAACCGTTGTGACCAGCGTATCCGATCTG	50	
RNAseq	GAAATCTGTGACCGTCCGTCGACAACCTCAACTGAGAACAGCGTCGACGG	83	
SpMAP_4R	GAAATCTGTGACCGTCCGTCGACAACCTCAACTGAGAACAGCGTCGACGG	100	
SpMAP_5R	GAAATCTGTGACCGTCCGTCGACAACCTCAACTGAGAACAGCGTCGACGG	100	
RNAseq	ATCGACGGGTCAACGCAAGTCGCATTCCTGTTATGGCAAGTCGATTTCCGA	133	
SpMAP_4R	ATCGACGGGTCAACGCAAGTCGCATTCCTGTTATGGCAAGTCGATTTCCGA	150	
SpMAP_5R	ATCGACGGGTCAACGCAAGTCGCATTCCTGTTATGGCAAGTCGATTTCCGA	150	
RNAseq	AGCTGAAACCTCTTGGACACCCGGTATCGCTGGGCGGCCCTGCCTCGATG	183	
SpMAP_4R	AGCTGAAACCTCTTGGACACCCGGTATCGCTGGGCGGCCCTGCCTCGATG	200	
SpMAP_5R	AGCTGAAACCTCTTGGACACCCGGTATCGCTGGGCGGCCCTGCCTCGATG	200	
RNAseq	GGTTCAGCTCACACGGCTCGCTTGCCTCCGACGATATGCCCGTGTTCGG	233	
SpMAP_4R	GGTTCAGCTCACACGGCTCGCTTGCCTCCGACGATATGCCCGTGTTCGG	250	
SpMAP_5R	GGTTCAGCTCACACGGCTCGCTTGCCTCCGACGATATGCCCGTGTTCGG	250	
RNAseq	ACGTCCAACCTCTCTGGACTACCGCGACAACCTCCGACTCCTCCTCGTACG	283	
SpMAP_4R	ACGTCCAACCTCTCTGGACTACCGCGACAACCTCCGACTCCTCCTCGTACG	300	
SpMAP_5R	ACGTCCAACCTCTCTGGACTACCGCGACAACCTCCGACTCCTCCTCGTACG	300	
RNAseq	CTACCTCCAACGGACGACGACACCACTCTCGCCAACGTCGTCAGGAGCT	333	
SpMAP_4R	CTACCTCCAACGGACGACGACACCACTCTCGCCAACGTCGTCAGGAGCT	350	
SpMAP_5R	CTACCTCCAACGGACGACGACACCACTCTCGCCAACGTCGTCAGGAGCT	350	
RNAseq	TCTGGACCGGGGCTCCGATTCGAATCGAAAGTGAATCTTTCTCGCAACTT	383	
SpMAP_4R	TCTGGACCGGGGCTCCGATTCGAATCGAAAGTGAATCTTTCTCGCAACTT	400	
SpMAP_5R	TCTGGACCGGGGCTCCGATTCGAATCGAAAGTGAATCTTTCTCGCAACTT	400	
RNAseq	CAATCACTCGCCGGTGGAGGCAAGGTGAAAGTGTATCACAGAAGATCG	433	
SpMAP_4R	CAATCACTCGCCGGTGGAGGCAAGGTGAAAGTGTATCACAGAAGATCG	450	
SpMAP_5R	CAATCACTCGCCGGTGGAGGCAAGGTGAAAGTGTATCACAGAAGATCG	450	
RNAseq	ACGTGAAAGATGTGTCCAGCAAGTGTGGATCTCGAAAAAACCTCAAACAT	483	
SpMAP_4R	ACGTGAAAGATGTGTCCAGCAAGTGTGGATCTCGAAAAAACCTCAAACAT	500	
SpMAP_5R	ACGTGAAAGATGTGTCCAGCAAGTGTGGATCTCGAAAAAACCTCAAACAT	500	
RNAseq	CAAGCTGGCGGTGGCAACGTTCAAATTTTCGACGACAAACCAAAATTTAA	533	
SpMAP_4R	CAAGCTGGCGGTGGCAACGTTCAAATTTTCGACGACAAACCAAAATTTAA	550	
SpMAP_5R	CAAGCTGGCGGTGGCAACGTTCAAATTTTCGACGACAAACCAAAATTTAA	550	
RNAseq	GGAGACCCTCTCTCGAAGATGGATCATGGAAGAATACGAACACGCTGG	583	
SpMAP_4R	GGAGACCCTCTCTCGAAGATGGATCATGGAAGAATACGAACACGCTGG	600	
SpMAP_5R	GGAGACCCTCTCTCGAAGATGGATCATGGAAGAATACGAACACGCTGG	600	
RNAseq	CTGGTGGCGGCGATGTTAAGATAGAAACACAAAACTAAATTTGGGAA	633	
SpMAP_4R	CTGGTGGCGGCGATGTTAAGATAGAAACACAAAACTAAATTTGGGAA	650	
SpMAP_5R	CTGGTGGCGGCGATGTTAAGATAGAAACACAAAACTAAATTTGGGAA	650	
RNAseq	GGATCACGTTGTGGCTCTTGGCAAAATGTTAAACACAAAGCTGGCGGTGG	683	
SpMAP_4R	GGATCACGTTGTGGCTCTTGGCAAAATGTTAAACACAAAGCTGGCGGTGG	700	
SpMAP_5R	GGATCACGTTGTGGCTCTTGGCAAAATGTTAAACACAAAGCTGGCGGTGG	700	
RNAseq	TGATCTGAAGATAGAAACACTACAGTTGAATTTGGGATCTGGATCTCGTG	733	
SpMAP_4R	TGATCTGAAGATAGAAACACTACAGTTGAATTTGGGATCTGGATCTCGTG	750	
SpMAP_5R	TGATCTGAAGATAGAAACACTACAGTTGAATTTGGGATCTGGATCTCGTG	750	
RNAseq	TGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGCGCGGTGGTCTCGAGCAC	777	
SpMAP_4R	TGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGCGCGGTGGTCTCGAGCAC	800	
SpMAP_5R	TGGCTCTTGGCAAAATATAAAACACAAGCCAGCGCGGTGGTCTCGAGCAC	810	
SpMAP_4R	CACCACCACCCACCTGAGATCCGGCTGCT	740	
SpMAP_5R	CACCACCACCCACCTGAGATCCGGCTGCT	830	

図2. SpMAPs 蛋白質発現ベクターの設計。上段：カイヤドリヒラムシのトランスクリプトームデータ。中段：SpMAP_4R。下段：SpMAP_5R。開始コドンの前に Nco1、終始コドンの位置に Xho1 酵素認識部位が付加されるようにプライマーを設計した。

(Forward; 5' - GTACCATGGAAACCGTTGTGAC -3' , Reverse; 5' - GACCTCGAGACCACCGCCTGG -3' , 産物サイズ; SpMAP_4R 687bp, SpMAP_5R 777bp) を用いて PCR 法で増幅した。その際、開始コドンに合わせて NcoI の制限酵素認識配列を加え、終止コドンの直前に XhoI の認識配列を加え、開始コドンから終止コドンの直前までを切り出せるように設計した (図 2)。pET21d (+) の His タグを使用するために終止コドンを削除した。PCR 産物をゲルから切り出し、pET21d (+) (Takara bio, Tokyo, Japan) と共に制限酵素 NcoI, XhoI (Takara bio, Tokyo, Japan) で消化し、DNA リガーゼ (DNA Ligation kit Takara bio, Tokyo, Japan) で繋ぐことで、SpMAP の下流にヒスチジン (His) タグを付加した。組み換えたプラスミドを DH5 α コンピテントセル (Takara bio, Tokyo, Japan) にトランスフォーメーションし、濃度 100mg/ml の Amp が 20 μ l 塗った LB プレートに 18 時間培養した。得られたコロニーを LB 液体培地に植え継ぎ、18 時間培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Strassel, Germany) を用いてプラスミドを抽出した。得られたプラスミド DNA を制限酵素 (NcoI, XhoI) で消化し、電気泳動により確認した。このプラスミド DNA のシーケンスを行い、塩基配列を確認した後、identity X (ver. 14.3.3, <https://home.hiroshima-u.ac.jp/kei/IdentityX/index.html>) を使ってアミノ酸配列を予測した。

リュウキュウナミウズムシ *Dugesia ryukyuensis* MAP (DrMAP) 遺伝子の探索

リュウキュウナミウズムシのトランスクリプトー

ムデータから、他の動物の MAP ファミリー遺伝子配列と相同性を持つものを BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて探索し、DrMAP 候補遺伝子とした。

DrMAP 遺伝子のクローニング

先行研究に従って遺伝子クローニングを行った³⁾。具体的には次のように行った。カイヤドリヒラムシの total RNA を NucleoSpin RNA Kit (Takara bio) を用いて抽出した。Total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて測定した。この Total RNA から Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) を用いて、最終濃度 10 ng/ μ L になるように一本鎖 cDNA を合成した。Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (Takara bio) と SpMAP 遺伝子に特異的なプライマー (Forward; 5' -GAAACGTATGTGAGGAACAG-3' , Reverse; 5' -TTAATTCGACCGGTGCTGC-3' , 産物サイズ; DrMAP 1209 bp) を用いて PCR を行った。PCR を行ったサンプルは 2% アガロースゲルで泳動し、Ez-Capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。泳動後、目的のバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nihon Genetics, Tokyo, Japan) を用いて、アガロースゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA を p-GEM-T Easy Vector System (Promega, WI, USA) を用いて p-GEM-T Easy Vector に組み込んだ。このベクターを *E. coli* DH5 α Competent Cells (Takara bio) のプロトコルに従い、*E. coli* DH5 α に組み込んだ。目的インサートをもつベクターが組み込まれた *E. coli* DH5 α を LB 培地で培養し、増幅した大腸菌から FastGene

RNAseq	METVVTSVSDLE ICDRRSTTSTENSVDGSGTQRSR I PVMASR I PK	45
SpMAP_4R	RRYSTMETVVTSVSDLEVCDDRRSTTSTENSVDGSGTQRSR I PVMASR I PK	50
SpMAP_5R	RRYSTMETVVTSVSDLE ICDRRSTTSTENSVDGSGTQRSR I PVMASR I PK	50
RNAseq	LKPLGPPVSLGGPASMGSSSHGSLASDDMPVFGFRPTSLDYRDNSDSSSYA	95
SpMAP_4R	LKPLGPPVSLGGPASMGSSSHGSLASDDMPVFGFRPTSLDYRDNSDSSSYA	100
SpMAP_5R	LKPLGPPVSLGGPASMGSSSHGSLASDDMPVFGFRPTSLDYRDNSDSSSYA	100
	AP配列	
RNAseq	TSNGRTTPLSPTSSGASGPRAP IQSKVKSF SNFNHSPGGG KVKVYHKK ID	145
SpMAP_4R	TSNGRTTPLSPTSSGASGPRAP IQSKVKSF SNFNHSPGGG KVKVYHKK ID	150
SpMAP_5R	TSNGRTTPLSPTSSGASGPRAP IQSKVKSF SNFNHSPGGG KVKVYHKK ID	150
	AP配列	
RNAseq	VKD VSSKCGSRKNLKHQAGGG NVQ I FDDKPKFKET ASSK I GSLKNTKHVA	195
SpMAP_4R	VKD VSSKCGSRKNLKHQAGGG NVQ I FDDKPKFKET ASSK I GSLKNTKHVA	200
SpMAP_5R	VKD VSSKCGSRKNLKHQAGGG NVQ I FDDKPKFKET ASSK I GSLKNTKHVA	200
	AP配列	
RNAseq	GGGDVK I ETQKLNWE VGSRVGSWQNVKHKAGGG DLK I ETLQLNWD TGSRV	245
SpMAP_4R	GGGDVK I ETx-----XQLNWD TGSRV	221
SpMAP_5R	GGGDVK I ETQKLNWE VGSRVGSWQNVKHKAGGG DLK I ETLQLNWD TGSRV	250
	AP配列 Hisタグ 終始コドン	
RNAseq	GSWQN I KHKPGGG * DPAA	259
SpMAP_4R	GSWQN I KHKPGGGLE HHHHHH DPAA	247
SpMAP_5R	GSWQN I KHKPGGGLE HHHHHH DPAA	276

図 3. 作製した SpMAPs 蛋白質発現ベクター。上段：カイヤドリヒラムシのトランスクリプトームデータ。中段：SpMAP_4R。下段：SpMAP_5R。終始コドンの前にヒスチジン (His) タグが 6 個付加される。

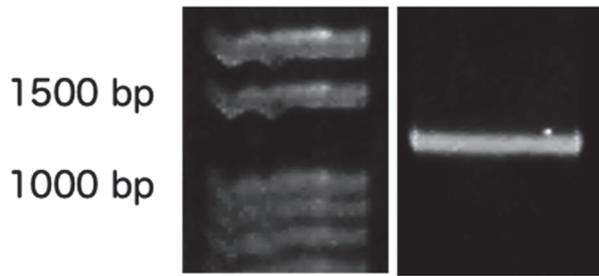


図4. リュウキュウナミウズムシ MAP-like 遺伝子のクローニング. リュウキュウナミウズムシ MAP-like 遺伝子特異的なプライマーを用いた RT-PCR により、1200 bp 付近にバンドが観察された. 左：マーカー，右：RT-PCR 産物.

Plasmid Mini Kit (Nihon Genetics) を用いてプラスミド DNA を精製した。このプラスミド DNA のシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

予測アミノ酸配列の構造と分子系統解析

既報⁴⁾を参照し、Gene Bank に登録されている MAP ファミリーのアミノ酸配列と SpMAP、DrMAP、ナミウズムシのゲノムから探索した DjMAP 候補遺伝子の予測アミノ酸配列 (*Dugesia japonica*) を用いて分子系統解析を行った。解析には MEGA X (ver. 10.1.8) を用いた。

結果

SpMAP 蛋白質発現ベクターの予測アミノ酸配列

シーケンスにより解析した SpMAPs 発現ベクターの塩基配列をもとに予測したアミノ酸配列を図3に示す。SpMAP の下流に His タグが6個付加されたアミノ酸を発現させることができるベクターの作製に成功した。

DrMAP のクローニング

DrMAP 遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、1200 bp 付近にバンドが観察された (予想バンドサイズ:1209 bp) (図4)。バンドを切り出し、クローニングベクターに載せ替えて増幅させ、塩基配列を解析した。結果、インサートチェック時にはベクターに PCR 産物遺伝子が組み込まれていたものの、シーケンス解析では AP 配列を含む遺伝子が確認されなかった。

DjMAP 候補遺伝子の探索と分子系統樹解析

ナミウズムシのゲノム情報をもとに AP 配列を含む遺伝子を探索した結果、AP 配列の繰り返しを4個もつ遺伝子が見つかった。そこで、DjMAP の予測アミノ酸配列と先に同定した2つの SpMAP の予測アミノ酸配列、既知の MAP ファミリーのアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った (図5)。その結果、脊椎動物神経性 MAPs のクレード (橙) と脊椎動物全身性 MAP のクレード (緑)、無脊椎動物 MAP のクレード (青) に分かれた。脊椎動物神経性 MAPs のクレードでは神経系特異的に発現する MAP2 や tau が配置され、概ね進化系統樹と類似した結果を示した。脊椎動物全身性 MAP のクレード内では魚類と哺乳類で分かれた。無脊椎動物 MAP のクレードでは扁形動物の MAP 候補配列は同じクレードに配置されていた。

SpMAP と DjMAP の予測アミノ酸配列の比較

SpMAPs と DjMAP の予測アミノ酸配列をウシの MAP4 配列と比較し、アライメントを行い、その構造を比較した (図6)。DjMAP は 339 アミノ酸残基

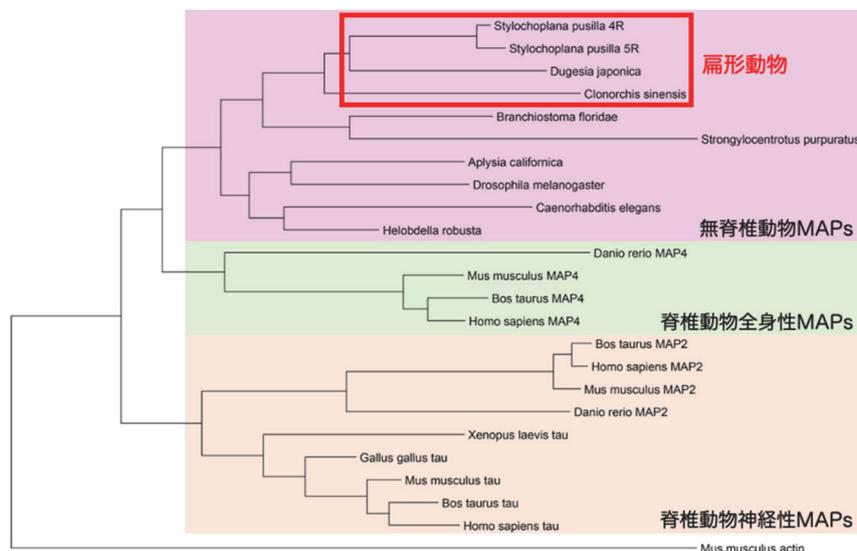


図5. MAPs ファミリーの分子系統樹解析. 脊椎動物神経性 MAPs ファミリー (橙) と脊椎動物全身性 MAPs ファミリー (緑), 無脊椎動物 MAPs ファミリー (ピンク) に分かれた. 赤枠: 扁形動物 MAPs.

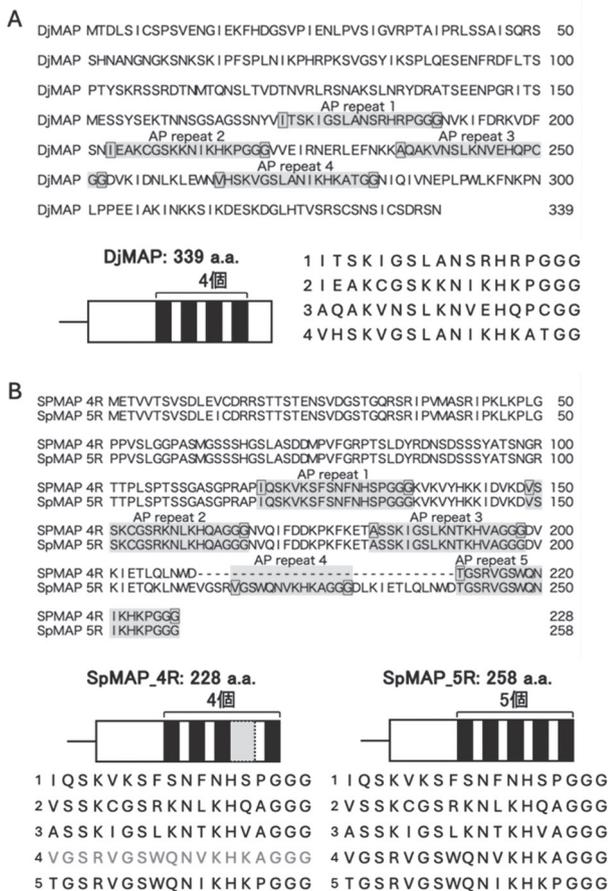


図 6. ナミウズムシ MAP-like 遺伝子と SpMAP の予想アミノ酸配列の比較。(A) ナミウズムシ (*Dugesia japonica*) のゲノムから予想したナミウズムシ MAP-like 蛋白質の予想アミノ酸配列。(B) SpMAP_4R, SpMAP_5R の予想アミノ酸配列。

からなり、哺乳類 MAP4 同様に AP 配列や Tail 部位を有していた (図 6A)。SpMAP 4R は 228 アミノ酸残基、SpMAP 5R は 258 アミノ酸残基からなり、SpMAP 4R は SpMAP 5R の 3 番目の AP 配列の終わりから 4 番目の AP 配列の末端までが欠失した構造であった (図 6B)。また、SpMAP は哺乳類 MAP4 や DjMAP と異なり、C 末端側の Tail 部位が存在しなかった (図 6)。

討論

今回、我々は 2 種の SpMAP の蛋白質発現ベクターの作製に成功した。また、プラナリアの MAP 遺伝子の配列解析により、カイヤドリヒラムシでは MAP 配列が知られている他の動物種には存在する Tail 部位が存在しないことを明らかにした。今後、これら扁形動物の MAPs の微小管重合能を測定することで Tail 部位が MAP のどのような機能に関わるのかを明らかにできると考えている。また、より下等な生物の MAP 遺伝子における Tail 部位の有無を調べることで、Tail 部位を獲得した生物学的意味に迫るこ

とができると考えている。

哺乳類 MAP ファミリーでは各 AP 配列の相同性が高く、MAP4 は 5 個の AP 配列をもち、MAP2 と Tau は最大で 4 個の AP 配列をもつ。哺乳類 MAP2 と Tau は MAP4 の 2 番目の AP 配列がない構造をとる³⁾。中間の AP 配列が失われた構造をとるという点では、哺乳類 MAP ファミリーとカイヤドリヒラムシの MAP ファミリーには共通性がある。哺乳類 MAP4 は全身の細胞で発現する一方で、MAP2 と Tau は神経細胞特異的に発現し、MAP2 は樹状突起マーカー、Tau は軸索マーカーとして知られている。扁形動物は中枢化された神経系を初めて獲得した動物と考えられており、もしかしたら SpMAP_4R が神経細胞特異的に発現し、SpMAP_5R は全身性に発現しているのかもしれない。今後、これらの SpMAP の発現局在を解析し、全身性と神経性のような局在の違いを明らかにすることで、左右相称動物における始原 MAP の機能と神経性、全身性の分化を明らかにしていきたい。

MAPs の Tail 部位は微小管の重合や安定性に関わるという報告がある⁵⁾。一方で、我々が明らかにした SpMAP の配列には Tail 部位が存在しなかった。カイヤドリヒラムシは血管・循環器系を獲得しておらず、いわゆる内分泌系が存在しない。そのため、神経細胞由来の内分泌物質は開口放出により体内に放出され、拡散により作用すると考えられる。Tail 部位の獲得が体内の「管」の形成を促し、高度な中枢神経系や血管・循環器系を促したのかもしれない。ヒラムシとプラナリアは同じ扁形動物でありながら、MAPs には Tail 部位の有無という違いを示す。そのため、Tail 部位の研究にうってつけのモデルなのかもしれない。

謝辞

本研究は、2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202305) を受けて行われた。リュウキュウナミウズムシは慶應義塾大学 松本 緑 准教授から分与いただいた。神奈川大学理学部 日野 晶也 名誉教授、神奈川大学 化学生命学部 細谷 浩史 教授に松本先生との橋渡しをしていただいた。また、室蘭工業大学 徳楽 清孝 教授、倉賀野 正弘 助教に蛋白質発現ベクターの作製法をご教授いただいた。記して感謝する。

文献

- 1) 小谷 享, 松島一幸, 久永眞市 (2006) 微小管結合蛋白質の構造と機能. *蛋白質 核酸 酵素* 51:535-542.
- 2) T. Oti SI, P.T. Nghiem, Y. Hashi, N. Tsutsui, S. Kotani

- (2022) Identification of Primitive Microtubule-Associated Protein Genes using the Marine Planarian, *Stylochoplana pusilla*. *Sci. J. of Kanagawa Univ.* **33**: 85-90.
- 3) Hirooka A, Hamada M, Fujiyama D, Takanami K, Kobayashi Y, Oti T, Katayama Y, Sakamoto T, and Sakamoto H (2021) The gastrin-releasing peptide/bombesin system revisited by a reverse-evolutionary study considering *Xenopus*. *Sci. Rep.* **11**: 13315.
- 4) Hashi Y, Kotani Y, and Tkuraku K (2015) Molecular Evolution of a Group of Microtubule-Associated Proteins Sharing Partial Similarities in Their Primary Structures. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **26**: 1-6.
- 5) Seeger MA, and Rice SE (2010) Microtubule-associated protein-like binding of the kinesin-1 tail to microtubules. *J. Biol. Chem.* **285**: 8155-8162.

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

両生類幼生を用いたマイクロプラスチックの誤食による 環境汚染の研究

吉本茉歩^{1,3} 内藤 凱¹ 深野 元¹ 神山風鳴¹ 薩摩 透¹ 原 和也¹
秋永 薫² 茂木和枝² 藤田深里^{1,2} 藤原 研^{1,2} 豊泉龍児^{1,2}

Study on Accidental Ingestion of Microplastics by Anuran Larvae

Maho Yoshimoto^{1,3}, Gai Naito¹, Hajime Fukano¹, Kazenaru Kouyama¹,
Toru Satsuma¹, Kazuya Hara¹, Kaoru Akinaga², Kazue Mogi², Misato Fujita^{1,2},
Ken Fujiwara^{1,2} and Ryuji Toyoizumi^{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. yoshi023913@gmail.com

Abstract: Environmental pollution by numerous microplastics is one of the serious problems for all living things. We are apt to regard microplastic pollution as a matter of oceanography, but many of the difficulties may also be common to freshwater environments. Aquatic amphibian larvae may be exposed to microplastics. Based on this standpoint, we aim to create a model system to evaluate the microplastic problem under laboratory conditions. First, we applied polystyrene microbeads to *Xenopus laevis* larvae, amphibian model organisms. *Xenopus* larvae earnestly ingested the microbeads and the developing guts were filled by the beads, and the larvae of other anuran species (*Xenopus borealis* and Japanese *Dryophytes japonica*, *Microhyla okinavensis*) also frequently ingested the polystyrene microbeads. *Xenopus* larvae fed on polypropylene beads, polyethylene beads, and glass beads, suggesting that, irrespective of the material of the microbeads, *Xenopus* larvae tend to eat them if they are of an appropriate size. In contrast, neither of the urodelan larvae of *Pleurodeles waltl* nor *Tylotriton verrucosus* ingested the polystyrene beads, suggesting a difference in the recognition of food particles between anuran and urodelan larvae. As a first step to promoting the conservation of anuran larvae against microplastics, we administered cadaverine-coated beads to *Xenopus* larvae, because cadaverine is known to induce escape behavior in the presence of teleost model species, zebrafish. After administration, *Xenopus* larvae did not prefer the smell, but we could not succeed in stopping the ingestion of microbeads. Taken together, anuran larvae have a strong tendency to eat various microbeads, so we propose that we should continue protecting fragile amphibian larvae against microplastic pollution.

Keywords: anuran, urodelan, microplastics, microbeads, environmental pollution

序論

SDGsの世界共通の目標として取り上げられている貧困やエネルギー問題の中に、緑の豊かさや海の豊かさといった環境問題が示されている。マイクロプラスチックは環境汚染や海棲生物への影響から海洋の環境問題へと直接的に関係している。

マイクロプラスチック（以下、 μP ）は、プラスチックごみの中でも直径5 mm以下の大きさになったものを指す。一次 μP と二次 μP に大別されており、一次 μP は化粧品や洗顔料に含まれるビーズやスクラブなどに由来する人工微小粒子のことを示す。

二次 μP は、生活用品に使われる人工的なプラスチック（ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン等）が紫外線や漂流による相互摩擦などによって劣化・分解されたものである。 μP は海洋や河川、湖などの海水・淡水域の生態系に大きな影響を及ぼしており、さまざまな生物が誤食、または餌とともに取り込んでいると考えられる¹⁾。また μP は人工プラスチックに含まれている可塑剤、着色料、安定剤から、フタレート類やビスフェノール A を含むビスフェノール類などの化合物を放出する。さらに周囲の海水中のダイオキシンや DDT（ジクロロジフェニルトリクロロエタン）、PCB（ポリ塩化ビフェニル）などの汚染物質を吸着し、10-100 万倍の濃度にまで濃縮する性質があり、生分解耐性が高く生物体内で消化・分解することができない²⁾。 μP を誤食した生物は組織の物理的な損傷の他、酸化ストレスや免疫関連遺伝子発現の変化を引き起こし、濃縮された汚染物質による神経毒性や成長遅滞、肝機能障害、行動異常が生じる可能性がある³⁾。 μP は食物連鎖の下位に位置する動物性プランクトンの体内でも確認されており、プランクトンより上位の生物にも μP 汚染が進み、人体への影響も懸念される。

本研究では、誤食の回避を試みるために死臭物質の cadaverine を使用した。Hussain らの 2013 年の論文で、腐敗した体から発せられる cadaverine や putrescine などのジアミンがゼブラフィッシュの嫌悪感を誘発し、強い回避行動を引き起こすことが示唆されている⁴⁾。そのため microbeads に cadaverine を吸着させることで両生類幼生に死臭への嫌悪感を抱かせ、誤食回避が可能なのではないかと考えた。

そのため本研究では、淡水生態系の生息種である両生類への μP への影響を検討するために、変態後の成体も後肢に水掻きを有する、両眼球が背側に位置するなどの形質をもつ無尾目アフリカツメガエルを主に使用し、材質の異なる microbeads の誤食や、誤食の発生段階依存性を調査した。また microbeads に死臭物質 cadaverine を吸着させ誤食回避を行うかを調べた。さらに、ツメガエル属の両生類種よりも陸棲環境に適応した形質をもつ両生類幼生の microbeads の誤食の有無について、代表的な日本在来種のカエル、有尾目のイベリアトゲイモリやアメイロイボイモリを用いて調査した。

材料と方法

実験動物・実験材料

両生類のモデル生物である、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* に性腺刺激ホルモン（gonadotropin）

を注射し、一晩置いて雌雄成体のつがいを交配し、得た胚を実験に使用する発生段階まで人工淡水（10% Steinberg 氏液）で育てた⁵⁾。その他、アマガエル科のニホンアマガエル *Dryophytes japonica*、ヒメアマガエル科のヒメアマガエル *Microhylla okinavensis*、ピパ科のキタアフリカツメガエル *Xenopus borealis* と、有尾目イモリ科のイベリアトゲイモリ *Pleurodeles waltl*、アメイロイボイモリ *Tylototriton verrucosus* の幼生を購入し、実験に使用した⁶⁾。

μP には、Polyscience 社製の polybead® polystyrene 90/45/10/3.0 Micron Microspheres（平均直径 90.72/44.16/9.634/3.0 μm ）、polybead® Dyed Red 1.0/Blue 6.0 Micron Microspheres（平均直径 0.964/5.75 μm ）、polybead® Yellow Dyed Micron Microspheres 1.00 μm を用いた。他に、polyethylene ビーズ（直径 27-32 μm ）や鉄ヤスリで polypropylene チューブを削り細粒にした μP 、ガラスビーズ（直径 3-10 μm ）を μP として用いた。また麻酔薬の 0.1% phenoxyethanol を作用させてから腹部を切開し、腸管を露出することで誤食の有無や誤食後の蠕動運動の観察を行なった。またツメガエル幼生の microbeads 誤食回避のため、cadaverine dihydrochloride（1,5-ジアミノペンタン二塩酸塩、ペンタメチレンジアミン二塩酸塩、1,5-ペンタンジアミン二塩酸塩、CAS No. 1476-39-7; 関東化学株式会社）を microbeads に吸着させ、誤食実験を行なった。

実験方法

ツメガエル幼生が誤食する μP の種類の検討

まず、アフリカツメガエル幼生がどのような μP を誤食するのかを検証するために、4 種類の材質のビーズや粒子の誤食を観察した。それぞれ直径 0.96, 3.0, 5.8, 9.6 μm の polystyrene (PS) ビーズ、polyethylene (PE) ビーズ（直径 27-32 μm ）、polypropylene (PP) 粒子、ガラスビーズ (GB) を 10% Steinberg 氏液に混合して懸濁液を作製し、ウェルやペトリ皿に投与した。そこに、st. 47-48, 51-58, 61 (Nieuwkoop & Faber の (1967) 発生段階表による)⁵⁾ のアフリカツメガエル幼生を 1 匹ずつ入れ、16°C の恒温器で一晩静置した。翌日に 0.1% phenoxyethanol で幼生に麻酔をかけ、腸管の観察を行なった。

ツメガエル幼生が誤食を開始する発生段階

次にツメガエル幼生における microbeads 誤食の発生段階依存性の検証を行うために、st. 39, 42, 46, 50 のツメガエル幼生を用い、12 穴プレートの各穴に幼

生を1匹ずつ入れた。そして、microbeadsを10% Steinberg氏液で10倍希釈したものを50 μL ずつ加え、24°Cで一晩静置し翌日観察した。観察時、st. 39の幼生はst. 42に、st. 42の幼生はst. 46に、st. 46の幼生はst. 48に進んでいた。

cadaverine 吸着による誤食回避の試み

次にツメガエル幼生のmicrobeads誤食回避のために、cadaverineを吸着させたビーズを用いた実験を行なった。1%スキムミルク250 μL とmicrobeads原液の混合液を2つ用意し、一方にはその混合液にcadaverineを0.05 g添加し溶解した。多孔プレートに幼生と10% Steinberg氏液を入れ、そこにcadaverineありのmicrobeadsとcadaverineなしのmicrobeadsを250 μL ずつ加えて、10分もしくは30分放置した。そしてcadaverineの有無に対する個体の遊泳行動の違いの有無を観察した。

両生類各種幼生による誤食の検証

アフリカツメガエル以外の両生類における、microbeadsの誤食の有無を検証するために、ニホンアマガエル、ヒメアマガエル、キタアフリカツメガエル、イベリアトゲイモリ、アメイロイボイモリの幼生を用いた。ニホンアマガエル幼生では10% Steinberg氏液で20倍希釈した2色ビーズ混合液(青ビーズ：直径5.7 μm と白ビーズ：直径9.6 μm 、または赤ビーズ：直径2.9 μm と白ビーズ：直径9.6 μm)をそれぞれ50 μL ずつ滴下し、計100 μL 加えた。ヒメアマガエル幼生には、青ビーズと赤ビーズを25 μL ずつを滴下し、計50 μL 、あるいは赤ビーズと青ビーズを50 μL ずつを滴下し、計100 μL 加えた。キタアフリカツメガエル、イベリアトゲイモリ、アメイロイボイモリでも同様に実験を行なった。こ

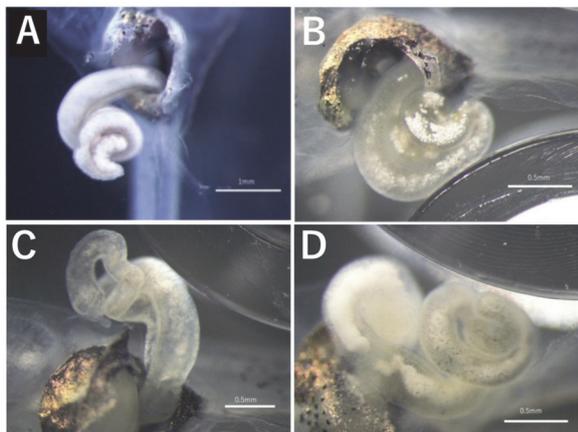


図1. アフリカツメガエルst. 47幼生における腸管内の μP A: PS (白3.0 μm). B: PE (27-32 μm). C: PP (削った破片を与えたのでサイズは様々). D: GB (3-10 μm). Bars, 0.5 mm.

のとき、誤食実験は1個体ずつ隔離してmicrobeadsの投与を行なった。

結果・討論

ツメガエル幼生が誤食する μP の種類を検討

st. 47-48の初期幼生、st. 51-58の後期幼生においては、ほとんどの個体でpolystyrene (PS)、polyethylene (PE)、polypropylene (PP)、ガラスビーズ (GB)の誤食が観察された(図1 A-D)。これらの多くでは同じ材質の糞がウェルやペトリ皿の底部に認められた。糞の排出直後には、消化管で分泌された粘液に絡められた形の、いわゆる糞の形状の μP が認められた。一方、st. 61の変態後期の幼生においては誤食があまり観察されず、糞も見られなかった。これは、体長と比較して μP の量が少なかったことや若い個体の幼生よりも糞を出すまでに時間がかかることから、観察時には糞を出していなかったためと考えている。開腹して消化管を観察したところ、実験を行なった発生段階の全てにおいて、殆どの個体で各材質のビーズを内包した腸管の蠕動運動の様子が観察された。この結果から、材質の異なる3種類の μP やガラスビーズを与えても短時間では生死に影響を及ぼすことはなかったといえる。この点に関しては、De Feliceら(2018)の結果を支持するが、Ruthsatzら(2023)が指摘するように、 μP の両生類発生に対する悪影響については、様々な発生段階の幼生で検証する必要がある⁷⁻⁸⁾。いずれにせよ、両生

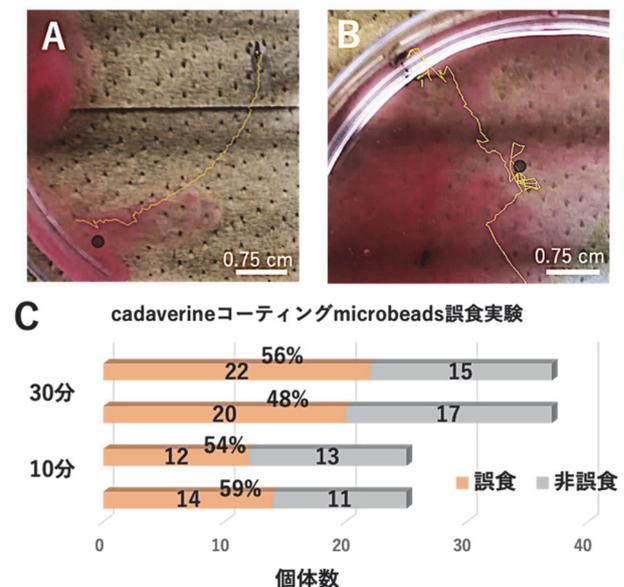


図2. アフリカツメガエル幼生におけるcadaverineに対する反応とmicrobeads誤食実験の結果。A: cadaverineなしのスキムミルクに対する行動の軌跡。B: cadaverineありのスキムミルクに対する行動の軌跡。黒点はスキムミルク注入点。C: cadaverineコーティングmicrobeads誤食実験結果。

類にとって、 μP の引き起こす致死性が低いことが「低リスクで良いこと」なのではなく、食物連鎖によってツメガエル幼生が μP を体内に取り込まれた状態で捕食者に捕食されると、捕食者の体内にまで μP が在留する可能性が懸念される。また本研究の結果から、ツメガエル幼生は μP の材質に関係なく、口に入るサイズであれば何でも誤食してしまう食性を有することがわかった。Huら(2016)は、*X. tropicalis*の μP 実験から、環境中の食物が少なくなり μP が増えてくるとより多くの μP を摂取する可能性があることを示唆している⁹⁾。今後は、*X. laevis*において飢餓状態(どの発生段階で何日絶食したのか)と μP 誤食の活動度との相関について、より精細な調査を行う必要がある。

ツメガエル幼生が誤食を開始する発生段階

誤食の発生段階依存性の検証では、投与時の発生段階がst. 39(観察時の発生段階はst. 42)の幼生では誤食はしていなかった(n=0/12)。ツメガエル幼生の口が貫通するのはst. 40であるため、st. 39-42で μP を誤食しなかったのは開口の有無には関係ないと考えている⁵⁾。

st. 42(観察時の発生段階はst. 46)では卵黄がまだ腸管内に大量に残っている発生段階であったが誤食がみられた(n=12/12)。ツメガエル幼生の内鰓が完成するのはst. 47以降である⁵⁾。そのため、st. 42-46の μP 誤食は内鰓から体内に μP が流入したことや、口が開いたことが原因とは考えにくい(st. 39の結果より)。一方で、st. 42-46は腸管形成期であり、およそ摂食を開始する時期と一致する。腸管形成期に μP を誤食するという事は、 μP によって濃縮された汚染物質によって生体内への影響があると思われる。Grzymkowskiら(2024)は、腸管形成期に除草剤に含まれるアトラジンという薬品に暴露されると、腸管の短縮や異常な腸の巻きが引き起こされることを示している¹⁰⁾。実際、 μP がアトラジンを含めた除草剤の成分を吸着し、水中における農薬の持続性を増加させるとの報告もある¹¹⁾。そのため、水中

のアトラジンを μP が吸着しそれを腸管形成期のツメガエル幼生が誤食した場合、腸管形成に影響を与え、腸の短縮や腸の巻きの異常を引き起こすと考えられる。

st. 46(観察時の発生段階はst. 48)、50になると、誤食をしたことにより銀色の腹膜の内側にビーズの詰まった腸管が見られた(n=12/12)。また、調査したビーズ直径0.96-9.6 μm の範囲では、ビーズの大きさによる誤食頻度に差異は見られなかった(n=66)。どの直径のビーズでも、腸管がぎっしりと飽和的に満たされるまで誤食する個体が多かった。st. 50はわずかな前肢芽と後肢芽が形成される段階でありほとんど変態は始まっていない。アフリカツメガエルは変態前の幼生期では草食であり変態後の成体では肉食であるように、幼生と成体で食性が変化する動物である。また幼生期は水底を這うような摂食行動が見られるが、成体は水面の餌も認識して摂食のために浮上する。このように幼生期と成体期の摂食行動にも大きな違いがあることから、今回は幼生の誤食を調査したが、変態後の幼若カエルで誤食実験を行うと異なる結果になるかもしれない。

cadaverine 吸着による誤食回避の試み

cadaverine 吸着による誤食回避実験を行う前に cadaverine に対するツメガエル幼生の行動を観察した。cadaverine を含まないスキムミルクをツメガエル幼生に対して吹き付けた場合、特に遊泳行動に異常は見られなかった(n=6, 動画数=3)。対して、cadaverine を含むスキムミルクを吹き付けると平衡感覚を失ったように混乱し異常な行動を示した(n=6, 動画数=3); 図2A-B)。このことから cadaverine はツメガエル幼生に影響を与え、忌避される化学物質であると判断した。しかし予想に反して、cadaverine 吸着した microbeads の誤食を観察すると、cadaverine の有無で誤食の頻度に大きな差はみられなかった(それぞれ N (試行回数) = 6, n = 30; N = 5, n = 25) (図2C)。cadaverine はツメガエ

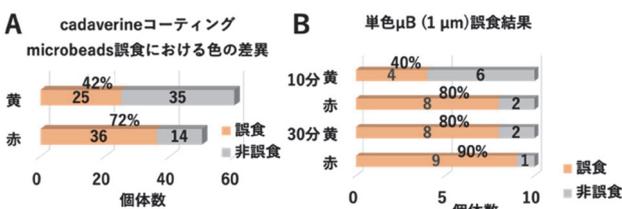


図3. アフリカツメガエル幼生における誤食実験結果の色による集計. A: cadaverine コーティング microbeads 誤食結果の, microbeads の色による比較. B: 人工淡水内での誤食実験結果における microbeads の色による比較.



図4. 両生類無尾目, 有尾目各種における microbeads の誤食結果.

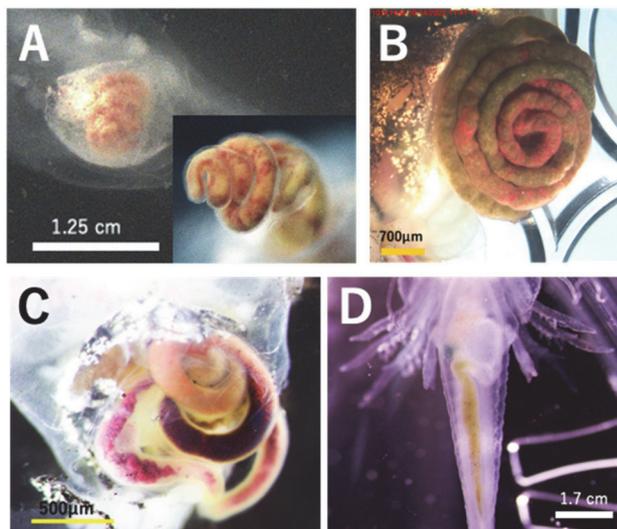


図5. 両生類無尾目、有尾目の様々な種における誤食結果. A: アフリカツメガエル幼生 st. 46 に赤色と黄色の microbeads を投与した (2種類の microbeads 投与のインターバル; 72時間). B: ニホンアマガエルに赤色と白色の microbeads を投与した (インターバル; なし). C: ヒメアマガエル幼生に赤色と青色の microbeads を投与した (インターバル; なし). D: イベリアトゲイモリに赤色と白色の microbeads を投与した (インターバル; なし).

ル幼生の行動に影響を与えるが、 μ P 誤食に影響がなかったことを考えると cadaverine は microbeads に吸着しにくく、匂いが付かなかったため嫌悪感を抱かなかった可能性がある。

しかしながら一方で、cadaverine 存在下で、誤食の頻度が赤色 microbeads では 72% (N = 5, n = 50)、黄色の microbeads では 42% (N = 6, n = 60) と、二色間で誤食頻度の差が生じた (図 3 A; $p < 0.01$)。そこで、通常の人工淡水内での microbeads 誤食結果を microbeads の色で比較してみると、誤食実験時間 10 分における誤食において、microbeads の色の違いによる誤食頻度の大きな違いがみられた。30 分での誤食結果では色の違いによる誤食頻度の違いは見られなかったことから、microbeads の色は誤食の立ち上がりに影響があると思われる (図 3 B)。実際、Hunt らの研究 (2020) では、アフリカツメガエル幼生 st. 48-49 は明所では緑色と赤色を好み、青色を忌避する反応を示したことを報告している¹²⁾。ツメガエル幼生が緑色を好む理由として、草食性であり体も小さいため水草の多く集まる環境を目指して移動するためだとされている。本研究では赤色と黄色のみの結果を示したが、緑色や青色との比較も行えばさらに誤食結果に顕著な差が見られるかもしれない。

各種両生類幼生による誤食の検証

両生類無尾目、有尾目における種別の誤食実験ではニホンアマガエル幼生、ヒメアマガエル幼生、キタ

アフリカツメガエル幼生は PS を誤食していた (それぞれ、N = 3, n = 20/20; N = 1, n = 6/6; N = 1, n = 9/12, 用いたキタアフリカツメガエル幼生はアフリカツメガエル幼生の st. 47 相当であった) (図 5 B, C)。特にニホンアマガエル幼生、ヒメアマガエル幼生が高頻度で誤食したが、誤食時には 1 個体ずつ隔離して microbeads 投与したことから、他の匂いをビーズが吸着しているとは考えられない。従って、本邦の在来種である 2 種はほぼ物理的な接触刺激のみで microbeads を誤食したと考えられる。ニホンアマガエル幼生、ヒメアマガエル幼生において異なるサイズと色 (赤色と黄色) の 2 種類の microbeads を共投与してみたところ、蠕動運動による各サイズのビーズの腸管内での排他的凝集を予想したが、はっきりとした傾向は出なかった。

一方で、有尾目のイベリアトゲイモリ幼生 (N = 1, n = 12)、アメイロイボイモリ幼生 (N = 1, n = 2) では、無尾目各種と同様の投与実験を行ったが、誤食はまったく観察されなかった。無尾目に比べて、有尾目は microbeads を誤食しない傾向があった (図 4, 図 5 D)。

まとめと展望

今回、実験に用いたアフリカツメガエル幼生は口に入るサイズであれば何でも誤食してしまう食性があり、PS, PE, PP, GB のどの材質の μ P でも誤食がみられた。microbeads 誤食の開始時期はおよそ腸管形成期と一致し、摂食を開始する時期と同じくして誤食が開始されることがわかった。アフリカツメガエル幼生の誤食回避のために死臭物質 cadaverine を吸着させた microbeads を投与した。cadaverine 自体に対しては忌避する反応を示すのに対して、cadaverine 吸着ビーズでの誤食頻度の減少はみられなかった。ただ、誤食頻度の時間経過をみると、microbeads の色による違いが赤色と黄色の間でみられた。誤食の立ち上がりに microbeads の色が影響すると考えられる。両生類各種における誤食の有無を調べた結果では、本邦在来種を含めた無尾目が高い頻度で誤食した。対して有尾目は全く誤食しなかった。

今後は、魚類の行動に対する忌避的な匂い物質の研究を参考に、cadaverine 以外の忌避物質の候補を選定して、cadaverine 実験と同様の実験を試みたい。また、アフリカツメガエル幼生の microbeads の色の違いによる誤食頻度の違いを明条件、暗条件、背景色等を変化させて調べていく実験も行いたい。さらに、両生類各種の μ P 誤食については野外調査の必要がある。実験室内環境では、有尾目幼生は誤食

をしなかった。しかしながら、アカハライモリなど本邦在来種の有尾目が、自然界では餌とともに誤飲し microbeads 汚染されている可能性は否定できず、野外調査を実施する必要がある。

謝辞

本研究は、2023年度の神奈川県総合理学研究所共同研究助成金による助成（RIIS202307）を受けて、藤原研研究室と豊泉龍児研究室の共同研究として行われました。所長の川本達也教授ならびに所員各位に感謝いたします。筆頭著者の研究活動は神奈川県理学部の大平剛教授、鶴岡慎哉氏にもアドバイスをいただいております。感謝いたします。

文献

- 1) Amelia TSM, Khalik WMAWM, Ong MC, Shao YT, Pan HJ & Bhubalan K (2021) Marine microplastics as vectors of major ocean pollutants and its hazards to the marine ecosystem and humans. *Progress in Earth and Planetary Science*, Volume 8, Issue 1, article id. 12. [doi: 10.1186/s40645-020-00405-4].
- 2) Alberghini L, Truant A, Santonicola S, Colavita G, Giaccone V (2023) Microplastics in Fish and Fishery Products and Risks for Human Health: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **20(1)**: 789. [doi: 10.3390/ijerph20010789].
- 3) Md. Simul Bhuyan (2022) Effects of Microplastics on Fish and in Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **20(1)**: 789. [doi:10.3390/ijerph20010789].
- 4) Hussain A, Saraiva LR, Ferrero DM, Ahuja G, Krishna VS, Liberles SD, Korsching SI (2013) High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110(48)**: 19579-84. [doi: 10.1073/pnas.1318596110].
- 5) Nieuwkoop PD and Faber J (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York ISBN 0-8153-1896-0.
- 6) Shi DL, Boucaut JC (1995) The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **39**: 427-441. [https://ijdb.ehu.eus/article/7577434].
- 7) De Felice B, Bacchetta R, Santo N, Tremolada P, Parolini M (2018) Polystyrene microplastics did not affect body growth and swimming activity in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **25(34)**: 34644-34651. [doi: 10.1007/s11356-018-3408-x].
- 8) Ruthsatz K, Schwarz A, Gomez-Mestre I, Meyer R, Domscheit M, Bartels F, Schaeffer SM, Engelkes K (2023) Life in plastic, it's not fantastic: Sublethal effects of polyethylene microplastics ingestion throughout amphibian metamorphosis. *Sci. Total Environ.* **10**: 885: 163779. [doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163779].
- 9) Hu L, Su L, Xue Y, Mu J, Zhu J, Xu J, Shi H (2016) Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere*. **164**: 611-617. [doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.002].
- 10) Grzymkowski JK, Chiu YC, Jima DD, Wyatt BH, Jayachandran S, Stutts WL, Nascone-Yoder NM (2024) Developmental regulation of cellular metabolism is required for intestinal elongation and rotation. *Development*. **151(4)**: dev202020. [doi: 10.1242/dev.202020].
- 11) Wang F, Gao J, Zhai W, Liu D, Zhou Z, Wang P (2020) The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. *J. Hazard Mater.* **394**: 122517. [doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122517].
- 12) Hunt JE, Bruno JR, Pratt KG (2020) An Innate Color Preference Displayed by *Xenopus* Tadpoles Is Persistent and Requires the Tegmentum. *Front Behav. Neurosci.* **14**: 71. [doi: 10.3389/fnbeh.2020.00071].

■原 著■ 2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ラベルム形成に注目したミョウガ (*Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe) の花発生に関する形態学的研究

山田大樹¹ 濱田拓見¹ 西井かなえ² Louis P. Ronse De Craene² 岩元明敏^{1,3}

Floral Development of *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe with a Special Reference to Labellum Formation

Taiju Yamada¹, Takumi Hamada¹, Kanae Nishii², Louis P. Ronse De Craene²
and Akitoshi Iwamoto^{1,3}

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

² Royal Botanic Garden Edinburgh, 20A Inverleith Row, Edinburgh, EH3 5LR, Scotland, UK

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

Abstract: Flowers of Zingiberaceae have a large labellum on their abaxial side. The labellum is a petaloid organ, derived from staminodes. It is generally recognized that two inner whorl staminodes are fused to form the labellum and an abaxial outer staminode is lost in the flowers of Zingiberaceae. Recent research, however, demonstrated that in some species belonging to the tribe Globbeae in the subfamily Zingiberoideae, the labellum consists of three fused staminodes: two from the inner whorl and one additional staminode from the outer whorl (the third staminode). This study focuses on floral development in *Zingiber mioga*, a member of the Hedychieae subfamily, whose floral development has been rarely observed, and was aimed at elucidating the development of the labellum in this species. Our observations revealed that three sepal primordia and a common primordia for a petals and stamen were initiated at first, followed by a common primodium for two petals and a labellum. These common primordia then differentiated into each floral organ primodium for the petal, stamen, and labellum consisting of staminodes. Although we confirmed the initiation and development of a third outer whorl staminode in a labellum, the third staminode, it becomes indistinguishable at later developmental stages and embedded between the two inner staminodes. These findings suggest that the labellum in *Zingiber mioga* consists of three staminodes, with development similar to that of *Globba godefroyi* in Globbeae.

Keywords: *Zingiber mioga*, floral development, labellum, Zingiberaceae, Hedychieae

序論

単子葉植物 (Monocots) は、基本的に同一の環状に3つずつの花器官を形成する「3数性」の花を持つ。特に雄蕊については、3つずつの雄蕊から構成される環が交互に2つあり、通常計6つの雄蕊が形成される¹⁾。しかし、ショウガ科 (Zingiberaceae) の花では、稔性を持つ雄蕊は向軸側の内環雄蕊1つだけであり、それ以外の雄蕊は不稔化して仮雄蕊となり、さらに花弁状化している。特に、背軸側に形成される2つの内環仮雄蕊が融合して形成された花弁状器官はラベルム (labellum) とよばれる。ショウガ科

のラベルムは大型化し、通常の花弁より大きくなることが多い。

前述したように、ラベルムは背軸側に位置する2つの外環仮雄蕊が融合することで形成されており、背軸側の外環仮雄蕊は退化してラベルムには含まれていないとこれまで考えられてきた²⁾。しかし、最近の研究によりショウガ科ショウガ亜科グローバ連の *Gagnepainia harmandii*, *G. godefroyi* では、背軸側の外環仮雄蕊原基が発達し、内環仮雄蕊原基と明確に識別することができるという観察結果が得ら

れた。そして、この結果からこの属の花におけるラベルムは3つの仮雄蕊（背軸側の内環仮雄蕊2つと外環仮雄蕊1つ）によって形成されていることが明らかとなった³⁾。以降、これまで退化して存在しないとされてきたショウガ科のラベルムにおける外環仮雄蕊を「第3の仮雄蕊」とよぶ。また、同じグロバ連の *Globba geoffrayi* についても、ラベルムの発達初期に第3の仮雄蕊が発生することが明らかとなった。ただし、*G. geoffrayi* では第3の仮雄蕊は発生するものの発達せず、小さい状態のまま残り続ける³⁾。

グロバ連を含め、ショウガ亜科植物における花発生およびラベルムの形態形成については、これまでに比較的多くの形態学的研究が行われている³⁾。しかし、ショウガ科におけるもう1つの大きな亜科であるハナミョウガ属 (*Alpinia*) の *Alpinia oxyphlla* の花発生しか研究されていない⁴⁾。

そこで本研究では、これまでにほとんど観察例がないハナミョウガ亜科のミョウガ (*Zingiber mioga*) の花発生についての観察を行った。そして、特に本種におけるラベルムの形態形成に注目し、第3の仮雄蕊が形成されるかどうかについて明らかにすることを目指した。

材料と方法

植物材料

ミョウガ (*Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe; 図 1A, B) を神奈川県湘南ひらつかキャンパス（神奈川県平塚市）で栽培し、2020年8,9月, 2021年8月に発達段階の異なる花芽を採集した。採集した花芽の液浸標本は、神奈川県理学部岩元研究室（神奈川県横浜市）にて保管されている。

材料の固定

採集した花芽は50% エタノールまたは FAA (= Formalin Acetic acid Alcohol; エタノール 30%, ホルマリン 5%, 酢酸 5%) に入れ、アスピレーター (WJ-20, SIBATA) を用いて約 20 分間の脱気固定を 2 回、常温で行った。その後 24 時間以上常温で固定し、観察に用いた。

走査型電子顕微鏡 (SEM) の試料作成と観察

固定した試料をエタノール系列で脱水し、酢酸イソアミルで置換した。この試料を、臨界点乾燥装置 (SYG LCP-81, 山友技術) を用いて約 85-95 気圧、42°C の臨界状態で乾燥した。乾燥後、試料をアルミニウム試料台上に貼付した。

貼付した試料を実体顕微鏡 (SZX16, Olympus) の下でピンセットを用いてトリミングし、各ステージの花の構造が観察できるようにしてから、イオンスパッター装置 (JFC-1600, JOEL) を用いて白金/パラジウム粒子でスパッタリングを行った (1.2kV, 40mA で 3 分間)。このスパッタリングした試料を走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-840A および JSM-IT200, JOEL) を用いて、加速電圧 5kV の条件で観察し、画像撮影を行った。

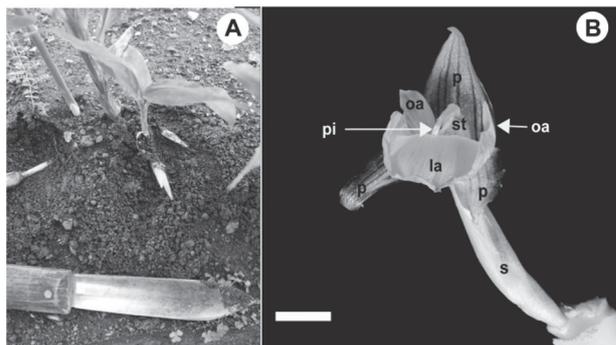


図 1. ミョウガ (*Zingiber mioga*) (A) 育成中のミョウガ。 (B) ミョウガの花。 ia, 内環仮雄蕊; la, ラベルム; oa, 外環仮雄蕊; p, 花弁; pi, 雌蕊; s, 萼片; st, 雄蕊。 Scale bar = 1 cm.

結果

花序分裂組織の先端付近にドーム状の花芽原基が観察され、花芽原基の背軸側に苞原基が最初に形成された (図 2A)。その後、左右に側萼片原基が生じ、その間に大きな共通原基が形成された (図 2B)。その後、別の背軸側共通原基が発生した (図 2C)。この共通の原基は発生が進むとよりはっきりと認識できるようになり、最初に花弁原基が分化することが確認できた (図 2D)。

さらに発生が進むと、向軸側の共通原基は花弁原基と雄蕊原基に分かれて発達した。また、背軸側の共通原基からは、花弁と仮雄蕊原基が発達した (図 2E)。この時 2 つの内環仮雄蕊原基の間に挟まれる形で、外環仮雄蕊原基の形成も確認された (図 2E)。この 2 つの内環仮雄蕊と 1 つの外環仮雄蕊原基で形成される器官がラベルムとなる。次に苞原基、萼片原基が花芽の中心部分を覆うように発達し、花弁原基も発達することで仮雄蕊原基は観察できなくなり、雄蕊原基の先端のみが観察できる状態となった (図 2F)。なお、ミョウガでは苞が 2 つ形成されることが観察された (図 2A-F)。

雌蕊原基が発生した段階では、内環仮雄蕊原基と外環仮雄蕊原基の境界は不明瞭であった (図 3A)。雌蕊の花柱が伸長を始めた段階では、内環仮雄蕊原基と外環仮雄蕊原基の差はよりはっきりと確認でき

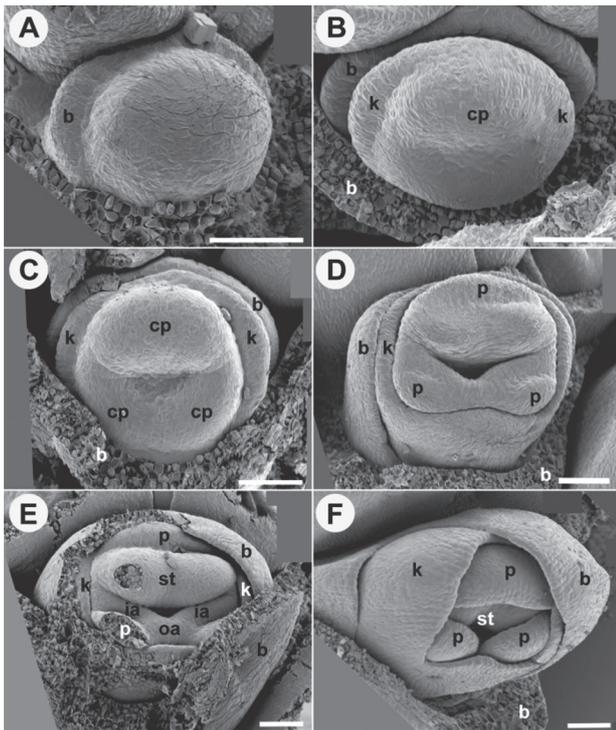


図2. ミョウガの花発生過程（初期から中期）. (A) 発生初期の原基. (B) 2枚の萼片原基と共通原基が形成された. (C) 共通原基が3つに分化. (D) 共通原基から花弁原基と雄蕊原基が発生. (E) 共通原基から雄蕊原基と仮雄蕊原基が発生. (F) 全体が苞と萼片原基に覆われた花. b, 苞; cp, 共通原基; ia, 内環仮雄蕊; k, 萼片; oa, 外環仮雄蕊; p, 花弁; st, 雄蕊. Scale bars = 100 μ m (A–F). Scale bars = 100 μ m (A–F).

た。この段階では雄蕊が雌蕊を取り囲むように発達していた（図3B）。

さらに発生が進むと、内環仮雄蕊原基と外環仮雄蕊原基の境界が不明瞭な個体と、明瞭な個体の両方が確認できた（図3C, D）。その後、内環仮雄蕊原基と外環仮雄蕊原基の境界は全ての個体で不明瞭になった（図3E）。雌蕊が雄蕊の2倍程度の高さまで伸長した発生段階では、内環仮雄蕊原基と外環仮雄蕊原基の境界が完全になくなり、ラベルムは2つの内環仮雄蕊原基で構成されているような形態となった（図3F）。

討論

ミョウガの花発生（ラベルム形成以外）

花発生を詳細に観察した結果、ラベルム形成における背軸側の外環仮雄蕊の発生と発達以外は、ほぼこれまでに報告があるショウガ科植物と同様の花発生を示すことが明らかとなった（*Alpinia*⁴⁾, *Curcuma*⁵⁾, *Gagnepainia*³⁾, *Globba*^{3, 6)}, *Hedychium*⁷⁾, *Hemiorchis*³⁾, *Scaphochlamys*⁸⁾）。このことから、ミョウガでは、ショウガ科植物の基本的な花発生が保持されているといえる。

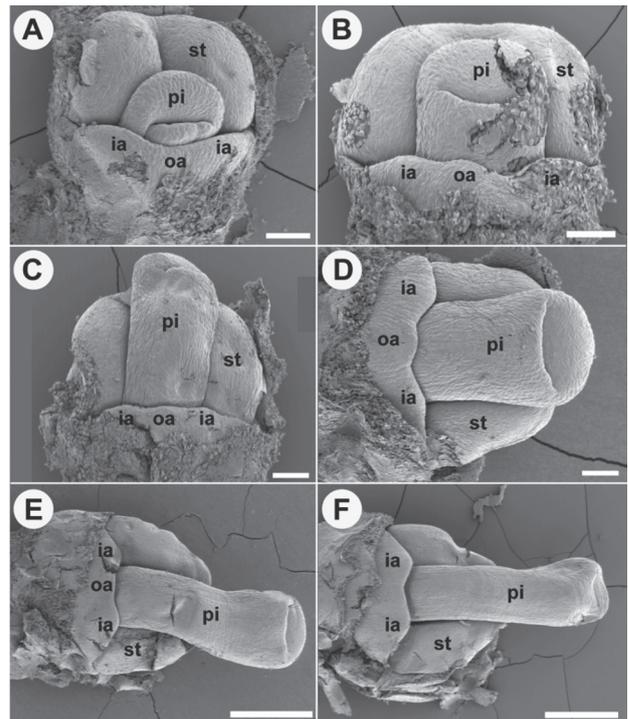


図3. ミョウガの花の発生過程. (A) 雌蕊が形成された花芽. (B) 雄蕊が発達し花柱が雌蕊の溝に入っている. (C) 雌蕊が伸長. (D) 第3の仮雄蕊が明瞭に確認できる花芽. (E) 内環仮雄蕊と第3の仮雄蕊の境界が不明瞭になりつつある花. (F) 内環仮雄蕊と外環仮雄蕊原基の境界が不明瞭になった花. ia, 内環仮雄蕊; oa, 外環仮雄蕊; pi, 雌蕊; st, 雄蕊. Scale bars = 100 μ m (A–D), 500 μ m = (E, F).

ラベルムの形成と構造

序論でも述べた通り、ショウガ科のラベルムでは背軸側の外環の仮雄蕊原基（= 第3仮雄蕊）は消失していると考えられてきた²⁾。実際に、これまでに花発生が観察されたショウガ科植物の多くで、ラベルムは発生せず、発生初期から2つの内環仮雄蕊のみが観察される³⁻⁸⁾。一方で、グロバ連の *Gagnepainia harmandii* と *G. godefroyi* のラベルムでは第3の仮雄蕊が発達する³⁾。 *Gagnepainia* では最終的なラベルムにおいても第3の仮雄蕊の存在を確認することができ、 *Globba geoffrayi* でも痕跡的にはなるものの、完全には退化せずにラベルム中に保持されている³⁾。

ミョウガのラベルムにおいては、発生初期に2つの内環仮雄蕊原基の間にドーム状の隆起が確認できた（図2E）。これは第3の仮雄蕊原基と考えられ、発生中期まで存在を確認することができた。しかし、発生後期にかけて内環仮雄蕊との境界が不明瞭になり、最終的にラベルムは2つの内環仮雄蕊によって構成されているような形態になった（図3D-F）。これは、発生中期から後期にかけては内環仮雄蕊の発達が第3の仮雄蕊と比べて著しいためであると考えられる。また、発生段階がほとんど同じ個体で、第3の仮雄蕊が明瞭なもの、不明瞭なものも観察され

た (図 3C, D)。このことから、ミョウガではラベルムの発達の程度に個体差があると推定される。

いずれにしても、ミョウガのラベルムでは第3の仮雄蕊が形成されており、少なくとも発生中期までは退化しないことが確認された。このラベルム形成の特徴は、これまでに報告があるいずれのショウガ科植物でも見られないものである³⁻⁸⁾。しかし、ラベルムにおける第3の仮雄蕊が発生するものの、大きく発達せずに痕跡的になる *Globba godefroy*³⁾ とは比較的近いラベルム形成であるといえる。

本研究により、ショウガ亜科だけではなく、ハナミョウガ亜科の植物においてもラベルムにおいて第3の仮雄蕊が形成される種が存在することが明らかとなった。ショウガ亜科のラベルムにおける第3の仮雄蕊の形成は、平行進化により再獲得されたものと考えられる³⁾。今回の結果から、ラベルムにおける第3の仮雄蕊の形成は、ショウガ亜科とハナミョウガ亜科、すなわちショウガ科ほぼ全体で平行進化していると推定される。今後は、他のハナミョウガ亜科植物についても花発生の観察を進め、ショウガ科におけるラベルム形成の進化についてより詳細に明らかにする必要がある。

謝辞

本研究の一部は、2023年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202304)、研究課題「ショウ

ガ科におけるラベルムの形態進化の解明」を受けて行われた。ここに記し、感謝する。

文献

- 1) Ronse De Craene LP (2022) Floral diagrams: an aid to understanding flower morphology and evolution. Cambridge University Press.
- 2) Kress WJ (1990) The Phylogeny and Classification of the Zingiberales. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **77**: 698-721.
- 3) Iwamoto A, Ishigooka S, Cao L and Ronse De Craene LP (2020) Floral development reveals the existence of a fifth staminode on the labellum of basal Globbeae. *Front. Ecol. Evol.* **8**: 133.
- 4) Song JJ, Zou P, Liao JP, et al (2007) Floral ontogeny in *Alpinia oxyphylla* Miq. (Zingiberaceae) and its systematic significance. *Gard. Bull. Singapore* **59**: 221-230.
- 5) Fukai S and Udomdee W (2005) Inflorescence and flower initiation and development in *Curcuma alismatifolia* Gagnep (Zingiberaceae). *Jap. J. Trop. Agri.* **49**: 14-20.
- 6) Box M and Rudall P (2006) Floral structure and ontogeny in *Globba* (Zingiberaceae). *Plant Syst. Evol.* **258**: 107-122.
- 7) Kirchoff BK (1998) Inflorescence and flower development in the Hedychieae (Zingiberaceae): *Scaphochlamys kunstleri* (Baker) Holttum. *Int. J. Plant Sci.* **159**: 261-274.
- 8) Kirchoff BK (1997) Inflorescence and flower development in the Hedychieae (Zingiberaceae): *Hedychium*. *Can. J. Bot.* **75**: 581-594.

■原 著■ 2023 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 11 海況と植物プランクトン分布 2023 年 12 月

水田眞輝¹ 川延京子¹ 西本右子¹ 西條光河¹ 鈴木祥弘^{1,2}

Long-term monitoring of environmental changes
in the Sagami River estuary XI
Distribution of phytoplankton biomass in December 2023

Masaki Mizuta¹, Kyoko Kawanobe², Yuko Nishimoto^{1,3}, Koga Nishijo¹
and Yoshihiro Suzuki^{1,2,4}

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuki03@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: We measured ocean conditions in the Sagami River estuary in December 2023. In this area, three water masses are often observed: river-derived water masses due to the inflow of river water, coastal water masses, and open ocean water masses. In this study, only river-derived and coastal water masses were observed, and no high-temperature, high-salinity open-ocean water masses were observed. Accordingly, the phytoplankton biomass was low. The increase in water temperature toward the coast indicated the possible presence of open ocean water masses offshore beyond 5000 m. The high species diversity found in the sample taken 5000 m offshore, closest to the open ocean water masses, suggests the importance of these masses in maintaining the productivity of the Sagami River estuary during this period.

Keywords: bio mass, 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⁾。中でも、相模川からの淡水の流入と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、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²⁻⁵⁾。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 12 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 12 月 4 日に行った。相模川河口から南に向かって沖合に 0、100、200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000 m の 13 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 (AAQ 126, 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、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 (富士フイ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⁶⁾。この Chla 濃度で校正することで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。各観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)。また、既知の濃度の水溶液で校正した後、比色定量キット (HI736 & HI781, ハンナインストルメンツ) を用いて海水試料のリン酸塩、硝酸塩濃度を求めた。

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、

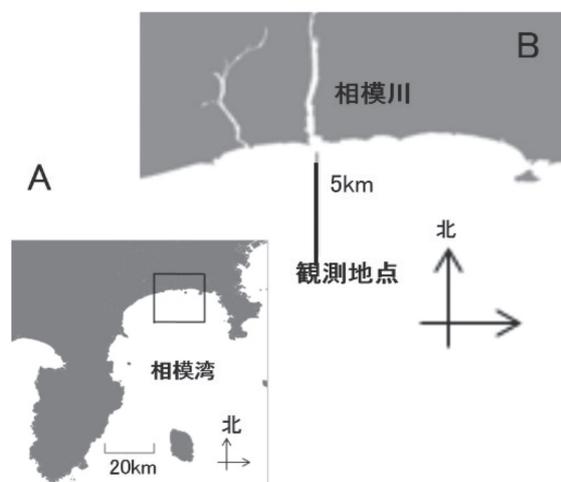


図 1. 観測海域。相模川河口から南方沖合 5000 m の線上に測点を設けた。A. 相模湾全景 図中の四角形は図 B の位置を示す。B. 観測海域 図中直線は調査した観測点を設けた南北の線を示す。

5000 m の南北直線上の 3 測点 (図 1) で表層水を採水バケツにより採水した。海水試料は 250 ml 黒色ポリびんに入れ、速やかに 0.1% 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⁷⁾。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 4 °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)⁸⁾ 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、Tomas C R (ed.) (1997)⁹⁾ および、Omura T. (ed.) (2012)¹⁰⁾ に従った。

結果 海況

海水の温度は河口 (沖合 0 m) から沖合にむかって 17.5 から 18.5 °C に上昇した。温度の上昇は水深 2 m 以浅の表層で遅く、河口付近で 17.5 ~ 18.0 °C、沖合 3000 m で 18.0 °C、沖合 4000 m で 18.5 °C となった。水深 10 m 以深の温度も河口付近で 17.5 ~ 18.0 °C であったが、表層に比較して岸よりの沖合 1000 m で 18.0 °C、沖合 3000 m で 18.5 °C となった。各観測点の鉛直方向の変化を見ると、河口から沖合 1000 m までの沿岸では、表層から海底までほぼ等しい 17.5 ~ 18.0 °C であった。さらに沖合でも 10 m 以深の水温はほぼ等しかったが、表層の水温は水深 10 m 以深の水温はより 0.5 °C 低かった。4000 m より沖では水温は再び鉛直方向に均一になり、18.5 ~ 19.0 °C となった (図 2 A)。沖合 500 m 付近の表層に 33.5 ~ 34.0 ‰ の低い塩分濃度の水塊が認められた。この水塊を含む最大深度 15 m 以浅の水塊の塩濃度は河口から 4000 m 沖合まで 34.0 ~ 34.5 ‰ で、その下の水塊の塩濃度の 34.5 ~ 35.0 ‰ に比べて低かった。上層の低い塩濃度の水塊の最大水深は沖合に行くにしたがって浅くなり、沖合 4000 m 以遠で認められなくなった。このため沖合 4000 m 以遠の塩濃度は表層から水深 50 m まで等しく 34.5 ~ 35.0 ‰ となった (図 2 B)。密度の指標 σ は表層で 24.8 未満、3 ~ 10 m 以深では 24.8 ~ 25.0 でほぼ一定であった。河口付近の低塩濃度の水塊の周辺では 24.4 ~ 24.6 の例外的に低い密度の水塊が認められた (図 2 C)。

観測海域の Chla 濃度は沖合 1000 m の海底付近と沖合 4500 ~ 5000 m の水深 15 m 付近を除き、3.5 $\mu\text{g Chla l}^{-1}$ 未満であった。河口から沖合 500 m ま

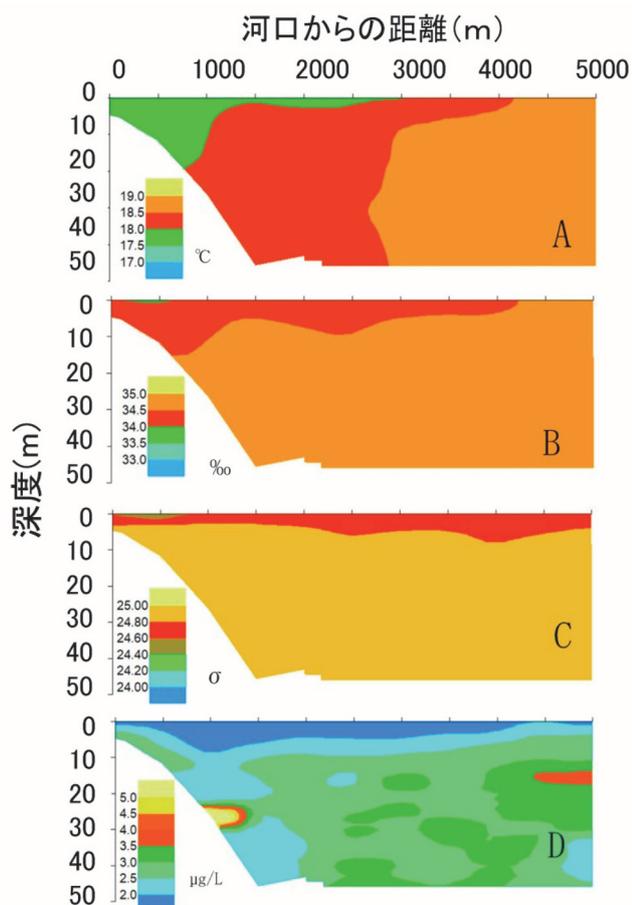


図2. 相模川河口域の環境要因の分布. 水温 (A). 塩濃度 (B). 密度 (C). クロロフィル *a* 濃度 (D) を記す.

で水深 0 m の Chla 濃度は $2.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ 未満であったが、直下の水深 1 m 以深で $2.0 \sim 3.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ に上昇した。河口から 500 ~ 4000 m 沖合までの表層の Chla 濃度も $2.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ 未満であったが、その層は河口付近より厚く、沖合 1000 m 付近では水深 8 m に達した。さらに沖合 4000 m 以遠では、 $2.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ 未満の植物プランクトンの希薄な層は再び、1 m 未満に薄くなった。この層の下ではクロロフィル濃度が上昇し、 $2.0 \sim 3.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ となった。さらに下層では、 $2.5 \sim 3.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ の濃度の水塊の中に $3.0 \sim 3.5 \mu\text{gChla l}^{-1}$ の濃度の水塊が散在していた。沖合 4000 ~ 5000 m の水深 10 ~ 30 m の中層には $3.0 \sim 3.5 \mu\text{gChla l}^{-1}$ の濃度の水塊が分布し、その中心には $3.5 \sim 4.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ の濃度の水塊が認められた。沖合 1000 m 付近の海底付近には $5.0 \mu\text{gChla l}^{-1}$ を越える濃度の水塊が認められた (図 2D)。この付近にはしばしば高いクロロフィル濃度の水塊が認められるが、その原因は今のところ不明である。

観測海域の硝酸塩濃度とリン酸塩濃度を求めた。水深 10 m の硝酸塩濃度は沖合 500 ~ 5000 m で 10

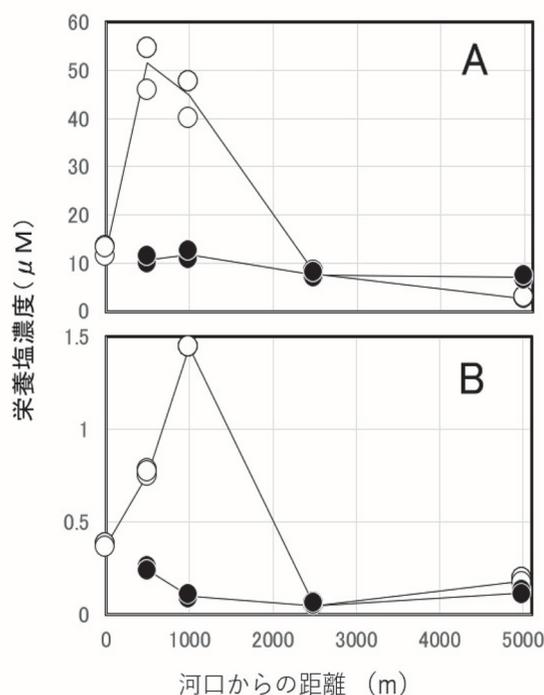


図3. 相模川河口域の硝酸塩濃度 (A) とリン酸塩濃度 (B) の分布. 水深 0 m (○) と水深 10 m (●) の濃度を記す.

μM 以下であった。河口 (沖合 0 m)、水深 0 m の表層でも $10 \mu\text{M}$ と低かったが、沖合 500 m、1000 m では、50 と $45 \mu\text{M}$ に上昇したが、さらに沖の 2500 m、5000 m では $10 \mu\text{M}$ 以下に低下した。リン酸塩濃度も同様の傾向を示した。水深 10 m のリン酸塩濃度は沖合 500 ~ 5000 m で $0.3 \mu\text{M}$ 以下であった。河口 (沖合 0 m)、水深 0 m の表層でも低く $0.4 \mu\text{M}$ であったが、沖合 500 m、1000 m では、0.75 と $1.5 \mu\text{M}$ に上昇した。さらに沖の 2500 m、5000 m では $0.3 \mu\text{M}$ 以下に低下した (図 3)。

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、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 (Diatoms)、クリプト藻 (Cryptophyceae)、渦鞭毛藻 (Dino-phyceae)、ハプト藻 (Haptophyceae)、珪質鞭毛藻 (Dictyochophyceae)、プラシノ藻 (Prasinophyceae) と原核生物であるラン藻 (Cyanophyceae) に属する様々な藻類が認められた。珪藻以外の藻類の細胞は、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。また、これらの多く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、これらの藻類を鞭毛藻 (Flagellate) とラン藻とし、比較的種同定の容易な珪藻類とは区別して扱った (表

表 1. 植物プランクトン群集の種組成

Species	表層 (0m)			Species	表層 (0m)		
	0m	1000m	5000m		0m	1000m	5000m
Diatoms				Cyanophyceae			
<i>Detonula pumila</i>	<w		39	<i>Trichodesmium</i> sp.		36	
<i>Lauderia annulata</i>	w	143	4724	Flagellates			
<i>Skeletonema costatum</i>		1575	573	573	Cryptophyceae		
<i>Thalassiosira</i> spp.		286	573	1432	380	380	1265
<i>Stephanopyxis palmeriana</i>	<w		42	Dinophyceae			
<i>Leptocylindrus danicus</i>			1432	<i>Prorocentrum dentatum</i>			143
<i>Corethron pelagicum</i>	wo	4	18	<i>Prorocentrum micans</i>	i		143
<i>Coscinodiscus wailesii</i>	w	18	11	Gymnodiniaceae			
<i>Rhizosolenia bergonii</i>	w		72	<i>Ceratium furca</i>	i		143
<i>Rhizosolenia decipiens</i>	w		54	<i>Ceratium fusus</i>		4	4
<i>Rhizosolenia robusta</i>	w	4	18	4	4		18
<i>Guinardia flaccida</i>		143	143	<i>Ceratium kofoidii</i>	wo		4
<i>Guinardia striata</i>		429	573	8876	<i>Ceratium trichoceros</i>	<w	4
<i>Cerataulina pelagica</i>			429	Oxytoxum sp.			
<i>Eucampia zodiacus</i>		752	91	161	Peridinales		
<i>Bacteriastrum elongatum</i>	<w		859	<i>Noctiluca scintillans</i>			
<i>Bacteriastrum</i> spp.		573	154	859	Haptophyceae		
<i>Hemiaulus hauckii</i>			286	<i>Gephyrocapsa oceanica</i>			
<i>Chaetoceros atlanticus</i>		787	21	143	30372	30372	32270
<i>Chaetoceros concavicornis</i>			573	Coccolithophorid			
<i>Chaetoceros eibonii</i>	w	14	39	429		143	286
<i>Chaetoceros affinis</i>			394	Dictyochophyceae			
<i>Chaetoceros compressus</i>			5297	<i>Dictyocha fibla</i>			
<i>Chaetoceros constrictus</i>	<c		573	<i>Dictyocha speculum</i>			
<i>Chaetoceros debilis</i>	<w		286	Prasinophyceae			
<i>Chaetoceros diadema</i>		286	1,575	<i>Pyramimonas</i> sp.			
<i>Chaetoceros didymus</i>	<w		716	1139	380	759	
<i>Chaetoceros lorenzianus</i>	w	143	4,152	Total (cell l⁻¹)			
<i>Chaetoceros pseudocurvis</i>	w		429	6,442	31894	31604	35898
<i>Chaetoceros socialis</i>			573	1,718			
<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	ib	949	380	380			
<i>Chaetoceros tortissimus</i>			143				
<i>Ditylum brightwellii</i>			21				
<i>Odontella aurita</i>			107				
<i>Thalassionema nitzschioides</i>		3,436	573	7,874			
<i>Thalassiothrix</i> spp.			18	18			
<i>Cymbella</i> sp.		143					
<i>Navicula</i> spp.		573	143	1,002			
<i>Pleurosigma / Gyrosigma</i> sp.				18			
<i>Cylindrotheca closterium</i>		143	1,432	1,288			
<i>Fragilariopsis</i> spp.			1,002				
<i>Nitzschia</i> spp.			143	143			
Total (cell l⁻¹)				10400	6744	53292	

w: warm water region, <w is tended to have that personality.
c: cold water region.
i: inshore or coastal region.
b: brackish
f: fresh water
o: open water region.
blank: cosmopolitan or world wide, and unknown.

1)。全3測点の海水試料中に観察された珪藻類は42種群で、鞭毛藻は16種群、ラン藻は1種であった。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。

ラン藻は沖合1000 mで1種のみが認められ、その細胞密度は36糸状体 ℓ^{-1} と鞭毛藻や珪藻に比べ低かった。鞭毛藻類の全細胞数の94%を占める優占種 *Gephyrocapsa oceanice* (ハプト藻) の密度は3測点でほとんど変化しなかった。このため、鞭毛藻類全体の細胞密度の変化はわずかであった。鞭毛藻類の平均密度は33000細胞 ℓ^{-1} であり、珪藻類の細胞密度の3測点の平均23500細胞 ℓ^{-1} を40%上回っていた。河口では優占種以外に3種類しか認められないのに対し、1000 m、5000 m 沖合の測点ではそれぞれ8種、15種が認められた。河口だけに特有の種は無く、1000 mの測点だけに特有の種は1種で、5000 m 地点だけに特有の種は8種であった。全16種中15種が5000 m 沖合の測点で認められた。鞭毛藻16種群には生息環境と対応づけられる種群はわずかで、沿岸性種が2種、外洋性種が1種で、全体に占める細胞数もわずかであった(0.1%と0.0%)。珪藻類の細胞密度は河口(0 m)で10400細胞 ℓ^{-1} であったが、1000 mの測点で6744細胞 ℓ^{-1} に低下し、5000 mで53000細胞 ℓ^{-1} となった。3測点で細胞数が大きく変化した。河口では *Skeletonema costatum* と *Thalassionema nitzschioides*、1000 mでは *Cylindrotheca closterium* と *Fragilariopsis* spp. が、沖合5000 mでは *Guinardia striata* と *T. nitzschioides* がそれぞれ優占していた。河口、1000 m、5000 mの3測点で認められた珪藻種はそれぞれ19、19、39種群で、河口から沖にかけて全ての測点で確認できた種は12種群であった。沖合5000 mで確認された種の一部が、河口や沖合1000 mでも確認されたが、残りの17種群は5000 mでのみ確認された。河口だけで認められた種群、1000 mだけで認められた種群がそれぞれ1種、河口と1000 m測点で認められ、5000 mで認められなかった種群が1種であった。中でも、1000 m測点でのみ認められた *Fragilariopsis* spp. は、この海域で優占する種群の一つであった(表1)。沖合5000 mでは確認できず、河口や沖合1000 mでのみ確認された種群はわずかであったが、その海域の藻類群集を特徴づけていた。珪藻類42種群のうち1/3にあたる14種が暖海性かその傾向を示す種であった。そのうち7種は5000 m 沖合でのみ認められたが、6種は河口で、4種は1000 m 沖合でも認められた。全細胞数に占める暖海性珪藻の細胞数は26.5%に達し、調査海域に広く、

高密度で分布していることが示された。一方、冷海性の珪藻種は *Chaetoceros constrictus* のみであった。

考察

観測された海域の密度分布から、均質な密度の水塊とその上部の水深10 m以浅に低密度の層が存在することがわかる(図2C)。下層の均質な密度の水塊は塩分濃度が均一で(図2B)、水温も鉛直方向にほぼ一定であった(図2A)。冬季温帯海洋では大気により冷却された表層水が沈降することにより鉛直混合が生じる。各点で測定された10 m以深の均一な塩分濃度、水温、密度は、50 m以深にまで達する鉛直混合を示していた。一方、水平方向の温度の分布をみると、温度は河口付近で低く、沖合に向かって上昇していた。さらに、水深10 m以浅の表層では、下層の均質な水塊に比較して温度の低い水塊が沖に向かって伸長していた(図2A)。密度が高くなる低温であるにも関わらず、表層に水塊が留まっていたのは、河川から流入した淡水に由来し、塩分濃度が低いためであった(図2B)。表層で低温水塊が顕著であることは相模川から流入した低温の淡水により、海水が冷やされたことを示唆していた。冬季の鉛直混合に加えて、低温・低塩濃度の河川水による冷却と塩分成分により、この海域の水塊の密度分布が生じていたと考えられる。表層の水塊には、栄養塩濃度にも大きな変動が認められた。河口と沖合1000 mの表層に認められた硝酸塩とリン酸塩の高い濃度は、低温・低塩分濃度の表層水塊が、高栄養塩濃度の河川水に由来することと対応していた。相模川河口周辺海域には、淡水の流入により直接形成される河口付近の低い塩分濃度の水塊(河川由来水塊)と、河川水と海洋水塊の混合により生じる沿岸域の水塊(沿岸水塊)、さらに、外洋の水塊(外洋水塊)の異なる3つの水塊が区別されることが多い^{3-5, 10-12)}。低温や高い塩分濃度は海水の密度を高める。河川由来水塊の低温・低塩分濃度、外洋水塊の高温・高塩分濃度の特性は海水密度を高くも低くもする要因を含んでいる。沿岸水塊を加えた3つの水塊が同時に存在することで、相模川河口水域に複雑な水塊構造を形成する。これにより生ずる不安定な成層は、河川や深層からの容易な栄養塩供給を可能にし、植物プランクトンの生産性を高めていると予想される、しかし、本研究では、二水塊しか認められなかった。この二水塊の内一つは、低温、低塩分濃度、高栄養塩濃度の特徴をもつ河川由来水塊であり、塩分濃度を指標とすると、河口から4000 m 沖合まで表層10 m以浅に広がっていた(図2B)。この水塊の中で硝酸塩、リン酸塩濃度が高かったのは、沖合1000 mを中心

の表層のみで、表層 10 m ではいずれの栄養塩も全ての測点で低い値であった (図 3)。栄養塩の分布は河川由来水塊の範囲は極めて限定的であることを示していた。一方、10 m 以深の水塊では水温が河口から沖合に向かって上昇する温度勾配が認められた。沿岸に伸長した巨大な外洋の水塊の一部である外洋水塊がほぼ一定の温度であることを考えると、観測された水塊は沿岸水塊としてとらえることができる。水平方向の温度勾配からは (図 2A)、さらに沖合に外洋水塊が存在する可能性が示唆された。

相模川河口の水域に二つの水塊しか認められない単純な海況は 2022 年冬期にも観測されている。三つの水塊が観測された 2021、2020 年で植物プランクトン生物量と比較すると、二つの水塊しか認められない本年のような海況で生物量が低い傾向がある⁹⁾。本研究では低い植物プランクトン生物量は河川由来水塊と河口に近い沿岸水塊で顕著であった。河川由来水塊では高い栄養塩濃度の測点でも、植物プランクトン生物量が低く、栄養塩濃度と生物量は対応していなかった (図 2D、図 3)。この結果は栄養塩の流入後、未だ藻類が増殖を介していない状況を示しており、この観測の後に藻類が増殖する可能性がある。しかし、実際に生物量が増えるかどうかについては、本研究の観測からは推定できない。生物量との対応を検討するためには、継続した観測が必要であった。一方、沖側の沿岸水塊には比較的高い植物プランクトンの生物量が認められた (図 2D)。外洋水塊の影響が殆ど認められなかった 2023 年 1 月と比較すると⁹⁾、5 倍以上の密度の生物量が認められている。この結果は、この海域の一次生産への外洋水塊の重要性を示している。植物プランクトン群集の種組成をみると、外洋水塊の影響を強く受ける 5000 m 沖合の種数が最も多く、その一部の種群が、河口 (0 m) や 1000 m 沖合の試料で認められている。生物量のみならず、さまざまな藻類種群の分布からも、植物プランクトンの供給源としての外洋水塊の重要性を伺うことができる。河口 (0 m) で優占していた *S. costatum* は、5000 m 沖合では優占しておらず、1000 m 沖合で優占していた *Fragilariopsis* spp. は 5000 m 沖合に認められない。近接した海域でありながら、それぞれの測点に特徴的な海況とそれと対応した珪藻種が優占することも、藻類種群の分布状況から推察された。

この海域で特徴的な植物プランクトンの分布に、沖合 1000 m 付近海底の高密度の分布がある (図 2D)^{3-5, 10-12)}。この地点に高い密度で植物プランクトンが存在することについては不明な点が多い。この特異的な分布の解明は、今後の課題であると考えられる。

結論

本研究では 2024 年 12 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河川由来水塊と沿岸水塊と外洋水塊の三つの水塊がしばしば認められる。本研究では河川由来水塊と沿岸水塊しか認められず、高温高塩分濃度の外洋水塊は認められなかった。これと対応して植物プランクトン生物量は少なかった。水温の沖合へ向かっての上昇は 5000 m 以遠の沖合に外洋水塊が存在する可能性を示していた。外洋水塊に最も近い沖合 5000 m の試料に認められた高い種多様性は、この時期の相模川河口水域の生産性の維持に外洋水塊が重要であることを示唆していた。

謝辞

本研究は、2023 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202304) 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) 西條光河, 川延京子, 西本右子, 鈴木祥弘 (2023) 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. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **34**: 65-70.
- 6) Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study(JGOFS) Core Measure Ments(1994UNESCO)
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Tomas C. R. (ed.) (1997) Identifying marine phytoplankton. *Academic press. Inc., San Diego, CA.*
- 10) Omura Takuo (ed.) (2012) Marine Phytoplankton of the Western Pacific. *Kouseisha Kouseikaku Co., Ltd., Tokyo.*
- 11) 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.

- 12) 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.

■短 報■

コンテナ変数を用いたデータ圧縮とそれによる検索時間の ニュース記事とその構成単語の関係データでの評価実験

桑原恒夫^{1,3} 斉藤和巳^{2,4}

Data Reduction and Data Searching times Using Container Variables Regarding Relations between News Documents and words used in the Documents

Tsuneo Kuwabara^{1,3} and Kazumi Saito^{2,4}

¹ Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa, 259-1293, Japan

² Department of Computer Science, Faculty of Informatics, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa, 259-1293, Japan

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

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

Abstract: Data reduction and its effect on the data searching time using container variables were experimentally tested regarding the relations between news documents written in Japanese and words used in the documents. The data size using container variables was reduced approximately 43%. The searching time for documents using a word becomes much shorter when data on main memory are used, whereas the searching time becomes much longer when data from hard disk are used. These results show that the proposed data processing method is useful for data from main memory, as using redis, which is one of the NOSQL databases and records data on main memory.

Keywords: data reduction, container variable, data searching time, data on main memory

序論

ビッグデータの時代を迎え、データの管理はますます重要になってきている。データの管理にはデータベースが好んで用いられ、その中でリレーショナルデータベース（以下、RDB という）はよく使用されている。RDB では正規化といってデータの冗長性を排除したデータ構成でデータを管理するための指針が示されている¹⁾。これに対し、多対多の関係を有するデータについてコンテナ変数という概念を新たに導入し、データサイズをさらに縮小させる方法が提案されている^{2,5)}。その研究では、提案方法の原理と共に、人為的に作成したデータに基づいてその方法（以下、提案方法という）の効果の実験的検証結果が示されている²⁾。

本研究では提案方法を現実世界のデータに適用し、その効果を実験的に検討した。具体的にはネット上に掲載されたニュースを題材とし、各記事中の単語と記事の関係を抽出して従来の RDB における正規化手法でのみで整えたデータと、それに加えて提案

方法で整えたデータを比較した。その結果、提案方法によりデータ量は減少し、またメインメモリ上に保持したデータを用いた場合の検索時間は短縮した。半面、ハードディスク上の RDB に保持したデータを用いた場合の検索時間は増加した。

材料と方法

提案手法の原理

提案手法の原理を Figure 1 に示す具体例を用いて説明する。

Figure 1 の左側の従来の方法では itemA と itemB の関係が全部で 15 対記録されている。これを提案方法のデータ構造に変換すると Figure1 の右側のようになる。そこではコンテナ変数 1 を介して itemA の 1, 2, 3 と itemB の 1, 2, 3, 4 が相互に関連付けられている。データ量はコンテナ変数と itemA の関係で 3 対、コンテナ変数と itemB の関係で 4 対、コンテナ変数では関連付けられない itemA と itemB の関係で 3 対

Conventional method.		Proposed method.	
itemA	itemB	container	itemA
1	1	1	1
1	2	1	2
1	3	1	3
1	4		
1	5		
2	1	container	itemB
2	2	1	1
2	3	1	2
2	4	1	3
2	6	1	4
3	1		
3	2	itemA	itemB
3	3	1	5
3	4	2	6
3	7	3	7
Total 15 records.		Total 10 records.	
		Reduction rate 33.3%.	

Fig. 1. Example of the data translation using the proposed method.

の合計 10 対になる。この 10 対で従来の方法で表現した 15 対の関係と完全に等価な情報を保持できる。この例でのデータ量の圧縮率は約 33.3%である。

用意したデータ

livedoor ニュースコーパス^④から複数の記事をダウンロードし、それらの記事の単語を全て取り出した。

その際、用言も記事中に使われた形態のまま抜き出し、特に終止形に変更するなどの操作は行わなかった。例えば、「使えば」という表現が記事中にあった場合、動詞「使う」の未然形「使え」と助詞「ば」をそのまま抽出した。そして別の個所で「使う」が抽出された場合には「使え」と「使う」は別の種類の単語として整理した。そして利用した記事とその記事から抽出した単語の種類にそれぞれ番号（以下 ID という）を付与し、各記事の ID（以下、documentID という）とその記事中の単語の種類の ID（以下、wordKindID という）を対応付けて記録した。

用意したデータの規模を Table 1 に示す。この表の中の documentID と wordKindID の関係（1,914,788 対）が本研究で使用するデータとなる。

データの変換

Table 1 中の documentID と wordKindID の関係を、提案方法に従い、コンテナ変数（番号で管理、以下その番号を containerID という）を媒介させて 3 つ

Table 1. Size of the tested data

Number of documents	7,367
Number of word kinds	75,024
Number of relations between documentIDs and wordKindIDs	1,914,788
Average number of words for a document	260

のテーブルに変換した（変換のアルゴリズムは文献 2）の Figure 4 参照）。この 3 つのテーブルとは、containerID と documentID の関係を示すテーブル、containerID と wordKindID の関係を示すテーブル、上記 2 つのテーブルでは関連付けられなかった wordKindID と documentID の関係を示すテーブルの 3 つである。

検索実験

(1) 使用したコンピュータ

OS : CentoOS Linux7, 64bit

メモリ : 15.3GB

プロセッサ : Intel Xeon(R) E-2134CUP

3.50GHz × 8

(2) データ検索手法

① RDB 上のデータを利用する場合

RDB 上に作成した全てのテーブルについて、そのテーブルの全てのカラムにインデックス^⑤を設定した。その上でストアドプロシジャを用いて wordKindID から documentID を検索する。

従来技術のデータに対しては、wordKindID から documentID を検索するストアドプロシジャ A と、wordKindID を順次検査させてストアドプロシジャ A を呼び出すストアドプロシジャ B により実行する。

提案方法のデータに対しては、containerID と documentID の関係を示すテーブルを用いて containerID から documentID を検索するストアドプロシジャ C と、containerID と wordKindID の関係を示すテーブルを用いて wordKindID から containerID を検索し、得られた containerID を引数にストアドプロシジャ C を呼び出すストアドプロシジャ D と、wordKindID と documentID の関係を示すテーブルを用いて wordKindID から documentID を検索するストアドプロシジャ E と、wordKindID を順次変化させてストアドプロシジャ D 及びストアドプロシジャ E を呼び出すストアドプロシジャ F の 4 つのストアドプロシジャにより実行する。

② メインメモリ上のデータを使用する場合

Java プログラムを用い、その HashMap オブジェクトを利用してデータを保持し、その保持したデータ上で検索を行う。なお検索時間にはこの

Table 2. Number of relations converted using proposed method

containerID vs documentID	148,403
containerID vs wordKindID	622,702
wordKindID vs documentID	313,422
Total	1,084,527

HashMap オブジェクトにデータを格納するまでの時間は含めない。

従来方法では、key に wordKindID、value にその wordKindID と関連を持つ documentID の集合を格納した HashSet オブジェクトを設定した HashMap オブジェクトを準備する。そしてこの HashMap オブジェクトを用いて wordKindID からそれに関連する documentID を検索する。

提案方法では、3 つの HashMap オブジェクトを利用する。1 つ目の HashMap オブジェクトとして key に wordKindID、value にその wordKindID に対応する containerID の集合を Hash Set オブジェクトとして格納したもの、2 つ目の HashMap オブジェクトとして key に containerId、value にその containerID に対応する documentID の集合を HashSet オブジェクトとして格納したもの、3 つ目の HashMap オブジェクトとして上記 2 つの HashMap オブジェクトでは記録できない wordKindID と documentID の関係を wordKindID を key に、value にその wordKindID に対応する documentID の集合を HashSet オブジェクトとして格納したものを準備する。そして 3 番目の HashMap オブジェクトより wordKindID に対応する documentID を検索するとともに、1 番目の HashMap オブジェクトから wordKindID に対応する containerID の集合を検索し、その集合に含まれる各々の containerID に対応する documentID を 2 つ目の HashMap オブジェクトから検索する。

結果

データ量

提案方法で変換して得られた 3 つのテーブルのデータ量を Table 2 に示す。

Table 2 に示すように 3 つのテーブルで合計 1,084,527 対のデータとなり、変換前に比べて約 43% のデータが圧縮されている。

データ検索時間

従来方法と提案方法について、ハードディスク上のデータから及びメインメモリ上のデータから、全ての wordKindID に対して順次 documentID を検索し

Table 3. Search times for documentIDs from wordKindID

Data storage	Proposed method	Conventional method
RDB (Hard Disk)	24.5	5.6
Main memory	0.86	2.8

(Seconds)

た時の検索時間を Table 3 に示す。

Table 3 に示すように、従来方法、提案方法共に、当然ながらメインメモリ上のデータを利用した時の方がハードディスク上の RDB のデータを使用した時より検索時間は短い。また提案方法は、メインメモリ上にあるデータを利用した時は従来方法より検索時間が短い、ハードディスク上の RDB にあるデータから検索した場合には従来方法より検索時間が長い。最も検索時間が短いのは、メインメモリ上のデータを提案方法で検索した時である。なお Table 3 に示したメインメモリ上のデータ検索時間には、前述のよう RDB からデータを読み取ってそれを HashMap オブジェクトに格納する時間は含めていない。その時間は別途計測しており、それは提案方法、従来方法でそれぞれ 0.20 秒と 0.18 秒であった。なお全ての場合で、検索結果の総数は当然ながら Table 1 の Number of relations between documentIDs and wordKindIDs に示す 1,914,788 件となった。

討論

データ量の圧縮

提案方法によってデータ量の圧縮が離れることは原理的に明らかであり、また文献 2) では人工的に設定したデータで実験的に示されている。しかし本研究で現実世界のデータに基づいてデータの圧縮が行われることを示した事は意味のあると考えている。そしてその圧縮率は約 43% とけして小さくない。このデータの圧縮は、データをハードディスク上に保持する場合はともかく、メインメモリ上に保持して使う場合 (例えば NOS Q L データベースの 1 つである redis⁷⁾ を使う場合など) には大きな利点になりうると考えている。

データ検索時間

提案方法のデータ構造で検索を行った場合、データがメインメモリ上にあれば従来法のデータ構造に対して検索を行う事よりも検索時間を約 31% (つまり 1/3 以下) に縮小できた。メインメモリ上のデータに対する検索時間の縮小は文献 2) でも人工的に設定し

たデータで実験的に示されていた。本研究では現実世界のデータに基づいて検索時間が大幅に縮小された例を実験的に示した。この意義は大きいと考えている。

一方、データがハードディスク上の RDB に保存されていた場合、本方法では従来法より検索時間が増大する。文献 2) で示された人工的に設定したデータを用いた実験では、提案方法と従来法で検索時間はほぼ同等であった。これは、文献 2) で使用されたデータが本研究で用いたデータより提案方法にとって有利なものであった可能性を示している。

提案方法の活用の方向性

提案方法は、データ圧縮の点でも検索時間縮小の点でも、データがメインメモリ上にある場合に真価を発揮する。従って提案方法はデータをメインメモリ上に設定するような場合（前述の redis を利用する場合など）に活用することでその有用性を発揮するものと考えている。

謝辞

掲載の機会を与えて頂いた神奈川大学総合理学研究所の川本所長ならびに編集委員の先生方に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) 奥野幹也 (2015) 理論から学ぶデータベース実践入門. 技術評論社, 東京 など多数
- 2) T.Kuwabara(2020) New Data Structure for Many-to-Many Relations to Reduce Data Size, Recording Time, and Search Time. *Information Engineering Express* 6: 37-52.
- 3) 特許権者：神奈川県大学，発明者：桑原恒夫 (2018) 情報探索装置，探索用プログラム，データベースの更新装置，データベース更新用プログラム. 日本国特許第 6269884 号.
- 4) Patentee Kanagawa University:Inovatoor Tsuneo Kuwabara(2022) Information Search Apparatus, Search Program, Database Update Method,Database Update Apparatus And Database Update Program, for Searching A Specified Search Target Item Associated With Specified Relation Item. US Patent No.11294961
- 5) 特許権者：神奈川県大学，発明者：桑原恒夫：(2022) 情報探索装置，データベースの更新方法，データベースの更新装置，データベース更新用プログラム. 日本国特許第 7185264 号
- 6) <https://www.rondhuit.com/download.html#news%20corpus>
- 7) 本田信也，河野達也，鶴見利章 (2012) NOSQL の基礎知識. リックテレコム, 東京 など多数.

■短 報■

N₂S₂-アミド配位子を有するパラジウム(II)錯体の合成と構造

原田 宝¹ 川本達也^{1,2}

Preparation and Structure of Palladium(II) Complex with N₂S₂-Amido Ligand

Takashi Harada¹ and Tatsuya Kawamoto^{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: kaw@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A sulfur-containing amide compound, which can coordinate to metal ions as an N₂S₂-ligand, was prepared by the reaction of 2-(methylthio)aniline and malonyl chloride. The reaction of palladium(II) acetate with the N₂S₂-ligand afforded a palladium(II) N₂S₂-amido complex, which was characterized by IR and ¹H NMR spectra and X-ray analysis.

Keywords: palladium complex, N₂S₂-amido ligand, X-ray analysis

序論

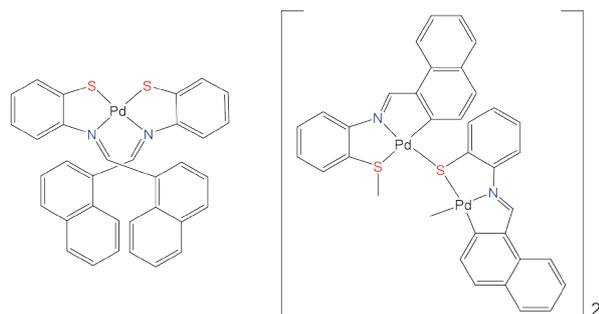
2-(1-ナフチル)ベンゾチアゾリンと酢酸パラジウム(II)の反応からは、四配位平面型シッフ塩基単核錯体と側鎖ナフチル基のオルトメタル化に伴い、シッフ塩基配位子がC,N,Sの三座配位子としてパラジウム中心に配位した硫黄架橋四核錯体(下図)が生成することが報告されている¹⁾。また、その四核錯体は犠牲剤、光増感剤、水素生成触媒から成る水素製造システムにおいて優れた水素生成触媒として機能することも知られている²⁾。一方、シッフ塩基と比較して中心金属への強い電子供与性が期待されるアミド配位子を有するパラジウム錯体の合成例は限られており^{3,4)}、また、同様な水素製造システムにおいて水素生成触媒として活用された例は報告されていない。そこで、本研究では堅牢な水素生成触媒を開発するためアミド部位を有するN₂S₂の四座配位子か

ら成るパラジウム錯体の合成を目的とした。

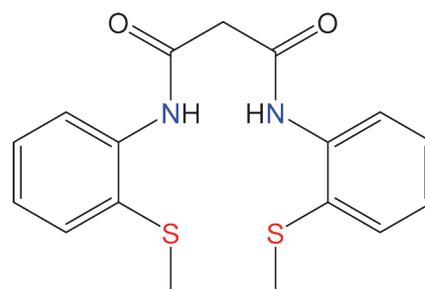
材料と方法

含硫アミド配位子(H₂L)の合成

含硫アミド配位子N,N'-ビス[2-(メチルチオ)フェニル]プロパンジアミド(H₂L)は2-メチルチオアニリンとマロニルクロライドの反応により合成した。具体的には、ジクロロメタン30 mLを溶媒として用い、窒素雰囲気下、2-メチルチオアニリン1.01 g(7.27 mmol)とトリエチルアミン0.739 g(7.30 mmol)を加え、さらにマロニルクロライド6.05 g(43.0 mmol)を加えた。室温で20時間攪拌した後、反応溶液がpH 1になるまで1 Mの塩酸を加えた。生成物をジクロロメタン(20 mL×2)で抽出した後、飽和食塩水(20 mL×2)と水(10 mL)で洗浄した。得られた



シッフ塩基 Pd^{II} 単核錯体と Pd^{II} 四核錯体の構造



含硫アミド配位子 (H₂L)

橙色のろ液を硫酸ナトリウムで乾燥し、さらに、硫酸ナトリウムをろ別後、残ったろ液を減圧乾固することで目的物を得た。

含硫アミドパラジウム(II)錯体(Pd^{II}L)の合成

含硫アミドパラジウム(II)錯体は、含硫アミド配位子(H₂L)と酢酸パラジウム(II)の反応から合成した含硫アミドパラジウム(II)錯体(Pd^{II}L)の1,2-ジクロロエタン溶液の吸収、IRおよび重クロロホルム溶液の¹H NMRスペクトルをそれぞれ図3, 4, 5に示す。吸収スペクトルでは420 nm付近に配位子では見られなかった吸収ピークが観測され、IRスペクトルでは配位子で観測されたN-Hの伸縮振動が消失した。また、¹H NMRスペクトルではNHプロトンのシグナルが消失し、配位子とは化学シフトの異なる芳香族プロトンのシグナルが6.80~8.80 ppm付近に観測された。これらの

結果

含硫アミド配位子(H₂L)の分析

含硫アミド配位子(H₂L)のIRおよび重クロロホルム溶液の¹H NMRスペクトルをそれぞれ図1と図2に示す。IRスペクトルにはN-Hの伸縮振動が3250 cm⁻¹付近に観測された。また、¹H NMRスペクトルには芳香族プロトンのシグナルが7.00~8.50 ppmに観測され、CH₂とNHプロトンのシグナルが3.60 ppmと9.30 ppm付近にそれぞれ観測された。これらの測定結果から、目的物の生成を確認することができた。

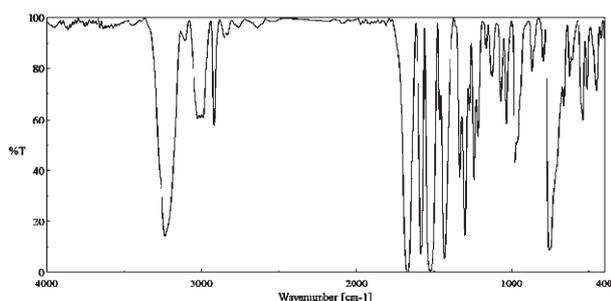


図1. H₂LのIRスペクトル.

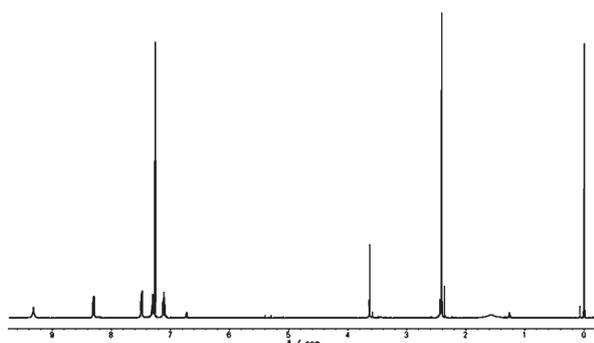


図2. H₂Lの¹H NMRスペクトル (in CDCl₃).

含硫アミドパラジウム(II)錯体(Pd^{II}L)の分析

含硫アミド配位子(H₂L)と酢酸パラジウム(II)の反応から合成した含硫アミドパラジウム(II)錯体(Pd^{II}L)の1,2-ジクロロエタン溶液の吸収、IRおよび重クロロホルム溶液の¹H NMRスペクトルをそれぞれ図3, 4, 5に示す。吸収スペクトルでは420 nm付近に配位子では見られなかった吸収ピークが観測され、IRスペクトルでは配位子で観測されたN-Hの伸縮振動が消失した。また、¹H NMRスペクトルではNHプロトンのシグナルが消失し、配位子とは化学シフトの異なる芳香族プロトンのシグナルが6.80~8.80 ppm付近に観測された。これらの

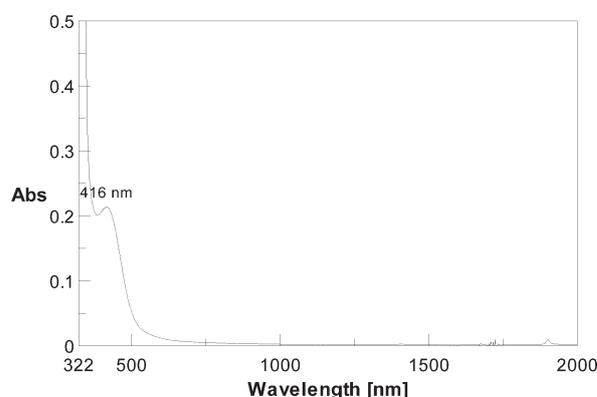


図3. Pd^{II}Lの吸収スペクトル (in ClCH₂CH₂Cl).

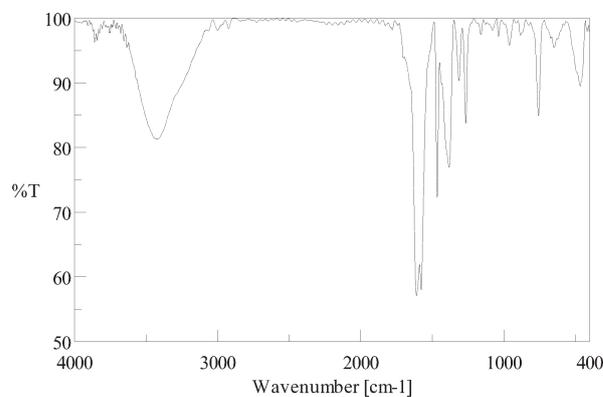


図4. Pd^{II}LのIRスペクトル.

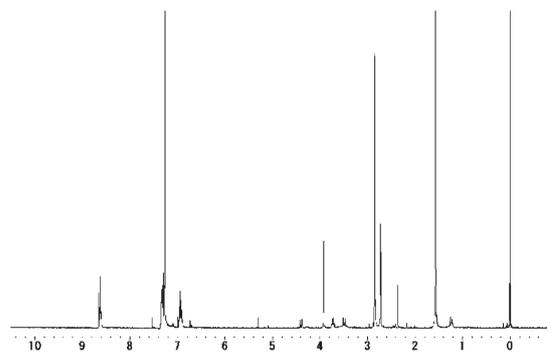


図5. Pd^{II}Lの¹H NMRスペクトル (in CDCl₃).

結果はパラジウム(II)錯体の生成を示す。

含硫アミドパラジウム(II)錯体($Pd^{II}L$)は1,2-ジクロロエタン/ペンタンの蒸気拡散法にて結晶化し、得られた針状結晶についてX線結晶解析を行った⁵⁾。その結果をORTEP図として図6に示すとともに中心金属周りの結合長と結合角を表1にまとめた。

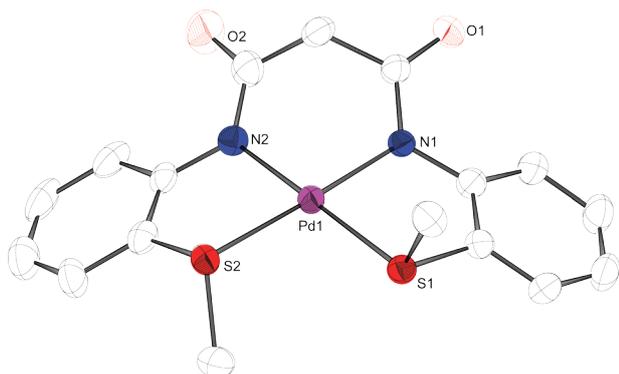


図6. $Pd^{II}L$ のORTEP図。

表1. $Pd^{II}L$ の結合長(Å)および結合角(°)

Pd(1)-N(1)	2.025(5)	Pd(1)-N(2)	2.041(6)
Pd(1)-S(2)	2.270(2)	Pd(1)-S(1)	2.278(2)
N(1)-Pd(1)-N(2)	93.4(2)		
N(1)-Pd(1)-S(2)	176.98(17)		
N(2)-Pd(1)-S(2)	83.55(18)		
N(1)-Pd(1)-S(1)	84.48(17)		
N(2)-Pd(1)-S(1)	174.96(18)		
S(2)-Pd(1)-S(1)	98.49(8)		

討論

N_2S_2 配位パラジウム(II)アミド錯体の性質

X線結晶解析により、合成したパラジウム錯体はア

ミド配位子が N_2S_2 配位した四配位平面型パラジウム(II)単核錯体であることがわかった。N,S配位の二座配位子が2つ配位した対応するシッフ塩基パラジウム(II)錯体と比較したところ、Pd-S間の結合長(シッフ塩基錯体のPd-S: 2.270(3) Å, 2.275(3) Å)には大きな違いは見られなかったが、Pd-N間の結合長(シッフ塩基錯体のPd-N: 2.089(7) Å, 2.096(7) Å)は今回合成したアミド錯体の方が短くなっていた。これはアミド配位子による強い σ ドナー性によるものと考えられる。したがって、この短いPd-N間距離は四座配位子によるキレート効果と相まって、錯体に高い堅牢性をもたらすことが期待できる。また、溶液中でもこの構造を保持していることは吸収および 1H NMRスペクトルにより確認されており、今後は、この錯体を水素生成触媒とする水の光還元反応について検討する予定である。

文献

- 1) Kawamoto T, Nagasawa I, Kuma H and Kushi Y (1996) Pd \cdots H-C Interactions. Preparation and Structure of Orthometalated Tetranuclear Complexes of Palladium(II) and Platinum(II). *Inorg. Chem.* **35**: 2427-2432.
- 2) 鈴木寿藍 (2019) パラジウム(II)四核錯体の合成と水の光還元反応における触媒作用. 神奈川大学理学部化学科卒業論文.
- 3) Kawamoto T, Suzuki S and Konno T (2007) Synthesis and characterization of cyclometallated palladium(II) and platinum(II) complexes with amide-thiolate ligands. *J. Organomet. Chem.* **692**: 257-262.
- 4) Atiga S, Saunders GC, Lane JR and Henderson W (2024) Thiosalicylanilide complexes of nickel(II), palladium(II) and platinum(II). *SSRN-id4732427*.
- 5) 結晶学的データ: Mo $K\alpha$ 線; $C_{17}H_{16}N_2O_2PdS_2$; $M = 450.84$; 三斜晶系; $a = 7.616(5)$, $b = 10.225(6)$, $c = 11.889(7)$ Å, $\alpha = 90.622(11)^\circ$, $\beta = 98.576(11)^\circ$, $\gamma = 109.649(14)^\circ$; $V = 860.3(9)$ Å³; $T = 200$ K; 空間群 $P-1$ (no. 2); $Z = 2$; 精密化後のR因子 $R1 [I > 2\sigma(I)] = 0.0620$, $wR2$ (all data) = 0.1432.

■報告書■

一般講演会「ギンナンと人間の関わり」報告書

内田英伸^{1,2,3} 吉田 洋¹ 内田美重^{1,4}

Report on the Public Lecture “*Ginkgo* Nuts and Humans”,
Which Was Held in Sobue, Inazawa, Aichi, Japan

Hidenobu Uchida^{1,2,3}, Hiroshi Yoshida¹ and Yoshie Uchida^{1,4}

¹ Department of Food Business, School of Health and Human Life, Nagoya Bunri University, Inazawa City, Aichi 492-8520, Japan

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

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: uchida.hidenobu@nagoya-bunri.ac.jp

⁴ Present address: Graduate School of Environmental and Human Sciences, Meijo University, Nagoya City, Aichi 468-8502, Japan

Abstract: During the 26th Sobue Yellow Leaves Festival, the public lecture “*Ginkgo* nuts and humans” was given in the Lifelong Learning Center in Inazawa, Aichi, Japan on November 23, 2023. Invited speakers gave speeches, entitled : “Coalition of a university with the neighboring region and activities of student volunteers” and “Japanese *Ginkgo* researchers” .

Keywords: *Ginkgo biloba*, public lecture, regional development, university student volunteers

背景

イチョウの祖先はジュラ紀に繁栄したとされ¹⁾, その葉には認知症抑制などの特有な医薬効果²⁾のある二次代謝産物が含まれる³⁾。その種子の中央部(雌性配偶体)⁴⁾であるギンナン可食部は日本の主要な食材の1つであり、炭水化物、カロテノイドに富んでいる⁵⁾。ギンナン(種子の内表皮・石層部と雌性配偶体)は漢方薬の白果として中国から日本に伝来し、イチョウは明治時代の近代植物学において主要な研究対象となった^{6,7)}。1896(明治29)年4月25日の東京植物学会の例会で平瀬作五郎は、当時のヨーロッパの植物細胞学の泰斗がなしえなかった“イチョウ精子の発見”を発表、さらに泳ぐ精子の挙動を同年9月26日に同例会で講演⁸⁾、その内容を植物学雑誌10月号に掲載し⁹⁾、受粉から受精の過程を仏文で報告した^{10,11)}。その後、日本の植物学界ではイチョウに関する遺伝学、細胞学の研究がさかんに進められた¹²⁾。

ギンナンの都道府県別収穫量において愛知県は1991年から全国で断然第1位であったが、1996年以降大分県と首位を争い、2016年から2021年に第2位となっている¹³⁾。愛知県では県西部の稲沢市祖父江町を中心とする木曾川左岸地帯にイチョウの栽

培地域が集中していることが知られており¹⁴⁾、江戸時代この地域から優良な園芸品種が育種された¹⁵⁾。

愛知県稲沢市にある名古屋文理大学は健康科学と情報科学の融合の基、フードビジネス学の教育を行い、地域の振興に資するべく地場産食材を用いた食商品の開発^{16,17)}、地域イベントへの学生ボランティアの派遣を通し、地元の団体と連携活動を行ってきた。

このような状況下のもと、イチョウに関する情報発信の拠点を愛知県稲沢市に構築、全国にむけ発信することは重要である。その第一歩として、同市祖父江町において一般向け学術講演会を開催することとした。

講演会

講演会名

「第26回そぶえイチョウ黄葉まつり」の1イベント、特別講演会「ギンナンと人間の関わり」として開催した。

講演内容

祖父江町商工会会長の挨拶に続き、名古屋文理大学教員が講演、最後に、商工会副会長が挨拶した。

開催日時

2023年11月18日から26日に開催された黄葉まつり期間中の11月23日(祝)の13:00～14:00に講演会を実施した。

会場

講演会の会場は愛知県稲沢市祖父江生涯学習センター・ソブエル・多目的ホールとした(図1)。

広報活動

2023年10月末から講演会開催前日までの間、A4紙のチラシを稲沢市、あま市、一宮市、名古屋市の公立図書館に配布し、A3のポスターを地元のスーパー、飲食店、中学校、高等学校、商工会などに持参し、掲示を依頼した。

参加登録

事前登録のGoogle Formを制作、2次元バーコードにリンクさせ、チラシとポスターに印刷した。

講演内容

第1講演「名古屋文理大学による地域振興・ボランティアの取り組み」

吉田洋が担当。祖父江のギンナンによる地域活性化を成功させるためには、強いリーダーシップを持った中心人物の存在や、地域住民・地方自治体の意識の強さ等が必要である。経営学の基礎的な理論に従えば、ヒト そぶえ黄葉まつりなど大学生のボランティア、小中学生のギンナン理科教育による人材育成、モノ ギンナンの品質、加工のしやすさ、ギンナンを用いた特産品、カネ 地方・国・企業・団体の援助金である^{16, 17)}。学生のボランティアや大学の地域連携センターを通じた研究・教育活動が祖父江のギンナンによる地域活性化に貢献できることを強調した。

第2講演「日本人のイチョウ研究」

内田英伸が担当。2023年のNHK朝の連続テレビ小説「らんまん」に登場した人物¹⁸⁾とそのモデルとなった人物である、平瀬作五郎、矢田部良吉、池野成一郎ほかの植物学者^{6, 19, 20, 21)}を対比しつつ、ギンナンの有用成分について解説した(図1)。

会場内の入り口付近に受付を設け、受付脇で第一演者のスライドの配布資料、名古屋文理大学地域連携センターの紹介冊子、イチョウに関する参考図書、同大学学生のイチョウに関する調査発表ポスターを展示した(図2)。

来聴者

来聴者は総計で12名であった。事前登録者は9名、当日参加者は3名であった。参加者の内訳は、祖父江町商工会事務局職員2名、名古屋文理大学の教員(演者以外)、卒業生、在校生が各1名、一般来聴者7名であった。

アンケート

講演会への来聴者の感想を基に次回講演会への改善点を把握するため、アンケートを実施した。講演に対する感想を選択式で3問、自由記述で2問回答してもらった(表1)。

アンケートの内容は以下の通りである。

- 事前登録はされましたか。
参加登録した 参加登録していない(当日参加)
- 本日の講演はいかがでしたか。
大変興味をもった すこし興味をもった
あまり興味をもたなかった 全く興味をもたなかった
- 本日の講演に満足されましたでしょうか。
とても満足 やや満足 やや不満



図1. 講演の様子。



図2. ポスター・書籍の紹介。

表 1.

感想	お気づきの点	事前登録	講演はいかがでしたか	満足度
イチョウ、ギンナンについていろんな事を知ることができて、とてもよかったです。身近なイチョウと朝ドラのつながり、興味をうまくひかれました。	もっと、多くの方にも聞いていただきたいお話でした。広くいろんな場所で告知されてほしかったです。たまたま来れてラッキーでした。	した	大変興味を持った	とても満足
もっと研究が進むべきと感じました。行政とタイアップして地域の特性を同時に銀杏の研究が進むことを期待したい。	多くの人たちに共有して行って欲しい。（これからも）	した	大変興味を持った	とても満足
関心あるテーマでありありがとうございました。	〇〇先生〔第二演者〕の持帰り資料を用意していただけると良かった。	した	大変興味を持った	とても満足
「祖父江のぎんなん」・・・意外と地味な存在ですので様々な機会でのPRすることは重要です。今回はその機会として大変参考になりました。	本学〔名古屋文理大学〕の学生にも広報すれば、参加学生が出るかも知れません。（交通の確保が課題ですが）	していない	大変興味を持った	とても満足
イチョウ研究の歴史が理解できて良かった。		した	大変興味を持った	とても満足
中心人物・地域住民＝ヒト そのサポート体制が必要ということが分かりました。祖父江のギンナンを中心に特産品を大事にしたら良い、地元愛を大切に地域の財産を有効活用してほしいです。ギンナンは炭水化物が多い（ダイズやゴマは油が多い）血流促進に良いので旬の時期に食べるようにしたいです。金兵衛がなぜ早く収穫できるか分かりました。		していない	大変興味を持った	とても満足
参加者は少なかったけれど、文理大学の活動内容がとても良くわかり満足しました。		した	大変興味を持った	
ギンナンと人のながれが良くわかりました。専門的な言葉がありもう少しかみくだいたお話であると良いと思います。ありがとうございました。		した	大変興味を持った	やや満足
地域活性化と銀杏のお話、大変興味深く聞かせて頂きました。		していない	すこし興味を持った	とても満足
地域振興の対〔象〕とか、生産・販売の拡大という面では、いろいろな人がかわり努力されていることがわかった。ただ、消費者としては、価格とかぎんなん利用法、栄養面なども聞きたかった。イチョウの研究の話はよかったが、資料がなくてよくわからなくて残念。	日本史でぎんなんが文献に表れたのはいつごろか、庶民の生活にとってぎんなんはどのように位置づけられていたかなど歴史の話もききたかった。祖父江町の小学校では、自由研究のテーマにぎんなんが取り上げられることも多いと思われるが、子どもたちの発表も聞いてみたい。	した	すこし興味を持った	やや満足
ぎんなんの効能を広く知ってもらえると良いと思いました。		した	すこし興味を持った	やや満足
もっと身近な内容を〔基〕に色々話しが聞きたかった！話が難しすぎて、あまり内容が良くわからなかった！！二人目の講師の話はすごく良かった！	もっと、分かりやすく、親しみのある内容で、話しを進めてほしかったです！！	した	あまり興味を持たなかった	やや不満、やや満足

斜線部は無回答。

誤植、分かりにくい語句には〔 〕で挟んだ語句を補った。

□とても不満

4. 本日の講演について、ご感想をお書きください。
5. 講演会でお気づきの点などありましたら、お書きください。

来聴者に会場でアンケート用紙とクリップ鉛筆を配り、講演会終了後、受付に設置したアンケート回収箱に投入してもらった。

「講演会はいかがでしたか」への12名の回答を調べた結果、「大変興味を持った」、「少し興味を持った」という回答が11人、「あまり興味をもたなかった」が1人であった(表1)。この結果から、来聴者の多くが講演に満足していたと思われる。その一方、「あまり興味をもたなかった」と回答した人は、「話が難しすぎて、あまり内容が良く分からなかった」と記していた。また、他の参加者から「専門的な言葉があり、もう少しかみくだいたお話であると良い」というコメントもあった。後者は、「講演はいかがでしたか」の問いに対し、「大変興味をもった」、「講演に満足しましたか」の問いに対し「やや満足」と回答していたことから、講演には概ね満足したものであるが、説明をより平易にすることで、さらに満足度が高まった可能性がある。

「大学の活動内容が良く分かった」、「地域振興の対[象]とか、生産・販売の拡大という面では、いろいろな人がかわり努力されていることがわかった」、「地域活性化と銀杏のお話、大変興味深く聞かせて頂きました」、「中心人物・地域住民=ヒト それのサポート体制が必要ということが分かりました」、「文理大学の活動内容がとても良くわかり満足しました」という回答があったことから、来聴者は概ね第1講演に満足していたと思われる。

また、第2講演に対し、「身近なイチョウと朝ドラのつながり、興味をうまくひかれました」、「ギンナンと人のながれが良くわかりました」、「イチョウ研究の歴史が理解できて良かった」というコメントが得られ、来聴者に概ね満足してもらえたと思われる。

今後の展望

今回の講演会では、チラシ、ポスターの配布の開始が講演会の1か月前で、周知期間が短かった。そのため、「広くいろんな場所で告知されてほしかったです」、「多くの人たちに共有して欲しい。(これからも)」、「本学[名古屋文理大学]学生にも広報すれば、参加学生が出るかも知れません」という自由記述が見られた。また、第1講演のスライド配布資料は準備されていたが、第2講演のは無かったため、来聴者から「[第2演者]の持帰り資料を用意していただけると良かった」、「イチョウの研究の話はよかつ

たが、資料がなくてよくわからなくて残念」との指摘を受けた。次回はこの点を改善したい。

展示した書籍は、専門書が多かったためか、手にとってじっくり見る来聴者はあまりいなかった。しかしながら、学生が制作したポスターは講演会の前後にゆっくり閲覧していた人がいた。

参加者に大学生、その卒業生がいたものの、高校生、中学生、小学生の参加がなかった。「祖父江町の小学校では、自由研究のテーマにぎんなんが上げられることも多いと思われるが、子どもたちの発表も聞いてみたい」というコメントがあり、今後、地域の学校の生徒・学生への参加をさらに促す必要がある。

また、第2講演で、イチョウ葉に含まれる脳の血流促進物質であるギンコライドなどの話を盛り込んだものの、「ぎんなん利用法、栄養面なども聞きたかった」、「ギンナンは炭水化物が多い(ダイズやゴマは油が多い)血流促進に良い」というコメントがあったことから、栄養素の話を取り上げることが重要であると思われる。

謝辞

本講演会では、祖父江町商工会の田中浩三氏、日比郁夫氏にご挨拶いただき、また、小澤康彦氏、足立尚氏、藤井佑哉氏には企画、運営にご参画いただいた。神奈川大学化学生命学部の井上和仁教授にはご支援をいただいた。この講演会は2021～2023年度の「名古屋文理大学の学長裁量枠I(908001)」の助成を受けた。ここに御礼申し上げる。本報告に開示すべき利益相反(Conflict of interest)状態はない。

文献

- 1) クレイン P, [矢野真千子翻訳] (2021) *イチョウ 奇跡の2億年史*. 河出書房新社, 東京.
- 2) DeFeudis FV and Drieu K (2000) *Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. Current Drug Targets. 2000: 25-58.*
- 3) vanBeek TA (2000) *Ginkgo Biloba (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles)*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 4) 長谷部光泰 (2020) *陸上植物の形態と進化*. 裳華房, 東京.
- 5) 文部科学省 (2021) *日本食品成分表 2022 八訂 栄養計算ソフト・電子版付*. 医歯薬出版, 東京.
- 6) 長田敏行 (2014) *イチョウの自然誌と文化史*. 裳華房, 東京.
- 7) 長田敏行 (2020) イチョウ特集号によせて. *生物の科学 遺伝* 74: 494-498.
- 8) 東京植物学会録事 (1896) *植物学雑誌* 10: 171-172.
- 9) 平瀬作五郎 (1896) いてふノ精虫ニ就テ. *植物学雑誌* 10: 325-328.
- 10) Hirase S (1895) *Études sur la fécondation et l'*

- embryogénie du *Ginkgo biloba*. 帝国大学紀要理科 8: 307-322.
- 11) Hirasé S (1898) Études sur la fécondation et l'embryogénie du *Ginkgo biloba*. (Second mémoire.) 東京帝国大学紀要理科 12: 103-149.
 - 12) Hori T, Ridge RW, Tulecke W, Del Tredici P, Trémouillaux-Guiller J and Tobe H (1997) *Ginkgo Biloba a Global Treasure: from Biology to Medicine*, Springer, Tokyo.
 - 13) 農林水産省 (2024) 分野別分類 / 作付け面積・生産量, 家畜の頭数など, 特産果樹生産動態等調査, 長期累年, 特産果樹生産出荷実績調査累年統計, かんきつ類以外の果樹【落葉果樹】. 統計情報. [https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukuei=00500503&tstat=000001020907&cycle=0&year=20210&month=0&tclass1=000001034278]
 - 14) 溝口晃之 (1982) 尾張平野北西部の銀杏栽培の地理学的研究. 地理学報告 55:15-22.
 - 15) 城山桃夫, 棚田幸雄, 高瀬尚明 (1955) 中島郡に於ける銀杏の栽培と品種について. 愛知県園芸試験場年報 1954: 213-220.
 - 16) 関川靖, 山田ゆかり, 吉田洋 (2011) 地域振興におけるフードビジネス研究の貢献. 名古屋文理大学特色ある研究 IV 最終報告書, 平成 20 年度～平成 22 年度.
 - 17) 関川靖, 山田ゆかり, 吉田洋 (2014) 地域振興におけるフードビジネス研究の貢献—人材育成と大学教育の視点から—. 名古屋文理大学特色ある研究 IV 最終報告書, 平成 23 年度～平成 25 年度.
 - 18) 阿部俊行, 山田結以 (2023) 連続テレビ小説 らんまん Fanbook. 宝島社, 東京.
 - 19) 本間健彦 (2004) 「イチョウ精子発見」の検証—平瀬作五郎の生涯. 新泉社, 東京.
 - 20) 中野実 (1999) 東京大学物語：まだ君が若かったころ (歴史文化ライブラリー, 71). 吉川弘文館, 東京.
 - 21) 小倉謙 (1940) 東京帝国大学理学部植物学教室沿革：附理学部附属植物園沿革. 東京帝国大学理学部植物学教室.

■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 (12)

加部義夫^{1,2}

Organometallic Chemistry Based on Reaction Types and Anecdote of Discoveries (12)

Yoshio Kabe^{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: kabe@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Organic compounds containing carbon-metal bonds are called organometallic compounds. Such compounds have been known and studied since the 19th century and have been widely used to effect synthetic transformation in modern organic chemistry. Many educational benefits may result from the use of reaction types and discovery episodes for undergraduate and graduate classes in organic and organometallic chemistry. Organometallic reactions were categorized into several types of metathesis reaction, depending on the combination of σ and π -bonds, such as σ - σ bond, σ - π bond, and π - π bond metathesis. Most early work in π - π bond metathesis reactions was conducted using ill-defined multicomponent catalyst systems. In 1971, Chauvin proposed the now widely accepted metal carbene mechanism, which was described in a previous article in this series. Subsequently, in the early 1990s, Schrock and Grubbs reported the well defined single component Mo- and Ru-carbene complex catalysts, respectively. In this article, discoveries and the development of these Mo- and Ru-carbene catalysts are outlined.

Keywords: π - π bond metathesis, Schrock Mo-carbene catalyst, Grubbs Ru-carbene catalyst

はじめに

このシリーズでは、有機金属の素反応を一般的なヒドロメタル化反応とカーボメタル化反応をのぞいて、結合の組換え反応として、 σ - σ (C-H 活性化)、 σ - π 、 π - π 結合メタセシス反応に分類し紹介した。すでに取り上げた π 結合メタセシス反応(1)では不均一系の π - π 結合メタセシスの反応機構が推定され、Chauvinの金属カルベン中間体を經由する機構が提唱された¹⁾。今回は π 結合メタセシス(2)として、その後のSchrockらのWやMoカルベン錯体やGrubbsらのRuカルベン錯体などの実用的な均一系触媒がどのように開発されてきたかについて見てゆきたい。

π 結合メタセシス (2)

2012年、Dupont社のNügentが“Black Swan Event in Organic Synthesis”というタイトルで有機合成のいくつかの発見のエピソードについてのエッセ

イを執筆している^{2,4)}。Black Swanは童話の「醜いアヒルの子」のことである。研究上の発見はよくセレンディピティー(セイロンの王子たちが旅先で予想外なものを発見するお話)という言葉とともに語られる意外な発見が付きものである。その場合は最初から発見されたものの真価が理解されている。一方、Black Swanについては、はじめは、一見今までの常識(conventional wisdom)に反して受け入れられないが、その理解と普及に時間と年数がかかる発見のことをさす。Nügentは、常識に反した結果であるが、それが新しい常識に漸進的(evolutional)ではなく革新的(revolutional)な発展する研究のことをBlack Swanにたとえている。そしてNügentのエッセイの中で、5つのrevolution的な研究と5つのevolution的な研究の発見のエピソードについて紹介している。その最初の5つのうちの1つとしてメタセシス触媒反応を取り上げている。

π - π 結合メタセシス反応の発見も石油化学工業にその端を発している。すでに1960年、米国Phillips社でプロペンをエチレンと2-ブテンにWO₂/SiO₂触媒で不均化する反応(トリオレフィン法)が工業化されたことは紹介した⁵⁾。Nügentのエッセイによると他にもDupont社、Standard Oil of India社でもほぼ同様に研究がなされていたようである²⁾。彼は π - π 結合メタセシスが知られるようになったのはCaldranの研究であるとしている。Caldranの研究については、すでに π 結合メタセシス(1)のところで紹介している¹⁾。その反応を再び示す(式1)。



この反応は、Nattaの環状オレフィンのZ-N触媒反応は環歪みでアリリックのC-C結合が切断され重合するという反応機構に反対し、歪みのない鎖状オレフィンでも反応が進行することを示したものである。Nügentは彼のエッセイで、Caldranの論文には引用文献がまったくないことに驚きを隠さず述べている。すなわちその当時、 π - π 結合メタセシス反応がいかに新規性の高いかを示すエピソードである。

Caldranの研究をうけて、Chauvinがメタラカルベンを中間体とするメタセシス機構(図1a)を提唱した。しかしその当時知られていたFischer型W(Mo)カルベン錯体にはそのような反応の報告はまっ

たくなく、反応性の高いメタラカルベンが関与するとは信じられなかった。その後2013年、Chauvinはカルベン錯体触媒を開発したSchrockとGrubbsらとともにノーベル化学賞が授与されることになる⁶⁻¹³⁾。一方Collman研でPhillips社のメタセシス反応の話を一早く聞くことがあったGrubbsはこの研究を生涯の研究テーマとして、その反応機構やチタナカルベン錯体を用いたメタセシスの研究をしたこともすでにこのシリーズで紹介した⁵⁾。チタナカルベン錯体の取り扱いの難しさを熟知していたGrubbsはRuカルベン錯体の開発にシフトするが、そのきっかけになったのがSchrockらのW(Mo)カルベン錯体の開発と、何よりSchrockとの出会いがRuカルベン錯体の開発に大きなきっかけをつくっている。これについては後述する。

最初にSchrockらによるカルベン錯体の開発の経緯から紹介する。SchrockはHarvard大で学位を取得後、渡英しポストドク後、Dupont社のPharshallらの有機金属研究のチームに所属し、Taカルベン錯体の合成に成功する(式2-1, 式2-2)¹⁴⁾。彼はその後MITに移ると同時に、メタセシス金属触媒の研究を展開することになるが、それについては彼のノーベル賞受賞講演¹¹⁾と関連した総説¹³⁾に詳しい。Schrockはまず自分の開発したTaカルベン錯体を用いて π - π 結合メタセシス反応が実現しないか様々検討した^{14, 15)}。しかしオレフィンと[2+2]付加したタンタラシクロブタン中間体から β -水素脱離と続く転位反応してオレフィンが生成した(式3, 図1b)。エチレンを過剰に用いた場合には、ルテナメチリデン中間体が2量化して分解したエチレン錯体を与えた(図1b)。

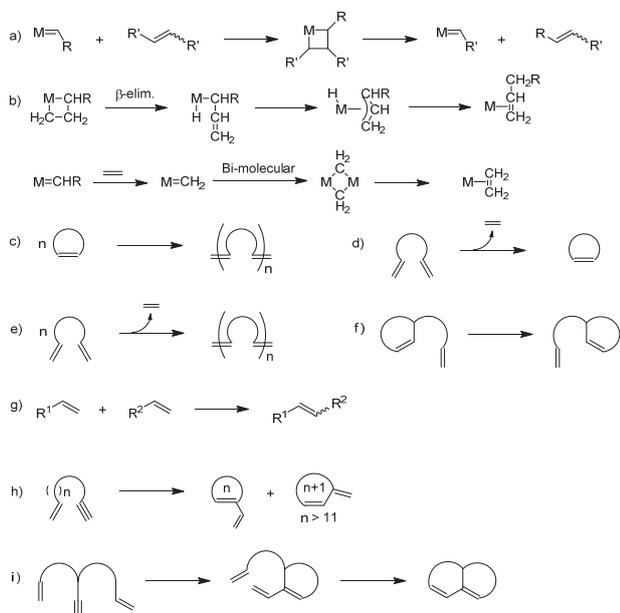
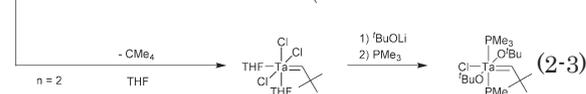
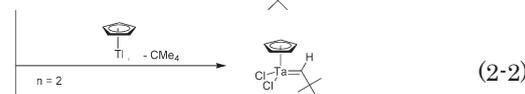
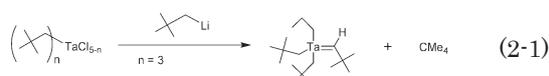
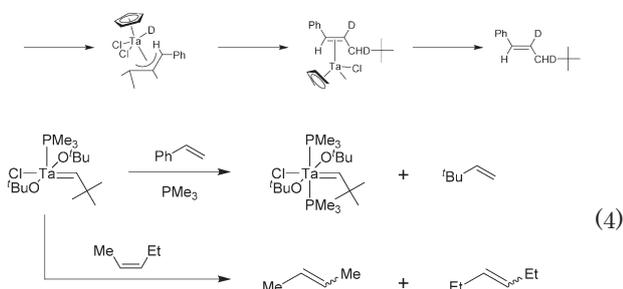
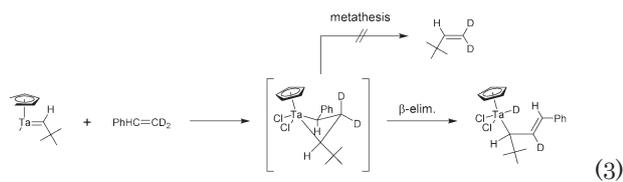


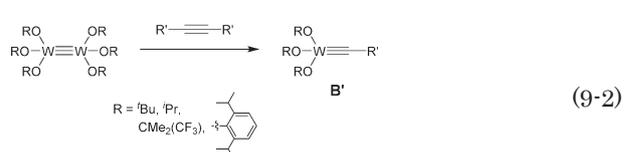
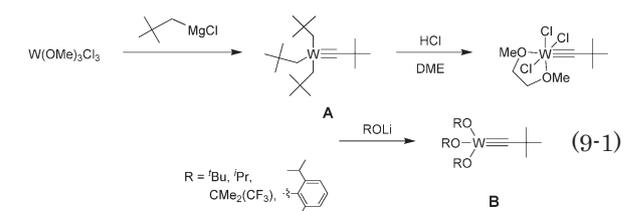
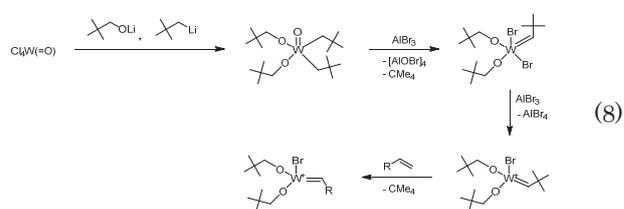
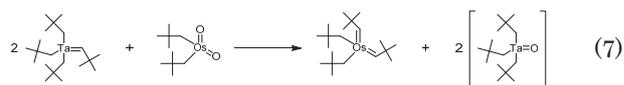
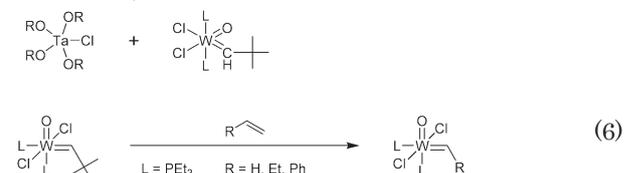
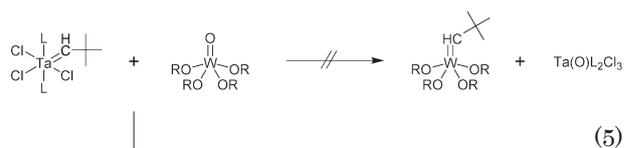
図1. π - π 結合メタセシス反応。a) Chauvin機構, b) メタラシクロブタン中間体の分解, c) 開環メタセシス重合(ROMP), d) 閉環メタセシス反応(RCM), e) 非環式ジエンメタセシス重合(ADMET), f) 閉環メタセシス反応(ROM-RCM), g) 交差メタセシス反応(CM), h) 閉環エンイン-メタセシス反応(RCEYM), i) ジエンイン-メタセシス反応(RCDEYM)。



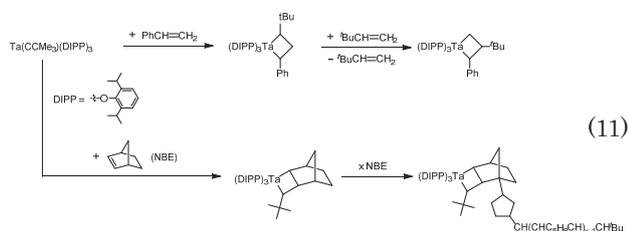
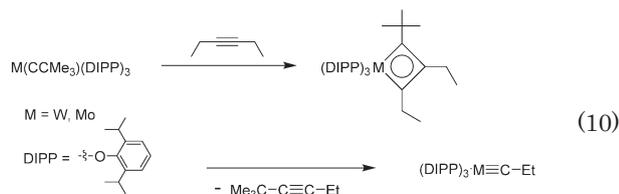
こうした中Schrockは新しいネオペンチリデン型のメタラカルベン合成法をさらに開発し、 π - π 結合メタセシスを実現させる。ひとつは配位性のTHFを溶媒とするとペンタン中でも安定な(tBuCH₂)₂TaCl₃が一度生成し、続いてネオペンタン脱離反応を起こしてCl₃(THF)₂Ta=CH^tBuが生成する(式2-3)。このネオペンチリデン基を有するルテナウム塩化物は有用な合成中間体で、^tBuO基を導入したネオペンチリデン型カルベンが β -水素脱離せずに、初めてス



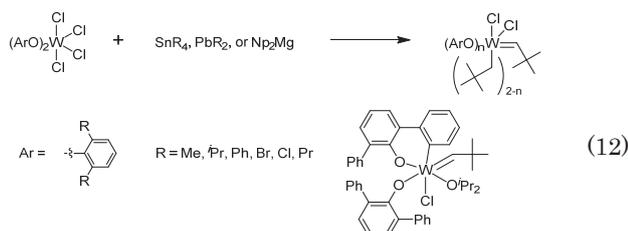
チレンや2-ペンテンと π - π 結合メタセシスを引き起こした(式4)¹⁶⁾。もう一つは、メタルオキシド基を有するネオペンチリデン型カルベンで、この場合は $W=O$ とネオペンチリデン基を有するタンタル塩化物とのWittig型反応を期待して反応を行ったところ予想外のオキソタングステンネオペンチリデン錯体が生成した(式5)。しかもこの予想外の生成物は1-ブテンやスチレンと π - π 結合メタセシス反応を起こしたのである(式6)¹⁷⁾。ちなみにSchrockはオスmiumオキシド($Os=O$)とタンタルネオペンチリデンではWittig型反応を起こし、ビスオスmiumカルベン錯体が生成することを後年に報告している(式7)¹⁸⁾。上記2つの新反応(式4と6)を論文発表に先立ち、1979年のフランスのリオンで開催された第3回オレフィンメタセシスに関する国際会議(ISOMIII)で発表している。これらが示すものは、嵩高いアルコキシ基やオキシ基がメタラシクロブタン中間体における β -水素脱離を押さえて、メタセシス反応を促進させるということである。Schrockらは彼の総説に必ず引用しているが、1980年ほぼ同じころOsbornらにより行なわれてたオキシおよびネオペンチルオキシタングステンネオペンチリデン錯体の研究とそのメタセシス反応活性の研究が、彼の研究にも少なからず影響を与えていると思われる(式8)^{19, 20)}。この嵩高いアルコキシ置換基の導入がメタセシス反応活性の発現を決定的にすることは、Schrock自身によるタングステンアルキン錯体の研究でも示されている^{11, 13, 15, 21-23)}。すなわちタンタルカルベンと同じ反応でアルキル基置換ネオペンチリジン錯体(A)からアルコキシ置換カルビン錯体(B)が合成できる(式9-1)。この反応はタンタルのネオペンチリデン錯体(式2-1)と同様、すでにこのシリーズで紹介した¹⁾。中周期金属なので、前周期金属 σ 結合メタセシスで生成するのか、そうでないのか、



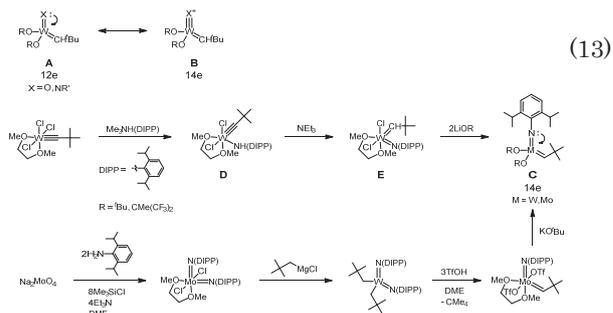
Schrockらにはもっぱら塩基(Grignard試薬など)による α -水素引き抜きで説明している。この方法とは別に、彼はCottonやChisholmらにより広く研究されているW、Moなどの金属多重結合^{1, 24)}と、アセチレンのメタセシスの可能性を予見し、実際に嵩高いアルコキシ置換のカルビン錯体(B')の合成に成功した(式9-2)。これら2つのカルビン錯体(A, B)ではAはアセチレンまったくメタセシスを起こさないが、BとB'は見事にメタセシス反応が進行したのである²⁵⁻²⁶⁾。さらにSchrockらは嵩高いアルコキシ基を嵩高い2,6-ジイソプロピルフェニルオキシ基(DIPP)にかえると、アルキンメタセシス中間体のメタラシクロブタンが単離され、X線結晶構造も明らかできた(式10)^{27, 28)}。この場合はWばかりでなく、今まで研究が遅れていたMoでも単離された。このDIPP配位子を利用すると、タンタル(Ta)についても、ネオペンチリデンカルベン錯体が合成単離できるばかりでなく、同様に、アルケンメタセシス中間体のメタラシクロブタンの単離に成功して



いる (式 11)²⁹⁾。後述する開環メタセシス重合の歪んだメタラシクロブタン中間体さえも単離・確認することができる³⁰⁾。Schrock らの高いアルコキシ配位子の検討は $\text{OCH}(\text{CF}_3)_2$ や $\text{OCMe}(\text{CF}_3)_2$ などフルオロアルキル基に及んでいる³¹⁾。彼の Ta のアルケンメタセシスと W のアルキンメタセシスへのこだわりはメタセシス金属の W アルキリデンカルベン錯体への展開を遅らして、DIPP 配位子を用いた W ネオ



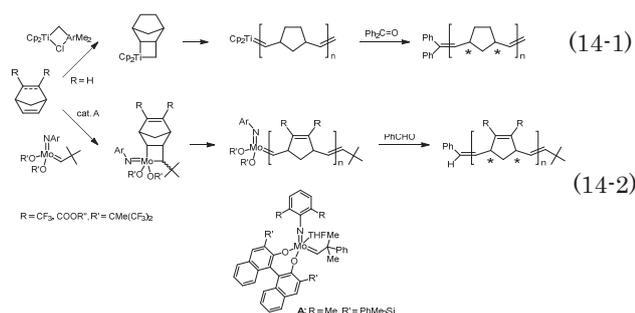
ペンチリデンカルベン錯体の研究に Basset らを参入させることになる。Basset らは Schrock らの方法により W ネオペンチリデン錯体を合成・単離し、不均一系 (ill-defined) 触媒 (種々の 2,6-置換フェノキシ基を有するタングステン塩化物とアルキル金属) とそのメタセシス活性を比較した^{32, 33)}。その中でとくに高い 2,6-ジフェニル置換体では C-H 活性化により高活性なネオペンチリデン錯体触媒を見出し、Schrock も彼のノーベル賞受賞講演で紹介している (式 12)^{11, 34)}。これら Basset の研究は、Schrock らのより活性でしかも実用に供するメタセシス触媒の開発に拍車をかけることになった。Schrock らはオレフィンメタセシスに活性を示す六配位オキソアルキリデンタングステン錯体 (式 5 と 6) から配位不飽和を安定化するためのホスフィン配位子を除くと、結局、反応を触媒する活性種は、四配位オキソアルキリデン錯体であると結論した (式 13, A)。そこへ、これまで自分たちと他の研究者の見出した必須な配位子を導入するとネオペンチリデン基、オキソ基、2,6-ジイソプロピルフェニル基が 2 つとなる。



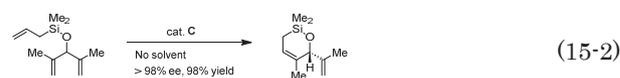
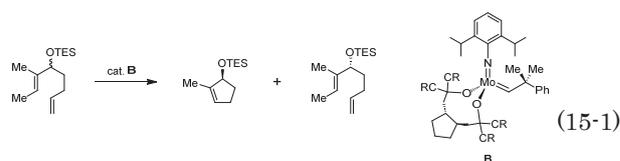
このとき W 金属のまわりの電子数は配位子に帰属させる方法で数え上げると、ネオペンチリデンとオキソ基が 2-、フェノキシ基が 2- で、酸化数は六価 (VI) で d ゼロとなる。その結果、W 金属まわりは 12e もの配位不飽和となり、このような配位不飽和な活性種を安定化させるために Schrock らはオキソ基を高い 2,6-2 置換フェニル基にかえることによって、いわゆる立体保護で安定化させた。当初、2,6-tert-ブチルフェニルアニリノ基を検討してたようであるが、MIT で同僚だった Sharpless の助言で、2,6-ジイソプロピルアニリノ基にしたと、彼のノーベル賞受賞講演では、打ち明けている¹¹⁾。Schrock は、イミド基は電子対を W に供与することで、擬似的に N C 三重結合を形成し、14e の配位不飽和錯体になっているとみなしている (式 13, B)¹³⁾。実際にその X 線構造は CNW が直線構造をとっている¹¹⁾。1980 年代、筆者は MIT の正宗研に留学する機会があり、その当時、正宗研と Sharpless 研は不斉エポキシ化反応で共同研究し、正宗研のもう 1 つの Si, Ge, Sn の多重結合の化学³⁵⁾でも 2,6-ジイソプロピルフェニル基が立体保護のために利用されていたことから、Sharpless を仲介して、この情報が Schrock 研にもたらされたのではないかと推測する。そして、現在 Schrock 触媒と呼ばれる Mo 触媒 (式 13, C) が完成するには、後 2 つのハードルを乗り越えることが必要であった。一つは、新しい合成反応 (式 13, D から E) の発見である。アルキン錯体の合成 (式 9-1) でその生成には、ネオペンチリデン錯体の β -水素脱離が間違いなく関与しているが、その逆反応を期待して、ネオペンチリデン錯体 (式 13, D) にイミノ基を導入したところ、塩基を触媒とすると N から C へ水素が転位し、一挙にイミドネオペンチリデン錯体 (式 13, E) が生成する反応をみつけた³⁶⁾。もう一つは、W イミドネオペンチリデン錯体 (式 13, C, M = W) は触媒活性は高いが失活も早いために、金属を W から Mo にかえ、それに伴い大量合成に適した新しい合成ルートを開発してことである (式 13)。ここまでは不均一な (ill-defined) オレフィンメタセシス反応の触媒活性種として均一 (defined) で単

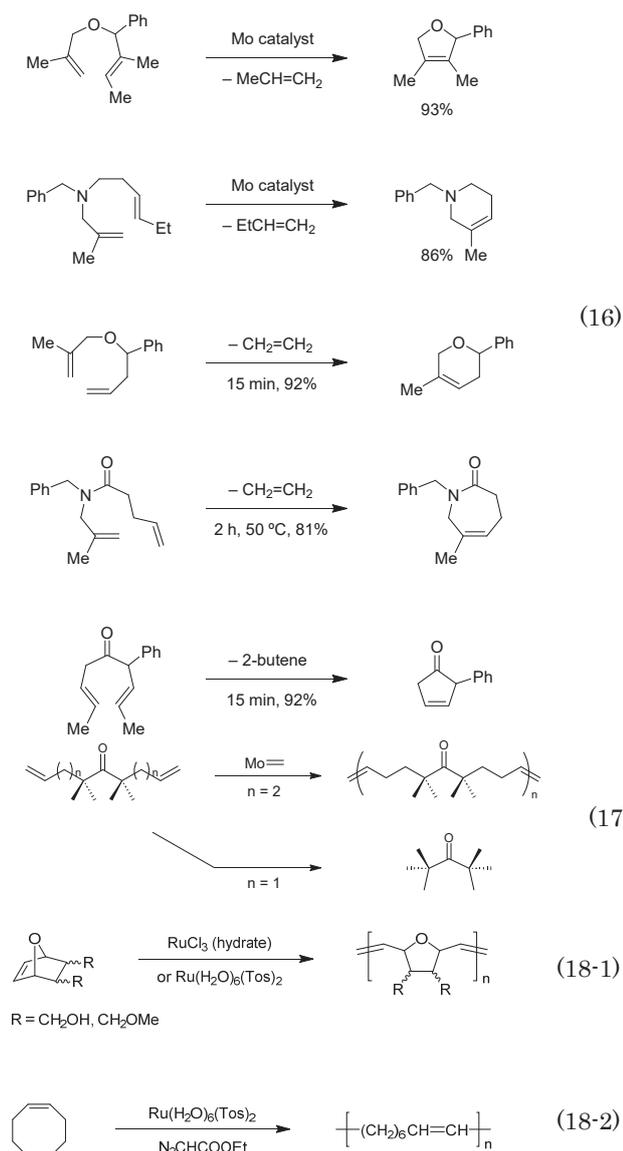
一成分のカルベン錯体の合成に研究の焦点があり、1986年ごろには Schrock 触媒は完成され、後に市販されるまでになった。そしてその応用という点で画期的な展開をみせるときも、ほぼ 1986 年にやってきた。

Ti カルベン錯体で環状歪みオレフィンの開環重合を実現した Caltech の Grubbs のところに Schrock が 4 か月ばかりサバティカルで訪れたのである。Grubbs のチタナカルベン錯体の研究は³⁷⁾、このシリーズでもすでに取り上げたので参照されたい (式 14-1)^{5, 12, 37)}。サバティカルについては Schrock¹¹⁾ も Grubbs^{12, 37)} も、共にその研究の回顧で取り上げている。そのうち、とくに詳細に語られているのが、Grubbs のノーベル賞講演で、それに従って解説してみたい^{12, 38)}。環状オレフィンの開環重合 (図 1c) は古く Natta 以来、知られていたが、Grubbs が Ti カルベンでノルボルネンおよびノルボルナジエンの開環重合に成功していたので、彼らにとって Ta カルベンと Mo カルベンがまさしく、均一系 (defined) 触媒で、それが本当に開環メタセシス重合反応の触媒となるのか、わくわくする実験だったと思われる。Schrock のサバティカルの目的もおそらくそこにあったと思われる。結果ははたして予想どおりであった。Grubbs が研究した少し歪みのある反応活性なノルボルナジエンで見事に重合反応が進行した (式 14-2)。W カルベンについては、Schrock らは Grubbs と共著で論文を発表し³⁹⁾、Ta カルベンについては、すでに紹介した論文を後年、発表している (式 11)³⁰⁾。Ti カルベンの開環重合は、リビング重合で、それを利用して、キャップとポリマーやブロックポリマーも合成でき、注目されていた⁴⁰⁻⁴²⁾。Schrock らも Grubbs らと 4 ヶ月ばかりのサバティカルで共同研究を行った後、Mo カルベンを用いたノルボルネンやノルボルナジエンの ROMP 反応 (図 1c) の研究に没頭する (式 14-2)⁴³⁾。彼らの結果によると Mo カルベン錯体を用いたノルボルネン誘導体の ROMP では生成するポリマーの cis/trans 異性体やタクティシティー (隣接するモノマー単位の相対



的立体配置) を錯体のアルコキシ基やイミド基をかえたり、基質の置換基をかえることで、制御し、立体規則性重合を実現できる^{13, 42, 43)}。このタクティシティーとはノルボルネンが有する 2 つの不斉炭素が R, S (式 14, *印) が高分子鎖中で -RS-RS-RS- のときイソタクティック、交互に -RS-SR-RS-SR- のときシンジオタクティック、まったく規則性がないときをアタクティックと呼び、cis/trans の 2 つと規則的なタクティシティーを組みあわせると 4 通りの可能性がある。Schrock らは¹³⁾ ¹H, ¹³C NMR を用いて、その立体規則性を解明している。とくに光学活性なビナフトール骨格を有するアルコキシ基を置換基として用いた Mo カルベン錯体 (式 14, A) は 99% 以上、イソタクティックで、Mw/Mn = 1.3 も低分散ポリマーの生成を達成した^{13, 42, 43)}。イソタクティックな相対配置は、Mo-炭素二重結合について常に同じ側からオレフィンが反応し、一方シンジオタクティックな相対配置は Mo-炭素二重結合に交互に別な面から反応することに対応する。すなわちカルベン錯体 (式 14, A) が後述するオレフィン類の光学分割や不斉閉環反応に展開できることを示唆した⁴⁴⁾。続いて Grubbs らは Mo カルベンアルコキシ基に光学活性配位子を導入し、最初のジエンアルコール類の光学分割を検討した⁴⁴⁾。ジオレフィンのラセミ化合物の反応では、速度論的光学分割がともなって起きるが、光学分割の不斉収率は 48% ee と高いものではなかった (式 15-1)⁴⁴⁾。Schrock らも不斉 Mo カルベン触媒を用いてアキラルなトリオレフィン化合物の非対称閉環メタセシス反応 (ARCM) を報告し、光学活性ビスナフトール基を配位子とした ROMP で高いイソタクティックポリマーを生成した Mo 錯体を用いて 98% ee と高い不斉収率を示した (式 15-2)¹³⁾。一方、1992 年、Grubbs と Harvard 大からポストドクで Grubbs 研に来た Fu は、Schrock らの Mo カルベン錯体の有機合成への可能性を調査し、酸素と窒素の入ったヘテロ環の開環メタセシス反応 (RCM, 図 1d) をはじめて報告した (式 16)⁴⁵⁻⁴⁷⁾。RCM 反応には、常に非環式ジエンメタセシス重合 (ADMET 図 1e) が競合する。Wagner らは Mo フェニルジメチルベンジリデンカルベン錯体を用いた ADMET の研究で嵩

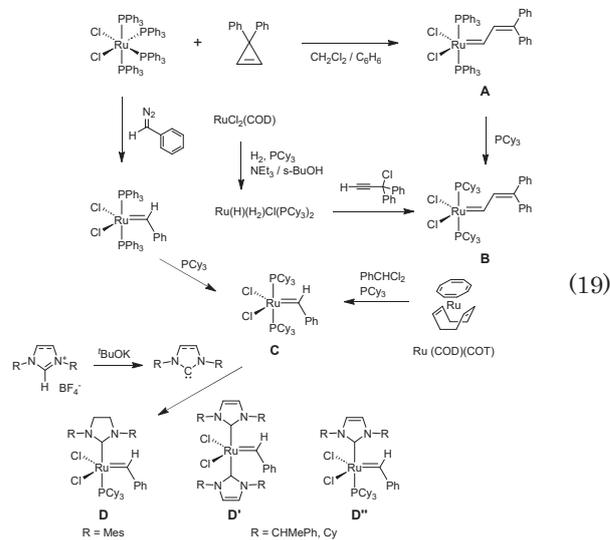




高い gem-ジアルキル基がいわゆる Thorp-Ingold 効果で RCM 反応が促進することを明らかにしている (式 17) ⁴⁸⁾。

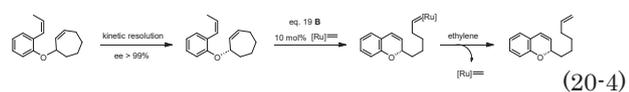
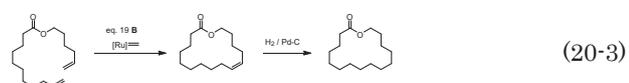
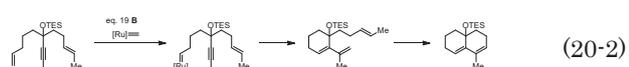
Grubbs のノーベル賞受賞講演 ¹²⁾ によると Schrock との共同研究後も、Grubbs らは Mo カルベン錯体の Mo 金属の酸素官能性基に対する親和性が高く、酸素官能性基に対するさらに寛容な金属を探しもとめていた。そして、それはあるセレンディピティーからもたらされたという。それは 7-オキサノルボルネンを Mo カルベン触媒で ROMP 反応すれば、イオン輸送につかえるイオノフォア膜をつくれるのではないかと、80 年代後半、学生の Novak が、種々、手に入る Mo カルベン触媒を試したが、まったく反応が進行しなかった。文献を調査したところ、1960 年代の報告にノルボルネンが $\text{RuCl}_3(\text{hydrate})$ 触媒、還元エタノールや乳化水溶液で ROMP 反応することを見出した ^{49, 50)}。オキサノルボルネンに適用する

と、確かに反応が進行した (式 18-1) ^{12, 38, 51)}。しかも不思議なことに、有機溶媒にすると ROMP 開始反応の誘導期間が 30 分から 20 時間にもなり、さらに脱水条件にすると、その時間が伸びた。Ru の水和物を検討したところ、 $\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_6\text{TOS}_2$ (TOS=p-トルエン sulfonate アニオン) が反応開始の誘導期が数分に短縮された。水中で、ノルボルネンと Ru が付加体を形成することも確認されている。反応途中で環状オレフィンを添加すると生成するポリマーに導入されることから、有機溶媒中で Ru カルベン中間体が生成していると考えられる。Ru カルベン中間体が効率よく発生するようにジアゾ酢酸エステルを添加するとオキサノルボルネンよりも環歪みの小さいシクロオクテンまで ROMP 反応することが見出した (式 18-2) ⁵²⁾。そしていかに単一の Ru カルベン種を生成するかに焦点があてられた。こうした中、学生の SonBinh Nguyen がカルベン源として 3,3-ジフェニルプロペンを用いて空气中で安定な単一のカルベン錯体 (式 19, A) を単離することに成功した (式 19) ⁵³⁾。この錯体は水中でもメタノール中でもノルボルネンの ROMP 反応を進行させた。決してその触媒活性は高くなかったが、はじめて ROMP 反応を触媒する単一成分の錯体の報告になる。そして配位子の Ph_3P をトリシクロヘキシルホスフィンに交換した触媒 (式 19, B) は活性が向上し、非環状オレフィンでもメタセシス反応が進行した ⁵⁴⁾。この 3,3-ジフェニルプロペンからビニルカルベン錯体の生成反応は一般性があり、前周期金属 Ti や Zr については Binger らにより報告されている ⁵⁵⁾。中後周期の W と Ir については、Grubbs ら自ら研究を行っている ⁵⁶⁻⁵⁸⁾。そして、Ru カルベン錯体の水中での ROMP 反応については、Grubbs と金岡らの研究に引き継がれ、水溶性 Ru カルベン錯体までが設計し合成さ



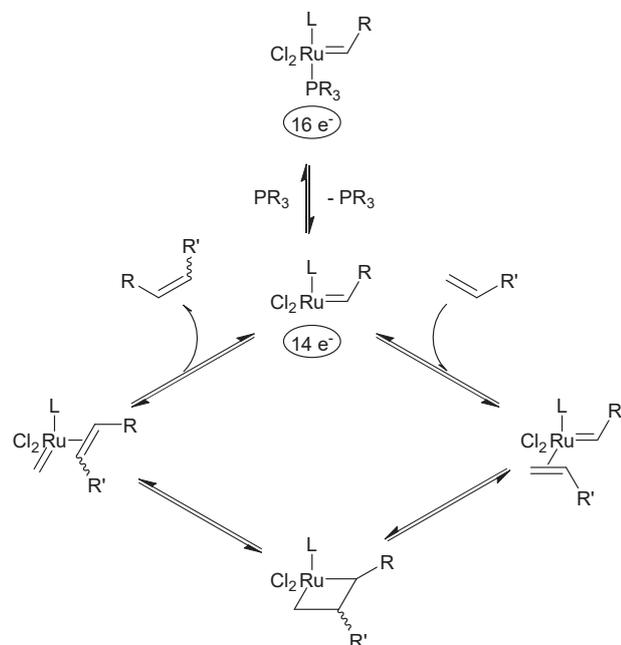
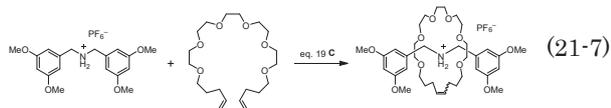
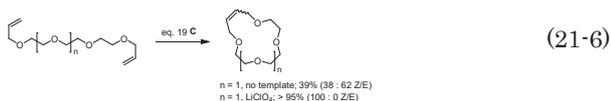
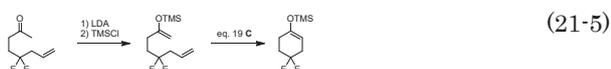
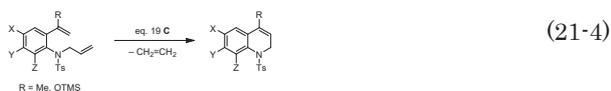
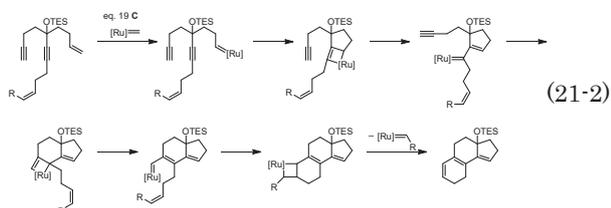
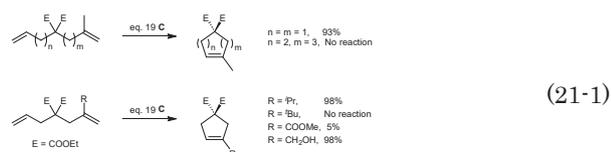
れている⁵⁹⁻⁶¹)。最初の錯体が SonBinh により合成されたとき、Schrock の Mo カルベン錯体触媒で RCM 反応を検討した Fu が MIT に教授として転出する直前だった。彼はただちにジエン化合物の Ru カルベン錯体による RCM 反応を再検討した。前回の実験と、今回の実験の大きな違いは、Mo カルベン錯体はグローブボックスで扱わなければならなかったが、Ru カルベン錯体は空气中で取り扱えるということだった。空気や水分に対する安定性はそのまま、カルボン酸、アルコール、アルデヒドなどの酸素官能基をもつ化合物でも触媒反応を可能にすることにつながった^{62, 63})。こうして Fu は炭素環や、酸素、窒素を含む環状化合物の合成に成功し、Grubbs 研で合成された Ru カルベン錯体 (式 19, B) が Schrock の Mo カルベン錯体に劣らないことを証明した。この後、Ru カルベン錯体を用いた有機合成がその触媒の改良とともに、飛躍的に進展する。その進展の内容が Grubbs の総説によくまとめられているので参照されい^{64, 65})。Grubbs の 2 報目の 2004 年の総説には、自分の論文だけで 400 報を超える論文が引用されている。また初期の Mo と Ru 触媒の合成については、Früstner の総説⁶⁶) に詳しく、触媒の改良と開発は今も続けられており、最近の触媒開発については、Grubbs が総説としてまとめている⁶⁷)。

Grubbs の初期の Ru カルベン触媒 (式 19, B) を用いた研究の中で、比較的、困難な 8 員環の合成にも高収率で達成されている (式 20-1)^{62, 68, 69})。また分子内にアセチレンを含む化合物の RCM 反応では、ジエンインメタセシス (RCYEM、図 1i) が起こり、ビシクロ環が一段階で合成できる (式 20-2)⁷⁰)。Früstner らは大環状ラク톤を RCM 反応を応用して 79% 収率で合成に成功している (式 20-3)⁷¹)。さらに Hoveyda らは開環メタセシス反応 (図 1f) によりスチリルエーテルをクロマン類に変換できる反応を開発した (式 20-4)⁷²)。その他、初期の Ru カルベン触媒を用いる有機合成としては、環状ペプチド (RCM 反応)⁷³) や、液晶ポリマー (ADMET 反応)



⁷⁴) の合成に応用された。

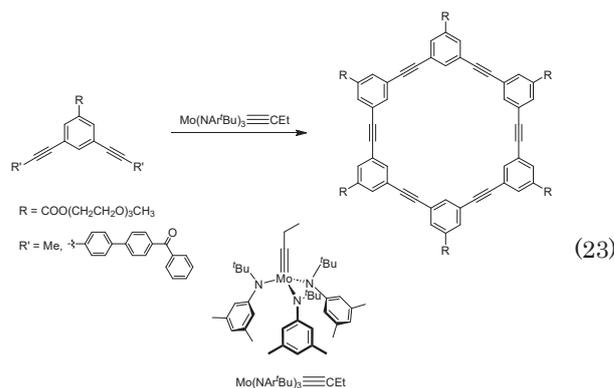
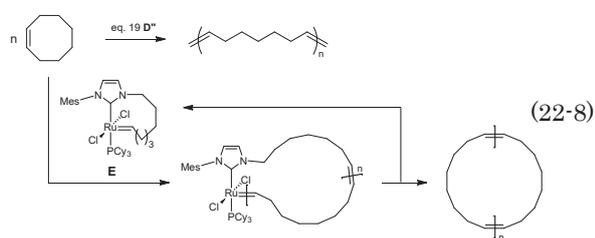
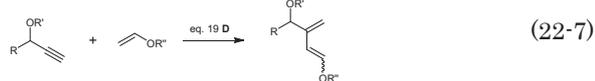
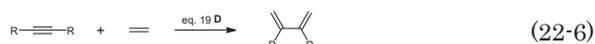
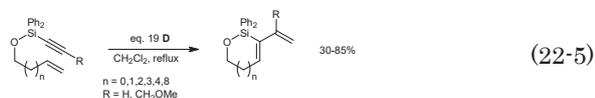
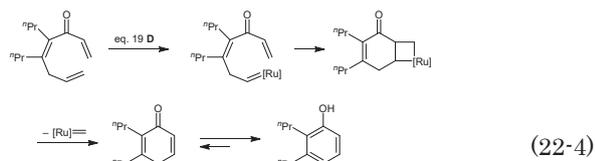
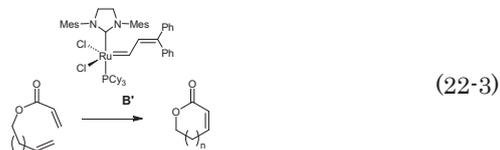
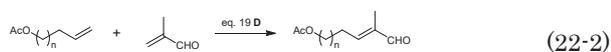
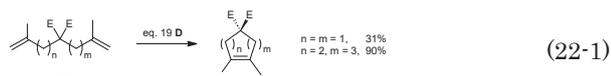
初期の Ru カルベン錯体 (式 19, B) はジフェニルシクロプロペンを用いたために、スケールアップした合成が困難であった。そこで Grubbs らは新しくジアゾ化合物をカルベン源として、のちホスフィン配位子をトリシクロヘキシルホスフィンに交換する合成ルートを確立した^{75, 76})。得られたベンジリデンカルベン錯体 (式 19, C) のメタセシス反応に対する活性はビニリデンカルベン錯体 (式 19, B) よりも高く、ROMP ばかりでなく非環式ジエンにもよく反応し、ベンジリデンカルベン錯体 (式 19, C) とエチレン、さらには一置換アルケンと定量的に反応して種々の Ru アルキリデン錯体を生成する優れた合成法を与えた^{75, 76})。そしてジアゾ化合物は爆発性なため Ru(COD)(COT) と二塩化ベンジリデン、PhCHCl₂ からの合成ルートで工業的に大量に合成されるまでになった (式 19)。市販されることでより多くの有機合成の研究者に利用され、ますます有機合成への応用が広がった。ベンジリデンカルベン錯体 (式 19, C) は反応が高いため多置換オレフィンのメタセシスが可能となった。Grubbs らが検討したところ、三置換オレフィンまで合成できた (式 21-1)^{66, 67})。さらにジエンインメタセシス反応を連続的 (カスケード) で行うことで、3 環系・4 環系の多環化合物も触媒反応を用いてワンポット合成できる (式 21-2)⁷⁸)。Ru ベンジリデン錯体 (式 19, C) を用いて 1998 年に森はエチレン雰囲気下で閉環エンインメタセシス反応 (図 1 h) を行うことで反応が促進されることを報告した。アルゴン雰囲気下では低収率であったが、高収率で複素環化合物の合成に成功している (式 21-3)^{79, 80})。有澤、西田、中川らは、Ru ベンジリデンカルベン触媒による多置換オレフィンの RCM によりイソキノリンの合成に応用している (式 21-4)。さらに中川⁸¹) と柴崎ら⁸²) は独立に分子内のシリルエーテルとの分子内 RCM 反応により環状エノールエーテルを位置選択的に合成すると報告している (式 21-5)。Mo 触媒でも多置換オレフィンのメタセシスは可能だが、酸素や窒素官能基に対する親和性が高くて使えない。一方、初期の Ru 触媒 (式 19, B) では、官能基許容性は高いが、反応性が低かった。しかしこれらの結果は新しい Ru 触媒 (式 19, C) の活性が Mo 触媒まで近づいたことを示唆した。Grubbs らによる触媒の反応機構が検討され、2 つのホスフィン配位子の 1 つが脱離して配位不飽和 14e 中間体が活性種であることが提唱されている (図 2)⁸³)。いずれの反応過程も可逆平衡と考えられている Ph₃P よりも嵩高く、はずれ易い。PCy₃ 配位の反応活性なのは、この理由によると考え

図1. π - π 結合メタセシス触媒反応.

られた。Grubbsらはオレフィンを両末端に有する鎖状ポリエーテルのRuベンジリデン触媒(式19, C)の反応を行なうとLiイオンを共存させると選択的に

環状ポリエーテルが生成し、逆にこの環状ポリエーテルを触媒と反応させて可逆的に鎖状ポリエーテルを触媒と反応させて可逆的に鎖状ポリエーテルにもどすことにも成功している(式21-6)⁸⁴。同様にGrubbsはStoddartらと共同しテンプレートとしてアンモニウムカチオンを用いてRuベンジリデンカルベン錯体(式19, C)のRCM反応を利用して、ロタキサン型やカテナン型超分子の合成にも成功している(式21-7)^{85, 86}。

配位不飽和14e電子錯体が触媒活性種とすると、立体的に嵩高い配位子により安定化し触媒回転比を大きくすることは触媒活性を高くする(図2)。Grubbsらはこのように考え、適当な嵩高い配位子を求めていた。ちょうどそのころDupont社のArduengoはイミダゾール骨格を有する安定カルベンの単離に成功した^{87, 88}。そして安定カルベンを種々の金属錯体の配位子(NHC)に用いた触媒を探索していたのがドイツのHerrmannらである⁸⁹。1999年、HerrmannらはFrüstnerらと共同して不飽和イミダゾールを2つもつ錯体(式19, D')と1つもつ錯体(式19, D'')の両方を合成し、シクロオクテンのROMP反応とRCM反応を確認している⁹⁰⁻⁹²。同年、この報告を読んでGrubbsら^{93, 94}とNolanら⁹⁵は独立に飽和のイミダゾリン配位子を合成しRCM反応を報告した。現在市販で入手可能なイミダゾリン配位子を有する、カルベン錯体(式19, D)は第2世代Grubbs触媒と呼び、ベンジリデンの第1世代と区別されているが、この開発には4つの研究室が競合したことになる。Grubbsは先の総説³⁸の中で、不飽和と飽和のイミダゾール配位子を両方検討し、飽和のイミダゾリンは共役系でないために、カルベン配位子の σ ドナー性が大きく、その分ホスフィン配位子が速くはずれ易いと考えた。さらにイミダゾリンのN上置換基の嵩高いメチル基は配位不飽和中間体の立体保護には必須と判断したと述べている。開発初期のRCM反応の結果からもMoでは反応した四置換オレフィンがやっと酸素官能基許容性を保ちながら、第2世代Ruカルベン錯体(式19, D)で進行することが見いだされた(式22-1)⁹¹⁻⁹³。開発の翌年Grubbsは多置換オレフィンばかりでなく、今までMo触媒ではうまくいかなかった α - β 不飽和カルボニル化合物とオレフィンのクロスメタセシス(CM, 図1g)とRCM反応を発表する(式22-2, 式22-3)^{96, 97}。このときはイミダゾール配位子を有するビニルカルベン触媒(式22-3, B')を使用している。この反応は反応中間体として不安定なエノンカルベン錯体が生成し、そのためさらなるCM反応が起きないためと考えられている⁹⁸。さらにこの反応はアルドール反応のような炭素伸長反



ジエンの合成を見出している (式 22-6)^{80, 104}。第 2 世代触媒をもちいて Diver⁸⁰ らもプロパルギルエーテルとアルケニルエノールのクロスエンイン反応によるジエンの合成を報告している (式 22-7)^{105, 106}。第 1 世代触媒のときは、プロパルギル位に酸素が置換している基質のみがブタジエンを与えたが、活性な第 2 世代触媒ではそれ以外のアセチレンでもジエンを与えた。このようにイミダゾリン (NHC) 配位子を有するカルベン錯体は活性な触媒であるが、Grubbs⁸⁰ らは不飽和なイミダゾリン (NHC) 配位子を有する触媒 (式 19, D')⁸⁰ や Ru カルベン部位が NHC 部位とキレートした触媒 (式 21, E) を用いるとシクロオクテンが ROMP 反応するばかりでなく、モノマーの挿入と分子内連鎖移動により新しいタイプの大環状ポリマーが生成することを見出した (式 22-8)¹⁰⁷。 π - π 結合メタセシスの最後にアルキンメタセシスについて例を 1 つだけ紹介する。この反応は Schrock⁸⁰ らの W、Mo アルキン触媒の研究からはじまるが、Früstner⁸⁰ らにより触媒の改良⁸⁰ とそれらを用いた Moore⁸⁰ らによる環状フェニレンエチニレンオリゴマーの合成が注目される (式 23)¹⁰⁸。しかしながら、まだ W、Mo アルキン触媒は市販されておらず、その有機合成への応用は限定的となっている。

終わりに

今号では π 結合メタセシス (2) として、 π - π 結合メタセシスの最近の発展までを見てきた。その研究の発端からどのような新しいタイプの反応が見出され、その背景にはどんな発見のエピソードがあったのかを Schrock⁸⁰ と Grubbs⁸⁰ の研究を中心に見てきた。不均一系の反応で活性種がわからないところから、反応活性種を明らかにし、分子設計するまでの有機金属化学の研究物語の金字塔である。前々号からオレフィンメタセシス (2) とオレフィン重合 (2) を解説して最終回になると予告してきたが、今号もオレフィンメタセシス (2) のみの紹介となってしまった。その内容が予想に反して多くなってしまったのと、オレフィン重合 (2) の内容について、エピソードの調査が遅れているのが理

由に置き換わることが期待できる。ちなみに触媒を第 1 世代にかえると、ほぼオレフィンの二量体しか生成せず、それまではアクリロニトリルとかアリルシランなど立体的に嵩高い化合物しか CM 反応は起きなかった⁹⁹。ケト・エノール互変異性化を利用したフェノール誘導体の合成が吉田、今本らにより報告されている (式 22-4)¹⁰⁰。置換芳香族化合物の合成に新しい方法論を与える¹⁰¹。さらにシリコンテッターの閉環エンインメタセシス (RCEYM) 反応も 2004 年に Lee⁸⁰ らにより報告されている。アルケニルシリルエーテルから Grubbs⁸⁰ 錯体触媒を用いて反応させることにより、5-8 員環の中員環だけでなく、14 員環の大員環の合成にも成功している。これはケイ素上の置換基のフェニル基の嵩高さによる Thorp-Ingold⁸⁰ 効果により反応が促進された結果と考えられる (式 22-5)^{102, 103}。CM 反応と同様、分子間エンインメタセシス反応も様々な生成物が得られるので、その選択性の制御が難しい。森らは種々のアセチレンとエチレンガスのクロスエンイン反応によりブタ

由である。Kaminsky 触媒、Brookhardt の高周期金属重合触媒や Jordan のジルコノセンカチオンの研究など、これも不均一系の Ziegler-Natta 触媒の反応活性種がわからないところから分子設計を可能にまでした、もう一つの有機金属化学の研究物語の金字塔である。そのエピソードを掘り起こしオレフィン重合 (2) として最終回を予定している。

謝辞

本文中の図・化学式については、総合理学研究所の川上義輝博士研究員に作成していただきました。ここに感謝申し上げます。

文献

- 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 (5). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **30**: 111-118.
- Nügent WA (2012) Black Swan Events in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**:8936-8949.5 つの revolution 的研究の残り 4 つは i) Au(I) 触媒によるアルキン付加反応, ii) 不斉水素化触媒の二座ホスフィン配位子, iii) スズ化合物と Pd 触媒による C-N カップリン, iv) 水溶系の酵素触媒反応が紹介されている。ii) と iii) についてはこのシリーズでも紹介している^{3,4)}。
- 加部義夫 (2019) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (6). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **29**: 113-119.
- 加部義夫 (2021) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (9). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **32**: 97-105.
- 加部義夫 (2022) 反応のタイプと発見のエピソードで学ぶ有機金属化学 (10). *Sci. J. Kanagawa Univ.* **33**: 115-124.
- 村橋俊一 (2005) 2005 年ノーベル化学賞。オレフィンメタセシス法の開拓 *現代化学* 2005 年 12 月: 21-25.
- 小澤文幸 (2006) 2005 年ノーベル化学賞を読み解く 化学賞: 高効率のオレフィンメタセシス触媒—有機合成に一大革新をもたらす有機金属触媒 *化学* **61**: 12-14.
- 碓屋隆雄 (2006) 2005 年ノーベル化学賞を読み解く Grubbs 教授の業績と人柄 *化学* **61**: 15.
- 野村 琴広 (2006) 2005 年ノーベル化学賞を読み解く Schrock 教授の業績と人柄 *化学* **61**: 16.
- Chauvin Y (2006) Olefin-Metathesis: The Early Days (Nobel Lecture) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 3740-3747.
- Schrock RR (2006) Multiple Metal-Carbon Bonds for Catalytic Metathesis Reactions (Nobel Lecture) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 3748-3759.
- Grubbs RH (2006) Olefin-Metathesis Catalysts for the Preparation of Molecules and Materials (Nobel Lecture) *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 3760-3765.
- Schrock RR and Hoveyda AH (2003) Molybdenum and Tungsten Imido Alkylidene Complexes as Efficient Olefin-Metathesis Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**: 4592-4633.
- Schrock RR (1979) Alkylidene Complexes of Niobium and Tantalum. *Acc. Chem. Res.* **12**: 98-104.
- Schrock RR (1983) Catalysis by Transition Metal: Metal-Carbon Double and Triple Bond. *Science* **219**:13-18.
- Schrock RR, Rocklidge S, Wengrovius JH, Rupprecht G, and Fellmann I (1980) Preparation and characterization of active niobium, tantalum and tungsten metathesis catalyst. *J. Mol. Cat.* **8**: 73-83.
- Wengrovius JH, Schrock RR, Churchill MR, Missert JR, and Youngs WJ (1980) Tungsten-Oxo Alkylidene compounds as Olefin metathesis catalyst and the Crystal Structure of W(O)(CHCMe₃)(PEt₃)Cl₂. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 4515-1516.
- LaPointe AM and Schrock RR (1993) Synthesis. Of Osmium (VI) Neopentylidene and Neopentylidyne Complexes. *Organometallics* **12**: 3379-3381.
- Kress J, Wesolek M, Osborn JA (1982) Tungsten (IV) carbenes for metathesis of Olefins. Direct observation and identification of chain carrying carbene complexes in a highly active catalyst system. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**: 514-516.
- Kress J, Aquero A and Osborn JA (1986) Recent advances in the Chemistry of tungsten-carbene complexes. *J. Mol. Cat.* **36**: 1-12.
- Schrock RR (1986) High-Oxidation-State Molybdenum and Tungsten Alkylidene Complexes. *Acc. Chem. Res.* **19**: 42-348.
- Clark DN and Schrock RR (1978) Multiple metal-carbon bonds 12. Tungsten and Molybdenum neopentylidene and some tungsten neopentylidene complexes *J. Am. Chem. Soc.* **100**: 6774-6776.
- Schrock RR, Listemann ML and Sturgeoff GL (1982) Metathesis of tungsten- tungsten triple bonds with acetylenes and nitrile to give alkylidene and nitride complex *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 4291-4293.
- Chisholm MH, Hoffman DM and Huffman JC (1982) Reactions Involving the Triple Bond in Dimolybdenum and Ditungsten Hexa-alkoxides and C-C, C-N and C-O Triple Bonds. *Chem. Soc Rev.* **14**: 69-91.
- Wengrovius JH, Sancho J and Schrock RR (1981) Metathesis of Acetylene by Tungsten(VI)-Alkylidene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 3932-3934
- Sancho J. and Schrock RR (1982) Acetylene metathesis by tungsten (VI) alkylidyne complexes *J. Mol. Cat.* **15**: 75-79.
- Churchill MR, Ziller JW, Freudenberger JH and Schrock RR (1984) Metathesis of Acetylene by Triphenoxytungsten cyclobutadiene complexes and the Crystal Structure of W(C₃Et₃)[o-2,6-C₆H₃(iPr)₂]₃. *Organometallics* **3**: 1554-1562.
- McCullough LG, Schrock RR, Dewan JC and Mardzek JC (1985) Preparation of Trialkoxymolybdenum (IV) Alkylidene Complexes. Their Reaction with Acetylene and The X-ray Structure of Mo[C₃(CMe₃)₂][OCH(CF₃)₂(C₅H₅N)]₂. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 5987-5998.
- Wallace KC, Dewan JC and Schrock RR (1988) Isolation and Characterization of the First Simple Tantalacyclobutane Complex. *Organometallics* **3**: 2162-2164.
- Wallace KC, Liu AH, Dewan JC and Schrock RR (1988) Preparation and Reaction of Tantalum

- Alkylidene Complex Containing Bulky Phenoxide or Thiolate Ligands Controlling Ring-Opening Metathesis Polymerization Activity and Mechanism through Choice of Anionic Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 4964-4977.
- 31) Freudenberger JH, Schrock RR, Churchill MR, Rheingold AL and Ziller JW (1984) Methesis of Acetylene by (fluoroalkoxy) tungstenacyclobutadine complex and the Crystal Structure of $W(C_3Et_3)[OCH(CF_3)_2]_3$ A higher Order Mechanism for Acetylene Metathesis. *Organometallics* **3**: 1563-1573.
- 32) Quignard F, Leconte M and Basset J.-M. (1985) Synthesis and Catalytic properties of $W(OAr)_2Cl_2(CHCMe_3)(OR_2)$ and $W(OAr)_2Cl(CHCMe_3)(CH_2CMe_3)(OR_2)$ ($Ar = 2,6$ -disubstituted phenyl, $R = Et$ or iPr), new uni-component catalysts for metathesis of acyclic and cyclic olefins with or without functional groups. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**: 1816-1817.
- 33) Quignard F, Leconte M and Basset JM (1986) Aryloxy Ligands in metathesis of olefins and olefinic esters: catalytic behaviour of $W(OAr)_2Cl_4$ complexes associated with alkyl-tin and alkyl-lead co-catalysts: alkylation of $W(OAr)_2Cl_4$ by $SnMe_4$, $Sn(nBu)_4$, $Pb(nBu)_4$, $MgNp_2$: synthesis of $W(OAr)_2Cl_2(CHCMe_3)(OR_2)$ and $W(OAr)_2Cl(CHCMe_3)(CH_2CMe_3)(OR_2)$. *J. Mol. Cat.* **36**: 13-29.
- 34) Coufurier J.-L., Paillet C, Leconte M and Basset J.M. (1992) A Cyclometalated Aryoxy(chloro) neopentylidene tungsten complex: A Highly Active and Stereoselective Catalyst for the metathesis of cis- and trans -2-Penten, Norbornene, 1-Methyl-norbornene and Ethyl Oleate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **31**: 628-631.
- 35) Tsumuraya T, Scott AB and Masamune S (1991) Strained-Ring and Double-Bond System Consisting of the Group 14 Elements Si, Ge and Sn. *Angew. Chem. Int. Ed.* **30**: 902-930.
- 36) Schaverien CJ, Dewan JC and Schrock RR (1986) A Well-Characterized, Highly Active Lewis Acid Free Olefin Metathesis Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 2771-2773.
- 37) Gillion LR and Grubbs RH (1986) Titanacyclobutane Derived from Strained Cyclic Olefins: The living Polymerization of norbornene. *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 733-742.
- 38) Trnk TM and Grubbs RH (2001) The Development of $L_2X_2Ru=CHR$ Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story. *Acc. Chem. Res.* **34**: 18-29.
- 39) Schrock RR, Fldman J, Cannizo LF and Grubbs RH (1987) Ring-opening polymerization of norbornene by a living tungsten alkylidene complex. *Macromolecules* **20**: 1169-1172.
- 40) 圓藤紀代司, 大津隆行 (1989) 遷移金属触媒を用いる新しい重合反応. *化学* **44**: 210-211.
- 41) Waldrop MM (1990) Polymer Chemists Are Having a ROMP. *Science* **248**: 304-305.
- 42) 宇野晃成 (1995) 開環メタセシス重合の最近の進歩, 立体規則性重合. *化学と工業* **48**: 51-52.
- 43) Schrock RR (1990) Living Ring-Opening Metathesis Polymerization Catalyzed by Well-Characterized Transition-Metal Alkylidene Complexes. *Acc. Chem. Res.* **23**: 158-165.
- 44) Fujimura O and Grubbs RH (1996) Asymmetric Ring-closing Metathesis: Kinetic Resolution Catalyzed by Chiral Molybdenum Alkylidene Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 2499-2500.
- 45) Fu GC and Grubbs RH (1992) The Application of Catalytic Ring-Closing Olefin Metathesis of The Synthesis of Unsaturated Oxygencycles. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 5426-5427.
- 46) Fu GC and Grubbs RH (1992) Synthesis of Nitrogen Heterocycle via Catalytic Ring-closing Metathesis of Dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 7324-7325.
- 47) Grubbs RH, Miller SJ and Fu GC (1995) Ring-closing Metathesis and Related Process in Organic Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **28**: 446-452.
- 48) Forbes MDE, Patton JT, Myers TL, Maynard HD, Smith Jr DW, Schultz GR and Wagner KB (1992) Solvent-Free Cyclization of Linear Dienes Using Olefin Metathesis and the Thorp-Ingold effect. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 10978-10980.
- 49) Michelott FW and Keaveney WP (1965) Coordinated Polymerization of the bicyclo-[2.2.1]-heptene-2 ring system (norbornene) in polar media. *J. Polym. Sci.* **A3** 895-905.
- 50) Rinehardt RE, Smith HP (1965) The Emulsion Polymerization of the Norbornene ring system catalyzed by Nobel Metal compounds. *Polymer. Lett.* **3**: 1049-1052.
- 51) Novak BM and Grubbs RH (1988) Catalytic Organometallic Chemistry in Water: The Aqueous Ring-Opening Metathesis Polymerization of 7-Oxanorbornene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 7542-7543.
- 52) France MB, Paciello RA and Grubbs RH (1993) Initiation of Ring-Opening Metathesis Polymerization in Protic Media. Extension of $[Ru(H_2O)_2]^{2+}$ catalyzed Polymerization to Less-Strained Cyclic Monomers. *Macromolecules* **26**: 4739-4741.
- 53) Nguyen ST, Johnson LK and Grubbs RH (1992) Ring-Opening Metathesis Polymerization by Group VIII Carbene in Protic Media. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 3974-3975.
- 54) Nguyen ST and Grubbs RH (1993) Synthesis and Activities of New Single-Component Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 9858-9859.
- 55) Binger P, Müller P, Benn R and Mynatt R (1989) Vinylcarbene Complexes of Titanocene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **28**: 610-611.
- 56) Johnson LK and Grubbs RH and Ziller JW (1993) Synthesis of Tungsten Vinyl Alkylidene Complexes via the Reactions of $WCl_2(NAr)(PX_3)_3$ ($X=R, OMe$) Precursors with 3,5-Disubstituted Cyclopropenes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 8130-8145.
- 57) Li RT, Nguyen ST, Grubbs RH and Ziller JW (1994) Reaction of 3,3-Diphenylcyclopropene with Iridium (I) Complexes: Probing the Mechanism cyclopropene Rearrangement at Transition Metal centers. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 10032-10040.
- 58) De la Mata FJ and Grubbs RH (1996) Synthesis and Reactions of Tungsten Oxo Vinylalkylidene Complexes: Reaction of $WCl_2(O)(PX_3)(X=OMe, R) Or$

- ganometallics* **15**: 577-584.
- 59) 金岡鐘局 (1997) 水中リビング開環メタセシス重合. *高分子* **46**: 48.
- 60) Lynn DH, Mohr B and Grubbs RH (1998) Living Ring-Opening Metathesis Polymerization in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 1627-1628.
- 61) Kirkland TA, Lynn DM and Grubbs RH (1998) Ring-closing Metathesis in Methanol and Water. *J. Org. Chem.* **63**: 9904-9909.
- 62) Fu GC, Nguyn ST and Grubbs RH (1993) Catalytic Ring-closing Metathesis of Functionalized Dienes by Ruthenium Carbene Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 9856-9857.
- 63) Schmaltz H.-G. (1995) Catalytic Ring-Closing Metathesis: A New Powerful Technique for Carbon-Carbon Coupling in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **34**: 1833-1836.
- 64) Grubbs RH and Chang S (1988) Recent Advances in Olefin Metathesis and Its Application in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **54**: 4413-4450.
- 65) Grubbs RH (2004) Olefin Metathesis. *Tetrahedron* **60**: 7717-7140.
- 66) Früstner A (2000) Olefin Metathesis and Beyond. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3012-3043.
- 67) Vougioukalakis GC and Grubbs RH (2010) Ruthenium-Based Heterocyclic Carbene-Coordinated Olefin Metathesis Catalysts. *Chem Rev.* **110**: 1746-1787.
- 68) Miller SJ, Kin S.-H. Chen Z.-R. and Grubbs RH (1995) Catalytic Ring Closing Metathesis of Dienes: Application to the synthesis of Eight-Membered rings. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 2108-2109.
- 69) 中谷庄吾 (1995) オレフィンメタセシスを用いる 8 員環構築. *化学と工業* **48**: 1086.
- 70) Kom S.-H. Bowdin N and Grubbs RH (1994) Catalyzed Ring Closing Metathesis of Diynes: Construction of fused Bicyclic Rings. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 10801-10802.
- 71) Füstner A and Longmann K (1996) Conformationally Unbiased Macrocyclization Reactions by Ring Closing Metathesis. *J. Org. Chem.* **61**: 3942-3943.
- 72) Hartity JPA, Visser MS, Gleason JD and Hoveyda AH (1997) Ru-catalyzed Rearrangement of Stryl Ethers. Enantioselective Synthesis of Chromanes through Zr- and Ru-Catalyzed Process. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 1488-1489.
- 73) Miller SJ and Grubbs RH (1995) Synthesis of Conformationally Restricted Amino Acids and Peptides Employing Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 5855-5856.
- 74) Walba DM, Keller P, Shao R, Clark NA, Hillmyer M and Grubbs RH (1996) Main Chain Ferroelectric Ligand Crystal Oligomers by Acyclic Diene Metathesis Polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 2740-2741.
- 75) Schwab PS, France MB, Ziller JW and Grubbs RH (1995) A Series of Well-Defined Metathesis Catalysts-Synthesis of $[\text{RuCl}_2(=\text{CHR}')] (\text{PR}_3)_2$ and Its Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **34**: 2039-2041.
- 76) Schoab PS, Grubbs RH and Ziller JW (1996) Synthesis and Application of $\text{RuCl}_2(=\text{CHR}') (\text{PR}_3)_2$: The Influence of the Alkylidene Moiety on Metathesis Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 100-110.
- 77) Kirkland TA and Grubbs RH (1997) Effect of Olefin Substitution in the Ring-Closing Metathesis of Dienes. *J. Org. Chem.* **62**: 7310-7318.
- 78) Zuercher WJ, Scholl M and Grubbs RH (1998) ruthenium-catalyzed Polycyclization Reactions. *J. Org. Chem.* **63**: 4291-4298.
- 79) Mori M, Sakakibara N and Kinoshita A (1998) Remarkable Effect of Ethylene Gas in the Intramolecular Enyne Metathesis of Terminal Alkyne. *J. Org. Chem.* **63**: 6082-6083.
- 80) 森美和子 (2005) メタルカルベ錯体を用いたメタセシス反応の新展開. *有機合成化学協会誌* **63**: 423-439.
- 81) Arisawa M, Theeraladanon C, Nishida A and Nakagawa M (2001) Synthesis of substituted 1,2-dihydroquinolines and quinolines using ene-ene metathesis and ene-enol ether metathesis. *Tetrahedron Lett.* **42**: 8029-8033.
- 82) Okada A, Oshima T and Shibasaki M (2001) Highly regioselective synthesis of cyclic enol silyl ethers using ring-closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **42**: 8023-8027.
- 83) Sanford M, Ulmann M and Grubbs RH (2001) New Insights into the Mechanism of Ruthenium-Catalyzed Olefin Metathesis Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 749-750.
- 84) Marsella MJ, Maynard HD and Grubbs RH (1997) Template-Directed Ring-Closing Metathesis: Synthesis and Polymerization of Unsaturated Crown Ether Analogs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**: 1101-1103.
- 85) Klinger AFH, Cantrill SJ, Walton AW, Day HW and Grubbs RH (2003) Magic ring Rotaxane by Olefin Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**: 3281-3285.
- 86) Guidry EN, Cantrill SJ, Stoddard JF and Grubbs RH (2005) Magic Ring Catenation by Olefin Metathesis. *Org. Lett.* **7**: 2129-2132.
- 87) Arduengo III AJ (1999) Looking for Stable Carbenes: The difficulty in Starting A new. *Acc. Chem. Res.* **32**: 913-921.
- 88) Dagani R (1991) Stable Crystalline Carbene Isolated at Dupont, *C&EN* 1991 January 19-20.
- 89) Herrmann WA (2002) N-Heterocyclic Carbene: A New Concept in Organometallic Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 1290-1309
- 90) Weskamp T, Kohl FJ, Hieringer W, Gleich D and Herrmann WA (1999) Highly Active Ruthenium Catalysts for Olefin Metathesis: The Synergy of N-Heterocyclic Carbene and Coordinatively Labile Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**: 2416-2419.
- 91) Ackermann L, Früstner A, Weskamp T, Kohl FJ and Herrmann WA (1999) Ruthenium Carbene complexes with Imidazole-2-ylidene Ligands Allow the formation of Tetrasubstituted Cycloalkenes by RCM. *Tetrahedron Lett.* **40**: 4787-4790.
- 92) メタセシスに高活性を示すルテニウム錯体触媒. *現代化学* 1999年2月 p8-9.
- 93) Scholl M, Trnka TM, Morgan JP and Grubbs RH (1999) Increased Ring Closing Metathesis Activity of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with Imidazoline-2-ylidene Ligands. *Tetrahedron Lett.* **40**: 2247-2250.
- 94) Scholl M, Ding S, Lee CW and Grubbs RH (1999) Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts

- Coordinated with 1,3-dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligand. *Org. Lett.* **1**:9 53-956.
- 95) Huang J, Stevens ED, Nolan SP and Petersen JL (1999) Olefin Metathesis -Active Ruthenium Complexes Bearing a Nucleophilic Carbene Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 2674-2678.
- 96) Chatterjee AK, Morgan JP, Scholl M and Grubbs RH (2000) Synthesis of Functionalized Olefins by Cross and ring-closing Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 3783-3784.
- 97) 羽村秀之 (2001) 新規 Ru オレフィンメタセシス触媒 -クロスメタセシス、閉環メタセシスによる多置換オレフィンの合成. *化学と工業* **54**: 593.
- 98) Choi TL, Lee CW, Chatterjee AK and Grubbs RH (2001) Olefin Metathesis Involving Ruthenium Enoic Carbene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 10417-10418.
- 99) Connon SJ and Blechert S (2003) Recent Development in Olefin Cross-Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**: 1900-1923.
- 100) Yoshida K and Imamoto T (2005) A New Synthetic Approach to phenol Derivatives: Use of Ring-Closing Olefin Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 10470-10471.
- 101) Donohe TJ, Orr AJ and Bingham (2006) Ring-Closing Metathesis as Basis for the Construction of Aromatic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 2664-2670.
- 102) Miller RL, Maifeld SV and Lee D (2004) Ruthenium-catalyzed Silyl Ether Formation and enyne Metathesis Sequence: Synthesis of Siloxacycles from Terminal Alkynyl Alcohols and Alkynylsilanes. *Org. Lett.* **6**: 2773-2776.
- 103) Li J and Lee D (2011) Enyne-Metathesis-Based Tandem Processes. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**: 4269-4287.
- 104) Tnogaki K and Mori M (2002) An Improved 1,3-diene synthesis from alkyne and ethylene using cross-enyne metathesis. *Tetrahedron Lett.* **43**: 2235-2238.
- 105) Giessert AJ, Synder L, Markham J and Diver ST (2003) Intermolecular Enol-Alkyne Metathesis. *Org. Lett.* **5**: 1793-1796.
- 106) Diver ST and Giessert A (2004) Enyne Metathesis (Enyne Bond Reorganization). *Chem. Rev.* **104**: 1317-1382.
- 107) Bielawski CW, Benitez D and Grubbs RH (2002) An Endless Route to Cyclic Polymers. *Science* **297**: 2041-2044.
- 108) Zhang W and Moore JS (2004) Arylene Ethynylene Macrocycles Prepared and By Precipitation-Driven Alkyne Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 12796.

■教育論文■

シリカ膜カラムによる米ゲノム DNA 抽出実験の 大学生向け動画教材の開発

内田美重^{1,2} コンタウィクリスティンアイコ¹ 呂 虹橋¹ 内田英伸^{1,3,4}

Video Teaching University Students Genome DNA Extraction
from Rice Using the Silica Membrane Column

Yoshie Uchida^{1,2}, Khristine Aiko Contawi¹, Hongqiao Lu¹
and Hidenobu Uchida^{1,3,4}

¹ Department of Food Business, School of Health and Human Life, Nagoya Bunri University, Inazawa City, Aichi 492-8520, Japan

² Present address: Graduate School of Environmental and Human Sciences, Meijo University, Nagoya City, Aichi 468-8502, Japan

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

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: uchida.hidenobu@nagoya-bunri.ac.jp

Abstract: It is important to encourage university students to study laboratory classes to identify food plants with molecular biological techniques. The authors of the present report, created a video to teach genome DNA extraction from rice using the silica membrane column. In this video, every experimental step was displayed on a large monitor behind the presenter explaining these steps successively. Based on the responses of students who watched this video, we consider that this teaching material can be used online for university students to prepare for their laboratory classes.

Keywords: iPad, iMovie, genome DNA, video, silica membrane column

序論

食用植物の分子同定は食の安全・安心を保証する上で重要である。例えば、モチ米とウルチ米の判別¹⁾や、品種の識別²⁾など日本の食品表示制度に関係する事項や、海外の遺伝子組換え品種の混入の判別が³⁾PCRにより解析できる。しかし、高校で基礎生物、生物を学ばずに大学に進学した学生に、基礎的な分子生物学の実験をどう教えるかは難しい問題である。

身近な食用植物からゲノム DNA を抽出する方法を教えるため、ブロッコリーなどからゲノム DNA の抽出方法を高校生徒に伝える理科教材が検討されており^{4,6)}、その動画もインターネット上で視聴できる⁷⁾。この実験はフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿による抽出法⁸⁾を簡便化したものである。一般に DNA を沈殿、遠心して回収すると、酵素反応を阻害する多糖類が混入することがある。この問題は CTAB 法⁹⁾やグアニジン塩酸・塩化セシウム密度勾配法¹⁰⁾による精製を行うことで改善

できる。一方、Qiagen DNeasy Plant Mini Kit^{11,12)}や ANIMOS MonoFas Food Kit^{13,14)}や Nippon Gene GM Quicker2 kit^{12,15,16)}などによるスピンカラムクロマトグラフィーを用いた方法であれば、短時間に、少量の試料からゲノム DNA が抽出できるため、高校生向けの理科教材になっている^{14,17)}。しかし、我々の知る限り、スピンカラムクロマトグラフィーでゲノム DNA 精製法を日本語で解説する動画は、研究経験のある人向けと思われるもの¹⁸⁾ぐらいしか見当たらず、また、大学生の教育を意識した動画教材は見当たらない。

近年、理科の科目を受験せずに食品学系の大学に入学する学生が増え、理科実験への関心を高める教材を開発することは重要になっている。そこで、本研究では、身近な食用植物からゲノム DNA を抽出する方法を動画で教える教材を開発することとし、その教材が、高校での実験経験がほとんどなかった

大学生の興味を引き付けたか、アンケートで調べた。

材料と方法

ゲノム DNA 抽出実験

実験材料は大学の近くで入手できるものを選んだ。具体的には、スーパーマーケットで購入した愛知県産のコシヒカリとたかやまもちにした。それぞれ 1.6g ずつを乳鉢内ですりつぶし、ニッポンジーン社の GM Quicker 2 キットを用いゲノム DNA を抽出した。同キットはコメ粉サスペンションを RNase、Proteinase K、アミラーゼの各酵素で処理し、ゲノム DNA 画分に混入しうる成分を分解した後、ゲノム DNA をシリカ膜のスピнкаラムに吸着させ、精製するシステムである¹⁵⁾。

実験ビデオの編集方針

動画時間を短縮するため、重複部分と待ちをできるかぎり削除した。コメ粒のすり潰し工程、マイクロピペットを用いた GM quicker2 キット¹⁵⁾ 溶液のピペッティング操作の繰り返し、恒温槽でのインキュベートと高速微量遠心機の待ち時間をカットした。また、実験をした講師が学生に語りかけ、視聴学生の興味を引き付けることとした。

動画編集の機器とソフトウェア

本研究では講師が理科実験室にてコメ粒からゲノム DNA を抽出し、三脚に固定した iPad で撮影助手がビデオ撮影した (図 1)。ここでは講師と撮影助手が所有する 2 台の iPad を使用した。それらは、第 6 世代、システムバージョン 16.6 (容量 32G)、iCloud+ストレージ 50G のものと、第 8 世代、システムバージョン 16.5 (容量 32G)、iCloud+ストレージ 50G のものである。必要に応じ、実験操作の手元を拡大して撮影するため、三脚の 2 脚を固定したまま残りの脚を持ち上げ、iPad を実験机に接近させ撮影を行った。また、ファイルのサイズが大きくならないようにするため撮影時間は 4 秒 (7M の MOV ファイル) ~ 3 分 33 秒 (39M の MOV ファイル) とした。34 ファイルについて、前述の通り繰り返し工程を削除、1 本のファイルにつなげた。ビデオ編集にはソフトウェア iMovie (バージョン 3.0) を使用した。手元動画のファイルは Microsoft OneDrive 経由で Windows PC に転送、外付けハードディスクにバックアップ保存した。その後、スタジオ (図 2) にて講師の解説動画を撮影 (図 3)、手元動画と合わせ 12 分 3 秒 (28M の MP4 ファイル) のビデオ教材とした。

撮影した手元画像



iPad で実験操作を撮影



図 1. 手元動画の撮影. 左写真: iPad で撮影した像の例. 右写真: iPad を三脚に固定, 像を撮影する様子. クローズアップ像を撮影したいときには, 三脚を実験者側に傾けた.

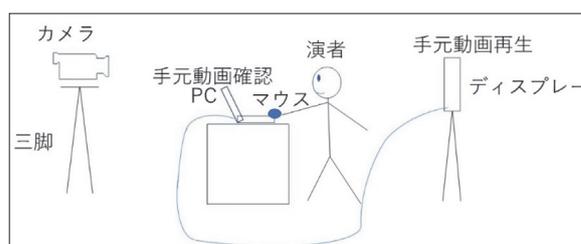


図 2. スタジオでの解説動画の撮影. 演者はノート PC と背面の大型ディスプレイで手元動画を再生, 正面のカメラが演者と背面のディスプレイの手元動画を同時に撮影した.



図 3. スタジオで録画した解説動画. 乳鉢・乳棒で各コメ粒をすり潰した. すり潰しの途中部分は動画編集段階で削除した.



図 4. スピнкаラムへ上清をアプライする場面の手元動画. カラムをマイクロチューブに載せ (スタンド右側のチューブ), その上に回収した上清をアプライした.

ビデオでのゲノム DNA 抽出実験の進行

各工程のおおよその開始時刻と作業内容は以下の通りである。

0:02 実験紹介。

0:43 手元動画を解説する動画。

- 1:12 コメ粒のすり潰し (図3)。
- 1:40 サンプルの秤量。
- 2:48 バッファーのピペッティング (試料と各酵素液との混和)。
- 4:45 恒温槽での加温 (各酵素処理による不純物の分解)。
- 6:00 マイクロチューブの遠心。
- 7:14 上清回収 (固形残渣の除去)。
- 8:28 スピнкаラムへの上清のアプライ (図4)。
- 8:34 カラムへのDNA吸着、洗浄、カラムからの溶出 (遠心)。

撮影した解説動画は名古屋文理大学健康生活学部フードビジネス学科の学生10名に見せ、アンケートをとった(表1)。各質問内容を4段階で回答してもらい、最後に自由記述で意見・感想を書いてもらった。

表1. 視聴学生へのアンケート

1	高校等で実験の授業はどれくらいありましたか。 □たくさんあった, □まあまああった, □少ししかなかった, □ほとんどなかった。
2	動画はいかがでしたか。 □大変よい, □まあまあ良い, □あまり良くない, □とても良くない。
3	動画は理解できましたか。 □とてもよく理解できた, □比較的良好理解できた, □あまり理解できなかった, □まったく理解できなかった。
4	動画を見て、実際に実験をしてみたいと思いましたが。 □大変そう思う, □ややそう思う, □あまりそう思わない, □まったくそう思わない。
5	動画は大学生が興味を持つ内容だと思いますか。 □大変そう思う, □ややそう思う, □あまりそう思わない, □まったくそう思わない。
6	ご意見や感想がありましたら、ご自由にお書きください。

結果と討論

学生へのアンケート

アンケートの第1問、「高校等で実験の授業はどれくらいあったか」への回答結果(「ほとんどなかった」、「少ししかなかった」、「たくさんあった」)ごとに、第1問から第5問への回答をグラフに示した(図5)。その結果、「高校での実験はほとんどなかった」と回答した学生は、「動画の感想」、「動画の理解」、「実験したくなったか」において、「大変よい」、「とてもよく理解できた」、「大変そう思う」(青色)と最高点の回答が多かった。以上の結果から、本研究の動画教材は高校で理科実験の機会が少なかったと感じていた学生に実験に対する興味を持たせ、実際にやって

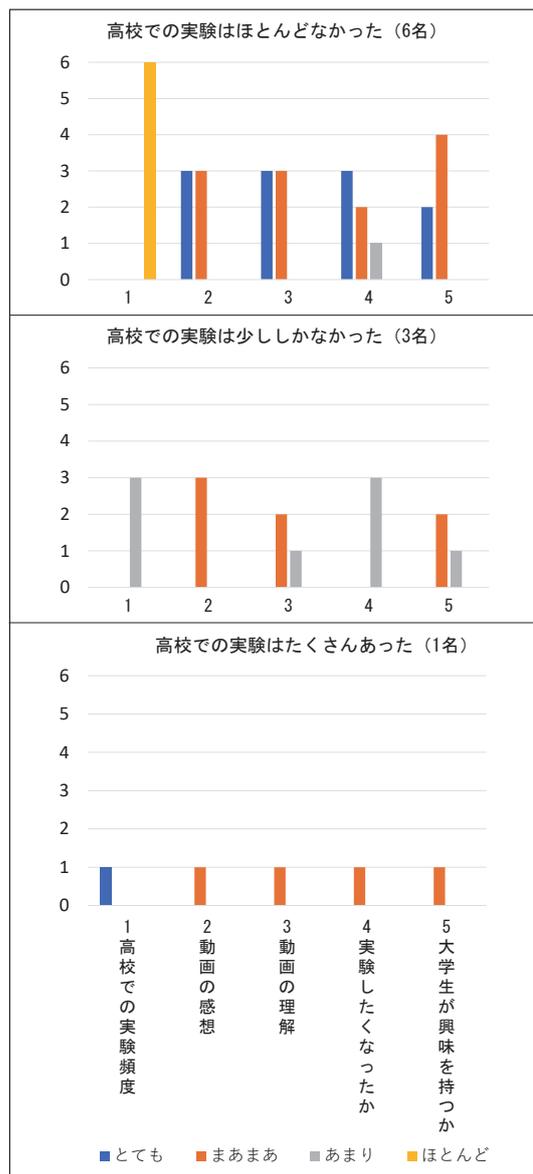


図5. アンケート結果. 第1の質問「高校で実験の授業がどれくらいあったか」に「ほとんどなかった」、「少ししかなかった」、「たくさんあった」と回答した学生について、表1の第1問から第5問の質問への回答数を表示した。グラフの縦軸は人数を、横軸は質問内容を示した。

みたくさせるものであったと考えられる。動画の中で講師が視聴者に語りかける工夫をしたのが良かったのかもしれない。「高校での実験は少ししかなかった」と回答した学生は、「ほとんどなかった」(黄色)と回答した学生より実験の経験が多かったと考えられるグループである。このグループの学生は、「動画の感想」、「動画の理解」に関しては、「高校での実験はほとんどなかった」と回答したグループと比べて、「まあまあ」、「比較的良好」(オレンジ)という、最高点ではないがやや高い点がみられる傾向があった。しかし、「実験をしたくなったか」の質問に対し、「あまりそう思わない」(灰色)と回答した者が多かった。これらの学生が実験をしたくなるためには、本教材

表 2. 意見・感想（自由記述）

1	実験している様子を撮影してくれて分かりやすく感じた。
2	実験をしている様子を見れてよかった。
3	とてもよかった。
4	字幕があるともっと分かりやすくなる。

のように食品を扱った学生実験実習に、食物学、食品安全学、食品衛生学、食品加工学、官能評価などの科目の知識を繋げる必要があるのではないだろうか。

また、自由記述では、「実験をしている様子を見れてよかった」、「字幕があるともっと分かりやすくなる」、「とてもよかった」、「実験している様子を撮影してくれて分かりやすく感じた」という回答が得られた（表 2）。

今後の展望

ゲノム DNA 抽出用の「研究者向けキットを利用」することの利点は短時間で大学レベルの実験を経験できることにあるとされている¹⁴⁾。また、「実験動画」は、遠隔地での利用が可能な教材である。これらのことから、本研究で開発した動画教材は大学生が自宅で実験実習を予習する教材として活用できると考えられる。今後、その教育効果について調べたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、名古屋文理大学の木村亮介准教授、堤浩一准教授、神奈川大学の井上和仁教授にご協力をいただいた。この研究は、2022 年度の「名古屋文理大学図書情報センターの動画作成支援講座」、2021～2023 年度の「名古屋文理大学の学長裁量枠 I（908001）」、2021～2022 年度の「物質・デバイス領域共同研究拠点」の共同研究プログラムの助成を受けたものです。本教材に報告した動画は名古屋文理大学の教育動画コンテンツである。開示すべき Conflict of interest（COI）状態はない。

付記：本論文は 2023 年 9 月 23 日に開催された日本理科教育学会第 73 回全国大会（高知大会）において発表した内容¹⁹⁾に加筆、修正を行ったものである。

文献

- 1) 岸根雅宏, 奥西智哉 (2011) DNA マーカーによる糯米検出法. *日本食品科学工学会誌* **58**: 26-29.

- 2) 大坪研一 (2014) 米の品質評価, 品種判別および加工利用に関する研究. *応用糖質科学* **4**: 93-102.
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品安全部監視安全課長 (2006) 安全性未審査の米国産遺伝子組換え米（長粒種）の混入について, 報道発表資料, 厚生労働省ホームページ. [<https://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/08/h0819-1.html>].
- 4) 森田保久 (2003) 身近な DNA 抽出実験. *理科の教育* **52**: 34-36.
- 5) 加藤良一, 平方慶太, 長田隼人, 鈴木隆 (2006) 生物教育教材としての DNA の抽出. *山形大学教職・教育実践研究* **1**: 39-42.
- 6) 庄野邦彦, 長谷川雅美, 道上達男, 最上善広, 渡邊雄一郎, 他 (2016) *新訂版 基礎生物*. 実教出版, 東京.
- 7) 東京バイオテクノロジー専門学校 (2023) いろんなものからの DNA 抽出. [<https://www.bio.ac.jp/archives/movie/3930>].
- 8) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Appendix E: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. In: *Molecular Cloning a Laboratory Manual, 2nd edition*, Cold Spring Harbor Lab. Press, E.1-E.39.
- 9) Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**: 4321-4325.
- 10) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Analysis and Cloning of Eukaryotic Genomic DNA, In: *Molecular Cloning a Laboratory Manual, 2nd edition*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 9.14-9.23.
- 11) QIAGEN (2020) DNeasy Plant Handbook, 07/2020.
- 12) 吉川ひとみ, 板宮裕実, 杉田律子 (2015) 市販キットによるコメの品種識別. *分析化学* **64**: 661-667.
- 13) アニモス (2021) Mono Fas 研究用試薬キット Food Kit アレルゲン検査用 取扱説明書 (第 1 版).
- 14) 針谷桃華, 橋場美穂, 甲斐由理子, 押鐘浩之 (2023) 高等学校の授業実態に即した分子生物学実験の実践と考察. *神奈川工科大学研究報告 A 人文社会科学編* **47**: 29-37.
- 15) ニッポンジーン (2023) GM Quicker2 -GMO DNA Extraction Kit for Rice, Canola, and Potato-, マニュアル version 3.0, [https://www.nippongene.com/siyaku/product/extraction/tds/tds_gm-quicker2.pdf].
- 16) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長 (2012) 安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について. 食安監発 0528 号第 2. [https://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/other/2012/dl/120528_1.pdf].
- 17) 末本哲雄, 田中清裕, 金井俊輔, 笠原茂佳, 石上歩, 池田紘美 (2007) DNA 鑑定を題材とした大学院生中心の出前授業—企画と実施, 留意事項について—. *高等教育ジャーナル* **15**: 27-44.
- 18) ビリュー企画 (2023) キアゲンキットでの環境 DNA 抽出方法. [<https://biryu-kikaku.com/qiagen-method/>].
- 19) 内田美重, コンタウィクリスティンアイコ, 呂虹橋, 内田英伸 (2023) 動画教材の開発 _PCR (polymerase chain reaction) によるモチ米・ウルチ米の識別 (1/3) ~ゲノム DNA の抽出~. *日本理科教育学会全国大会発表論文集* **21**: 221.

2023 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:	理学部	教授	川本達也
運営委員:	理学部	教授	酒井政美
	理学部	教授	水野智久
	情報学部	教授	桑原恒夫
	情報学部	教授	張 善俊
	理学部	教授	辻 勇人
	理学部	教授	西本右子
	理学部	教授	小谷 享
	理学部	教授	藤原 研

(2) 編集委員

委員長:	理学部	教授	川本達也
編集委員:	理学部	教授	阿部吉弘
	理学部	准教授	川東 健
	情報学部	教授	桑原恒夫
	情報学部	教授	張 善俊
	理学部	教授	加部義夫
	理学部	教授	堀 久男
	理学部	教授	安積良隆
	化学生命学部	教授	井上和仁

(3) 産官学委員

委員長:	理学部	教授	水野智久
運営委員:	理学部	教授	松澤 寛
	情報学部	教授	桑原恒夫
	情報学部	教授	張 善俊
	理学部	教授	辻 勇人
	理学部	教授	堀 久男
	理学部	教授	岩元明敏
	理学部	教授	藤原 研

(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、松本正勝
	山口和夫
客員教授	尾中 篤、久堀 徹
客員研究員	秋永 薫、安部 淳
	井上 哲、上田麗子

内田英伸、王 琦
 大石不二夫、越智拓海
 加藤善輝、川上義輝
 菊地原愛、忽那周三
 河野 優、今野 巧
 齋藤礼弥、齋藤 佑
 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、花俣 繁
 平野弘樹、付 哲斌
 藤原葉子、村下 達
 八柳祐一、吉田 剛
 渡辺 明

2 講演会

(1) 講演会

演 題: 「系外惑星の大気の特徴付け」

講演者: 川島由依氏

(理化学研究所)

日 時: 2023年4月28日(金)

16時00分～17時45分

会 場: 神奈川大学 横浜キャンパス

(7号館51号室)

主 催: 神奈川大学総合理学研究所

報 告:

1995年に太陽以外の恒星周りにおける惑星「系外惑星」が初めて発見された。それまでは我々の太陽系が惑星系としてどれほど一般的なのかは知る由もなかったが、系外惑星系の発見により太陽系とは大きく異なる多種多様な惑星系の存在が知られることとなった。現在では4000個にも及ぶこれらのサンプルを活用すれば、システムとしての惑星系の普遍的な性質を解明できると期待される。

今回の講演では、このために、発見された個々の惑星の特性(質量や半径、軌道、組成)を知り、比較することが必要であり、これらの特性の

うち前者 3 つは惑星の発見と同時に知ることができることを概観された。その一方、組成について直接的な制約をつけるためには、惑星の外殻である「大気」の分光観測を行い、大気を特徴付ける必要があることに言及しつつ、これまでおよび最新の観測により得られた系外惑星大気の知見について紹介され、興味深い考察をされた。

なお、講演会には教員、大学院生、学部 4 年生、1 年生を合わせて、18 人の参加者があった。

(報告者 粕谷伸太 2023.5.7)

(2) 講演会

演 題：「海底金属資源の開発を地球科学の応用問題として考える」

講演者：石橋純一郎 教授
(神戸大学海洋底探査センター)

日 時：2023 年 6 月 2 日(金)
15 時 30 分～17 時 30 分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(17 号館 402 号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所
報 告：

理学部理学科に地球環境科学コースが設置されたことに鑑み、神戸大学の海洋底探査センター教授である石橋純一郎先生をお呼びし、講演会を行いました。鉱床とはどういうものかを説明された後、それが地下のマグマの活動とどのように結びついているのか、熱水鉱床と金属元素の動きが金属硫化物の性質とどのように関わるのか、について話をされ、そのような科学的な考察の元に、日本近海で実際に鉱床を探索するプロジェクトとの関わりについて話をされました。当日は台風のさなかでしたが、教員 6 名の他、地球環境科学コースの 1 年生を含めて学生約 20 名の参加があり、講演後は活発な議論が交わされました。

(報告者 木原伸浩 2023.6.5)

(3) 講演会

演 題：「全天 X 線監視装置 MAXI による突発天体の観測」

講演者：芹野素子 助教
(青山学院大学)

日 時：2023 年 7 月 3 日(月)
17 時 10 分～18 時 30 分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(7 号館 41 号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所
報 告：

X 線で見える空は肉眼で見える空よりも激しく変動する。これは、我々の目に見える星の多くが普通の恒星であるのに対し、X 線で明るく見える星の多くは連星系であり、X 線を放射しているのは中性子星やブラックホールの周りに形成されている降着円盤である。今回の講演では、このように激しく変動する X 線の空で、どの天体をいつ見れば研究する価値のある面白い現象を見られるのかという予想をすることは難しく、そのため、全天をくまなく監視し、特別な現象が起こればすぐに通報するというシステムが必要になることに言及され、現在この役割を果たしている国際宇宙ステーション (ISS) に搭載された日本の X 線監視装置 MAXI を紹介された。また、MAXI の成果として、2009 年からこれまでに 35 の X 線新星を発見し、そのうちの 14 例はブラックホールであると考えられている現状について説明され、MAXI が何を観測し、そこからどのようなことがわかるのかについてお話しされ、興味深い考察をされた。

なお、講演会には教員、大学院生、学部 4 年生、1 年生を合わせて、13 人の参加者があった。

(報告者 粕谷伸太 2023.7.4)

(4) 講演会

演 題：「宇宙暗黒物質としての原始ブラックホールとアクシオン」

講演者：川崎雅裕 教授
(東京大学宇宙線研究所)

日 時：2023 年 7 月 25 日(火)
16 時 00 分～17 時 45 分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(20 号館 106 号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所
報 告：

現在の宇宙には通常物質である原子・分子の 5 倍程度の暗黒物質 (ダークマター) が存在することが知られている。暗黒物質の正体は未だ解明されておらず、宇宙物理・素粒子物理の最も大きな問題となっている。今回はこれまで考えられてきた暗黒物質の候補の中から、最近注目を集めている天体的な暗黒物質候補である原始ブラックホールと素粒子的な暗黒物質候補のアクシオンを取りあげられた。これらは暗黒物質の基本的な性質である相互

作用の弱さと質量の間関係を考えると、相互作用の弱い極限にある素粒子の候補であるアクシオンと、質量は大きいので密度が小さく、実質的な相互作用が小さくなる極限の「天体」の候補である原始ブラックホールという2つの興味深い候補である。原始ブラックホールの話では、密度揺らぎの大きさと揺らぎのスケールによって生成されることを学び、すばる望遠鏡によるマイクロ重力レンズ観測、原始ブラックホールからのガンマ線の観測、宇宙背景放射の観測などからの制限について議論し、原始ブラックホールがいかに宇宙の暗黒物質を説明できるかを説明された。

アクシオンに関しては、強い相互作用という素粒子の理論的問題の解決から導入された素粒子であることを学び、宇宙の暗黒物質になり得る2つのシナリオそれぞれの問題点や利点に関して説明された。

暗黒物質の候補としてよく取りあげられてきた WIMP とは異なり、非常に特異な性質を持つことがわかり、興味深い考察をされた。

なお、講演会には教員、大学院生、学部4年生、3年生、1年生を合わせて、22人の参加者があった。

(報告者 粕谷伸太 2023.7.27)

講演の前半では、上記の研究を理解するために必要な知識として、光化学、量子ドット、超高速緩和現象の観測手法の各項目を基礎レベルから解説し、チュートリアル的な講義を行った。つづいて、最先端研究の説明に移った。まずは、無機化合物のみからなるペロブスカイト結晶の量子ドットに関し、その分光特性に関する世界の研究成果をレビューした。これを受け、Samanta教授らが最近精力的に進めている量子ドットの励起エネルギートラップサイトに関する成果を説明した。Samanta教授らは、超高速レーザーを用いた過渡吸収分光や蛍光分光を用い、いくつかの異なるトラップサイトを見出し、それぞれについてトラップを通じた励起緩和機構について提案している。いくつかの種類量子ドットや、それらに化学修飾を行った試料に関する観測結果を併せて提示し、量子ドット内の光エネルギー緩和過程とトラップサイトの関係について解説した。

参加者は、神奈川大学学生11名の他、研究者2名、補佐員1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 2023.8.1)

(5) 講演会

演題：「Charge Carrier Dynamics in perovskite Nanocrystals」

講演者：Professor Anunay Samanta
(University of Hyderabad, India)

日時：2023年7月3日(月)
16時00分～18時00分

会場：神奈川大学 横浜キャンパス
(23号館526号室)

主催：神奈川大学総合理学研究所
報告：

2023年7月28日(金)午後16時より、横浜キャンパス23号館526講義室において、講師にAnunay Samanta教授(インド、University of Hyderabad)を迎え、「Charge Carrier Dynamics in perovskite Nanocrystals」と題した英語による講演会を行った。最近、太陽光発電や発光物質の素材として急速に研究開発が進んでいるペロブスカイト結晶の量子ドットについて、その光吸収および励起エネルギーの緩和過程に関する最先端の研究成果を解説した。

(6) 講演会

演題：「Stable and metastable spin species in solid-state inorganic materials」

講演者：Associate Professor Enrico Salvadori
(University of Torino, Italia)

日時：2023年9月21日(木)
16時00分～18時00分

会場：神奈川大学 横浜キャンパス
(17号館402号室)

主催：神奈川大学総合理学研究所
報告：

演題を「Stable and metastable spin species in solid-state inorganic materials」として、おもにパルス ESR 分光法や時間分解 ESR 法を用いた、ナノサイズ物質のスピンダイナミクスに関する研究成果についての英語による解説がなされた。特に強調されたのは、近年新しい光物性や半導体特性を発現する物質として注目されている carbon nitride のナノサイズのシート状物質に関する研究であった。この物質の光励起にともなうエキシトン生成のメカニズム説明と、生成したエキシトンのスピ

ン多重度の異常性に関する解説、また、エキシトンが拡散する過程についての理論仮説について、詳細な説明がなされた。また、このような物質の将来性について、コメントがなされた。

研究の他、Salvadori先生の母国イタリアの紹介や、日本文化でイタリアに浸透しているものについてもお話があり、国際交流への配慮がなされた講演会であった。聴講者は、神奈川大学の教職員・院生・学部生が11名、他大学教員2名、他大学院生が1名であった。

(報告者 河合明雄 2023.10.4)

(7) 講演会

演 題：「天然物合成における2つのアプローチ」

講演者：早川一郎 教授
(日本大学)

日 時：2023年10月3日(火)
15時20分～16時50分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(7号館32号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

報 告：

天然物および生理活性物質の合成に関する2つのアプローチについてご講演いただいた。通常天然物合成の手法に加えて、講演者が最近取り組んでいる「リノベーション法」についても未発表データを交えながら示していただいた。講演者は本学理学部化学科出身者(4期生)であることから、後輩をエンカレッジするメッセージも盛り込まれた。講演後の質疑応答セッションでは学生、教員を交えた積極的な議論が交わされた。

(報告者 辻 勇人 2023.10.4)

(8) 講演会

演 題：「Singlet Oxygen Photogeneration Quantum Yields and Quenching Rate Constants」

講演者：Dr. Wade N. Sisk
(President of “Expanding Scientific Horizons”, U.S.A)

日 時：2023年10月23日(月)
14時00分～16時00分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(7号館61号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

報 告：

米国エネルギー省の研究費審査官で、米国マイノリティー学生の海外留学支援団体の理事長を務めるWade N. Sisk博士を講師に迎え、学術講演および英語でのプレゼン方法についての英語講義を行った。学術講演に関しては、Sisk博士が専門とされる一重項酸素の有機半導体物質中における酸化反応に対する時間分解近赤外分光による研究について、その概略の解説があった。

聴講者に4年生が多いことを考慮して、酸素の電子状態に関する分子軌道法に基づいた基礎的な序論を丁寧に行った。これに続き、一重項酸素の実時間減衰速度の計測に基づく反応速度論に基づいた酸化反応の解明について、専門的レベルでの講義を行った。その後、英語でのプレゼンにおける重要な5つのポイントについて、解説を行った。今回は、特別ゲストとしてSisk博士の夫人であるAvril Sisk氏にも短時間登壇いただき、プレゼンについてのアドバイスコメントをいただいた。Avril Sisk氏は米国における弁護士としてWashingtonDCを中心に活躍されており、弁護における多くの経験から、プレゼンで重要な点を解説した。特に、Eye contactの重要性について力説された。

聴講者は、学生12名、学外者2名(久光製薬、テレビ朝日)、職員2名であった。

(報告者 河合明雄 2023.11.9)

(9) 講演会

演 題：「小型惑星の発見と軌道・大気観測の最前線」

講演者：平野照幸 准教授
(自然科学研究機構 アストロバイオロジーセンター)

日 時：2023年10月24日(火)
17時10分～18時40分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(20号館109号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

報 告：

系外惑星の最初の発見から30年近くが経過し、近年ではその統計的な性質や各惑星の詳細な特徴が議論されるようになってきた。この講演では、近年の系外惑星観測の発展とそこから明らかになった惑星系の特徴を概観され、系外惑星科学におけるいくつかの重要な

未解決問題について解説された。また、それら未解決問題を紐解くために平野氏のグループが現在取り組んでいる系外惑星の観測研究を紹介され、特に惑星の軌道や大気の特徴付けを通じて惑星系の形成進化史がいかに理解されるかを考察された。また、今後の系外惑星探査の状況、見通しについても触れられた。非常に興味深い内容で、多数の質問が出て、活発な議論を行うことができた。

なお、講演会には教員、大学院生、学部4年生、3年生を合わせて、10人の参加者があった。

(報告者 粕谷伸太 2023.10.25)

(10) 講演会

演 題：「EPR Spectroscopy: developments and applications」

講演者：Professor Christopher Kay
(Saarland University, Germany)

日 時：2023年10月27日(金)
15時00分～17時00分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(3号館408号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

報 告：

電子スピン共鳴を専門とする Christopher Kay 教授 (ドイツ Saarland University、英国 University College London を兼務) を講師に迎え、実演を多く含んだ初歩的な磁気共鳴の解説から、Kay 教授の専門である光励起三重項状態をつかめたメーザー発振現象の紹介まで、英語による講演会を行った。

講演の序論においては、会場の雰囲気と和やかにする目的で、数学的なパズルの問題を取り上げ、実際のパネルを使用したパズル遊びを聴講者全員で実施した。扱ったのは昨年が開発された図形パズルで、タイルとしての利用が可能である。敷き詰めた模様パターンが一切現れないことが特徴であった。これに続き、NMRなどの磁気共鳴で基本的現象である自由誘導減衰について、Kay 教授自作のステンレス製円盤を用いた実演による解説を行った。学生諸氏も、自ら円盤を回転させる実習により、スピンが自由誘導減衰をおこす原理を可視化した状態で学ぶことができた。

これらに引き続き、Kay 教授が開拓したペンタセンドープ結晶におけるペンタセンの光励起を利用したメーザー発振の概説が行われた。Kay 教授が設計製作したマイクロ波共振

器と誘電体素子を聴講者全員が手に取って観察し、メーザー発振の原理や誘電体の役割についての理解を深めた。

講演会は、英語で行われたが、Kay 教授は極めてゆっくりお話しされ、実演を多用したことで、多くの学生に分かりやすい内容であった。聴講者は、学生12名、研究員1名、職員1名であった。

(報告者 河合明雄 2023.11.13)

(11) 講演会

演 題：「核ガンマ線による新しい天文学と GRAMS 実験の展望」

講演者：小高裕和 准教授
(大阪大学)

日 時：2023年11月9日(木)
17時10分～18時20分

会 場：神奈川大学 横浜キャンパス
(7号館31号室)

主 催：神奈川大学総合理学研究所

報 告：

今や天文学の研究は、電磁波の観測に加えて、宇宙線やニュートリノ、重力波をも利用することが可能になり、「マルチメッセンジャー天文学」の新時代を迎えている。これらの中で、伝統ある電磁波による観測技術は最も進んでいると言えるが、電波から超高エネルギーガンマ線にわたる約20桁もの波長域をカバーするようになった現在でも、メガ電子ボルト (MeV) 帯域のガンマ線観測は極めて困難であることで知られ、最後に残された「未開拓波長域」となっている。この波長帯はちょうど原子核のエネルギー準位に対応し、天体における核反応を直接調べることができる極めて重要な帯域である。本講演では、将来の核ガンマ線観測の重要ターゲットとなる超新星や連星中性子星合体における重元素合成について概観され、最新の MeV ガンマ線観測技術を紹介されつつ、液体アルゴンを用いた大型ガンマ線検出器の計画 GRAMS についてその展望を述べられた。また、暗黒物質の間接探索において、特異な信号を検出できる可能性についても議論された。非常に興味深い内容で、多数の質問が出て、活発な議論を行うことができた。

なお、講演会には教員、大学院生、学部4年生、3年生、および、外部からの研究者を合わせて、16人の参加者があった。

(報告者 粕谷伸太 2023.11.11)

(12) 講演会

演題：「ゼオライト細孔が示す“ゆりかご効果と”有機合成への応用」

講演者：尾中 篤 名誉教授
(東京大学)
(神奈川大学総合理学研究所客員教授)

日時：2023年12月6日(水)
15時30分～17時00分

会場：神奈川大学 横浜キャンパス
(17号館402号室)

主催：神奈川大学総合理学研究所

報告：

尾中先生は東京大学および東京農業大学で長年に渡り有機化学の研究と教育に携わってきました。最近では、ゼオライトの細孔を反応場として用いることで、従来は不可能であった有機反応を実現させ、活発に研究を展開しておられます。今回、神奈川大学理学部の横浜移転にあわせて、神奈川大学総合理学研究所の客員教授に就任され、神奈川大学の有機化学の発展に資するために、尾中先生の最新の研究成果と、新しい有機化学の方向性を講演していただきました。当日は、教員6名(名誉教授を含む)の他、学生約15名の参加があり、ゼオライトという「場」の特異性と、「場」を用いた有機反応の制御について講演をいただき、その後、活発なディスカッションが行われました。

(報告者 木原伸浩 2023.12.7)

堀 久男、濱浦 尋、仲上綾音、迎 弘文、
岸川洋介、ダイキン工業(株)

5) 「化合物、それを含んでなる光触媒、及び水素の製造方法」

辻 勇人、川本達也、井上 哲

6) 「高分子」

木原伸浩、加藤甫規、富田敦史、(株)イノアック
技術研究所

7) 「バナジウムの回収方法、及びバナジウムとその他の金属とを含む溶液からバナジウムを選択的に回収する方法」

堀 久男

8) 「シクロペンター縮環多環芳香族炭化水素化合物の製造方法」

辻 勇人

9) 「接着加工部材の製造方法及び治具」

村下 達、星野 靖、関 裕平

10) 「化合物及びそれを含んでなる発光材料」

辻 勇人、川本達也、井上 哲、牧浦理恵、(大)
大阪大阪公立大学

3 産官学 活動実績

(1) 特許

〔日本出願〕

1) 「イオン交換膜の分解処理方法及びそれを行うための装置」

堀 久男

2) 「ポリエステル製の製造方法」

木原伸浩

3) 「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

4) 「フッ素含有ポリマーの分解方法」

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行あける。

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) *テイツイガイガー植物生理学 第3版*. 培風館, 東京.
- 7) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料の元素分析法. *微生物* **5**: 34-44.
- 8) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプ*

ローチ. 弘学出版, 東京.

- 9) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. よくわかる電子顕微鏡技術. 平野 寛, 宮澤七郎監修, 朝倉書店, 東京. pp. 137-148.
- 10) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. 神奈川大学総合理学研究所年報 2003. pp.41-80.

※ インターネット情報を文献として引用する場合は、著者 (年) 論文タイトルなどの末尾に [] 付きで、[doi. -----]、[www. -----]、[http://www. -----] のように記述する。なお、閉じ括弧のあとには必ずピリオドをつける。

(12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

表の上部には必ず番号 (表 1.、Table 1. など) とタイトルを付し、本文との整合を期す。

表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。タイトルの末尾にピリオドはつけない。

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

なお、本文への挿入の他に各表の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図のタイトルの末尾にはピリオドを置く。図のタイトルと説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図のタイトルと説明文に限り、和文でもピリオド (.) とカンマ (,) を用いる (和文の句読点は用いない)。

図の番号および説明文の文字サイズは 9P とする。

図はできるだけ分かりやすいものとし、図中の文字や記号は高さ 3 ~ 5 mm 程度にする。

写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

なお、本文への挿入の他に各図の抜粋も作成し、電子媒体として原稿に添付する。これらの図は、あまり圧縮せず、電子密度 300dpi 程度

の原図とする。

(14) 単位

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

(15) 作製見本

希望者には作製見本 (デジタルファイル) を配付する。

原稿は、作製見本および既に発表されている本誌の各論文を参照して作製する。

4 原稿の体裁 (報告書)

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

下記要領に従って、原稿はそのまま印刷できるように仕上げる。

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

多人数による共同研究のうち、

(1) 各研究者が全員原著と同等の論文 (短報の場合も含めて) を投稿出来る場合は、それらを原著として扱い、原稿は3の規定に準じて作製する。

(2) 各研究者が要約を作製し、代表者がそれらを一つの報告書としてまとめる場合は、編集委員会の指示に従ってこれを作製する。この場合も、文書のレイアウト、フォントの種類とサイズなどの基本的な原稿作製基準は3の規定と同じである。

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

5 原稿の体裁 (テクニカルノート)

これに該当するものは、研究技術および研究装置の紹介記事である。

研究論文 (原著および報告書) の規定に準じて原稿を作製する。

6 原稿の体裁 (教育論文)

これに該当するものは、自然科学分野の教育研

究や教育技法に関する論文、および完成度が高く簡潔に纏められた実習テキストなどである。

研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

7 原稿の体裁（研究交流報告）

これに該当するものは、研究交流を目的とした他大学・研究所訪問記、海外研究留学報告、国内外開催の国際学会参加報告などである。

本誌、18巻掲載の該当論文を参照し、英文要旨を省略できることを除いて、研究論文（原著および報告書）の規定に準じて原稿を作製する。

8 投稿と略題名（Running Title）提出

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

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

9 投稿論文の審査

適時、レフリーによる校閲を行ない、採否や再投稿請求は編集委員会で決定する。

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

10 原稿の校正

掲載決定原稿は、ゲラ刷りの段階で著者の校正

を依頼する。校正は最低限の修正に留める。

11 投稿料

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

また、いずれの範疇であっても、論文が12頁を超える場合には、超過分に係る経費は著者がその実費を負担するものとする。

12 別刷

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

13 著作権等

掲載論文の内容についての責任は著者が負うものとする。その著作権は著者に属するが、著作権のうち、複製権および公衆送信権については神奈川大学図書館に許諾を与えるものとする。論文内に使用した他者の著作物（図版や写真など）の転載許可は著者の責任において投稿前に行う。

出版権は神奈川大学総合理学研究所に属するが、総合理学研究所は頒布の便を図るために、神奈川大学学術機関リポジトリを通じて「Science Journal of Kanagawa University」を公開するものとする。

Author Index

A

- Akinaga, Kaoru 秋永 薫…………… 31
Aoki, Takashi 青木 孝…………… 1

C

- Chikaraishi, Noriko 力石紀子…………… 13
Contawi, Khristine Aiko コンタウィクリスティンアイコ…………… 77

F

- Fujita, Misato 藤田深里…………… 31
Fujiwara, Ken 藤原 研…………… 31
Fukano, Hajime 深野 元…………… 31

H

- Hamada, Takumi 濱田拓見…………… 37
Hara, Kazuya 原 和也…………… 31
Harada, Takashi 原田 宝…………… 53
Hirotsu, Masakazu 廣津昌和…………… 13
Hu, Jinan 胡 繼楠…………… 19

I

- Iwamoto, Akitoshi 岩元明敏…………… 37

K

- Kabe, Yoshio 加部義夫…………… 63
Kawamoto, Tatsuya 川本達也…………… 53
Kawanobe, Kyoko 川延京子…………… 41
Kotani, Susumu 小谷 享…………… 25
Kouyama, Kazenaru 神山風鳴…………… 31
Kuwabara, Tsuneo 桑原恒夫…………… 49
Kuwamura, Naoto 栗村直人…………… 13

L

- Louis P. Ronse De Craene …………… 37
Lu, Hongqiao 呂 虹橋…………… 77

M

- Min, Yihao ミンイゴウ…………… 25
Mizuno, Tomohisa 水野智久…………… 1
Mizuta, Masaki 水田眞輝…………… 41
Mogi, Kazue 茂木和枝…………… 31

N

- Naito, Gai 内藤 凱…………… 31
Nishii, Kanae 西井かなえ…………… 37
Nishijo, Koga 西條光河…………… 41
Nishimoto, Yuko 西本右子…………… 41

O

- Okanishi, Kazuma 岡西一真…………… 13
Oti, Takumi 越智拓海…………… 25
Otoguro, Yuna 乙黒優那…………… 9

S

- Saito, Kazumi 斉藤和巳…………… 49
Satsuma, Toru 薩摩 透…………… 31
Shoji, Tatsuya 東海林竜也…………… 9
Suzuki, Kentaro 鈴木健太郎…………… 9
Suzuki, Yoshihiro 鈴木祥弘…………… 41

T

- Toyoizumi, Ryuji 豊泉龍児…………… 19, 31
Tsuboi, Yasuyuki 坪井泰之…………… 9

U

- Uchida, Hidenobu 内田英伸…………… 57, 77
Uchida, Yoshie 内田美重…………… 57, 77

Y

- Yamada, Taiju 山田大樹…………… 37
Yoshida, Hiroshi 吉田 洋…………… 57
Yoshimoto, Maho 吉本茉歩…………… 31

編集後記

2023年は理学部が湘南ひらつかキャンパスから横浜キャンパスに移転した大変な年でした。2022年の年末から2023年3月までの移転期間中、多くの研究機器が長期間運転停止となりました。私も2022年の年末辺りから、植物育成棟が使えなくなる期間に備えて新たな実験植物の播種を中断し、2023年の4月になってから、やっと新規に植物の種を播けるようになった有様でした。卒業論文、修士論文、博士論文の作製に取り組んでいた卒業研究生、大学院生を始め、多くの方がやきもきしたことと思います。このような研究機器の運転停止や実験材料の調達不可などの問題から、研究の遂行に支障を来さないか心配な年でし

た。研究に停滞期間があったことは間違いのないことでしょうが、皆様の研究への熱意と創意工夫のおかげをもちまして、理学誌には多くの研究・教育論文が投稿され、立派に仕上がりました。理学部はまだ横浜キャンパスに馴染もうとしているところですが、今後、皆様が横浜の地に根を下ろし、湘南ひらつかキャンパスで行ってきた価値ある研究を横浜キャンパスでさらに大きく発展させられることを祈念申し上げます。また、理学誌にその研究成果をより多く発表して下さることを期待致しております。

〔 神奈川大学総合理学研究所 〕
〔 理学部 安積 良隆 〕

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

堀 久男 理学部

Science Journal of Kanagawa University

Editor-in-Chief

Tatsuya Kawamoto Faculty of Science

Editors

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

Hisao Hori Faculty of Science

Science Journal of Kanagawa University Vol. 35 (*Sci. J. Kanagawa Univ.*)

発行日	2024年7月31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