

2020年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：ムラサキ科植物の OAT の機能解析

報告者（申請者名）：眞辺美咲

報告日：2021年3月5日

1. 研究過程の概要

ムラサキ科植物であるムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は、根でナフトキノン誘導体であるシコニン・アルカニン類縁体を生合成する。シコニンとアルカニンは互いに鏡像異性体関係にあり、1' 位の水酸基に結合するアシル基の構造の違いにより様々な類縁体が存在する。シコニン・アルカニン類縁体の生合成は他のムラサキ科植物でも観察されており、含まれる類縁体の種類やその存在比は種によって異なる。先行研究により、いくつかのムラサキ科植物に含まれるシコニン・アルカニン類縁体の種類とその存在比が明らかになったが、まだ調べられていない種も多い。そこで、3種のムラサキ科植物 *Alkanna tinctoria*、*Anchusa leptophylla*、*Echium vulgure* を用いて、HPLC による根抽出物のシコニン・アルカニン類縁体の検出を行ったところ、*E. vulgure*、および *A. leptophylla* の根抽出物においてシコニン・アルカニン類縁体を検出した。特に *E. vulgure* ではアセチルシコニンをはじめとする複数のシコニン類縁体のピークを検出した。*L. erythrorhizon* のシコニン生合成経路において、OAT タンパク質はアセチル基を含む複数のアシル基をシコニン・アルカニンに付加することが分かっているが、異なるシコニン・アルカニン類縁体を生合成する他のムラサキ科植物の OAT の働きは不明である。本研究では、複数のムラサキ科植物の OAT の働きや基質特異性を調べることで、OAT の分子進化の過程を解明することを目的として研究を行った。

まず、シコニン類縁体が検出された *E. vulgure* を用いて研究を行った。OAT の酵素アッセイを行うために *E. vulgure* の根から total RNA を抽出、逆転写して cDNA を得た。OAT 遺伝子をクローニングして pCold I ベクターに組込み、大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。プラスミドを抽出後、タンパク質発現用大腸菌 Origami 株に形質転換後、培養して粗酵素を得た。OAT タンパク質が発現しているのか確認するために SDS-PAGE を行った。

2. 研究成果の要点

E. vulgure の根由来の cDNA から2種類の異なる配列 *EpOAT1*、*EpOAT2* をクローニング下した。酵素活性測定を行うために、タンパク質発現用大腸菌 Origami 株に形質転換後、培養して粗酵素を得た。得られた粗酵素液を SDS-PAGE に供してタンパク質の発現確認をしたところ、*EpOAT1*、*EpOAT2* ともに発現していなかった。今後は発現条件の検討を行う予定である。

3. 研究成果発表

新型コロナウイルスの影響により、今年度は対外的な発表の機会がなかった。そのため、仮所属研究室において、発表をおこなった。

4. 発表会等で得られたコメントや意見

Origami 株でタンパク質が発現しないなら、大腸菌に少ないコドンにも対応可能な Rosseta2 株でのタンパク質発現を試みてはどうかと言う意見を頂いた。また、今研究開始時点での候補配列の他に、複数 EpOATs の候補配列が見つかったというコメントも頂いた。

5. 成果の自己評価, 残された課題や反省点など

今回の研究では *Echium vulgure* の 2 つの OAT 候補配列のクローニングを行い、各タンパク質の発現確認を行うことができた。今回、Origami 株を用いてタンパク質の発現が確認できなかったため、今後は大腸菌に少ないコドンにも対応可能な Rosseta2 株を用いたタンパク質の発現を試みる。タンパク質が発現できた場合は粗酵素を抽出・精製し、酵素アッセイを行って EpOATs の働きを調べる。また、今回 EpOAT2 は異なる配列も同時にベクターに挿入されていることが確認できたため、EpOAT2 のみが挿入されたプラスミドの精製を行う。さらに、他の EpOAT 候補配列もクローニングしてタンパク質発現を行い、酵素アッセイを試みる。

2020 年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：瑪瑙の加熱による変色について

報告者（申請者名）：木尾颯月

報告日： 2021 年 3 月 5 日

1. 研究概要

橙色を呈する瑪瑙が加熱によって赤色に変化する要因を明らかにするために、加熱実験を行い加熱前と加熱後の有色部の組成を比較した。組成分析には、エネルギー分散型走査型電子顕微鏡を用いた。加熱実験の結果、300 °C、500 °C、800 °Cの温度全てで瑪瑙の橙色の部分で赤色に変化した。加熱前と後の瑪瑙有色部の組成分析の結果、鉄と少量の硫黄が検出された。加熱前と後で瑪瑙の有色部の大きさ、形状、組成（鉄と硫黄量）に差がない。以上の結果から、瑪瑙の橙色から赤色への色の変化は、鉄もしくは硫黄を含有する物質の構造変化による着色であると考察される。今回観察された瑪瑙中の有色物質の大きさが、1 μm 以下と微細であることから、鉄もしくは硫黄を含む鉱物の条混色が有色原因である可能性が高い。このため条混色が橙色である褐鉄鉱が加熱により条痕色が赤色である赤鉄鉱に変化したことが橙色の瑪瑙が加熱により赤色に変化した原因であると結論した。

2. 本研究の着想に至った経緯

赤色瑪瑙に興味を持ち色の原因について調べていたところ、「楽しい鉱物図鑑」（堀秀道 著）という文献中に「赤色の瑪瑙は加熱すると色が濃く鮮明になる」という記述を見つけた。より詳しく調べたところ、「鉄の酸化によるもの」という記述しかなく、詳細を記した論文や書物を見つけることが出来なかった。そこで、橙色を呈する瑪瑙を用いて加熱実験を行い、赤色が濃くなった瑪瑙中の有色物質の産状と組成変化を調べることで、瑪瑙の赤色が加熱により濃くなる原因を明らかにしたいと考えた。

3. 実験の目的

橙色の瑪瑙が赤色に変化するメカニズムの解明を目的として以下の 2 つについて調べた。

- 1) 橙色の瑪瑙の色が赤色に変化する温度
- 2) 瑪瑙の有色部の加熱前と加熱後の産状と組成の違い

4. 実験方法

4.1 試料準備と研究手法

本研究試料である瑪瑙は顕微鏡下で観察するために、岩石カッターで 5 mm程度の厚さに切断し、ダイヤモンドペーストで研磨した。予備加熱実験に用いた試料は、研磨後にペトロポキシを用いてプレパラートに貼り付けた。試料の表面観察には、実体顕微鏡、偏

光顕微鏡を用いた。組成分析および電子像観察には、エネルギー分散型検出器搭載の走査電子顕微鏡 (SEM-EDS: JEOL 社製 JSM-5010A) を用いた。また SEM での観察に際し、炭素蒸着を施した。SEM の分析条件は、加速電圧は 15 kV、照射電流が 2 nA で、スポットサイズは 2 μm であった。

4.2 瑪瑙の加熱実験

加熱実験の条件は、表 1 にまとめた。橙色を呈する瑪瑙から薄いチップを切り出し、マッフル炉で温度を変えてそれぞれ加熱した。マッフル炉から取り出した後、実体顕微鏡での観察を行い、顕微鏡観察写真を 30 秒ごとに撮影した。

表 1. 加熱実験条件

加熱温度 ($^{\circ}\text{C}$)	300	500	800	310($\pm 10^{\circ}\text{C}$)
加熱時間 (min)	30	3	30	5
冷却室温 ($^{\circ}\text{C}$)	—	—	—	17.3
湿度 (%)	—	—	—	20

5. 実験結果

5.1 加熱前の瑪瑙の産状

瑪瑙は茨城県の久慈川で採集されたもので、一辺約 5 cm の塊状である (図 1)。表面にガラス質の光沢を持つ石英が観察される。白色、透明、白濁の 3 つの色を呈する瑪瑙が不規則に重なり、層構造を成している。一部の境界は橙色を呈する。橙色を呈する部分は、幅 0.5 mm 以下である。透過偏光顕微鏡観察下では橙色を呈する部分が、反射偏光顕微鏡観察下では赤色の内部反射を示す。赤色の内部反射を示す部分を拡大すると、大きさは 10 μm 程度で円形の粒子があり、SEM による反射電子像観察下では周りの瑪瑙部分より輝度が高く観察された。加えて SEM 観察で輝度の高い部分を SEM-EDS で組成分析したところ、ケイ素、鉄、硫黄が検出された。検出された元素のスペクトル (図 2) からわかるように、硫黄の $\text{K}\alpha$ 線の強度は低い。ケイ素はスポットサイズの関係で周りの石英部分が検出されたと考えられる。

また、偏光顕微鏡観察下で、黄鉄鉱が瑪瑙の橙色を呈する部分に包有されているのが観察された。黄鉄鉱の周辺は濃い橙色を呈しており、外側になるにつれて色が淡くなっていた。反射偏光顕微鏡観察下で、黄鉄鉱の周りには赤い内部反射を示す粒子が多く観察され、SEM 観察下で黄鉄鉱の周囲の輝度は高かった (図 3)。



図 1. サンプルの瑪瑙の写真とスケッチ

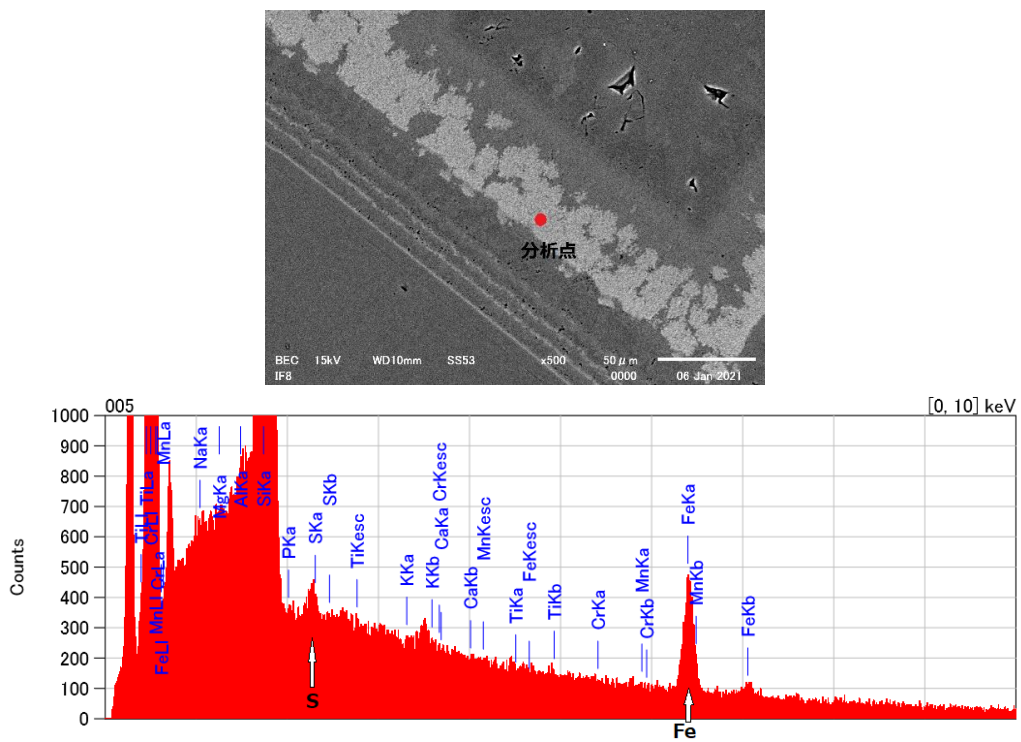


図 2. 組成分析点 (上図) と元素スペクトル (下図)

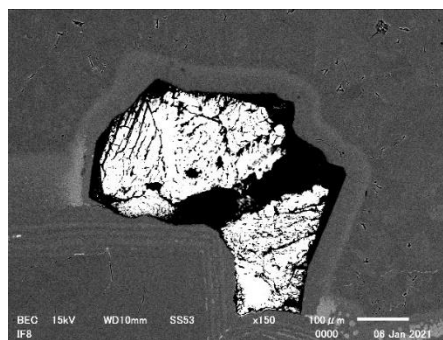


図 3. 150 倍の反射電子像で観察した黄鉄鉱

5.2 瑪瑙の予備加熱実験と観察

予備加熱実験では、全ての温度で瑪瑙の橙色の部分に赤色に変化した（図4）。加えて、全ての温度において加熱直後は黒赤色になっており、常温で3分ほど経つと赤色に変化するのを確認できた（図5）。また、500℃、800℃では瑪瑙が変質して脆くなっていた。

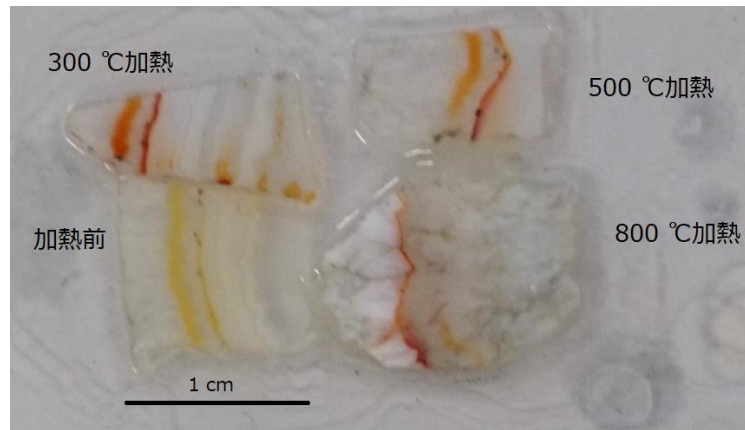


図4. 加熱前の瑪瑙片と加熱後の瑪瑙片

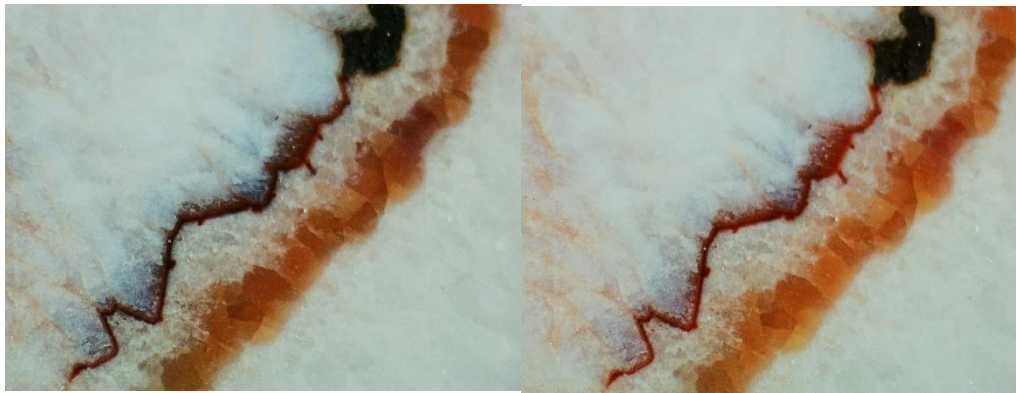
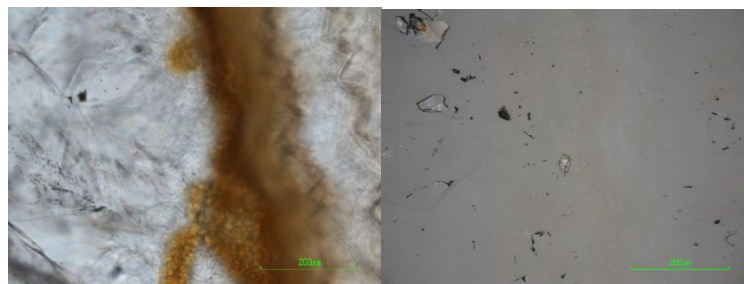


図5. マッフル炉から取り出した直後の瑪瑙片（写真左）としばらく常温の空气中に置いた瑪瑙片（写真右）

予備加熱後の全ての瑪瑙片で、赤色を呈する部分を透過偏光顕微鏡で観察すると、瑪瑙の縞に沿って大きさ $10\mu\text{m}$ 程度の円形状の赤い粒子が観察できた（図6）。この赤い粒子は反射偏光顕微鏡観察下で赤色の内部反射を示した。800℃加熱後の瑪瑙片については、他より暗い色を呈していた。よって、鮮やかな赤色を呈し瑪瑙が変質しにくい 300℃で加熱実験を行うことを決めた。



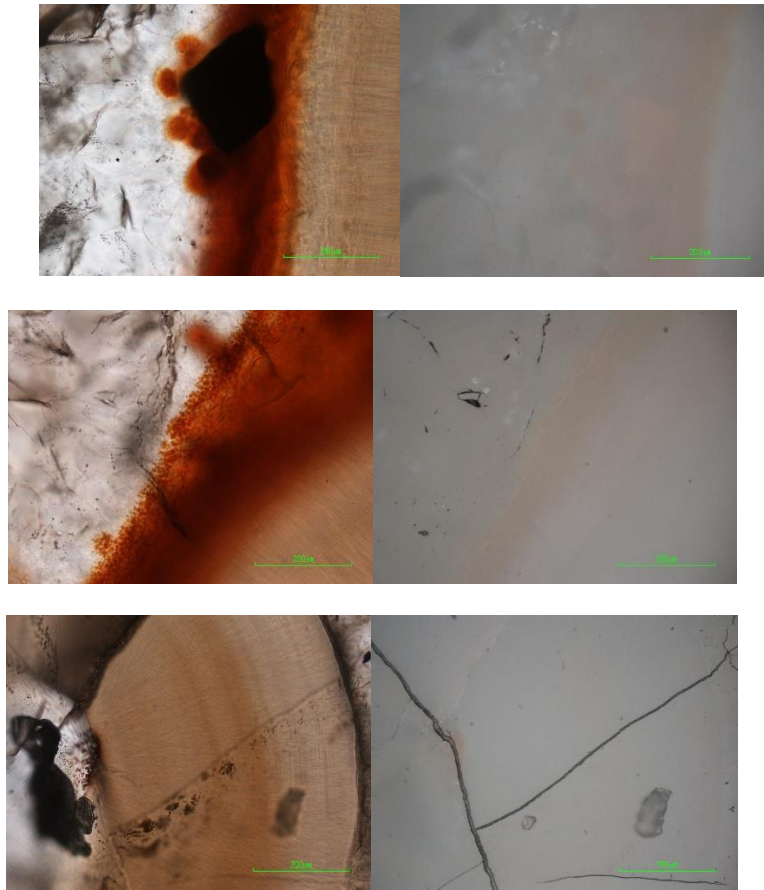


図 6. 左が透過偏光顕微鏡のオープンニコル、右が反射顕微鏡の 20 倍の写真
上の段から順に加熱前、300 °C、500 °C、800 °C 加熱後の瑪瑙片

さらに加熱後に赤色に変化した部分を SEM で観察したところ、全ての加熱条件の反射電子像で、他の部分より輝度が高い微細な粒子が瑪瑙の縞に沿って集合して球形になっているのが観察された（図 7）。

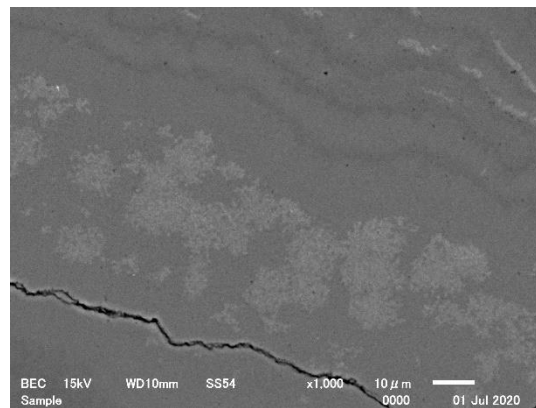


図 7. 500 °C 加熱の瑪瑙片の 1000 倍の反射電子像

5.3 瑪瑙チップの 300 °C 加熱実験と観察

新たに切り出した厚さ 7 mm 程度の瑪瑙チップを 310 °C (±10 °C) で 5 分間加熱したとこ

ろ、予備加熱実験と同様に加熱直後の瑪瑙が黒赤色に変色し、その後 17 °C の空気中で徐々に鮮やかな赤色を呈するのが確認できた。

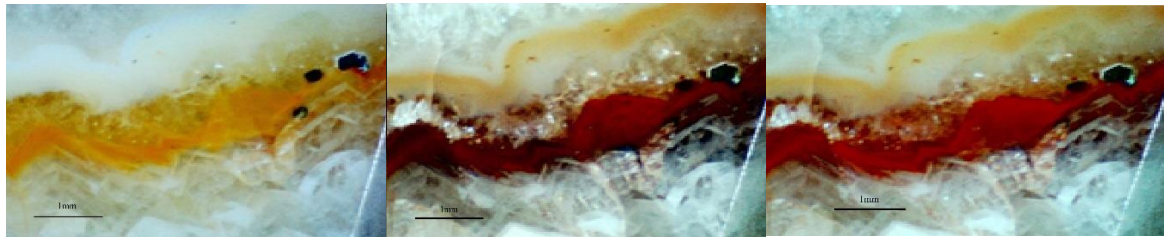


図 8. 左が加熱前、中央が加熱直後、右が加熱後 2 分経った時の瑪瑙チップの表面（倍率は 1 倍）

300 °C 加熱後の瑪瑙チップを SEM で観察し、加熱前と比較した。同じ場所の二次電子像と反射電子像を観察した結果、加熱前後共に輝度の高い粒子が観察された。また、加熱前後で粒子の大きさや形状、組成に変化は見られなかった（図 11）。

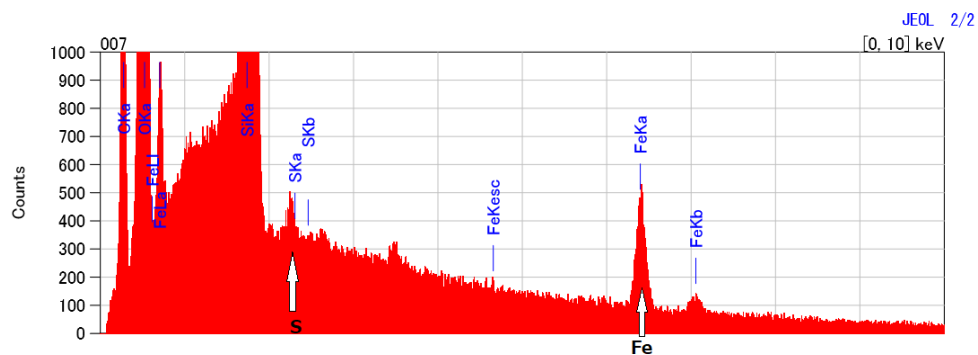
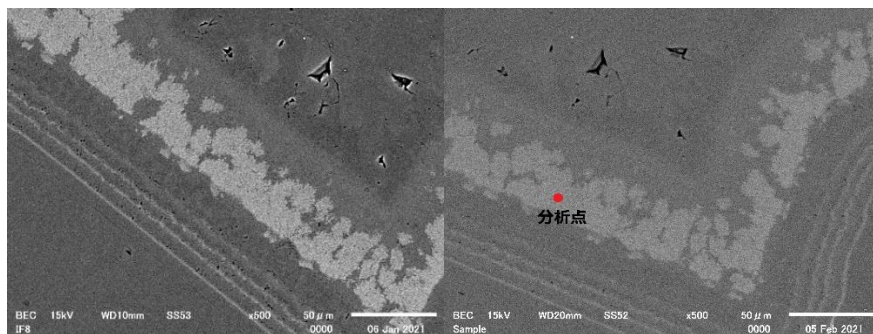


図 9. 上図：左が加熱前、右が加熱後の 500 倍の反射電子像

下図：加熱後の組成分析による元素スペクトル

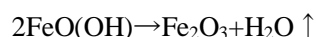
6. 考察

瑪瑙の加熱前の橙色部分と加熱後の赤色部分には、瑪瑙より大きな原子番号の元素で構成された赤色の内部反射を持つ粒子が見られた。組成分析をしたところ鉄と硫黄が検出されたことから、以下の表 2 に表される鉱物が瑪瑙の有色原因であると考えられる。

表 2. 定性分析で検出された元素と実体顕微鏡での瑪瑙の色の観察から考えられる鉱物と条痕色。(条痕色は「鉱物肉眼鑑定辞典」(松原聰 著)より)

鉱物名	化学式	条痕色
赤鉄鉱	Fe ₂ O ₃	赤～赤褐色
褐鉄鉱 (針鉄鉱)	FeO(OH)	黄褐色
磁鉄鉱	Fe ²⁺ Fe ³⁺ ₂ O ₄	黒色
黄鉄鉱	FeS ₂	灰黒色
磁硫鉄鉱	Fe _{1-x} S(x=0.1～0.2)	灰黒色
自然硫黄	S	白色に近い淡黄白色

加熱前後の瑪瑙でそれぞれ観察された微細な粒子が有色だったことから、表 2 の条混色が瑪瑙の有色原因である可能性が高い。表 2 の条痕色から、加熱前の瑪瑙の橙色は褐鉄鉱が原因であると考えられる。また加熱後の赤色は赤鉄鉱が原因であると考えられる。このことから加熱前に瑪瑙の縞の間にあった褐鉄鉱が、加熱により脱水し赤鉄鉱になることが瑪瑙の赤色が加熱により濃くなる原因だと考察される。化学式は以下のとおりである。



また鉄と共に検出された硫黄については、SEM-EDS の組成分析で調べた元素スペクトルより、鉄の K α 線の方が硫黄の K α 線より強く出たことから、瑪瑙の加熱による色の変化に影響しないほど少量だと考察した。

7. 研究成果の要点

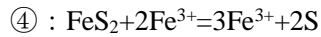
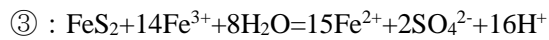
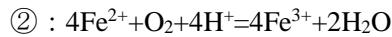
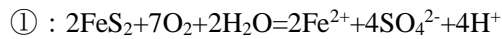
橙色を呈する瑪瑙を加熱すると、瑪瑙の縞模様に沿って赤色に変色した。この変化は 300 °C、500 °C、800 °C の温度全てで起きることが分かった。また、瑪瑙が加熱直後に黒赤色になった後、常温の空气中で赤色に変化するのが確認された。加熱前後の瑪瑙に対して表面観察と組成分析を行ったところ、鉄と硫黄が含まれていた。化学式と条痕色から、瑪瑙の加熱により赤色が濃くなる現象の原因は、瑪瑙の縞の境界に入っていた褐鉄鉱が脱水により赤鉄鉱になることであると考察された。硫黄については組成分析から色の変化に関係しないほど少量であると考察した。

8. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

今回の観察と分析で、瑪瑙の赤色が濃く変色するのに関係していると考えられる成分と必要な温度について調べることができた。一番の研究成果は偏光顕微鏡と SEM による表面観察と SEM-EDS による組成分析により、鉄の構造変化が赤色に変色する原因であると考察できたことである。加えて、鉄の他に硫黄が含まれていることもわかった。

今後の課題は、加熱前の瑪瑙に本当に褐鉄鉱が存在するか、また加熱により赤鉄鉱ができていないかを詳しく調べることである。加えて瑪瑙に含まれていた鉄がどこから来たのかを調べることである。特に鉄の由来について、外側から鉄を含む水が流れてきた場合は瑪瑙全体が橙色や赤色になっているはずなので、鉄は瑪瑙の内部から出て一部の縞の境界に入り込んでいる可

能性がある。考えられるのは、瑪瑙に包有された黄鉄鉱の酸化経路である。黄鉄鉱の酸化経路では、途中で鉄ができ、残りの黄鉄鉱と反応して硫黄ができる。この時の化学式は以下のとおりである。（下の式で、pHが低いほど④式が優勢におこる（笹木,1998）。）



これらのことを踏まえ、今後は加熱前後の瑪瑙に含まれる鉄成分についてのラマン分光分析や粉末 X 線回折装置による分析、また黄鉄鉱の加熱実験と観察を行いたい。

9. 引用文献

楽しい鉱物図鑑，堀秀道，株式会社 草思社，(1993.6.7)

鉱物肉眼鑑定辞典，松原聰，株式会社 秀和システム，(2017.10.10)

笹木圭子：黄鉄鉱の常温酸化妖怪に関する実験地球科学的研究，鉱物学雑誌，(1998.5),第 27 巻，第 2 号,93－103

謝辞

本研究では信州大学理学部地球学コースの江島輝美助教に実験についてご助言いただきました。また試料の加工には信州大学の薄片技官である高橋康氏にご助力していただきました。加えて信州大学理学部地球学コース 4 年の小淵俊秀氏に試料を提供していただきました。深く感謝申し上げます。

2020 年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：ミュオングラフィック検証実験に向けた、小型 PC による検出器制御装置の開発

報告者（申請者名）：柿元拓実 鈴木雄飛

報告日： 2021 年 3 月 4 日

1. 研究過程の概要

本研究の目的は Raspberry Pi を用いてミュオン検出器を制御し、データを取得することであり、そのためにまず、研究に必要な知識である、プログラミング言語 C++ の習得、解析ソフトである ROOT の学習、および Raspberry Pi を動作させる OS である Linux についての学習を行った。次に、Raspberry Pi に、ROOT および EASIROC Module (以下 EASIROC) を動作させるソフトウェアをインストールし、EASIROC の動作を確認した。そして、EASIROC を用いた光検出器 MPPC1ch の読み出しに成功した(図 1)。現在は、EASIROC を用いた MPPC の複数 ch 同時読み出しの方法を模索している。

2. 研究成果の要点

EASIROC を Raspberry Pi で制御することによって、当初の課題であった「小型 PC 上で装置を動かすためのプログラム実行環境」を作成するという目的は達成された。また、シミュレーションソフト Geant4 を用いた装置の性能評価を行い、物体の像を捉えるのに十分な視野角と角度分解能を持つことを確認した。更に、Geant4 で得られたデータを解析ソフト ROOT に渡し、物体によって粒子数が減少したミュオンを装置で捉え、その減少率から物体の像を画像として作成できることを確認した(図 2)。この結果をもって測定器の基本デザインの方針が正しいことを立証した。

3. 研究成果発表

柿元拓実・鈴木雄飛・高橋雪奈・林優希, 2021.2.10, ミュオンラジオグラフィ装置の開発とシミュレーション, 物理学コースアドバンス科目発表会, 信州大学理学部

4. 発表会等で得られたコメントや意見

装置は 4 層のシンチレータで構成されており、前に 2 層、後ろに 2 層を配置することによって、角度分布を作成する仕組みとなっている。この前後 2 層の間の距離 (モジュール間距離) を変えることによって、ミュオンの検出レート、装置の視野角、角度分解能などが増減する。そういった背景を踏まえて、「モジュール間距離は目標の物質や密度に応じて変更してみるかどうか」というコメントを頂いた。装置の設計上、モジュール間距離を変更することは可能であるため、シミュレーション上で行った性能評価をベンチマークとして、モジュール間距離を設定していきたい。

5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

EASIROC を用いた MPPC の同時読み出しや、2 台の EASIROC を連携させる具体的な方

法の模索が課題として残っている。しかしながら、昨今の状況を踏まえると、高エネルギー物理学周辺のソフトウェア、ハードウェアについて十分な知識をつけ、かつ実践に活かすことができたと感じている。

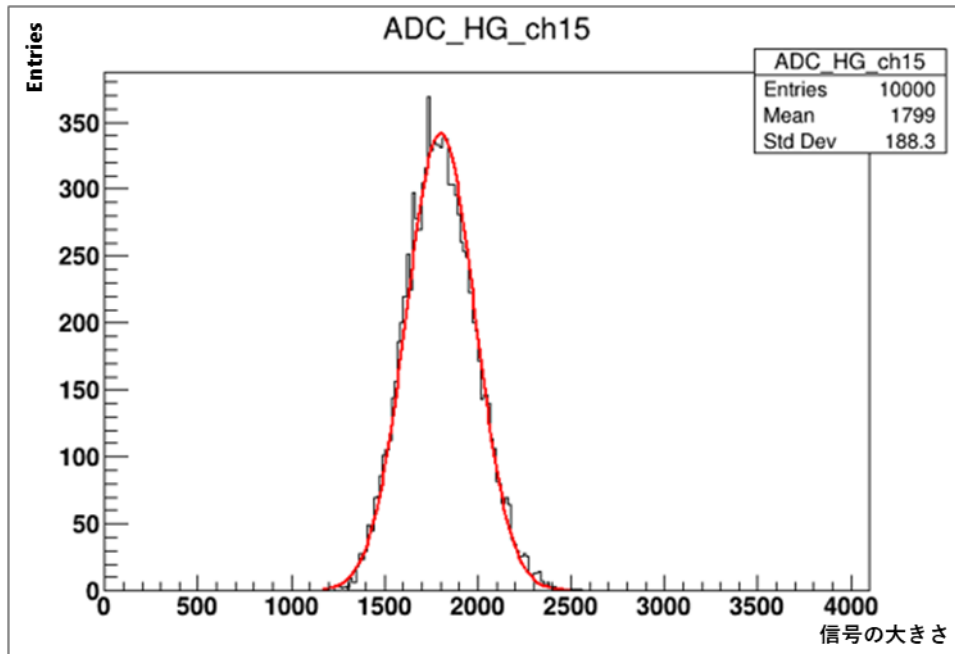


図 1. EASIROC によって得られた MPPC1ch の ADC 分布

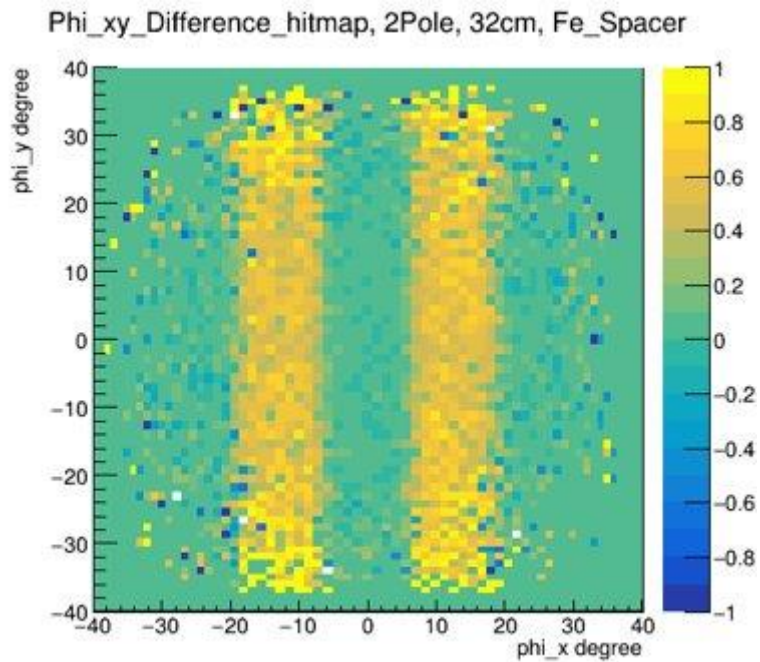


図 2. シミュレーションによって得られた物体の透視画像(2本のコンクリートの柱)

2020年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：実地測定に適した可搬型小型ミュオン検出器の開発と性能評価

報告者（申請者名）：高橋雪奈 ・ 林 優希

報告日： 2021年 3月4日

1. 研究過程の概要

本研究では、シン・リガクブ大作戦の第一段階として、ミュオン検出器の開発を行った。検出器に要求される仕様決定のため、2020年11月23日に、検出器のパフォーマンス評価を行う候補地である、伊那市の中央構造線・溝口露頭の現地調査を行った。また、現地調査から得られた、検出器設置予定地や地球学において測定対象となる場所の状況から、検出器の構造として、後述のように小型化・省電力化が重要であることが分かり、それを踏まえた検出器の構造を3D CADを用いて設計した。現在は、実際に検出器の組み立てを行っている段階である。検出器の性能評価は今後の課題となっている。

2. 研究成果の要点

溝口露頭の現地調査により、検出器設置予定場所をはじめ、地球学で測定対象となる場所の多くは足場が悪いことが分かり、検出器の小型化と持ち運びのしやすさを想定する必要があることがわかった。さらに、設置予定場所は南アルプスの雪解けや、大雨の影響で湖に沈む場所であることがわかったため、現地測定には季節や天候の制限が付くことがわかった。これらの状況に適した検出器の構造を検討し、3D CAD等を使用して設計した。使用する部品やその他組み立てに必要な材料がそろったため、現在は検出器の組み立てを行っている。

3. 研究成果発表

鈴木雄飛、柿元拓実、高橋雪奈、林優希、2011年2月10日、ミュオンラジオグラフィ装置の開発とシミュレーション、物理学コースアドバンス科目発表会、信州大学理学部

4. 発表会等で得られたコメントや意見

- ・シン・リガクブ大作戦の一環で、今後地球学や化学に研究が繋がっていくということが、スケールが大きくてよい。
- ・以前ピラミッドの透視についてのテレビ番組を見た。今回の発表と関わっていたので、テレビで取り上げるような研究を大学で取り組んでいることを知って驚いた。

5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

本研究の目標は、検出器の開発と性能評価であった。しかしながら、現在検出器の組み立て途中であり、性能評価を行うことができなかった。そのため、検出器の完成とその性能評価は今後の課題である。年度当初の目標に比べると多くの課題が残ってしまう結果であったが、検出器を一から作り上げるということから、構造の問題点などに対して、ひとつひとつ解決しながら、開発の方向性を決め、検出器の組み立てに必要な部品や材料をそろえることができたことは、評価できると考えている。

2020年度「理学部公募型アドバンス演習・実験・実習」 成果報告書

研究課題名：陸生巻貝における雑種個体の嗅盲に関する化学生態学的研究

報告者（申請者名）：深草 彩子

報告日：2021年2月15日

1. 研究過程の概要

コハクオナジマイマイとオナジマイマイの雑種個体が親種の分泌する揮発性物質に誘引されるか否かを判定する行動実験を行った。

2. 研究成果の要点

コハクオナジマイマイの成熟個体およびオナジマイマイの成熟個体が分泌する物質の揮発性分画に対し、雑種第一世代の成熟個体は誘引されないことを支持する結果が得られた。

3. 研究成果発表

深草彩子、2021年2月8日、雑種個体に特徴的な機能欠損、信州大学理学部研究室セミナー

4. 発表会等で得られたコメントや意見

本実験の結果は、雑種個体は触覚で触れるまでは配偶相手を感じできない可能性を示唆する。

5. 成果の自己評価、残された課題や反省点など

実験に不可欠の動物個体を飼育して、無事に成熟したものを行動実験に用いるべく恒常的に維持するという地道な作業が、生物学の研究においてどれほど基幹の役割を担っているのかを、多くの失敗を経て学ぶことができた。個体ごとにさまざまに異なる測定値が得られる行動実験により結論を合理的に導くにはどのようにしたらよいかを学ぶことができた。