

SCIENCE JOURNAL

SCIENCE JOURNAL OF KANAGAWA UNIVERSITY

KANAGAWA UNIVERSITY

神奈川大学理学誌

Vol.18 2007

神奈川大学総合理学研究所

Research Institute for Integrated Science of Kanagawa University

Science Journal of Kanagawa University

Vol. 18

目 次

巻頭言

齊藤光實	1
------------	---

原 著

A Rule-Based Expert System for Automatic Segmentation of Cerebral MRI Images Shanjun Zhang and Kazuyoshi Yoshino	3
An Intracellular PHB Depolymerase from the Supernatant Fraction of <i>Ralstonia eutropha</i> H16 Cells Tomoko Abe, Teruyuki Kobayashi and Terumi Saito	11
Detection of the Centrosomal DNA from the Sperm of Bryophyte <i>Marchantia polymorpha</i> L. and <i>Physcomitrella patens</i> Shinobu Kawai, Erika Watai, Takashi Sano, Kazuhito Inoue and Akiya Hino	19
外部仕様のパラドックス — 問題点と対策の考察 — 野口健一郎	27
Fork システムコールを用いた並列ガーベジコレクションの Lisp 処理系への実装と評価 佐藤憲一郎、松井祥悟	37
イオン注入したダイヤモンド半導体の MeV 級イオンビーム照射による電氣的活性化の研究 — 高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の研究(2) — 中田穰治、斎藤保直、川崎克則、服部俊幸	45
水ストレスで誘導されるアイズプラントの葉組織および細胞の微細構造変化 早津 学、鈴木季直	55
シロイヌナズナの生殖過程に異常のある変異体の染色体解析 II 酒井麻美、黒森 崇、松永幸大、安積良隆	61
シロイヌナズナの倍数体の減数分裂期染色体の動態解析 早川 俊、岩元明敏、安積良隆	71
短 報	
海産無脊椎動物の相互作用と形態・適応の進化、および、人間活動がこれらに与える影響 — 相模湾平塚沖浅海の貝類と海底環境 — 大和田正人、吉田奈央、金沢謙一	77

報告書

ホタルの生物発光とそれらに関連する化学発光の機構解明 松本正勝、渡辺信子、大橋 守、藤森 憲	81
生体工学のための感光性材料の開発 山口和夫、前田瑞夫、横山昌幸	85

テクニカルノート

多目的分析装置の立ち上げ 中田穰治、斎藤保直、川崎克則、服部俊幸	89
中電流型イオン注入装置の導入 中田穰治、斎藤保直、川崎克則、服部俊幸	95

研究交流

「国立台湾大学」訪問の記 杉谷嘉則	103
台湾大学における第2回化学科合同シンポジウムに参加して 竹内 重夫	107
ボストン大学認識とニューラルシステム研究所における Laminar cortical モデルによる仮想環境でのサイバシークに関する研究 張 善 俊	109

2006年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告	115
-------------------------------	-----

投稿規定 (Science Journal of Kanagawa University)	118
---	-----

編集後記	122
------------	-----

■ 巻頭言 ■

ポストゲノムの時代

齊藤光實

神奈川大学総合理学研究所 所長

The Postgenome Era

Terumi Saito

Director of the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University

生物学の分野においてポストゲノムという言葉が聞かれるようになってからもうかなりになる。ゲノムという言葉は、gene + ome からの造語であって、遺伝子全体とか、遺伝子の集まりとか言う意味である。生物の遺伝子研究が近年急速に進み、生物の持つ遺伝子が一応全部分析できるようになって来ている。遺伝子の実体は DNA であるので、分析の意味は DNA 中の塩基の配列決定に他ならない。一個の生物が持つ遺伝子の数はもちろん有限と考えられていた。メンデルの出現前までは融合遺伝という事も考えられた。遺伝の際に両親からの遺伝子がいろんな色のインクのごとく混ざりあって子孫に伝わると言う考え方である。この考え方では遺伝を決定する要素は無限に有る事になる。しかし、メンデルは遺伝は粒子として伝達すると考え、その後、遺伝子という名称が定着した。原子、分子と同様に漢字で小さい物を表す「子」を当てたのである。技術の進歩によって、生物の持つ全 DNA の塩基配列を決める計画（所謂ゲノムプロジェクト）は当初の目標をはるかに上回る速度で次から次と色々な生物のゲノム配列の決定に成功した。ヒトのゲノム配列も決定されたし、その他、細菌、植物、動物の主要な生物のゲノム配列は既に判明している。遺伝子の塩基配列から蛋白質のアミノ酸配列が分かる。今では、色々な生物のゲノム配列をデータベースとして利用でき、蛋白質のアミノ酸配列も容易に手に入る時代となった。標準の細菌である大腸菌のゲノムプロジェクトは既に終わっているので、大腸菌の遺伝子は PCR (polymerase chain reaction) という方法で簡単に増幅して得る事ができるし、そこから遺伝子が指定している蛋白質を純粋な形で作ることも原則的に可能であり、学部の卒業研究でもできる。このような状態をもうゲノムプロジェクトの時代は終わったという意味でポストゲノムといわれる。

しかし、有限である遺伝子の配列が解明されるこ

とは時間の問題ではあった。もう生物の分子的な理解は殆ど終わったと思った気の早い人もいられない。しかしそうではない。ポストゲノムの次に盛んに聞くようになった言葉にプロテオームがある。この言葉も protein + ome であって、ある生物のある瞬間に、その生物や細胞中に存在する蛋白質の集合を指す。どのような蛋白質が、どれくらいの比率で存在するかを知ろうとするのである。これが分かれば細胞の働きを蛋白質から説明できるかも知れない。プロテオーム研究には二次元電気泳動と質量分析機が活躍する。プロテオームにおいては蛋白質が作る組み合わせは単純な有限ではなく、各々の蛋白質の種類と量の組み合わせは膨大な数になる。最近の研究では、遺伝子から作られる蛋白質だけが重要ではなく、蛋白質にならない RNA もいろんな事をやっていると示唆されている。そこでトランスクリプトーム (transcripts + ome) という用語も登場している。transcripts とは DNA から転写された RNA のことである。その中には、蛋白質となる情報を含んだ RNA もあれば、RNA 止まりのものもある。したがって、プロテオームよりも一層複雑である。プロテオームもトランスクリプトームもどちらも遺伝子産物の集合であるので、遺伝子の発現が問題となる。仮に 10 個の遺伝子がそれぞれ on、off という調節を受けているとすれば、 2^{10} の組み合わせが生じ、これはおよそ 1000 となる。現実の遺伝子調節は on、off のようなデジタルの調節ではなくアナログの調節であるので、数千の遺伝子の発現状態の組み合わせは無限に近づく。もっとも、代謝系の一連の蛋白質のように協調的に発現調節を受けるものの存在は、この数を減らすことにはなるが。

次の問題は細胞内の分子の相互作用である。細胞内部の物質は極めて密に詰め込まれていて、細胞内は稠密なゾル状態であると考えられる。こうした状態での分子間の相互作用は殆ど研究されていないよ

うに思われる。遺伝子調節の基本は蛋白質と DNA の相互作用である。情報伝達では低分子と蛋白質の相互作用の他に蛋白質と蛋白質の相互作用が重要である。代謝は全て蛋白質と低分子（あるいは高分子）との相互作用と見なしてよい。プロテオーム、トランスクリプトームの後にくるのはこのような相互作用の時間的、空間的理解であろう。このような相互作用の集まりをインタラクトーム (interaction + ome) と呼んでもいいかもしれない。インタラクトームはゲノム、プロテオーム、トランスクリプトーム

の全てを包含する最上位の概念であり、その複雑性は想像を越える。このように、ポストゲノムの時代にも分子からの生物の理解はまだ緒に就いたに過ぎないといわざるを得ない。

研究所の年報は昨年から新しい装いで出発した。研究所の歩みをお知らせするとともに学术论文の掲載も行う。関係各位の投稿を期待する。今後とも「*Science Journal of Kanagawa University*」について総合理学研究所の他の事業とともに皆様のご理解とご支援を賜りたい。

■Full-Length Paper■

A Rule-Based Expert System for Automatic Segmentation of Cerebral MRI Images

Shanjun Zhang^{1,3} and Kazuyoshi Yoshino²

¹ Department of of Computer Science, The Faculty of Science, Kanagawa University, 2946, Tsuchiya, Hiratsuka-shi, Japan 259-1293, Japan

² Department of Welfare Systems Engineering, Kanagawa Institute of Technology, 1030 Simoogino, Atsugi-shi, Kanagawa 243-02, Japan

³ To whom correspondence should be addressed (Kanagawa University).
E-mail: zhang@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The interior boundary of medical image is fuzzy in nature. In this paper, proposed is a novel method to segment and classify the MR image of head by fuzzy clustering and fuzzy reasoning. Traditional fuzzy clustering methods are basically statistical ones in which only intensity affinities of the image are reflected. Considering the characteristics of MR image, we constructed a set of knowledge-based rules to set the fuzzy memberships of the pixels of the image by generally using the intensity similarities, positional relationships among multiple spectra MR images, and the shape features of the brain tissues and the mathematics morphological analogy of the brain tissues. Then a coarse-to-fine reasoning method is used to combine the fuzzy memberships of the pixels of the T1- and T2- channels of the image to segment the cerebral tissues into gray matter, white matter, and CSF. Experimental results showed the efficiency of the method.

Keywords: fuzzy clustering, rule base, MRI, segmentation, morphological filter

Introduction

Segmentation of volumetric image data plays a key role in medical image processing, especially as a preprocessing step for quantitative analysis and volume visualization. Most approaches to image segmentation try to separate segments containing pixels with similar intensity. For aiding visualization of medical images, it is required to classify organs and other solid masses into tissue types.

Unfortunately, nonuniform intensity levels may exist in tissues of identical compositions. The intensity inconsistencies caused by the effect of inhomogeneity of medical modalities and biological variations of tissues form the main obstacles for the segmentation of medical images. To solve the problem, many methods, which can be categorized into classical, statistical, structural and knowledge-based methods, have been proposed¹⁻⁶⁾.

Classical methods include the use of standard image processing techniques such as threshold,

and edge and region-based techniques. These methods are usually sensitive to noise and do not result in continuous regions⁵⁾.

Statistical methods assume the tissue region to follow a priori model such as a finite Gaussian mixture, then the parameters are estimated by expectation-maximization algorithm (EM) to obtain the final segmentation⁸⁻¹³⁾. The structural approaches take the use of morphological properties of the objects to aid the segmentation^{14, 15)}. Morphological filtering has been introduced by Mather on⁷⁾ with the inception of morphological opening and closing, can simplify images and remove irrelevant features while preserving their fundamental shape characteristics.

Statistical segmentation methods seldom incorporate geometry of regions within the image, while structural methods often ignore the distribution of intensity values within the image when making judgements about boundary properties and measures of homogeneity within regions.

Knowledge-based methods provided a means to combine the statistical and structural methods. Focused on different facts of the image objects, different knowledge-based methods have been proposed¹⁷⁻²¹).

In this paper, we proposed another knowledge-based approach focused on the intrinsic fuzzy property of the cerebral magnetic resonance image. In the proposed method, a simplified fuzzy c-means algorithm is applied to pre-segment the T_1 weighted and T_2 weighted magnetic resonance image. The segmented results are deliberately under-segmented and over-segmented to get a set of clusters with fuzzy memberships. After the defuzzification of the under-segmented results, they are used to generate the brain mask and the extra-cranial mask by the special feature values distribution of the T_1 and T_2 weighted images. While the over-segmented results are used to separate the three main brain tissues- white matter, gray matter and cerebrospinal fluid (CSF) into non-overlapped cliques. Then the statistical features such as means and variations together with the morphological characters are calculated for the cliques. Finally, sets of knowledge based fuzzy rules are used to progressively specify the relationship between the cliques and the tissue class memberships. During the fuzzy reasoning, the spatial correspondence among the hetero-spectral images and the k-nearest neighborhood voting mechanism provided means for crossreferences.

Background

In many medical images, pathological tissues appear without clear-cut frontiers, such that fuzzy set fit to model uncertainty and inaccuracy attached both to image components and image processing results. Fuzzy c-means (FCM) is an effective method to separate the available data set into subgroups to reflect the substructures in the feature space of the data set. Let $X = (x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$ be the set of d-dimensional feature vectors, the memberships μ_{ij} can be iteratively calculated by minimizing an objective function of the type

$$f_p(U, V) = \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^c (u_{ij})^p \|x_i - v_k\|^2 \tag{1}$$

$$1 \leq p \leq \infty$$

$$v_k = \sum_{j=1}^N \frac{(u_{kj})^2 x_j}{\sum_{j=1}^N (u_{kj})^2}, 1 \leq k \leq c \tag{2}$$

Where $V = (v_1, v_2, \dots, v_c)$ is a c-tuple of prototypes, $U = \{\mu_{ij}\}$ is the fuzzy partition matrix, and $\mu_j = (\mu_{1j}, \mu_{2j}, \dots, \mu_{cj})$ denoting the grade of membership of feature point x_j .

Usually, the clusters obtained by FCM do not exactly correspond to the tissues to be labeled. One reason of this is because that it is not known a priori the exact number of the distinct substructures in the image, the other reason comes from the inhomogeneity of the feature values of MR image, such that the pixels of the same tissues may be assigned to different clusters, and in the same cluster, pixels may belong to different tissues. Let ω_j be tissue membership vector of pixel x_j as

$$\omega_j = (\omega_{1j}, \omega_{2j}, \dots, \omega_{Lj}) \tag{3}$$

Where $\omega_{ij} \in [0, 1]$, $i = (1, 2, \dots, L)$ and L be the number of tissues. The aim of the rest paper is to provide a novel method to correspond the memberships between ω_j and μ_j .

Feature population distribution

The cross-sectional slices of the MR image consist of three feature images: T_1 -weighted (T_1), T_2 -weighted (T_2), and proton density (PD). The feature values of the images depend on the repetition time (TR) and the echo time (TE) used in scanning. Although the absolute feature values of T_1, T_2 , PD change with person, the relative magnitudes distribution will not change greatly for different tissues.

For example, in T_1 feature space, air regions exhibit to be with lowest intensities, white matter exhibit to be with high intensities. The intensities of gray matter are generally lower than those of

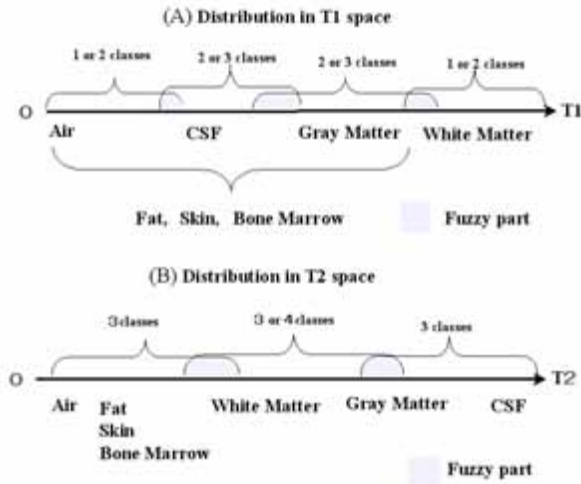


Fig. 1. Cluster centers distribution feature of MR images. (A) T_1 -Weighted image, (B) T_2 -Weighted image.

white matter but higher than those of CSF. The extra-cranial tissues such as bone marrow, subcutaneous fat, skin has intensities scattering in the range from air to white matter in T_1 feature space. At the mean time, the intensities of the tissues distribute in another but definite form in T_2 feature space.

Raya¹⁶⁾ analyzed the histogram of the low-level feature of the tissues and then derived the a set of confidence function to reflect the measure of the likelihood for a class of pixels in the image. Since the histogram of different tissues may overlap, and for a particular tissue, the feature values may vary in several distinct ranges, the resultant confidential function exhibit with overlapped range. To solve the problem, Raya used six low-level features derived by the combination of T_1 and PD feature spaces.

The idea of ¹⁶⁾ and similar ideas in ^{13-15, 18, 20)} give us motivation to use fuzzy method to describe the certainty a pixel should be assigned to a tissue. We use a simplified fuzzy c-means algorithm to coarsely segment the original image into over-divided clusters. Then we use a set of fuzzy reasoning rules to assign the pixels in each cluster into white matter, gray matter and CSF tissue categories. To reduce the possibility that more than three tissue pixels fall in the same cluster, the number of the clusters is set bigger than the practical for the initial parameter of the

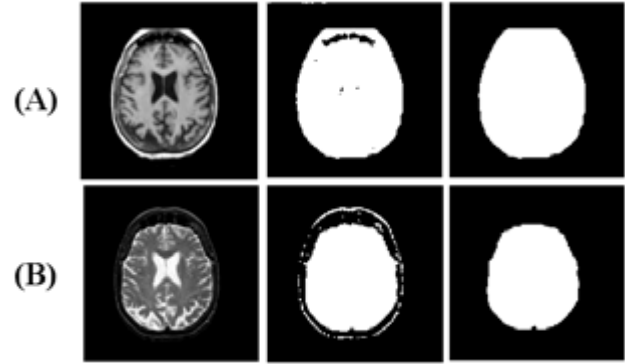


Fig. 2. An example of the pre-process. (A) shows the original T_1 -weighted image, a cluster of FCM of T_1 -weighted image and the outline mask of the head. (B) shows the original T_2 -weighted image, a cluster of FCM of T_2 -weighted image and the outline mask of the brain.

FCM algorithm. IF the number of the clusters be set to be 10, the distribution of the center values of the clusters may follow the spectrum shown in (Fig.1)²⁰⁾.

Method

Preprocessing

From Fig.1, we can see that it is difficult to separate the extra-cranial tissues merely by the intensities of the feature values. So we take the use of the shape knowledge of the brain to get rid of them.

It is known that brain as a whole is a connected entity, and in T_1 -weighted image, the intensities of the cranial bone are quite different from those of the air, the image can be approximately be viewed as two parts: air part, and in cranial part; while in the T_2 -weighted image, the intensities of the tissues between the cranial bone and the boundary of the brain matters are similar to those of air, and the image can be approximately be viewed as brain-matter part and non-brain-matter part.

By using under-segmented FCM algorithm, we can automatically pick out a cluster as shown in the middle of Fig.2 from the FCM clustering results where the cluster number be set four, and iteration number be set three. Then we can obtain the brain mask and extra-cranial mask through morphological closing processing.

Using the masks, we can separate the bone, skin, fat, and the brain matters from the original

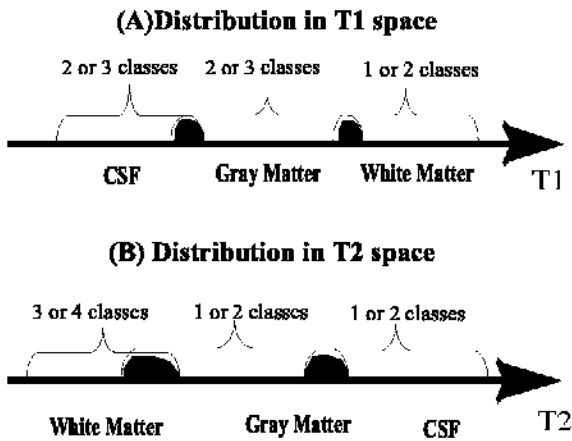


Fig. 3. Cluster centers distribution after mask process. (a) is for T_1 weighted image, (b) is for T_2 weighted image. membership of the pixels to the three main tissues.

images. By setting the cluster number eight, the FCM can divide the masked image into six to eight clusters (one or two clusters may be empty when the cluster number be eight), and centers of the clusters may exhibit a distribution as shown in Fig.2. So the pixels in the over-segmented FCM clusters may belong to only one tissue or two adjacent tissues. Next, we will introduce a set of fuzzy rules to separate them by calculating the fuzzy.

Fuzzy rules for tissue membership

In Fig.3, we can see that in the T_1 feature space, apart from the extra-cranial regions, the pixels in the lowest two or three clusters may belong to CSF tissues, and those in the highest one or two clusters may belong to white matter, the remain pixels in the two or three clusters in the middle range may belong to gray matter.

Without losing generality, let μ_{ij} denote the membership of pixel x_j to cluster i , v_i denote the means of the cluster center, where $v_m < v_n$, for $m < n$, and $i = (1, 2, \dots, c)$. In this subsection we describe a way to transfer the cluster membership $\mu_j = (\mu_{1j}, \dots, \mu_{cj})$ into tissue membership $\omega_j = (\omega_{1j}, \dots, \omega_{Lj})$. In this paper, c is set eight, and L three.

First, the maximum defuzzification method is used to get c clusters from the result of FCM. Then the statistic characters and the morphological

characters are calculated for each cluster. By statistic characters we mean the average and variation of the cluster. By morphological character we use a ratio N_{open}/N_{orig} to represent the cluster's morphological density, where N_{open} is the number of the pixels of the cluster after performing an opening morphological filter on a 3×3 neighborhood, and N_{orig} is the number of the pixels of the focused cluster.

Fig.4 shows the defuzzified results of the FCM for T_1 and T_2 - weighted image. Fig.5 shows the distribution of the statistical and morphological features of the corresponded clusters (In the left part, the size of the circle represent the variation of the cluster, and the center of the circle represent the average of the cluster; In the right part the bar represent the morphological density of the cluster). Generally, the value of morphological density of gray matter is small, while those of the white matter or CSF are relatively bigger, and the values change significantly between the adjacent different tissue clusters.

Combining the vague observed facts from MRI images, we constructed a set of fuzzy rules to assign the memberships of the pixels for the three main brain tissues. In the following rules, four thresholds of $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$ are imperatively selected as 0.25, 0.15, 25.0 and 30.0. The parameters may be optimized through a training neural network system in the future.

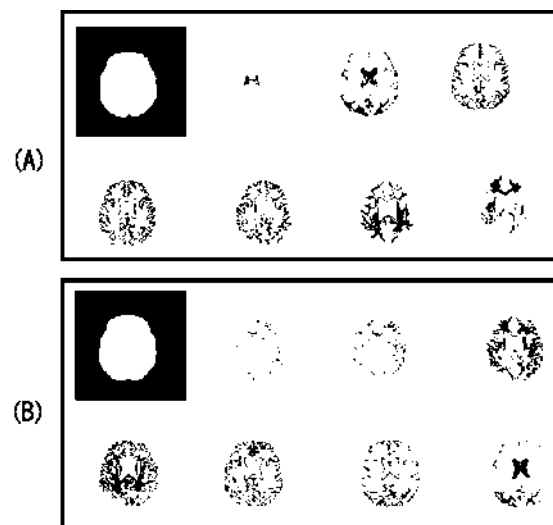


Fig. 4. Over segmentation results of FCM for a normal image (slice34), (A) is for T_1 -weighted image,(B) is for T_2 -weighted image.

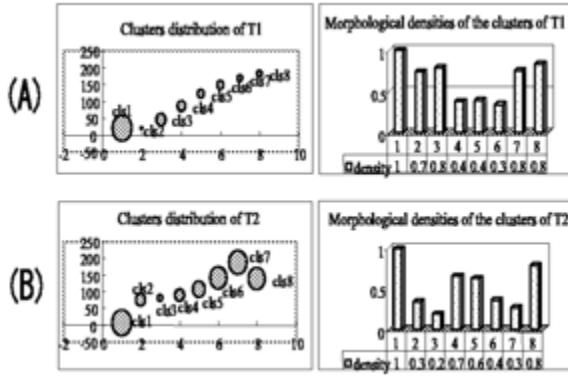


Fig.5. Distribution of the statistical and morphological features of the segmented clusters (T_1 :upper, T_2 :lower).

Rule bases for T_1 -weighted image

For T_1 -weighted image, it is easy to say that the pixels in the cluster with lowest average value are a part of CSF tissues and the pixels in the cluster with highest average value are a part of white matters from fig.3. The remained middle clusters are then assigned with CSF and gray matter or gray matter and white matter with fuzzy memberships.

(A)The following rules take CSF as the tissue of the focus-of-attention.

100: if x_j belongs to the second lowest cluster then set the membership of x_j with $\omega_{csf,j}=1.0$.

110: if x_j belongs to the third lowest cluster then x_j will probably be CSF or gray matter, and the membership of CSF will be set in the range of [0.6,1.0] according to the sub-rules.

111: if the difference of the morphological density to the next cluster (possibly be gray matter) is considerably big, (greater than α_1) then set the membership as $\omega_{csf,j}=1.0$.

112: else if the density difference is relatively great (that is greater than α_2 , but smaller than α_1); then assign the membership of x_j as $\omega_{csf,j}=0.9$, $\omega_{gray,j}=0.1$.

113: else if the difference of the feature value of x_j and the average value of the known CSF is quite small (less than β_1); then set $\omega_{csf,j}=0.8$, $\omega_{gray,j}=0.2$.

114: else if the feature value difference is relatively small (less than β_2 but greater than

β_1); then set $\omega_{csf,j}=0.7$, $\omega_{gray,j}=0.3$; else set $\omega_{csf,j}=0.6$, $\omega_{gray,j}=0.4$.

(B) The following rules take white matter as the tissue of the focus-of-attention.

200: if x_j belongs to the upper most cluster; then the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=1.0$.

210: if x_j belongs to the second cluster from the top; then x_j will probably be white matter, we refer (Rule 211-213) for further decision.

211: if the difference of the morphological density with the adjacent next cluster is big (greater than α_1); then the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=1.0$.

212: else if the difference is medium (greater than α_2 but less than α_1) then the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=0.9$, and $\omega_{gray,j}=0.1$.

213: else if the difference is small, but the morphological density itself is less than 0.5 (it is not clear whether it should be white matter or gray matter); then the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=0.6$, and $\omega_{gray,j}=0.4$; else x_j may possibly be white matter, refer(Rule 213a-213c).

213a: if the difference of the feature value of x_j with that of the average of white matter is less than β_3 then the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=0.9$, and $\omega_{gray,j}=0.1$.

213b: else if the feature value difference is less than β_1 ; then the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=0.8$, and $\omega_{gray,j}=0.2$.

213c: else the membership of x_j be set $\omega_{white,j}=0.7$, and $\omega_{gray,j}=0.3$.

(C) The following rules take gray matter as the focus-of-attention tissue

300: if the difference of the morphological density between the clusters x_j belongs to and that of white matter or of CSF is big (greater than α_1); then x_j is more likely to be gray matter, and the sub-rules are considered.

301: if the difference of the feature value of x_j

with that of the average of white matter or of CSF is greater than β_2 ; then set the membership of x_j to be $\omega_{gray,j}=1.0$.

302: else set the membership of x_j to be $\omega_{gray,j}=0.8$, and if the feature value of x_j more near to that of the average value of white matter; then set $\omega_{white,j}=0.2$ else set $\omega_{csf,j} = 0.2$.

310: else if the morphological density is not big, but the feature value difference with CSF is bigger than β_2 ; then $\omega_{gray,j} = 0.8$, and $\omega_{csf,j} = 0.2$.

320: else if the feature value difference with white matter is bigger than β_2 ; then set the membership to be $\omega_{gray,j}=0.8$, and $\omega_{white,j}=0.2$; else set the membership to be $\omega_{gray,j}=0.6$, and $\omega_{white,j}=0.2$, $\omega_{csf,j} = 0.2$.

Similar rule-bases are built for T_2 -weighted feature space, where the lower two or four clusters are considered with high possibility as white matter, and the upper one or two clusters are considered as CSF with high confidence, the remained clusters will be dealt as gray matter candidates.

Combination of the memberships

The fuzzy tissue memberships derived from the fuzzy knowledge rule-base, for T_1 and T_2 weighted images may remain ambiguities or even be conflict with each other. The ambiguities and conflicting will finally be cleared in a four-levels reasoning process, where the cluster memberships obtained by fuzzy c-means and the tissue memberships assigned by the fuzzy rule base and a k-nearest neighborhood voting mechanism are used.

At the first level, we pick the pixels both with congenial high tissue memberships to generate a representing initial set for the white matter, gray matter, and CSF, respectively. For example, if the memberships for CSF of pixel x_j are both greater than 0.8 in T_1 and T_2 feature space, the pixel will be finally labeled as CSF pixel. We will loosen the conditions to avoid one of the representing sets of the three tissues being empty.

At this stage, for the un-labeled pixels x_j , we compare the fuzzy cluster membership μ_{ij} of T_1 and T_2 weighted image, if the maximum clusters are both classified to be the same tissues, and the tissue memberships are both greater than 0.7, then the pixel will be labeled the tissue label. After this stage, the means of the feature values are calculated for the labeled tissues of gray matter, white matter and CSF.

In the third combination level, for the remained unmarked pixels, compare the feature value differences of the pixels with average values of the known tissues, if the difference with a certain tissue is smallest for both channels, and the tissue memberships exhibit no conflict with the tissue, then the pixel will be marked with the tissue label.

Finally, the remained unmarked pixels will be labeled by k-nearest neighborhood voting according to the marked results.

Symmetry analysis

After finishing the segmentation of the image, a symmetric measure index is introduced to test the symmetric degree of the brain tissues.

$$symmetric\ measure = \frac{1}{1 + \alpha * (\frac{|L - R|}{L + R})} \tag{4}$$

As it is known, the brain structure is approximately symmetry. Here parameter α is used

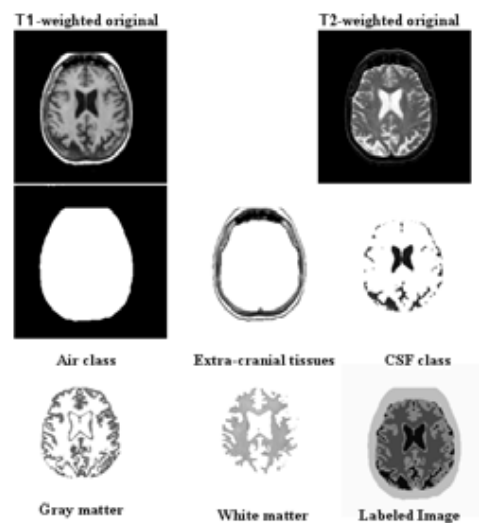


Fig. 6. The example of the final labeling results after fuzzy reasoning (for slice 34).

to adjust the permissible symmetric range, and L and R represent the numbers of the pixels in the left and right part of the tissue. With different permissible symmetric range, we can vary α to calculate the symmetric index (degree1) for the left-right part of the whole tissue, and symmetric index (degree2) for the upper left and upper right or the lower left and lower right part of the quadrant of the tissue.

It is desirable to be provided a mechanism to automatically indicate the possible shape corruption of the tissue and thus pick out the possible abnormal images. To calculate the symmetric indexes, it is necessary to divide the brain into four quadrants. Here the mask image of the brain matter and that of the extra-cranial can be used to do so.

Results and Discussion

Experimental results

The proposed rule-based expert system was used to segment a sample of 36 brain scan slices selected from the normal and abnormal image database of "The Whole Brain Atlas" project²²⁾ of Harvard University. Our system is implemented on a PC Linux machine with CPU of 400 MHz.

For dealing with a slice, it took 44 seconds to assign label, and 4 seconds to calculate symmetry measure index and help indicating diagnosis assistant messages. Fig.6 showed the final labeling results for a normal slice, and Fig.7 showed the final labeling results for an abnormal image.

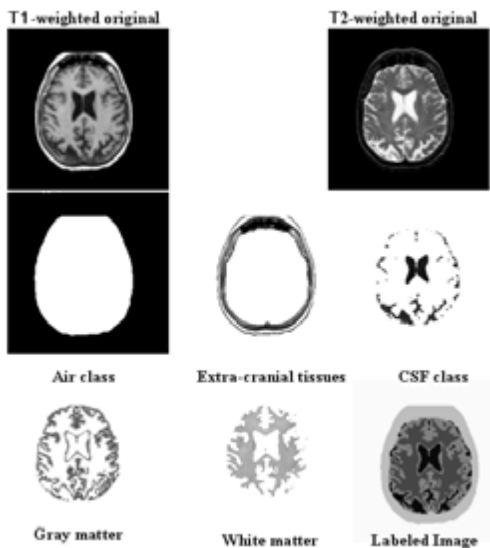


Fig. 7. The example of the labeling results of an abnormal image.

In the system, we do not distinguish the tumor tissues from the normal brain tissues. Instead of that, we introduced a symmetric measure index to help judging the segmented region of the tissues of white matter, gray matter, and CSF.

If the symmetry is significantly collapsed, then the tissue is doubted to be with abnormal. Table 1 showed the symmetry measure of Fig.6, and Table 2 showed the symmetry measure of Fig.7. We have tested 36 data slices in the "Whole Brain Atlas" database, where 10 are abnormal slices, and 26 are normal slices. The segmentation results of the normal slices categorized the brain tissues into CSF, gray matter and white matter reasonable, and the symmetry measure indexes of 25 slices are in normal range.

For the abnormal slices, the tumor tissues may be assigned as CSF, and the symmetry measure indexes are less than 0.5 and suggest possible disease in these slices automatically and warn the physician to check the image carefully.

Conclusion

In this paper, we have explained a rule-based expert system, which can automatically segment and label the cerebral MR image and provide assistant message to indicate possible abnormality in the image. Yet the medical physicians should make the final diagnostic decisions. In the system, the image features of the multi-spectral MR intensity distribution, the fuzzy membership of the FCM, and the morphological properties of the region are well combined to provide a step-by-step way to achieve consistent tissue labeling. Experimental results showed the efficiency of the

Table 1. The automatic diagnostic assistant results of example one (normal image of slice 34)

tissue		(R , L)	symmetry measure	
			degree1	degree2
csf	total	(1327, 1575)	0.5392	0.9087
	upper	(653, 621)		
	Lower	(674, 954)		
GRM	total	(3465, 2850)	0.5066	0.7214
	upper	(1681, 1385)		
	Lower	(1784, 1465)		
WTM	total	(3418, 3832)	0.6365	0.7406
	upper	(1614, 1900)		
	Lower	(1845, 1932)		
This slice is NORMAL!				

Table 2. The automatic diagnostic assistant results of example two (abnormal image)

tissue		(R , L)	symmetry measure	
			degree1	degree2
csf	total	(1785, 1269)	0.3718	0.9616
	upper	(496, 506)		
	Lower	(1289, 763)		
GRM	total	(3269, 3059)	0.7508	0.7464
	upper	(1552, 1309)		
	Lower	(1717, 1750)		
WTM	total	(3061, 3835)	0.4712	0.8553
	upper	(1823, 1984)		
	Lower	(1238, 1851)		
This slice is ABNORMAL!				
Tumor may be found in the lower part of csf!				

system. The parameters in the system are empirically determined through trial-and-error. Although the selected parameters worked well for most cases, better parameters should be automatically assigned by a training neural network in the future.

References

- Dawant BM, Zijdenbos P and Margolin RA (1993) Correction of intensity variations in MR images for computer aided tissue classification. *IEEE Trans. Med. Imag.* **12**: 770-781.
- Lim KO and Pfefferbaum A (1989) Segmentation OF MR brain images into cerebrospinal fluid spaces, white and gray matter. *J. comput. Assisst. Tomogr.* **13**: 588-593.
- Brummer ME, Mersereau RM, Eisner RL and Lewine RRJ (1993) Automatic detection of brain contours in MRI data sets. *IEEE Trans. Med. Imag.* **12**: 153-166.
- Zhang S, Hamabe H and Maeda J (1998) A hybrid approach to segmentation of two channels cerebral MR images. In : *Proc. 4th Intern. Conf. Signal Processing*. Beijing, pp. 959-962.
- Harris GJ, Barta PE, Peng LW, Lee S, Brettschneider PD, Shah A, Henderer JD and Schlapfer TE (1994) MR volume segmentaion of gray matter and white matter using manual thresholding dependence on image brightness. *Amer. J. Neuroradiaol.* **15**: 225-230.
- Bezdek JC, Hall LO and Clarke LP (1993) Review of MR image segmentation techniques using pattern recognition. *Med. Phys.* **20**: 1033-1048.
- Matheron G (1975) *Random Sets and Integral Geometry*. Wiley, New York.
- Cline HE, Lorensen WE, Kikinis R and Jolesz F (1990) Threedimensional segmentation of MR images of head using probability and connectivity. *J. Comput. Assisst. Tomogr.* **14**: 1037-1045.
- Liang Z, Jaszczak Rj and Coleman RE (1992) Parameter estimation of finite mixtures using the EM algorithm and information criteria with application to medical image procesing. *IEEE Trans. Nucl. Sci.* **39**: 1126-1133.
- Liang Z, MacFall JR and Harrington DP (1994) Parameter estimation and tissue segmentation from multispectral MR images. *IEEE Trans. Med. Imag.* **13**: 339-348.
- Taxt T and Lundervold A (1994), Multispectral analysis of the brain using magnetic resonance imaging. *IEEE Trans. Med. Imag.* **13**: 470-481.
- Chang MM, Teklap AM and Sezan MI (1993) Bayesian segmentation of MR images using 3D Gibbsian priors. In : *Image Video Processing, SPIE Proc. 1993, Vol. 1903*, pp. 122-133.
- Jernigan TL, Press GA and Hesselink JR (1990) Methods for measuring brain morphologic features on magnetic resonance images. *Arch. Neurol.* **47**: 27-32.
- Brandt ME, Bohan TP, Kramer LA and Flecher JM (1994) Estimation of CSF, white and gray matter volumes in hydrocephalic children using fuzzy clustering of MR images. *Computerized Med. Imag. Graphics.* **18**: 25-34.
- Nazif AM and Levine MD (1984) Low level image segmentation: An expert system. *IEEE Trans. PAMI.* **6**: 555-577.
- Raya SP (1990) Low-level segmentation of 3D magnetic resonance brain images-a rule-based system. *IEEE Trans. Med. Imag.* **9**: 327-337.
- Stansfield SS (1986) Angy: A rule-based expert system for automatic segmentation of coronary vessels from digital subtracted angiograms. *IEEE Trans. PAMI.* **8**: 188-199.
- Dhawan AP and Arata L (1991) Knowledge-based 3D analysis from 2D medical images. *IEEE Engineering Med. Biol.* **10**: 30-37.
- Gerig G, Martin J and Kikinis R (1991) Automating segmentation of dual-echo MR head data. In : *12th Int. Conf. Information Processing. in Med. Imag.*
- Li C, Goldgof DB and Hall LO (1993) Knowledge-based classification and tissue labeling of MR images of human brain. *IEEE Trans. Med. Imag.* **12**: 740-750.
- Hu ZP, Pun T and Pellegrini D (1990) An expert system for guiding image segmentation. *Computerized Medical Imaging and Graphics.* **14**: 13-24.
- <http://www.med.harvard.edu/AANLIB/home.html>

■Full-Length Paper■

An Intracellular PHB Depolymerase from the Supernatant Fraction of *Ralstonia eutropha* H16 Cells

Tomoko Abe¹, Teruyuki Kobayashi¹ and Terumi Saito^{1,2,3}

¹ Laboratory of Molecular Microbiology, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

² Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E. mail: 43saito-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase was purified 4,400-fold from the supernatant fraction of *Ralstonia eutropha* cells through fractionation with ammonium sulfate and chromatography with Toyopearl DEAE, Q Sepharose, and Toyopearl Ether. The partially purified preparation showed a high level of specific activity to hydrolyze amorphous PHB, comparable to PhaZd from *R. eutropha*. The degradation was inhibited by diisopropylphosphate (10 mM) and dithiothreitol (100 mM). Most of the degradation products were 3-hydroxybutyrate oligomers. The properties of the enzyme closely resembled those of PhaZd, but some differences were observed. This distinction from PhaZd was discussed.

Keyword: poly(3-hydroxybutyrate), PHB, enzyme purification, intracellular PHB depolymerase, *Ralstonia eutropha* H16

Introduction

Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), a homopolymer of R(-)-3-hydroxybutyrate (3HB), is a storage material produced by a variety of bacteria under certain conditions¹. Intracellular PHB, which is accumulated in an amorphous state, is degraded by several hydrolases for use as a source of carbon/energy². When PHB-accumulating bacteria die, PHB released into the environment is hydrolyzed by microorganisms which secrete extracellular PHB depolymerases³. In the past few decades, the potential use of PHB in biodegradable polymers/plastics has been studied extensively⁴. As a result, the extracellular metabolism of PHB has been fully clarified in many bacteria such as *Ralstonia pickettii* T1 and *Paucimonas lemoignei*, and some fungi⁵.

The intracellular PHB mobilization system is not as well understood as the extracellular PHB degradation system. Some intracellular PHB depolymerases have been reported⁶⁻¹¹. The intracellular PHB depolymerase system was first identified in *Rhodospirillum rubrum* in 1964⁸.

The system consists of a thermostable activator and a thermolabile esterase and it was recently reinvestigated^{6, 7}. The amino acid sequence of the intracellular soluble PHB depolymerase in *Rhodospirillum rubrum* (PhaZ1_{Rm}) shows similarity with extracellular PHB depolymerases in, for example, *Acidovorax* sp. TP4^{7,12}.

In *Ralstonia eutropha* H16, four types of intracellular PHB depolymerase or 3HB-oligomer hydrolase genes have been cloned and some aspects of the gene products have been reported^{9, 13-17}. PhaZa1 (formerly PhaZ1) exists in PHB inclusion bodies and degrades artificial amorphous PHB^{9,15}. The existence of some PhaZa1 homologs has also been reported in *R. eutropha*¹⁸. Additionally, some enzymes having similar properties to PhaZa1 have been studied in other bacteria^{19, 20}. PhaZb (formerly PhaZ2)^{14, 16} and PhaZc mainly degrade 3HB-oligomers and the degradation product is a 3HB-monomer. PhaZd has been characterized recently¹⁷. This enzyme showed a high level of specific activity for the hydrolysis of amorphous PHB.

The existence of an intracellular PHB depoly-

merase in the soluble fraction of disrupted cells has been suggested in bacteria such as *Rhodospirillum rubrum*⁸⁾ and *Zoogloea ramigera* I-16-M¹⁰⁾. In *R. eutropha* H16, the enzyme has been purified partially^{11, 21)}. Although the enzyme has different properties from PhaZa1, PhaZb, PhaZc, and PhaZd, its participation in the mobilization of PHB remains little understood. To clarify how the mobilization system works, it is important to understand the function of this enzyme.

In this report, a novel intracellular PHB depolymerase was partially purified from the soluble fraction of *R. eutropha* H16 cells.

Materials and Methods

Bacterial culture

R. eutropha H16 was cultured in a mineral medium (0.27% [wt/vol] KH₂PO₄, 0.99% [wt/vol] Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0.02% [wt/vol] MgSO₄ · 7 H₂O, 0.1% [vol/vol] mineral solution [0.1 M HCl, 119 mg/l CoCl₂, 9.7 g/l FeCl₃ · 6H₂O, 7.8 g/l CaCl₂, 118 mg/l NiCl₂ · 6H₂O, 62 mg/l CrCl₃ · 6H₂O, 156 mg/l CuSO₄ · 5H₂O]) containing 2% (wt/vol) fructose and 0.1% (wt/vol) ammonium sulfate at 30°C with shaking²²⁾. To preserve *R. eutropha* H16, cells were grown in a nutrient (N)-rich medium (1% [wt/vol] yeast extract, 1% [wt/vol] polypeptone, 0.5% [wt/vol] beef extract, and 0.5% [wt/vol] ammonium sulfate) at 30°C and then stocked at -80°C, mixing in glycerol (final concentration, 25% [vol/vol]).

Enzyme assays

PHB depolymerase activity and 3HB-oligomer hydrolase activity were assayed by measuring the amount of 3HB released during the reaction. The reaction mixture (50 µl) was composed of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), artificial amorphous PHB granules (0.5 mg/ml), and enzyme. The reaction was started by adding substrate at 30°C, and stopped (30 min) by adding 6 M HCl to pH 2. The reaction mixture was then centrifuged. The supernatant was used treated with for 3HB-oligomer hydrolase (1.0 U [3HB-dimer-hydrolyzing activity] of PhaZb_{Reu} or PhaZc_{Reu}) for 10 min before the quantification of 3HB. The amount of 3HB was measured from the increase in A_{340 nm} by an enzymatic method using R(-)-3HB dehydrogenase and hydrazine hydrate²³⁾.

Preparation of substrates

Artificial amorphous PHB granules were prepared using the method described by Horowitz and Sanders²⁴⁾ as follows. The PHB isolated from *R. eutropha* H16 cells was dissolved in chloroform, and 0.05% (wt/vol) sodium deoxycholate was added. The mixture was sonicated (20 kHz, 100 W) for 2 min. The emulsion was heated to remove the chloroform and dialyzed for 24 h against 0.01% (wt/vol) sodium deoxycholate at room temperature. The linear 3HB-dimer and trimer were synthesized and then purified by HPLC. The linear 3HB-tetramer and pentamer were purified from the digest of artificial amorphous PHB granules with PhaZ7 of *Paucimonas lemoignei*²⁵⁾ as described by Sugiyama et al.²⁶⁾. The chemically synthesized cyclic 3HB- oligomers were donated by D. Seebach of ETH, Switzerland²⁷⁾.

Partial purification of intracellular PHB depolymerase from the soluble fraction in *R. eutropha* H16

Fifty five grams of *R. eutropha* H16 cells cultured in a mineral medium containing 2% (wt/vol) fructose and 0.1% (wt/vol) ammonium sulfate for 72 h was suspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). The cells were sonicated twice on ice for 4 min (20 kHz, 50 W) and centrifuged at 10,000 x g for 30 min. The supernatant ("soluble fraction"), crude extract (250 ml), was fractionated with ammonium sulfate (0 to 35% saturation). The pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer and dialyzed overnight against 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) containing 20% (vol/vol) glycerol (buffer A). The dialyzed fraction was applied to a TOYOPEARL DEAE-650M (Tosoh, Japan) column (2.5 x 24 cm) and the column was washed with buffer A. PHB depolymerase activity was eluted with a linear gradient of NaCl (total volume, 1000 ml; 0 to 0.4 M) in buffer A. The eluted fraction was dialyzed against 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 20% (wt/vol) glycerol (buffer B) overnight and applied to a Q Sepharose FF (Amersham) column (2.5 x 5 cm). The column was washed with buffer B, and then PHB depolymerase activity was eluted with a linear gradient of NaCl (total volume, 180 ml; 0 to 0.34 M) in buffer B. To the eluted fraction was added

(NH₄)₂SO₄ (final concentration, 1.7 M) and the mixture was applied to a TOYOPEARL Ether-650M column (1.5 x 6 cm) equilibrated with buffer A containing 1.7 M (NH₄)₂SO₄. The column was washed with buffer A and PHB depolymerase activity was eluted with a linear gradient of (NH₄)₂SO₄ (total volume, 60 ml; 1.7 to 0 M) in buffer A. The eluted enzyme was dialyzed overnight against 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 50% glycerol.

Immunoblot analysis

Samples were subjected to immunoblotting according to standard procedures using a rabbit antiserum against PhaZd as primary antiserum and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (SIGMA-ALDRICH, MO, U.S.A.) as secondary antibody. The immunocomplex was visualized using nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate *p*-toluidine.

Other analytical methods

The amount of PHB was quantified as crotonic acid by HPLC as described by Karr *et al.*²⁸⁾ Protein concentrations were measured by the method of Lowry *et al.*²⁹⁾ with bovine serum albumin as the standard. The purity and size of proteins were estimated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) as described by Laemmli³⁰⁾. Proteins on the gel were stained with a Silver Stain II kit (Wako, Osaka, Japan).

Results

Partial purification of soluble PHB depolymerase from *R. eutropha* H16

R. eutropha H16 cells were cultivated in minimum salt medium containing 2% (wt/vol) fructose (carbon source) and 0.1% (wt/vol) ammonium sulfate (nitrogen source) (PHB-accumulating conditions). Both the PHB content of cells and PHB depolymerase activity in the soluble fraction reached a maximum after 72 h (Fig. 1). The soluble fraction obtained from cells cultivated for 72 h was used as the starting material for purification.

The crude extract was fractionated with (NH₄)₂SO₄ (0 to 35% saturation) and dissolved in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer. Compared to the crude extract, the total activity in the ammonium sulfate fraction was increased 1.6-fold (Table 1). The ammonium

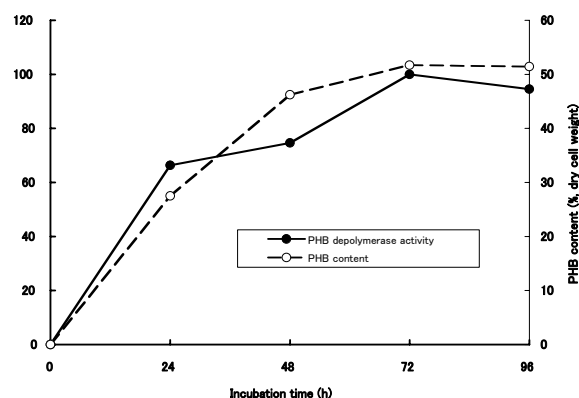


Fig. 1. PHB depolymerase activity (●) in the soluble fraction (crude extract) and PHB content (○, wt/wt) of the cells of *R. eutropha* H16 grown in PHB-accumulating conditions. The 100% value for PHB depolymerase activity was 0.019 μ mol/min/mg.

sulfate fraction was purified using a TOYOPEARL DEAE-650M (anion exchanger) column, a Q Sepharose FF (anion exchanger) column, and a TOYOPEARL Ether-650M (hydrophobic resin) column in sequence. In the TOYOPEARL DEAE-650M column and Q Sepharose FF column (Fig. 2), PHB depolymerase activity was eluted in about 0.15 M NaCl. In a TOYOPEARL Ether-650M column (Fig. 3A), the activity was eluted near 0.25 M NaCl. In step using TOYOPEARL Ether-650M, the activity of PHB depolymerase increased more than 10-fold compared to that in the Q Sepharose FF step. However, no fractions from TOYOPEARL Ether-650M showed a single homogeneous band on SDS-PAGE when visualized with silver stain (Fig. 3B). The enzyme was partially purified 4,400-fold with 59% yield (Table 1). An increase of the total activity

Table 1. Partial purification of an intracellular PHB depolymerase from the soluble fraction of *R. eutropha*

	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude extract	810	15	0.019	100
Ammonium sulfate	680	24	0.035	160
DEAE-650M	97	5.7	0.058	38
Q-Sepharose FF	6.4	0.76	0.12	5
Ether-650M	0.11	8.8	83	59

The enzyme was purified from a 4.4-liter culture (55 g of wet cells). Artificial amorphous PHB was used as a substrate.

U = μ mol/min

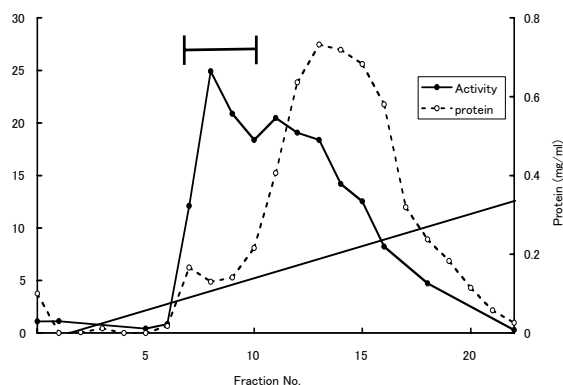


Fig. 2. Q Sepharose FF column chromatography. Artificial amorphous PHB granules were used as a substrate. Fractions 7-10 (total 40 ml) were collected. Solid circle, activity; open circle, protein.

after ammonium sulfate fractionation or the use of TOYOPEARL Ether-650M was observed. When the partially purified enzyme was mixed with crude extract, the PHB-hydrolyzing activity was partially inhibited (data not shown).

Properties of the partially purified PHB depolymerase

Table 2. shows the substrate specificity of the final preparation in the TOYOPEARL Ether-650M step. No 3HB-oligomer hydrolase activity was detected in the final preparation. The specific activity toward artificial amorphous PHB of the partially purified enzyme was much stronger than that of any other intracellular PHB depolymerase or 3HB-oligomer hydrolase in *R. eutropha* H16 reported except for PhaZd whose specific activity is 110^{13-15, 17}. This enzyme, like other intracellular PHB depolymerases, did not degrade semicrystalline PHB. The release of 3HB from cyclic 3HB-oligomers or linear 3HB-oligomers by the enzyme was not detected.

Figure 4. shows the time course of the degradation of amorphous PHB by the partially purified enzyme. Most of the products were 3HB-oligomers. Even when the reaction time was lengthened, little 3HB was detected.

The effect of various reagents on the PHB depolymerase activity of the partially purified enzyme was examined (Table 3). The activity to degrade PHB was almost completely inhibited by diisopropylfluorophosphate (DFP) at 10 mM, but not by 10 mM of phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF). 1,4-Dithiothreitol (DTT) (100 mM), by EDTA, but the purified soluble PHB EDTA (10 mM),

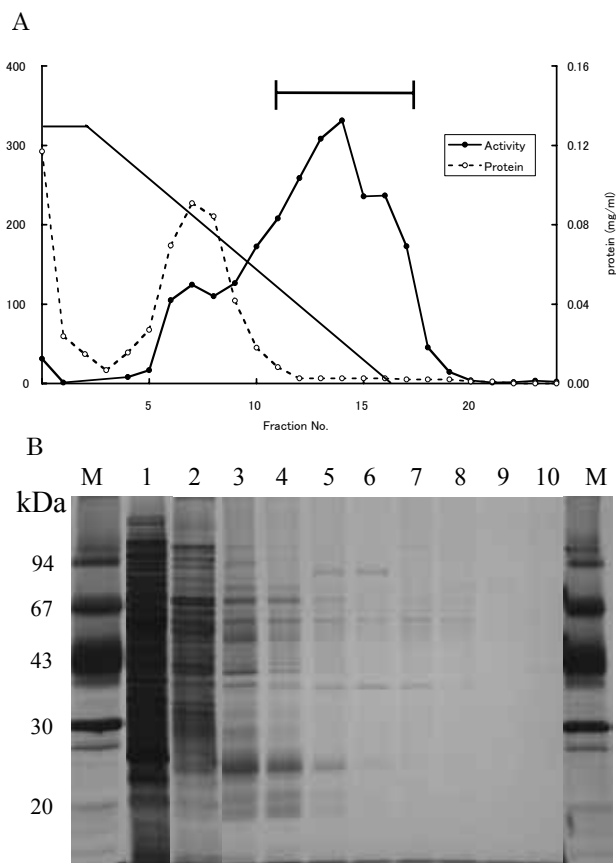


Fig. 3. Toyopearl Ether-650M column chromatography (A) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of fractions at various steps in the purification process (B). A. Artificial amorphous PHB granules were used as a substrate. Fractions 11-17 (35 ml) under a bar were collected as a final preparation. B. Proteins were visualized by silver staining. Lanes 1, Toyopearl DEAE-650 fraction (5.3 mg); 2, Q Sepharose FF fraction (1.6 mg); 3, Toyopearl Ether-650M fraction 10 (0.2 mg); 4, fraction 11 (0.08 mg); 5, fraction 12 (0.02 mg); 6, fraction 13 (0.02 mg); 7, fraction 14 (0.02 mg); 8, fraction 15; 9, fraction 16 (0.02 mg); 10, fraction 17 (0.02 mg); M, molecular makers.

Table 2. Substrate specificity of the partially purified PHB depolymerase

Substrate	3HB released ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
artificial amorphous PHB granules	83
semicrystalline PHB granules	0
linear 3HB-oligomers ^a	0
cyclic 3HB-oligomers ^b	0

a; linear 3HB-dimer, -trimer, -tetramer, -pentamer
b; cyclic 3HB-trimer, -pentamer

or Triton X-100 (1%) did not completely inhibit the activity, while 0.005% Triton X-100 seemed to activate the enzyme.

The pH optimum of this enzyme was 8.5 in Tris-HCl. During storage at 4 °C, the enzyme lost

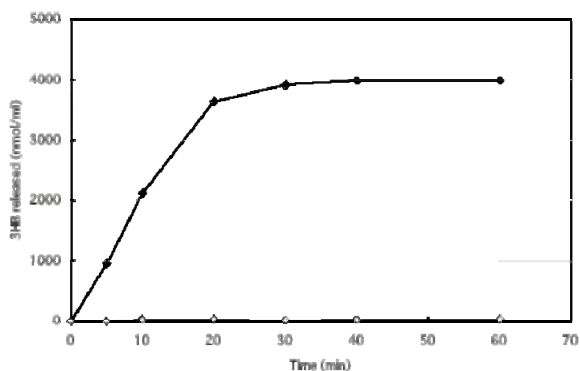


Fig. 4. Degradation products of artificial amorphous PHB granules. 0.15 mg of the partially purified PHB depolymerase was used. Reaction conditions were as described in Materials and Methods except for the reaction time. Open circle, 3HB-monomer; solid circle, 3HB-oligomer.

60% activity within 24 h. For long-term storage, freezing at -20°C was required.

Immunological analysis of the partially purified enzyme

To examine whether the partially purified soluble PHB depolymerase contains PhaZd which is a novel intracellular PHB depolymerase present in both cytosol and PHB inclusion bodies¹⁷, the final preparation obtained in the TOYOPEARL Ether-650M step was analyzed by SDS-PAGE and stained immunologically using antibody against PhaZd. Even when the sample was concentrated 50-fold (containing about 2.5 μg of protein) or 100-fold (containing about 5 μg of protein), no significant band was detected (data not shown).

Table 3. Effect of various reagents on the partially purified PHB depolymerase

Reagents	Concentration	Activity (%)
DFP	1	63
(mM)	10	8
PMSF	1	99
(mM)	10	100
DTT	1	100
(mM)	10	86
	100	11
EDTA	1	59
(mM)	10	77
TritonX-100	0.005	136
(%,wt/vol)	0.05	62
	1	56

DFP, diisopropylfluorophosphate; PMSF, phenylmethane sulfonyl fluoride; DTT, 1,4-dithiothreitol. 0.02 μg of the partially purified enzyme was used. Artificial amorphous PHB was used as a substrate.

Discussion

The intracellular PHB depolymerase partially purified from the soluble fraction of *R. eutropha* H16 in this study has several properties different from those of known intracellular PHB depolymerases or 3HB-oligomer hydrolases, PhaZa1, PhaZb, PhaZc, and PhaZd. The strong specific PHB-hydrolyzing activity is a particularly remarkable feature. The products of degradation were mainly 3HB-oligomers when artificial amorphous PHB granules were used as a substrate. Since only a very small amount of 3HB-monomer was detected in the products obtained from amorphous PHB granules, this enzyme hydrolyzes PHB in an endo-type fashion. The partially purified enzyme was strongly inhibited by DFP, suggesting that the active center is serine. The enzyme probably has a "lipase box (G-X-S*-X-G)" which is the active center common to PhaZb, PhaZc and other PHB depolymerases except for PhaZa1. Activation by Triton X-100 at low concentrations has been reported for the extracellular PHB depolymerase of some bacteria such as *Acidovorax* sp. TP4¹². The peak of activity was not singular in the column chromatography, suggesting that several depolymerases might be contained in the soluble fraction.

These properties are very similar to those of PhaZd¹⁷. Sucrose density gradient centrifugation revealed that PhaZd was distributed nearly equally in the cytosolic fraction and the PHB inclusion bodies¹⁷. Although these two enzymes had similar properties, they differed in how they were affected by reagents: PhaZd was activated depolymerase was partially inhibited. PhaZd was inhibited by DTT completely at 1 mM, but the purified soluble PHB depolymerase was not inhibited at that concentration of DTT at all. High concentrations of DTT (10 mM and more) partially inhibited the purified soluble PHB depolymerase (Table 3). It is possible that the partially purified sample was a mixture of PhaZd and some other PHB depolymerase(s) not inhibited by DTT. Immunostaining of the final preparation from the TOYOPEARL Ether-650M step using antiserum against PhaZd revealed no significant band. The partially purified PHB

depolymerase from the soluble fraction contains a different intracellular PHB depolymerase from PhaZd, although a minute amount of PhaZd seems to be included. The PHB depolymerase contained in the preparation purified from the soluble fraction may be a unique enzyme different from PhaZd. To clarify this, further purification is needed.

The increase in total activity after fractionation with ammonium sulfate or chromatography with TOYOPEARL Ether-650M suggests the existence of some inhibitor(s) in the soluble fraction (Table 1).

References

- 1) Daws EA and Ribbons DW (1964) Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. *Bacteriol. Rev.* **28**: 126-149.
- 2) Saito T and Kobayashi T (2002) Intracellular degradation of PHAs. In: *Biopolymers. 3b. Polyesters II*. Doi Y and Steinbüchel A, eds., Wiley-VCH Weinheim. pp. 23-39.
- 3) Jendrossek D (2002) Extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: the key enzymes of PHA degradation. In: *Biopolymers. 3b. Polyesters II*. Doi Y and Steinbüchel A, eds., Wiley-VCH Weinheim. pp. 41-83.
- 4) Merrick JM (2002) Microbial water-insoluble aliphatic polyesters (PHA). In: *Biopolymers. 3b. Polyesters II*. Doi Y and Steinbüchel A, eds., Wiley-VCH Weinheim. pp. 105-122.
- 5) Jendrossek D and Handrick R (2002) Microbial degradation of polyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 403-43
- 6) Handrick R, Reinhardt S, Schultheiss D, Reichart T, Schuler D, Jendrossek V and Jendrossek D (2004) Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (Phasin). *J. Bacteriol.* **186**: 2466-2475.
- 7) Handrick R, Reinhardt S, Kimmig P and Jendrossek D (2004) The "intracellular" poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *J. Bacteriol.* **186**: 7243-7253.
- 8) Merrick JM and Doudoroff M (1964) Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* **88**: 60-71.
- 9) Saegusa H, Shiraki M, Kanai C and Saito T (2001) Cloning of an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.* **183**: 94-100.
- 10) Saito T, Saegusa H, Miyata Y and Fukui T (1992) Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Zoogloea ramigeta* I-16-M. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 333-338.
- 11) Saito T, Takizawa K and Saegusa H (1995) Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*. *Can. J. Microbiol.* **41**(Suppl. 1): 187-191.
- 12) Kobayashi T, Sugiyama A, Kawase Y, Saito T, Mergaert J and Swings J (1999) Biochemical and genetic characterization of an extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Acidovorax* sp. strain TP4. *J. Environ. Polym. Degrad.* **7**: 9-17.
- 13) Kobayashi T, Uchino K, Abe T, Yamazaki Y and Saito T (2005) Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **187**: 5129-5135.
- 14) Kobayashi T, Shiraki M, Abe T, Sugiyama A and Saito T (2003) Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol.* **185**: 3485-3490.
- 15) Kobayashi T and Saito T (2003) Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 487-492.
- 16) Saegusa H, Shiraki M and Saito T (2002) Cloning of an intracellular D(-)-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and identification of the active site serine residue by site-directed mutagenesis. *J. Biosci. Bioeng.* **94**: 106-112.
- 17) Abe, T, Kobayashi, T and Saito T (2005) Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **187**: 6982-6990.
- 18) York GM, Lupberger J, Tian J, Lawrence AG, Stubbe JA and Sinskey AJ (2003) *Ralstonia eutropha* H16 encodes two and possibly three intracellular poly [D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase genes. *J. Bacteriol.* **185**: 3788-3794.
- 19) Gao D, Maehara A, Yamane T and Ueda S (2001) Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 159-164.
- 20) Kobayashi T, Nishikori K and Saito T (2004) Properties of an intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Curr Microbiol.* **49**: 199-202.
- 21) Ozawa K (1995) Thesis for degree of master of Kanagawa university.
- 22) Kawaguchi Y and Doi Y (1992) Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromolecules* **25**: 2324-2329.
- 23) Williamson DH, Mellanby J and Krebs HA (1962) Enzymic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic and in blood. *Biochem. J.* **82**: 90-97.
- 24) Horowitz DM and Sanders KM (1994) Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 2695-2702.
- 25) Handrick R, Simone R, Focarete ML, Scandola M, Adamus G, Kowalczyk M and Jendrossek D (2001)

- A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Pseudomonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.* **276**: 36215-36224.
- 26) Sugiyama A, Kobayashi T, Shiraki M and Saito T (2004) Roles of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial metabolism. *Curr. Microbiol.* **48**: 424-427.
- 27) Bachmann BM, and Seebach D (1999) Investigation of the enzymatic cleavage of diastereomeric oligo (3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB unit. A model for the stereo selectivity of PHB depolymerase from *Alkaligenes faecalis* T1. *Macromolecules* **32**: 1777-1784
- 28) Karr DB, Waters JK and Emerich DW (1983) Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography UV detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1339-1344.
- 29) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AJ and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- 30) Leammli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

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

Detection of the Centrosomal DNA from the Sperm of Bryophyte *Marchantia polymorpha* L. and *Physcomitrella patens*

Shinobu Kawai^{1,2,3}, Erika Watai², Takashi Sano²,
Kazuhito Inoue^{1,2} and Akiya Hino^{1,2}

1 Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, 2946, Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1293, Japan

2 Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Kanagawa, 259-1293, Japan

3 To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt125307@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The liverwort *Marchantia polymorpha* is dioecious and haploid during most of its life cycle. It is known that fertilization in bryophytes, as in animals, involves sperm and eggs. Recently, we isolated novel DNA from the sperm centrosome of the starfish *Asterina pectinifera*. In the present study, we examined whether the sperm of bryophytes contain this unique DNA. The total DNA in the sperm of *M. polymorpha* was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) analysis performed using a centriole-specific DNA primer. Although this primer was designed to specifically amplify the centrosomal DNA of the starfish, it can amplify the centrosomal DNA of many other animals having a similar DNA sequence. The size of the amplified PCR products was approximately 500 bp, which is similar to that of the PCR products amplified from starfish. We determined the nucleotide sequence similarities between the PCR products amplified from the cultured cells of the moss *Physcomitrella patens* and from the sperm of the liverwort *M. polymorpha*. Our results show that DNA similar to that of the starfish centrosomal DNA exists in bryophytes and includes animal centrosomal DNA homologues and candidate centrosomal DNA.

Keywords: centrosome, centrosomal DNA, S1 nuclease, bryophyte sperm, liverwort

Introduction

In most eukaryotic cells, the basal bodies of cilia or flagella and the centrioles in the spindle pole are structurally analogous and interchangeable¹⁾. Recently, we identified novel DNA from the sperm centrosome of the starfish *Asterina pectinifera*²⁾. In starfish, this unique DNA exists in the centrioles of the sperm and the basal bodies of cilia on the blastulae. The localization of the products amplified by polymerase chain reaction (PCR) was investigated by *in situ* PCR with fluorescence-labeled primers. The amplified DNA signal was detected in the sperm centrosome of *A. pectinifera*. Although the centriole-specific DNA (CS) primer was designed to specifically amplify the centrosomal DNA of the starfish, it can amplify the centrosomal DNA of many other animals having a similar DNA sequence (above

95% sequence identity). The size of the PCR products amplified from the DNA of many animals is approximately 500-bp; this is similar to the size of those amplified from the starfish DNA^{2,3)}. In the present study, we investigated the presence of this unique DNA in the bryophyte sperm. Carothers and Kreitner (1968) have observed centrosomes in the spermatid mother cells of the liverwort *Marchantia polymorpha*⁴⁾. The extraction of sperm from liverworts is easier than that from other plants in which sperm functions as the male gamete. The moss *Physcomitrella patens* has been recognized as a useful model for the study of plant embryogenesis and development for several reasons⁵⁾. Insights into the molecular biology of mosses have been gained come mainly from the studies of this monoecious

moss. Therefore, in this study, the liverwort *M. polymorpha* and the moss *P. patens* were selected to identify the centrosomal DNA in plants. The total DNA of the *M. polymorpha* sperm and the *P. patens* protonemata were used as templates for PCR analysis, which was performed using the CS primer.

Materials and Methods

Plant material and culture conditions

The protonemata of *P. patens* ssp. *patens* were cultured on 0.7% agar with 0.01% hyponex (6-10-5). The cultures were grown in 9 cm Petri dishes on medium solidified with 0.7% agar and overlaid with cellophane discs having a diameter of 8 cm (type 325P; AA Packing Ltd, Preston, UK). The plates were grown in a culture room at 25°C under a regime of 16h light and 8 h darkness. After a 3-week incubation of the *P. patens* plants, the total DNA was extracted according to the specified protocol.

Sperm isolation

We used the sperm of the bryophyte, *M. polymorpha*, which was collected at Manazuru (Kanagawa) and Chofu (Tokyo). An isolate of the spermatozoon of *M. polymorpha* was taken and a droplet of distilled water was deposited on the antheridium, following which the sperm were released. After 3 repeated centrifugations, each performed at 1,000 x *g* for 1 min, the sperm in the supernatant were sedimented at 1,000 x *g* for 10 min at room temperature. Subsequent steps were carried out at 4°C.

Nucleic acid isolation

Total DNA was extracted from the protonema or gametophores using QIAGEN plant tissue Kit according to the manufacturer's protocol.

PCR analysis

PCR primers measuring 500-bp were designed for the novel DNA from the starfish centrosomal DNA sequence of the partial sequences. The sequences derived from clone K4 were obtained by PCR using the DNA extracted from starfish sperm centrosome as a template, a (CS-primer-F) forward primer (5'-GCAGCTTTCGTCGATTTAAA-3') and a (CS-primer-R) reverse primer (5'-TCA

TTTTCTTCACCAGCAAA-3'). This pair of PCR primers is named the *CS primer*. The PCR was performed using the HotStar Taq polymerase (QIAGEN). The cycling conditions were as follows: first, initial incubation step at 95°C for 15 min; second, 35 cycles, each performed at 94°C for 1 min (denaturation), 53°C for 30 sec (annealing) and 72°C for 1 min (extension); and third, final extension at 72°C for 10 min. The following bryophyte RuBisCo primers were used for chloroplast-DNA PCR (positive control): forward, 5'-AGTAACTTTAGGTT TCGTAG-3' and reverse, 5'-TTTCCAAATTTACAA GCAG-3'. Bryophyte (*M. polymorpha*) RuBisCo primers correspond to nucleotides 1020-1039 (forward) and 1370-1389 (reverse). The following bryophyte 18S rRNA primers were used for genomic PCR (positive control): forward, 5'-TACCTGGTTG ATCCTGCC AG-3' and reverse, 5'-AGGTTACCTA CGGAAACCT-3'. Bryophyte (*M. polymorpha*) 18S rRNA primers correspond to nucleotides 0001 - 0020 (forward) and 1786 - 1805 (reverse). For positive control of PCR was performed under the condition of 35 cycles of 94°C for 1 min, at 57°C for 30 sec and at 72°C for 1 min.

DNA sequencing analysis

Sequencing was performed using a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI PRISM 310) as recommended by the manufacturer. Sequences were processed using the program GENETYX-MAC, version 9.0 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Results and Discussion

Morphological observation of the sperm of liverwort

The sperm of bryophytes (liverworts) can be easily harvested for the purpose of study. Microscopic observation of the liverwort sperm was first carried out by Ikeno in the 1900's⁶⁾. Electron microscopic observation of liverwort sperm was reported by Carothers and Kreitner⁴⁾. With regard to the sperm of the bryophyte *M. polymorpha*, Carothers observed centrosomes in the spermatid mother cells by electron microscopy. The structure of the centriole of the *M. polymorpha* is already confirmed by observations under the electron microscope⁷⁾. Microscopic and electron microscopic analysis of

the liverwort sperm is comparatively easier than that of sperm from other mosses⁸⁾ or hornworts⁹⁾. The gametophyte of the liverwort *M. polymorpha* was collected from Manazuru Chou in Kanagawa and Chofu City in Tokyo from March to April. This liverwort is heterothallic.

Figure 1 shows the white solution of the sperm that overflowed on the gametophyte of the male plant of the *M. polymorpha*. The spawning of sperm is indicated in the photograph on the right (Fig. 1). This spawning of sperm was observed on the male-receptacle of the liverwort and appeared as turbid water.

Phase-contrast microscopic photographs of the spermatogenesis of *M. polymorpha* are shown in

figure 2. In immature liverworts, the sperm has an outer membrane (Fig. 2, A). During maturation, the outer membrane of the sperm is dissolved and the sperm is then released (Fig. 2, B to T).



Fig. 1. Gametophytes of the male and female plants of *M. polymorpha* are indicated by yellow arrows (left). White arrows indicate the spawning of the sperm in a water drop on the male-receptacle (right).

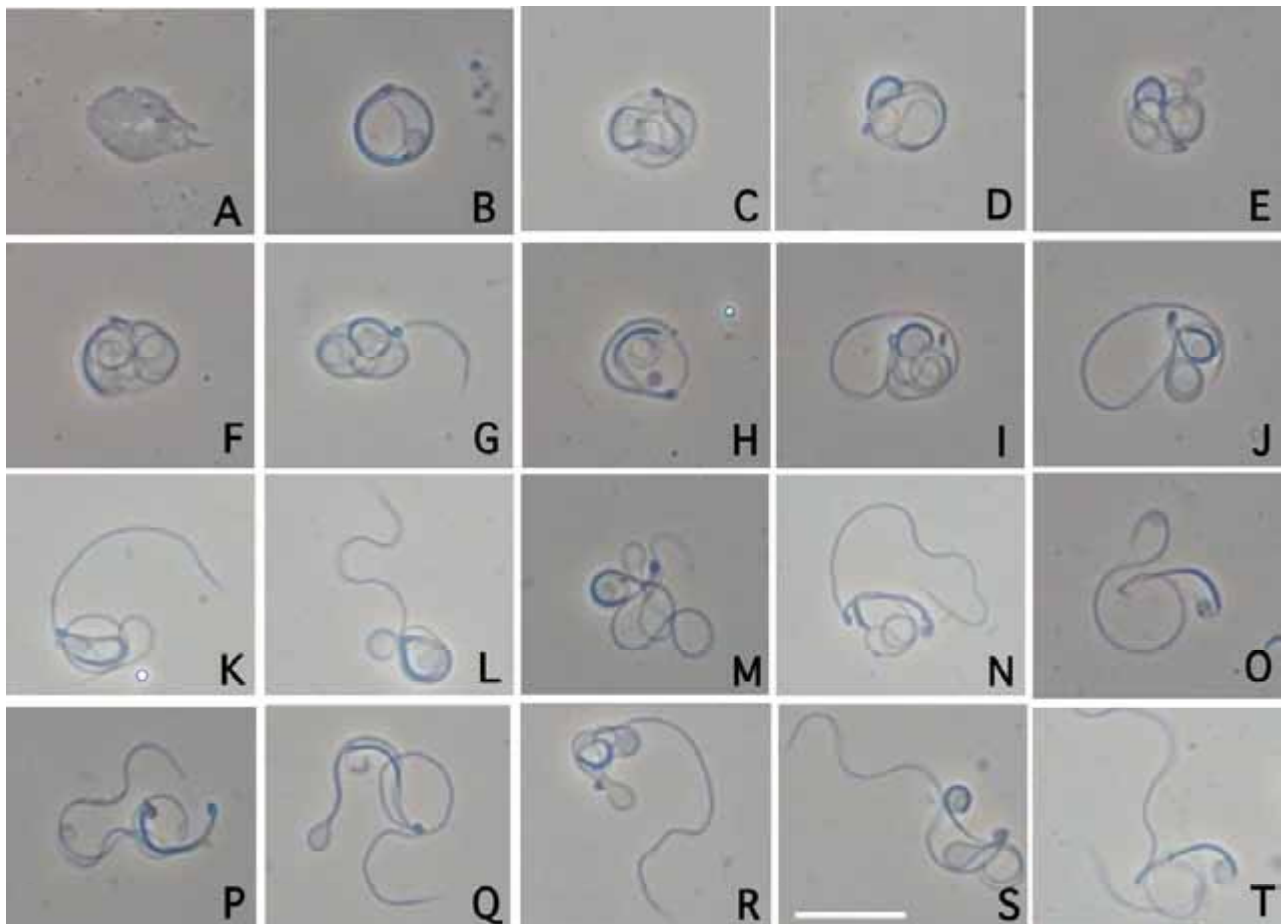


Fig. 2. Phase-contrast microscopic photographs obtained during the sperm maturation of liverwort. The process of spermatogenesis shows in B-T. A shows the outer membrane of the spermatid. Two flagella projected from spherical spermatid cells show in G-N. Two moving flagella are present, and spermatids gradually lose the cytoplasm of the spermatid cells (I-S). T shows the mature sperm of the *M. polymorpha*. Scale bar = 10 μm .

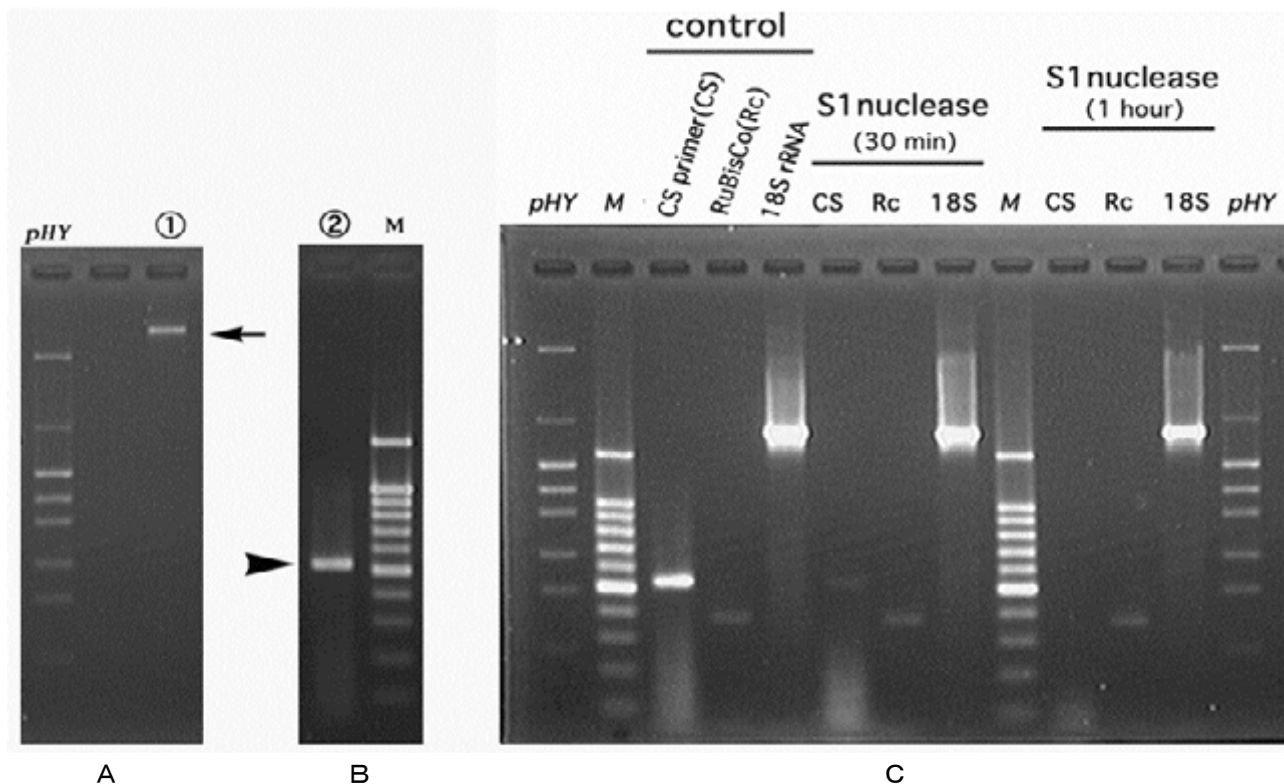


Fig. 3. Total DNA of the *M. polymorpha* shows in A (lane 1, arrow) on the agarose gel (2%) electrophoretic pattern. PCR amplification with CS-primer experiment shows in B. PCR fragments confirmed the 500-bp product (lane 2, arrowhead). In contrast with 18S-rRNA- or RuBisCo-primers, PCR products with the CS-primer were not amplified from the total DNA (template DNA) of the *M. polymorpha*, after treated by S1 nuclease for 1 hour incubation (C). M indicates the 100-bp ladder marker. pHY indicates the pHY marker of the molecular weight marker.

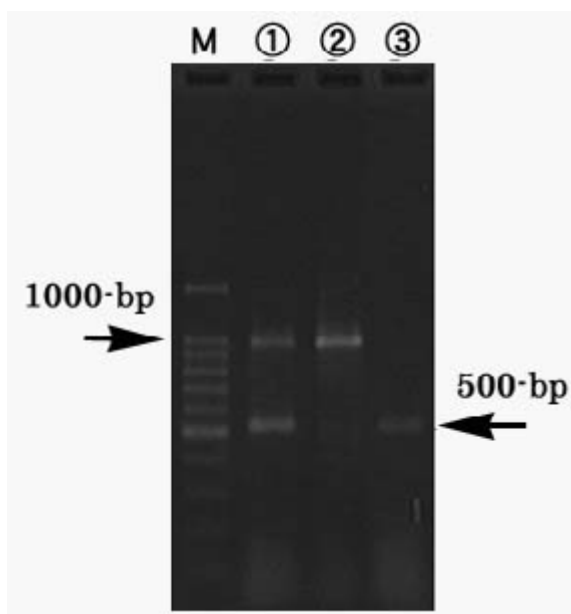


Fig. 4. PCR amplification from the bryophyte *P. patens* is shown in lane 1. Isolated fragments of the 500-bp and 1000-bp products were obtained, (lane 2; 1000-bp, lane 3; 500-bp). M indicates the 100-bp ladder marker.

PCR amplification and sequence analysis of unique DNA sequences in moss and liverwort

To confirm the presence of unique DNA sequences corresponding to starfish, total DNA was extracted from the male gamete cells (sperm) of the liverwort *M. polymorpha* and from the cultured cells of the moss *P. patens*. To examine whether the unique DNA sequences are present in these plants, PCR amplification was performed with the CS primer in order to amplify the starfish centrosomal DNA homologues. Analysis of the PCR fragments confirmed a 500-bp product (Fig. 3) from the total DNA of *M. polymorpha* sperm. In addition, genomic DNA sequences encoding 18S rRNA and chloroplast DNA encoding the large subunit of RuBisCo (*rbcL*)^{10,11} were also amplified as controls for genomic DNA and the organellar DNA, respectively (Fig. 3).

PCR amplification experiments were also performed with the DNA isolated from the

cultured cells of *P. patens* (Fig. 4). An analysis of the amplified fragments confirmed that the protoneurium cells of the moss *P. patens* contained the same unique sequences as the plant cells of the liverwort. Further, in the case of *P. patens*, the amplification products of different sizes were obtained. In addition to the 500-bp product, a PCR product of approximately 1000-bp was obtained (Fig. 4).

With respect to animals, the sperm centrosomes of the starfish contain specific novel DNA, and the nucleotide sequence of this DNA has been determined in our recent studies^{2,3,12}.

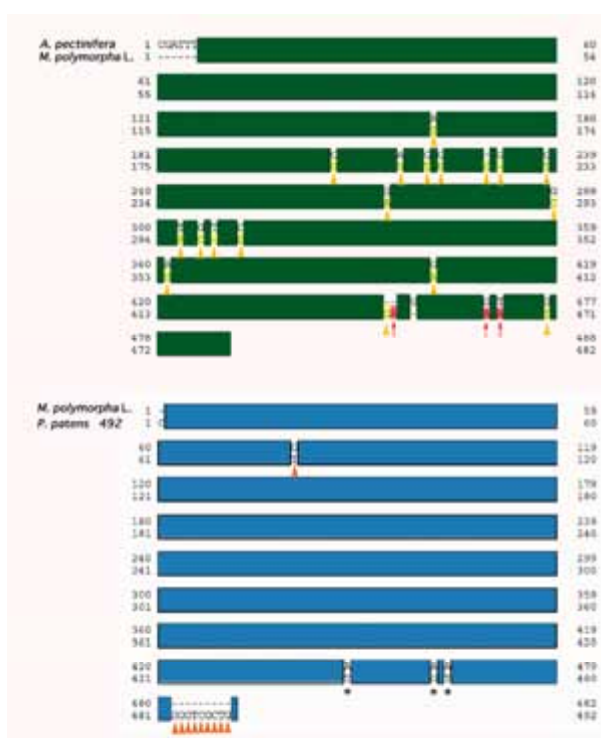


Fig. 5. Comparison between the DNA sequences amplified from the starfish *A. pectinifera* and the liverwort *M. polymorpha*; those sequences were obtained by PCR using the CS primer (top: coincident arrangement is indicated in green). Nucleotide substitution is indicated by yellow arrowhead. The remarkable insertion mutations in the *M. polymorpha* indicated by red arrows, and the remarkable insertion sequences in *P. patens* are indicated by orange triangles (bottom). The asterisk shows nucleotide substitution between *M. polymorpha* and *P. patens*. The numbers on the both sides indicate the nucleic acid residue positions.

A characteristic of this novel DNA is that it is sensitive to single-strand nucleases. For example, this DNA is digested by the S1 nuclease. To determine whether the DNA extracted from our

samples also showed this characteristic, it was treated with the S1 nuclease and used for PCR amplification. The untreated total DNA (as a control) extracted from liverwort sperm and the S1 nuclease treated total DNA were subjected to PCR analysis using the CS-primer, RuBisCo primer and 18S rRNA primer, respectively. Using the total DNA as a template for PCR, the amplified PCR fragments were confirmed. However, such PCR amplification was not detected with the CS-primer from S1 nuclease-treated total DNA. The unique DNA in bryophytes was also sensitive to the S1 nuclease since no amplification product was obtained with the CS-primer (Fig. 3C).

The similarities between the nucleotide sequences of the PCR products amplified from the cultured cells of the moss *P. patens* and the sperm of the liverwort *M. polymorpha* were determined and are shown in Figure 5. Figure 5 (bottom) shows the sequences common to *M. polymorpha* and *P. patens* in blue. Figure 5 (top) shows a comparison between the sequences of the starfish and the liverwort; identical sequences are indicated in green. Yellow arrowheads indicate the insertions common to the starfish and the bryophytes. The insertions unique to *M. polymorpha* are denoted by red-arrows. The insertions unique to *P. patens* are indicated by orange arrowhead. The liverwort PCR product sequences were 482 nucleotides long; this liverwort PCR product is 6 nucleotides shorter at the 5' end than the PCR products amplified from the centrosomal DNA of *A. pectinifera*. In contrast, in case of the moss *P. patens*, the PCR product sequences were 492 nucleotides long; this PCR product is 4 nucleotides longer than that of *A. pectinifera*. PCR analysis was carried out with the CS primer to identify similarities between the centrosomal DNA of the starfish and the moss plant. The size of the amplified PCR product was approximately 500-bp, which was similar to that of the PCR product of the starfish. The nucleotide sequences of liverwort showed high homology (95.8% identity) with that from centrosomal DNA of starfish. The nucleotide sequences of *P. patens* also showed high homology (96.3% identity) with that from centrosomal DNA of starfish. There was 99% identity in centrosomal DNA between *M. polymorpha* and *P. patens*. The centrosome exists

not only in most animal cells but also in plant cells⁴⁾. These results of this study suggest that the unique DNA sequences are present in the centrioles of not only the starfish but also the sperm of liverwort *M. polymorpha* and the *P. patens* protonemata.

In bryophytes such as mosses, liverworts, and hornworts, the sperm is the male gamete, as in the case of animals^{4,7,8,9)}. However, the structure of the sperm of these bryophytes is slightly different from that of animal sperm. The most remarkable difference is that the sperm of these plants have 2 flagella¹³⁾. However, the sperm of all animals have only 1 flagellum. As for the numerical difference of the flagella in which the sperm owns, it is thought with the evidence of the difference that the plants and the animals were able to understand the first divergence that they occurred by a process of the evolution of the eukaryotic cells¹⁴⁾. The sequence phylogeny and taxonomic distribution of the myosin domain combinations revealed five innovative possibilities that strongly support unikont (animals, fungi, choanozoa, and amoebzoa) monophyly and the primary bikont/unikont (bikont; plants, chromists, and all other protozoa) bifurcation¹⁴⁾. It is believed that this structural difference in the sperm of plants and animals is an extremely important difference in the divergence of eukaryotes.

In our preliminary PCR experiments performed using the total DNA of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* and the diatom *Chaetoceros gracillis*, we succeeded in amplifying the centrosomal DNA by using the CS primer. The partial DNA sequences of both the sea urchin and diatom were also analyzed, and the homology between both sequences and the centrosomal DNA sequence from the starfish was found to be above 95%. This DNA sequence appears to be highly conserved between species. This novel DNA is expected to be a new tool in the study of the origin of the eukaryotes.

Accession numbers of the genes described here are as follows: AB298452 (*M. polymorpha*) and AB298453 (*P. patens*)

Acknowledgments

This study was supported by a grant of the Research Institute for Integrated Science, Kanagawa

University. We want to thank Prof. Dr. Mitsuyasu Hasebe (National Institute for Basic Biology) for providing the moss *P. patens* of materials. We are grateful to Dr. Akiko Fujiwara (Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University), Dr. Tatsuo Furuki (Natural History Museum and Institute, Chiba) and Dr. Isao Kawai for a kind help in collecting materials and invaluable advice. This work was partly supported by Grants-in-aid from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (15657057).

References

- 1) Palazzo ER and Schatten PG (2000) *The Centrosome in Cell Replication and Early Development* Current Topics in Developmental Biology Vol.49, eds, Academic Press, New York.
- 2) Kawai S, Azumi Y, Kato HK and Hino A (1998) Isolation, purification and analysis of nucleic acids from a sperm tail fraction in *Asterina pectinifera*. *Zygote* **6**: 138.
- 3) Kawai S and Hino A (2004) Detection of unique DNA localized on the basal bodies from isolated cilia of *Paramecium caudatum*. *Zool. Sci.* **21**: 1286.
- 4) Carothers ZB and Kreitner GL (1968) Studies of spermatogenesis in the Hepaticae II Blepharoplast structure in the spermatid of *Marchantia*. *J. Cell Biol.* **36**: 603-616.
- 5) Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, Riese M, Huijser Pand Baulcombe DC (2005) Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J.* **43**: 837-848.
- 6) Ikeno S (1903) Beitrage zur Kenntnis der pflanzlichen Spermatogenese Die Spermatogenese von *Marchantia polymorpha*. *Botan. Centr.* **15**: 65.
- 7) Moser JW and Kreitner GL (1970) Centrosome structure in *Anthoceros laevis* and *Marchantia polymorpha*. *J. Cell Biol.* **44**: 454-458.
- 8) Miller CCJ, Duckett JG, Sheterline P and Carothers ZB (1983) Immunofluorescence microscopy of the flagella and multilayered structure in two mosses, *Sphagnum palustre* L. and *Polytrichum juniperinum* Hedw. *J. Cell Sci.* **61**: 71-86.
- 9) Vaughn KC and Renzaglia KS (1998) Origin of bicentrioles in Anthocerotale spermatogenous cells. In: *Bryology for the Twenty-first Century*. Bates JW, Ashton NW and Duckett JG, eds., Maney Publishing and The British Bryological Society, Leeds. pp. 189-203.
- 10) Lewis LA, Mishler BD and Vilglys R (1997) Phylogenetic relationships of the liverworts, a basal embryophyte lineage, inferred from nucleotide sequence data of the chloroplast gene *rbcl*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **7**: 377-393.
- 11) Sugiura C, Kobayashi Y, Aoki S, Sugita C and Sugita M (2003) Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*:

- evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucl. Acids Rese.* **31**: 5324-5331.
- 12) Kawai S, Nemoto S and Hino A (2002) Detection of unique DNA localized in the starfish sperm centrosomes from parthenogenetically activated embryos. *Zool. Sci.* **19**: 1440.
- 13) Duckett J G, Carothers ZB and Miller CCJ (1983) *New Manual of Bryology: Gametogenesis*. Schuster RM, eds., The Hattori Botanical Laboratory. Nichinan, (Japan).
- 14) Richards TA and Cavalier-Smith T (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **436**: 1113-1118.

■原 著■

外部仕様のパラドックス — 問題点と対策の考察 —

野口健一郎^{1,2}

Paradox of External Specification — A Consideration on its Problems and the Measures —

Kenichiro Noguchi^{1,2}

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

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

Abstract: The external specifications of information systems including software need to be provided in a clear manner to users and others, which would be an essential requirement for the sound advancement of information society. However, to realize it is not easy. In this paper the intrinsic problems of the definition of the external specifications of information systems are examined. I show that, for a usual information system which is not very simple, it is impossible to define its external specification without utilizing the internal structure of the system and that the ultimate definition results in a sort of implementation of the system. I call this characteristic as *the paradox of external specification*. Next I review how the paradox of external specification affects the actual activities in the following four areas – use of information systems, development of them, interoperation in the network environment, and standardization - and general characteristics are presented. Then the paper discusses the measures, which include the evolution and deployment of specification description techniques such as formal description ones, the improvement of the readability of source programs, and the development of external specifications whose semantics are easy to be understood.

Keywords: external specification, specification description method, specification description language, formal semantics

序論

情報化の進展は著しい。情報化社会を可能にしているのは、コンピュータという 20 世紀に生まれた新しい道具である。コンピュータを利用してさまざまな情報システムが作られており、それらはコンピュータ技術の進展に伴い、ますます高度化しつつある。これらのコンピュータやそれを使った情報システムという道具は、これまで人類が発明した他の道具に比べてはるかに複雑である、という特徴を持っている。そして使う人が、コンピュータや情報システムの機能、特性を細部まできちんと把握し、理解することが難しい、という状況になっている。

利用者からみたコンピュータや情報システムの詳細な機能や特性、すなわち外部仕様は、そもそも開

発者にとっても、それをきちんと、利用者に分かりやすく書き表すことが難しい、という根本問題がある。したがって、利用者が外部仕様を正確に把握し、理解することは、そもそも困難なことになっている。今後の本格的な情報化社会の健全な発展のために、この状況をいかに改善するかは大きな検討課題であると思われる。

情報化社会ではネットワークの果す役割がどんどん大きくなっている。情報システムがネットワークを介して繋がるとき、繋ぎのための約束事も情報システムの外部仕様的一种である。これが標準化され、公開されて、誰でもそれに合わせた製品を作れるようにすることも、情報化社会の健全な発展のために

重要である。このとき、これをどのような形で提供するか、というのも外部仕様に関わる大きな課題である。

本論文では、外部仕様の記述、提供に関わる問題点と対策について考察する。まず、外部仕様の本質的な特性と、それから生じる問題点を明らかにする。外部仕様を利用者に分かりやすいように、内部の詳細に立ち入らずに記述することは、ある程度複雑な仕様の場合には不可能であることを論証する。また、外部仕様定義は結局その外部仕様を実現するものを作ることに相当することを示す。(外部仕様が外部的に記述できない、さらに外部仕様定義が作りと等価になってしまうという意味で、これを本論文では“外部仕様のパラドックス”と呼ぶ。)次に、これらが情報システムの利用や開発に実際的にどのような影響を及ぼしているかを見てみる。それらは外部仕様のパラドックスの例証にもなっている。最後に、対策のためにどのような課題の解決が必要かを述べる。

外部仕様の記述法については、ソフトウェア開発の1段階としてのものは種々行われている。その中で、外部仕様記述の問題点を検討したものとして野口(1990)¹⁾がある。構造設計およびオブジェクト指向設計での仕様記述については詳細なサーベイがWieringa(1998)²⁾にあり、外部仕様記述は未完成の領域であるとしている。

本論

外部仕様定義の問題点

外部仕様

(1) 観念としての外部仕様

コンピュータや、それを使った情報処理機器や情報処理システムを、ここでは一般的に情報処理機械と呼ぶことにする。ソフトウェア(プログラム)は、それを実行するコンピュータと組み合わせ、情報処理機械を構成する。情報処理機械の基本モデルは、入力情報を受け付けて、それを処理し、結果として出力情報を出す、というものである(図1)。

情報処理機械は、それを利用する側(人間または他の情報処理機械)とは入力および出力を介して繋がっている。すなわち、利用する側からは入力情報および出力情報だけが見え、内部の処理は見えない。



図1. 情報処理機械のモデル。

利用する側からみた情報処理機械の特性は、入力情報、出力情報およびその関係によって決まる。それが情報処理機械の外部仕様である。すなわち、外部仕様とは、

- ・利用する側から見える、または認識できるものである。
- ・その内容は、入力情報、出力情報およびその間の関係である。
- ・情報処理機械の内部の処理は、外部仕様には、直接には、含まれない。

第1点および第3点を強調するために、「外部」仕様の名が付いている。以上は外部仕様についての基本的な捉え方であるが、次に述べるような、具体的な捉え方になっていない。これは観念としての外部仕様と言える。

(2) 実体としての外部仕様

外部仕様は、情報処理機械の利用に際して、利用する側にそれを伝えて理解してもらうために、また情報処理機械の開発時に、共同開発者にそれを伝えて理解を共有するために、伝達することが必要になる。伝達できるためには、観念としての外部仕様をものに固定する必要がある。すなわち、外部仕様を定義した「もの」が必要になる。この、外部仕様の定義物は、多くの場合記述物である。外部仕様の定義物が、実体としての外部仕様である。前者の例では利用者向けのマニュアル、また後者の例では外部仕様書と呼ばれる文書がそれに相当する。

以下の議論は、実体としての外部仕様は、それを定義した記述物である、として進める。

外部仕様定義の分類

外部仕様定義は、次の二つの要素からなる。

- ・入力情報および出力情報の形式の定義
- ・入力情報と出力情報の関係の定義

外部仕様は、入力メッセージを受け取り、出力メッセージを返す、ということから一つの言語とみなすこともできる。そうみなしたとき、前者は言語の構文規則(シンタックス)に相当し、後者は意味規則(セマンティクス)に相当する。

実際に行われている外部仕様定義は、いくつかのタイプに分類される。

(1) タイプ1: 構文のみ型

外部仕様として、構文の側面だけを定義し、意味の側面は無視してしまう、ということがけっこう行われている。これはオブジェクトベースないしオブジェクト指向分野でのインタフェース定義の場合に見られる。インタフェースも、それを利用する側との関係で見ると、そのインタフェースを提供している

プログラムやサーバの外部仕様である。Ada[†]言語における specification 部³⁾、Java^{††}言語の interface⁴⁾、CORBA^{†††}IDL (Interface Definition Language)⁵⁾ によるインタフェース記述などはその例で、いずれも構文の側面だけを定義している。

(2) タイプ2：構文+不完全意味型

タイプ2は、構文についてはきちんと定義するが、意味については完全な定義を目指さず、主要な意味だけを記述する、というものである。利用者向けの外部仕様定義書であるマニュアルの場合はこれが普通である。

(3) タイプ3：構文+意味型

タイプ3は、構文規則だけでなく、意味についてもきちんと定義するものである。情報処理機械の開発時に作成する外部仕様書はこれを目指している。また、異なるベンダ同士で、製品間のネットワーク接続などを図るためのインタフェース仕様書なども、これを目指している。

外部仕様定義の実際的な問題点

実際に行われている外部仕様定義は、タイプ毎にそれぞれ問題点を含んでいる。前に述べた観念としての外部仕様に照らし合わせると、次のような問題点がある。

(1) 不完全性

タイプ1およびタイプ2は、意味規則が全く、または一部欠けており、外部仕様定義として完全でない。

(2) 実現性

タイプ3について、全ての意味規則を漏れなく記述するのは、大変難しいことが多い。簡単な情報処理機械の場合は問題ないが、実用となるような情報処理機械は通常外部仕様も複雑になり、それをうまく記述する方法が見付からないことが多い。

(3) 表現の内部性

タイプ3について、外部仕様は本来利用する側から見える外部的なものであるはずだが、意味規則を完全に外部的に記述することは難しい、という問題点もある。詳細な意味規則を記述するために、どうしても内部の動きを記述に利用せざるをえなくなることが多い。

意味記述の本質的な問題—記述手法

本来の外部仕様定義であるタイプ3においてもなお、意味定義について実現性と表現の内部性の問題点があることを述べたが、これらは外部仕様の意味規則

[†] Ada は米国政府の登録商標である。

^{††} Java は Sun Microsystems, Inc. の商標である。

^{†††} CORBA は Object Management Group, Inc. の商標である。

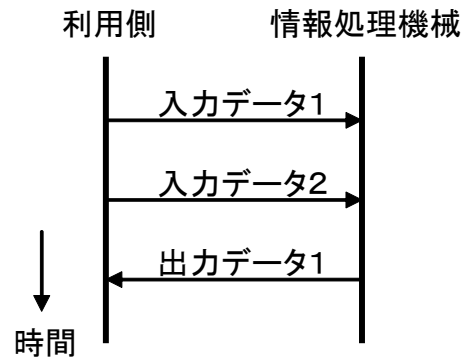


図2. 時系列図（シーケンス図）の例。

を記述することに関わる本質的な問題から由来する。まずオートマトン理論⁶⁾をベースとして、基本的な記述手法について考察する。

(1) 入出力の関係の並べ挙げ

入力情報と出力情報の関係の記述が意味の記述である。これを直接的に行う方法は、関係のインスタンスを並べ挙げることである。その実例が時系列図（シーケンス図）である。時系列図では情報処理機械とその利用側をそれぞれ一本の縦棒で表現し、利用側が与える入力データまたは入力データのシーケンスに対応して、どのような出力データまたは出力データのシーケンスが結果として得られるかを、方向性を持った矢印と一緒に、時系列的に記述する（図2）。

この記述法の利点は、情報処理機械の内部にはまったく立ち入ることなく（時系列図では一本の縦棒で表されるだけである）、利用側から見える入力情報と出力情報だけを使って、入力情報と出力情報の関係が記述されることである。すなわち、まったく外部的な記述になっている。ただし、この方法の限界は、入力情報と出力情報の関係が有限の組合せしかないとき（すなわち関係のインスタンスが有限個のとき）だけ、完全な記述となることである。通常の情報処理機械は入力情報と出力情報の関係は無限の組合せを持っている。そういう情報処理機械に対しても入出力の関係の並べ挙げによる記述が行われることも多いが、それは有限個の例を記述しただけの不完全なものとなる。時系列図は単純な通信プロトコルを表現する手法として広く使われてきているが、ソフトウェアの設計手法としても使われており¹⁾、UMLでも手法の一つとして採用されている⁷⁾。

(2) 内部状態を利用した記述

情報処理機械の入出力の関係に無限の組合せがある場合でも、入出力の関係の規則は有限におさまる。この規則性を記述すればよい。規則性を記述するために、必然的に規則を表現するための媒介の記号類—それは入力情報や出力情報とは別のもの—が必要になる。

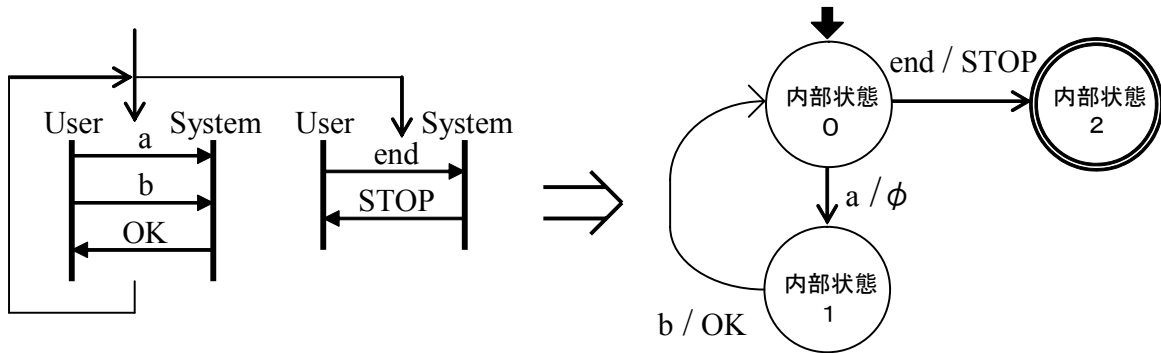


図3. 繰返し型シーケンスの状態遷移図による記述の例.

入出力の関係に無限の組合せがあるものの中で最も簡単なモデルが有限状態機械である。これは内部状態の概念を導入することにより、それを媒介として入出力の関係の規則性を記述するものである。有限状態機械は、入出力の関係に、正規表現で表すことが可能な、繰返し型の規則性があるものであり、内部状態を用いた記述はその表現法である(図3)。入出力の関係の規則性は有限状態機械の振舞い、動作とみることもできる。実際の記述方法としては状態遷移図や状態遷移表がある。

有限状態機械モデルに基づいた記述法の利点は、内部状態(それは機械の記憶をモデル化したものである)という概念は利用するものの、それ以外は、利用側から見える入力情報と出力情報のみを用いて、入出力の関係の規則、すなわち意味規則が記述できることである。さらに、内部状態は機械の記憶をモデル化したものであり、機械を利用する場合にそれを認識することが必要なものであるので、有限状態機械モデルに基づいた記述はかなり外部的な記述と言えよう。ただしこの方法の限界は、情報処理機械が有限個の内部状態を持つものである場合だけ、完全な記述となることである。情報処理機械には、構造的に無限の記憶を持つものとして取り扱うべきものや、たとえ内部状態数は有限でも、その数が多すぎて、状態遷移図や状態遷移表では実際に表しきれないものも多い。そのような場合でも、主要な外部仕様の記述に状態遷移図や状態遷移表が用いられることがある。状態遷移図や状態遷移表は通信プロトコルを表現する手法として、広く使われてきている。またソフトウェアの設計手法としても用いられており、ソフトウェアの状態遷移の表現法は、ISO/IEC標準ともなっている⁸⁾。階層的な表現などを可能にした拡張手法もある⁹⁾。

なお、内部状態数が多いとき、情報処理機械を複数の有限状態機械に分割できれば、内部状態数の総和はずっと少なくなり、より分かりやすい記述となる。ただし、分割された有限状態機械間での情報の

やり取りが出てくる。分割された有限状態機械の記述には、この内部の入出力(それは利用する側からは直接見えないもの)も用いる必要がある¹⁾。このため記述は外部的なものとは言えなくなる。

(3) 内部記憶および内部記号を用いた記述

情報処理機械が無限の記憶を持つ場合には、有限状態機械より複雑なモデルを適用する必要がある。情報処理機械がプッシュダウンオートマトンとしてモデル化できる場合には、有限個の内部状態と無限長のプッシュダウンスタックを用いて、機械の振舞い、すなわち入出力の関係の規則を記述することができる。情報処理機械の最も一般的なモデルはチューリングマシンになる。この場合には有限個の内部状態の他に、無限長のテープと、内部的な記号(入力情報や出力情報には含まれないもの)も利用して、機械の振舞いを記述することになる。外部仕様の意味記述が、利用する側からは直接見えない内部の記憶装置や内部的な記号を用いた、内部的な記述になってしまう。

(4) 実際の記述手法

実用的な情報処理機械は、内部状態数が多すぎて状態遷移図や状態遷移表では表しきれなかったり、または無限の内部状態を持つとして取り扱う必要のあるものが多い。実際の記述手法はそのような一般的な情報処理機械の仕様を記述できなければならない。

状態遷移技法を拡張して、機械の内部変数を導入し、状態遷移に伴う機械の動作に内部変数に対する操作を許すことによって意味記述をすることが行われている。これは内部状態の一部を内部変数で表現することに相当し、“拡張状態遷移図”または“拡張状態遷移表”と呼ばれる。状態遷移技法とプログラミング言語的な表現を組み合わせることにより、記述の自由度がずっと広がる。この手法はOSの仕様記述用としてかなり以前に提案された¹⁰⁾。通信分野ではOSI(開放型システム間相互接続)¹¹⁾の通信プロトコルの意味記述にも用いられている。Estelleはそれを記述言語化したものである¹²⁾。この手法、

あるいはその変形は、ソフトウェア設計手法において、外部仕様記述の手法として用いられている¹⁾¹³⁾。特に構造設計およびオブジェクト指向設計において多く採用されており²⁾、UMLでもこの一種が採用されている⁷⁾。

仕様記述言語を用いて、形式的に仕様を記述することが行われている。VDM-SL (Vienna Development Method - Specification Language)¹⁴⁾、Z言語¹⁵⁾、B¹⁶⁾などは集合論や述語論理に基づく数学的記法を採用している。しかしこれも内部の変数などを利用した、内部的な記述になっている。述語論理を用いた記述は、プログラミング言語による処理型の記述とは異なるものの、結局は外部仕様を実現したインタープリタとみることができる。(プログラミング言語の意味定義は結局その言語のインタープリタである、という見方は schmidt(1996)¹⁷⁾にある。)

ソフトウェアの場合、ソースプログラムは、完全な意味の記述も含んだものである。すなわち、プログラミング言語そのものが意味記述の手法のひとつである。

意味記述の実践的な手法は、結局外部仕様を何らかの方法で実現したインタープリタを作ることと相当し、記述は内部的なものになる。

(5) 外部仕様記述の本質的な問題点のまとめ

以上で述べたモデル化および記述手法の比較を表1に示す。複雑な情報処理機械では、意味の規則を記述するために、入力情報と出力情報に加えて、内部的な情報を補助として用い、それらの間の関係を記述することになる。

問題点をまとめると、次のようになる：

法則1：情報処理機械は、有限状態機械としてモデル化できるものより複雑なものは、その完全な外部仕様を、内部の振舞いに立ち入らずに、外部的に記述することはできない。

すなわち、観念としての外部仕様は、実体としては存在しない(存在できない)ことが多い。

表1. 情報処理機械のモデルと意味記述の方法

情報処理機械のモデル (複雑さのレベル)	意味記述として何の関係を記述するか				記述手法の例
	外部入力 外部出力	内部状態	内部入力 内部出力 (内部要素間)	内部記憶・ 内部変数	
入出力の関係が有限個	✓				時系列図
有限状態機械	✓	✓			状態遷移図(表)
	✓	✓	✓		複数の状態遷移図(表)
無限状態	✓	✓		✓	チューリングマシンの記述
一般(制約なし)	✓	✓	✓	✓	仕様記述言語 拡張状態遷移図(表) プログラミング言語 (ソースプログラム)

意味記述のもう一つの本質的な問題—定義の循環論

(1) 外部仕様定義の循環論

情報処理機械の外部仕様を完全に、曖昧さ無く記述するためには、記述に用いる手法が、外部仕様記述を受け取り理解する人にとっても、明確で曖昧さの無いものでなければならない。

単純な記述手法(たとえば時系列図や状態遷移図、状態遷移表)の場合はこの問題はない。しかし、仕様記述にもっと複雑な記述言語を用いる場合は、まずその記述言語自身の定義をきちんと行う必要が出てくる。すでに述べたように、言語と外部仕様は本質的には同じものであり、言語の定義は(その言語を受け付ける情報処理機械の)外部仕様の定義である。すなわち、ここに定義の循環論の問題が生じる：

法則2：情報処理機械の外部仕様定義を完全に、曖昧さ無く行うために、ある記述言語を用いると、次にその記述言語の定義の問題が生じる。これは循環論になり、各レベルの記述言語として定義が必要なものをを用いる限り、記述による外部仕様定義は完結しない。

次にこの循環論を断ち切る方策を考察する。

(2) 定義済み記述言語の利用

外部仕様定義をある記述言語を用いて行い、またその記述言語の定義を別の記述言語で行う、という場合、あるレベルの記述言語が定義済みのものであれば、それより上のレベルの記述言語の定義も明確になり、もとの外部仕様定義も明確なものとなる。

定義済み記述言語としては、単純な記述手法であって定義の問題が無いもの、数学の記法、あるいはその地域の人なら誰でも理解できるはずである自然語などが用いられる。単純な記述手法や数学の記法の場合も、実はその定義は自然語で行われているはずで、結局自然語が最終的な定義済み言語となっている。

最終的な定義済み言語が自然語である、ということは、自然語の曖昧さの問題が伴う可能性がある。厳密に考えれば、自然語はその文法がはっきり分かっているわけではなく、また完全な辞書があるわけでもない。外部仕様や言語の定義に向けた言葉でもない。したがって、外部仕様定義を記述によって行うというのは、完全な定義にならない可能性がある。

法則 3：情報処理機械の外部仕様は、明確で、曖昧さの無い記述手法で記述できる場合を除いて、完全に、曖昧さなく記述することは困難である。

すなわち、ある程度複雑な情報処理機械については、実体としての外部仕様も、存在が難しいことになる。

(3) 定義機械による定義

外部仕様定義の循環論は、記述のアプローチだけでは断ち切ることが難しいことを述べた。これを断ち切る本質的な方法がある。それは、あるレベルの記述言語に対して、その定義を記述で与える代わりに、その言語を受け付け、理解する機械を作って、与えることである。そのような機械をその言語の定義機械と呼ぶ。定義機械により、その言語が明確に、曖昧さなく定義される。意味、すなわち入出力の関係も、定義機械の上で試すことにより、明確に知ることができる。

ある言語の定義機械とは、その言語のインタープリタとして機能する情報処理機械である。すなわち、その言語で記述されたもの（それは一つ上のレベルの言語の定義）を入力して、記述のとおり動作する。すなわち、その言語で記述された一つ上の言語の定義と、その言語の定義機械が組み合わさって、一つ上の定義機械が構成されることになる。結局、

もとの情報処理機械の外部仕様定義についても、それを定義する機械、すなわち記述対象の外部仕様を持つ情報処理機械が構成されることになる。この状況を図4に示す。図は、情報処理過程を形式的に表す手法を用いて¹⁸⁾¹⁹⁾、言語とその定義機械は同じ記号で表現し、また、記述物は記述対象の外部仕様や言語と記述言語をそれぞれ分数の分子、分母として表記している。図では、言語 L に定義機械 L を与えることにより、それより上のレベルの言語および外部仕様についてもそれぞれ定義機械が構成されることを示している。以上をまとめる：

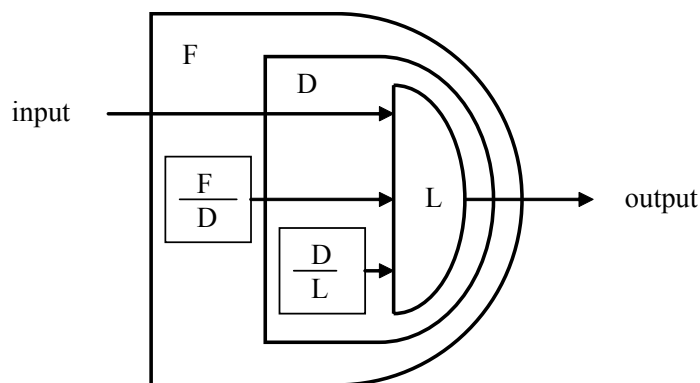
法則 4：情報処理機械の外部仕様を、明確で、曖昧さ無く与える殆ど唯一の方法は、その外部仕様を持つ機械を作って、与えることである。

外部仕様のパラドックス

外部仕様は、観念としてのものも存在が難しく、また実体としてのものも存在が難しいこと、さらに完全な外部仕様定義はそれを実現する機械を作って与えることにより達成されること、すなわち外部仕様は結局は作り（実装）と等価であることまでが論証された。外部仕様は外部仕様で無くなってしまった。これ（法則1から4まで）を“外部仕様のパラドックス”と名付ける。

外部仕様のパラドックスの影響

外部仕様のパラドックスが複雑な情報処理機械、特にソフトウェアの利用や開発にどのような影響を及ぼしているか、を見てみる。なお、これらは外部仕様のパラドックスの例証でもある。



凡例：
 $\left(X \right)$ 外部仕様(言語)Xを実現する機械 (Xの定義機械)
 $\frac{X}{Y}$ 外部仕様(言語)Xの言語Yによる記述

図4. 外部仕様(言語)定義の階層の例.

情報システム利用への影響

補則1：ソフトウェアの利用者には完全な外部仕様情報は提供されない。

外部仕様を完全に、詳細に記述することが困難であることから、こうならざるをえない。実際上も、多くの利用者向けマニュアルは主要な外部仕様のみを記述している。これは、詳細な仕様まで記述しようとすると、マニュアルが厚くなりすぎ、多くの人にかえって読みにくくなってしまふ、というのも理由の一つである。なお、マニュアルでは外部仕様の意味規則は自然語で書かれることが多く、その点からも曖昧さがあり、不十分である。

補則2：利用者が詳細な外部仕様を知る最後の手段は、実際に製品を動かしてみることである。

実は、外部仕様のパラドックスから、これは本質的な方法である。利用者は、試行によって、詳細な入出力の関係を知ることができる。なお、構文規則がマニュアルなどに完全に記述されていれば、試行は容易になる。また、仕様そのものが類推が付きやすく作られていれば、それによっても試行が楽になる。ただし、試行で分かるのは入出力の個別の関係（インスタンス）であり、それから規則性を帰納するのは、一般には容易ではない。それは一種のリバースエンジニアリングであり、時間のかかる、発見的なプロセスとなる。

情報システム開発への影響

補則3：ソフトウェアの内部の設計に着手する前に、外部仕様をすべて明確に規定するという理想は、実用的にも理論的にも満たされない。内部の設計を進めることにより、外部仕様も明確にすることができる。

少し複雑な製品の場合、外部仕様の記述は内部的にならざるをえない。すなわち、内部の構造や内部の変数を前提にすることにより、外部仕様の記述もできる。すなわち、外部仕様の記述のために、なんらかの形で内部設計を行うことが必要になる。

これは、外部仕様の設計と内部処理の設計において、ウォータフォール・モデルに従った開発はできないことを意味する。

補則4：ソフトウェア開発において、開発がかなり進むまで、何を開発しているかが完全には分からない。

補則3を別の形で述べたものである。

また、補則3ないしは4は、開発管理の面でも、かなり深刻な影響を及ぼしている。

補則5：ソフトウェアの開発計画（予定の日程、予定のコストなど）を立てる時には、開発の対象（何を開発するか）は完全には定義されていない。

開発対象物は、外部仕様によって定義される。しかし、それは開発が進まないとはっきりしない。開発計画を立てる時は、開発対象物がどういうものになるか、よく分かっていない。結果として、製品の開発計画は実際とはずれたものになってしまう。その結果としての日程の遅延やコストの増大、いうことも多い。

開発を、契約により請け負わせる・請け負うときにも同様の問題が生じる。

補則6：ソフトウェアの開発契約締結時に、契約の対象（何を開発するか）が完全には定義されていない。

開発契約の発注仕様書には、何を開発するかをきちんと書くことができない。したがって、契約する日程や費用も、妥当なものかどうか分からない。開発契約に関わるトラブルのもとにもなる。

開発の過程で、外部仕様が完全なものになったとき、その文書化（外部仕様書としての）の問題がある。これには、最後の解決策がある。

補則7：外部仕様の詳細な記述（意味も含めて）は可能である。完成したソースプログラムがそれである。

法則3と4との関係では、ソースプログラムは明確で、曖昧さの無い記述であり、またその外部仕様を持つ機械を実現しているものである。なお、外部仕様の完全な形式定義も、一種のソースプログラムと見ることもできる。

ネットワーク環境での相互運用の実現への影響

ネットワーク環境で、製品間の相互運用を実現することが、今後極めて重要になっていく。このためには、製品同士が同じ通信プロトコルを理解し、それを用いて対話できなければならない。通信プロトコルも、それを実現する製品の外部仕様である。ただし、特定製品に所属する外部仕様というより、複数製品が共有する外部仕様である。インターネット時代においては、それは規格として標準化され、誰でもがアクセスでき、かつそれを実装する製品を作れることが望まれる。このためには、通信プロトコル規格が文書化されることが必要である。ただしこれ

は必要条件ではあるが、十分条件ではない。

補則 8 : 文書化された通信プロトコル仕様だけに基づいて、製品間の相互運用を実現することは難しい。

通信プロトコルは、状態遷移モデルで記述できるレベルの基本的な通信プロトコルについては問題ないが、アプリケーションプロトコルには複雑なものが多い。それらを文書として、詳細かつ完全に記述することは難しい。しかし、プロトコルが詳細かつ完全に記述されていないと、それに基づいて実装した製品間の相互運用は達成できない。

OSI は、標準規格文書をまず作り、それに基づき製品開発を行い、製品間の相互接続、相互運用を達成しようという国際的なプロジェクトであった。適合性試験や相互運用性試験の必要性も認識されて、そのための努力もなされたが、全体としては文書中心のアプローチであったことが、成功できなかった大きな要因といえる。

補則 9 : 通信プロトコルを実装したソースコードを公開かつ権利放棄して、誰にでも利用可能にすることは、相互運用性を実現する確実な方法である。

インターネットの基本プロトコルである TCP/IP は UNIX[†] の BSD 版と共に広まった²⁰⁾。また、Sun Microsystems の NFS (Network File System)²¹⁾ もソースコードの流通により広まった。

なお、公開だけではだめか、権利放棄まで必要か、ということについては次のようになる。たしかに、ソースコードが公開されれば、そこから外部仕様を読み取ることができる。しかし、実体としての外部仕様は記述物であり、たとえば著作権で守られているソースコードを読み取って、独立の著作物を作ることは困難である。IBM 社のネットワークアーキテクチャである SNA は、ソースコードレベルの詳細なプロトコルがマニュアルとして公開されている(プログラムと有限状態機械を組み合わせた記述手法が用いられている)²²⁾が、著作権を放棄することはしなかった(1984 年の EC との独禁法裁判の和解の結果²³⁾)。

補則 10 : 通信プロトコルの参照用実装を利用して相互運用のテストを行うことにより、文書化された通信プロトコル仕様の完全でない部分を補うことができる。

参照用実装 (reference implementation) とは、その外部仕様を正しく実装した原器として利用可能にされるものである。なお、先行開発され、市場に普及したデファクト製品が、実質的な参照用実装の

役割を果たすこともある。

仕様の標準化への影響

通信プロトコル以外の分野での、仕様の標準化への影響を述べる。

補則 11 : 文書化された標準仕様に基づいて独立に開発された製品間では、緩やかな互換性が実現される。

通信プロトコル以外の分野では、ハードウェア仕様の差などを考慮して、標準規格といえども、製品間の完全な互換性を要求するものではなかった、という経緯もある。プログラミング言語や OS の分野では、仕様の細部には実装依存とされている部分がある。ただし、ネットワーク環境での使用を考慮したプログラミング言語では、事情は変わってきている。

対策と今後の課題

外部仕様のパラドックスを認識しつつ、21 世紀の情報システムの外部仕様の提供方法をどのようにすべきかは、重要な検討事項である。

外部仕様記述の提供

今後の情報化社会においては、情報システムの詳細な機能、特性を、利用者が知ろうと思えば分かるようにすべきであると考えられる。しかし、外部仕様のパラドックスから、実用的な、したがってある程度複雑な情報システムやソフトウェアの厳密な外部仕様の記述は、内部的にならざるをえない。

数学的ないしは論理的な手法を用いた形式的な仕様記述手法、オートマトン理論・形式言語理論と実際的なプログラミング手法を組み合わせる手法などは単に開発手法としてだけでなく、より広い仕様提供手法として使えよう。これらの進化と普及を期待する。なおこれらの手法は、記述手法自身の仕様定義の問題を解決するためにも、定義機械により実行可能なものであることが望ましい。

利用者には、主要な外部仕様だけを知ればよい人から、詳細な外部仕様を必要とする人までいろいろなレベルがある。外部仕様記述も、主要な外部仕様の記述から、詳細な記述まで、階層的に構成できる手法の研究も意味があると思われる。

[†] UNIX は The Open Group の登録商標である。

ソースプログラムの利用

ソフトウェアの場合、ソースプログラムを完全な意味記述を含んだ文書として利用することは有効な方法であり、プログラミング言語の進歩に伴い、より現実的な方法になってくると思われる。たとえばオ

・ソースプログラムの読解性の向上

ソースプログラムを文書としても取り扱う場合、その読解性の問題がある。一つの解決策はより論理的な記述を可能にすることで、構造化プログラミング言語、オブジェクト指向言語などはその方向での進化でもある。読解性についてはさらに、プログラミング言語仕様の国際化・地域化の問題がある。現在のプログラミング言語は英語ベースのものが多く、英語圏以外の人々にとっては、読むのに骨が折れる。それぞれの地域の言語をベースにしたプログラミング言語の表現を可能にすること（自国語プログラミング）^{24,25)}が、その解決策になる。ソースプログラムの各国語表現への変換は、コンピュータにとっては容易な処理である。

・知的財産との関係の解決

ソフトウェアのソースプログラムには外部仕様だけでなく、実装の技術もすべて含まれる。ソフトウェア開発を業とする企業にとっては、最も重要な知的財産である。その公開には、この関係の解決が必要である。社会的なセキュリティを考えた場合、情報化社会を実現するためのソフトウェアが完全にブラックボックスでよいのか、という問題もある。広く一般に公開しないまでも、特定の条件でソースプログラムを閲覧可能にする措置が必要になると考えられる。

ソースプログラムを広く利用可能にして、プログラム開発の促進と、信頼性の確保を図ろうという動き（Open Source Software）も出てきている²⁶⁾。情報化社会のインフラとなるソフトウェアは、社会財としてこのカテゴリになってくる可能性もある。

外部仕様の作り方

外部仕様の意味定義の問題を軽減するために、外部仕様そのものの作り方も検討してゆく必要がある

・他言語で意味を定義済みの構文要素の利用

外部仕様で用いる構文要素（語や記号）に、他の言語（特に自然語）で意味を定義済みの構文要素を借りるようにすると、新たな定義をしなくても、意味が理解できる。

・外部仕様の国際化・地域化

意味を定義済みの構文要素として、その地域の言語ベースの構文要素を利用すれば、さらに意味理解が容易になる。GUI(Graphical User Interface)の分

ブジェクト指向でクラスを継承するとき、親クラスの振舞いはソースプログラムを読むことによって完全に理解される。ソースプログラムを利用する場合の課題を述べる。

野はかなりそうになっている（ただし、英語をカタカナ語にしたものが多い問題はある）が、他の外部仕様も、それを考えていくべきである。なお、外部仕様を国際化・地域化する際には、異なる地域表現の間でも相互運用性を確保するようにすべきである。それはコンピュータにとっては難しいことではない。

標準仕様・共通仕様の提供方法

情報システムは、通常改版が行われることにより、新しい製品が生み出される。そして、情報システムの外部仕様は、改版が行われても将来的に引き継いでゆかれる共通的な仕様と、特定の版の個別の仕様に分かれる。前者の共通仕様は、製品開発上明確に管理する必要がある。また、利用者に対して、またはその情報システムと相互運用する別のシステムのために、将来への約束として明確に示す必要がある。ソースプログラムは仕様の完全な定義として有効ではあるが、共通仕様と個別仕様を区別してくれない。共通的な外部仕様を意味まで含めて明確に記述し提供する方法は課題である。

システムがネットワークによって相互に接続される場合、製品間にわたる標準的・共通的なインタフェース仕様に従い、その範囲だけを使って接続が実現される。したがって、個々の製品が改版され、別製品になっても、継続して接続が行える。このように、標準規格化されている外部仕様、インタフェース仕様は、標準的・共通的な範囲を取り決めている。それを実装した製品の外部仕様とは同じではない（後者は前者を包含しているが）。標準規格化される外部仕様、インタフェース仕様の記述と提供の方法も、同様に課題である。

なお、アーキテクチャという用語がソフトウェアの世界でも使われることが多くなった。この用語の本来の意味は、体系化された標準インタフェースの集合、というものである。標準仕様・共通仕様の記述と提供方法の課題とは、アーキテクチャの記述と提供方法の課題とも言える。

結論

情報システムの外部仕様が、明確な形で利用者等に提供されることは、情報化社会が健全に発展していくための要件であると思われるが、その実現は必ずしも容易ではない。

本論文では、まず外部仕様定義の本質的な問題点を考察し、ある程度複雑な仕様の場合は、

- ・外部仕様は外部的に記述できない、
- ・外部仕様定義は作りと等価になる

など、外部仕様がその名前と矛盾する特性を持つことを論証し、4つの法則として示した。そしてそれを外部仕様のパラドックスと名付けた。次に、外部仕様のパラドックスが実際面でどのように影響しているかを、情報システムの利用、開発、ネットワーク相互運用、および仕様標準化の4つの局面について考察し、11個の補則としてまとめた。これらは外部仕様のパラドックスの例証にもなっている。最後に対策および今後の課題について考察した。外部仕様のパラドックスが存在するため、外部仕様の容易な提供方法はない。

- ・仕様の形式記述手法などの進化と普及
 - ・ソースプログラムの読解性の向上
 - ・意味理解が容易な外部仕様の作成
- などが解決策であり、また今後の課題である。

文献

- 1) 野口健一郎 (1990) ソフトウェアの論理的設計法, 共立出版, 東京.
- 2) Wieringa R (1998) A Survey of structured and object-oriented software specification methods and techniques. *ACM Comput. Surv.* **30**: 459-527.
- 3) American National Standards Institute, Inc. ANSI/MIL-STD-1815A-1983 (1983) *The Programming Language Ada Reference Manual*, Lecture Notes in Computer Science 155, Springer-Verlag, New York.
- 4) Gosling J, Joy B, Steele G and Bracha G [村上雅章訳](2006): *The Java TM 言語仕様 第3版*, ピアソン・エデュケーション, Tokyo.
- 5) Object Management Group, Inc. (2004) *Common Object Request Broker: Core Specification, Version 3*.
- 6) Hopcroft JE, Motwani R and Ullman JD [野崎昭弘他訳]: オートマトン 言語理論 計算論 I・II 第2版, サイエンス社 (2003).
- 7) Rumbaugh J, Jacobson I and Booth G (1999) *The Unified Modeling Language Reference Manual*. Addison-Wesley, Reading, Mass.
- 8) ISO/IEC 11411:1995 (1995) *Information Technology - Representation for Human Communication of State Transition of Software*, International Standard.
- 9) Harel D (1988) On visual formalism. *Comm. ACM* **31**: 514-530.
- 10) 野口健一郎, 元岡達 (1973) オペレーティング・システムの記述に関する一考察. *情報処理* **14**: 98-105.
- 11) ISO 7498:1984 (1984) *Information processing systems - Open Systems Interconnection - Basic Reference Model*. International Standard.
- 12) ISO 9074:1989 (1989) *Information processing systems - Open Systems Interconnection - Estelle: A formal description technique based on extended state transition model*, International Standard.
- 13) 渡辺政彦 (1998) 拡張階層化状態遷移表設計手法 Ver.2.0. 東銀座出版社.
- 14) ISO/IEC 13817-1:1996 (1996) *Information technology - Programming languages, their environments and system software interfaces - Vienna Development Method - Specification Language - Part 1: Base Language*. International Standard.
- 15) Potter B, Sinclair J and Till D [田中武二監訳](1993) ソフトウェア仕様記述の先進技法—Z言語. プレンティスホールトッパン, 東京.
- 16) Wordsworth JB (1996) *Software Engineering with B*. Addison-Wesley, Harlow, England.
- 17) Schmidt DA (1996) Programming language semantics. *ACM Comput. Surv.* **28**: 265-267.
- 18) Sklansky J, Finkelstein M and Russel EC (1998) A formalism for program translation. *ACM.* **15**: 165-175.
- 19) 野口健一郎, 元岡達 (1969) 情報処理過程の形式的表現. 昭和 44 年度電子通信学会全国大会予稿集. p. 883.
- 20) Leffler SJ, McKusick MK, Karels MJ and Quarterman JS [中村明, 相田仁, 計宇生, 小池汎平訳] (1991) *UNIX 4.3 BSD の設計と実装*. 丸善株式会社, 東京.
- 21) Sun Microsystems, Inc. (1989) *NFS: Network File System Protocol Specification. Network Working Group Request for Comments: 1094*.
- 22) IBM Manual SC30-3112-2 (1980) *Systems Network Architecture Format and Protocol Reference Manual: Architectural Logic*, Third Edition.
- 23) IBM [日程コンピュータ訳] (1984) IBM-EC 独禁法問題和解: IBM 提出の確約書全訳, 日経コンピュータ 10月1日号: pp. 191-198.
- 24) Noguchi K (2006) An internationalization approach to native language based programming. *Proc. 4th Int. Conf. Computer Science and Its Applications.* pp. 87-91.
- 25) 鈴木康彦, 野口健一郎, 後藤英一 (1999): Java をターゲットにした自国語プログラミングの実験. *情報処理学会 第58回全国大会予稿集.* 5M-8.
- 26) Raymond ES [山形浩生訳] (1999) *伽藍とバザール オープンソース・ソフト Linux マニフェスト*. 光芒社, 東京.

■原 著■

Fork システムコールを用いた並列ガーベジ コレクションの Lisp 処理系への実装と評価

佐藤憲一郎^{1,3} 松井祥悟^{2,4}

Implementation of Parallel Garbage Collection Using Fork System Call in Lisp System and Its Evaluation

Kenichiro Sato^{1,3} and Shogo Matsui^{2,4}

¹ Graduate School of Information Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka-shi, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Information Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka-shi, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Presently with Hitachi Information Systems, Ltd.

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

Abstract: We implemented the parallel garbage collector using fork system call for process generation supported in the multi-processes OS, such as UNIX. The GC does not need a write barrier because the gc process performs marking the replica space generated by fork system call. Although Inter-Process Communication is needed in order to notify garbage cells, the ordinary stop and collect mark-sweep GC can be easily changed to this method. We implemented the GC in the Lisp system and compared with the original mark-sweep GC.

Keywords: garbage collection, parallel garbage collection, garbage collection using fork system call

序論

動的なデータ構造を取り扱うシステムでは、ヒープ領域に配置したメモリ資源をプログラムが必要に応じて領域確保し使用する、という形態のデータ処理を行うのが一般的である。このようなシステムでは、使用済みのメモリを自動的に回収するガーベジコレクション (GC) の機構が不可欠である。

通常 GC は、割り当て可能なメモリが枯渇した時点で、メモリを消費して計算を行うプログラム (mutator) を停止し、メモリ回収プログラム (collector) を実行して使用済みのメモリを回収する停止・回収 (stop-and-collect) 方式で行う。

この停止・回収方式のアルゴリズムには、マークスイープ法やコピー法があるが、使用中のメモリを判別するためにヒープ領域をトレースする処理を行う点が共通している。この場合、mutator の停止時間はヒープ領域の大きさやトレースすべきメモリ量に比例して長くなる。この停止時間を短縮するために、世代 GC や並列 GC が開発されている。

並列 GC は、mutator と collector を並列に動作させる。完全な並列動作が実現できれば、collector による mutator の中断を完全に排除することができる。mutator が無停止になるので実時間処理への応用が可能となる。また、全体の処理時間が GC による時間分だけ短縮されるので高速化にもつながる。並列 GC の効率を改善する研究も行われている^{5,7,10}。

並列 GC は、mutator によるセルの書き換えを collector へ通知するバリアが必要となる。そのため、停止・回収型 GC を並列 GC へ変更するには、mutator がセルを書き換える箇所へバリアを設定しなければならない。しかし、mutator のメモリ空間をコピーしたレプリカ空間に対して、collector が回収処理を行うことでバリアが不要となる。Rodriguez-Rivera らは、fork システムコールを使用してレプリカ空間を生成する並列 GC について述べている⁶。彼らの GC は、malloc 関数や free 関数などのメモリ管理処理を独自のライブラリとして実装

している。一方我々は、この fork システムコールを用いたプロセス生成型並列 GC を Lisp 処理系へ直接組み込んだ³⁾。そして、停止-回収型 GC との比較を行い、効率や問題点について評価した。

本論

並列 GC のアルゴリズム

並列 GC の基本的なアルゴリズムと、並列化において問題となる点をあげる。

並列 GC の動作

並列 GC はマークスイープ法やコピー法のような停止-回収型の GC を並列化したものである。並列 GC は、collector に独立した専用のプロセッサを割り当て、mutator との完全な並列処理により GC を行う。一台のプロセッサ上での疑似並列処理による漸次 (Incremental) GC も並列 GC の一種である。

マークスイープ法を基にした並列 GC では、一つの GC サイクルは、以下の三つのフェーズで構成される。

- (1) ルート挿入 (root-insertion)
- (2) 印付け (marking)
- (3) 回収 (sweep)

ルート挿入フェーズでは、collector は mutator のレジスタやグローバル変数、スタック領域から mutator が使用中のセルを指すポインタをすべて収集する。これらの領域をルートセットと呼ぶ。印付けフェーズでは、収集したポインタから到達可能なすべてのセルに印を付ける。回収フェーズでは、全セルを走査し、印のないセルをフリーリストへ戻す。

バリア

停止-回収型 GC を単純に並列化した GC を考えると、collector の印付けやコピー中に mutator がセルのポインタを書き換えた時、使用中のセルに印が付かず、誤って回収される場合がある。それを防ぐために、mutator によるセルの書き込みに対してバリアを設け、collector へ通知する必要がある²⁾ (図 1)。

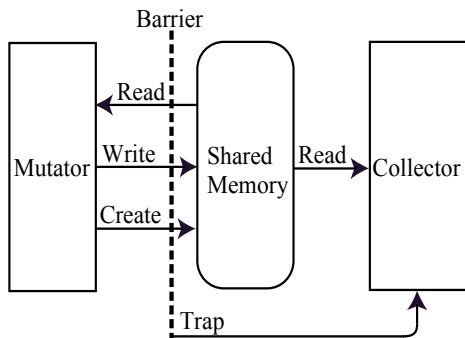


図 1. 並列ガーベジコレクタの構成とバリア。

基本的なアルゴリズム

一般的な並列 GC は、incremental update (IU) 型と snapshot-at-beginning (SB) 型の 2 種類に分類できる⁹⁾。

IU 型 IU 型は停止-回収型 GC を単純に並列化したものである。collector は mutator のルートセットから到達できるセルに印付けを行い、印のないセルを回収してフリーリストへ戻す。停止-回収型との大きな違いは、collector による印付け中に mutator がセルの書き換えを行った場合の補償処理と、印付け終了後に必要なルートセット走査である。

SB 型 SB 型は GC 開始時にセルの状態をスナップショット写真を撮るように記録しておき、その記録上で使用済みとなったゴミセルだけを回収する。基本的には、スナップショット時にルートセットを含むすべてのセルの状態を記録し、それに基づいて印付けを行えばよい。実際にはルートセットだけを記録しておき、mutator がセルの書き換えを行う場合に、collector へ通知し、追加の印付けを行う。

スナップショット型並列 GC の動作

SB 型並列 GC は、はじめに mutator を停止してルートセットのコピーを行う (ルート挿入フェーズ)。その後、ルートセットに基づいて印付けを行う (印付けフェーズ)。この時に mutator によるセルの書き換えが発生すると、上書きされる古いポインタを collector へ通知する。ルートセットから到達できるすべてのセルへの印付けが終わると、mutator から通知されたセルへの追加の印付けを行う。最後に、印のない使用済みセルをフリーリストへ戻す (回収フェーズ)。mutator が停止するのは、ルート挿入フェーズでルートセットをコピーする時だけである。

純スナップショット型並列 GC

SB 型並列 GC は、通常スナップショット時にルートセットだけがコピーされるため、mutator によるセルの書き換えに対してバリアを設定する必要がある。しかし、セル空間全体を別の空間へコピーして、collector がこのコピーされた別空間のセルに対して印付けを行えば、バリアは必要なくなる。これを純スナップショット型 GC と呼ぶ⁸⁾。

純スナップショット型 GC は、SB 型のスナップショット動作においてルートセットだけではなくセル空間全体を別の空間へコピーする (図 2)。collector は別空間のコピーされたセルに対して印付けを行う。この印にしたがって mutator のセル空間のゴミを回収し、フリーリストへ戻す。

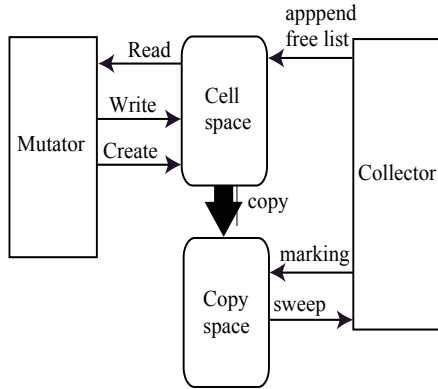


図 2. 純スナップショット GC の構成.

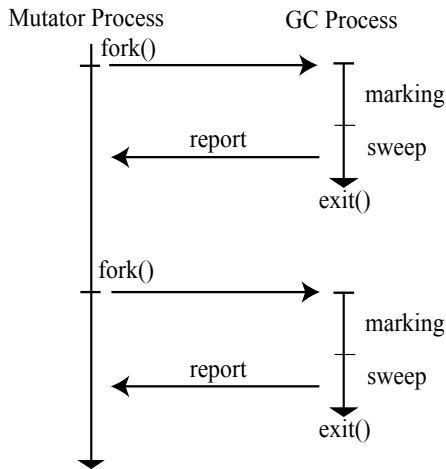


図 3. Fork GC の動作.

fork システムコールを用いた並列 GC

fork システムコールを用いた純スナップショット型 GC (Fork GC)⁴⁾を図 3 に示す。fork()によりセル全体が子プロセス側へコピーされる。fork 実行後、親プロセスは mutator として通常の計算処理を続行する。子プロセスは collector として停止-回収型マークスイープと同じ GC 処理を行う。GC プロセスはスイープフェーズで再利用可能なゴミセル情報を親プロセスへ通知し、exit()で終了する。

コピーオンライト (copy-on-write, COW) 型の fork システムコールの場合、プロセスを生成するときには、メモリ空間をコピーしたように見せかけておく。ページへの書き込みが発生すると、はじめて実際にコピー処理を行いメモリ空間を分離する。このように fork システムコールを用いることで、容易にセル全体のスナップショットを撮ることができる。

Rodriguez-Rivera らの並列 GC

Rodriguez-Rivera らの並列 GC のアルゴリズム⁶⁾を以下に示す。

- (1) 回収を起動したスレッド以外のスレッドを停止する。
- (2) プロセスのメモリを複製する。

- (3) すべてのスレッドを再開する。
- (4) 子プロセス内の一つのスレッドを用いて印付けを行う。
- (5) マークフェーズが終了するとマークビットを親プロセスへ渡して子プロセスを終了する。
- (6) マークのないブロックをその後の割り当てに使用する (遅延スイープ)

彼らは、fork システムコールを用いた並列 GC を、共有ライブラリとして実装している。彼らの並列 GC は、malloc 関数や free 関数といったメモリ管理処理を独自のライブラリとして実装している。free 関数などの明示的にメモリを解放する関数ではメモリの解放を行わず、メモリの回収は GC だけで行う。

アプリケーション実行時に、ランタイムリンカがシステムライブラリ (libc) の代わりに独自に実装したメモリ管理ライブラリを動的にリンクするように指定している。

彼らの研究の目的の一つは、ソースコードが利用できないようなプログラムに対しても彼らの GC を使用できるようにすることである。そのために動的ライブラリとして実装することで、アプリケーションと独立した Nonintrusive (非侵害) 性のある GC を実現している。

実験では、シングル CPU マシンおよびマルチ CPU マシン上で停止-回収型 GC や Boehm-Demers-Weiser GC (BDWGC) との比較を行っている。マルチ CPU マシン上においては、GC による総停止時間は停止-回収型や BDWGC より短くなるなど、良い結果が得られている。

fork システムコールを用いた並列 GC の実装

fork システムコールを用いた並列 GC (Fork GC) の実装について述べる。

mutator プロセスと GC プロセス間の通信

fork システムコールによって mutator プロセスと GC プロセスのメモリ空間は分離されるため、GC プロセスはスイープ時に mutator プロセスへゴミセル情報を通知する必要がある。主なプロセス間通信方法 (IPC) にはパイプ、FIFO、メッセージキュー、共有メモリがある。その中でパイプや FIFO を用いるメッセージパッシング方法と共有メモリ方法について述べる。

(1) メッセージパッシング型

プロセス間でパイプなどの通信路を作成し、GC プロセスから mutator プロセスへゴミセル情報を送信する。

(2) 共有メモリ型

mutator プロセスと GC プロセスで情報を共有するためのメモリ領域を用意する。GC プロセスはスイープ時にゴミセル情報を共有メモリ上に書き込む。mutator プロセスはセルが必要となったときに共有メモリから取得する。つまり、共有メモリをフリーリストとして利用する。

プロセス間通信の違いによる得失

プロセス間通信の違いにより、次のような得失が生じる。

(1) mutator の停止

メッセージパッシング型の場合、GC プロセスからゴミセル情報の送信があると、mutator プロセスは処理を中断してフリーリストへゴミセルを追加しなければならない。この停止時間は GC プロセスが回収したセルの数（最悪の場合セル全体）に依存するので予測不可能である。共有メモリ型の場合には、このような mutator プロセスの停止はない。

(2) フリーリストの構成

メッセージパッシング型では、停止・回収型と同じ形式のフリーリストを用いることができる。共有メモリ型では、共有メモリ上にフリーリストを作成するように変更する必要がある。

(3) リソースの制限

共有メモリ型では、一つのプロセスが利用できる共有メモリのセグメント数と 1 セグメントあたりの最大メモリサイズに制限がある。例えば、SPARC 版 Solaris2.6 のデフォルトでは、1 プロセスに対して最大 6 セグメント、1 セグメントのメモリサイズは最大約 1 MB となっている。そのため、ヒープサイズが大きい場合には共有メモリ上にフリーリスト全体を作成することができなくなる。

評価

Lisp1.5 処理系で停止・回収型マークスイープ GC の euzak lisp に、パイプを用いたメッセージパッシング型（パイプ型）と、フリーリストをリングバッファ形式にした共有メモリ型の 2 種類の Fork GC を実装した。euzak lisp は C 言語で実装されており、UNIX 系 OS 上で動作する。評価を行った環境を表 1 および表 2 に示す。表 1 のマルチ CPU マシンの場合には、mutator プロセスと GC プロセスがそれぞれ 1 プロセッサを使用し、合計 2 プロセッサを用いている。評価に用いたベンチマークプログラムを以下に示す。boyer 論理式に対して論理証明を行うプログラムである。文献 1) のプログラムを使用した。

表 1. 評価環境 (multiCPUs) .

CPU	HyperSPARC 100M Hz
CPU の個数	4
メインメモリ	512MB
OS	Solaris2.6
コンパイラ	GCC2.95.3

表 2. 評価環境 (singleCPU) .

CPU	TurboSPARC 170MHz
メインメモリ	64MB
OS	Solaris2.6
コンパイラ	GCC2.95.3

表 3. ソースコードの変更量.

ForkGC の種類	ソースコードの総変更行数
パイプ型	170
共有メモリ型	163

(1) ack

原始帰納的でない帰納的関数で、2 つの引数が大きくなると計算量が膨大になる。

(2) hanoi

ハノイの塔を解くプログラムである。

ソースコードの変更量

表 3 に停止・回収型マークスイープ GC から並列型の ForkGC へ変更したときのソースコードの変更量を示す。

ソースコード全体は約 7700 行なので、変更は全体の約 2% である。主な変更箇所は、fork による GC プロセスの生成部分（約 100 行）である。変更量はパイプ型と共有メモリ型でほとんど変わらない。パイプ型の場合には mutator プロセスと GC プロセスの通信処理部分を追加しているため、共有メモリ型よりも若干多くなっている。

処理時間全体の評価

処理時間全体を計測し、比較を行った。処理時間は、euzaklisp を起動してフリーリストの作成などの初期化処理を行い、ベンチマークプログラムを実行し、処理系を終了するまでの時間である[†]。処理時間の計測には、シェル (tcsh) の組み込み関数の time を用いた。

停止・回収型のマークスイープ GC と並列型の Fork GC の処理時間を比較した結果を図 4 および図 5 に示す。図 4 はマルチ CPU マシン（表 1）、図 5

[†] 初期化処理などにかかる時間は数十ミリ秒で、処理時間全体の 0.1% 以下なので無視している。

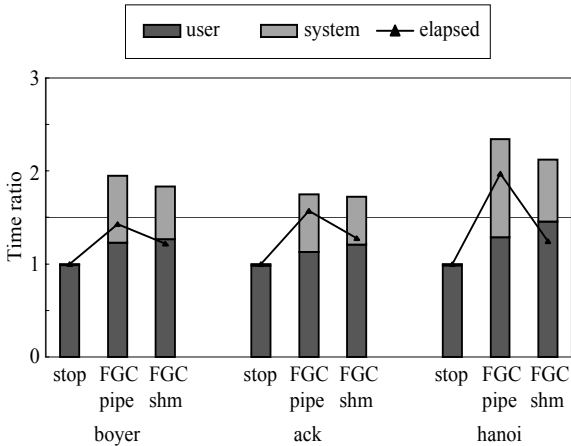


図 4. 停止-回収型と Fork GC の比較(multi CPUs).

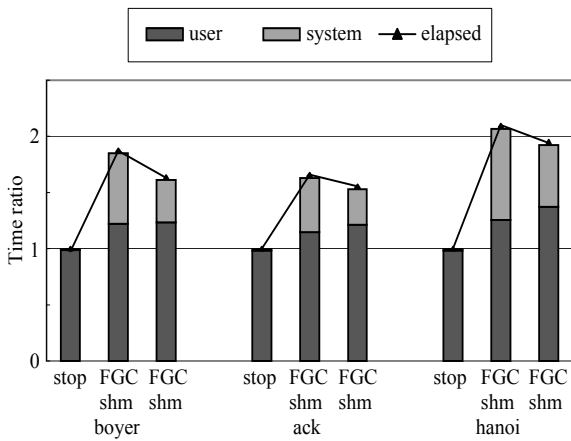


図 5. 停止-回収型と Fork GC の比較(single CPU).

はシングル CPU マシン (表 2) で計測を行った結果である。横軸は各 GC、縦軸は処理時間比である。処理時間が長いほど処理時間比は長くなる。

折れ線は処理経過時間 (elapsed) で、棒グラフはユーザ時間 (user) とシステム時間 (system) を示している。停止-回収型マークスイープ GC (stop) の処理時間を 1 としている。マルチ CPU マシンの場合には、2 プロセッサによるユーザ時間とシステム時間の合計が処理経過時間を上回っているのは、複数のプロセッサによる並列処理のためである。

fork システムコールによるプロセス生成コストや、セルの書き換えによる COW におけるコピー処理のオーバーヘッドにより、停止-回収型よりも並列型 ForkGC の方が処理時間が長くなっている。システム時間が大幅に増えているのは、fork システムコールによるプロセス生成といったカーネルレベルでの処理量が増えたためと考えられる。

ForkGC のユーザ時間が増えているのは、プロセス間通信によるコストのためと考えられる。

また、パイプ型は mutator プロセスによるフリーリストへのゴミセルの追加やパイプによるプロセス

間の非同期通信に時間がかかるため、処理時間全体では共有メモリ型の方が短くなっている。

シングル CPU マシン上でも疑似並列処理による漸次型 GC として動作している。しかし、mutator プロセスと GC プロセスは実際には並列に処理されないため、fork システムコールによるオーバーヘッドやセルの書き換え時の COW におけるコピー処理、パイプ型におけるプロセス間通信の時間分だけ処理時間全体が増えている。そのため、マルチ CPU マシン上よりもシングル CPU マシン上の方が処理経過時間の増加分が大きくなっている。

アッカーマン関数の計算に比べて、ハノイの塔の計算の方が処理経過時間の増加が大きくなっている。これはハノイの塔の計算の方が、GC 処理が多く発生しているためと考えられる。

mutator の停止時間

fork システムコールによる GC プロセス生成時の mutator の停止時間を表 4 (マルチ CPU マシン) および表 5 (シングル CPU マシン) に示す。

停止時間の計測には、現在時刻を取得する gettimeofday 関数を用いている。ForkGC における mutator の停止時間は、fork システムコールを実行してプロセスを生成する間の時間、停止-回収型 GC の場合は、印付けと回収にかかる GC 全体の時間で、単位はミリ秒である。各ベンチマークプログ

表 4. Mutator の停止時間(multiCPUs).

GC の種類	boyer (ms)	ack (ms)	hanoi (ms)
パイプ型	13	13	13
共有メモリ型	13	13	13
停止-回収型	60~100	60	60

表 5. Mutator の停止時間(singleCPU).

GC の種類	boyer (ms)	ack (ms)	hanoi (ms)
パイプ型	6~245	7~467	6~485
共有メモリ型	6~246	7~203	6~232
停止-回収型	45~78	42~46	40~50

ラムに対して 10 回ずつ実行し、ベンチマークプログラムの実行中に行われた各 GC サイクルにおける mutator の停止時間を計測した。

マルチ CPU マシン上での mutator の停止時間は、パイプ型、共有メモリ型の両方の SB 型 Fork GC において一定となっている。この停止時間は、平均の時間であるが、実際にはほぼ一定で、標準偏差は約 0.5 ミリ秒である。停止-回収型マークスイープ GC

における boyer ベンチマークの計算で、mutator の停止時間が変化しているのは、生存セル量が増え、印付けにかかる時間が増加していくためである。

シングル CPU マシン上での Fork GC における mutator の停止時間はかなり変化している。これは、単一プロセッサによる疑似並列処理のためである。fork システムコールの実行後、GC プロセスや全く別のプロセスがディスパッチされる場合があるので、mutator の停止時間は大きく変化する。

通常、Solaris におけるユーザプロセスのスケジューリング方法は、タイムシェアリング方式である。タイムスライス優先度によって変化するが、20 ミリ秒から 200 ミリ秒である。

そのため、mutator が 200 ミリ秒以上停止しているのは、fork システムコールの実行後に、mutator プロセスとは別のプロセスに対してプロセッサが割り当てられているためと考えられる。

Fork GC の場合は、COW におけるコピー動作や、パイプ型 Fork GC の場合の、スイープ時のゴミセルの追加においても mutator の停止が発生するので、この評価だけでは完全な停止時間の評価とはいえない。この評価の範囲では、マルチ CPU マシンにおいての一回あたりの mutator の平均停止時間は、Fork GC の方が短くなっている。

ヒープサイズと mutator の停止時間

マルチ CPU マシン上での、ヒープサイズを変化させた時の、fork システムコールによる mutator の平均停止時間を図 6 に示す。横軸が、ヒープのセルサイズ（セル数）で、縦軸が平均停止時間（ミリ秒）である。停止時間の計測には、パイプ型の Fork GC を使用している。

ヒープサイズを増やすにつれて、mutator の停止時間が線形で増加している。これは、停止時間が、プロセス生成時における仮想メモリ空間のコピーコストに依存するためと考えられる。

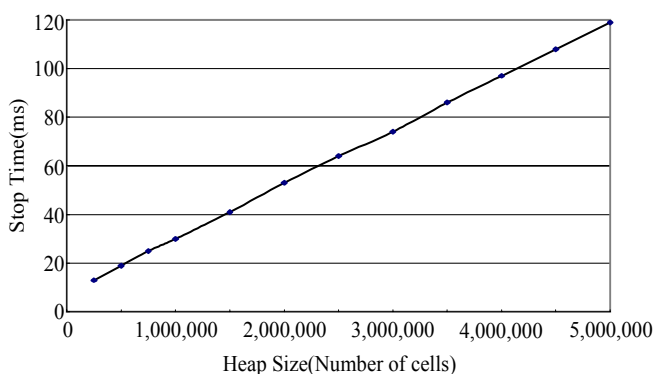


図 6. ヒープサイズと停止時間(multi CPUs).

Fork GC のバリアの問題点

処理時間全体の評価において Fork GC の場合の処理時間が、停止-回収型マークスイープ GC の場合よりも長くなった原因について考察する。

通常、純粋な SB 型並列 GC の場合には、必要なバリアは書き込みバリアだけで、読み込みや生成のバリアは発生しない。しかし Fork GC の場合には、GC の処理中に mutator が cons 関数でセルを生成するとセルが書き換えられ、mutator から GC への COW によるコピー処理が発生する。そのため、書き込みバリアだけではなく生成バリアも発生する。

一般的に実行頻度は、読み込み>生成>>書き込みなので⁸⁾、GC の処理中に mutator によるセルの生成が頻繁に発生し、生成バリアによるコピー処理によって、処理時間が増加していると考えられる。COW によるコピー処理は、カーネルレベルで処理されるため、ユーザ時間よりもシステム時間の方が大幅に増加している。

Fork GC の場合、純粋な SB 型並列 GC のようにセル生成時のバリアをなくすことはできない。したがって、バリアによるオーバーヘッドは、書き込み頻度だけではなく、セル生成の頻度にも依存することになる。Rodrigues-Rivera らが対象とした一般アプリケーションのように、メモリ要求におけるサイズが大きく頻度が小さい場合には大きな問題とならないが、Lisp のように、サイズが小さく頻度が大きい場合には大きなオーバーヘッドとなり、システム全体の処理能力へ影響する。バリアのオーバーヘッドに関しては、この Fork GC は、cons 頻度が小さく、GC のマーキング処理量の小さなアプリケーションでないかぎり、SB 型並列 GC に大きく劣ると考えられる。

結論

fork システムコールを用いることで、Lisp 処理系に実装された一般的な停止-回収型マークスイープ GC を容易に並列型の GC へと変更することができた。シングル CPU マシンにおいても疑似並列処理により動作させることができた。マルチ CPU マシン上での、GC プロセス生成時における mutator の停止時間においては、停止-回収型マークスイープ GC の停止時間よりも短縮することができた。しかし、fork システムコールによるオーバーヘッドは予想以上に大きかったために、Fork GC の処理時間は、停止-回収型の 2 倍から 3 倍となった。

COW におけるコピー処理のオーバーヘッドを減らすためには、Fork GC の処理時間を短くする必要がある。つまり、Fork GC のマーキング処理量を減

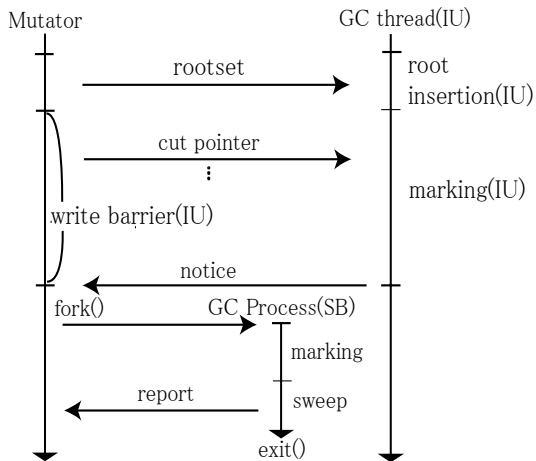


図 7. 相補型 Fork GC.

らせばよい。そのために今後は、相補型 (Complementary) GC^{5,7)} に Fork GC を組み込むことを計画している。

Fork GC を用いた相補型 GC を図 7 に示す。相補型 GC は、IU 型アルゴリズムのルートセット走査と追加の印付けを SB 型アルゴリズムで行う。IU 型でルート挿入と印付けを行った後に、GC プロセスを生成して追加の印付けと回収を行う。IU 型のルート挿入から GC プロセスによる回収までが 1 つの GC サイクルとなる。

IU 型アルゴリズムの問題点は、mutator を停止した状態でルートセットの走査と追加の印付けを行わなければならない点である。この追加の印付けを mutator と並列に実行できれば、mutator の停止時間を予測することが可能になる。

後半の Fork GC による SB 型の印付けは、前半の IU 型の印付け中に書き換えられたセルのための追

加の印付けなので、Fork GC の処理時間は短くなる。また、通常の相補型 GC では IU 型と SB 型の両方の書き込みバリアが必要となるが、Fork GC を用いることで COW におけるコピー処理により、SB 型の書き込みバリアが不要となる。

文献

- 1) Gabriel RP (1985) *Performance and Evaluation of Lisp Systems*. MIT Press, Cambridge.
- 2) Jones R and Lins RD (1996) *Garbage Collection: Algorithms for Automatic Dynamic Memory Management*. John Wiley & Sons, Chichester.
- 3) 佐藤憲一郎, 松井祥悟 (2004) fork システムコールを用いた並列ガーベジコレクション. *情報処理学会第 66 回全国大会講演論文集 (1)*. pp.309-310.
- 4) 藤森 誠 (2002) プロセス生成型ガーベジコレクションの研究. *2001 年度神奈川大学理学部松井研究室卒業研究論文*.
- 5) Matsui S, Tanaka Y, Maeda A and Nakanishi M (1995) Complementary garbage collector. In: *Proc. Int. Workshop on Memory Management, Lecture Notes in Computer Science Vol.986*. Springer-Verlag, Kinross, Scotland. pp.163-177.
- 6) Rodriguez-Rivera G and Russo V (1997) Non-intrusive cloning garbage collection with stock operating system support. *SPE*. **27**: 885-904.
- 7) 松井祥悟, 田中良夫, 前田敦司, 中西正和(1995)相補型ガーベジコレクタ. *情報学論* **36**: 1874-1884.
- 8) 松井祥悟, 田中良夫, 前田敦司, 中西正和(1999)並列ガーベジコレクションの実用化技術. *第 40 回プログラミング・シンポジウム報告集*. pp.159-170.
- 9) Wilson PR (1992) Uniprocessor garbage collection techniques. In: *Proc. Int. Workshop on Memory Management, Lecture Notes in Computer Science No.637*. Springer-Verlag, St.Malo, France. pp.17-32.
- 10) 田中良夫, 松井祥悟, 前田敦司, 中西正和(1995)部分印付けを併用した並列 GC の提案および効率の解析. *信学論(DI)* **J78-D-1**: 926-935.

■原 著■ 2006 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

イオン注入したダイヤモンド半導体の MeV 級イオンビーム照射による 電氣的活性化の研究

— 高品質ダイヤモンド薄膜の形成と評価の研究 (2) —

中田穰治^{1,4} 斎藤保直¹ 川崎克則² 服部俊幸³

Research into Electorical Activation of Ion-implanteed Diamond Semiconductor Using MeV Ion Beam Irradation

— Research into Formation of High-Quality Diamond Epitaxial Thin Layers
on the Diamond Substrates and Evaluation of These Layers (2) —

Jyoji Nakata^{1,4}, Yasunao Saito¹, Katsunori Kawasaki² and Toshiyuki Hattori³

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

² Graduate School of Science and Engineering

³ Research Laboratory of Nuclear Reactor, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo-to, 152-8550, Japan

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

Abstract: We have developed a microwave-plasma CVD apparatus for depositing epitaxial diamond layers on the diamond substrates. We reported in 2006 that high-quality diamond epitaxial layers were successfully deposited on these substrates, however, sharp peaks of points several microns high were also observed by using an Atomic Force Microprobe. We attributed these peaks to carbon nanotubes grown on the diamond substrate, because a high density of contamination atoms for species around iron element was detected by the Rutherford Backscattering analysis on the as-purchased diamond substrates. Therefore, in 2007, we adopted some cleaning processes for the diamond substrate surface before deposition, using acidic liquid. We successfully obtained high-quality diamond epitaxial layers without sharp high peaks, however, we observe a uneven hills. These can be attributed to the very small uneven surfaces of the as-purchased diamond substrates, due to inadequate polishing process at the diamond substrate maker. We are now reexamining the polishing process, including the etching process, to obtain clean and flat surfaces of the as-purchased diamond substrates.

Keywords: microwave plasma, CVD, diamond, epitaxial layer, Hall effect, AFM, surface cleaning process

序論

半導体とは、電気伝導率の高い導体とゴムなどの高抵抗で電気を通さない絶縁体の中間に位置する物質のことであり、その伝導率は温度によって変動する。このような半導体部品材料としてはシリコンが主流として用いられているが、最近では絶縁体といわれているダイヤモンドを半導体として用いる動きも見られる。これは、ダイヤモンドがシリコンに比べて、
・禁制帯が約 5 倍広いので、高温環境下での動作が可能。

・熱伝導率が約 13 倍高いので、大電力動作時に熱を放出しやすい。
・電子ドリフト速度が速いので、デバイスの高速動作が可能。
・絶縁破壊電圧が約 10 倍高いので、高電圧にも耐えられる。
・ホール移動度が高いので、高周波に耐えられる。
という性質を持つことが理由に挙げられる。
当研究室における研究の最終目標は高品質 CVD ダ

イヤモンド薄膜にイオン注入により N 型ドーパントを注入して MeV 級イオン照射により電氣的に活性化することである。N 型電氣的活性化は世界中で 40 年以上の間達成できなかったことである。MeV 級イオン照射により低温で結晶化する現象^{1,2)} (Ion-Beam-Induced Epitaxial Crystallization, IBIEC) は著者が世界で初めて明らかにしたもので、その後世界各地でこの現象が研究され、この現象を説明する各種モデルが提案されてきた³⁻²³⁾。通常の熱処理を熱平衡過程による熱処理とすれば、IBIEC は非熱平衡過程による熱処理であり、それを利用してイオン注入ダイヤモンドを電氣的に活性化できないかと着想した。

本実験では、その前段階としてマイクロ波プラズマ CVD 薄膜形成装置を用いて高品質ダイヤモンド薄膜を形成することを目的としている。また、マグネトロン CVD スパッタ装置を利用して電極を形成し、Au ワイヤの超音波ボンディング装置を利用してホール効果測定を行い、その測定精度を向上させる方法を試行錯誤によって得ることを目的とする。

前年度に当研究室で自作したマイクロ波プラズマ CVD 装置を用いてダイヤモンド薄膜を堆積できたことを報告した。しかし、その際、AFM で観測すると非常に小さな突起が多数表面に成長していることが分かった。これはカーボンナノチューブであることを予想した。というのは薄膜成長前のダイヤモンド基板の表面には鉄、コバルト、ニッケルといったようなナノチューブを成長させる触媒金属の汚染が存在することが分っていたからである²⁴⁾。これら鉄族の元素はダイヤモンド基板を高温高压合成させる際に触媒として用いられる元素であり、それらが基板の表面汚染として残っていることが分った。そこで今年度は CVD 薄膜を堆積させる前の基板洗浄方法や、ホール効果測定を行う際の測定方法改善、ホール効果測定を行うための電極金属堆積方法等、各種実験方法の改善に取り組んだ。

なお本実験では主にダイヤモンド Ib 基板を使用した。ダイヤモンド基板には Ib 基板と IIa 基板がある。2つの基板の違いは基板に含まれている窒素の量で、IIa 基板が窒素を出来る限り取り除いているのに対して、Ib 基板は窒素の含有量が高い。成膜した膜中には N が殆ど含まれていないので、窒素濃度を比較しやすい Ib 基板を使用した。

材料と方法

Ib 基板の問題点

今回使用したダイヤモンド Ib 基板には最初に 2つの問題があった。以下ではその問題点と解決方法を

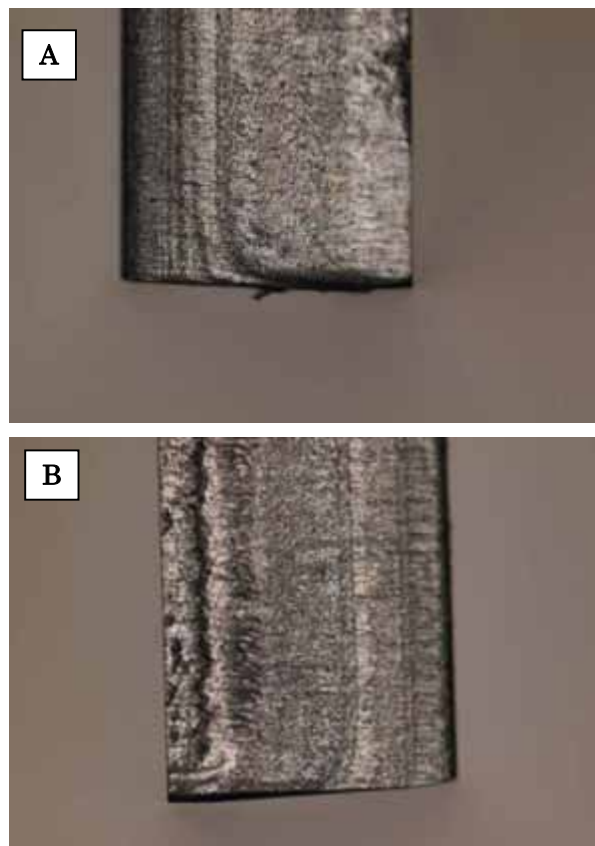


図 1. A. 基板側面(洗浄前). B. 基板側面(洗浄後).

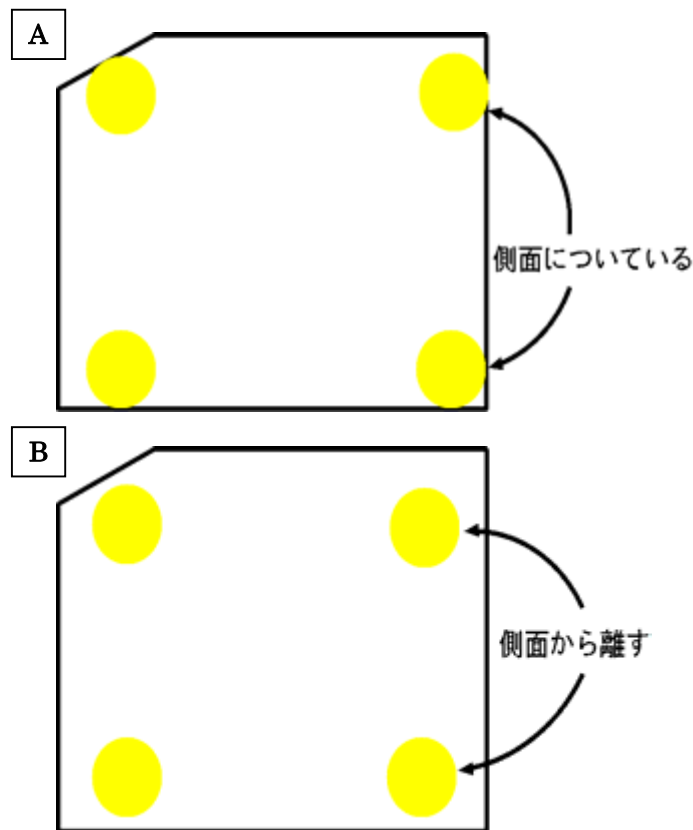


図 2. A. 従来の金スパッタリングによる電極の蒸着. B. 今回の金スパッタリングによる電極の蒸着.

説明していく。

側面の汚染について

絶縁体であるはずのダイヤモンドの Ib 基板に電気が流れてしまっていた。そこで Ib 基板を取り出しテスターを使って抵抗を測ってみると、基板の側面で抵抗が測れてしまうことが分かった。光学顕微鏡で基板の側面を見てみると以下のようにになっていた。以下の方法でこの物質を落とすことを試みた。

- ・酸洗浄 薬品 硫酸：硝酸＝3：1
温度 200 °C
時間 15 分
- ・水素エッチング

2 つの洗浄を試してみたが上の図 1(A)、(B)の通り効果がなかった。そこで金電極の位置を図 2(A)に示す外側ぎりぎりの位置から少し内側にずらし、図 2(B)のように側面を避けることにした。

表面の汚染について

Ib 基板の表面を光学顕微鏡で見ると、図 3 (A)のように汚染されていることが分かった。

そこで以下の方法でこの汚染物質を落とすことを試みたところ、図 3(B)のようなきれいな Ib 基板となった。

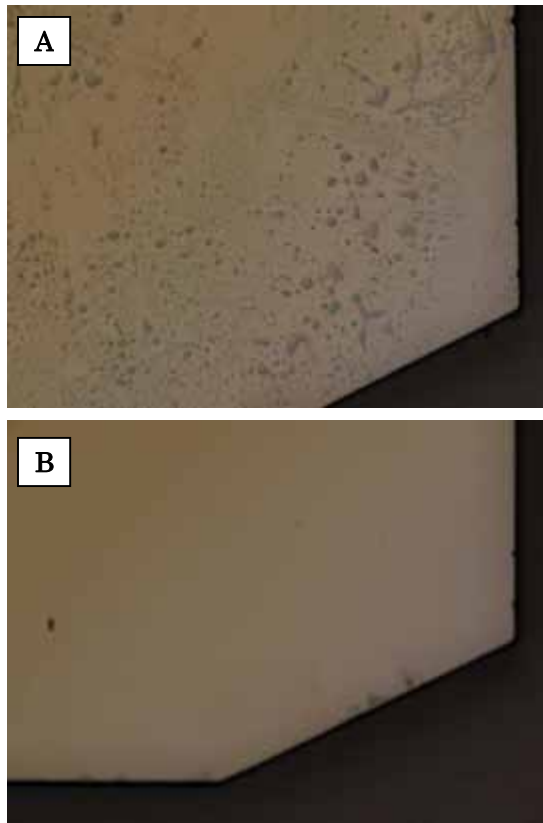


図 3. A. 基板表面(洗浄前). B. 基板表面(洗浄後).

・アルカリ洗浄

- 薬品 アンモニア水：過酸化水素水：純水
＝1：1：5
- 温度 80 °C
- 時間 10 分間

この洗浄方法は有機物やパーティクルを取り除く洗浄方法である。こうして上記の汚染は有機物であることがわかった。次に上記の洗浄したダイヤモンド Ib 基板にマイクロ波プラズマ CVD 法でダイヤモンド薄膜を形成する。

マグネトロン CVD スパッタ装置による電極形成

ホール効果測定装置で電気的特性を調べるために、ダイヤモンド薄膜を成長させた基板上に、マグネトロン CVD スパッタ装置で電極を形成する。この際に、昨年度は Au、PtRh、Ti の 3 金属をスパッタしていた。それぞれには以下の役割がある。

Au：金ワイヤーとの接続。

PtRh：Ti の酸化を防ぎ、Au と Ti の合金化を防ぐ。

Ti：ダイヤモンド試料とのオーミックコンタクトを取る。

昨年度は超音波ボンディング装置に不具合があったため、ボンディングはせずに、直接試料をホール効果測定装置の電極に取り付けていた。我々はボンディング出来なかった原因として試料の電極膜側に問題があるのではないかと考えた。

まず、Si 基板上に、Au、PtRh、Ti を昨年度と同じ条件でスパッタし、これにボンディングを試みた。やはり、ボンディングの成功率は低く、実際に実験での使用は困難であった。このボンディング失敗部分を光学顕微鏡で観察すると、図 4 のように PtRh/Ti 面で膜が剥がれている事が分かった。

この事から、昨年度ボンディングがうまくいかなかった原因として PtRh/Ti 面の強度に問題があると予想できる。

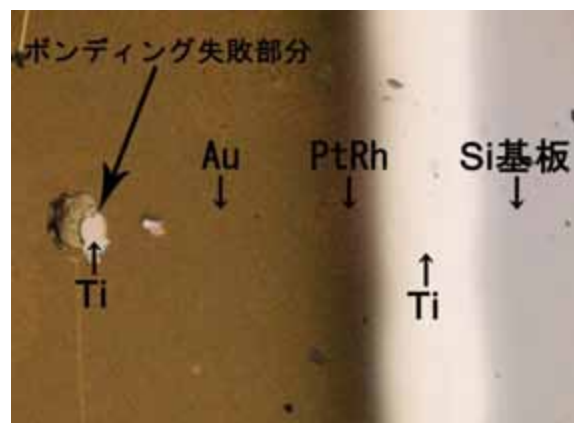


図 4. ボンディング失敗部分の顕微鏡写真.

産総研の実績ではオーミックコンタクトを測定する試料の電極膜の形成にはAu/Pt/Tiの3金属を使用していたが、本実験ではPtではなく当研究室にあったPtRh（白金ロジウム）という合金を使用したため、問題が発生したと考えられる（図5A参照）。

PtやPtRhには、Tiの酸化を防ぎ、Auとの合金化を防ぐ働きがあるが、当研究室にはPtRhしかなく、これをPtの代用として使用出来ない事が今回の調べで分かった。

これにより、今年度は図5Bのように、PtRhをはずし、Au、Tiの2金属をスパッタ蒸着した。これにより、ボンディングの成功率は高くなり、ホール効果測定に使用出来るようになった。

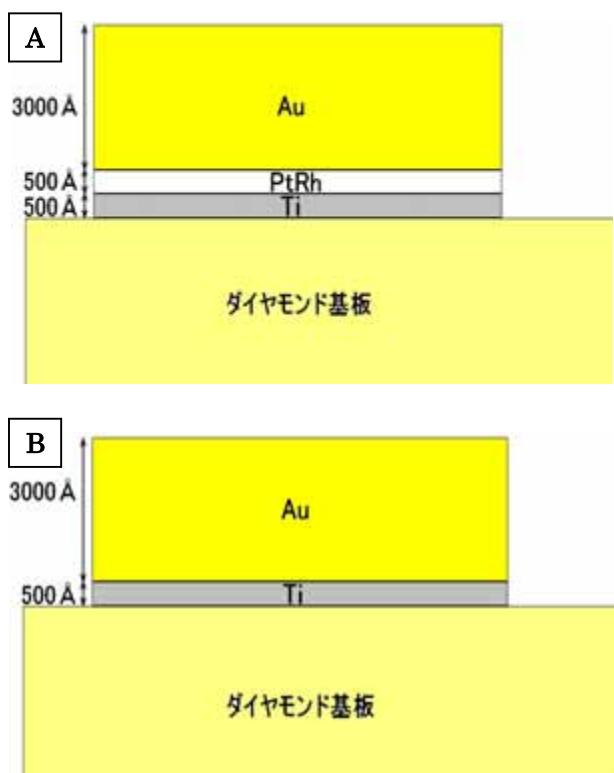


図5. A. 昨年度の電極膜の構成要素. B. 今年度の電極膜の構成要素.

超音波ボンディング装置

金をスパッタリングで蒸着した後、金ワイヤーを付けるために使用するのがボンディング装置である。装置は図6のようにになっている。

溶接する電極金属と同じ材質のワイヤーを上におき、これに上から静圧を加えながら面に平行方向に超音波振動を与える。すると薄膜とワイヤーとの境界面で摩擦が起こり、その摩擦熱によって金属の融点近くまで温度が上がり、溶接する。

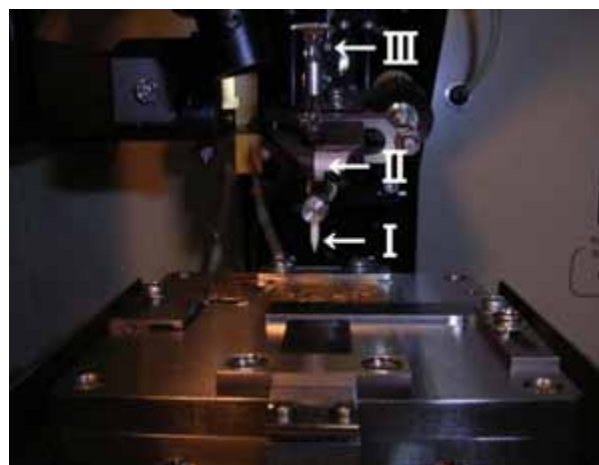


図6. ボンディングアーム部. I:キャピラリ, II:ワイヤクランプ, III:ワイヤガイド.

設定条件が適正だとして熔融温度範囲が広い金属の温度を測定してみると、溶接時の最高温度はその金属の融点の35%~50%を示している。溶接面では薄膜とワイヤーが拡散しあっている、それがどこまで温度によるものでどこまで機械的振動によるものかはっきりしたことはまだいえない。超音波が弱すぎてももちろんいけないが、強すぎたり時間を長くかけすぎたり静圧をかけすぎてもかえってちぎれてしまう。

ホール効果測定装置

半導体のホール効果を測定すれば、半導体にとって重要な電気物性であるホール係数、キャリア濃度、キャリア移動度、シート抵抗の値などを知ることが出来る。また、測定する試料の温度を変化させることによって、それらの温度依存性も測定することが可能である。昨年の卒業研究で行ったホール効果測定方法から変更した点とその理由を解説する。

※ホール効果の基本的な原理、ホール効果測定装置の使用法など昨年度の発表内容と重複する部分は省略する。

試料の固定方法の変更

図7に示すように以下の変更を行った。

昨年：試料を金属製のつめでサンプルホルダーに固定し、測定。

今年：スパッタによって取り付けられた電極部分にAuワイヤーを超音波ボンディングし、Tiねじに巻きつける固定方法に変更。

これにより、ホール効果の安定した測定が可能になった。

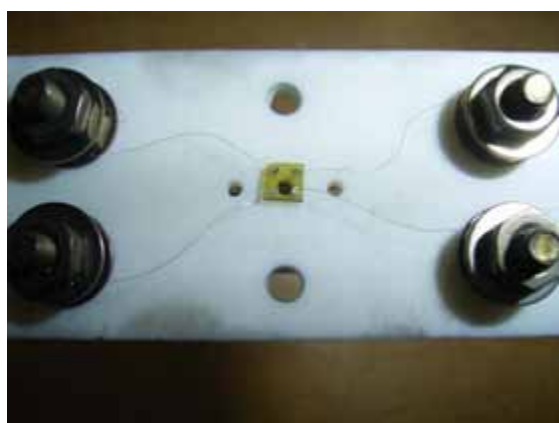


図 7. 基板をホール効果測定装置のホルダーへ取り付けた写真(上: 昨年, 下: 今年).

サンプルホルダーの洗浄

ホルダーに使用している Ti ねじがカーボンで黒く汚染されており、高温で測定した結果サンプルホルダーやダイヤモンド基板がグラファイトに汚染されてしまった。これでは正常に測定出来ないの以下手順で洗浄した。

- 1) 硫酸 H_2SO_4 :硝酸 $\text{HNO}_3=3:1$ の割合で混合し、 200°C まで熱する。
- 2) サンプルホルダー等を投入し、15 分間洗浄する。
- 3) 15 分たったら取り出し、純水で超音波洗浄した後乾燥させる。

測定時の設定変更

昨年: 測定の温度範囲 $50^\circ\text{C}\sim 800^\circ\text{C}$

電流値 最大 $1.000\text{e-}09\text{ A}$

最小 $1.000\text{e-}12\text{ A}$

800°C まで一回で測定を行うと、 500°C 以上はオーミックコンタクトが取れず、正常な測定をしていなかった。そこで今年はオーミックコンタクトを測定するために温度設定を 2 つ以上に分け、温度範囲によって電流設定を変えて測定を行い、測定後に各グラフを合成するという方法を取った。これは、ダイヤモンドの抵抗値が温度上昇によって下降するため

である。これにより、 500°C 以上でもオーミックコンタクトが取れていることが確認できた。

※オーミックコンタクトとは、抵抗値が一定の場合オームの法則 $I \times R = E$ により電圧と電流は比例する状態を指している。

結果

ダイヤモンド薄膜の形成と評価

AFM による表面モフォロジー観察

ダイヤモンドを半導体デバイスとして用いるには、ダイヤモンド基板上に高品質のダイヤモンド薄膜を得る必要がある。本実験では、マイクロ波プラズマ CVD 法によりダイヤモンド基板にダイヤモンド薄膜を形成し、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてその表面評価を行った。今年度のマイクロ波 CVD 法によるダイヤモンド薄膜形成条件は表 1 の通りである。

ダイヤモンド薄膜を形成する前の基板表面を AFM で測定すると図 8A のようにほぼ平面であることが分る。この基板上に表 1 で記した条件で 10 時間、あるいは 30 時間ダイヤモンド薄膜を成長させると図 8C、図 8D のようになった。昨年度、同一条件下で成長させたダイヤモンド薄膜の AFM による像を図 8B に示す。昨年度はピークの高さが $0.6\ \mu\text{m}$ にも及ぶ、鋭い突起が観測されたが、今年は観測されなかった。この突起の原因について昨年度は成長ダイヤモンド薄膜の上にさらにカーボンナノチューブが形成されたのではないかと推測した²⁴⁾。

xx ナノチューブはその名の通り直径が数ナノメートルから数十ナノメートルの間まで多種ある。上記の正方形の 1 辺の長さは $20\ \mu\text{m}$ なので、これらピークの直径は見かけ上直径はコンマ数 μm から $2\sim 3\ \mu\text{m}$ であるように見える。しかし、これは AFM の探針の直径を考慮に入れることによりナノメートル

表 1. マイクロ波 CVD 法の薄膜形成の条件

	Ib 基板 No.6	Ib 基板 No.15
成膜時間	10 時間	30 時間
メタン濃度	0.05 %	0.05 %
水素流量	400 sccm	400 sccm
メタン流量	0.2 sccm	0.2 sccm
マイクロ波電力	750 W	750 W
圧力	25 Torr	25 Torr
基板温度 (設定温度)	1073 K	1073 K

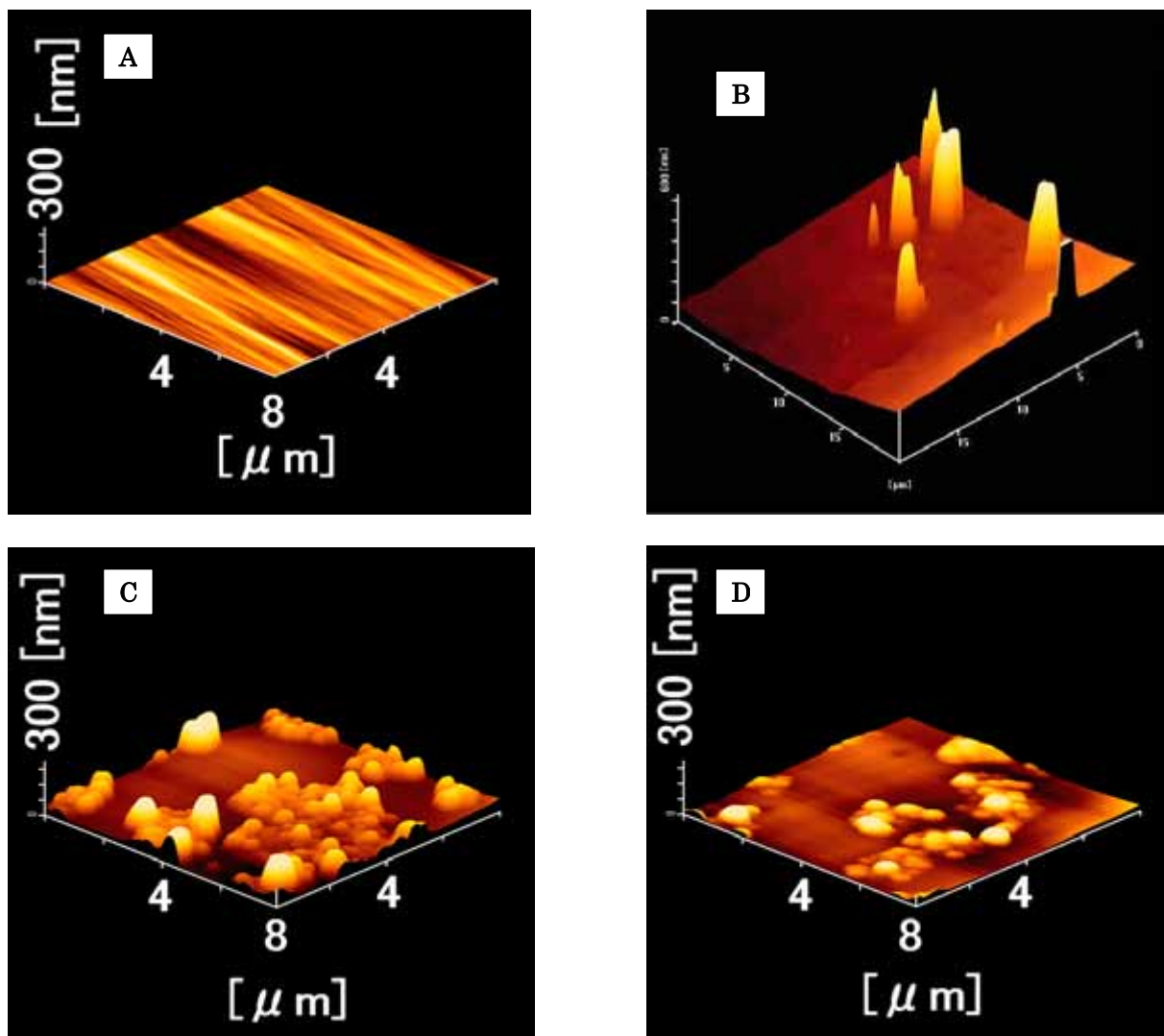


図 8. A. 成膜前の基板表面. B. 昨年度 10 時間成長. C. 今年度 10 時間成長. D. 今年度 30 時間成長.

の分解能が出ていないためと解釈できる。また、昨年度 RBS-channeling 法により測定した結果を報告したように、購入した直後の薬品洗浄していない試料のダイヤモンド基板表面には鉄、コバルト、ニッケルといった鉄系の金属が多数付着している。これらはカーボンナノチューブを形成するための触媒金属としてよく知られている。これらを核としてカーボンナノチューブが成長したのではないかと類推した。

今年度、10 時間成長試料も 30 時間成長試料も大きさは異なるが凹凸が生まれた。しかし、30 時間の凹凸の程度は 10 時間成長よりも小さい。堆積した基板は前もって酸、アルカリによる洗浄を行っており、表面に付着している金属系汚染物や有機系汚染物を取り除いている。従って、これら堆積後の凹凸の原因は元々の基板表面（図 8A に示されている）の凹凸がかなり残留していることによるものと思われる。図 8A では見えていない残留している凹凸が、

堆積するにつれ凹凸の程度が拡大していくと思われる。今後基板表面をさらに細かく研磨するか、或いはイオン注入により表面をグラファイト化し、グラファイト層をエッチングにより削り、表面の凹凸を減らさなければならない。エッチングによる滑らかな表面析出方法を現在検討中である。

2. ラマン分光測定による評価

これら図 8A, B, C に対応した試料についてラマン分光測定を行った結果を図 9 に示す。いずれにおいてもダイヤモンドの鋭いピークが観測されており、表面の凹凸の問題は残るものの、確実にダイヤモンドの薄膜が成長していることが確認できた。

Ib 基板のホール効果測定による評価

ホール効果測定装置による測定結果から Ib 基板のシート抵抗の基板温度依存性は図 10 のグラフのようになった。青が神奈川大学における測定結果であ

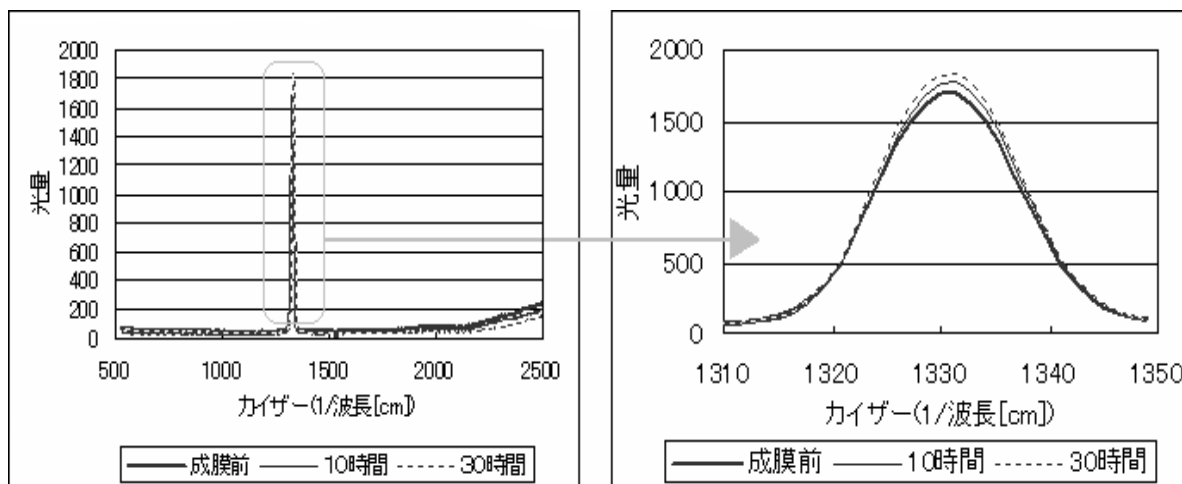


図9. 成長前、10 時間成長、30 時間成長試料のラマンスペクトルの測定結果(左)とその拡大図(右).

り、赤と黄色が産総研での測定結果である。神奈川大学の結果の方が産総研より傾きが大きい。

この青のグラフから活性化エネルギーを求めてみる。

$$\frac{y_1}{y_2} = e^{-\frac{E}{k} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)}$$

この式に神奈川大学での測定結果を代入すると活性化エネルギーは 1.7 eV になった。

さらに、図 10B には伝導層の厚さを 1 μm と仮定した時のシートキャリア濃度の測定温度依存性を示す。図 10 から温度が高くなるとシート抵抗が下がるということはシートキャリア濃度が増加することに対応し、実際に図 10B に示すように温度依存性は図 10A とは逆の傾向になっている。

次の図 10C には図 10B における神奈川大学における測定データの内、低温領域での直線的データを抜き出したものである。これから活性化エネルギーを求めた結果やはり 1.7 eV になることが確認できた。

討論

AFM による観察結果から

図 8A に示すように AFM の測定結果から堆積前の基板表面の凹凸は殆どないように思える。しかし、図 8B の 10 時間堆積 ($\sim 0.7\mu\text{m}$) 図 8C の 30 時間堆積 ($\sim 2.1\mu\text{m}$) の試料は表面に凹凸が観測される。堆積した基板試料はともに同様な洗浄処理を行っている。しかも、30 時間堆積のほうが、10 時間堆積よりも凹凸の程度ははるかに小さい。このことから、堆積以前に基板表面に付着している何らかの汚染物質がこれら凹凸の生成に関与している可能性は無いと思われる。同様な基板洗浄処理を行っており、本来なら堆積厚さが大きくなるほど凹凸の程度は大き

くなると予想されるからである。

そこで次に考えられる凹凸の原因であるが、おそらく、堆積前の基板表面の極微細な凹凸が堆積後の凹凸の原因になっているのではないかとと思われる。即ち、30 時間堆積した試料の元々の凹凸が 10 時間堆積した試料の元々の凹凸よりも小さかったのではないかと予想している。これら小さな基板の凹凸が堆積時に拡大されていくのではないかと考えられる。

従って、最初に購入した高温高压合成ダイヤモンド基板の表面の凹凸処理が、きちんと出来ていないと再現性ある堆積膜の品質維持が出来ないことになる。今後、これら、購入基板表面の再研磨或いはイオン注入によりダイヤモンド表面をグラファイト化した後にエッチングを行い、滑らかな清浄表面を露出させるといったような工夫が必要になる。

ラマン分光測定の結果から

今回、図 8A, B, C に対応した試料のラマン分光測定の結果が図 9 に示されている。いずれのスペクトルも 1333 cm^{-1} の位置に鋭いピークが観測されている。しかも、堆積前基板試料、10 時間堆積試料、30 時間堆積試料の順にピーク強度が強くなっていく傾向にあることが分る。このことは基板試料よりも不純物が少ない、結晶性の良いダイヤモンド薄膜試料が、表面凹凸の問題はあるが、形成されていることを伺わせる。

ホール効果測定結果から

図 10A に示しているように、今年度のホール効果測定の結果、シート抵抗は低温領域で活性化エネルギーが 1.7 eV の急激な傾きを持っており、高温領域ではシート抵抗値が飽和する結果となっている。この傾向は図 10B に示すシートキャリア濃度の測定温度依存性のグラフからも言える。図 10C のシート

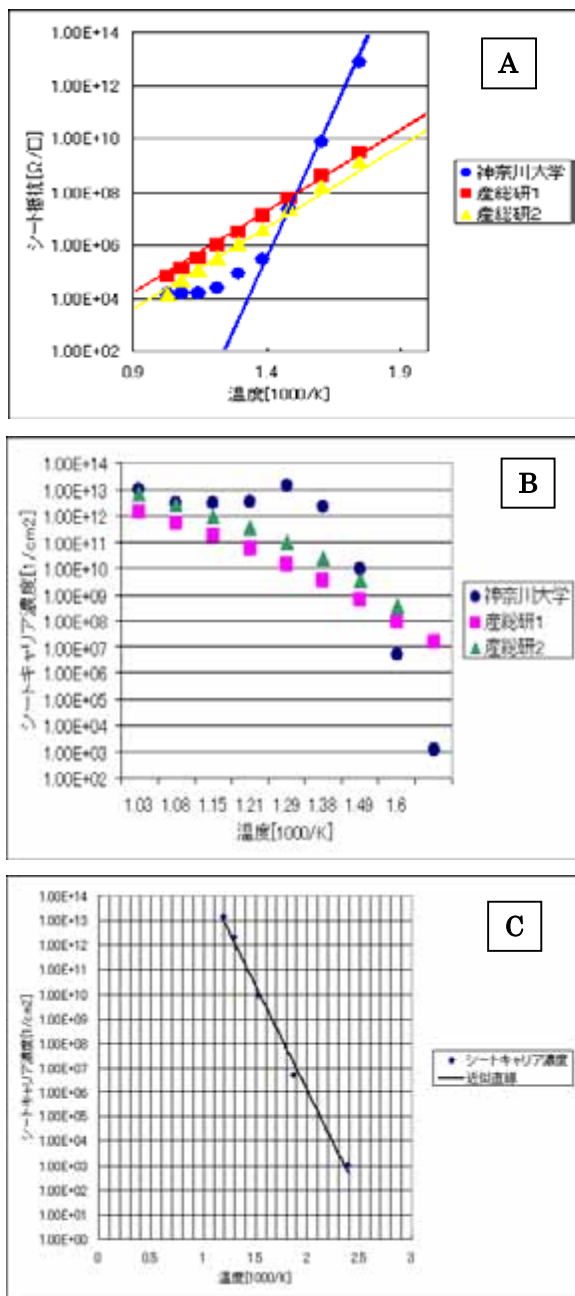


図 10. A. Ib 基板のシート抵抗の基板温度依存性. B. Ib 基板のシートキャリア濃度の基板温度依存性. C. 図 10B の低温領域を抜き出したグラフ.

キャリア濃度の傾きから求めた活性化エネルギーも 1.7 eV の値であった。この活性化エネルギーの値はダイヤモンド中に含まれる窒素原子のドナーとしての不純物準位、即ち伝導帯から下に 1.7 eV 下がったところに形成するドナー準位と考えられる。温度が上昇するにつれ、置換位置に入っている窒素ドナーの電子が伝導帯に上げられる過程が一直線の温度領域で起こっていることを示している。

しかし、さらに高温になって飽和傾向がでてくるということは別の伝導機構がその高温領域で働いていることを強く示唆している。まだ、結論付けるのは尚早であるが、置換位置にある窒素原子がそのド

ナー電子をすべて伝導帯に上げてしまい、金属的な振る舞いが出てきているのではないかと考えられる。しかし、これらの飽和傾向が出てきている温度領域では実験方法の項でも述べたように、オーミック特性を得るためにホール電流の値を変更していることもあるので、そのことの影響が有るのか、無いのかも含めて確認する必要がある。

更に、ここでは述べていないが、ホール効果測定の際に p, n 判定がうまく出来ていないこともあり、測定上の問題点をさらに克服していく必要がある。

まとめ

ダイヤモンド薄膜を 10 時間または 30 時間成長させたが、いずれの場合も大きさは異なるが凹凸が形成された。基板洗浄を行い基板表面に付着した不純物を取り除いたにも関わらず凹凸が形成されたことから、この原因は基板表面自身の微細な凹凸であると考えられる。今後より平坦な薄膜形成を目指すならば、基板表面の研磨により凹凸を減らさなければならない。また、マイクロ波プラズマ CVD 薄膜形成装置のプラズマに磁界をかけることにより高密度なプラズマを得られ、より高い出力のプラズマ形成と同等の効果が得られると考えられる。これら二つの課題を解決することによって、より高品質のダイヤモンド薄膜が得られると考えている。

また、2006 年 3 月に本実験室に設置された中電流型イオン注入装置を用いることによって、完成したダイヤモンド薄膜に III 族原子や V 族原子を注入することでダイヤモンドの電気的特性を変化させることも可能となる。

本実験では、2005 年度から多くの点を変更した。まず、ダイヤモンド基板やホール効果測定装置のホルダーの酸洗浄、アルカリ洗浄の手順を確立した。次に、マグネトロン CVD スパッタ法によってダイヤモンド基板表面に形成される電極膜の構成を Au/PtRh/Ti から Au/Ti に変更。これにより Au ワイヤの超音波ボンディングが可能となった。この超音波ボンディングした Au ワイヤを用いたことに加えて、試行錯誤の末にホール効果測定の条件を導き、変更したことによってホール効果測定の精度は昨年よりも上昇した。

以上のような変更を加えたことにより、実験全体の手順の確立や精度の向上を行うことが出来た。

謝辞

今回、この実験を遂行するに当たり、ホール効果測定装置をはじめとする各種治具の洗浄のために、化学科学生実験室のクリーンベンチを使用させて頂い

た。また、イオン注入装置のための冷却水、或いはホール効果測定装置のための冷却水に使用するために純水供給を化学科から受けた。感謝致します。

文献

- 1) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temperature recrystallization of amorphous silicon by high-energy ion beam. *Appl. Phys. Lett.* **40**:686.
- 2) Nakata J and Kajiyama K (1982) Novel low-temperature (<300°C) annealing of amorphous Si by scanned high-energy (2.5 MeV) heavy ion beam. *Jpn. J. Appl. Phys.* **21**:211.
- 3) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam-induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon. *Materials Research Reports* **5**:319.
- 4) Linnros J, Svensson B and Holmen G (1984) Ion-beam-induced epitaxial regrowth of amorphous layers in silicon on sapphire. *Phys. Rev.* **B30**:3629.
- 5) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1985) Proportionality between ion-beam induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev.* **B32**:2770.
- 6) Williams JS, Elliman RG, Brown WL, Seidel TE (1985) Beam induced crystallization of amorphous silicon. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **37**:127.
- 7) Svensson B, Linnros J and Holmen G (1983) Ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum & Methods* **209/210**:755-760.
- 8) Linnros J, Holmen G and Svensson B (1984) Influence of energy transfer in nuclear collisions on the ion beam annealing of amorphous layers in silicon. *Appl. Phys. Lett.* **45**(10):1116-1118.
- 9) Elliman RG, Johnson ST, Pogany AP and Williams JS (1985) Ion beam induced epitaxial crystallization of silicon. *Nucl. Instrum & Methods* **B7/8**:310-315.
- 10) Williams JS, Brown WL, Elliman RG, Knoell RV, Mahr DM and Seidel TD (1985) The kinetics and microstructure of ion beam induced crystallization of silicon. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **74**:477.
- 11) Linnros J, Elliman RG and Brown WL (1987) The composition between ion beam induced epitaxial crystallization and amorphization in silicon; The role of the divacancy. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **74**:477.
- 12) Heera V (1996) Comment on 'Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt high-energy heavy ion-beam irradiation'. *J. Appl. Phys.* **80**:4235-4236.
- 13) Kinomura A, Williams JS and Fujii K (1999) Mass effects on regrowth rates and activation energies of solid-phase epitaxy induced by ion beams in silicon. *Phys. Rev.* **B59**:15214-15224.
- 14) Williams JS, Elliman RG, Brown WL and Seidel TE (1985) Dominant Influence of beam-induced interface rearrangement on solid-phase epitaxial crystallization of silicon. *Phys. Rev. Lett.* **55**:1482-1485.
- 15) Priolo F and Rimini E (1990) Ion-beam induced epitaxial regrowth of amorphous layers in silicon on sapphire. *Mater. Sci. Rep.* **5**:319.
- 16) Linnros J, Svensson B and Holmen G (1984) Proportionality between ion-beam induced epitaxial regrowth in silicon and nuclear energy deposition. *Phys. Rev.* **B30**:3629.
- 17) Elliman RG, Williams JS, Brown WL, Leiberich A, Maher DM and Knoell RV (1983) Ion-beam induced annealing of radiation damage in silicon on sapphire. *Nucl. Instrum & Methods* **19/20**:755-760.
- 18) Jackson KA (1988) A defect model for ion-induced crystallization and amorphization. *Mater. Res.* **3**(6):1218.
- 19) Heera V, Henkel T, Kglar R and Skorupa W (1995) Evidence for diffusion-limited kinetics of ion-beam-induced epitaxial crystallization in silicon. *Phys. Rev.* **B52**:15776.
- 20) Nakata J (1991) Mechanism of low-temperature crystallization and amorphization of amorphous Si layer on the crystalline Si substrate by high-energy heavy-ion beam irradiation. *Phys. Rev.* **B43**:14643.
- 21) Nakata J (1996) Evidence of enhanced epitaxial crystallization at low temperature by inelastic electronic scattering of mega-electron-volt heavy-ion beam irradiation. *J. Appl. Phys.* **79**(2): 682.
- 22) Nakata J (1997) Enhanced crystallization of amorphous silicon containing hydrogen without oxygen during ion-beam irradiation at 310°C and during furnace annealing at 450°C. *J. Appl. Phys.* **82**(11):5433.
- 23) Nakata J (1999) Annealing of ion-implanted defects in diamond by MeV ion-beam irradiation. *Phys. Rev.* **B60**:2747.
- 24) Nakata J, Saito Y, Kawasaki K and Hattori T (2006) Research for Formation of High-Quality Diamond Epitaxial Thin Layers on the Diamond Substrates and Evaluation of These Layers. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **17**:63-75.

■原 著■

水ストレスで誘導されるアイスプラントの葉組織および細胞の微細構造変化

早津 学¹ 鈴木季直^{1,2}

Water Stress-induced Ultrastructural Changes of Leaf tissues and Cells in the Ice Plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L.

Manabu Hayatsu¹, and Suechika Suzuki^{1,2}

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

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

Abstract: A facultative halophyte ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L., switches over from C₃ photosynthesis to Crassulacean acid metabolism (CAM) under environmental stress, such as water stress (osmotic stress or ionic stress). The ultrastructural changes of tissues and cells during the metabolic switch were examined in common ice plants cultured hydroponically with 400 mM NaCl. To define the stress-induced metabolic switch, the concentration of malate was measured in well expanded green leaves kept in the light and dark. The concentration was significantly higher in leaves kept in the dark than in the light, indicating CAM induction by water stress in the ice plant. The leaves of stress-induced CAM plants and unstressed plants were fixed chemically by conventional methods, and ultrathin sections were examined with a light microscope and an electron microscope. In contrast with those found in unstressed plants, in stress-induced CAM plants, epidermal bladder cells were well developed, mesophyll cells changed to small and round in shape, and the intercellular spaces became remarkably narrow. These changes may be caused directly by water stress. Furthermore, in mesophyll cells, the chloroplasts contained conspicuously swelled thylakoids and a few small starch grains. These structural changes in chloroplasts may reflect the metabolic switch induced by water stress.

Keywords: ice plant, water stress-induced ultrastructural change, Crassulacean acid metabolism, epidermal bladder cell, mesophyll cell

序論

植物は、高温の乾燥地や砂漠などでは、土壌が乾燥してくると土壌中の塩濃度が上昇し、浸透圧上昇により根からの水分吸収量が低下するため、植物全体への水分供給量が低下し、よく成長することができない。しかし、そのようなストレス下にあっても、その環境に適応して成長でき、かつ特殊な光合成経路を発達させた植物があり、それらは CAM (Crassulacean Acid Metabolism) 植物と呼ばれている。

一般的な CAM 植物は、気温が下がる夜間に気孔を開いて CO₂ を取り込んでリンゴ酸として固定し¹⁻³⁾、液胞内に蓄えておき、高温で乾燥した昼間に気孔を閉じて水分の蒸散を抑えながら、蓄えたリンゴ酸を脱炭酸して CO₂ にし、再度、カルビン-ベンソン回

路で固定し、糖やデンプンに合成する^{4,5)}。しかし、この光合成経路では、前段階で、リンゴ酸を液胞中に蓄えておくためにエネルギーを消費するので、同じ量の CO₂ を糖に変換する時、より多くのエネルギーを必要とし、その結果、水分が十分にある状況下でも、その成長速度は C₃ 植物に比べて遅くなる。この CAM 型光合成の欠点を回避し、幅広い環境変化に適応して C₃ 型光合成と CAM 型光合成の双方を使い分ける光合成経路を持つ植物があり、塩生植物のアイスプラント (common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* L.) はその一つである。

アイスプラントは、水分が十分に供給されている間は C₃ 型光合成を行い、乾燥などの環境ストレスを受けると CAM 型光合成へと変換することが知られ

ている⁶⁾。このアイスプラントにおける光合成経路の変換に関連した酵素活性の変化や浸透圧調節に関する研究は数多くなされている^{7,8)}が、これに伴う微細構造変化を明らかにしようとする試みはあまりなされていない。本研究では、アイスプラントを高濃度の NaCl 溶液で水耕栽培することにより植物にストレスを与え、誘導される CAM 型光合成に伴う葉の組織変化と葉肉細胞の微細構造変化について、光学顕微鏡と電子顕微鏡による観察を行った。

材料と方法

水ストレスを与える実験には、ピートモス、バーミキュライト、パールライトからなる土壌で種子から発芽し、成長 4 週間後のアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) を用いた。1ℓの蒸留水に、0.606 g KNO₃、0.657 g Ca(NO₃)₂、0.115 g NH₄H₂PO₄、0.241 g MgSO₄·7H₂O、0.00286 g H₃BO₃、0.00181 g MnCl₂·4H₂O、0.00008 g CuSO₄·5H₂O、0.00022 g ZnSO₄·7H₂O、0.005 g FeCl₂ を完全に溶かし、その後、pH が 8.0 になるように 1N NaOH を加えてホーグランド液を調整した。この液を標準の培養液として水耕栽培した植物を対照群とした。一方、ホーグランド液にさらに NaCl を溶かし、400 mM にした高塩濃度溶液を調整し、この液で水耕栽培した植物を実験群とした。水耕栽培 7 日後に CAM 型光合成への変換を確認するためにそれぞれの植物をさらに二群に分け、一方を明所、他方を暗所に移し、12 時間後に葉を切り取り、蒸留水中でホモジェナイザーを用いて葉細胞を破碎し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で葉内リンゴ酸濃度を測定した。また、CAM 型光合成からの回復を確認するために、実験群の一部を標準培養液に移し、さらに 7 日間水耕栽培した。水耕栽培の期間中、溶液のエアレーションを行い、各溶液は 2 日に一回新しい溶液に交換した。

水耕栽培 7 日後の植物、および回復期間後の植物の葉を採取し、葉脈方向が長辺となる約 1×4 mm² の長方形葉片を切り取り、蒸留水を入れた試料ビンに入れ、水流アスピレーターを用いて脱気した。試料が液底に沈んだ後、蒸留水を抜き取り、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH7.2) で希釈した 6% グルタルアルデヒド (以下 GA) 液に浸漬し、室温下で 1 時間、4℃ 下で 23 時間前固定した。GA 液で固定した後、0.1 M 燐酸緩衝液 (pH7.2) で洗浄し、蒸留水で希釈した 2% 四酸化オスミウム (以下 OsO₄) 液と交換し、室温下で 1 時間、4℃ 下で 23 時間、後固定した。固定試料は、アセトン系列で脱水し、更に Epoxy 樹脂に包埋し、40℃ 下で 24 時間、60℃ 下で 24 時間熱重合

した。樹脂包埋ブロックの試料まわりを剃刀でトリミングした後、ウルトラマイクロトーム (Reichert Ultracut-N) で組織観察のための厚さ 90 μm の切片を作製した。切片をスライドガラスに載せ、加温乾燥し、トルイジンブルーで加温染色した後、光学顕微鏡で観察した。一方、同じ樹脂包埋ブロックから、ウルトラマイクロトームで厚さ 70 nm の超薄切片を作製し、コロジオン膜を張った Cu-150 メッシュに載せ、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX、JEOL JEM1230) で観察した。

結果

水ストレスで誘導される代謝変換と葉内リンゴ酸濃度変化

水耕栽培後、対照群植物は、茎は太く、葉も縦横に幅広く成長していた。一方、実験群植物は、対照群植物に比べて生長速度が遅く、茎は細く、葉面積も小さかった。しかし、葉や茎の表面は凹凸が顕著になり、水泡様の多数の突起が形成されていた。高塩濃度溶液で水耕栽培した植物が、ストレスにより CAM 型光合成へ変換されたか否かを確認するために対照群植物と実験群植物をそれぞれ二群に分け、明所と暗所に置いた後、葉のリンゴ酸濃度の測定を行った。その結果、対照群植物では、葉に含まれるリンゴ酸の濃度は、明所に置いた植物と暗所に置いた植物でほぼ同じであった (表 1)。一方、ストレスが加えられた実験群植物では、葉に含まれるリンゴ酸濃度は明暗で大きく異なり、暗所に置いた植物の濃度は明所に置いた植物の約 3 倍高い値を示し、光合成経路の変換が認められた。

表 1. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるアイスプラント葉のリンゴ酸の測定結果

	対照群	実験群
明所	12 mM	6 mM
暗所	13 mM	17 mM

葉の組織と細胞の微細構造観察

図 1 は、光学顕微鏡による対照群と実験群の葉の横断切片像を示している。対照群植物の葉肉細胞は大きく、不定形であり、細胞内の殆どが液胞で占められており、細胞膜に沿って薄い層をなす細胞質基質内に多くの葉緑体が分布していた (図 1A)。また、細胞間には大きな間隙空間が認められた。一方、実験群植物の葉肉細胞は、液胞や葉緑体の細胞内分布で対照群と大きな差は示さなかったが、その殆どが対照群植物の葉肉細胞に比べて小さく、ほぼ楕円形

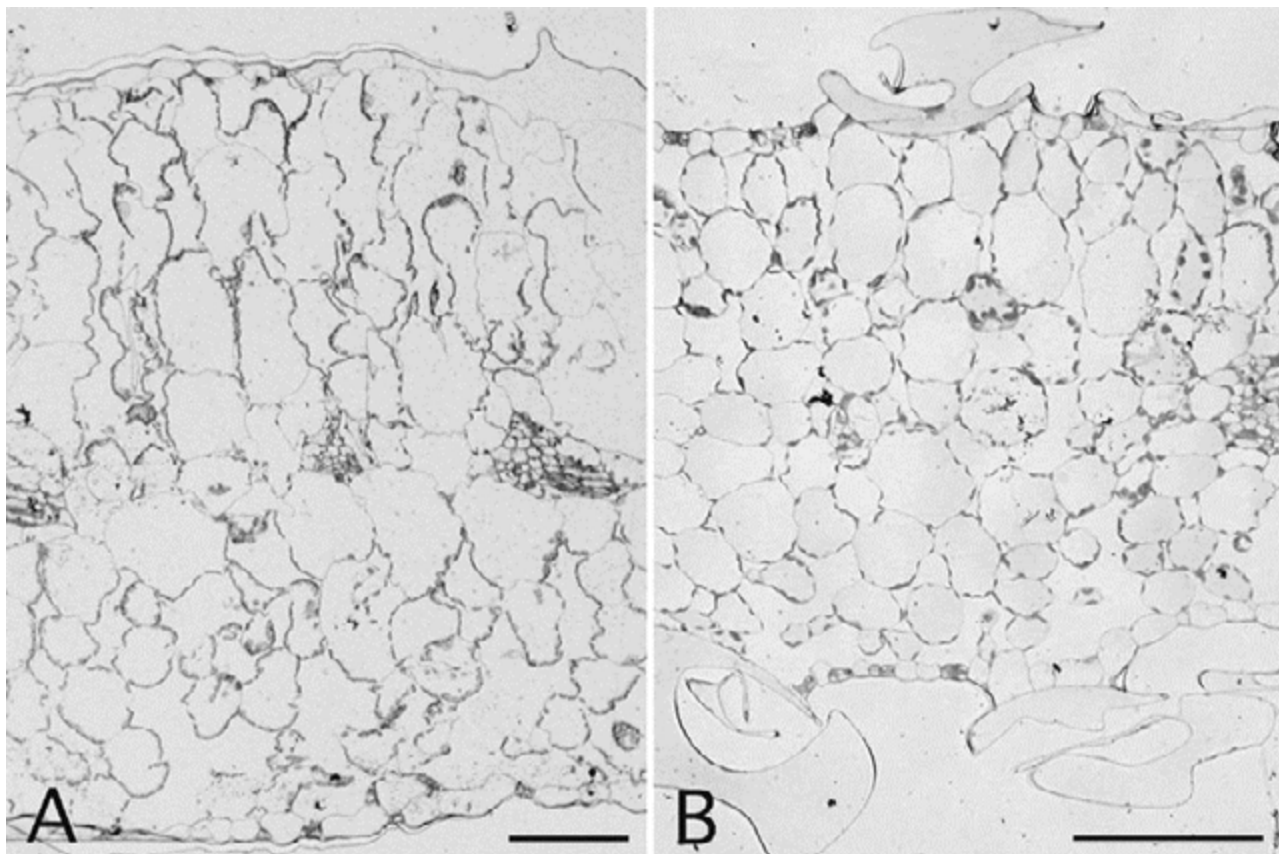


図 1. アイスプラント葉の横断切片光学顕微鏡像. 上部は向軸面、下部は背軸面. A. 標準ホーグランド液で 7 日間水耕栽培した対照群植物の葉肉組織. B. 400 mM NaCl を含む高塩濃度ホーグランド液で 7 日間水耕栽培した実験群植物の葉肉組織. Scale: 100 μ m.

であった (図 1B)。また、細胞間隙は著しく縮小されていた。この変化は、細胞の形と大きさの変化と共に、高塩濃度溶液による水耕栽培の影響によるものと思われる。

アイスプラントでは、その呼称の由来とされるブラッター細胞 (epidermal bladder cell) と呼ばれる塩嚢細胞が葉や茎の表皮系に存在することが知られている⁸⁾。対照群植物では、ブラッター細胞は扁平状の大きめの表皮細胞として認められるが (図 1A 右上部)、その数は少なかった。しかし、実験群植物では、葉の表裏両面で、大きく膨れ、表面から大きく突出した多数のブラッター細胞が観察された。これらのブラッター細胞は、固定前の生試料では、風船のように膨らんでいるのが光学顕微鏡下で確認できたが、固定後の試料では、図 1B のように不定形を示した。

維管束組織の細胞については、対照群および実験群の植物間に大きな違いは観察されなかった。

図 2 は、対照群と実験群のアイスプラント葉の超薄切片像を示している。光学顕微鏡による観察結果と同様に、どちらの植物の葉肉細胞も細胞内の殆どが液胞に占められており、細胞壁に沿って薄い層と

して存在する細胞質基質内に多数の葉緑体が観察された。対照群では葉緑体内に大きなデンプン粒が多数含まれていたが (図 2C)、実験群ではその数と大きさは著しく減少しており、しばしばデンプン粒を含まない葉緑体も見られた (図 2D)。葉緑体内膜系の変形としてチラコイドの膨潤が認められた。高塩濃度培養液から再度標準培養液に移して水耕栽培した植物では、葉肉細胞内の葉緑体は図 2C と同様のチラコイドが膨潤していない内膜系を示し、多数の大きなデンプン粒を含んでいた。このことから、高塩濃度培養液で水耕栽培した植物の葉肉細胞に見られる葉緑体の構造変化は水ストレスが要因となって引き起こされたものと考えられる。

細胞質基質内にはミトコンドリアや核などの細胞内小器官も観察されたが、これらの細胞内小器官には水ストレスによる構造変化は見られなかった。

図 3 は、高塩濃度美容液で水耕栽培した実験群植物の葉の表皮系に見られるブラッター細胞の超薄切片像を示している。基底部や隣接する表皮細胞間には細胞壁が認められるが (図 3B)、外気に面した表面には細胞壁のような顕著な細胞膜外物質による蓄積構造は認められなかった。細胞内は殆ど液胞で占め

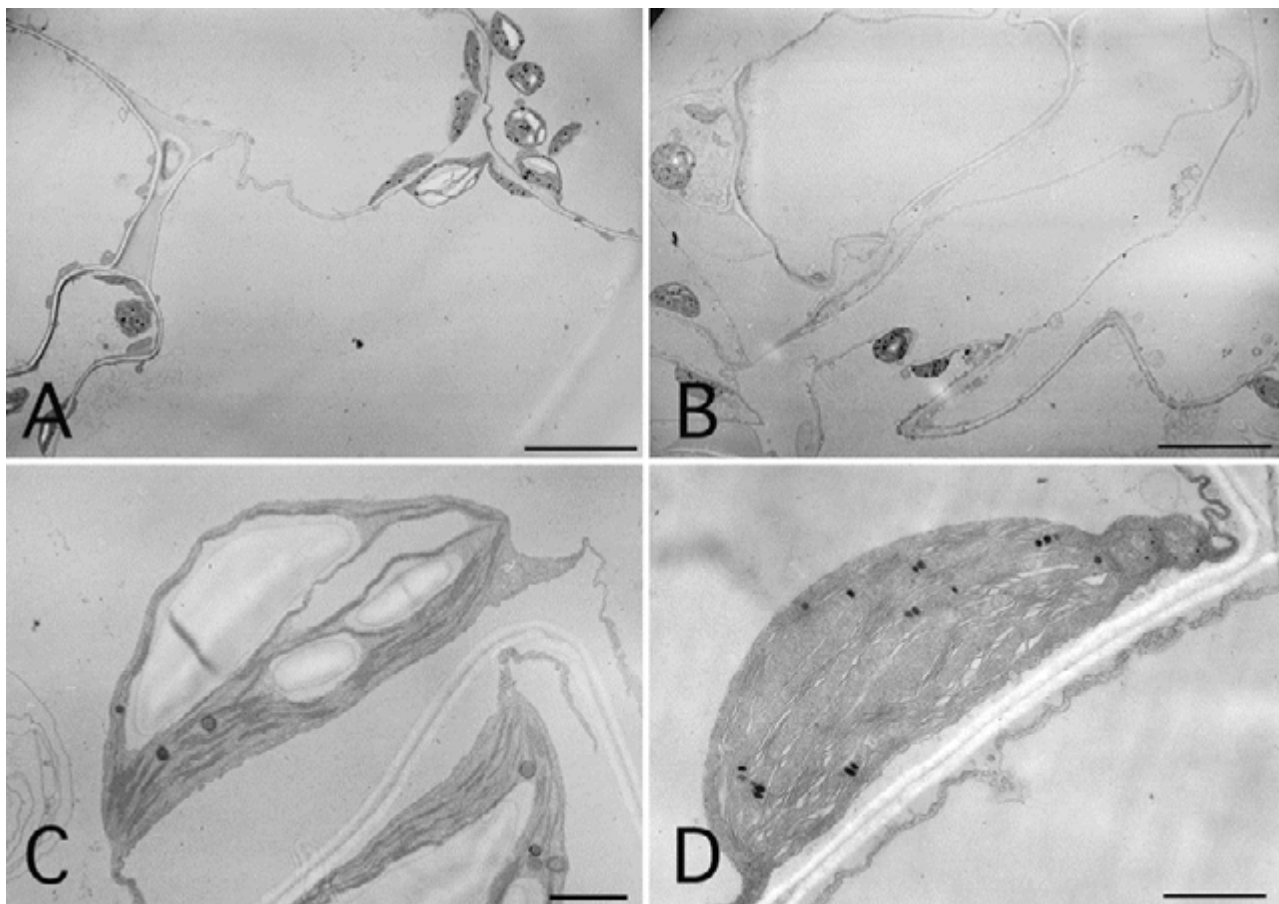


図2. アイスプラント葉の超薄切片像. 標準ホーグランド液で7日間水耕栽培した対照群植物の葉肉細胞(A)と葉緑体(C). 400 mM NaClを含むホーグランド液で7日間水耕栽培した実験群植物の葉肉細胞(B)と葉緑体(D). Scale: 10 μ m (A, B); 1 μ m (C, D).

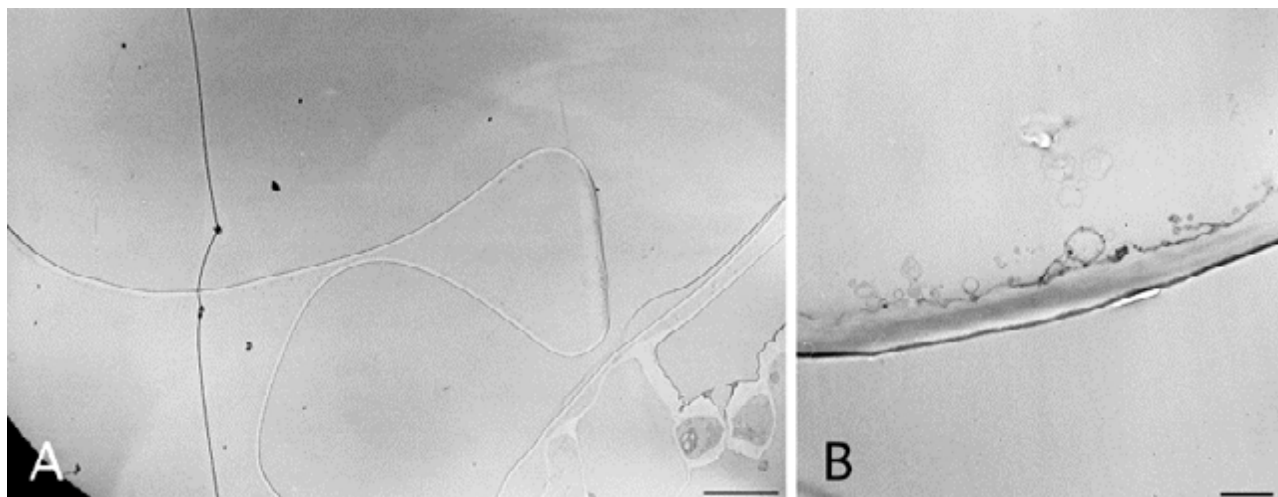


図3. 400 mM NaClを含むホーグランド液で7日間水耕栽培した実験群植物のブランチー細胞(A)と細胞壁(B)の超薄切片像. Scale: 10 μ m (A); 1 μ m (B).

られており、液胞内は均質で、顕著な沈殿物は見られなかった。

討論

アイスプラントは乾燥などの環境ストレスで光合成経路が C_3 型から CAM型へと変換することが知られ

ている⁶⁾が、本研究では、アイスプラントに 400 mM NaCl を含む高塩濃度培養液で水耕栽培し、水ストレスを7日間与えることで C_3 型から CAM型光合成への変換誘導を試みた。ストレスを与えていない植物では明所および暗所で葉に含まれるリンゴ酸濃度が殆ど違いがないのに対し、ストレスを与えた植物

では、明所に比し、暗所でおよそ3倍の高いリンゴ酸濃度を示した(表1)。このことは、水ストレスによりアイスプラントが光合成経路を変換し、暗所でCO₂を吸収してリンゴ酸内に固定し、V-ATPaseによるH⁺ pumpとmalate²⁻の電気勾配で液胞内に蓄積し、明所でデンプン合成に向いリンゴ酸を脱炭酸し、これを消費した^{4, 5}結果を反映したものと思われる。

水ストレスを与えた実験群植物の葉や茎の表面には大きく膨潤したブラッター細胞が観察された。ブラッター細胞は、根から吸収した塩を溜め込んで丸く膨らむことが知られており⁹⁾、周りの細胞から塩を隔離する役割を果たしていると考えられている。これらの細胞の大部分を占める液胞の内部は均質で、顕著な沈殿物が観察されなかったことから、イオン化したNa⁺とCl⁻のみを特異的に高濃度で蓄積している可能性がある。超薄切片像でブラッター細胞の形が不定形に変形していたのは、高濃度の塩蓄積で他の細胞より異常に高くなった浸透圧が固定液の浸透圧と一致しなかったためと考えられる。

水ストレスを与えた実験群植物の葉肉細胞内の葉緑体は、対照群植物のそれらに比べ、デンプン粒の減少とチラコイド膜の膨潤を示した。前述したように、CAM植物は、リンゴ酸を液胞中に蓄えておくためにエネルギーを消費するので、デンプン合成の効率は低下していると考えられる。チラコイド膜の膨潤は、水ストレスから解放された植物では見られないことから、単なる化学固定によるアーティファクトではなく、CAM型光合成への変換に伴う構造変化である可能性が高い。しかし、ブラッター細胞のみならず、水ストレスにより、植物全体の細胞の浸透圧が高くなっている可能性もあることから、これを明確にするためには、固定液の浸透圧調節を考慮する必要のない急速凍結などによる物理固定により詳細に調べる必要があると考えられる。

水ストレスを与えたアイスプラントでは成長の遅れが見られた。これは環境ストレスでCAM型光合成が誘起されたアイスプラントは成長が遅くなるという報告¹⁰⁾や高濃度のNaCl存在下でアイスプラント培養細胞の成長速度が減少するという報告¹¹⁾と良く一致する。水ストレスを受け、CAM型光合成に変換された植物は、ブラッター細胞内へのNaClの蓄積や液胞内へのリンゴ酸の蓄積にエネルギーの多くを費やすため、成長が遅くなるものと思われる。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究材料のアイスプラントの種子をご提供下さいました独立行政法人 農業生物資源研究所生理研究グループ物質代謝研究チーム 上野 修博士、高速液体クロマトグラフィーによるリンゴ酸の測定に御指導賜りました農業総合研究所経営情報部 吉田 誠博士に深く感謝致します。

文献

- 1) Kluge M and Ting IP (1978) Crassulacean acid metabolism: analysis of ecological adaptation. *Ecological Studies Series*. **30**:595-622.
- 2) Neales TF (1975) The gas exchange patterns of CAM plants. In: *Environmental and Biological Control of Photosynthesis*. Marcelle R ed., W Junk The Hague. pp. 299-310.
- 3) Osmond CB (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 379-414.
- 4) Luttge U, Smith JAC, Marigo G and Osmond CB (1981) Energetics of malate accumulation in the vacuoles of *Kalanchoe tubiflora* cells. *FEBS Lett.* **126**: 81-84.
- 5) Ting IP (1985) Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**:595-622.
- 6) Winter K and von Willert DJ (1972) NaCl-induzierter Crassulaceen-Saurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **67**: 166-170.
- 7) Winter K (1985) Crassulacean acid metabolism. In: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment*. Barbar J and Baker NR. eds., Elsevier, Amsterdam. pp.329-387.
- 8) Bohnert HJ, Ostrem JA, Cushman JC, Michalowski CB, Rickers J, Weyer R, De Rocher EJ, Vernon DM, Krueger M, Vasquez-Moreno L, Velten J, Hofner R and Schmitt JM (1988) *Mesembryanthemum crystallinum*, a higher plant model for the study of environmental induced changes in gene expression. *Plant Mol. Biol. Rep.* **6**: 10-28.
- 9) Adams P, Nelson DE, Yamada S, Chmara W, Jenson RG, Bohnert HJ and Griffiths H (1998) Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol.* **138**: 171-190.
- 10) Cushman JC, Michalowski CB and Bohnert HJ (1990) Developmental control of Crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. *Plant Physiol.* **94**: 1137-1142.
- 11) Thomas JC, De Armond RL and Bohnert HJ (1992) Influence of NaCl on growth, proline and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol.* **98**: 626-631.

■原 著■ 2006 年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

シロイヌナズナの生殖過程に異常のある変異体の染色体解析 II

酒井麻美¹ 黒森 崇² 松永幸大³ 安積良隆^{1,4}

Analysis of Chromosome Behavior of *Arabidopsis* Mutants Defective in Reproductive Processes II

Asami Sakai¹, Takashi Kuromori², Sachihiko Matsunaga³ and Yoshitaka Azumi^{1,4}

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

² Plant Functional Genomics Group, RIKEN Genomic Science Center, RIKEN, Yokohama Institute, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

³ Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita-ku, Osaka, Osaka 565-0871, Japan

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

Abstract: In a previous work, we showed that a mutation in *AtSPO11-2* resulted in the production of abnormal sterile pollens and that *AtSPO11-2* protein was required for meiotic homologous recombination. *Atspo11-2* mutant was used with other meiotic mutants to examine the regulatory system of centromere roles during meiosis in this research. Yeast and *Arabidopsis* centromeres have been shown to couple with each other at early prophase I to promote homolog pairing, and to direct the polarity of sister chromatids at metaphase I. The present research revealed that centromere coupling at early prophase I was independent of meiotic homologous recombination, but that the decision of sister centromere polarity was dependent on recombination.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, meiosis, homologous chromosome, centromere, DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole), FISH (fluorescent *in situ* hybridization), MHR (meiotic homologous recombination)

序論

有性生殖を行う生物にとって減数分裂は、その種のゲノムを構成する染色体の数を一定に保つために絶対的に必要な過程である。この過程を経なければ受精が起こる度に染色体数が倍加してしまう。減数分裂は有性生殖を可能にし、これを行う生物の発展に大きく貢献しているが、染色体数を半減させるという危険の伴う作業を遂行している。この作業の安全性を確保するためには、減数分裂を構成するそれぞれの素過程は正確な順序とタイミングで進行しなければならず、その進行を監視・調節する制御機構が存在すると考えられている。

減数分裂は大きく分けて第一分裂と第二分裂の 2 つの過程からなる。この 2 つの分裂は、一度の染色体複製の後、連続して起こる。それぞれ分裂は、前期、中期、後期、終期からなり、第一分裂では相同染色体が分離し、第二分裂では姉妹染色体が分離する。その結果、1 つの 2n の母細胞から 4 つの n の

娘細胞が作られる。減数分裂の最大の特徴である相同染色体の対合と分離は第一分裂前期から後期にかけて起こる。減数第一分裂の前期は 5 つの時期に分けられる。染色体が細い糸状に見える細糸期(レプトテン期)。相同染色体がペアリングし始める合糸期(ザイゴテン期)。完成したシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が端から端まで互いに接着する太糸期(パキテン期)。シナプトネマ構造が崩壊しながらもキアズマによって連結を維持し、染色体がさらに凝縮する複糸期(ディプロテン期)。凝縮が完成し、二価染色体として観察される移動期(ディアキネシス期)。第一分裂中期には赤道面に 5 つの二価染色体が整列する。第一分裂後期には、それぞれの二価染色体を構成する相同染色体は互いに別の極へと分配され、第一分裂で形成される 2 つの娘細胞は必ず全ての相同染色体対から 1 つだけ染色体を受け取り、染色体数が正確に半減した細胞となる。つま

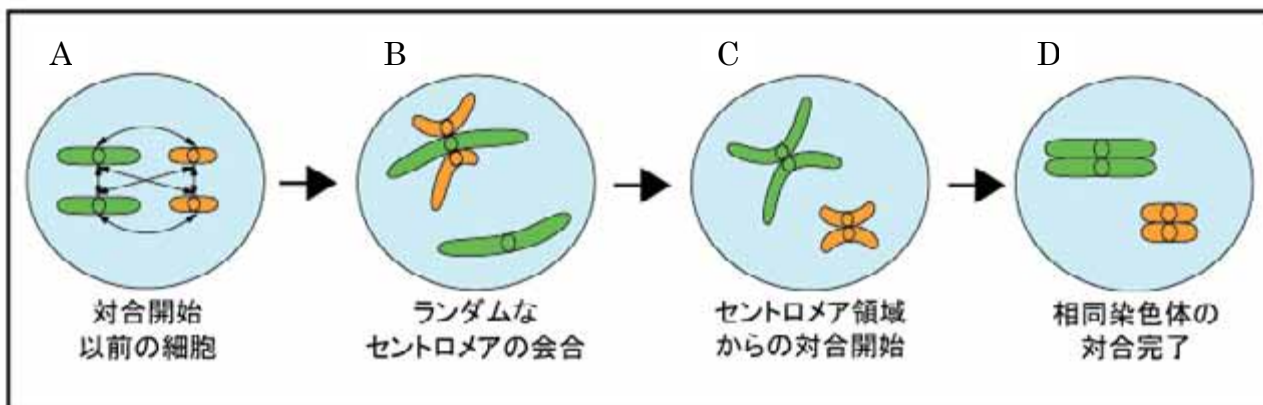


図 1. 相同染色体の対合過程の模式図. A. 相同染色体の対合が開始されるレプトテン期にはセントロメア同士が親和性を持つようになる. B. レプトテン期からザイゴテン期にかけて無差別なセントロメア同士の接着が起こる. C. ザイゴテン期にはセントロメア領域から対合が始まる. D. パキテン期には相同染色体の対合が完成する.

りこれが 5 本の染色体が重複することも、欠落することもなく、均等に分配されるための仕組みである。相同染色体の対合が完成するまでは、テロメアの集合（クラスタリング）、相同染色体の並列（alignment, juxtaposition）、減数分裂期相同組換え（meiotic homologous recombination, MHR）、シナプトネマ構造の完成（シナプシス、synapsis）といった過程がある。これに加え最近では、図 1 に示すような、レプトテン期からザイゴテン期にかけてのセントロメア同士の会合とでも呼ぶべき、セントロメア同士が無作為に接着し合う過程があり、相同染色体の対合に促進効果を及ぼしているのではないかと考えられてきている¹⁾。酵母ではこの時、概ね 2 つのセントロメアが接着しているため、カップリングと呼ばれている。しかし、シロイヌナズナの場合、2 つ以上のセントロメアが接着するため、我々は会合と呼んでいる。いずれにしても、相同染色体の並列、会合、シナプシス、MHR の各過程間の相互依存性については詳しく調べられておらず、興味を持たれる。

図 2 に示すようにセントロメアは染色体分配において、それぞれの染色体の方向性を決定するという重要な働きをする。体細胞分裂時には姉妹セントロメアは異なる極に配向し、染色体を均等分配する。第一分裂中期の二価染色体を形成する相同染色体の相同セントロメアは互いに異なる極に配向する（二極性、bipolar orientation）ように制御されており、染色体は還元分配される²⁾。同時にそれぞれの染色体の姉妹セントロメアは同じ極に配向するように制御されている（一極性、monopolar orientation）。この配向性の制御に狂いが生じると染色体を適切に分配することができなくなる。また、この配向性の制御にも、MHR が関与している可能性が示唆されている³⁾。

MHR は相同染色体同士の正確なパートナーの識別に必須である。酵母などの研究から減数分裂期の相同組換え反応は SPO11 蛋白質による二本鎖 DNA 切断から開始することが知られている⁴⁾。その後、一本鎖 DNA 部分が削り出され、その一本鎖が相同染色体の相同部分と組換えを起こし、反応が進むといったモデルが提案されている。シロイヌナズナでは 3 つの SPO11 の相同遺伝子、AtSPO11-1、AtSPO11-2、AtSPO11-3 が存在する⁵⁾。AtSPO11-1

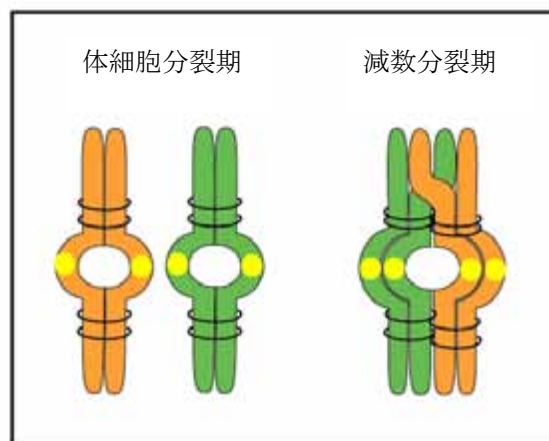


図 2. 染色体の分離方向とセントロメア. 体細胞分裂期の染色体は、それぞれ複製後の姉妹染色体から構成されており、姉妹セントロメアは二極性を示す。減数分裂期染色体は相同染色体が連結されており、姉妹セントロメアは一極性を示す。相同セントロメアに関しては二極性となる。

は実際に相同組換えに必要で、この遺伝子の変異体では相同染色体の対合が起こらないことが知られている⁶⁾。AtSPO11-3 の変異体では栄養生長に異常が見られることから体細胞分裂時に機能していると考えられている⁷⁾。AtSPO11-3 との類似性から AtSPO11-2 も体細胞分裂に関与すると考えられていたが、正常レベルの相同組換えに必須であることが明らかにされている⁸⁾。シロイヌナズナの SOLO

DANCERS (SDS) 遺伝子は減数分裂に特異的なサイクリンをコードしている⁹⁾。この遺伝子の変異体でも組換えの頻度が極度に減少する。サイクリン依存性キナーゼ(CDK)を介して相同組換えを制御している可能性が考えられる。

そこで本研究では *AtSPO11-1*, *AtSPO11-2*, *SDS* の変異体を用いて、上記のセントロメアの会合と配向性の決定が減数分裂期相同組換えに依存したもののなかどうかを調べることにした。

材料と方法

実験植物

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型及びその変異体は、神奈川県・平塚キャンパス内の植物育成棟内で栽培した。60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光、14時間10時間の明暗周期、気温 24°C、湿度 60% の条件下で、ハイポネックスと MS 培地を交互に、週に一度与えながら栽培した。播種後、5~7 週間目の植物の花序を採取し、ファーナー液 (Ethanol, Acetic Acid: 3:1) 中、室温で 20 時間程度置くことによって固定した。その後は -20°C で保存した。

消化展開法

花粉母細胞の染色体試料作製は Azumi らの方法¹⁰⁾ に従った。固定した試料を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) 中で洗った後、cytohelicase (Sigma)、cellulase “ONOUKA” R-10 (Yakult)、pectolyase (Kikkoman) (各 0.4%(w/v)) を含む同緩衝液中、適宜脱気しながら、37°C 3 時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4°C で保存した。

消化した花序をシャーレ上の 60% 酢酸中に移した後、適当な大きさの蕾を取り出し、同じく 60% 酢酸を滴下したスライドガラス上で解剖した。薬をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、45°C のホットプレート上に 1 分間静置した。氷冷したファーナー液を周囲に滴下し、緩やかに混和させた後、ファーナー液を捨て、スライドを乾燥させた。DAPI 溶液 (Vector) を滴下し、カバーガラスを載せた後、顕微鏡 (オリンパス BX61) で観察した。

FISH (fluorescent *in situ* hybridization)

消化展開法によって準備された染色体標本に対して、セントロメア付近に局在する 180-bp 繰り返し配列¹¹⁾ をプローブとする FISH を行った。FISH は Azumi らの方法に従った¹⁰⁾。180-bp 繰り返し配列は、シロイヌナズナゲノム DNA を鋳型とし、両端の配列をプライマーとする PCR (polymerase chain reaction)

により増幅し、プローブ合成に用いた。プローブ合成には Nick Translation Kit (Amersham BioScience) と Alexa Fluor 488 Labeling Kit (invitrogen) を利用し、プローブは PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製した。1~2 μg の DNA から合成したプローブは 30 枚のスライドガラスの染色体試料に使用した。洗浄後の染色体標本に 5 μL の DAPI (Vector) を滴下し対比染色を行った後、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX60) 下で観察した。撮影した写真はスキャナーで取り込み、PhotoShop (adobe) で加工・編集した。

結果

相同組換えに依存しない相同染色体の会合過程

我々はすでに減数分裂時の相同染色体の対合過程で、セントロメア同士が相同のものであるかないかにかかわらず接着し合うセントロメアの会合という現象があるのを報告している。この現象はレプトテン期からザイゴテン期にかけて、シナプトネマ構造ができ始める時期に見られる。この時期、MHR 反応も進行していると考えられている。我々はセントロメアの会合が起こるのに MHR 反応が必要なのかどうかを調べるため、野生型シロイヌナズナの花粉母細胞の染色体と MHR 反応の起こらない変異体の花粉母細胞の染色体を比較してみることにした。

酵母の *Spo11* 遺伝子の相同遺伝子であるシロイヌナズナの *AtSPO11-1* と *AtSPO11-2*、減数分裂に特異的なサイクリンをコードする *SOLO DANCERS (SDS)* は MHR 反応の開始に必要なことが明らかにされている。野生型とこれらの遺伝子の変異体から消化展開法によって減数分裂期染色体の試料を作成した。これに対して、セントロメア部分を明らかにするために、セントロメア付近に局在する 180-bp 繰り返し配列をプローブとする FISH を行った。

野生型の花粉母細胞では、シナプトネマ構造がまだほとんどできていないレプトテン期初期には 10 近いセントロメアのシグナルが観察された (図 2A)。これはこの時点ではほとんどのセントロメアは互いに接着せず、離れて存在していることを示している。しかしレプトテン期からザイゴテン期にかけて、シグナルの数は急激に減少し、2 箇所とか 3 箇所しか観察されなくなる (図 1B)。シグナルが 5 カ所以下であることから、2 つ以上のセントロメア同士が接着していることになり、相同のもの以外でも接着し合うと考えられる。パキテン期になるとシグナルの数は通常 5 カ所で観察され、相同のセントロメア同士のみが接着していると考えられる (図 1C)。

sds, *Atspo11-1*, *Atspo11-2* 変異体では、レプトテン初期には 10 近いシグナルが観察されたが、サイゴテン期にはそれぞれ図 3B、図 4B、図 5B に示すように減少し、全般的に野生型の花粉母細胞で見られるよりも激しい接着が起こっていた。時には一塊りとなっている場合も見られた。これらの変異体ではパキテン期を経ずにディプロテン期に進行するため、染色体は 5 組の二価染色体とならずに個々に凝縮し、10 個の一価染色体となる。セントロメアのシグナルも 10 近く観察される。

以上のことから、これらの変異体でも野生型と同様にセントロメア同士の接着は起こっており、セントロメアの会合は相同組換えに依存しないと結論することができる。

配向は相同組換え反応に依存する減数第一分裂時のセントロメア

野生型シロイヌナズナの減数第一分裂中期の染色体は、相同染色体が連結された二価の状態にある。二価染色体を構成するそれぞれの染色体の姉妹セント

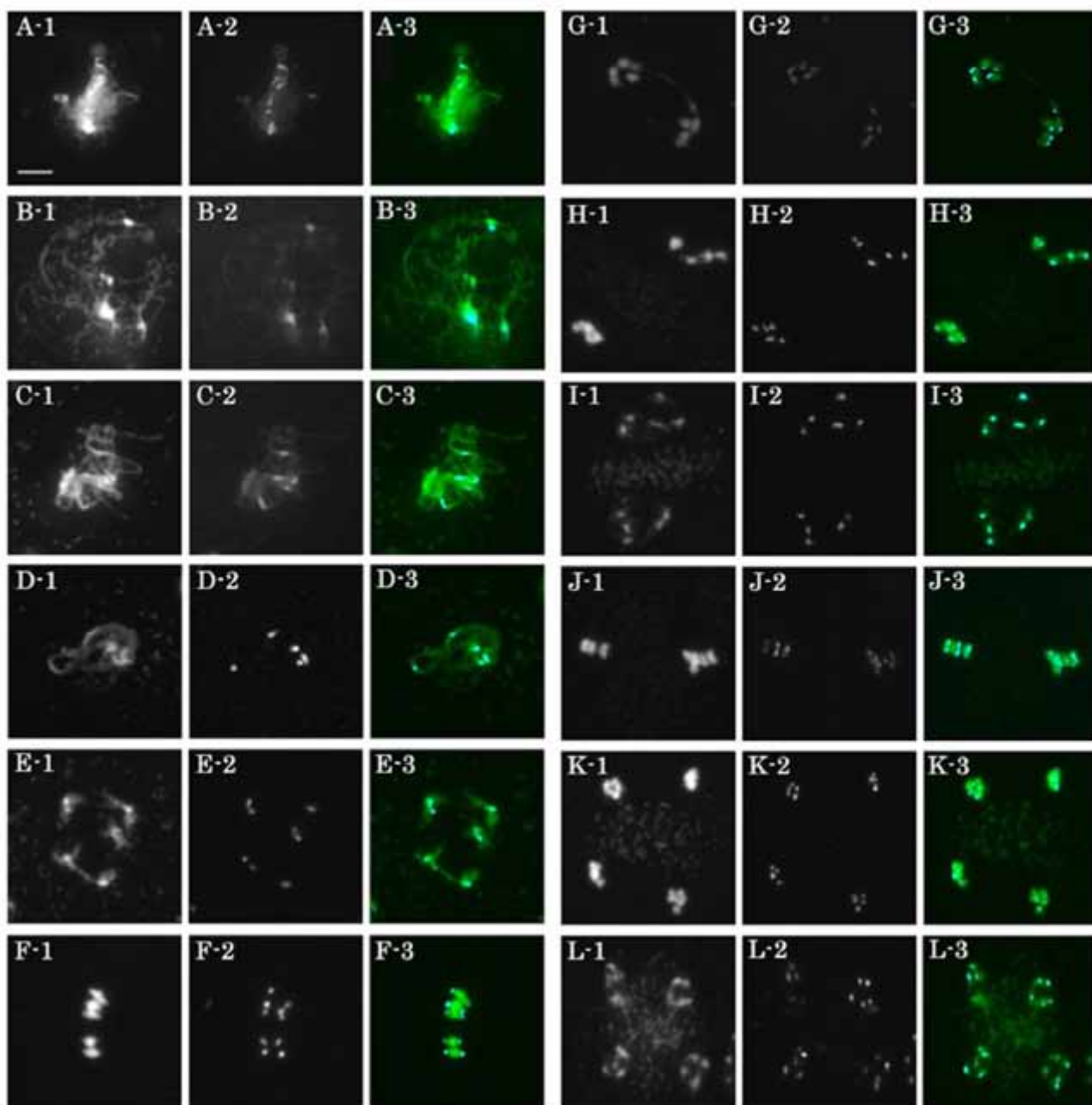


図 3. 野生型シロイヌナズナの減数分裂期染色体に対するセントロメア配列をプローブとする FISH. A. レプトテン期, B. サイゴテン期, C. パキテン期, D. ディプロテン期, E. ディアキネシス期, F. 第一分裂中期, G. 第一分裂後期, H. 第一分裂終期, I. 第二分裂前期, J. 第二分裂中期, K. 第二分裂後期, L. 第二分裂終期. 各パネルの 1 は DAPI 染色した染色体像, 2 はセントロメアからのシグナル, 3 は合成画像である. スケールバーは 10 μ m.

ロメアは同じ極に向かう一極性で、相同関係にあるセントロメアは別々の極に向かって配向する二極性である。先の MHR 変異体では、この時期全ての染色体は一価となっており、赤道面付近に並ぶものもある(図 4E-G、図 5E-G、図 6E-G)。これは姉妹セントロメアの一局性が確立されていないために起こるのではないかと考えられた。そのことを確かめるために、MHR 変異体の減数第一分裂中期のセントロ

メアの配向性について FISH 法を用いて調べた。

極方向に移動している染色体ではセントロメアシグナルは染色体の極方向の 1 カ所のみで観察された(図 4, 5, 6 矢印)。赤道面付近で停滞している染色体では両極方向の 2 カ所でシグナルが観察された(図 4, 5, 6 アスタリスク)。また、一つの細胞内に一極性の姉妹セントロメアと二極性の姉妹セントロメアが存在した。この結果は、二価染色体となっていない染色体では姉妹セントロメアの一方方向性が確

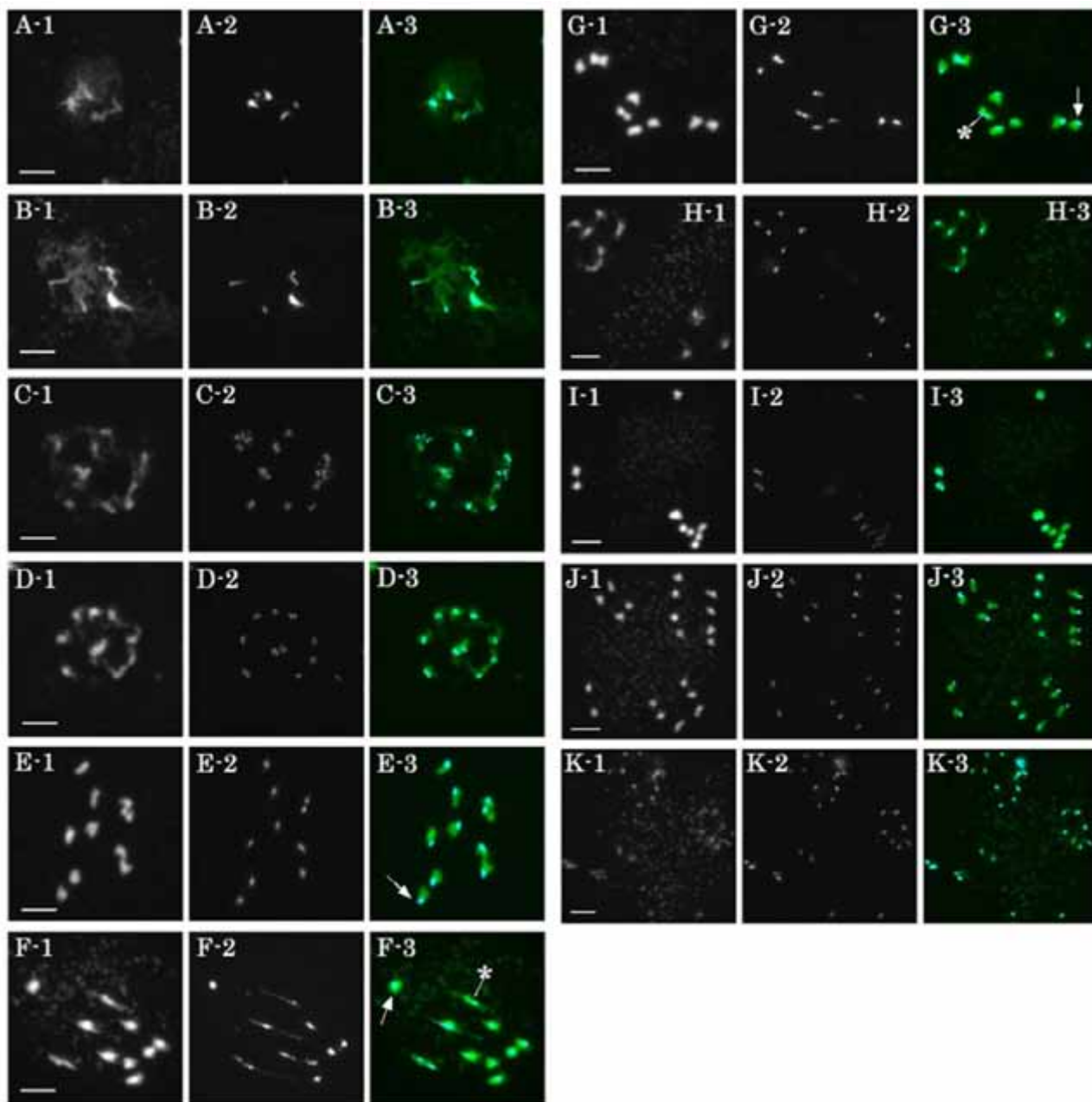


図 4. *sds* 変異体の減数分裂期染色体に対するセントロメア配列をプローブとする FISH. A. レプトテン期, B. ザイゴテン期, C. ディプロテン初期, D. ディプロテン後期, E. デiakinesis期, F. 第一分裂中期, G. 第一分裂後期, H. 第二分裂前期, I. 第二分裂中期, J. 第二分裂後期, K. 第二分裂終期. 各パネルの 1 は DAPI 染色した染色体像, 2 はセントロメアからのシグナル, 3 は合成画像である. 矢印は一極性の姉妹セントロメアを示し, アスタリスクは二極性のセントロメアを示す. スケールバーは 10 μ m.

立てておらず、姉妹セントロメアは互いに制約されることなく自由に両極からの微小管と結合し、たまたま同じ極からの微小管に両方のセントロメアが結合すれば一極性になり、別の極からの微小管と結合した場合には二極性となるものと考えられる。二極性となった場合、減数第一分裂では姉妹染色分体の接着を維持する機構が働き、姉妹染色分体は分離できず、赤道面付近に停滞することが多い(図 3F、図 5F)。

討論

セントロメアの会合

我々はすでに相同染色体の対合過程でセントロメア同士が無差別に接着する、セントロメアの会合と我々が呼んでいる現象が起こることを報告している。酵母でも同様の現象がセントロメアのカップリングと呼ばれ報告されているが、酵母の場合は大抵の場合は 2 つのセントロメアが接着しているのに対し、シロイヌナズナの場合にはもっと多くの染色体が数箇所に分かれて接着する。MHR が起こらない変異

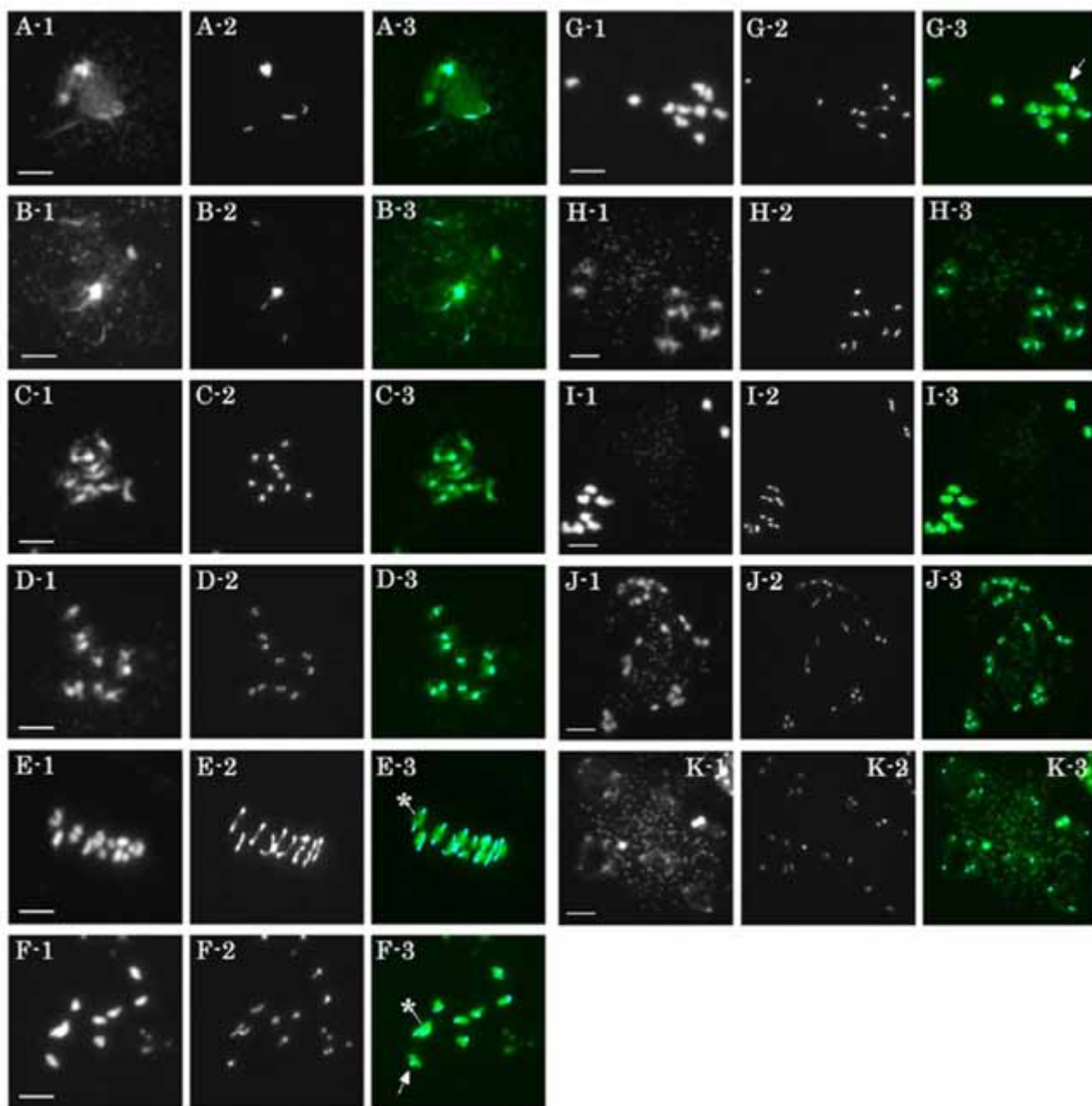


図 5. *Atspo11-1* 変異体の減数分裂期染色体に対するセントロメア配列をプローブとする FISH. A. レプトテン期, B. ザイゴテン期, C. ディプロテン初期, D. ディプロテン後期, E. 第一分裂中期, F. 第一分裂中後期, G. 第一分裂後期, H. 第二分裂前期, I. 第二分裂中期, J. 第二分裂後期, K. 第二分裂終期. 各パネルの 1 は DAPI 染色した染色体像, 2 はセントロメアからのシグナル, 3 は合成画像である. 矢印は一極性の姉妹セントロメアを示し, アスタリスクは二極性のセントロメアを示す. スケールバーは 10 μ m.

体を用いた本研究で、この会合が起こるのに MHR は必要ではないことを示すことができた。MHR とは独立した別の、染色体同士を結び付ける機構が存在するものと推測される。対合初期にはセントロメア同士のみで接着が見られることから、セントロメア間に特有の親和性がこの時期に現れると解釈される。これらの MHR 変異体ではセントロメアの会合はむしろ昂進している様子が観察されたことから、MHR が正常に進行し相同染色体同士が正しく対合

すると、この対合初期に見られるセントロメア間の親和性は消失するものと考えられる。それに元々この親和性はそれほど強いものではなく、酵母で示されているように、セントロメア同士は接着したり解離したりしながら、本当のパートナーを探索しているものと推察される。

対合初期には各染色体のテロメアは細胞内の特定の部位に、多くの場合は核膜の一部に、クラスターリングし、染色体全体としてブーケ構造をとることが

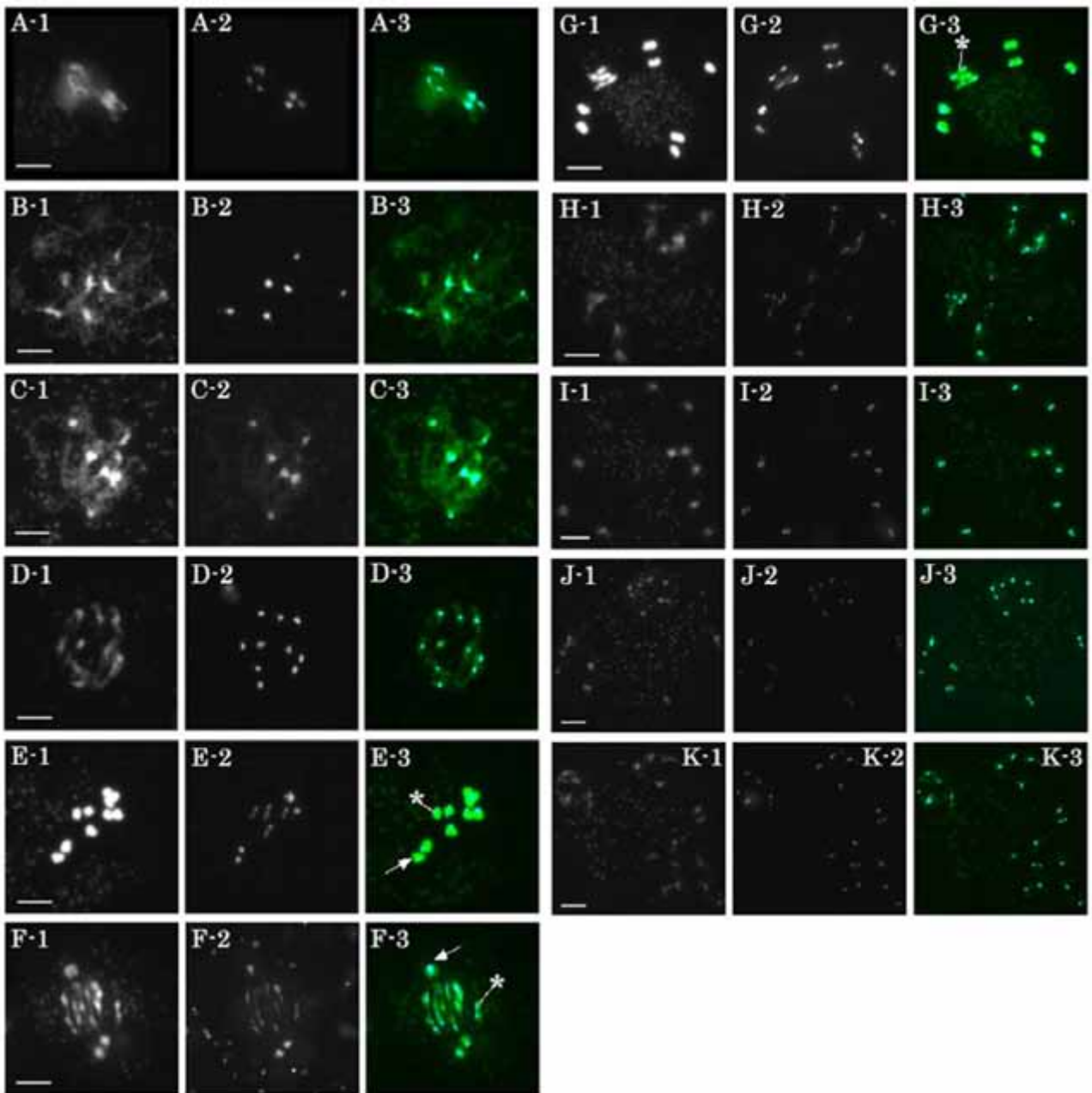


図 6. *Atspo11-2* 変異体の減数分裂期染色体に対するセントロメア配列をプローブとする FISH. A. レプトテン期, B. ザイゴテン期, C. ディプロテン初期, D. ディプロテン後期, E. ディアキネシス期, F. 第一分裂中期, G. 第二分裂中期, H. 第二分裂前期, I. 第二分裂前期, J. 第二分裂終期, K. 第二分裂終期. 各パネルの 1 は DAPI 染色した染色体像, 2 はセントロメアからのシグナル, 3 は合成画像である. 矢印は一極性の姉妹セントロメアを示し、アスタリスクは二極性のセントロメアを示す. スケールバーは 10 μm .

知られている¹²⁾。シロイヌナズナの場合は核小体の周りに減数分裂開始期から集合している¹³⁾。対合開始期に全ての染色体のテロメアが限られた空間に拘束されていれば、染色体が全く自由に細胞内に分布する状況と比べると、染色体の相同部分が遭遇する確率はかなり高くなるものと想像される。その上、セントロメア部分の親和性ゆえに染色体同士が近距離に置かれると探索の効率はさらに向上するものと考えられる。たまたま正しいパートナーと遭遇した場合には、染色体の両末端のテロメアが固定されていることもあり、その接着はエネルギー的にも安定化されるのではないだろうか。その間に MHR を介した相同部分の探索が進み、見つかった部分ではシナプトネマ構造による相同染色体の接着の安定化が起こり、そこを起点として染色体全体にシナプトネマ構造が構築され、シナプシスが完成するというモデルが考えられる。セントロメアの会合の役割はこのモデルでも提案したように、テロメアのクラスタリングと協調して、相同染色体同士を接近させ、対合を促進するというものであると考えられるが、これは MHR の反応とは別の機構によるものであるが、MHR に必要な相同部分同士の接触が起こる頻度を高めることによって遂行されていると仮定している。

減数分裂期セントロメアの極性確立

減数第一分裂中期の染色体は互いに連結された相同染色体からなり、二価染色体と呼ばれる。二価染色体では相同関係にあるセントロメアは二極性であるが、姉妹セントロメアは同じ極に配向する一極性である。MHR を行えない変異体では第一分裂中期においても相同染色体は二価とならず、一価のまま存在する。この状態でのセントロメアの配向を FISH 法を用いて調べてみると、一極性のものと二極性のものが混在していた（この時のそれぞれの染色体のセントロメアの配向を模式図にすると図 7 のようになる）。この結果は MHR を行い相同染色体が対合することが、姉妹セントロメアの一極性の確立に不可欠であることを示している。対合している染色体とそうでない染色体の違いは何であろうか。MHR を経験しているかないかという違いもあると思われるが、キアズマを持っているかどうか大きな影響を及ぼしていると考えられる。キアズマは顕微鏡観察で認識される染色体上の構造で、遺伝学的な交叉が起きている部位に相当すると考えられている。しかし、キアズマの分子構造についてはまだ良く解っていない。キアズマからは近辺にキアズマが形成されないようにする干渉作用を伝えるシグナルの発信源となっているとの見方がある。セントロメアに対

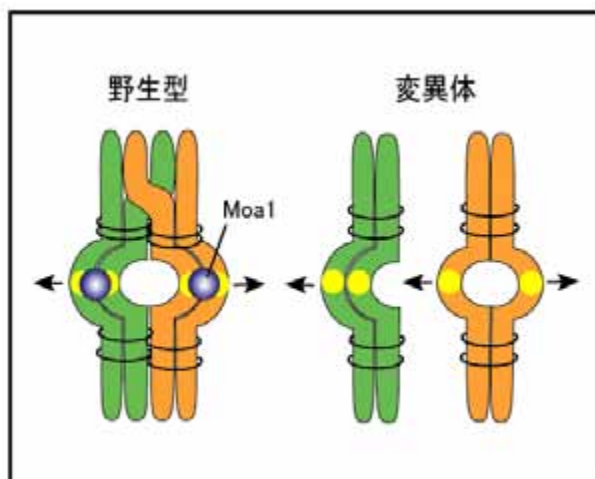


図 7. 野生型と MHR 変異体での減数第一分裂中期の姉妹セントロメアの配向性の違い。野生型では姉妹セントロメアは同じ極に向かって配向する。MHR 変異体では一極性のものと二極性のものが混在する。

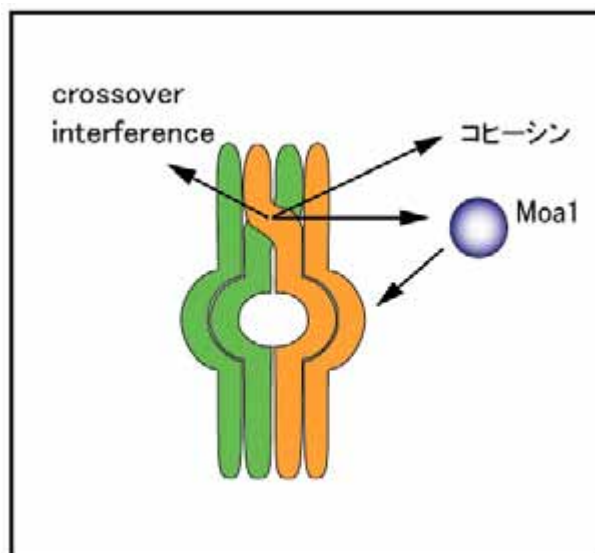


図 8. MHR からセントロメアへのシグナル伝達のモデル。MHR の結果生じるキアズマからは様々な方向にシグナルが発せられていると考えられる。

しても、その染色体でキアズマが存在するか否かのシグナルを発している可能と考えられる（図 8）。

体細胞分裂時の染色体も二極性を取るが、この場合全ての染色体が二極性となっており、そうでなければ後期に進行できないように監視しているチェックポイントが存在する。相同組換え変異体の減数第一分裂中期の一価染色体に見られる二極性とは、必然と偶然の差がある。野生型では減数第一分裂時の姉妹セントロメアは必ず一極性を示す。これは、出芽酵母ではセントロメアに局在する Moa1¹⁴⁾（分裂酵母では Monopolin¹⁵⁾）タンパク質が姉妹セントロメアを束ねているために一極性を示すものと考えられている（図 7）。植物では Moa1 に相当する遺伝子はまだ見つからないが、同じ機能を果たす遺

伝子が存在するものと考えられる。キアズマから発せられたシグナルが、直接あるいは何らかのメッセンジャーを介して Moa1 に伝達され、Moa1 が姉妹セントロメアを結束するのもも知れない (図 8)。

謝辞

本研究は 2006 年度神奈川大学総合理学研究所協同研究プロジェクトの助成のもとに行われた。

文献

- 1) Tsubouchi T and Roeder G S (2005) A synaptonemal complex protein promotes homology-independent centromere coupling. *Science* **308**: 870-873
- 2) 坪内英生 (2003) 出芽酵母で明らかになった減数分裂期の相同染色体分配メカニズム. *実験医学* **21** (No. 5 増刊): 700-707.
- 3) Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot G, Vrielynck N, Belcram K, Rocques N, Marquez-Lema A, Bhatt AM, Horlow C, Mercier R, Mezard C and Grelon M (2005) AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J Cell Sci.* **118**: 4621-4632.
- 4) Keeney S, Giroux CN and Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**: 375-384.
- 5) Hartung F and Puchta H (2000) Molecular characterization of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acid Res.* **28**: 1548-1554.
- 6) Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001) *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589-600.
- 7) Sugimoto-Shirasu K, Stacey NJ, Corsar J and Roberts K (2002) DNA topoisomerase VI is essential for endoduplication in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **12**: 1782-1786.
- 8) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* **48**: 206-216.
- 9) Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* **21**: 3081-309.
- 10) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence *in situ* hybridization procedure applicable to whole stages of male meiosis of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Sci.* **5**: 1-6.
- 11) Murata M, Ogura Y, Motoyoshi F (1994) Centromeric repetitive sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Jpn J Genet.* **69**: 361-370.
- 12) Davis L and Smith GR (2006) The meiotic bouquet promotes homolog interactions and restricts ectopic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **174**: 167-177.
- 13) Armstrong SJ, Franklin FC and Jones GH (2001) Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci.* **114**: 4207-4217.
- 14) Yokobayashi S and Watanabe Y (2005) The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* **123**: 803-817.
- 15) Monje-Casas F, Prabhu VR, Lee BH, Boselli M and Amon A (2007) Kinetochore orientation during meiosis is controlled by Aurora B and the monopolin complex. *Cell* **128**: 477-490.

■原 著■

シロイヌナズナの倍数体の減数分裂期染色体の動態解析

早川 俊¹ 岩元明敏¹ 安積良隆^{1,2}

Analysis of Chromosome Behavior during Meiosis of *Arabidopsis* Polyploid Mutants

Shun Hayakawa¹, Akitoshi Iwamoto¹ and Yoshitaka Azumi^{1,2}

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

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: adumiy01@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Polyploid lines were constructed from several diploid ecotypes of *Arabidopsis thaliana* by colchicine treatment. To confirm their ploidy by counting the chromosome number of the respective cells under a microscope, meiotic chromosomes of pollen mother cells were surface-spread on slide glasses and visualized by DAPI staining. It was clearly indicated that the tetraploid lines assumed by flowcytometry had 20 chromosomes, since 10 pairs of bivalents were observed on the metaphase I plate, and 2 sets of 10 chromosomes on metaphase II plates. As far as we analyzed through light microscopic observation, homologous chromosomes normally synapsed at the pachytene stage, congressed on the metaphase plate at metaphase I, and segregated reductionally to daughter cells at the anaphase I, and sister chromatids were separated to produce tetrads during meiosis II. Putting these results together with their fertility, the constructed tetraploid lines were concluded to undergo meiosis as normally as wild-type diploid plants, though the chromosome number was doubled.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, polyploid, colchicine, meiosis, chromosome, DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole)

序論

通常、二倍体の生物は2組の染色体を保有している。植物では近縁種間の交雑などによって倍数体が生じる。倍数化が起こると植物体自体が大きくなり、生産力が高まることもある。コムギを例に挙げると、現在多く使われている三～五粒系の（パン）コムギは $2n=42$ の染色体を持つ。これはコムギの元となった一粒系のコムギ近縁野生種($2n=14$)同士の交雑によって生じた六倍体と考えられている。この例のように倍数性が増加すると生産性や品質が高まる場合があり、一種の育種法として利用されている。しかし交雑による倍数化は効率が悪く、現在ではコルヒチン処理によって核内倍加を誘発する方法が取られている。コルヒチンは染色体解析に用いられる物質であり、紡錘糸の形成を阻害し細胞分裂を中期で停止させる働きをもつ。中期で停止した細胞の中には稀に後期に進むことなく、次のS期に進行するもの

が現れるため、染色体数が倍加した植物を作成することができる。

我々はモデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて、コルヒチン処理により倍数化した植物の正確な染色体数、及びその染色体の動態を調べることにした。シロイヌナズナは $2n=10$ の染色体数を持つ植物で、Landsberg *erecta* (Ler), Columbia (Col) 等、様々なエコタイプが存在する。シロイヌナズナでは数々の分子遺伝学的、細胞生物学的手法が利用できるため、様々な観点から染色体を解析することができる。

減数分裂とは、受精の結果として起こる染色体倍加に備えて、予め染色体数を半減させ、親と同じ染色体数に保つための分裂である。この減数分裂が正常に行われない場合、その後の配偶子形成に大きな影響を及ぼす。減数分裂は一度の染色体の複製の後、

二度の分裂が起こり、それぞれ第一分裂、第二分裂と呼ばれ、前期、中期、後期、終期からなる。減数第一分裂の前期は、染色体が細い糸状に見える細糸期（レプトテン期）、相同染色体がペアリングし始める合糸期（サイゴテン期）、完成したシナプトネマ構造を介して相同染色体同士が互いに接着する太糸期（パキテン期）、シナプトネマ構造が崩壊し染色体がさらに凝縮する複糸期（ディプロテン期）、凝縮がほぼ完成する移動期（ディアキネシス期）の5つの時期に分けられる。第一分裂中期には連結した相同染色体からなる二価染色体が赤道面に整列する。第一分裂後期には相同染色体が分離し、核相としては n となる（還元分裂）。第二分裂ではそれぞれの染色体を形成している姉妹染色分体が分離する（均等分裂）。相同染色体が分離する時期や姉妹染色分体が分離する時期は染色体数を精度良く数えることができる。我々は野生型の二倍体 *Ler* と共に、コルヒ

チン処理によって作成された四倍体の *Col* 及び *Ler* の減数分裂期染色体の様子を観察した。これを以下に報告する。

材料と方法

実験植物

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型及びその変異体は、神奈川県・平塚キャンパス内の植物育成棟内で栽培した。60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の白色光、14時間10時間の明暗周期、気温24°C、湿度60%の条件下で、ハイポネックスとMS培地を交互に、週に一度与えながら栽培した。播種後、5-7週間目の植物の花序を採取し、ファーマー液 (Ethanol, Acetic Acid; 3:1) 中、室温で20時間程度置くことによって固定した。その後は-20°Cで保存した。

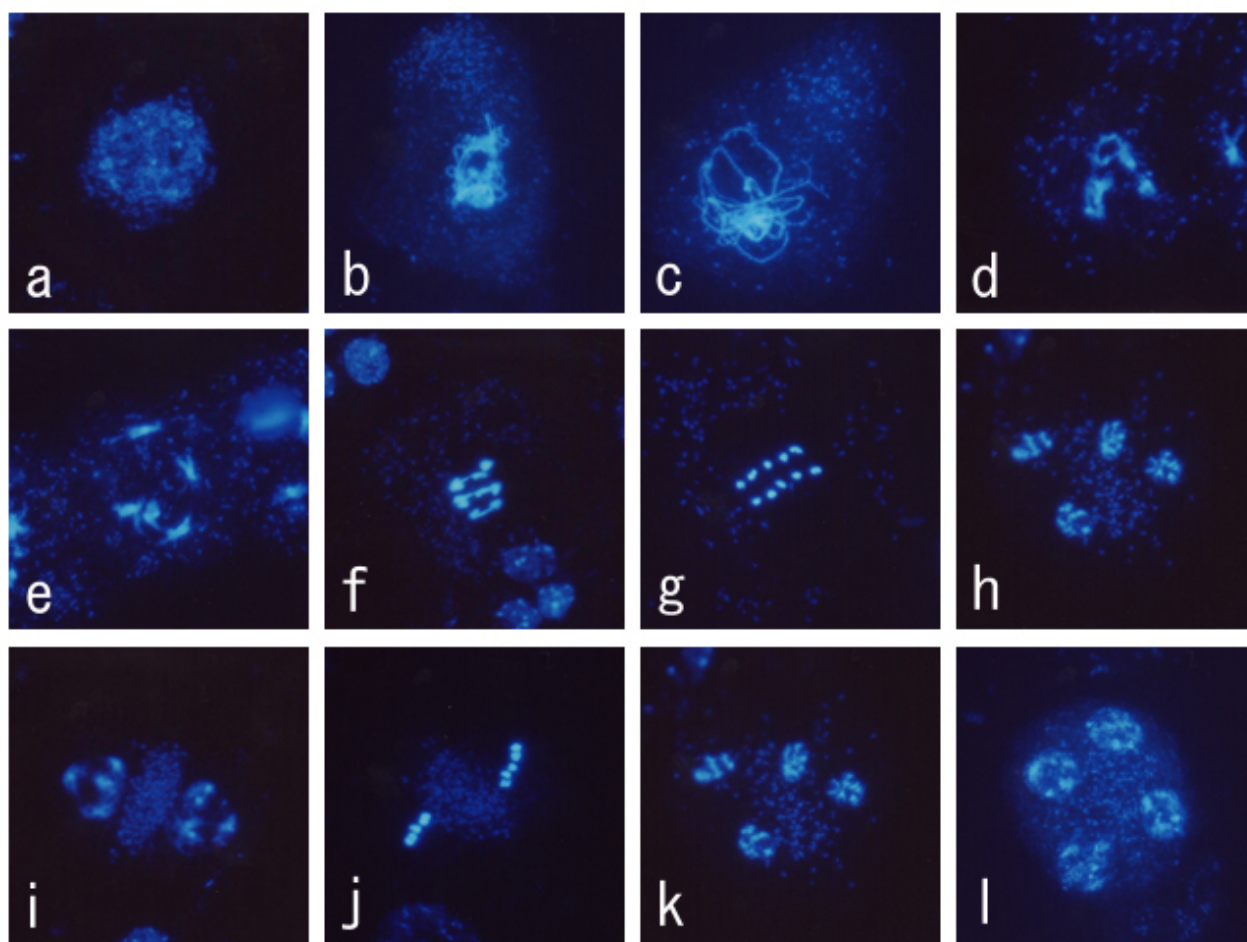


図1. 二倍体シロイヌナズナ (*Ler*) の花粉母細胞の減数分裂期の染色体. 野生型シロイヌナズナの花序を採取し、ファーマー液で一晩固定した. 適当な大きさの蕾を選んで消化展開法で試料を作成し、DAPIで染色して蛍光顕微鏡で観察した. a. レプトテン期, b. サイゴテン期, c. パキテン期, d. ディプロテン期, e. ディアキネシス期, f. 第一分裂中期, g. 第一分裂後期, h. 第一分裂終期, i. 第二分裂前期, j. 第二分裂中期, k. 第二分裂後期, l. 第二分裂終期.

消化展開法

花粉母細胞の染色体試料作製は Azumi らの方法に従った¹⁾。固定した試料を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) 中で洗った後、cytohelicase (Sigma)、cellulase “ONOZUKA” R-10 (Yakult)、pectolyase (Kikkoman) (各 0.4% (w/v)) を含む同緩衝液中、適宜脱気をしながら、37°C 3 時間保温し、細胞壁を消化した。同緩衝液で洗った後、4°C で保存した。

消化した花序をシャーレ上の 60% 酢酸中に移した後、適当な大きさの蕾を取り出し、同じく 60% 酢酸を滴下したスライドガラス上で解剖した。葯をつぶして花粉母細胞を拡散させたのち、45°C のホットプレート上に 1 分間静置した。氷冷したファーマー液を周囲に滴下し、緩やかに混和させた後、ファーマー液を捨て、スライドを乾燥させた。DAPI 溶液 (Vector) を滴下し、カバーガラスを載せた後、顕微鏡 (オリンパス B X61) で観察した。

コルヒチン処理による 4 倍体系統の作出

GMA 培地プレート上にシロイヌナズ Col と Ler の野生株の種子を播種し、無菌的に育てた。3 枚目の本葉が展開し始めたところで、プレートの蓋を開けて植物体の茎頂にコルヒチンゲル (低融点アガロース 1%、コルヒチン 0.5%) を 5 μ l をのせ、蓋を閉じて三日間静置後、コルヒチンゲルを除去してから植物体をバーミキュライトの入ったポットに植え替えた。そのまま育成し、四つ又、五つ又状のトリコムが多く観察された個体から種子を採集した。この種子を播種・育成して葉を採集し、Johnstonet らの方法²⁾に従い、チョッピング法を用いてフローサイトメーター (Ploidy Analyser PA) で倍数性を調べ、四倍体の選抜を行った。少なくともコルヒチン処理後第三世代までは同様の方法で倍数性を調べ、染色体の倍加が安定していることを確認した上で、四倍体系統として実験に用いた。

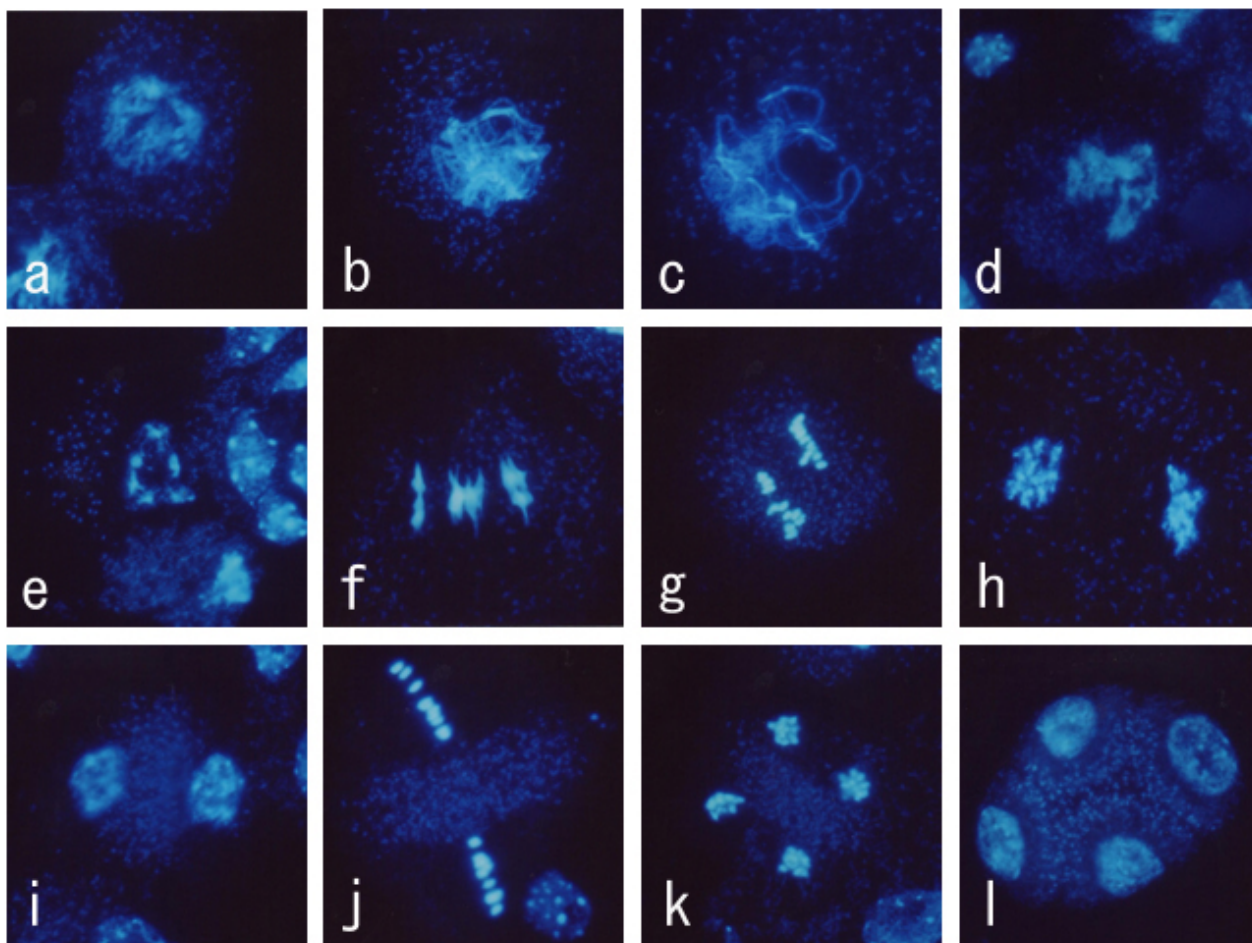


図 2. 四倍体 *Ler* の花粉母細胞の減数分裂期染色体. a. レプトテン期, b. ザイゴテン期, c. パキテン期, d. ディプロテン期, e. ディアキネシス期, f. ; 第一分裂中期, g. 第一分裂後期, h. 第一分裂終期, i. 第二分裂前期, j. 第二分裂中期, k. 第二分裂後期, l. 第二分裂終期.

結果と討論

四倍体 Col, Ler の植物体の成長

四倍体の植物は栄養成長期においては二倍体と同じく良好に成長し、成長速度に違いは見られなかった。葉の形・枚数、草丈も二倍体と同じで異常は見られなかったが、四倍体の茎の太さや葉の大きさは二倍体のものより増大していることがわかった。生殖成長期においても、萼、花卉、雄蕊、雌蕊の花器官の分化では、形や数に異常は見られなかったが、四倍体の角果は、二倍体と比較して明らかに大きく成長していた。

二倍体 Ler の染色体観察

細胞壁を消化した後、スライドガラス上に染色体を展開する消化展開法によって染色体試料を作製した。二倍体シロイヌナズナの減数分裂期染色体に関しては Ross らの報告³⁾以降、減数分裂変異体を含めいくつかの報告がある^{4,5,6)}。概略を説明すると以下のようになる。第一分裂前期では、糸状に染色体が観察

され始めたレプトテン期 (Fig.1a)、ペアリングが起きていると予想されるザイゴテン期 (Fig.1b)、対合が完成したパキテン期 (Fig.1c)、シナプトネマ構造が崩壊してゆく過程のディプロテン期 (Fig.1d)、凝縮がほぼ完成したディアキネシス期 (Fig.1e) などが観察された。また、第一分裂中期から第二分裂終期までの相同染色体が分離し脱凝縮してゆく様子も観察される (Fig.1f~l)。第一分裂中期 (Fig.1f) では、どの細胞においても赤道面に整列した 5 組の二価染色体が、第二分裂中期 (Fig.1j) ではオルガネラバンドによって隔てられた 5 本ずつの染色体が鮮明に観察される。

四倍体 Ler の染色体観察

第一減数分裂において、この四倍体ではレプトテン期を見ても二倍体のものより染色体の量が増えていることは蛍光量から明らかであった。レプトテン期 (Fig.2a)、ザイゴテン期 (Fig.2b)、パキテン期 (Fig.2c) と分裂が進むにつれ染色体量の違いがよ

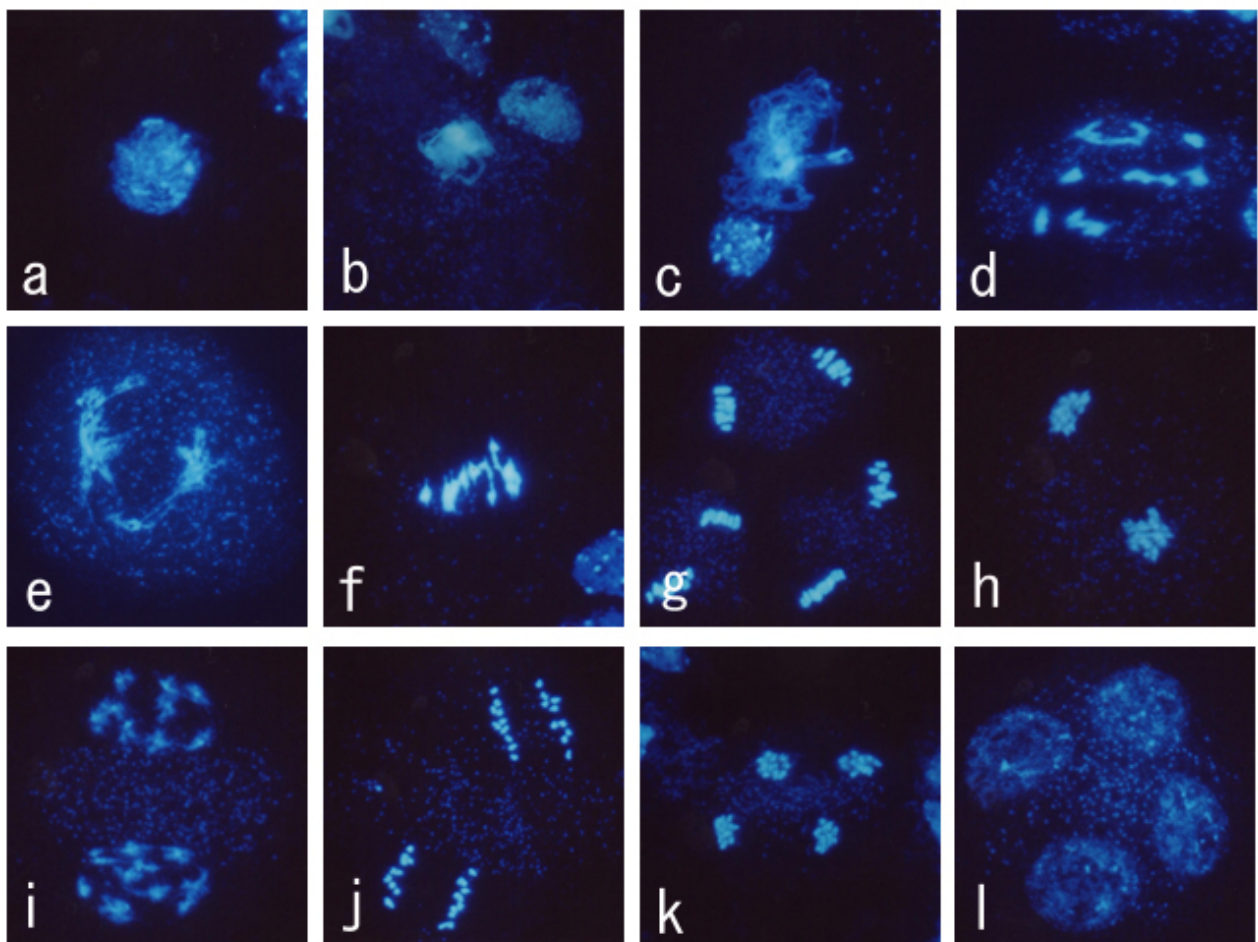


図 3. 四倍体 Col の花粉母細胞の減数分裂期染色体. a. レプトテン期, b. ザイゴテン期, c. パキテン期, d. ディプロテン期, e. ディアキネシス期, f. 第一分裂中期, g. 第一分裂後期, h. 第一分裂終期, i. 第二分裂前期, j. 第二分裂後期初期, k. 第二分裂後期, l. 第二分裂終期.

り顕著となり、第一分裂中期において約 10 本の凝縮した二価染色体を数える事ができた (Fig.2f)。その後、第一分裂後期から終期にかけて両極に 10 本ずつの染色体移動しているのが確認された (Fig.2g~h)。これらのことは二倍体のもつ 10 本の染色体が全てそろって倍加していることを裏付けている。染色体の分配に異常は確認されなかった。

第二分裂中期から後期にかけて、二倍体では 5 本ずつの染色体が整列し姉妹染色体に分離するのに対し、この変異体では 10 本ずつの染色体が整列し、姉妹染色体に分離するのが確認された (Fig.2j)。第二分裂後期で移動を完了した染色体は終期 (Fig.2l) で正確な四分子体を形成した。

他の特徴としては、染色体数の違いからか四倍体の花粉母細胞は二倍体のそれと比較してかなり大きいということであった。この四倍体はその後、野生型よりも大きな角果を付け、種子は正常に発芽した。

四倍体 Col の染色体観察

四倍体 *Ler* と同様に、減数第一分裂前期から二倍体と比較して染色体の量は明らかに多いのが見て取れた (Fig.3a~e)。第一分裂中期のほとんどの細胞で 10 組の二価染色体が観察され (Fig.3f)、分離などに顕著な異常は観察されなかった。

減数第二分裂では中期から後期にかけて (Fig.3j~k) 姉妹染色体が紡錘糸に分離していく様子が観察され、このときの染色体数は 40 本であった。終期 (Fig.3l) には四分子体を形成し減数分裂を完了したことから、第二分裂の染色体の挙動も四倍体 *Ler* と同様であると考えられる。

この四倍体は成長すると四倍体 *Ler* よりさらに長大な角果を作り、種子は正常に発芽した。

まとめ

二倍体 *Ler*、四倍体 *Ler*、及び四倍体 Col の減数分裂期染色体を比較・解析した。第一分裂中期に細胞の赤道面に集まった染色体については、二倍体と四倍体の *Ler*、及び四倍体 Col の染色体数以外に目立った違いが見られなかった (二倍体で約 5 組、四倍体ではいずれも 10 組の二価染色体)。第一分裂後期には同じ数の染色体が両極へ正確に分配された。また、第二分裂中期においても二倍体と四倍体の間では染色体数の違い (二倍体では染色体は 5 本ずつ、四倍体では染色体は 10 本ずつ) 以外には特に相違

が見られなかった。終期に形成される四分子はそれぞれ正常な 4 つの小孢子となっていることが観察された。さらにこれらの四倍体は *Ler*、Col のいずれでも発芽可能な種子を付ける。これらの事から、コルヒチン処理によって倍加した染色体は減数分裂時に二倍体の染色体と同じように挙動を示し、減数分裂過程を正常に終了していると考えられる。すなわち、1 つの核相 $2n$ の母細胞から 4 つの核相 n の娘細胞が形成されるという減数分裂の機能には染色体数が単純に倍加しても影響は無いものと考えられる。四倍体では相同染色体が対合するとき、対合する相手が複数存在することになり、一つの染色体が 2 つあるいは 3 つの相同染色体と相同組換えを起こす可能性もあるように思えるが、混乱が生じないのはなぜだろうか。3 つ以上の染色体が絡むようなキアズマができないようにする仕組みがあるのならば、非常に興味深い。

謝辞

倍数体の作出については東京大学の杉山宗隆博士に御助力頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。本研究は神奈川大学総合理学研究所協同研究助成のもとに行われました。

文献

- 1) Azumi Y, Toyama T, Igarashi A and Suzuki H (2001) A sensitive fluorescence *in situ* hybridization procedure applicable to whole stages of male meiosis of *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Sci.* **5**: 1-6.
- 2) Johnston JS, Bennett MD and Price HJ (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei *Am. J. Bot.* **86**: 609-613.
- 3) Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**: 507-516.
- 4) Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001) *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589-600.
- 5) Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006) *Arabidopsis SPO11-2* functions with *SPO11-1* in meiotic recombination. *Plant J.* **48**: 206-216.
- 6) Azumi Y, Liu D, Zhao D, Li W, Wang G, Hu Y and Ma H (2002) Homolog interaction during meiotic prophase I in *Arabidopsis* requires the *SOLO DANCERS* gene encoding a novel cyclin-like protein. *EMBO J.* **21**: 3081-309.

■短 報■ 2006 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

海産無脊椎動物の相互作用と形態・適応の進化、
および、人間活動がこれらに与える影響
— 相模湾平塚沖浅海の貝類と海底環境 —

大和田正人^{1,3} 吉田奈央¹ 佐藤武宏² 金沢謙一

Morphological and Adaptational Evolution Caused by Interaction between
Marine Invertebrates, and the Effect of Human Activity on It
— Mollusks and Bottom Environment in the Shallow Water of
Sagami Bay off Hiratsuka —

Masato Owada^{1,3}, Nao Yoshida¹ Takehiro Sato² and Ken'ichi Kanazawa

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, 2946 Tsuchiya, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: pt125365@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Mollusks and bottom sediment were collected by dredging Sagami Bay off Hiratsuka at depths of 6 to 43 m. Five hundred forty specimens belonging to 51 species were obtained. All were warm water species, 45 of which are known only around Japan and 6 of which are distributed from Japan to equatorial regions. Two tropical species, *Barbarca tenella* (Reeve) and *Melanella cf. carchedon* (Iredale), have not hitherto been reported in Sagami Bay; all specimens were juvenile and they are presumably unable to survive the low water temperature in winter. The seafloor at 6 to 13 m deep appears to be often turbulent and active burrowing mollusks such as *Umbonium costatum* (Valenciennes), *Glossaulax didyma* (Roding) and *Olivella japonica* Pilsbry live there. The bottom sediment at depths of around 20 m is mainly composed of very fine- to fine-grained sand, in which *Glycymeris imperialis* Kuroda, *Nitidotellina hokkaidoensis* (Habe) and *Lyonsia ventricosa* Gould are dominant. The sediment also includes pebbles, on which sessile bivalves like *Mytilus galloprovincialis* Lamark and *Barbarca tenella* (Reeve) are attached, indicating a low sedimentation rate. The substrate around 40 m deep is very fine-grained sand with 24% mud content, in which *Episiphon subroctum* Joffreys and *Cardiomya gouldiana* (Hinds) are dominant.

Keywords: mollusks, environment, sediment, Sagami Bay

序論

相模湾産の貝類については、昭和天皇陛下が御採集遊ばされた標本を中心に戦前から研究があり¹⁾、戦後、生物学御研究所編纂の「相模湾産貝類」²⁾の出版により集大成された。また、1950年代から、東京大学の調査船臨海丸や淡青丸、中央水産研究所の調査船蒼鷹丸などにより採集された貝類について幾つかの報告があり^{3) 4) 5)}、これらの研究により、相模湾に生息する貝類の種類と分布についてはかなり詳しくわかってきた。しかし、これらの研究の主体は、東部の三浦半島周辺、西部の伊豆半島周辺、或は相

模灘に至るやや水深のある海域であり、中央北部の浅海底棲貝類についての調査は十分に行われていない。また、海底環境については、海底堆積物の解析が同時に行われることは稀であり、底生生物にとって重要な底質の状態と貝類相の関係はよく掴めていない。平塚市漁業協同組合によれば、近年、平塚沿岸の底質が泥がちになり、チョウセンハマグリ等の砂底を好む貝類が激減しているという。そこで本研究では、相模湾北部平塚沖の浅海域における貝類の生息状況と海底環境を調べた。

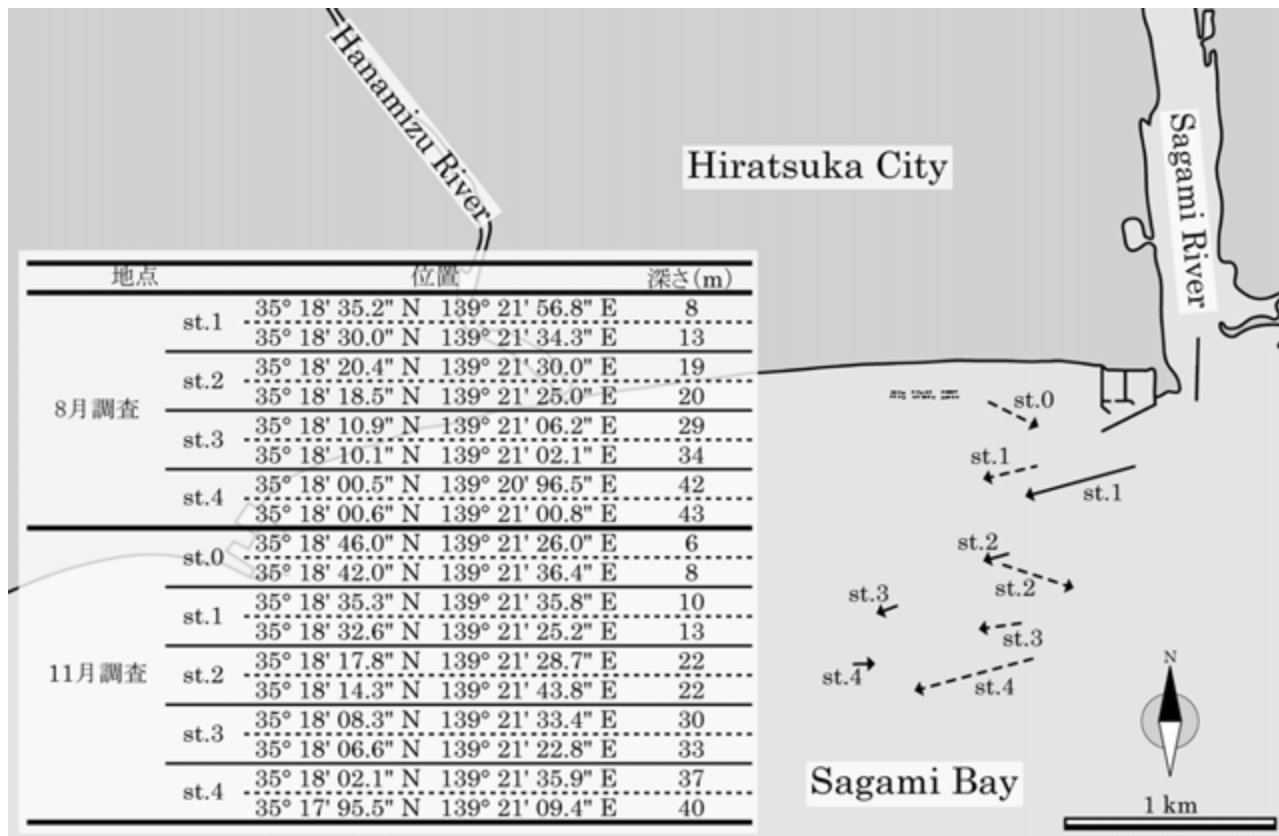


図 1. ドレッジによる採集場所. 矢印の元は投入場所、先は回収場所を示す. 実線の矢印は 8 月調査, 破線の矢印は 11 月調査を示す. 表には投入場所 (上段) と回収場所 (下段) の緯度, 経度, 水深が示してある.

材料と方法

2006 年の 8 月 1 日と 11 月 16 日の 2 回、平塚沖の水深 6~43 m の海域で調査を行った。漁船をチャーターし、水深 6~8 m (st.0)、8~13 m (st.1)、19~22 m (st.2)、29~34 m (st.3)、37~43 m (st.4) でドレッジを行い、底生生物と海底堆積物を採取した (図 1)。生物採集用には、間口 100×20 cm、袋部のメッシュサイズ 5 mm (8 月調査)、20 mm (11 月調査) の簡易ドレッジ (5121-C; 離合社製) を用いた。堆積物採取用には円筒形ドレッジ (直径 17 cm 長さ 42 cm、離合社製) を用い、これを簡易ドレッジの袋部の後ろに連結し、生物と同時に堆積物を採取できるようにした。採集した貝類は全て実験室に持ち帰り、20% ホルマリンまたは 100% エタノールで固定した。堆積物は塩分を除去した後に乾燥させ、篩により粒度分析を行った。

結果

貝類

8 月の調査では、腹足綱 15 種、二枚貝綱 25 種、掘足綱 3 種の合計 43 種 645 個体 (生貝) の貝類を採集した。11 月の調査では、腹足綱 7 種、二枚貝綱 12 種、掘足綱 2 種の合計 21 種 95 個体 (生貝) の貝類を採集した。調査全体で採集した貝類は腹足綱

18 種、二枚貝綱 30 種、掘足綱 3 種の合計 51 種 740 個体 (生貝) であった (表 1)。採集した貝類を分布域ごとにまとめたものは表 2 に示してある。

海底堆積物

海底堆積物の粒度分析結果は図 3 に示してある。水深 6~8 m は含泥率 1.3 %の細粒~中粒砂を主体とした砂底、8~13 m は含泥率 2.2 %の細粒~極細粒砂を主体とした砂底、水深 22 m 付近は、含泥率 3.5 %の細粒~極細粒砂を主体とした砂底、水深 29~34 m は含泥率 7.1%の極細粒~細粒砂を主体とした泥質砂底、水深 37~43 m は含泥率 24.0%の極細粒砂を主体とした泥質砂底であった。

討論

今回、平塚沖浅海で採集された貝類 51 種はすべてが暖流系種であり、そのうちの 88.2%の 45 種が日本周辺を分布域とし、11.8%の 6 種が赤道海域にまで及ぶ分布域をもっている。房総半島より北にのみ分布する寒流系種は 1 種も見られなかった。暖流系種のうち、ハブタエエガイとヒメセトモノガイの 2 種は、これまで紀伊半島以南に分布するとされ、相模湾からの報告はなかった。ハブタエエガイは 8 月の調査で 145 個体が採集されたが、すべて殻長 14

表 1. 平塚沖浅海でドレッジにより採集された貝類

	学名	和名	st.0	st.1	st.2	st.3	st.4	総個体数	分布域	
腹足綱	<i>Umbonium costatum</i> (Valenciennes, 1838)	キサゴ	6					6	北海道南部~九州	
	<i>Crepidula onyx</i> Sowerby, 1814	シマメノウフネガイ				16	9	25	北海道南部~九州	
	<i>Glossaulax didyma</i> (Röding, 1798)	ツメタガイ	8	1	2	1	2	14	北海道南部~沖縄	
	<i>Epitonium aculeatum</i> (Sowerby, 1844)	トゲシノブガイ			1		1	2	房総半島以南	
	<i>Epitonium gracile</i> (Sowerby, 1844)	シノブガイ			5	1		6	房総半島以南	
	<i>Epitonium cf. carchedon</i> (Iredale, 1936)	cf. ホソマキスジイトカケ			5	1		6	房総半島~九州	
	<i>Melanella cf. bovicornu</i> (Pilsbry, 1905)	cf. ヒメセトモノガイ			1			1	紀伊半島~沖縄	
	<i>Zeuxis castus</i> (Gould, 1850)	ハナムシロ					2	2	北海道南部~沖縄	
	<i>Fusinus perplexus</i> (A. Adams, 1864)	ナガニシ					1	6	北海道南部~九州	
	<i>Olivella japonica</i> Pilsbry, 1895	ホタルガイ	3	30	2			35	房総半島~九州	
	<i>Cancellaria spengleriana</i> Deshayes, 1830	コロモガイ			1			1	北海道南部~沖縄	
	<i>Tomopleura nivea</i> (Philippi, 1851)	マキモノシャジク			1		1	2	房総半島以南	
	<i>Lophotoma leucotropis</i> (A. Adams & Reeve, 1850)	クダマキガイ				1	1	6	房総半島~沖縄	
	<i>Pseudotrema fortitrata</i> (E. A. Smith, 1879)	ホソシャジクガイ			5	2		7	北海道南部~九州	
	<i>Breviamyrella japonica</i> (E. A. Smith, 1873)	ヒメトクサ			15			15	北海道南部~九州	
	<i>Tarboanilla kidoensis</i> (Yokoyama, 1922)	キドイトカケギリ			4			4	相模湾~九州	
	<i>Acteon cf. soyase</i> Habe, 1961	cf. ソウヨウウキジビガイ			2			2	房総半島~九州	
	<i>Eocylichna braunsi</i> (Yokoyama, 1920)	ツマベニクダタマガイ				1		1	北海道南部~沖縄	
	二枚貝綱	<i>Jupiteria confusa</i> (Hanley, 1860)	ゲンロクソデガイ			5	6		14	房総半島~沖縄
		<i>Barbarca tenella</i> (Reeve, 1844)	ハブタエエガイ		3	140	1	1	145	紀伊半島~沖縄
<i>Scapharca satowi</i> (Dunker, 1882)		サトウガイ	2					2	房総半島~九州	
<i>Dilvarca ferruginea</i> (Reeve, 1844)		ハゴロモガイ					1	1	房総半島~沖縄	
<i>Glycymeris imperialis</i> Kuroda, 1934		ミタマキガイ			7	23	5	40	北海道南部~九州	
<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamark, 1818		ムラサキガイ		10	3			13	北海道南部~九州	
<i>Modiolus metcalfei</i> (Hanley, 1843)		コケガラス			1			1	房総半島以南	
<i>Modiolus flavidus</i> (Dunker, 1857)		サザナミマクラ			3	7	12	22	房総半島以南	
<i>Musculista japonica</i> (Dunker, 1857)		ヤマホトギス					1	1	房総半島以南	
<i>Musculista senhousia</i> (Benson, 1842)		ホトギスガイ			1			1	北海道南部~九州	
<i>Pecten albicans</i> (Schröter, 1802)		イタヤガイ					1	1	北海道南部~九州	
<i>Laevicardium undatopictum</i> (Pilsbry, 1904)		マダラチゴトリガイ			2			2	房総半島~沖縄	
<i>Mactra chinensis</i> Philippi, 1846		バカガイ	3	5				8	北海道南部~九州	
<i>Mactra nipponica</i> Kuroda & Habe in Kuroda, Habe & Oyama, 1971		チゴバカガイ		8	6	1		15	房総半島~沖縄	
<i>Raetellops pulchellus</i> (Adams & Reeve, 1850)		チヨノハナガイ			2			2	北海道南部~九州	
<i>Exotica tokubei</i> (Habe, 1961)		コメザクラ		1	7	3		11	房総半島~沖縄	
<i>Nitidotellina hokkaidoensis</i> (Habe, 1961)		サクラガイ			48	1		49	北海道南部~沖縄	
<i>Leptomya cuspidariaeformis</i> Habe, 1952		コチョウシヤクシ					2	2	房総半島~沖縄	
<i>Siliqua pulchella</i> (Dunker, 1852)		ミゾガイ			2			2	房総半島~九州	
<i>Placamen tiara</i> (Dillwyn, 1817)		ハナガイ		1	19	5	12	39	房総半島~九州	
<i>Veremolpa micra</i> (Pilsbry, 1904)		ヒメカノコアサリ		4	10	1		16	房総半島~沖縄	
<i>Pitar japonicus</i> Kuroda & Kawamoto in Kawamoto, 1956		ウスハマグリ			2	4	2	8	房総半島~九州	
<i>Phacosoma japonicum</i> (Reeve, 1850)		カガミガイ		1	2			3	北海道南部~九州	
<i>Paphia vernicosa</i> (Gould, 1861)		アケガイ					1	1	北海道南部~九州	
<i>Callista chinensis</i> (Holten, 1803)		マツヤマワスレ		2	8	2	1	14	房総半島~九州	
<i>Cyclosunetta menstrualis</i> (Menke, 1843)		ワスレガイ	4					4	房総半島~沖縄	
<i>Solidicorbula erythrodon</i> (Lamark, 1818)		クチベニガイ		2	8	2		12	房総半島~沖縄	
<i>Lyonsia ventricosa</i> Gould, 1861		サザナミガイ			78	10		88	北海道南部~九州	
<i>Cuspidaria nobilis</i> (A. Adams, 1864)		オオシヤクシガイ					1	1	房総半島~九州	
<i>Cardiomya gouldiana</i> (Hinds, 1843)		ヒメシヤクシ					15	15	房総半島~沖縄	
腕足綱		<i>Dentalium octangulatum</i> Donovan, 1804	ヤカドツノガイ				1	1	4	北海道南部~沖縄
		<i>Fustiaria nipponica</i> (Yokoyama, 1922)	サケツノガイ				1	1	1	房総半島~九州
		<i>Episiphon subrectum</i> (Jeffreys, 1883)	ロウソクツノガイ		2	25	20	1	61	北海道南部~沖縄

st.0~st.4 は採集場所を示す。上段は8月調査, 下段は11月調査。分布域は文献6, 7, 8に基づく。

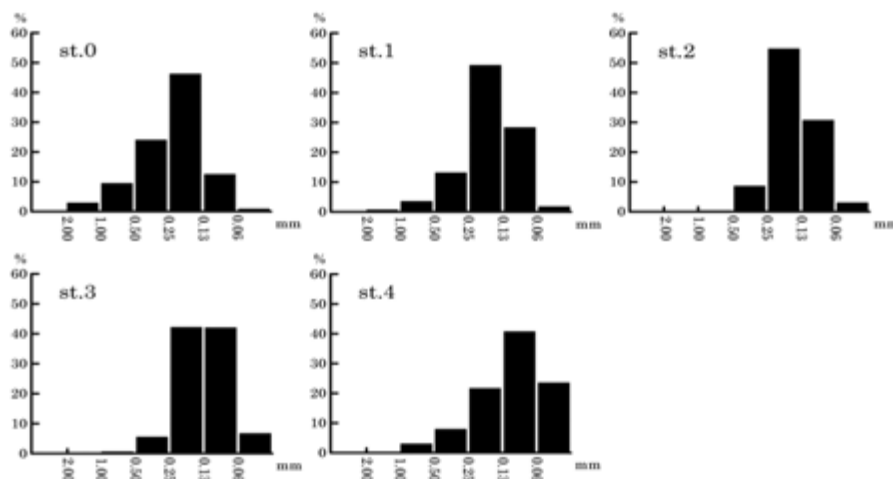


図 2. 11 月調査で採集した堆積物の粒度組成. st.0~st.4 は採集場所, 横軸は粒径, 縦軸は重量%を示す.

mm 未満の幼貝であり、死殻もこれと同様であった。また、ヒメセトモノガイは 1 個体のみが採集された。これらの貝は、黒潮と共に平塚沖に流入するが、冬季の低水温に耐えることができず、性成熟に達する前に斃死すると考えられる。海底環境を堆積物の粒度組成と貝類の生活様式から見てみる。水深 15 m 付近までの底質は泥分をほとんど含まない細粒～中粒砂であり、キサゴ、ツメタガイ、ホタルガイなどの内生性で運動能力の高い貝類が多く生息している。このことから、この水深の海底は波浪等による水流のために表層堆積物が流動しやすい環境だと考えられる。水深 20 m 付近の底質は細粒～極細粒砂であったが、中礫と細礫を少量含み、ムラサキガイやハブタエガイなどの固着性の貝類が足糸でこれらの礫に付着していた。また、ミタマキガイ、サクラガイ、サザナミガイなどの内生性で泥質砂底を好む貝類も多く見られた。これらのことから、この水深の海底は堆積速度が遅く、強い水流がほとんど生じない安定した環境だと

考えられる。水深 40 m 付近の底質は含泥率が高く極細粒砂主体で、ロウソクツノガイ、ヒメシャクシなどの内生性で泥底を好む貝類が多く、また固着性のサザナミマクラが見られた。したがって、この水深の海底は定常的に水流が極めて弱く、泥が堆積しやすい環境だと考えられる。

表 2. 採集した貝類の地理的分布

	種数	割合 (%)	個体数	割合 (%)
紀伊半島～沖縄	2	3.9	146	19.7
房総半島以南	6	11.8	34	4.6
房総半島～沖縄	11	21.6	98	13.2
房総半島～九州	11	21.6	114	15.4
北海道南部～沖縄	7	13.7	132	17.8
北海道南部～九州	14	27.5	216	29.2
合計	51	100.0	740	100.0

漁業関係者が指摘していたチョウセンハマグリやキサゴの減少は確かにあるようで、今回のドレッジでチョウセンハマグリは 1 個体も採集されなかった。しかし、水深 10 m 付近の海底堆積物の含泥率は極めて低く、泥分とこれらの貝類の減少との因果関係は現時点では明らかではない。

謝辞

貝類の同定にあたっては、速水格東京大学名誉教授の御教示を賜った。ドレッジでは、平塚市漁業協同組合の田中邦男氏の御協力を賜った。これらの方々に心より感謝申し上げる。本研究は神奈川大学総合理学研究所の助成により行われた。

文献

- 1) 黒田徳米(1934) 御採集にかゝる相模湾産稀貝類. *ヅキナス* 4: 204-208.
- 2) 黒田徳米、波部忠重、大山桂 (1971) *相模湾産貝類*. 生物学御研究所編, 丸善, 東京. pp. 489.
- 3) Horikoshi M (1957) Note on the molluscan fauna of Sagami Bay and its adjacent waters, *Sci. Rep. Yokohama National Univ., Section II*, 6: 37-64.
- 4) 奥谷喬司 (2006) 2002～2004 年に相模湾の陸棚・斜面および漸深海帯から採集された原鰓類および異鰓類 (二枚貝綱). *国立科学博物館専報* 40: 295-306.
- 5) 長谷川和範 (2006) 2001 年から 2004 年に主に東京大学臨海丸によって採集された三浦半島周辺の潮下帯および漸深海帯性有殻腹足類. *国立科学博物館専報* 40: 225-281.
- 6) Oyama K (1973) Revision of Matajiro Yokoyama's type mollusca from the tertiary and quaternary of Kanto area. *Palaeontological Society of Japan, Special Papers* 17:1-148.
- 7) 奥谷喬司 (1986) *決定版生物大図鑑 貝類*. 世界文化社, 東京. p. 399.
- 8) 奥谷喬司 (2000) *日本近海産貝類図鑑*. 東海大学出版, 東京. p. 1173

■報告書■ 2006年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

ホタルの生物発光とそれらに関連する化学発光の機構解明

松本正勝^{1,3} 渡辺信子¹ 大橋 守¹ 藤森 憲²

Mechanistic Study on Bioluminescence of Fireflies and Related Chemiluminescence

Masakatsu Matsumoto^{1,3}, Nobuko Watanabe¹, Mamoru Ohashi¹,
and Ken Fujimori²

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

² Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

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

Abstract: A dioxetane bearing a phenoxide anion decomposes with the accompanying emission of light, effectively by the intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence (CTICL) mechanism, by which the bioluminescence of fireflies has been believed to take place through an intermediary dioxetanone. In the course of our investigation of highly effective dioxetane-based chemiluminescent substrates, bicyclic dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl moiety substituted with a 5-aryl, such as naphthalen-1-yl, carbazol-9-yl, indol-1-yl, and benzotriazol-1-yl, were synthesized. Base-induced decomposition of these dioxetanes displayed intense light, the maximum wavelength of which changed depending on the crown ether complex used as a base. As a further development, we realized four optically isomeric bicyclic dioxetanes bearing a 2-hydroxy-1,1'-binaphthyl-4-yl moiety. These isomeric dioxetanes were decomposed with the accompanying emission of light on treatment with three base systems. The chemiluminescence efficiencies of all isomers were practically the same for tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in the DMSO system, whereas they split into two diastereomer-groups for 18-crown-6 ether complex of t-BuOK in the benzene-THF system. For the base system using t-BuOK complex of optically active crown ether, the chemiluminescence efficiencies split further into four. The shape of the chemiluminescence spectrum, maximum wavelength, and rate of decomposition were also different between each of the four stereoisomers.

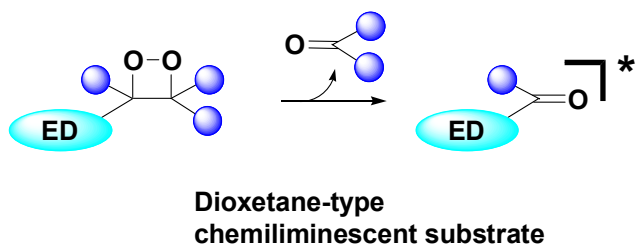
Keywords: chemiluminescence, bioluminescence, dioxetane

序論

ホタルやヒカリコメツキなど発光昆虫は同一のルシフェリンを基質とするにもかかわらず、緑色から赤色にわたる光を放つ。このような生物発光における色調変調はその分子機構に対する興味だけでなく医療や生化学分析への応用という視点から最近多大の関心を集めている。

これら昆虫の生物発光の機構は、酵素ルシフェラーゼの触媒作用によるルシフェリンの酸化、それにより生成する高エネルギー中間体の一重項励起

オキシルシフェリンへの分解、が鍵となっている。一方、われわれは生物発光における高エネルギー中間体の基本骨格である4員環ペルオキシド、すなわちジオキセタン、を化学発光化合物として人工的に創り出し、その化学励起機構についても明らかにする研究を行ってきた。その結果多くの生物発光に匹敵する発光効率を有する基質の創出に成功しているが、ここでは、もう一つの大きな研究課題である色調変調を起こす化学発光基質の創出について報



告するとともに、その研究を通じて得た知見を基礎にした生物発光における色調変調機構についてもふれる。

結果と考察

1. 4-アリール-3-ヒドロキシフェニル基を有するジオキセタンの発光

4-(アントラセン-9-イル)-3-ヒドロキシフェニル基を有するジオキセタン **1** がクラウンエーテルなどの配位場系において黄色から真紅までの発光色調の変調を起こすことはすでに報告している。このような研究の一環として、3-ヒドロキシ-4-(ナフタレン-2-イル)-フェニル **2, 3**、4-(カルバゾール-9-イル)-3-ヒドロキシフェニル **4**、4-(インドール-1-イル)-3-ヒド

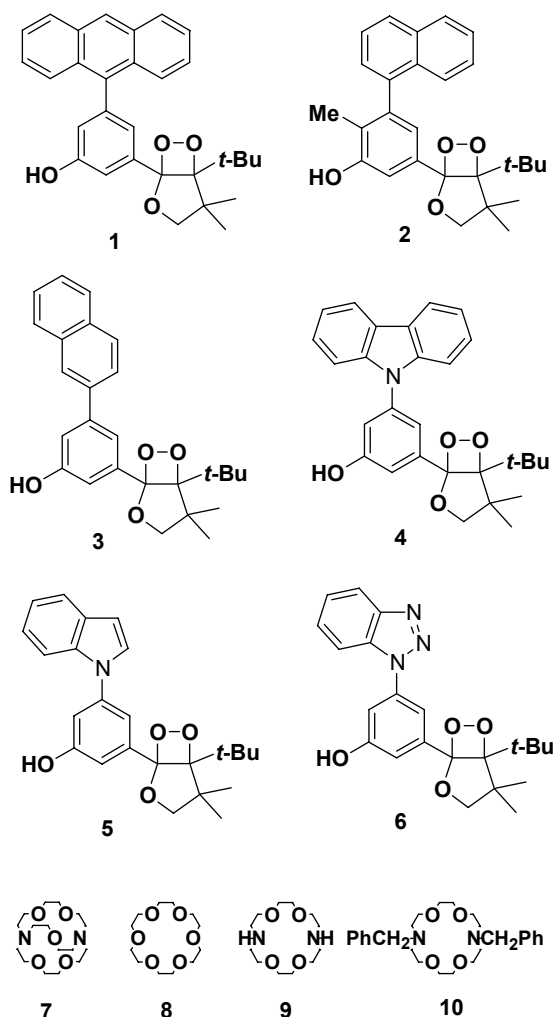


図1. アリールフェニル置換ジオキセタン。

ロキシフェニル **5**、4-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-3-ヒドロキシフェニル **6** などを有するジオキセタンを設計・合成し、それらの完全な均一系、そして配位場系における発光について調べた(図1)。

その結果、クラウンエーテル **7~10** との配位場系においては、クラウンエーテルの嵩高さのアリールフェノール基中のアリールの嵩高さに応じて色調変調の起こることを見出した。また、通常の均一系での発光においては、発光スペクトルと標品となるエミッターの蛍光は一致するが、これらアリールフェノール置換ジオキセタンの配位場系における発光では、発光と蛍光のスペクトルは一致しないことが分かった。このような現象は、発光がジオキセタンの分解から励起カルボニルを生成するまでの化学反応における過渡的な姿を反映していることを示唆するものである(図2)。

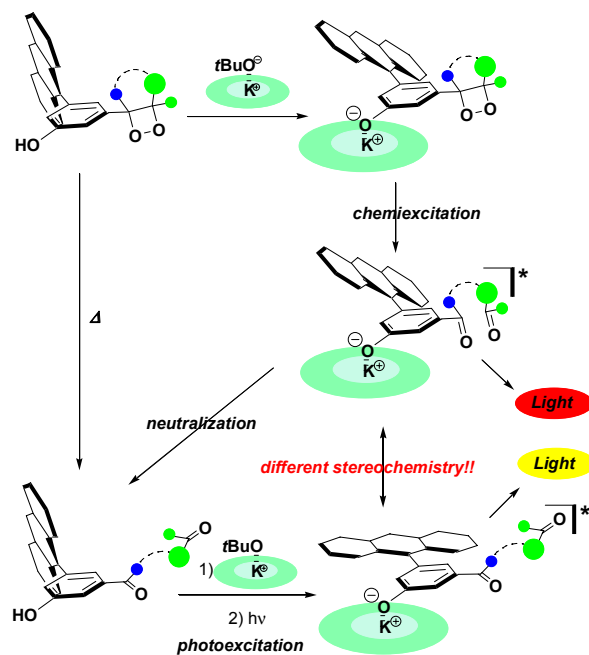


図2. ビアリール置換ジオキセタンの発光色調の変調機構。

アニソトロピックな微視的環境に応答する色調変調型ジオキセタンの創出

先述のアリール置換フェノール基を有するジオキセタンの色調変調の仕組みとビナフチル骨格が軸性不斉を発現することを基礎にして、2-ヒドロキシ-1,1'-ナフチル-4-イル基を有する双環性ジオキセタン **11** の光学異性体4種すべて、すなわち (*Ra,1R,5R*)体、(*Ra,1S,5S*)体、(*Sa,1S,5S*)体、(*Sa,1R,5R*)体を合成した。完全な均一系 (TBAF / DMSO) および光学活性でない配位場系 (18-crown-6 エーテルの *t*BuOK 錯体、[Kc(18C6)]+*t*-BuO-) においては、これらの異性体は異性体間で相違のない発光スペクトル

ルを示した。一方、光学活性な配位場系（ビスピナフトクラウン・エーテルの *t*-BuOK 錯体、 $[Kc(12)]+t\text{-BuO}^-$ ）においては、4種の異性体はそれぞれ異なる形の発光スペクトルを与えた(図3)。また、光学活性な配位場系を構築するために用いている光学活性クラウンエーテルをそのエナンチオマーに変えた配位場系においては、4種の発光スペクトルの形は反転的に入れ替わった。これらの結果は、光学活性ジオキセタン **11** が光学活性クラウンエーテルという分子を認識しながら分解発光することを示している。しかし発光スペクトルの違いの程度は光学活性ジオキセタン **13** の発光の場合ほど顕著ではなかった(図4)。特筆すべき特徴は発光スペクトル

ルではなく、発光の効率に見られた。すなわち、完全な均一系においては、4種の異性体間で差異が認められないのに対し、光学活性でない配位場系においてはジアステレオマー間で発光効率が異なった。さらに光学活性な配位場系においては、発光効率は光学異性体に応じて4つに分裂した。また、発光スペクトルとエミッターの蛍光スペクトルの乖離は、光学活性であろうとなかろうと配位場系において認められた。

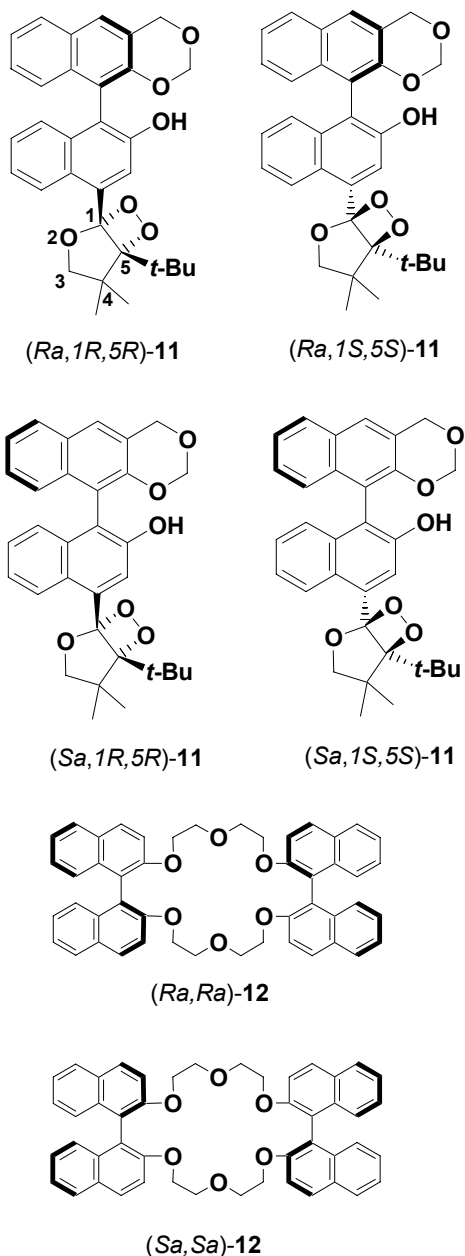


図3. 光学活性なピナフトル置換ジオキセタン。

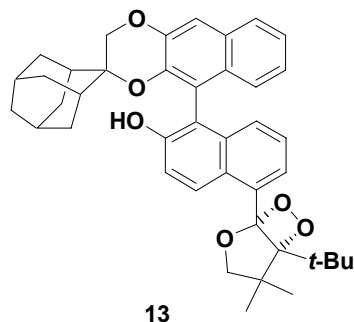


図4. 光学活性ジオキセタン。

昆虫の生物発光の色調変調機構について

ホタルなどの生物発光は序論でも少しふれたが、図5のようなメカニズムで起こるとされている。

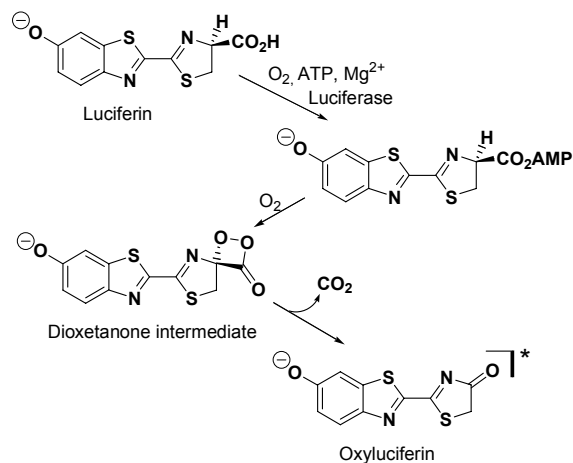


図5. ホタルの生物発光機構。

- 発光昆虫における色調変調のメカニズムとしては、
- ① オキシルシフェリンのケト-エノール互変異性による。
 - ② オキシルシフェリンのモノアニオンとジアニオンの違いによる。
 - ③ オキシルシフェリンの取り込まれているルシフェラーゼポケットの極性による。
 - ④ 励起オキシルシフェリン分子の振れで TICT (twisted intramolecular charge-transfer) 励起状態ができる。

といった説がある(図 6)。これらのうち、本報告で述べた色調変調型ジオキセタンは④のモデルといえる。また、ベンゾチアゾリルレゾルシノール置換ジオキセタン **14** の熱分解では ES IPT (excited state

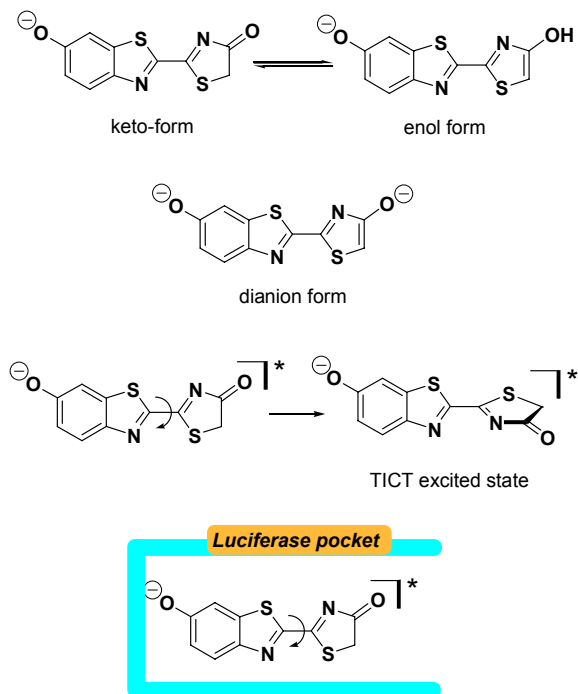


図 6. ホタルの発光における色調変調.

intramolecular proton transfer) 型発光を起こすことから①のモデルと考える。弱塩基誘発分解ではモノアニオン由来の発光をし、強塩基誘発分解ではジアニオン由来の発光をすることが分かっており、これは②のモデルと言える (図 7)。

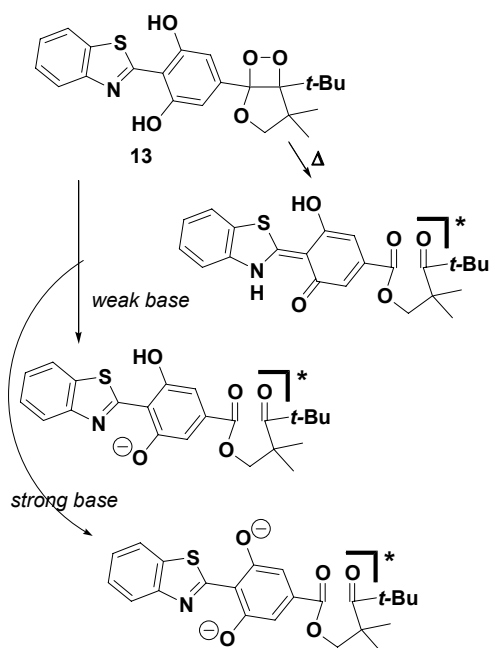


図 7. ジヒドロキシフェニル置換ジオキセタンの発光色調変調.

しかし、より重要なことは、色調変調型ジオキセタンのアニソトロピックな微視的環境下での発光が生成するエミッターの蛍光ともはや一致しないという現象にある。この現象から、われわれは“発光は前駆体であるジオキセタンの分解反応における構造変化の過渡的な姿を反映する”とした。ホタルの生物発光においてもジオキセタンファミリーの一員であるジオキセタノンの分解により発光種が生じる。このようなことを考え合わせると、ホタルなど昆虫の生物発光における色調変調もジオキセタノンの立体構造変化に大きく影響されるはずであり、メカニズムに関する研究においてこの視点はずしてはならないと考える。

文献

- 1) Matsumoto M, Watanabe N (2005) Structural aspects of 1,2-dioxetanes active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Bull. Chem. Soc. Jpn, Accounts*, **78**: 1899-1920.
- 2) Matsumoto M, Yamada K, Ishikawa H, Hoshiya N, Watanabe N and Ijuin HK (2006) Color modulation for charge-transfer-induced chemiluminescence of bicyclic dioxetanes bearing a 3-hydroxy-5-naphthylphenyl moiety in the coordination sphere. *Tetrahedron Lett.* **47**: 8407-8411.
- 3) Matsumoto M, Yamada K, Watanabe N and Ijuin H K (2007) Chemiluminescence of bicyclic dioxetanes bearing a hydroxyphenyl moiety substituted with carbazolyl indolyl or benzotriazolyl group in the coordination sphere. *Luminescence*, in press.
- 4) Hoshiya N, Watanabe N, Ijuin HK and Matsumoto M (2006) Synthesis of bicyclic dioxetanes bearing a 2-hydroxy-1,1'-binaphthyl-5-yl moiety active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Tetrahedron* **62**: 12424-12437.
- 5) Matsumoto M, Maeda H, Hoshiya N, Watanabe N and Ijuin HK (2007) Chemiluminescence in anisotropic microenvironment: splitting of chemiluminescence efficiency for charge-transfer-induced decomposition of optically active bicyclic dioxetanes bearing a 2-hydroxy-1,1'-binaphthyl-4-yl moiety under chiral recognition *Tetrahedron Lett.* **48**: 491-496.
- 6) Hoshiya N, Watanabe N, Ijuin HK and Matsumoto M (2007) Effect of intramolecular hydrogen bonding on thermolysis of dioxetanes: unusual instability of bicyclic dioxetanes bearing a hydroxynaphthyl group with vicinal substitution pattern. *Chemistry Lett.* **36**: in press.
- 7) Matsumoto M, Watanabe N, Hoshiya N and Ijuin HK (2007) Color modulation for intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence of 1,2-dioxetanes. *Chemical Records*, in press.

■ 報告書 ■

生体工学のための感光性材料の開発

山口和夫¹ 前田瑞夫² 横山昌幸³

Development of Photosensitive Materials for Bioengineering

Kazuo Yamaguchi^{1,4}, Mizuo Maeda² and Masayuki Yokoyama³

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

² Bioengineering Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

³ Kanagawa Academy of Science and Technology, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012

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

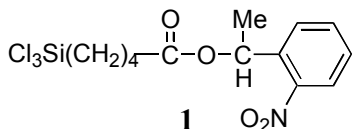
Abstract: We have already developed a method to spatiotemporally control cell adhesion using a photochemical reaction. In this study, we formed cell-adhesive spots smaller than single cells and located the focal adhesions of the cells by controlling the sizes of the illuminated regions. Moreover, by subsequently illuminating the region alongside the cells patterned on the substrate in advance, their geometrical confinements were released, and migration and proliferation were induced. Single cells were also micropatterned on the substrate and were induced to extend lamellipodia or filopodia alternatively by the subsequent formation of wide or narrow paths in their surroundings, respectively. Photodegradable block copolymer composed of hydrophilic poly (ethylene oxide) (PEO) and hydrophobic poly (benzyl aspartate) connected with a photocleavable 2-nitrobenzyl moiety were synthesized to form polymer micelles. Photodegradation of the resulting block copolymer was demonstrated.

Keywords: photosensitive self-assembled monolayer, 2-nitrobenzyl group, cell adhesion, cell migration, photodegradable block copolymer, polymer micelle

序論

我々はこれまでに、光分解性の2-ニトロベンジルエステルで保護したシランカップリング剤 **1** を合成し、無機材料表面への修飾、光照射を行い、カルボキシ基の導入を接触角、XPS の測定などにより確認している^{1,2)}。さらに **1** で処理して得られるガラス基板上の感光性単分子膜を用いて、標準的な蛍光顕微鏡下で細胞接着性を制御する方法を開発している (Fig. 1)³⁾。この方法では、基板表面に吸着させた細胞接着を抑制するウシ血清アルブミン (BSA) を、2-ニトロベンジルエステルの光分解によって表面から解離させ、露出したカルボキシ基に細胞接着を促進させるフィブ

ロネクチン (FN) を吸着させることで表面を細胞接着性へと変換



する。

本研究では、この方法を応用して、サイズや形状の異なる細胞のパターニングや、光照射による細胞移動を試みた^{4,5)}。

一方、両親媒性ブロック共重合体は、細胞接着性を制御する表面修飾剤として用いられているだけ

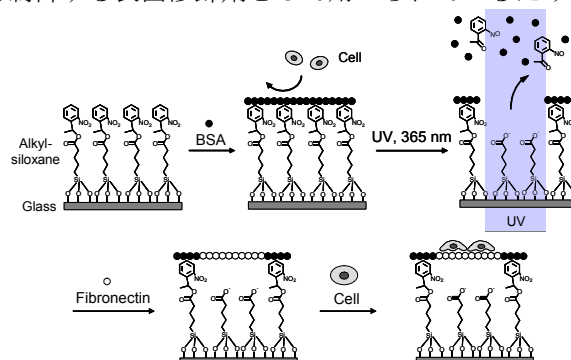
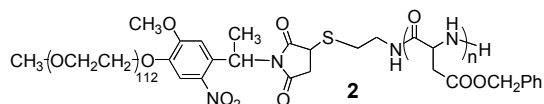


Fig.1. Schematic representations of photoactivation of the substrate for cell adhesion

でなく、疎水性あるいは親水性薬物を内包できるポリマーミセルやポリマーソームなどの薬物送達システム (DDS) としての利用も検討されている。本研究では、親水性成分としてポリエチレンオキシド (PEO)、疎水性成分としてポリベンジルアスパルテート (PBLA) を連結させたブロック共重合体 **2** の合成を試みた⁶⁾。両成分を直接連結させたブロック共重合体は、薬物を内包するポリマーミセルを形成し、DDS としての実用化が検討されているものである⁷⁾。光分解性基で連結された両親媒性ブロック共重合体を得られれば、上記のシランカップリング剤に代わる細胞接着性を光で制御する新たな表面修飾剤として期待されるだけでなく、光で放出を制御する新しい DDS の構築も可能であると予想される。



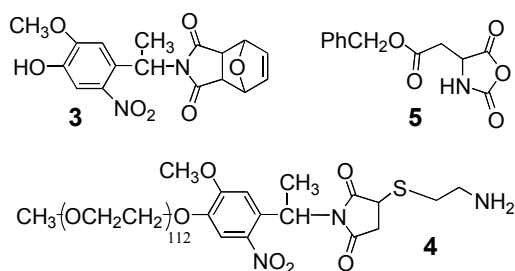
材料と方法

1 で修飾した基板を用いた細胞アレイの作製

1 のベンゼン溶液にガラス基板を投入し、1 時間還流させ修飾ガラス基板を得た。修飾基板を 10mg/mL の牛血清アルブミン (BSA) あるいは Pluronic F108 のリン酸緩衝溶液 (PBS) に 1 時間浸漬後、蛍光顕微鏡下で波長 365 nm の光 (1 W/cm^2) を 10 秒間照射した。その基板を $25 \mu\text{g/mL}$ のフィブロネクチンを含む PBS に 30 min 浸漬させた。無血清培地中でヒト胎児腎細胞 (HEK293) を播種し、30 分後に培地交換して細胞を観察した。光照射領域は、OHP シートに印刷したフォトマスクを蛍光顕微鏡の視野絞りに挿入することで制御した。

光分解性ブロック共重合体 **2** の合成

Scheme 1, 2 に示すように、光分解性リンカー**3**、PEO 末端にリンカーを介してアミノ基が結合した **4** を合成し、**4** を開始剤として用いたベンジルアスパルテートの N-カルボキシ酸無水物 **5** の開環重合を行い、**2** を合成した。得られた生成物は、 $^1\text{H NMR}$ スペクトルなどで同定した。**2** の THF 溶液に対し、500 W 超高压水銀灯を光源とし、硫酸銅水溶液フィルターを用いて 320 nm 以上の光のみを照射した。



結果と討論

1 で修飾した基板を用いた細胞パターン⁵⁾の作製

ストライプ型の細胞パターンを作成した結果を Fig. 2 に示す。200 μm 幅の透明なストライプと 400 μm 幅の不透明なストライプを持つフォトマスク (Fig. 2a) を介する光照射により、蛍光インクを塗布したカバーガラス上に、100 μm 幅の間隔に 50 μm 幅の蛍光性のストライプが観察できる (Fig. 2b)。このことから、視野絞りに挿入したフォトマスクの四分の一の倍率で、カバーガラス上に光照射されていることがわかった。1 で化学修飾したカバーガラスに BSA をコートした後、上記のフォトマスクを用いて光照射し BSA を染色したところ、未照射部位のみに BSA が残存していることがわかった (Fig. 2c)。このカバーガラスをフィブロネクチン溶液に浸漬させると、照射部位に選択的にフィブロネクチンが吸着していることが、蛍光抗体法により明らかになった (Fig. 2d)。この基板に HEK293 を播種すると、フィブロネクチン吸着部位に、細胞が接着している

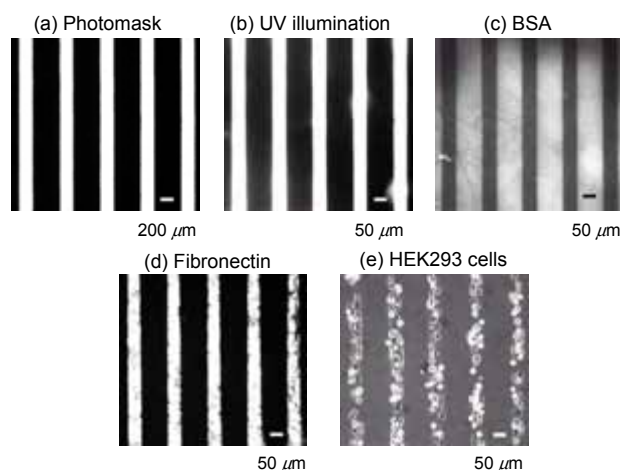


Fig.2. Patterns of a photomask, illumination, proteins, and cells.

ことが観察できた (Fig. 2e)。このような細胞パターンは、細胞種にも依存するが 1-3 日間維持された。BSA の代わりに合成高分子 Pluronic F108 を用いると、パターンの維持時間が約 1 週間まで向上できる。

次に光照射領域を縮小し、細胞より小さいサイズのアレイパターンを用いた結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3a のフォトマスクを用いた照射パターンのサイズは 6 mm であることがわかる (Fig. 3b)。照射パターン通りにフィブロネクチンが吸着しており (Fig. 3c)、HEK293 細胞は照射したアレイスポットの上に節状の構造体を形成した (Fig. 3d)。細胞はこの節状の構造体中に接着斑を形成しているのであろう。この結果は、本手法の空中分解能が細胞以下のサイズまで達していることを意味している。

この手法を用い、光照射と細胞播種を繰り返すことによって、2つの細胞をすぐ横に並べ配置することも可能であった。光照射を制御することで、細胞どうしを接触させることも可能であり、基板上で細胞同士の相互作用を人為的に設定することができる。

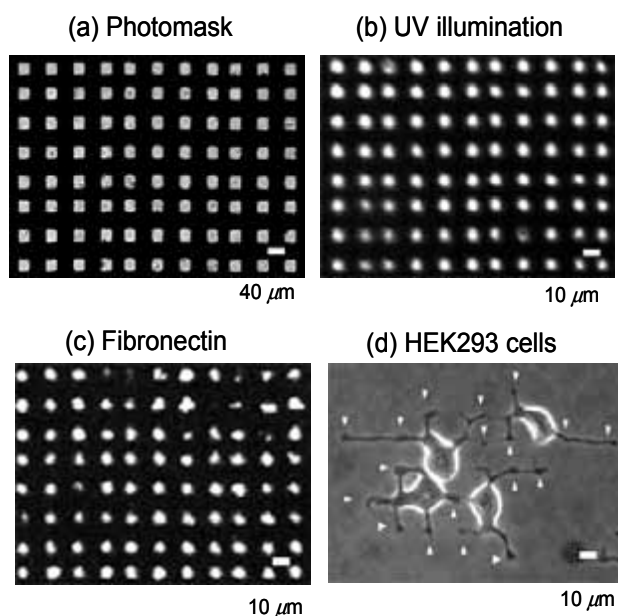


Fig.3. Cell adhesion onto the substrate photoactivated in a subcellular pattern.

さらに Fig. 4 に示すように、基板上に接着した HEK293 細胞のすぐ横の領域を光照射し、新たな接着領域を形成したところ、細胞は新設された細胞接着領域に向かって移動を開始し、増殖することがわかった。これは、創傷治療、あるいはガン細胞の浸潤モデルと考えることができ、誘導した細胞の移動・増殖能を指標に、細胞の運動性を調節する薬物

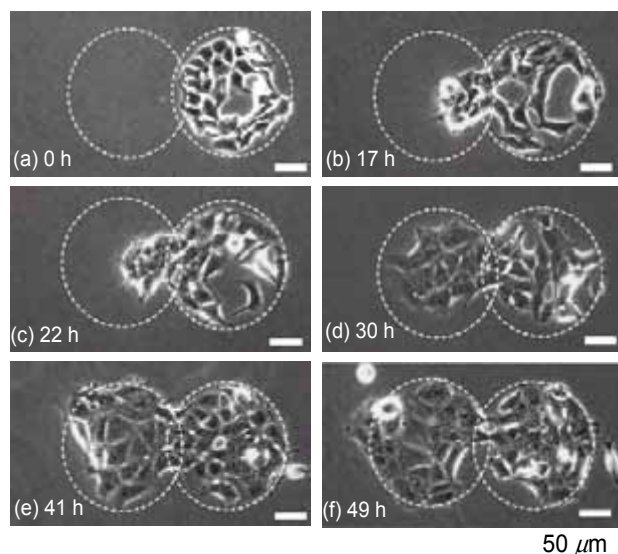


Fig.4. Inducing migration of HEK 293 cells by sequential photoactivation of the substrate.

候補物質の活性評価が行えると考えている。

この方法を応用して、一細胞の移動挙動を顕微鏡観察する手法を開発した。ここでは、1 で修飾したカバーガラスを BSA の代わりにパターンの維持時間の長い Pluronic F108 を用いて、基板全面を細胞非接着性にした。25 x 25 μm² のアレイスポットに配置した細胞 (Fig. 5a) に接する幅 25 μm あるいは 5 μm の通路状領域を光照射したところ、それぞれ葉状仮足、糸状仮足が選択的に形成された (Fig. 5b, c)。アレイ状に隔てて配置した一細胞の先端端の移動挙動を定量的に評価することにより、葉状仮足の方が糸状仮足よりも有意に速く移動することが明らかになった (22.6 ± 2.2 μm/h vs. 19.4 ± 1.4 μm/h)。今後、細胞移動を調節する分子の細胞内挙動を同時観察することで、より詳細な解析ができると考えられる。

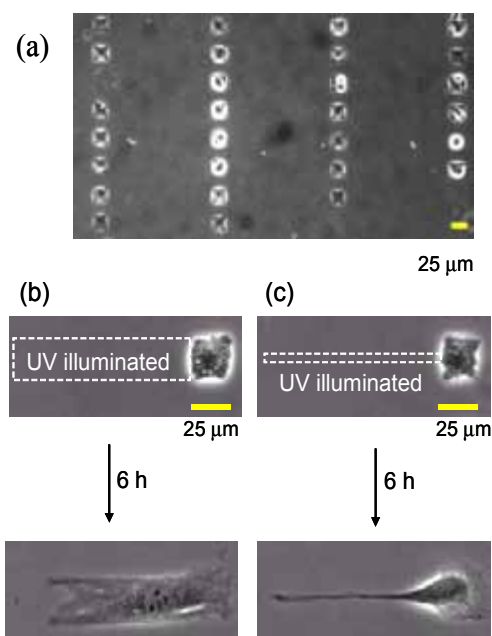
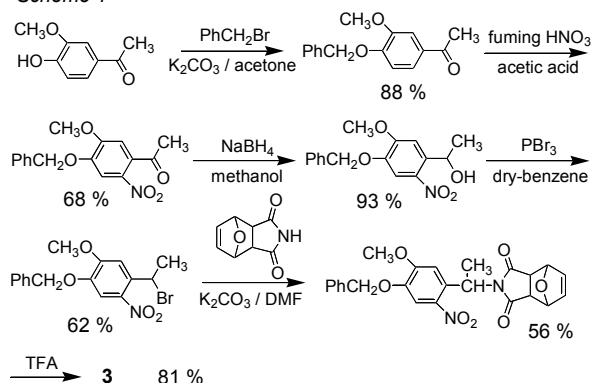


Fig.5. Spatiotemporal control of cell migration on the photoactiatable cell-culturing substrate. (a) Single NIH3T3 cells on 25 x 25 μm² square spots. (b,c) Selective extension of a lamellipodium (b) or filopodium (c) in an NIH3T3 cell induced by illuminationg paths with 25-μm (b) or 5-μm width.

光分解性ブロック共重合体 2 の合成⁶⁾

光分解性リンカー **3** の合成の反応式と収率を Scheme 1 に示す。出発原料である 4-ヒドロキシ-3-メトキシアセトフェノンのフェノール性-OH を、ベンジルエーテルとして保護した。これに対し、ニトロ化、還元、三臭化リンを用いたブロモ化を行った。得られたブロモ体と、フランを Diels-Alder 反応によって付加させたマレイミド誘導体をカップリングさせ、ベンジル基を脱保護することで **3** を得た。

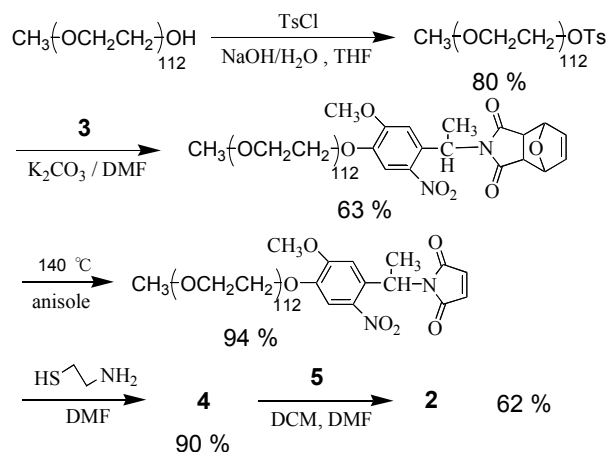
Scheme 1



分子量 5000 のポリエチレングリコールへの光分解性リンカーの導入、開始剤 **4** への変換、**4** を用いた **5** の重合の反応式と収率を Scheme 2 に示す。原料であるポリエチレングリコールモノメチルエーテルを塩基として少量の水に溶解させた NaOH を用いてトシルクロリドによりトシル化した。そこに、Scheme 1 で **3** をカップリングさせ、逆 Diels-Alder 反応により脱保護し PEO 末端にマレイミドを導入した。さらにシステアミンを付加させることで、PEO 末端に光分解性基を介してアミノ基が結合した開始剤 **4** を合成した。

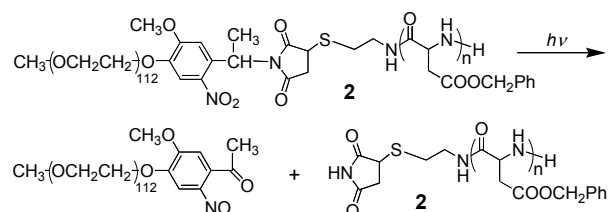
4 を用いて、ベンジルアスパルテートの N-カルボキシ酸無水物 **5** を開環重合し、目的の光分解性ブロック共重合体 **2** を得た (Scheme 2)。反応溶液の IR スペクトルによって反応を追跡した。反応が進行するにつれ、モノマーである **5** のカルボニル吸収が消失している。**2** の ¹H-NMR スペクトルでは、PEO のメチレン鎖由来のピークと PBLA のベンジル位、あるいは芳香環由来のピークを確認することができた。積分比から、目的のブロックコポリマー **2** では、PEO 中のモノマーの重合度 112 に対し、PBLA 中のモノマーの重合度は 9 であることがわかった。

Scheme 2



2 に対して照射を行ったところ、照射前に見られた 240 nm, 300 nm 付近のニトロベンジル基由来の吸収は減少した。一方で、照射によって新たに 270 nm, 400 nm 付近にニトロソ体の吸収ピークが増大した。以上のことから、**2** が Scheme 3 に示すように光分解すると考えられる。

Scheme 3



謝辞

細胞アレイの研究は、理化学研究所との共同研究であり、共同研究者である理化学研究所前田バイオ工学研究室の宝田徹博士、中西淳博士（現 物質・材料研究機構）に深く感謝する。

文献

- 1) Yamaguchi K, Kitabatake T, Izawa M, Fujiwara T, Nishimura H and Futami T (2000) Novel silane coupling agents containing a photolabile 2-nitrobenzyl ester for introduction of a carboxy group on the surface of silica gel. *Chem. Lett.*, **2000**: 228-229.
- 2) Nakayama H and Yamaguchi K (2003) Controlled surface properties of photoreactive monomolecular layers containing nitrobenzyl ester. *Polym. Prep. Jpn.* **52**: 820.
- 3) Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K and Maeda M (2004) Photo-activation of a substrate for cell adhesion under standard fluorescence microscopes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 16314-16315.
- 4) Nakanishi J, Kikuchi Y, Takarada T, Nakayama H, Yamaguchi K and Maeda M (2006) Spatiotemporal control of cell adhesion on a self-assembled monolayer having a photocleavable protecting group. *Anal. Chim. Acta*, **578**: 100-104.
- 5) 中西淳、菊地由希子、井上敏、山口和夫、宝田徹、前田瑞夫 (2006) 光応答性基板上に形成した一細胞アレイを用いた細胞移動の顕微鏡観察. *日本分析化学会第 55 年会要旨集*. p. 182.
- 6) Sato T, Yamaguchi K and Yokoyama M (2006) Synthesis of amphiphilic block copolymer by macroinitiator containing photocleavable linker. *Polym. Prep. Jpn.* **55**: 2941.
- 7) Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y and Okano T (2005) Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Controlled Release* **104**: 313-321.

■テクニカルノート■

多目的分析装置の立ち上げ

中田穰治^{1,4} 斎藤保直¹ 川崎克則² 服部俊幸³

Development of Multi-purpose Spectroscopy System

Jyoji Nakata^{1,4}, Yasunao Saito¹, Katsunori Kawasaki² and Toshiyuki Hattori³

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

² Graduate School of Science and Engineering

³ Research Laboratory of Nuclear Reactor, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo-to, 152-8550, Japan

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

Abstract: Photo-Luminescence (PL) and Cathode-Luminescence (CL) apparatus were designed and created for measurements of fluorescent light from many kinds of semiconductors and other various high-functional materials. A 375-nm wavelength ultra-violet laser beam focused in ~5 μm diameter at a target surface is used for stimulating target materials in PL measurement. A well-collimated electron beam of several micro amperes at maximum energy of 30-keV is used for stimulating target materials in CL measurement. Luminescences between 200 nm-950 nm wavelengths are introduced into a single crystal Ge detector via the light-fiber. One photon produces one electron via the photoelectric effect in Ge crystal. Thus, according to the number of incident photons, the same number of electrons is produced and emitted from Ge crystal and introduced into a photo-multiplier, which amplifies these electron numbers by about one million. These amplified electrons are introduced into a high-sensitivity current meter. Thus, luminescence intensity is proportional to current intensity. Even one photon can be detected by this analysis system. We successfully observed luminescence from fluorescent oil painted on the Si substrate and luminescence from the GaAs semiconductor substrate.

Keywords: photo-luminescence, cathode-luminescence, RHEED, Q-Mass

序論

情報科学科中田研究室においては、高速反射電子線回折法(RHEED, Reflection High Energy Electron Diffraction)、電子ビーム励起蛍光分析(カソードルミネッセンス法、CL法)、光励起蛍光分析法(フォトルミネッセンス法、PL法)、質量分析法(Q-Mass)などが可能な多目的分析装置を自作している。これら測定方法¹⁻⁵⁾は、ダイヤモンドを始めとする各種半導体や、カーボンナノチューブ等の高機能材料の分析に不可欠な装置である。

2005年度はRHEED測定について完全ではないが一応の目処が付いたので、2006年度はPL法、CL法を中心に、各種半導体材料の定性的物性評価ができるようにするのを目標とした。その為に装置全体の構成を設計し、光軸調整を含む立ち上げを行った。さらに、実際に各種半導体材料を測定・評

価することを試みた。最後に、これら各種装置の使い方を、分かりやすいマニュアルとしてまとめた。

材料と方法

フォトルミネッセンス法(PL法)

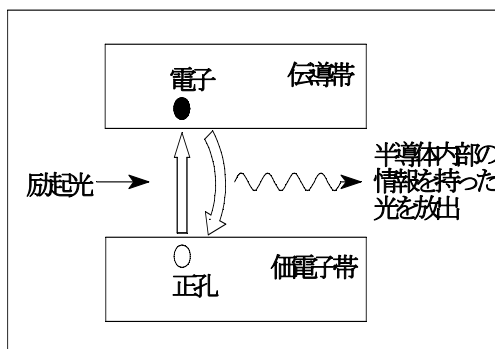


図1. エネルギーバンド図と電子の励起.

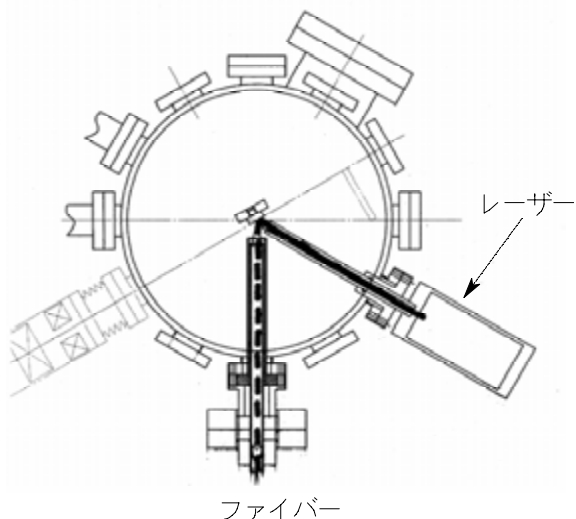


図 2. PL 装置、CL 装置の上から見た図.

伝導帯と価電子帯の間にある、電子のエネルギー状態として存在し得ない領域が禁止帯である。禁止帯よりも高いエネルギーを持つ光を半導体等の試料に当てると、価電子帯に正孔、伝導帯に電子が生成される。この時、熱平衡状態よりも過剰な数の正孔、電子対があり、それらが平衡状態に戻ろうと再結合する時、光を放出する。これを、蛍光（ルミネッセンス）という。ここで出た光を後に説明する分光器に入れ、観測されたスペクトルから物質を評価する。

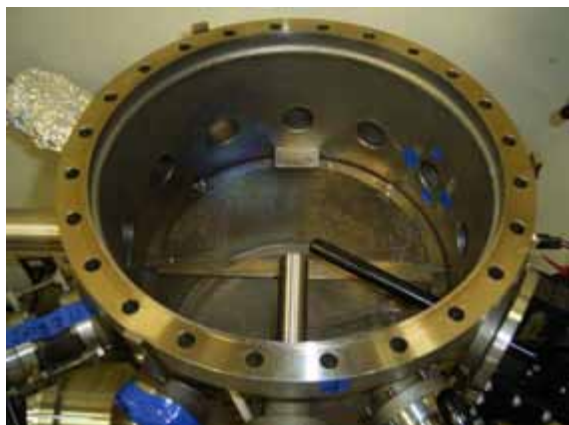


図 3. 実際のチャンパー写真。右の黒い筒から PL 励起用のレーザービームが、左からは CL 励起用の電子ビームが射出される。中央の筒は蛍光の集光系である。CL 測定時にはチャンパーを真空に引く。

カソードルミネッセンス法 (CL 法)

ルミネッセンスを観測する際に、レーザー光の代わりに電子銃の電子ビームを用いるのが、CL 法である。高速電子が試料に入射すると電子は半導体内の結晶ポテンシャルによって弾性散乱されると同時に試料中の電子を励起することによって非弾性散乱を受ける。

電子の軌道変化は主に弾性散乱によって引き起こされ、エネルギーの損失は非弾性散乱によって起こ

る。この非弾性散乱によって二次電子や各種の電磁波が放出されるが、エネルギーの一部は価電子帯やアクセプター順位にある電子をドナー順位や伝導帯に励起するのに使われ、電子正孔対が生成される。生成した電子や正孔は結晶中を拡散して、局所順位に捕獲されるとそこで再結合して蛍光を発生する。

分光器の仕組み

分光器は、分散素子（プリズムやグレーティング等）を利用し、光の波長を分離して測定することができる装置のことである。

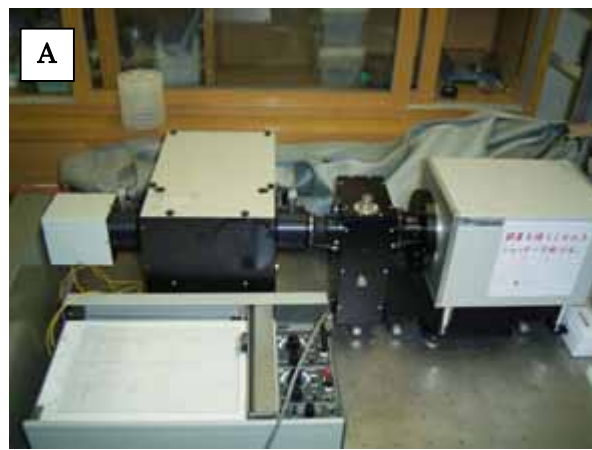


図 4. A. 左が分光器、右が光電子増倍管、手前に X-Y レコーダーが配置されている。B. 分光器の制御系。青いコントローラでグレーティングを回転させ、波長分散された光をスリットに導く。下のモジュールは光電子増倍管等にパワーを供給するためのもの。

分光器の概要

図 5 に分光器と光電子増倍管の概要図を示す。

スリットから入射した光は、コリメーティングミラー(C)で平行光線となりグレーティング(G)に導かれる。グレーティング(G)で回折された光は、フォーカシングミラー(F)によって、スリットを中心分散方向にスペクトルを結像する。スペクトルの中でスリット上に集光した波長の光のみが出射される。出

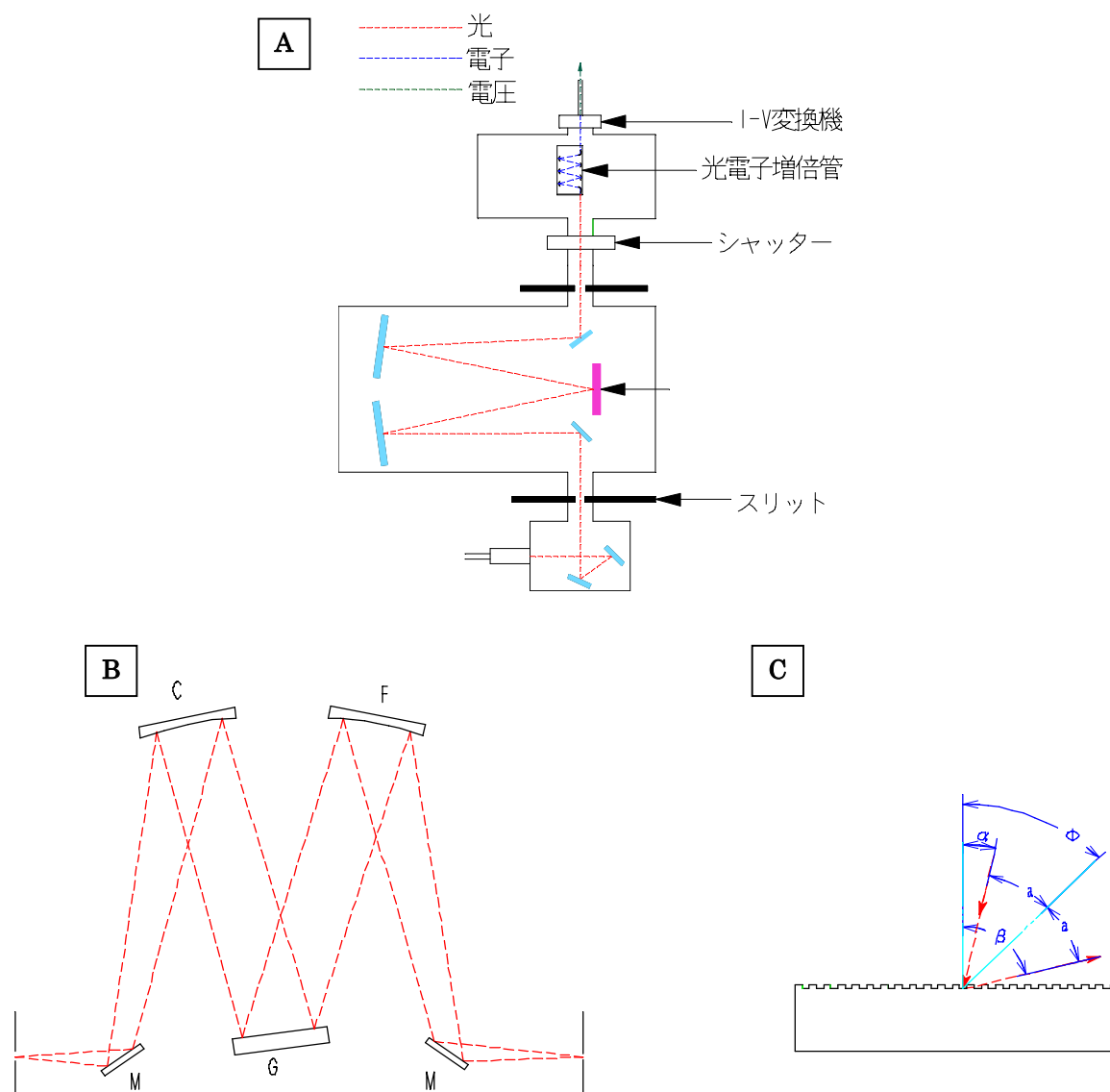


図 5. 分光器の概要. A. 分光器と光電子増倍管の校正尾示す概要. B. Czerny-Turner マウント. C. グレーティング.

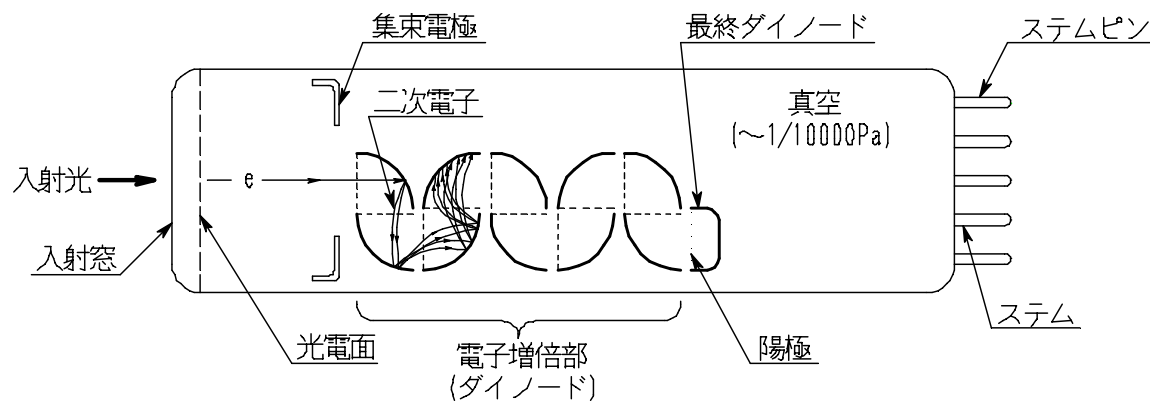


図 6. 光電子増倍管の構造.

射する光は、グレーティング(G)を回転することによって、光の回折方向が変わるため波長を変えることができる。

光電子増倍管の仕組み

分光器を通ってきた光は、まず左側から入射する。入射窓はガラスで出来ていて、光は簡単に通過できる。その後、「光電面」と呼ばれる金属面に光が当たる。光電面に光が入ってくると、「光電効果」と呼ばれる現象によって、金属内部の電子が飛び出す。1個の光子に対して1個の光電子が飛び出す。飛び出した電子は、強い電場によって加速されて、一段目の「ダイノード」に衝突する。ダイノードに衝突した電子は、加速で得たエネルギーを使ってダイノード内の電子を次々と飛び出させる。この飛び出した電子を2次電子といい、電子の数が増幅される。2次電子はまた電場によって加速され、次の段のダイノードに衝突し、新たな2次電子群を発生させる。これを次々と繰り返し、初め1個だった電子は最終段のダイノードに達するとき100万個程度にまで増える。ここまで到達した電子は、電流として外部に読み出される。

結果と討論

バンドギャップから蛍光の波長を求める式

$$\lambda = h \frac{c}{eV} \quad (\text{Einstein の光量子の仮説}) \cdots (1)$$

この式を使って励起して出てくる蛍光の波長を求める。

PL 法

Si のバンド間遷移に伴う蛍光に関する討論

Si は(1)式から 1128 nm でルミネッセンスを見ることができる。図9より測定したピークは3つあり、

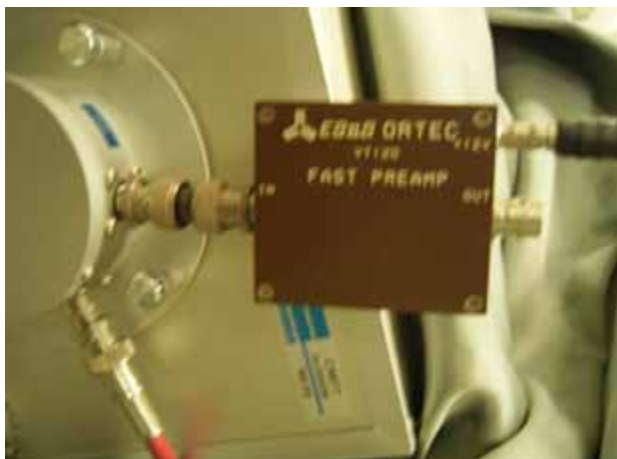


図 7. 光電子増倍管の出口に付く増幅器。増幅器の直接出力は微分波形となる。



図 8. 真中の細長い計器が高感度電流計である。電流積分計としての機能も備えている。

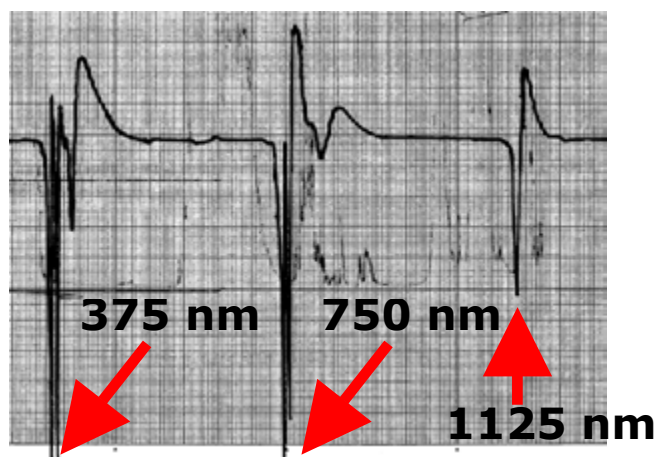


図 9. 励起光の微分波形スペクトル。

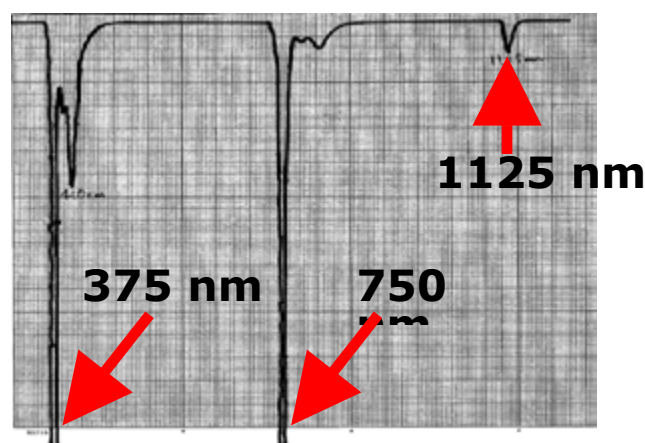


図 10. 励起光の積分波形スペクトル。

それぞれのピークの波長は、左から 375 nm、750 nm、1125 nm となった。

当初、光電子増倍管の電流出力は I-V 変換器兼増幅器 (図 7) で電圧変換されていたため、微分波形で出ていた (図 9)。スペクトルのピークの傾きを観測しているで I-V 変換器をはずして直接高感度電流計につなぎ、積分波形に直した (図 10)。

レーザーの波長である 375 nm の波長は見る事ができるはずだが、なぜ 750 nm, 1125 nm でもピークが観測されるのか、当初は分らなかった。その後、グレーティングにある凹凸でブラッグの回折条件で光が強め合い、その光がちょうど 750 nm, 1125 nm の位置に出たもので実際は 375 nm の光を見ていることが分かった。分光器の中では光が入ってきた時のグレーティングの角度から波長を選別するので、750 nm や 1125 nm の光が出てきたように見える。Si のバンドギャップから計算される蛍光の波長はまさにこの励起光の 3 倍波長 (1125 nm) に相当する回折干渉光と一致する為、Si 自身から出てくる蛍光を観測できなかつた。また、元々グレーティングの能力として 950 nm までの光しか検出できない為、たとえ 3 倍波長がなかったとしても観測不可能なはずである。

蛍光塗料を塗った Si に関する討論

Si でも GaAs でもレーザーの波長あるいは、その 2 倍、3 倍波長と伝導帯一価電子帯間の遷移による蛍光の波長とが重なってしまい、蛍光のスペクトルを確認できなかつたが、Si ウエハに蛍光塗料を塗りそこからの蛍光を観測することにした。

蛍光塗料を塗ったことで出る光の波長は不明であったが、図 11 に示すように励起光に加えて新たに 520 nm の位置にピークが観測された。また、次節に説明する CL 法でも光塗料を塗って実験したが、その時に出ている波長と同じであるため、520 nm の光は蛍光塗料から出ていると断言できる。

CL 法

蛍光塗料を塗った Si に関する討論

波長 520 nm と 1040 nm の位置で、スペクトルを観測することができた (図 12)。今回用いた蛍光塗料の発する光の色は緑色であり、緑色の色彩光は波長



図 11. 蛍光塗料を塗った Si からのスペクトル

500~570 nm の領域にある為、観測された波長 520 nm の波長は、蛍光塗料の光であると考えられる。測定されたもう一つの波長 1040 nm の光は、波長 520 nm の光の 2 倍干渉波であると考えられる。

GaAs のバンド間遷移に伴う蛍光に関する討論

PL 法では、GaAs を励起して出てくる蛍光とレーザー光の 2 倍干渉光がとても近い波長になるため、重なってうまく測定できなかつた。そこで、CL 法で観測した。それにより、全ての励起光成分を消すことができる。測定結果 (図 13) より、波長 867 nm の光が出ていることが分つた。(1) 式より、GaAs のバンド間遷移に伴う蛍光の波長は 867 nm であることは確認しているの、このスペクトルは GaAs の蛍光で間違いないと考えられる。

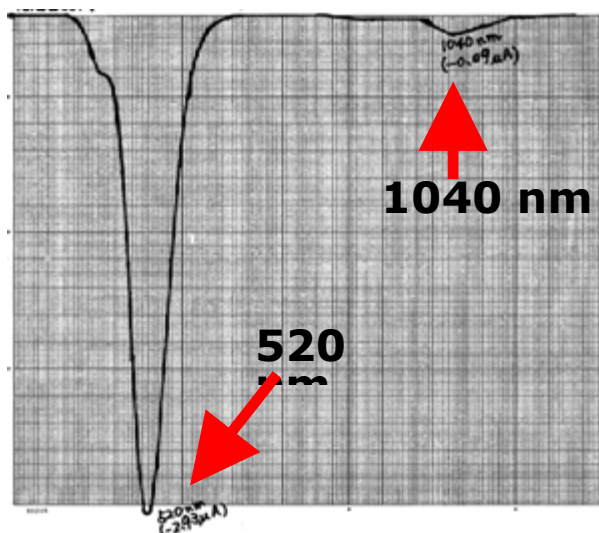


図 12. 蛍光塗料を塗った Si からのスペクトル

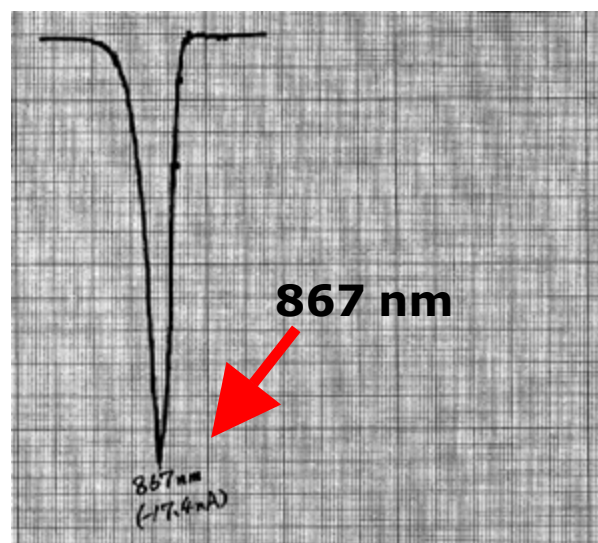


図 13. GaAs のバンド間遷移スペクトル

今後の課題

PL 法

光軸調整やレーザーの波長のことなどは理解でき、レーザー以外の波長も出すことができたが、実際に試料を分析することができなかつた為、レーザーの波長から離れたところに出るバンドギャップの試料で実験することが今後の課題である。

さらに分光器に入射する前の段階で、フィルターを通過させれば、励起光源の波長を遮断することが出来、同時に 2 倍波長や 3 倍波長も遮断できることになる。今後、ノイズを抑える有効な手段として検討していく。

CL 法

今回、I b、II a ダイヤモンド基板のバンド間遷移に伴う蛍光に関する測定も行ったが、観測することができなかつた。これは、ダイヤモンドが絶縁体に近い為、表面に電子が溜まりチャージアップしてしまう為と考え、アースで電子を逃がしたがやはり観測できなかつた。今後は、電子銃の動きの安定性を上げ再現性を持たせることと、ダイヤモンド基板の測定で、チャージアップを防ぐより良い方法を考え、測定することが課題である。

しかし、さらに調べるとダイヤモンドのような間接遷移型励起子発光（電子-正孔対消滅によるバンド間遷移に伴う発光）の場合、極めて結晶性の良いダイヤモンド結晶からしかスペクトルが観測できないことが分つた。結晶性の良い IIa 基板であったと

しても室温での励起子発光は観測できず、液体窒素温度（-270℃）でやっと観測できる程度であるらしい。従って、Ib 基板では室温はもとより、液体窒素温度でも励起子発光は観測できないのが当然であるということであった。むしろ励起子発光を観測できるということが、結晶性の良好さを示すバロメーターになっているということである。

経済産業省 産業技術総合研究所においては CVD 法で形成した良質なダイヤモンド薄膜から室温での励起子発光を観測できたと発表している。今後基板ではなく、CVD 膜を形成してそこからの発光を観測することが目標になる。

謝辞

今回の PL、CL 装置立ち上げに関しては、NTT フォトニクス研究所の村下達 主任研究員に大変にお世話になった。氏には各種機器の扱い方等について懇切丁寧な説明をして頂き、また、電話等でもいろいろとご教示頂いた。ここに厚くお礼を申し上げる。

文献

- 1) 日本表面学会 (1997) 第 23 回表面科学基礎講座 表面・界面分析の基礎と応用 テキスト, 東京.
- 2) 三宅静雄編 (1991) 実験物理学講座 21, 電子回折・電子分光. 共立出版株式会社, 東京.
- 3) 日本表面科学会編 (1983) 表面分析辞典. 共立出版株式会社, 東京.
- 4) 山科俊郎, 福田伸 (1991) 表面分析の基礎と応用. 東京大学出版会, 東京.

■テクニカルノート■

中電流型イオン注入装置の導入

中田穰治^{1,4} 斎藤保直¹ 川崎克則² 服部俊幸³

Establishment of Medium Current Ion Implanter at Kanagawa University

Jyoji Nakata^{1,4}, Yasunao Saito¹, Katsunori Kawasaki² and Toshiyuki Hattori³

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

² Graduate School of Science and Engineering

³ Research Laboratory of Nuclear Reactor, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo-to, 152-8550, Japan

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

Abstract: A medium-current-type ion implanter was introduced into Kanagawa University. This machine can be used for various purposes, for example, characteristic changes of various materials such as metals, semiconductors, or insulators. Doping various impurities to many kinds of semiconductors is one of the principal roles of semiconductor industries, to acquire controlled electrical conductivity. These features can be accomplished by irradiating various ion species at various energies for various doses. This implanter can implant ion species from hydrogen to atoms with a mass number around gold. The accelerated ion energy ranges from 5 keV to 200 keV. The most peculiar feature of this machine is the structure of the target holder, that is, endstation construction. Targets can be kept during ion implantation at temperatures from -200 °C using a liquid nitrogen cooling system to 1000 °C by heaters. The specification of these features cannot be achieved by any other ion implanter in the world. We sincerely hope that this machine will be widely used in Kanagawa University.

Keywords: ion implantation, semiconductor, doping, material modification

はじめに

イオン注入とは、イオンを固体に注入し、固体の特性を変化させる技術である。金属の表面処理や半導体工学など、さまざまな材料科学の研究などに用いられている。具体的には、電気的にイオン化した中性の原子を keV~MeV に加速し、固体や薄膜の表層（深さ数 nm~数 μ m 程度）に注入して、物質に物理的、化学的変化を与えることができる。¹⁻⁵⁾

目的

昨年、中電流型イオン注入装置が私学助成により導入された。これにより、物質を添加する際に大きな役割を果たすイオン注入が理学部においてできるようになった。従来は外注しなければできなかった技術である。しかし、装置を操作するのは非常に難しく、厚さ 10 数センチある説明書を全て読んでいては時間がかかる。そこで、本装置の原理や使い方をマスターし、初めての人にも使いこなせる使用マ

ニュアルを作成した。以下にこのイオン注入装置の構成や原理等を分かりやすく説明する。理学部、工学部の各研究室は是非この装置を利用して頂きたい。

中電流型イオン注入装置の構成

中電流型イオン注入装置の基本構成は、イオン源、質量分析部、加速部、スキャン走査部、およびエンドステーション（試料室）から成り、3つの独立した排気系によって常時真空に保たれている。加速部は質量分析部の前後にあるため、細かく分けると前段加速部、後段加速部といい、通常は加速部というのと後段加速部のことを表し、加速管とも呼ばれる。本装置は基本的には 200 kV まで出すことができ、前段加速電圧として 30 kV、後段加速電圧として 170 kV を用い、合計 200 kV となる。イオン源から後段加速部まで高電圧がかかるため、2重の部屋の形状をしており、ハウジングと呼ばれる。この部屋

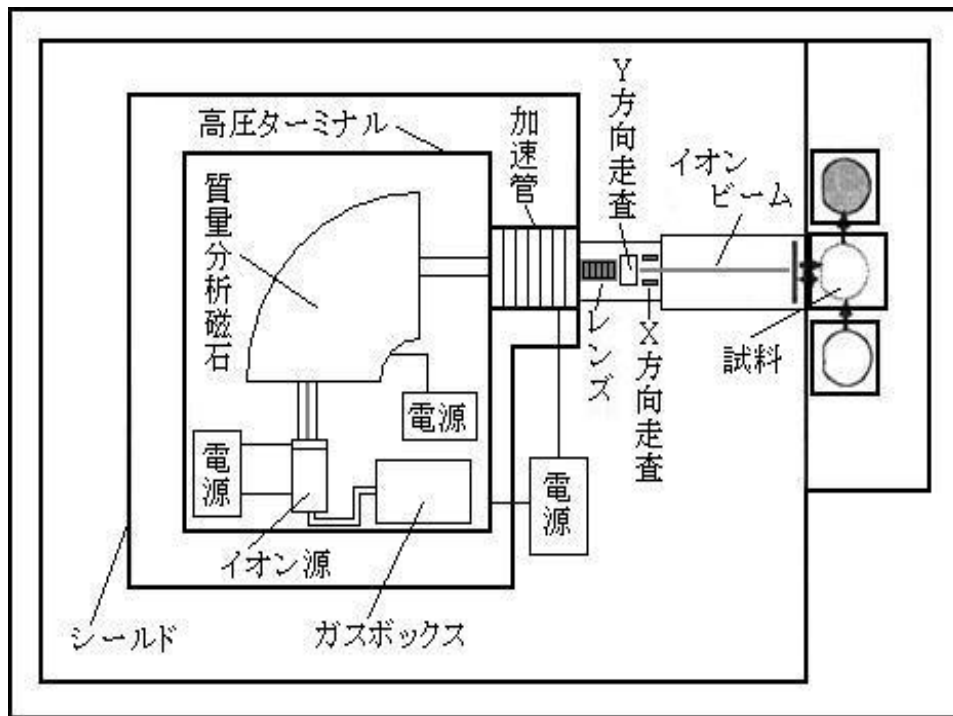


図1. 中電流型イオン注入装置の全体図.



図2. 中電流型イオン注入装置の全体写真.



図 3. ターゲット部分 (エンドステーション部分).



図 4. 制御系の写真.

の内部の壁には鉛板が張られている。これは加速管またはその後方で、加速されたイオンと残留ガス分子あるいは装置構成部品との衝突で発生した電子が、イオン源側へ逆加速され、加速管を構成する金属部に衝突するときに放出される制動X線を遮断するためである。加速管の高圧電源の印加部、および質量分析部からイオン源までの部分に 170 kV の高電圧がかかっており、高圧ターミナルという。イオン源部はさらにこれより 30 kV 高くなっている。高圧

ターミナルの各機器への電力供給のため高耐圧の絶縁トランスなどが利用されている。イオン源部は、高圧ターミナル内でさらに絶縁碍子で絶縁されており、電力はやはり高耐圧絶縁トランスを介し供給される。ハウジングのドアには高圧インターロック機構があり、ドアが開いている場合、安全のため高圧が印加できない状態になる。高圧部で作業をするときは、必ずアース棒で高圧部に触れ、残留チャージを取り除く必要がある。

イオン工学技術の基礎事項

プラズマの定義

プラズマとは、「プラスの電荷をもつイオンとマイナスの電荷をもつ電子がほぼ同じ密度で存在し、全体として電氣的にはほぼ中性状態である粒子集団」として広く定義されている。プラズマには、大部分が中性粒子で、その一部が電離している「弱電離プラズマ」と、全ての粒子がプラスイオンと電子に分かれている「完全電離プラズマ」があるが、イオン工学技術では、弱電離プラズマを利用することが圧倒的に多く、「プラズマ」といえば「弱電離プラズマ」を意味する。

プラズマは、アークチャンバ内に設けた電極間に

印加した直流電圧による電界によって加速された電子とガス分子との衝突電離を利用して生成される。プラズマ中には、イオンや電子のほか、励起状態の原子、分子、あるいは分子の解離によって生じた中性活性種などが存在している。さらに、イオンと電子の再結合がプラズマ中チャンバ内において生じるプラズマは、電離と再結合が平衡状態にある粒子集団である。

アーク放電

電極の電圧を徐々に上げていくと、そこには電子の数に相当するだけの電流しか流れない。しかし、ある値まで上げると突然大きな電流が流れるようになる。これが放電の開始である。この放電電流を増加させていくと、コロナ放電、グロー放電が起き、その状態からさらに放電電流を増加させると、ある電流値で放電電圧が急激に低下する。この状態の放電をアーク放電という。アーク放電は陰極からの熱電子放出が基本となる。これは、電流・電圧といった電力が大きくなることにより陰極が加熱され、陰極面から熱電子が放出されるようになるためである。

ドーズ量（注入量）の定義

ドーズ量（注入量）とは、その名のとおりに試料に注入されるイオンの数であり、試料の単位面積当たりのイオン注入量を表す。ビーム電流、注入時間などから算出できる。

ドーズ量 (ions/cm²) = ビーム電流 (A) × 時間 (秒) / 照射面積 (cm²) / 素電荷 (1.603E-19 C) / イオンの価数

「これだけのイオンを打ち込みたい」というときに、注入時間を算出するために用いられることが多く、ビーム電流を2倍にすれば、注入時間は半分になる。

イオン注入装置の構造と機構

イオン源部

イオン注入に用いるイオンを発生させる部位をイオン源と言い、イオン注入装置のビームラインの最上流に設置されている。イオン化物質としてガス、固体のいずれも利用可能であり、熱陰極の使用および低アーク電圧のため、イオンエネルギーのゆらぎが少なくビームの安定性に優れているという特長がある。イオン源では、真空中に導入した原子やガスに対して、プラズマ放電を起こしたり、電子ビームを照射したりすることにより、導入した原子の電子を離奪（電離）させて、イオン化する。プラズマ放電を起こすための方式としては、その電離のためのエネルギー供給方法の違いによって、直流型、高周波

型、マイクロ波型に分類され、さらに半導体生産用のイオン注入装置では直流放電型が用いられることが多く、さらにその形態によっても言い方が変わる。本装置は直流型のうちで熱電子発生用のフィラメントが螺旋または U 字型になっているバーナス型である。イオン源の主要部位としてアークチャンバがある。この中に蒸気・ガス化された原子を導入しつつ、アーク放電を起こすことで、イオンを得ることができる。アークチャンバの中では、フィラメントからの熱電子を、アーク電圧で加速し、これを蒸気・ガス化された原子に衝突させることで、原子から電子が奪われ、イオンが生成される。図5の箱状のと

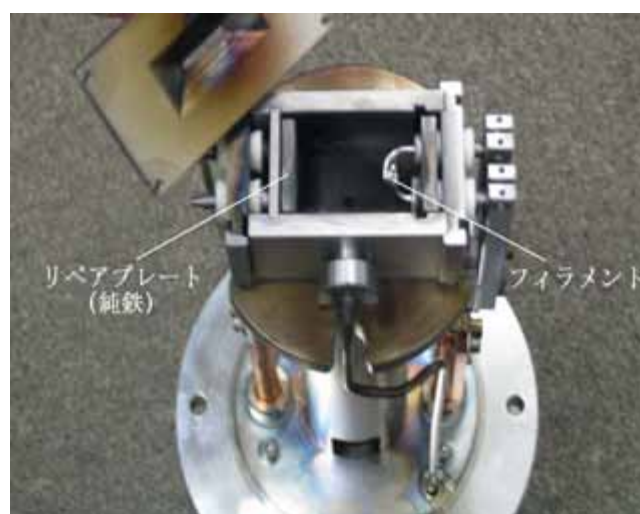


図5. イオン源のアークチャンバ内部の写真。

ころがアークチャンバで、ここにふたをする形でスリットを取り付ける。イオンは30 kVの引出電圧による電界によってこのスリットから引き出される。

また、Fe⁺イオンを効率よく生成するためにフィラメントの対面に板状の純鉄（リペアプレート）を取り付けてある。これは、アークチャンバ内でプラズマにより鉄原子をスパッタさせイオン化させ、Fe⁺イオンビームを効率よく取り出すためである。チャンバ内の真空度をよくすることにより、10 μA程度のFe⁺イオンビーム電流を取り出すことができた。

また、本装置は多品種少量生産に対応できるという特徴がある。扱うことのできるイオンの種類と、用いるガス等をまとめたものが下の表1である。

A型イオン源は安全な物質を扱うときに併用して使うことができる。リペアプレートは金属イオンをそれぞれ効率よく生成するために取り付ける。B型イオン源は危険な物質を扱うときに用いる。B型イオン源の下部にはベーパーライザーを取り付ける部分があり、粉末のものからイオン化する場合にそれぞ

表 1. イオンの種類と用いるガス等.

イオン種	形態	ガスおよび材料	ガス用イオン源	ベーパライザー
Ar ⁺	ガス	Ar ガス	A 型	
C ⁺		CO ₂ ガス		
O ⁺		CO ₂ ガス		
Ge ⁺		GeF ₄ ガス	B 型	なし
Fe ⁺	金属	リペアプレート+Ar ガス	A 型	
Cr ⁺		リペアプレート+Ar ガス		
Ni ⁺		リペアプレート+Ar ガス		
B ⁺	粉末	LiBF ₄ +Ar ガス	B 型	低温ベーパライザー (210 °C)
P ⁺		P+Ar ガス		高温ベーパライザー (340 °C)
As ⁺		As+Ar ガス		高温ベーパライザー (500 °C)

れ使い分ける。GeF₄ ガスから Ge⁺ イオンを生成する場合は B 型を用いるが、ベーパライザーを取り付ける必要は無い。

このように、本装置ではイオン源を使い分けたりベーパライザーを用いたりすることで、各種イオンを扱うことができる。質量分析部の電磁石の能力から、最大 Pt 程度の質量数 (195) まで加速できる。また、CO⁺ イオンや Ar²⁺ イオンなど、複合分子や価数の異なるイオンも生成されるので、加速できる原子 (分子) の種類はさらに多い。

質量分析部

イオン源から飛び出して前段加速部で最大 30 keV まで加速された各イオンには、例えば CO₂ ガスを用いて C⁺ イオンを発生させたいときに他に現れる O⁺ イオンや CO⁺ イオンなど、目的とするイオン以外のイオンが存在することが多い。そこで、必要なイオンだけを取り出すために、引出電圧分のエネルギーを持ったイオンを、直径約 40 cm、厚さ約 15 cm の質量分析磁石 (アナライザーマグネット) で発生させた磁場の中を通す。これによって同一エネルギーを持ったイオンであっても、イオンそれぞれの質量・電荷量の違いから運動量 (速度) が異なるために、各イオンが磁場内で描く円軌道の半径も異なる。この軌道の違いを利用すれば、磁場を通した後イオンが到達する位置がそれぞれ異なるため、質量分析磁石の焦点部分にスリットを設ければ、特定のイオンだけを取り出すことができる。スリット幅を大きくすれば質量分析の分解能が悪くなる。この原理を以下に式で表す。例として、Ar ガスを用いて Fe⁺ イオンを発生させるときの説明をする。ローレンツ力は $\vec{F} = e\vec{v} \times \vec{B}$ と表される。電荷 e [C]、速度 v [m/s]、質量 m [kg] とし、遠心力を表す式と合わせて、

$$evB = m \frac{v^2}{r} \Rightarrow r = \frac{mv}{eB} \quad \dots \textcircled{1}$$

①式より、 B (磁束密度) を大きくすると r が小さくなる、つまり小回りになることがわかる。イオン 1 個の持つ運動エネルギーは $eV = \frac{1}{2}mv^2$ であるから、Ar、Fe は其々

$$\frac{1}{2} m_{Ar} v_{Ar}^2 = eV, \quad \frac{1}{2} m_{Fe} v_{Fe}^2 = eV$$

$$\Rightarrow v_{Ar} = \sqrt{\frac{2eV}{m_{Ar}}}, \quad v_{Fe} = \sqrt{\frac{2eV}{m_{Fe}}}$$

と書ける。

スリットに目的のイオンを通らせるために、各イオンが質量分析部で描く円軌道の半径は一定値であることは明白なので、半径 r はどのイオンにおいても一定である。

よって、①式より $\frac{m_{Ar} v_{Ar}}{B_{Ar}} = \frac{m_{Fe} v_{Fe}}{B_{Fe}}$ これに、
 $v = \sqrt{\frac{2eV}{m}}$ を代入、変形して $\frac{B_{Fe}}{B_{Ar}} = \sqrt{\frac{m_{Fe}}{m_{Ar}}}$

以上から、Ar と Fe が同じ半径を描くときの磁場の大きさの比が、それぞれの質量比の平方根と等しいことがわかる。

質量分析磁石の磁場の大きさを調整するツマミが、A-MAG である。マススペクトルを取りながら A-MAG を回して 0 から徐々に上げていく。ツマミを回すほど、つまり磁束密度を大きくするほど、質量の小さいイオンから順に電流が計測される。マススペクトルとは、その反応を波形として表したものである。この波形を、物質の質量比などと照らし合わせ、目的のイオンを取り出す。

例として、Ar ガスによって Fe⁺ イオンを発生させたいとき、Fe⁺ イオンがどれくらいの磁束密度で取り出せるかについて説明する。

ビームエネルギーを 5 keV、AMP RANGE を 5.0 μ A とし、マススペクトルを取る。その結果が図

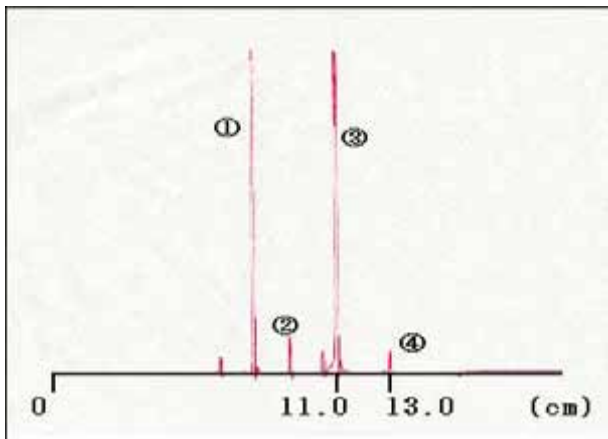


図 6. 各種イオンの見つけ方 (5 keV) .

2 である。横軸は磁束密度の大きさ、縦軸はビーム電流値を示す。スペクトルの始点を 0 cm とし、ピークが現れる位置までの長さを定規で測る。この場合、11.0 cm のところで現れる大きなピークは Ar^+ イオンであることがわかっている。

現物の長さで 11.0 cm と出しているが、これは磁束密度 B の値と置き換えて考えられるので、 B_{Ar} は 11.0 となる。 m_{Ar} 、 m_{Fe} はそれぞれ 39.948、55.845

であるから、②式より、
$$\frac{B_{Fe}}{11.0} = \sqrt{\frac{55.845}{39.948}} \doteq 1.182$$

$\therefore B_{Fe} \doteq 13.0$ となる。従って、図 2 で、13.0 cm 付近に現れるピークを探してみると、ちょうど 13.0 cm で最大のピークを迎えるスペクトルがある。これが Fe^+ イオンである。

これは、 Fe^+ を探す場合に限らず、すべてのイオンについて当てはまる。図 6 のマススペクトルで、各ピークが現れる位置までの長さを測り、磁場の大きさ (横軸の長さ) の比がそれぞれの質量比の平方根と等しいことを利用すると、どのピークが何イオンなのかがわかる。

しかし、同じイオンでも価数によってピークの現れる位置が違ってくる。例えば、 Ar^+ イオンと Ar^{2+} イオンではピークの現れる位置が異なる。これは前

1 価イオンのピークが現れる位置の $\frac{1}{\sqrt{2}}$ 倍の述の比を用いた計算方法を応用して求めることができる。①式と、 $r = \frac{mv}{eB}$ 運動エネルギー $eV = \frac{1}{2}mv^2$ をもとにして考える。2 価の場合は e が 2 倍になるので、この 2 つの式は、 $r = \frac{m'v'}{2eB'}$ 、 $2eV = \frac{1}{2}m'v'^2$ と書ける (m', v', B' は 2 価のときの値)。 Fe^+ の位置を求める場合と同様に計算すると、 $\frac{B'}{B} = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \sqrt{\frac{m'}{m}}$ とな

る。1 価と 2 価は電子 1 個分の違いなので、 $m \doteq m'$ と考えてよい。従って、 $B' = \frac{1}{\sqrt{2}}B$ となることから、ところに 2 価イオンのピークが現れる。また、3 価の場合は $\frac{1}{\sqrt{3}}$ 倍となる。

以上を踏まえて、図 6 のマススペクトルの各ピークがどんなイオンなのか求めると、以下の表 2 になる。

表 2. 各種イオンのピークが現れる位置

番号	①	②	③	④
イオン	Ar^{2+}	Fe^{2+}	Ar^+	Fe^+

今回は分りやすくするためにマススペクトルをとったので、これだけのイオンしか現れなかったが、AMP RANGE をもっと小さくしてマススペクトルをとると、残留ガス中に含まれる分子がイオン化したものなどが検出される場合もあり、さらに多くの多原子分子が存在し、加速される。

加速部

イオン源のアークチャンバで発生したイオンは、正の電場 (電界) によって、アークチャンバの外に引き出される。この電場 (電界) を発生させるための電圧を引出電圧と呼び、前段加速部と言う。大地側では、アークチャンバに開けられたイオン引き出し用のスリットと対向する形で引き出し電極と呼ばれるスリットのある電極が配置され、引き出されたイオンは、引出電圧分のエネルギーを持ったまま、引出電極のスリットを通過して取り出される。

イオン源から引出電圧によって引き出されたイオンは、引出電圧分だけのエネルギーを持っている。このイオンに対して、注入に必要なエネルギーにまでイオンを加速するために、イオンを加速電圧のかかった加速管 (後段加速部) の中を通すことになる。注入されるイオンのエネルギーは、加速電圧と引出電圧の和と、さらにイオンの価数によって決定される。例えば、引出電圧 30 kV、加速電圧 170 kV の場合、1 価イオンのエネルギーは 200 keV になるが、2 価イオンのエネルギーは倍の 400 keV になる。

スキャン走査部

加速されて一定のエネルギーになったイオンを試料に照射する。注入イオンの試料面内での均一性を得るため、三角波電圧 (図 4) でイオンビームを X-Y 方向に走査する。この時試料に近い電極板を 5~7° 程度曲げ、DC (直流) 成分を有する三角波電圧を加える。これはビームライン中で残留ガス分子との衝

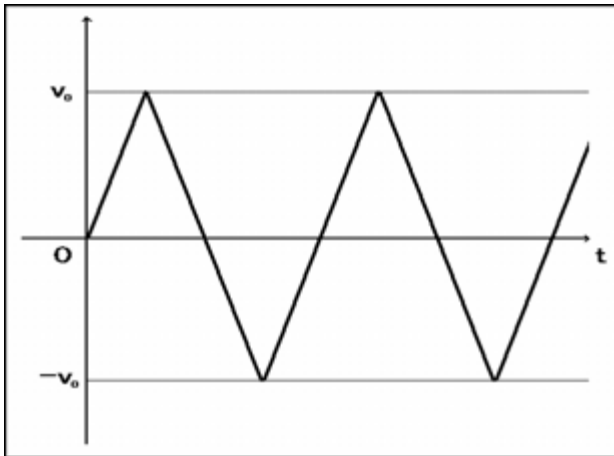


図 7. 三角波電圧.

突の結果電荷を失った、走査できない中性ビームを除去し、試料上の注入均一性を向上させるためである。

ビーム電流量の計測には、ファラデーカップ (図 8) が用いられる。ファラデーカップは、ビーム電流量の絶対値を測定するだけでなく、スキャンされたビーム電流の分布を確認したり、イオンビームの形状を測定するためにも用いられる。

ここで、この三角波電圧と走査の幅が比例していることを示す。

各要素を図 9 のように記号しておく。質量 m [kg]、電荷 e [C] の電子が初速度 v_0 で飛び出すとき、

$$\frac{1}{2}mv_0^2 = eV_0, \quad v_0 = \sqrt{\frac{2eV_0}{m}}$$

$N = J/m$ 、 $C = J/V$ より、 $N = CV/m$ という式が得られ、 C に e [C]、 m に d [m] を代入すると、力 $= eV/d$ …①となる。そして、運動方程式 $f = ma$ へ、式①を代入すると、

$$\frac{eV}{d} = ma. \quad \text{これにより、加速度 } a \text{ は、} a = \frac{eV}{md}$$

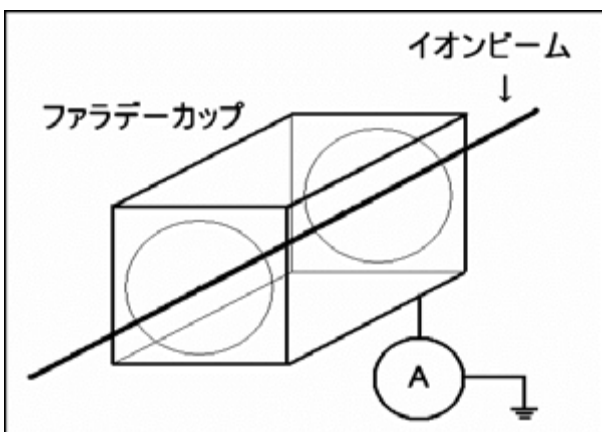


図 8. ファラデーカップ.

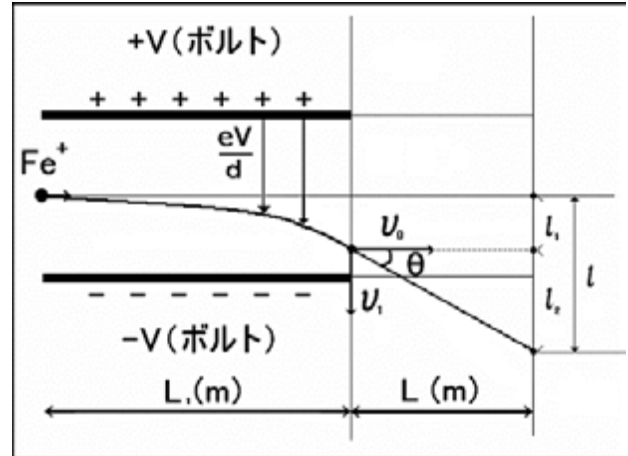


図 9. スキャン走査部.

と求まる。 L_1 を進む時間は、時間 $= \frac{\text{道のり}}{\text{速度}}$ より、 $t = \frac{L_1}{v_0}$ 。 l_1 の長さは、加速度 a 、時間 t での自由落下なので、 $l_1 = \frac{1}{2} \frac{eV}{md} \dots$ ②。放物線の下方向への速さ v_1

は、加速度×時間より、 $v_1 = \frac{eV}{md} \cdot \frac{L_1}{v_0}$ となる。放物線の l_2 部分の角度を θ としたら $\tan \theta = \frac{v_1}{v_0}$ となり、

$$l_2 = L \cdot \tan \theta \dots$$
③。 l は、 $l_1 + l_2$ で求められるので、

式①と式②より、

$$l = \frac{1}{2} \cdot \frac{eV}{md} \cdot \left(\frac{L_1}{v_0}\right)^2 + L \cdot \frac{eVL_1}{mdv_0^2} = \frac{eV}{md} \cdot \frac{L_1}{v_0^2} \left(\frac{1}{2}L_1 + L\right) \dots$$
④

式④の e, m, d, L_1, L, v_0 は定数。

∴ 三角波電圧の大きさ V はスキャンの幅 l に比例する。

オシロスコープによるビーム電流モニター

実際のイオン注入装置の運転に際しては、オシロスコープによりビーム電流をモニターしながらスキャンの三角波の波高値や三角波の平均値のオフセット電圧を調整する。図 10 にオシロスコープで観測したビーム電流の波形 (上 X スキャン・下 Y スキャン) を示す。

図 10 の上の写真は横軸に水平方向のスキャン電圧に比例した電圧信号を入力し、縦軸にビーム電流値に比例した電圧信号を入力したオシロスコープの写真である。同じく下は横方向に垂直方向のスキャン電圧に比例した電圧信号を入力し、横軸にビーム電流値に比例した電圧信号を入力したオシロスコープの写真である。

ターゲットにビームが全て当たっているところが台形の上底部分になり、ビームが当たっていないと

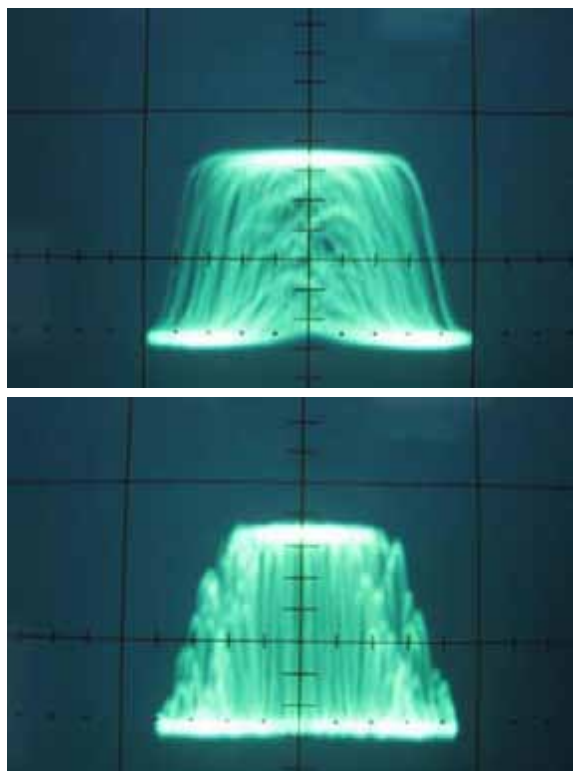


図 10. オシロスコープで観察したビーム電流の波形
(上は X スキャン、下は Y スキャンの様子を示す)。

ころが下底部分にあたる。そして、ビームが一部分当たっているところが斜辺部分にあたる。この台形波の整形がうまくできていないと、注入がうまくできないので、きれいに整形する必要がある。

今後の課題

イオン注入装置で Fe (鉄)、Ar (アルゴン) のイオン注入に成功した。一方、2 価の注入 (ダブルチャージ) については検収の際行ったが、自分自身

で注入する機会が無かったので今後トライする必要がある。他にも、高温・低温ペーパライザーでの注入、B (ホウ素)・P (リン)・As (ヒ素) を使った注入も自分自身で実際にやってみる必要がある。

また、研究室の誰でもイオン注入装置が操作できるように、分かりやすい短いマニュアルをまとめる。

謝辞

今回、私学助成により 1 億 4 千万円もの高額な中電流型イオン注入装置を導入できたのは、大学当局、教学、法人諸幹部の理解の賜物と考えています。この装置の性能仕様は日本で最高の、或いは私の知る限り世界で最高の性能仕様を持った研究用イオン注入装置として位置づけられるものと確信しています。全国の国立大学、或いはどの国立の研究機関にも設置されていない、かくも価値ある研究装置を導入して頂き、深謝致します。今後この装置を当研究室あるいは関連する情報科学科水野研究室において存分に利用し、研究成果を出していくことは勿論のことですが、さらに工学部を含めた全学で使えるような体制を整え、教員各位の利用に供したいと考えています。

文献

- 1) 蒲生健次 (1986) 半導体イオン注入技術. 産業図書, 東京.
- 2) 藤本文範・小牧研一郎 (2000) イオンビームによる物質分析・物質改質. 内田老鶴圃, 東京.
- 3) 藤本文範・小牧研一郎 (1995) イオンビーム工学イオン・固体相互作用編. 内田老鶴圃, 東京.
- 4) 電気学会 (1995) 電子・イオンビーム工学. オーム社, 東京.
- 5) 山崎泰規 (1994) 粒子線物理学. 丸善, 東京.

■ 研究交流 ■

「国立台湾大学」訪問の記

杉谷嘉則^{1,2}

Report of Joint Symposium held at National Taiwan University

Yoshinori Sugitani^{1,2}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Tsuchiya 2946, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

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

昨年（2006年）12月21日から24日にかけて国立台湾大学(National Taiwan University, NTU)を訪問し、第2回合同シンポジウムに参加してきた。一行4名で生物科学科から竹内重夫教授と鈴木祥弘助教授、化学科から山口和夫教授と私（杉谷）が参加した。この企画は、本理学部化学科とNTU化学科との学術交流協定に沿ったものである。第1回シンポジウムは2006年1月に本学湘南ひらつかキャンパスで行われ、NTUから陳竹亭(Chen, Jwu-Ting)教授、劉緒宗(Liu, Shih-Tzung)教授、邱勝賢(Chiu, Sheng-Hsien)助教授の3名が参加された。さらに先立って、2005年3月には竹内敬人教授（当時）と森和亮教授がNTU（およびその他の大学）を訪

問され、その際、化学科間の協定文書が取り交わされた。協定の趣旨は、合同シンポジウムを通じて、相互の学術交流を発展させ、併せて将来的には学生の交流にまで広げよう、というものである。

21日夕方台湾に到着、一泊して翌日から行動開始であったが、先方のお取計らいで、その日午前中は故宮博物館見学(後述)、午後は近郊の北投温泉訪問、そして夕刻から双方参加で大学組織の概要を紹介し合うこととなっていた。しかしながら温泉訪問は時間もきつそうなので代わって台湾科技大学を表敬訪問する、ということに変更していただいた。その故は神奈川大学と国立台湾科技大学は大学間で協定関係にあり、かつ、廖徳章(Liaw, Der-Jang)教授に



図1. 国立台湾大学正門前で。中央のお方が、陳教授。

は 2006 年の夏に本学工学部および理学部で集中講義をしていただいた関係もあり、同教授が出張留守中であることを承知の上で訪問した。化学関係の方々が急遽集まって研究室や施設を案内して下さった。この台湾科技大学は NTU の東南側に高速道路を隔てて位置しており、面積は台湾大学の 4 分の 1 程で、もともとは NTU の一部だったものが分離独立した由である。

合同シンポジウムは 23 日に行われた。その時のプログラムは表 1 のとおりである。双方から 4 名ずつがスピーカーとなり、計 8 件の発表が行われた。シンポジウムといっても主題を定めた研究発表会というだけでなく、双方それぞれの研究紹介という体裁で行われ、私は高周波分光法の話、竹内教授は本学理学部生物科学科の活動全般についての紹介、山口教授は感光性自己組織化単分子膜の話、鈴木祥弘助教授は北海道サロマ湖の海氷藻類についての発表であった。

そもそも今回の訪問に生物科学科の 2 人の先生が参加されたのは、今後、本学と台湾大学の交流を進めるに際して、化学のみならず生物の領域にもパイプを伸ばしたいという我々の希望に基づいており、NTU 側もそれに好意的に対応してくださり、生命科学学院院長の羅竹芳(Lo, Grace Chu-Fang)教授もスピーカーの一人としてご自分の研究およびライスサイエンス部の構成と活動についてお話をくださった。NTU の創立は偶然にも本学と同じ 1928 年(昭和 3 年)である。日本の台湾統治時代に台北帝国大学として設立されたものである。その故であろう、大学構内のたたずまいは日本の旧帝大系国立大学のそれに非常に近いものがある。正門(図 1)からメインの大通りを進んでいくと、左右に古色の建物が並んでおり、雰囲気としてはとくに北海道大学のそれにそっくりの感じを受けた。通りの左右にはヤシの



図 2. 構内のメイン通り。向こう正面の建物は中央図書館。

木が並んでおり(図 2)、これも日本人の設計になるものと伺った。化学教室は、大通りを少し離れたところにあつて新しい高層建築の全体がそれである。あと 1~2 年のうちに、この建物に隣接して倍の規模に増設されるとのこと。この化学教室だけでおよそながら本学理学部全体に匹敵(床面積、所属人数ともに)する程である。活動ぶりも全体に発展的雰囲気満ちていた。

今回の台湾訪問で仕事を離れたお楽しみは、故宮博物館の訪問であった(図 3)。台北市中心部から車で 30 分足らずのところにある。最近になって豪華な建物が 2 棟新築され、その 1 棟(本館)がオープンされたばかりであった。われわれは開館少し前に到着し待つこと少々で入館できた。紀元前 3、4 千年前からの逸品が整然と陳列され、その分量も多くてとても一日では見切れない。午後の予定(台湾科技大学訪問)もあるため午前中しか見学できなかったが、それだけでも結構疲れた。はじめは館内も空いていたが時間が経つにつれて小中学生や一般人の団体が



図 3. 故宮博物館の前で。

次々と来館し、我々が去る頃には館内は人でいっぱいになった。この日見学した本館には、主として古代からの出土品や工芸品が展示されていたが、もう 1 棟のほうは外観がすっかり出来上がっていたがオープン直前とかで中を見学することはできなかった。こちらは書や絵画などが展示されているようで、私個人としては王羲之の真筆を見ることなど期待していたが適わず残念であった。いずれ機会をみつけてまた訪問したいものと思っている。

今回の台湾訪問とシンポジウムを一応無事に果たすことができ一同喜んでいる。次回シンポジウムには、今度は台湾から 2007 年 10 月ごろを目途に何人かで来日されることになっている。ますます充実したものになればと願っている。

表 1. シンポジウムのプログラム

2006 KU and NTU Joint Symposium on Chemistry and Life Science Department of Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan	
Date: December 22, 2006 Location: R218, Department of Chemistry, NTU	
16:00-16:30	Introduction to Department of Chemistry, National Taiwan University
16:30-17:00	Introduction to Kanagawa University
17:30-19:00	Faculty Party
Date: December 23, 2006 Location: R121, Department of Chemistry, NTU	
08:50-09:00	Registration
09:00-09:10	Opening, Chung-Yuan Mou, Professor, Department Chairperson
Chairman, Shiuh-Tzung Liu, Professor, Deputy Dean, College of Science	
09:10-09:50	Yoshinori Sugitani, Professor, Dean of Faculty of Science <i>New measuring system of High Frequency Spectroscopy and its application to the analysis of water - contained materials</i>
09:50-10:30	King-Chuen Lin, Professor <i>Applications of Cavity Ring-down Absorption Spectroscopy in Gas Phase and Surface Chemistry</i>
10:30-10:50	Coffee & Tea
10:50-11:30	Shigeo Takeuchi, Professor <i>An outline of activities in Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University</i>
11:30-12:10	Chu-Fang Lo, Professor, Dean of College of Life Science <i>Research Activities in the Crustacean Virology Laboratory at NTU's College of Life Science</i>
12:10-13:30	Lunch (Location:R117)
Chairman, Sheng-Hsien Chiu, Associate Professor,	
13:30-14:10	Kazuo Yamaguchi, Professor <i>Photosensitive Self-Assembled Monolayers Based On Silane Coupling Agents Containing Carboxy Group Protected As Photocleavable 2-Nitrobenzyl Ester</i>
14:10-14:50	Jim-Min Fang, Professor <i>Direct Conversion of Primary Alcohols and Aldehydes to Nitriles, Amides, Triazines and Tetrazoles Using Iodine-Amine in Aqueous Media by One-Pot Tandem Reactions</i>
14:50-15:10	Coffee & Tea
15:10-15:50	Yoshihiro Suzuki, Associate Professor <i>Characteristic photosynthesis of ice algae in the northern part of Japan, maintained at the lowest temperature in the biosphere</i>
15:50-16:30	Chun-Chung Jerry Chan, Assistant Professor <i>Solid-State NMR and AFM Studies of Prion Fibrils</i>
16:30-16:45	Closing Remarks
18:00	Banquet

■ 研究交流 ■

台湾大学における第2回化学科合同シンポジウムに参加して

竹内 重夫

Attending the Second Joint Symposium between National Taiwan University and Kanagawa University

Shigeo Takeuchi

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Tsuchiya 2946, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

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

本理学部化学科は台湾国立大学化学部と学術交流協定に従い、2005年神奈川大学に於いて第1回合同シンポジウムを、2006年12月23日台湾大学にて第2回合同シンポジウムを開催した。第2回シンポジウムの開催にあたって、理学部長杉谷教授より、化学科単科による学術交流を、理学部全体へと拡大するために、生物科学科のシンポジウムへの参加を勧奨された。生物科学科としては、教員の研究の進展を図るだけでなく、外国の大学との学術交流を通じて、大学院学生あるいは学部学生の勉学、研究のモチベーションを高めることができるので、喜んで参加させて頂くことにした。

幸い台湾大学化学科のシンポジウムを準備された陳竹亭(Jwu-Ting Chen)教授、および化学科長の牟中原(Chung-Yuan Mou)教授の御好意により、生物系の話題提供者として台湾大学生物科学院院長 羅竹芳(Grace Chu-Fang Lo)教授と当生物科学科の鈴木祥弘助教授および竹内重夫が参加できるようになった。合同シンポジウムにおいて、羅教授は台湾大学生命科学院の概要と、羅教授の研究室における甲殻類へのウイルス感染機構の分子生物学的な研究とを発表された。竹内が当生物科学科の教育体制、各研究室の研究内容を手短かに紹介した後、鈴木助教授が北極圏における藻類の生態学についての研究成果を報告し大いに関心を集めた。

羅教授が多忙であるため、生物科学院を訪問、会談することが出来なかったため、シンポジウムの昼食時に当生物科学科と台湾大学生物科学院との学術交流について話し合いを持ち、第3回以降、神奈川大学化学科が主催する台湾大学化学部との合同シンポジウムには、生物科学院のメンバーと当生物科学科のメンバーが参加すること、および羅教授の来日の際スケジュールが許す限り、当生物科学科でセミ

ナーをもつことを快諾された(下記 E-mail)。

今後、国際交流委員が中心になって、第3回のシンポジウムを今年度で開催するべく準備されることになるという。当生物科学科では鈴木祥弘助教授を中心とした協力態勢を整え第3回のシンポジウムを実りあるものとし、台湾大学との学術交流の流れを加速し、教職員の交流だけではなく、近い将来、両大学の大学院院生が研究成果を発表し、相互に討論することの出来るような基盤を築きたいと考えている。

羅竹芳(Grace Chu-Fang Lo)教授の E-Mail

Dear Prof. Takeuchi Shigeo,
Thank you for your email. I was very glad to have you and your team visit us here in Taiwan, and I now have a much better understanding of the Biological Science Department in your university. I hope you also have a good overview of the sort of work we are now doing here at NTU, as well as the work we plan to do in the future.

I particularly appreciated the questions you asked about ethics in Asia, and I am optimistic that NTU will take your comments on board when we address this issue -- as we inevitably must. And the sooner the better!

Lastly, thank you very much for your kind invitation. I hope that NTU's College of Life Science will be able to send a group of scientists to attend the next symposium in Japan. And if I can come too, then I will be very glad to meet and talk to your students.

With best wishes for the New Year,
Grace

■研究交流■

ボストン大学認識とニューラルシステム研究所における
Laminar cortical モデルによる仮想環境でのサイバシックに関する研究

張 善 俊

Research on Cybersickness in Virtual Environment by Laminar Cortical Model
in Department of Cognitive and Neural System, Boston University

Shanjun Zhang^{1,2}

¹ Department of Information Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University

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

はじめに

2005年4月1日～2006年3月31日一年間、神奈川県川大学在外研究員として、ボストン大学認識とニューラルシステム研究所（Department of Cognitive and Neural systems）で Laminar cortical モデルによる仮想環境でのサイバシックに関する研究を行う機会を得たので、以下に、CNS の紹介をかねて、研究の概要を報告する。

大学都市ボストン

アメリカの独立生誕の地、ボストンは、マサチューセッツ州の州都であり、6州からなるニューイングランド地方最大の都市である。ボストンは、Harvard や MIT をはじめ、70以上の大学が集まる、全米随一の大学都市である。町の中には現代的な建物と百年も前のアパートは当たり前のように、うまく調和してその存在感を示している。筆者が住む Beacon Street では、石畳の路地にレンガ造りの家並みは、まるでヨーロッパを思い立たせる情緒が漂っている。この街は、歴史的に奥深いだけでなく、学問や芸術の分野でも活気があふれている。ここで様々な肌色と顔をした若者に会える、一年間でたくさんの中国人研究者と日本から来たお医者さんとお友達になった。

ボストンの地下鉄もアメリカで最も古い。1897年9月1日に開業したボストンの地下鉄は、市民の足として親しまれている。ボストンの地下鉄は、T（ティー）とよばれており4つの路線がある。この4つの路線が、ボストン近郊をほとんど網羅している。筆者は毎日グリーンラインに乗ってボストン大学の研究室と借りたアパートと行き来している。地下鉄は郊外に出ると路面電車となる。アウトバウンド方向では、自由に乗り入れてき、インバウンド（ダ

ウンタウン方向）では1.5ドルの安さで乗れる。車がなくてもさほど不自由を感じない。

ボストンは日本の札幌と同じ緯度に位置しているが、札幌の気候よりちょっと暖かい。四月の初めに、MIT のメインストリートの両側に桜の花が満開し、公園には色とりどりの花を咲かせていた。



図1. ボストン大学のキャンパスの一角。

認識とニューラルシステム研究所（CNS）

CNSは、野球で有名なレッドソックス球場のすぐ近くにある3階建ての小さな建物を占めている。CNSは、ボストン大学のなかでもかなり異色な存在であり、もともとはfunding chairmanのグロースバーグ教授の研究グループから発展してきた。今は9名の教授陣と25名の提携研究者、そして50名ほどの大学院生、ポスドックなどで、人間あるいは動物のニューラルシステムの計算原理、機構、およびアーキテクチャについて研究をしている。ここでは、主に二つの問題に解答を求めている。つまり、(1)脳はどうやって人間（動物）の行動をコントロールしているか。(2)どうやって技術を使って生物的な知能をシミュレートするか。具体的には、ニューラルモ

デルの理論的研究、視覚研究、聴覚研究、計算視聴覚の研究と記憶に関する研究です。一個のニューロンの計算モデルから、大脳皮質の各領野、大脳皮質のマルチ階層までの研究を繰り返している。



図 2. Stephen Grossberg 教授と筆者.

CNS での研究は、筆者がボストン到着の三日目から始まった。二階の客員研究員の一室に筆者の机が置いている。二ヶ月後にギリシアの某大学の助教授も加わった。オフィスの設備は日本のそれとはさほど変わらない。実験用の眼球追跡の設備はミンゴラー教授の実験室のものを使わせてもらった。今まで 3 世代の眼球追跡装置を使ってきたが、この装置は使い勝手も精度も一番よかった。CNS では、実験もやるが、どちらかというと理論的な研究の方が多い。しかもその理論はほとんど 30 年前からグロースバーグ教授が提案してきた *shunting network* 理論をベースに発展している。筆者はもともとコンピュータグラフィックスと画像処理をやっているが、ニューラルネットワークそして大脳の内部機構などにはあまり詳しくなかった、ここでは大学院生向けのコースも一部参加させてもらった。ここでは、一回の授業は大体 2 時間である、毎回の授業は事前に配られている 5, 6 本の論文が読まれていることを前提にして進められている。授業の中に課題が課されていて期末テストと中間テストもあり、学生さんが単位を取得するのが容易ではない。年末には学生さんの成績に合わせて *funding* と称する奨学金の配分を決めていく。*Funding* をもらうと月々 2000 ドルぐらいのお金がもらえるだけでなく、年間 4 万ドルの授業料も免除される。学生さんは *Funding* をもらうために一生懸命、教授達は *Funding* を集めるために一生懸命である。2004 年にグロースバーグ教授を代表にボストン大学、ブランディ大学、MIT とペンシルベニア大学で構成する研究グループで 2010 万ドルの NSF のグラントを 5 年間計画で獲得

し、CNS に潤いをもたらしていたそうである。

CNS では、研究指導は一對一のミーティングの形で、アポイントメントを予約して行われている。65 歳にもなるグロースバーグ教授は精力的に共同研究者あるいは大学院生達とのゼミをこなしている。一人一時間のペースで次から次へと人々と議論しているグロースバーグ教授を見て筆者が大変感心をした。グロースバーグ教授はもともと数学出身で、ドクターを取得後すぐに MIT の助教、準教授になった。彼は変微分方程式を使って、脳モデル、ビジョン、記憶、感情、認識など幅広い分野に応用した。1980 年代初頭に彼の論文に、学会が特集を組んで、当時の著名な学者達に賛否両論の議論を引き起こし、学会の一大風景となった。また彼はビジョンの研究で有名な MIT の David Marr との喩亮のライバル関係も有名な話である。筆者は、グロースバーグ教授とのミーティングを通していろんなことを学んだ。特に、一流の研究者の問題の捉え方である。彼は様々な研究資源を集中させ、自分の理論のルールに導かせて、幅広い分野に応用させて、問題を掘り下げながら 460 もの論文を生産している¹⁷⁾。

CNS でもうひとつ印象に残ったことは、学術交流の頻度とそのレベルである。ボストンでは、*neural talks* と呼ばれる公開ゼミが、MIT、ハーバード大学医学部、ボストン大学、ブラン大学の研究者を中心毎週行われている。ネイチャーに発表される論文の内容は、多くそこで取り上げられている。

サイバーシックスの研究

サイバーシックスはバーチャルリアリティ(VR)システムなどの仮想環境で引き起こされる車酔いに似た症状である。VR システムに没入する最中、あるいは使用後に以下のような症状はかなりの割合の人で出てくる。(1)視覚症状(眼精疲労、目が張る、目がかすむ、頭痛)、(2)方向感症状(眩暈、平衡失調)、(3)悪心(目まい、吐き気、嘔吐)。そのほかの症状として: 一般的な不快、集中機能の低下、唾液の分泌の増加、頭が重い、余分な発汗、胃が張るなども報告されている。Lawson *et al.* (2002)⁸⁾。

McGuinness(1981)⁹⁾の報告では、66 人の 250 から 4000 時間の飛行経験を持つ人に戦闘機シミュレータシステム(ACMS)を一回 1 時間のコースを毎日 4 回ずつ一週間使用させますと、27%の人が少なくともひとつの症状が出る。また、1500 時間以上の飛行経験を持つ人は 47%で、1500 時間以下の飛行経験を持つ人は 18%に症状が出る。Crowley(1987)¹⁰⁾は、コブラ戦闘機のパイロット 115 名に FWS シミュレータを使用させて、そのうち

40%の参加者に吐き気や眩暈などの症状が報告された。1000時間以上の飛行経験を持つ人がもっとサイバシックを感じやすい結果である。なお、普通の人なら、没入型のVRシステムを利用するとおよそ60%の人がサイバシックの症状が出ると報告されている (stern, 1990)。

サイバシックの原因解明はVRシステムがより一層そのパワーを社会に発揮するために不可欠である。従来の研究では、サイバシックは3つの感覚システム間のコンフリクト、つまり、視覚、前庭および自己感応の情報の不一致によるものと主に思われていた。その他、中毒の理論(Treisman,1977)¹²⁾および生態学的な理論(Stoffregen,1991)¹³⁾もある。以下はそれらの理論を紹介する。

センサー衝突の理論 (sensory conflict)

センサー衝突の理論は感覚器官の情報不一致によって症状を引き起こされる説としては最も流行する解説である。この理論では、三次元空間にある人体のオリエンテーションを保持するために、中枢神経系に最小4つの知覚情報エントリのポイントを必要とする: (1) 耳石が提供線形加速、速度および傾斜に関する情報; (2) 三半規管によって提供される角加速の情報; (3) 視覚システムが提供する視覚シーンによる体の方位に関する情報; (4) 接触と運動感覚圧力のシステムが提供する肢および体の位置に関する情報。環境の変化から既にきちんと整っている体の感覚システム間のミスアラインメントか不一致があったらサイバシックの症状は現われることができる (Harm, 2002)¹⁴⁾。

適切な視野を維持するためには、目は見られる対象に対して安定しなければならない。そのために、環境に置かれる頭部の位置情報と眼球運動と一致させる必要がある。この一致はVOR (vestibulo-ocular reflex) によって実現される。頭部が特定の方向で動き始めるとき前庭システムは動きを感じ、視覚システムの眼球運動モーターに情報を直接送ることで網膜像を維持する。頭部が没入VR環境のなかで動いているとき、前庭システムによって感知される変位とコンピュータによって送信される相応の視覚情報の間にわずかな時間的ずれが起こる。それによって方向に狂いが出て、眩暈、平衡失調などの症状が発生するといわれている。また、VRの映像では、環境が回っているときに、視覚センサーは回旋を認識するが、三半規管からは人間が回っていることを示さないで、感覚の不一致が結局人間に眩暈をもたらしている。

一般に、体の動きは視覚、前庭および自己感応の

メカニズムによって感知される。視覚の要素がない時、頭部の方位と動きは前庭システムによって検出される。リアルな環境では、これらのシステムから来る情報は完全に一致する。しかしバーチャルリアリティで、人は動かなかったことを前庭および自己感応システムが示す間、人が動いたことを視覚センサーからの情報によって示される。逆に、移動する車の中で本を読んでいるとき、視覚情報では、体は動いていないが、前庭および自己感応システムが人の動きを示す。このように、方向性症状と吐き気は、多種センサーシステムから脳によって届く情報間の衝突によって引き起こされるようである。

また、VRで実現する三次元の世界は両眼視差によって作り出されているが、実際にヘッドマウントディスプレイ (HMD) の中で、VR没入者の両眼運動はVRの映像を作るときに仮定した両眼視差とは完全に一致することが困難である。タイミング的に両者の同期が難しい、両眼の運動量の大きさにも一致させることがほぼ不可能である。この不一致がある程度蓄積したら、サイバシックの症状が出る。しかし、その具体的な相関はどうなっているかは不明である。それについて筆者はいろんな実験をやったが、その結果をまとめて別途論文にする予定である。

センサー衝突の理論は一般に十分な説得力があるようであるが、でも、どうして同じ対立衝突する情報に対してサイバシックが出る人と出ない人がいるかきちんと説明できない。また、ある状態では、センサー情報の対立は、全員にサイバシックの症状を引き起こさないことがある。また、症状が出る人でも、ある種の情報衝突に症状が出るが、別な情報衝突には症状が出ないことがある。さらに、この理論は情報衝突と症状発生との定量的関係を示すことが困難であるし、根本的なメカニズムを詳細に説明することが困難である。

中毒理論

中毒理論は、Treismanが1977年にscience誌に発表している理論である¹²⁾。つまり、動きに起因する病気を誘発するメカニズムが胃からの毒素を撤回するために作用する身体への応答の結果である。Treismanは動きが単なるある特定のメカニズムを活動化させるための人工的な刺激であると提案している。もっと簡単に言えば、動きは吸収された毒素に起因する生理学的な妨害に答えるために作られ、開発されるメカニズムで機能である。神経系の活動は神経毒の効果によって肢および目の動きを制御するためにすべての感覚システムからの情報の記入項

目の調整を可能にして妨げられる。従って、不自然な動きによるこの活動の妨害は解釈されメカニズムを活動化させる毒素の吸収の徴候でありとして催吐性の応答を作り出す。Money (1996)によると、動きに起因する前庭システムによって始められる中毒を表す病気が2つの主要な現象で構成される: 空いている胃の応答(副交感神経制御)および圧力の応答(交感神経制御)。前庭システムは自律神経系の規則に関係していると考えられる。

中毒の理論に対する批評は前庭のメカニズムに影響を与えるのに毒素に必要な周期に関連している。胃腸域の毒素を除去する方法として可能にするには持続期間が余りにも長い。それは嘔吐が中毒に対して防衛の最後の手段のひとつである^{15,16)}。

生態学的な理論

生態学的な理論は交通機関に起因する“車酔い”が状態の不安定(Postural instability, PI)が長い期間までに続くことによって引き起こされると思われる。これは、センサー衝突の理論を否定する考えである。このアプローチはVR参加者と環境との適応を問題にしている。参加者の不慣れが安定姿勢を保つのに影響を及ぼす。参加者が適応するまで、状態の不安定が身体的な不快を引き起こす。PI理論は、姿勢の安定性の個人差があると説明できる。さらに、没入型VR環境化では参加に姿勢の不安定を引き起こすことができる。不安定の持続期間そして強度はサイバーシクの強度を予測する。

このアプローチへある限界がある。第一に、この理論は迷走神経(中耳)に問題がある個人は、どうしてサイバーシクを感じないかの説明を完全にできないか。第二に、このアプローチは意味されたメカニズムと操作に関してわかりやすい説明を提供しない。最終的に、このアプローチは状態の不安定により変位のために病気をなぜに関して引き起こすか理由の明確な説明を提供しない。

以上の三つの理論の存在は、それぞれの限界と同時に、サイバーシクの現象の複雑さも示されている。これらの理論の相違は相互に排他的であることを意味しない。これらを統一に説明するには、トリガーとなる神経伝達物質の解明と大脳皮質中の各層での情報の流れを明らかにする必要がある。Takedaら(2001)は薬物でサイバーシクを治療するために、ヒスタミン、アセルチコリンノルアドレナリンなどの神経伝達物質が車酔いのような現象に強く関与していることを特定したが、shunting ネットワークモデルで階層的な展開を試みたい。

謝辞

CNS 滞在中、公私にわたりお世話いただいたボストン大学の Stephen Grossberg 教授、Ennio Mingolla 教授をはじめ CNS のスタッフおよび大学院生の人々に感謝します。本留学の機会を与えてくれた神奈川大学に感謝の意を表します。

文献

- 1) Berzhanskaya J, Grossberg S and Mingolla E (2006) Laminar cortical dynamics of visual form and motion interactions during coherent object perception. *Spatial Vision*, in press.
- 2) Cao Y and Grossberg S (2005) A laminar cortical model of stereopsis and 3D surface perception: Closure and da Vinci stereopsis. *Technical Report CAS/CNS TR-2004-007, Boston University. Spatial Vision* **18**: 515-578.
- 3) Grossberg S and Howe PDL (2003) A laminar cortical model of stereopsis and three-dimensional surface perception. *Vision Research* **43**: 801-829.
- 4) Raizada R and Grossberg S (2003) Towards a theory of the laminar architecture of cerebral cortex: Computational clues from the visual system. *Cerebral Cortex* **13**: 100-113.
- 5) Grossberg S (2001) Linking the laminar circuits of visual cortex to visual perception: Development, grouping, and attention. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **25**: 513-526.
- 6) Grossberg S (2001) Linking the laminar circuits of visual cortex to visual perception: Development, grouping, and attention. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **25**: 513-526.
- 7) Grossberg S (1999) How does the cerebral cortex work? Learning, attention and grouping by the laminar circuits of visual cortex. *Spatial Vision* **12**: 163-186.
- 8) Lawson BD Graeber DA and Mead AM (2002) Signs and symptoms of human syndromes associated with synthetic experience. In: *Handbook of Virtual Environments: Design, Implementation, and Applications*. Stanney KM, eds., Mahwah: IEA. pp.589-618.
- 9) McGuinness J, Bouwman JH and Forbes JM (1981) Simulator sickness occurrences in the 2E6 Air Combat Maneuvering Simulator (ACMS). *Tech. Rep. NAVTRAEQUIPCEN 80-C-0135-4500-1. Orlando, FL: Naval Training Equipment Center*.
- 10) Crowley JS (1987) Simulator sickness: a problem for Army aviation. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* **58**: 355-357.
- 11) Stern RM, Hu S, Anderson RB, Leibowitz HW and Koch KL (1990) The effects of fixation and restricted visual field on vection-induced motion sickness. *Aviation, Space and Environment Medicine* **61**: 712-715.
- 12) Treisman M (1977) Motion sickness: An evolutionary hypothesis. *Science* **197**: 493-495.
- 13) Stoffregen TA and Riccio GE (1991) An ecological critique of the sensory conflict theory on motion sickness. *Ecological Psychology* **3**: 151-194.
- 14) Harm DL (2002) Motion sickness neurophysiology,

- physiological correlates, and treatment. In: *Handbook of Virtual Environments: Design, Implementation, and Applications*. Stanney KM, ed., Mahwah: IEA. pp. 637-661.
- 15) Stanney KM and Kennedy RS (1998) Aftereffects from virtual environment exposure: how long do they last? *Proc. 42nd Human Factors and Ergonomics Society Annual Meeting*. pp.1476-80.
- 16) Kennedy RS, Lane NE, Berbaum KS and Lilienthal MG (1993) Simulator Sickness Questionnaire (SSQ): a new method for quantifying simulator sickness. *Int. J. Aviat. Psychol.* **1993**: 203-220.
- 17) Takeda N, Morita M, Horji A, Nishiike S, Kitahara T and Uno A (2001) Neural mechanisms of motion sickness. *J. Med. Inve.* **48**: 44-59.

2006年度 神奈川大学総合理学研究所事業報告

1 人事

(1) 所長・運営委員

所長： 生物科学科 教授 齊藤光實
 運営委員： 情報科学科 教授 張 善俊
 情報科学科 教授 中田穰治
 化学科 教授 野宮健司
 化学科 教授 大石不二夫
 生物科学科 教授 小笠原 強
 生物科学科 教授 鈴木季直

(2) 顧問・特別所員・客員研究員

顧問： 藤原鎮男、門屋 卓、村田健郎、
 武内義尚
 特別所員： 藤原 譲、釜野徳明、大橋 守、
 猪木慶治、鈴木秀穂、村上 悟、
 竹内敬人
 客員研究員： 藤林俊生、平野哲也、松浦育敏、
 藤原昭子、豊泉和枝、河合 忍、
 中原昌明、岸 康人、高梨雅彦、
 大瀧丈二、松島一幸、木村卓央、
 濱元千絵子

(3) 理学部産官学連携推進委員会

委員長： 化学科 教授 大石不二夫
 総合理学研究所所長： 生物科学科
 教授 齊藤光實
 情報科学科： 教授 中田穰治
 化学科： 教授 松本正勝
 生物科学科： 助教授 鈴木祥弘
 情報系： 情報科学科 教授 桑原恒夫
 広報委員： 情報科学科 教授 天野 力
 産官学連携推進室： 課長 田口澄也
 産官学連携推進室平塚： 部長 辻 洋一

2 セミナー・シンポジウム・講演会

(1) 第24回湘南ハイテクセミナー

—機器分析入門—

日時： 2006年6月8日(木)・9日(金)
 10時～16時30分

会場： KU ポートスクエア
 (みなとみらいクイーンズタワー14階)

主催： 神奈川大学総合理学研究所

後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「分析総論」
杉谷嘉則(神奈川大学理学部化学科)
- 2) 「NMR 分析」
天野 力(神奈川大学理学部化学科)
- 3) 「有機材料分析」
宇野佳孝(株式会社日東分析センター)
- 4) 「質量分析」
明石知子(横浜市立大学大学院総合科学研究科)
- 5) 「赤外分光」
高柳正夫(東京農工大学大学院共生科学技術研究院)
- 6) 「環境分析」
功刀正行(独立行政法人国立環境研究所)

(2) 第25回湘南ハイテクセミナー

—研究開発と分析技術—

日時： 2006年12月5日(火)・6日(水)
 10時～16時30分

会場： KU ポートスクエア
 (みなとみらいクイーンズタワー14階)

主催： 神奈川大学総合理学研究所

後援： 日本分析化学会関東支部

演題・講師：

- 1) 「超微量分析の新展開」
原口紘丞(名古屋大学大学院工学研究科)
- 2) 「研究開発と材料分析」
志智雄之(株式会社日産アーク)
- 3) 「研究開発と IR 分光」
古川行夫(早稲田大学工学部化学科)
- 4) 「研究開発における NMR 分析」
嶋田一夫(東京大学大学院薬学系研究科)
- 5) 「X 線分析と研究開発」
田沼繁夫(独立行政法人物質・材料研究機構)
- 6) 「高分子・ゴムの分析技術」
西本右子(神奈川大学理学部化学科)

(3) 第17回神奈川大学平塚シンポジウム

日時： 2007年3月16日(金)
 13時30分～17時10分

会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス

(61号館332室AV教室)

主催： 神奈川大学理学部化学科
神奈川大学総合理学研究所

共催： 日本化学会

演題・発表者：

- 1) 「速度論的安定化を利用した高周期14元素低配位化学種合成と性質に関する研究」
杉山佑介(Westfälische Wilhelm 大学)
- 2) 「ポリカテナンへの戦略」
木原伸浩(神奈川大学理学部)
- 3) 「ナノスケール分子キャビティを活用した活性化学種の反応制御」
後藤 敬(東京工業大学大学院理工学研究科)
- 4) 「光学活性オリゴナフタレンの合成と機能」
椿 一典(京都大学化学研究所)
- 5) 「水素結合を設計戦略とする基質認識型有機分子触媒の開発」
寺田眞浩(東北大学大学院理学研究科)

(4) 講演会

日時： 2005年6月9日(金)
15時～16時
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館228室)
共催： 神奈川大学総合理学研究所
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
演題： 「光合成微生物および嫌気性細菌による水素生産」
講演者： 浅田泰男(日本大学理工学部)

(5) 講演会

日時： 2006年8月1日(火)
15時10分～16時40分
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館304室)
主催： 神奈川大学総合理学研究所
演題： 「発酵茶高分子ポリフェノールのすばらしい能力」
講演者： 沼田 治(筑波大学大学院生命環境科学研究科)

(6) 講演会

日時： 2006年10月20日(金)
15時10分～17時
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(67号館228室)

主催： 神奈川大学総合理学研究所

演題・講演者：

- 1) 「細胞培養系による植物細胞機能の解析」
駒嶺 穆(木原生物学研究所)
- 2) 「ゲノムの概念を確立した生物—コムギ」
荻原保成(木原生物学研究所)

(7) 講演会

日時： 2006年10月27日(金)
15時10分～16時40分
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(61号館332室)
主催： 神奈川大学大学院理学研究科
神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
神奈川大学総合理学研究所
演題： 「自己組織化膜を用いるセンシング素子の構築」
講演者： 北野博巳(富山大学大学院理工学教育部)

(8) ハイテク・リサーチ・センター研究発表会

日時： 2006年6月10日(土)
9時50分～16時50分
会場： 神奈川大学湘南ひらつかキャンパス(61号館332室)
主催： 神奈川大学ハイテク・リサーチ・センター
共催： 神奈川大学総合理学研究所
演題・発表者：

- 1) 「効率水素, メタン発生光合成細菌の探索—シアノバクテリア・光合成細菌・メタン発生細菌を利用した光合成による光エネルギー利用システムの構築に向けた基礎研究」
井上和仁(神奈川大学理学部生物科学科)
- 2) 「生命現象解析のための無処理かつ簡便な分子トレーサーの検討」
小笠原 強(神奈川大学理学部生物科学科)
- 3) 「光合成細菌・藻類のバイオマス生産性に影響する環境因子のモデル化と最適化—低温環境と海氷藻類の一次生産—」
鈴木祥弘(神奈川大学理学部生物科学科)
- 4) 「光合成細菌における生分解性ポリエステルと関連化合物の産生」
齊藤光實(神奈川大学理学部生物科学科)
- 5) 「光エネルギー変換用新規触媒系の構築—新規機能性金属錯体の分子設計」
野宮健司(神奈川大学理学部化学科)

- 6) 「生物発光・化学発光系の高感度生化学分析への展開」
松本正勝(神奈川大学理学部化学科)
- 7) 「ナノ細孔を持つ光触媒の開発と環境・エネルギー問題への展開」
森 和亮(神奈川大学理学部化学科)
- 8) 「光照射による固体表面修飾法の開発と生体分子配列の制御」
山口和夫(神奈川大学理学部化学科)
- 9) 「光機能分子が誘導する生体膜の動的構造変化の凍結電顕技法による観察」
鈴木季直(神奈川大学理学部生物科学科)
- 10) 「ケイ素・ゲルマニウムの特性を活かした光機能性超分子の合成」
加部義夫(神奈川大学理学部生物科学科)
- 11) 「コンピューターによる分子設計支援システムの開発と生体分子情報の収集—学習・自己組織化機能を持つ意味記憶空間の構築—」
中山 堯(神奈川大学理学部情報科学科)
- 12) 「生体高分子の構造変化と分子運動の高時間分解能を有する測定システムによる解析」
平田善則(神奈川大学理学部化学科)
- 13) 「生物発光研究の新展開：ラチア、ホタル、発光ゴカイ」
丹波治樹(電気通信大学量子・物質工学科)

投稿規定

Science Journal of Kanagawa University

1 編集方針

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

2 掲載論文の種類

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

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

掲載する論文は和文および英文である。

3 原稿の体裁 (総説および原著)

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

(2) 原稿用紙サイズ

A4版の用紙を用いる。本文および図表の占める範囲(紙面)は縦横245×170mmとする。この場合、余白は、上辺30mm、下辺20mm、左辺20mm、右辺20mm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10mmずつの余白を置く。

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

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞、文献は2段組み、左右両端揃えとする。

(4) 使用文字 (フォントの種類)

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

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

(5) 論文構成

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

(6) 論文種の表示

第1頁、第1行目に左揃えで、前後に■記号を付して論文種を記入する。

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

最終的には編集委員が判断して論文種を決定する。

文字は、MSゴシックで11P(ポイント)とし、太字にはしない。

次の研究課題名まで1行あける。

(7) 研究課題名、著者名、所属

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

続く、研究課題名(英語)は13P、著者名(英

語)は12P、所属(英語)は9Pとし、これらは太字にしない。

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

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

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

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

次のAbstractまでは1行あける。

(8) Abstract

要旨は原則的に英文とする。語数は250語程度が適切であるが、特に制限しない。

見出し(Abstract:)からは1文字あけて要旨本文を書く。

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

(9) Keywords

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

文字は10Pを用い、見出し(Keywords:)はイタリックで太字とする。

次の本文との間は1行あける。

(10) 本文

横2段組、各段48行とする。

1行の文字数は和文23文字、英文46文字とする。

序論、材料と方法、結果、討論、謝辞の各項目の見出しは左揃えとする。

各項目間は1行分のスペースをあける。

文字サイズは、各項目の見出しは太字で12P、本文は10Pとする。

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

必要なら、各項目内で小見出しを設ける。小見出しは太字で10Pとする。

項目の見出しと小見出しの間は1行スペースをあける。

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。

- 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) Squire J (1981) *The Structural Basis of Muscular Contraction*. Plenum Press, New York.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 佐藤賢一, 鈴木季直 (1998) *生命へのアプローチ*. 弘学出版、東京.
- 6) 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.
- 7) 安積良隆, 鈴木秀穂 (2003) シロイヌナズナを用いた植物の有性生殖研究における最近の展開 2003. *神奈川大学総合理学研究所年報 2003*. pp.41-80.

(12) 表

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

表の上部には必ず番号(表1、Table1、など)とタイトルを付し、本文との整合を期す。

表のタイトルは、表の幅にあわせて両端揃えとする。

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

(13) 図

本文中の適切な部分に挿入し、紙面内では中央揃えとする。

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

図の説明文は、図の幅にあわせて両端揃えとする。

図の説明文に限り、和文でもピリオド（.）とカンマ（,）を用いる（和文の句読点はいない）。

図の番号および説明文の文字サイズは9Pとする。

図はできるだけ分かりやすいものとし、図中の文字や記号は高さ3～5 mm程度にする。写真はデジタル化で不明瞭にならないよう、極度の圧縮は避ける。

(14) 単位

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

(15) 作製見本

希望者には作製見本を配付する。

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（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。

7 投稿

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。

8 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。

9 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。

10 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。

11 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。

12 著作権等

掲載論文の内容についての責任は著者が負うものとする。その著作権は著者に属するが、著作権は神奈川大学総合理学研究所に属する。



編集後記

本誌、Science Journal of Kanagawa University (神奈川大学理学誌) が、神奈川大学総合理学研究所の機関誌(年報)から、理学部および大学院理学研究科の学内紀要の役割も果たす理学専門の科学誌として再出発して3年経ちました。今年も、より充実した研究論文を掲載して、無事、第18巻を皆様のもとにお届けできましたことは喜ばしい限りです。

前巻までは、掲載論文の中心は、総合理学研究所の研究助成論文でした。しかし、昨年、総合理学研究所では、研究助成の件数を絞り、各研究予算の大型化を計ったため、第18巻の編集では、十分な数の論文が投稿されるか危惧しておりました。幸いにも、助成論文の他に多くの論文を投稿して頂き、英文論文も増え、前巻以上の頁数で本巻を発行できることとなり、喜びに堪えません。その中には、若手研究者や大学院生の論文も含まれており、本誌発行の主旨が皆様に理解され、本誌が研究成果を公表する場として着実に成長し始めているという実感をもたらせてくれております。

本巻から、新たな論文範疇として、テクニカルノートと研究交流報告を設けることに致しました。テクニカルノートでは、研究技法や研究装置の紹介記事を取り上げます。また、研究交流報告は、本学が推進する国際交流の事業成果を広く報告する目的で、大学・研究所訪問記、海外研究留学報告、国際学会参加報告などを取り上げます。これらの諸論文が、若手研究者や大学院生の研究意欲に大きな刺激となることを期待しております。

既にも実現している国立情報学研究所を通じたオンライン化に加えた独自のホームページによる論文開示、レフリーによる査読を経た論文審査体制の確立、発行回数増加など、本誌をより発展させるための懸案の課題はまだ多く残されています。編集者一同、今後も努力を重ねて行く所存です。皆様のさらなるご協力、ご支援、お願い申し上げます。

[神奈川大学総合理学研究所、
理学部生物科学科 鈴木季直]

神奈川大学理学誌編集委員会

委員長
鈴木季直 生物科学科
委員
天野 力 化学科
石岡俊也 情報科学科
井上和仁 生物科学科
加部義夫 化学科
張 善俊 情報科学科

Science Journal of Kanagawa University

Editor-in-Chief
Suechika Suzuki Department of Biological Sciences
Editors
Chikara Amano Department of Chemistry
Shunya Ishioka Department of Information Sciences
Kazuhito Inoue Department of Biological Sciences
Yoshio Kabe Department of Chemistry
Zhang Shan Jun Department of Information Sciences

Science Journal of Kanagawa University Vol. 18

発行日 2007年5月25日
編集者 Science Journal of Kanagawa University 編集委員会
発行者 神奈川大学総合理学研究所
発行所 〒259-1293 平塚市土屋 2946
Tel. 0463-59-4111(内 2500)
Fax. 0463-58-9684
印刷所 光和サービス株式会社

神奈川大学総合理学研究所
Research Institute for Integrated Science of Kanagawa University