J-1

Mn-Ga-Cu 合金における三元化合物の磁気特性

（仙台高専マテリアル環境工学科）
○船水昭宏・伊東航

キーワード： Mn-Ga-Cu 合金、磁気特性、時効熱処理、永久磁石

1．緒言

近年、高出力モーターのための強力磁石の需要が増大している。その中で、Nd-Fe-B 磁石が主力となっている。しかし、原料に希少元素を使用しているため高価であることと、産地が限定的であるため、将来的に安定供給ができなくなる可能性がある。そのため、希少元素を用いない新しい磁石材料の開発が期待されている。

近年、Mn-Ga-Cu 合金において、低温で時効熱処理することで希土類磁石に匹敵する保磁力を発現することが報告されているため、希土類磁石にかわる磁石材料として期待できる[1]。

保磁力発現には三元化合物であるτ_1 相とτ_2 相の寄与が示唆されている。τ_1 相とτ_2 相はMn_2GaCu_3 という化学量論組成比の化合物であり、それぞれ Cu_2Mg 型構造、$MgZn_2$ 型構造を示す。また温度上昇によって、τ_1 相からτ_2 相に相変態することが知られている。しかし、これらの三元化合物と保磁力発現の関係性は解明されていない。

今回は、三元化合物τ_1 相およびτ_2 相の単相合金における磁気特性を調査することを目的とした。

2．実験方法

種々の組成の Mn-Ga-Cu 合金は、高周波溶解炉を用い、Ar 雰囲気下で作製した。得られた試料を石英管に封入し、平衡化処理は 600 ℃で 5 日間、300 ℃で 1 週間行い、その後水中に焼入れた。

試料の組織観察には光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた。XRD 測定は 2θの範囲が 20~100° まで、Cu-Kα線を用いて行った。磁化測定は振動試料型磁力計(VSM)を用いて、室温において最大磁場 14 kOe の条件で行った。

3．実験結果および考察

Mn-Ga-Cu 合金を 600 ℃、5 日間の条件で熱処理した試料、300 ℃、5 日間の条件で熱処理した試料は、光学顕微鏡で観察したところ、共通して単相組織であった。

Fig. 1 に本研究で作製した Mn-Ga-Cu 合金の磁化測定結果を示した。図から、Cu 濃度の増加に伴い、磁化が低下しているのがわかる。また、同じ組成の合金でも熱処理温度によって磁化に変化が現れた。Cu 濃度が 40 at.%の時は、300 ℃で熱処理を行った試料の方が磁化が高いが、Cu 濃度が 45 at.%のとき磁化の強さが逆転し、低くなっている。このような結果の理由については現時点では不明であり、今後詳細に調査する必要がある。

4．結言

Mn-Ga-Cu 合金において、Cu の濃度が増加することにより、磁化が低下することを確認した。τ_1 相とτ_2 相は Cu 濃度が低いときはτ_1 相の方が磁化が高いが、徐々に濃度を上げていくと磁化の強さが逆転する。

しかし、磁化が極めて低いため、今回の実験結果からは τ_1 相とτ_2 相が Mn-Ga-Cu 合金磁石材料の保磁力発現に寄与していると言えない。他の析出相などが保磁力発現に起因している可能性があるため、詳細に調査する必要がある。

参考文献

[1] K. Minakuchi *et al.*, J. Alloys Comps. 611 (2014) 284.

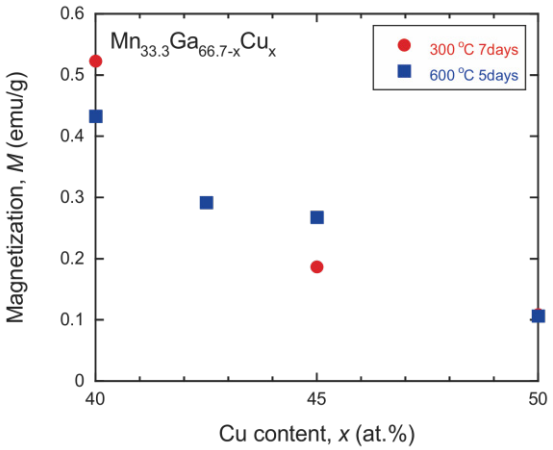


Fig.1 Mn-Ga-Cu 合金における組成および熱処理温度変化と磁化の関係性

お問い合わせ先
氏名：伊東航
E-mail：ito@sendai-nct.ac.jp

J-2

$Co_{50}Nb_{50-x}Sn_x$ ホイスラー合金のマルテンサイト変態温度および結晶構造の組成依存性

（仙台高専マテリアル環境工学科[1]、東北大学大学院工学研究科[2]）
○山村美来[1]・貝沼亮介[2]・伊東航[1]

キーワード：Co 基ホイスラー合金、マルテンサイト変態、形状記憶効果

１．緒言

Co 基ホイスラー合金はハーフメタル性を有することからスピントロニクス材料として盛んに研究が行われている。以前までマルテンサイト変態の発現が報告されていなかったが、最近新たにマルテンサイト変態を発現する Co 基ホイスラー合金が発見された。また、この合金は冷却誘起形状記憶効果という興味深い現象が発現することから注目が集まっている[1]。

Co 基ホイスラー合金のひとつである $Co_{50}Nb_{25}Sn_{25}$ 合金は今まで化学量論組成のみでの研究しか行われていない。また、マルテンサイト変態が低温域で確認できると報告されているが、報告者によって変態温度が異なっている[2,3]。さらに、形状記憶効果は発見されていない。

そこで本研究は、非化学量論組成 $Co_{50}Nb_{50-x}Sn_x$ 合金を作製し、マルテンサイト変態温度や結晶構造の組成依存性について調査を行い、形状記憶効果を発見することを目的とした。

２．実験方法

$Co_{50}Nb_{50-x}Sn_x$ (x＝20～27)合金を Ar 雰囲気中の高周波誘導溶解炉で作製した。各元素の純度は電解 Co:99.9%、Nb:99.9%、Sn:99.99%である。試料は石英管に封入し、1100 ℃で 24 時間の熱処理を施した後、水中に焼き入れた。

試料の組織観察には光学顕微鏡を用いた。XRD 測定は 2θの範囲が 20～100 度まで、Cu-Kα 線源を用いて行った。マルテンサイト変態温度測定には熱分析装置(DSC)を用いた。また、組成分析には SEM-EDS を用いた。

３．実験結果および考察

図 1 に $Co_{50}Nb_{50-x}Sn_x$ 合金の室温における粉末 X 線回折パターンを示す。Sn 量が一番少ない $Co_{50}Nb_{30}Sn_{20}$ 合金では $L2_1$ 型(ホイスラー構造)、C1b 型、C15 型を示す三相が確認された。そこから Sn 量を増やした $Co_{50}Nb_{27}Sn_{23}$ 合金では $L2_1$ 型の単相であった。さらに Sn を増やした $Co_{50}Nb_{23}Sn_{27}$ 合金では $L2_1$ 型の他にもう一相が存在していることが明らかとなった。組織観察より、この相は液相であった(図 2(a)参照)。

液体窒素を用いたその場冷却組織観察を行った結果、$Co_{50}Nb_{23}Sn_{27}$ 合金のみマルテンサイト組織が確認できた(図 2(b)参照)。DSC 測定より、マルテンサイト変態開始温度 (M_s) は -85.6 ℃であると決定した。

当日は他の組成の調査結果についても報告する。

【参考文献】
[1] X.Xu *et al*., Appl. Phys. Lett. 103 (2013) 164104.
[2] V.N.Antonove *et al*., Phy. Rev. B71 (2005) 174428.
[3] M.Terada *et al*., PHYS. Soc. JAPAN 36 (1974) 620.

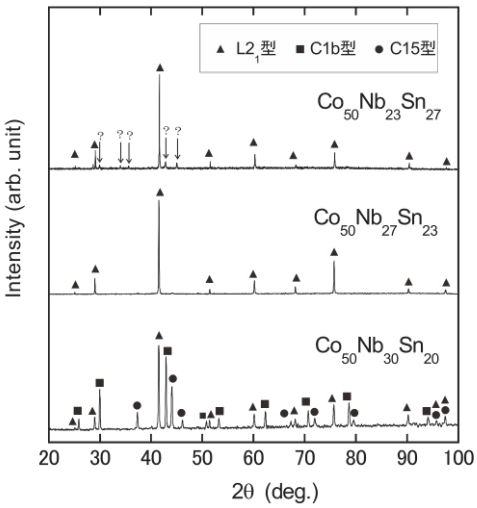


図 1: $Co_{50}Nb_{50-x}Sn_x$ 合金の粉末 X 線回折パターン

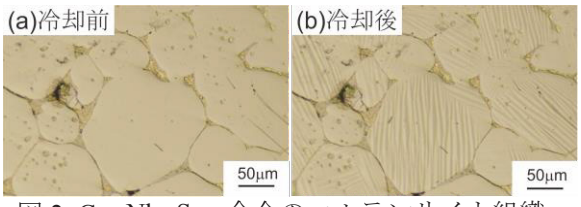


図 2: $Co_{50}Nb_{23}Sn_{27}$ 合金のマルテンサイト組織

お問い合わせ先
氏名：伊東航
E-mail：ito@sendai-nct.ac.jp

J-3

Bi 系高温超伝導ウィスカーの高効率育成方法の検討

（米子高専電気情報工学科）
○小西那奈・西尾知美・田中博美

キーワード：Bi 系高温超伝導体，ウィスカー，育成法

１．緒言

現在，高温超伝導体は次世代の省エネルギー材料として注目されている．特に，$Bi_2Sr_2Ca_{n-1}Cu_nO_y$ (n=1-3)高温超伝導針状結晶(以後，Bi 系ウィスカー)は臨界電流密度(J_c)が高く，完全結晶であるため，粒内 J_c の評価に適している．一方で，Bi 系ウィスカーの最大結晶サイズは 3 mm 程度と非常に小さく，実用化を妨げる原因となっている．従って，Bi 系ウィスカーの実用化には大型化が必要不可欠である．

このような背景の下，我々の研究室では Bi 系ウィスカーの新規育成法として VLH (Vapor Liquid Hybrid) 法を考案した．VLH 法では，母材を粉砕することでその表面積を増加させる．これに伴い蒸気圧が増加し，従来の液相成長に加えて，気相成長が促進される．

VLH 法では，触媒として Al_2O_3 粉末を母材表面に散布する．本研究では，散布粉末に Bi_2O_3 粉末を混合する工夫を行った．これは，Bi 元素が Bi 系高温超伝導体の構成元素の中では融点が最も低く，VLH 法の要となる気相成長の促進に寄与し得ると考えたためである．そこで我々は，散布粉末の Bi と Al の組成比を変化させて，最適化することでウィスカーの大型化を試みた．

２．実験方法

まず，粉末状の材料を組成比 Bi : Sr : Ca : Cu = 1 : 1 : 1 : 2 となるよう計量・混合し，1200℃のマッフル炉で融解する．その後，鉄板で挟み込み，急冷をすることで母材であるガラス急冷体を作製した．このとき，鉄板に Al_2O_3 と Bi_2O_3 の混合粉末を散布する．混合粉末の組成比は Al : Bi = x : 1-x (x = 0.5～1.0) とした．次に，作製した母材を 1.0 mm× 1.0 mm に粉砕した．この母材粒を用いた Bi 系ウィスカーの育成条件は，育成時間：24 ～120 h，育成温度：882～886 ℃，酸素流量：120 ml/min とした．評価としては，得られた Bi 系ウィスカーの最大結晶サイズを測定し，散布粉末の組成比による影響を明かにした．

３．結果と検討

図 1 に育成時間 24 h における散布粉末の Al, Bi 組成比と Bi 系ウィスカーの最大結晶サイズの関係を示す．図より，散布粉末中の Al の割合が

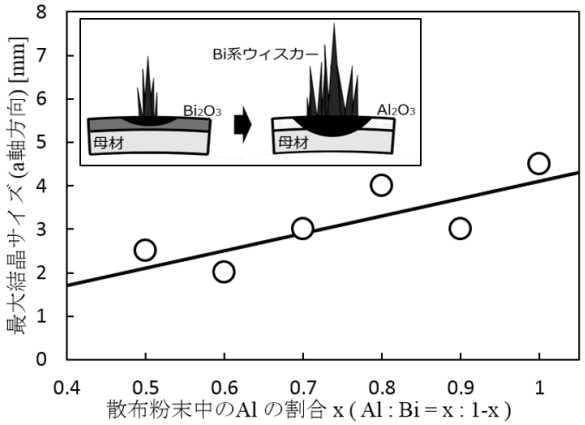


図 1　散布粉末の組成比と Bi 系高温超伝導ウィスカーの最大結晶サイズの関係

x = 0.5～1.0 の範囲で増加すると，Bi 系ウィスカーの最大結晶サイズが 2.5 mm から 4.5 mm へと系統的に増加することが分かる．Bi 系ウィスカーは一般に Al_2O_3 を触媒として液相成長する[1]．そのため，Al_2O_3 が不足していると Bi 系ウィスカーは成長できないと考えられる．このことは図 1 の結果とも一致しており，VLH 法を用いた Bi 系ウィスカーの成長においても Al の存在が重要であることが明らかとなった．

以上のことから，Al 触媒によって十分に液相成長を実現させた上で，気相成長を誘起させると Bi 系ウィスカーのさらなる大型化が期待できる．

４．結言

本研究では， Bi 系ウィスカーの大型化を目的として，VLH 法の母材表面に Al_2O_3 と Bi_2O_3 の混合粉末を補充した．その結果，散布粉末 (Al : Bi = x : 1-x) 中の Al の割合が x = 0.5～1.0 の範囲で増加すると，Bi 系ウィスカーの最大結晶サイズ 2.5 mm から 4.5 mm へと系統的に増加することが分かった．また，VLH 法を用いた Bi 系ウィスカーの成長においても Al の存在は重要であることが示唆された．

参考文献

[1]　I. Matsubara et.al : J. Cryst. Growth, (1994) 131.

お問い合わせ先
氏名：小西那奈
E-mail：e11211kn@student.yonago-k.ac.jp

J-4

Ni-Co-Mn-Al メタ磁性形状記憶合金のマルテンサイト変態挙動と磁気的性質

（仙台高専マテリアル環境工学科）
○後藤俊太・伊東航

キーワード：Ni-Co-Mn-Al、メタ磁性形状記憶合金、マルテンサイト変態

１．緒言

メタ磁性形状記憶合金とは、外部から磁場を印加した際に、常磁性のマルテンサイト(M)相から強磁性の母相へ磁場誘起逆変態を起こすことによって形状回復する合金である[1]。温度変化で形状回復する従来の形状記憶合金に匹敵する大きな歪み量と応力が得られるだけでなく、優れた応答性も示すため注目されている。これまで Ni-Mn-In 系、Ni-Mn-Sn 系合金が主に研究されてきたが、合金特有の脆弱性や磁場誘起逆変態に必要な磁場の大きさが課題であった。

近年、新たに Ni-Co-Mn-Al 合金においてメタ磁性形状記憶効果を示すことが報告された[2]。本合金は加工性に優れるが、変態ヒステリシスが大きいため改善が急務である。また、これまで$(Ni, Co)_{50}Mn_{50-x}Al_x$ 合金しか研究が行われておらず、幅広い組成での研究が報告されていない。そこで Ni-Mn-In 合金で変態ヒステリシスを減少させるのに有効であった合金設計[3]を Ni-Co-Mn-Al 合金に適用する。本研究ではこれまでに報告のなかった$(Ni, Co)_{46}Mn_{54-x}Al_x$、$(Ni, Co)_{48}Mn_{52-x}Al_x$ 合金を作製し、組織、マルテンサイト変態温度、磁気的性質の調査を行う。

２．実験方法

$(Ni, Co)_{46}MnAl$(46 断面)、 $(Ni, Co)_{48}MnAl$(48 断面)合金をアルゴン雰囲気中の高周波誘導溶解により作製した。得られたインゴットを短冊状に切断後、石英管に真空封入し、1273 K にて 1 日間の溶体化処理を施した。組織観察は光学顕微鏡により行った。各変態温度の決定には DSC を用い、結晶構造の同定には XRD を用いた。磁化測定には VSM を使用した。

３．実験結果および考察

DSC 測定結果から、両断面において Al 濃度の減少に伴ってマルテンサイト変態温度は低下したが、キュリー温度はほとんど変化しないことが分かった。また、50 断面から 46 断面へ断面をずらすことによってマルテンサイト変態温度は低下し、キュリー温度は上昇した。

Fig. 1 に室温における各組成の磁化曲線を示す。$(Ni, Co)_{48}Mn_{36}Al_{16}$ 合金、$(Ni, Co)_{46}Mn_{38}Al_{16}$ 合金は室温で母相を示す合金である。どちらも典型的な強磁性の磁化曲線を示した。飽和磁化はそれぞれ 117.9 emu/g、103.9 emu/g であった。さらに、50 断面における飽和磁化は約 100 emu/g であった[2]。50 断面から 46 断面へ断面をずらすことにより飽和磁化が増加した。

一方、$(Ni, Co)_{46}Mn_{41}Al_{13}$ 合金は室温で M 相であり、典型的な常磁性の磁化曲線を示した。$(Ni, Co)_{48}Mn_{37}Al_{15}$ 合金は強磁性的なふるまいを示した。この合金の組織観察の結果、母相と M 相が混在している組織が確認された。つまり、強磁性を示した原因は、カイネティックアレスト現象[4]により M 変態しなかった強磁性の母相が残留したことが影響していると考えられる。

当日は変態温度測定結果や磁化測定結果とあわせて組織写真や X 線回折パターンについても報告する。

参考文献
[1] R. Kainuma *et al*., Nature 439 (2006) 957.
[2] R. Kainuma *et al*., Appl. Phys. Lett. 88 (2008) 091906.
[3] K. Oikawa *et al*., Appl. Phys. Lett. 88 (2006) 122507.
[4] W. Ito *et al*., Appl. Phys. Lett. 92 (2008) 021908.

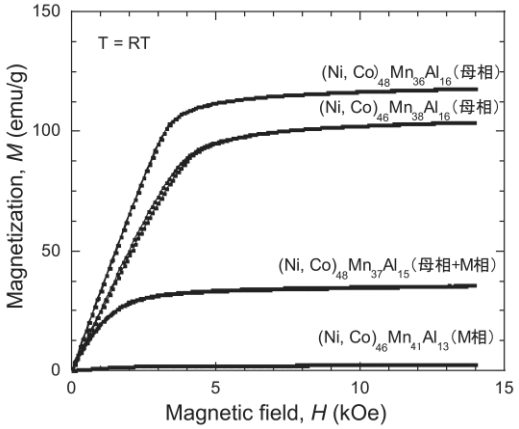


Fig. 1 室温における各組成の磁化曲線

お問い合わせ先
氏名：伊東 航
E-mail：ito@sendai-nct.ac.jp

J-5

2 元系透明導電膜を用いた フレキシブル液晶セルの試作

（仙台高専マテリアル環境工学科）

○渡部翔・熊谷晃一

キーワード：フレキシブル基板、TN 液晶セル

１．緒言

現在、液晶材料は薄型テレビやスマートフォン等に広く用いられている。これらのディスプレイを制御する電極として透明導電膜が用いられている。これは導電性を持ちながらも可視光領域で高い透過率を持つ薄膜である。

一般に、透明導電膜は酸化インジウム(In_2O_3)に酸化スズ(SnO_2)を添加した Indium Tin Oxide(ITO)を石英基板上に成膜したものが用いられるが、In は希少金属であるため資源的な問題が指摘されている。そのため代替材料として、安価で資源量が豊富な酸化亜鉛(ZnO)が注目されている。

また、 透明導電膜は基板としてガラスが用いられてきたが、軽量、安価で屈曲可能なフレキシブル樹脂基板の需要が高まっている。

本研究では，フレキシブル樹脂基板上に ITO-ZnO 2 元系透明導電膜を作製後、TN 液晶セルを試作し、その評価を行うことを目的とした。

２．実験内容

試料は、昨年までで最も優れた値を出した条件で作製した。基板は 30 mm×30 mm×100 μm の PET フィルム(KFX 帝人デュポンフィルム株式会社製)を使用した。透明導電膜は RF スパッタリング装置を用いて、成膜を行った。スパッタリング条件は Table1 に示す。

抵抗はディジタルマルチメーターを用い、直流四端子法により測定した。透過率、膜厚は紫外可視吸収分光装置(UV-VIS)を用いて測定した。測定条件は測定間隔 1.0 μm、積算 5 回、波長 200～900 nm の範囲で行った。

Table1 スパッタリング条件

スパッタ時間[min]	20
RF パワー(ITO)[W]	105
RF パワー(ZnO)[W]	45
Ar ガス流量[sccm]	20
基板-ターゲット間の垂直距離[mm]	90
ベース圧力[Pa]	$\leqq 5.0\times10^{-4}$
成膜圧力[Pa]	7.0×10^{-4}

作製したフレキシブル基板を 2 枚用いて、TN 液晶セルを作製した。液晶材料およびスペーサーは 5CB と 10 μm のポリエチレンを使用した。評価は偏光顕微鏡での観察と光学測定系による応答特性の評価を行った。

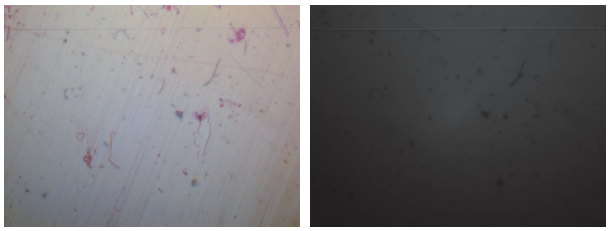
３．結果と考察

Table2 に測定した基板の物性値を示す。作製したフレキシブル基板は同条件の石英基板と比較すると 2 倍近くの膜厚があった。これは PET フィルムの剛性が石英より小さく、基板への原子の食いつきが良いためであると考えられる。大きい膜厚の影響で抵抗と透過率は低く出ている。スパッタリング条件を調整し、膜厚を小さくすることで、より適正化ができると思われる。

Fig1 は偏光顕微鏡による TN 液晶セルの観察結果である。(a)は偏光子⊥検光子の関係で、電圧無印加状態である。クロスニコル条件下で明状態であることから作製した液晶セルは TN 配向していると言える。(b)は(a)に電圧を加えたときの観察結果である。電圧の印加で暗状態に変化し、印加を止めると明状態に戻る TN 型の応答を確認できた。そのスイッチング特性の詳細については当日の口頭発表時に報告する。

Table2 フレキシブル基板の物性値

膜厚[nm]	961
抵抗[Ω]	201
透過率[T/%]	46.1
抵抗率[Ω・cm]	1.61×10^{-2}



左(a):電圧無印加　明状態
右(b).電圧印加　　暗状態
Fig1 TN 液晶セルの偏光顕微鏡画像

お問い合わせ先
氏名：熊谷晃一
E-mail：kumagaik@sendai-nct.ac.jp

J-6

サーモトロピック混合液晶のレーザー光の透過による過渡応答特性の温度依存性

（仙台高専専攻科生産システムデザイン工学専攻[1]、
仙台高専マテリアル環境工学科[2]）
○菊地信哉[1]・熊谷晃一[2]

キーワード：液晶、混合液晶、過渡応答特性、温度依存性

１．緒言

ある温度範囲で液晶性を示すサーモトロピック液晶として構造の知られている 4’-ペンチル-4-ビフェニルカルボニトリル(4’-Pentyl-4-biphenylcarbonitrile;5CB)、4’-オクチル-4- ビニフェルカルボニトリル(4’-Octyl-4-biphenylcarbonitrile;8CB)、またそれらの混合液晶は液晶関連の研究に広く用いられており、定常応答特性の温度依存性は知られているが、過渡応答特性の温度依存性は明らかにされていない。

本研究では 5CB(シグマアルドリッチ製)、8CB(シグマアルドリッチ製)などの低分子液晶、またそれらの混合液晶を用い、液晶温度範囲で温度制御しながら電圧を印加し、駆動させた際の、レーザー光の透過によって過渡応答特性を測定し、その温度依存性を調べた。

２．相転移温度

5CB は 24℃で結晶からネマチック相へ、35℃で等方相へ相転移し、8CB は 22℃で結晶からスメクチック相へ、34℃でネマチック相へ、41℃で等方相へ相転移することが知られている[1]。

その他の混合液晶については、熱分析装置により示差走査熱量測定(Differential scanning calorimetry;DSC)を行い、実際の試料の相転移温度の測定を行った。

３．液晶セルの作製

液晶セルを組む工程としては、基板は石英基板を用い、基板を洗浄、RF マグネトロンスパッタリング装置を用い、同研究グループが過去に良好な透過率および抵抗率が得られた RF パワー比 7:23 の ITO-ZnO 二元系透明導電膜を成膜、初期配向を与えるためにポリビニルアルコール(polyvinyl alcohol;PVA)をスピンコートにより塗布しラビング処理を行い、セルギャップを保つため 10μm のスペーサーをはさみ液晶を注入する、といった流れで行った[2]。図 1 に液晶セルの模式図を示す。

４．過渡応答特性の測定

5CB 単体、8CB 単体、5CB-8CB 混合液晶で TN 型液晶セルを組み、それぞれの液晶温度範囲で加熱保持しながらその過渡応答特性を測定した。

過渡応答特性を測定する方法としては、液晶セルに矩形波パルスを印加する。これによって液晶分子がねじれて配向している状態と面内方向に対して 90° 垂直に配向している状態を作り、He-Ne レーザーから放射したレーザー光を液晶セルに透過し、Pin フォトダイオードで受け、その透過光を電気信号に変換し、オシロスコープで観察して液晶分子の配向変化の過渡応答特性の測定を行った。図 2 に時間応答特性の測定装置構成を示す。講演では、測定結果の詳細について報告する。

５．参考文献

[1] 液晶便覧編集委員会(2000)『液晶便覧』 丸善株式会社 p. 325.
[2] 佐藤純平, 狭間徹, 笹野優寿, 吉田むつみ, 熊谷晃一: 第 18 回高専シンポジウム講演要旨集, “ITO - ZnO 二元透明導電膜を用いた混合液晶の配向応答”, pp. 340.

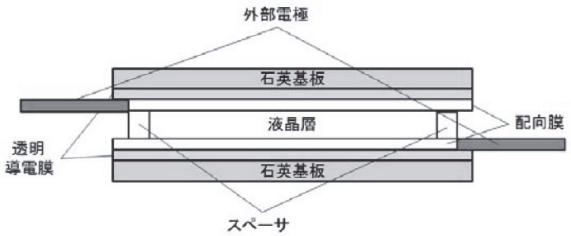


図 1　液晶セル模式図

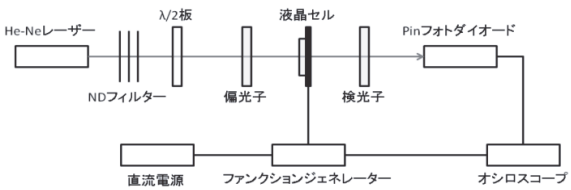


図 2　過渡応答特性の測定装置構成

お問い合わせ先
氏名：熊谷晃一
E-mail：kumagaik@sendai-nct.ac.jp

J-7 粉末冶金法を用いたAZ31マグネシウム合金のリサイクルに関する研究

（久留米高専専攻科物質工学専攻[1]、久留米高専材料工学科[2]）
○草場厚志[1]・川上雄士[2]

キーワード：粉末冶金，マグネシウム合金，リサイクル，パルス通電焼結

１．緒言

近年，輸送機器の軽量化が課題となっており，比強度の大きいマグネシウム（以下，Mg）合金の需要が高まっている．従って新たなMg合金の供給源が重要である．工場で生じるMg屑のリサイクルに着目したところ，鋳造屑は再溶融により再利用されているのに対し，切削屑は燃焼しやすく，保管が困難なので廃棄処理されている．本研究は，切削屑を粉砕して得られた粉末を常圧焼結法及びパルス通電焼結(PECS)法により焼結し，粉砕・焼結条件が焼結体に及ぼす影響を調査した．

２．実験方法

供試材としてAZ31B丸棒を使用し，旋盤加工して切削屑を得た．切削屑は脱脂後，高速振動ミルを用いて粉砕した．同時に，エタノールを適量添加して粉砕する湿式粉砕も実施した．粉末の評価はSEM観察，粒度測定，X線回折により行った．

作製した粉末は常圧焼結法及びPECS法により焼結した．常圧焼結は基本条件を焼結温度615℃，焼結保持時間10hourとし，焼結温度と焼結保持時間を変えながら行った．PECSは基本条件を加圧力33MPa，焼結温度500℃，焼結保持時間600secとし，焼結温度と焼結保持時間を変えながら行った．焼結体は，密度測定，光学顕微鏡観察，SEM-EDX分析，ビッカース硬さ試験により評価した．

３．実験結果及び考察

粉砕の結果，粉砕時間の延長に伴い得られる粉末の粒径が小さくなった．また，エタノールを3-5cm^3添加した湿式粉砕で得られた粉末は乾式粉砕で得られた粉末よりも粒径が小さくなり，乾式粉砕で生じるボトルやメディアへの凝着を防ぐことができた．X線回折の結果，湿式粉砕で得られた粉末は酸化物であるMgOが形成されていた．

乾式粉砕で得られた粉末を常圧焼結した場合は金属光沢を示す焼結体が得られたが，湿式粉砕で得られた粉末を常圧焼結した場合は焼結の進行が確認されなかった．これは，湿式粉砕で得られた粉末が酸化していたことに起因すると思われる．乾式粉砕で得られた粉末に対し，焼結温度を変化させて常圧焼結した結果，焼結温度の上昇に伴い焼結体の密度及び硬さが増加した．焼結保持時間を変化させて常圧焼結した結果，焼結保持時間と焼結体の密度及び硬さには特別な関係は見られなかった．

乾式粉砕で得られた粉末をPECSした場合，緻密な焼結体が得られた．一方で，湿式粉砕によって得られた焼結体をPECSした場合，酸化物や空孔を含む焼結体が得られた．乾式粉砕で得られた粉末に対して焼結温度を変化させてPECSした結果，図1に示されるように500℃までは焼結温度の上昇に伴い，焼結体の密度及び硬さが増加した．一方で550℃では，硬さが減少した．これは，550℃では，焼結時に一部が溶融し，粉砕時に粉末に導入された歪みが除去されたためだと思われる．焼結保持時間を変化させてPECSを行った結果，焼結保持時間の延長に伴い，焼結体の硬さが増加することがわかった．

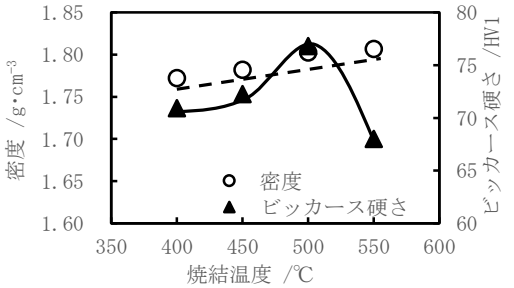


図１　PECSにおける焼結温度と得られる焼結体の密度及び硬さの関係

表１　リサイクル材と元の材料の硬さの比較

供試材名	ビッカース硬さ /HV1
押出材	81.3
焼鈍材	64.6
常圧焼結で得られた焼結体	82.4（最大）
PECSで得られた焼結体	54.3（最大）

４．結言

AZ31Bの切削屑をリサイクルするために高速振動ミルにより粉砕し，得られた粉末を常圧焼結及びPECSした結果，以下の知見が得られた．

(1) 湿式粉砕を行うことで，ボトルやメディアへの凝着を防ぎ，微細な粉末を得ることができるが，Mgが酸化し，焼結性が悪化する
(2) 焼結温度や焼結保持時間はリサイクル材のビッカース硬さに大きな影響を与える
(3) PECSを行うことで押出材と同等の機械的強度をもつ焼結体を作製することができる

お問い合わせ先
氏名：川上雄士
E-mail：kawakami@kurume-nct.ac.jp

J-8

AZ31 合金のインサートを用いたパルス通電接合性

（久留米高専材料工学科[1]）
○新井淳平[1]・川上雄士[1]

キーワード：パルス通電接合,固相接合,マグネシウム合金,インサート,PECB

１．緒言

マグネシウム合金は軽量・高強度であるが，難溶接性であるため構造部材などへの適用はまだ進んでいない．そのため適当な固相接合法の開発が望まれている．

パルス通電焼結(Pulsed Electric Current Sintering, PECS)法は，PCS, SPS などと呼ばれ従来の焼結法よりも優れた焼結法として研究が進められている．本研究で用いたパルス通電接合(Pulsed Electric Current Bonding, PECB)法は，PECS 法を接合に応用したものである．

本研究では，AZ31 のパルス通電接合において，高温加圧力下における変形が問題となっているという先行研究に基づき，接合温度の低下及び接合界面での酸化皮膜の除去を目的として Zn(sheet/powder)のインサートを用いて接合を行った．

２．実験方法

直径 20mm の AZ31B 押出材を高さ 20mm に切り出し，試験片二つ一組を一度の接合に用いた．接合面は，#800 まで耐水研磨紙による湿式研磨を行った後アルコール洗浄を行った．インサートとして用いた Zn sheet 及び Zn powder は，それぞれ厚さ 50μm，粒径 75μm である．

㈱ソディックメカテック製の U-PAS410 を用いて AZ31B のパルス通電接合を加圧力 5MPa，種保持時間 10min という条件で種々の測定温度での接合を行った．

接合を行った試験片に対して，引張試験機による接合強度評価，走査型電子顕微鏡（SEM）及びエネルギー分散型 X 線分光法(EDX)による接合界面の分析を行った．

３．結果及び考察

Fig. 1 に継手の引張試験結果を示す．直接接合とインサートを用いた接合両方で温度に依存して接合強さが増加する傾向が見られる．また，インサートを用いた接合では直接接合に比べてより低温，高強度側に分布が推移している．これは Zn 及び Mg の溶融による酸化被膜除去の効果であると考えられる．

この酸化被膜除去効果について検討するため，EDX による破断面分析を行った．Fig. 2 に接合温度 660K での試験片における破断面の Al, Mg, Zn に対する SEM 及び EDS 分析結果を示す．

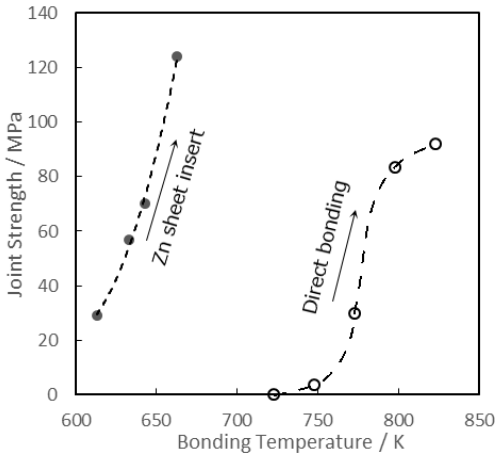


Fig. 1 Relationship between joint strength and bonding temperature in AZ31/AZ31 and AZ31/Zn sheet/AZ31 joints.

破断面は脆性破面と延性破面の領域に分けられ，脆性破面領域には Zn が多量に検出され，延性破面領域は Mg のみが検出されていることがわかる．これは．Mg が Zn と共晶反応を起こし溶融した後，加圧力によって界面から押し出されることで酸化被膜を除去し，健全な接合継手が形成されたためであると推察される．

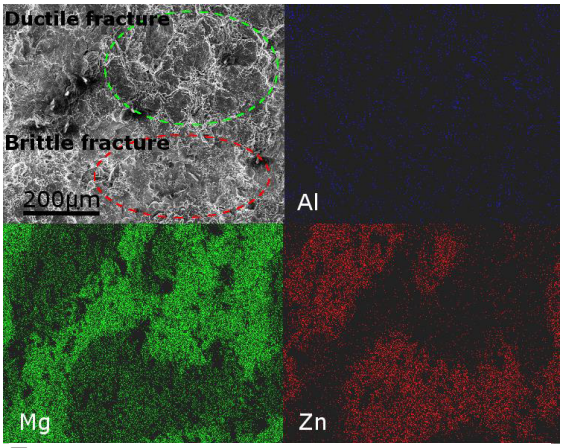


Fig. 2 SEM image and EDS analysis on fracture surface of joint bonded at 660K

謝辞

本研究の一部は「高専-長岡技科大共同研究助成」の支援を受けたものです．

お問い合わせ先
氏名：川上雄士
E-mail：kawakami@kurume-nct.ac.jp

J-9

電源装置の制御方式による SPS 焼結体への影響

（久留米高専専攻科物質工学専攻[1]，久留米高専材料工学科[2]）
○酒井大樹[1]・川上雄士[2]

キーワード：SPS，パルス比，パルス制御

１．緒言

放電プラズマ焼結法（SPS 法:Spark Plasma Sintering）は試料に対して一軸加圧及びパルス通電加熱を行うことにより，焼結を行う方法である．SPS 法に用いられる電源装置には，サイリスタ位相制御もしくはインバータによる PWM 制御による方式が採用されている．本研究では，チタンを試料とし，各々の制御方式で SPS を行い，試料を評価することで制御方式の違いによる材料への影響を調査した．

２．実験内容

純チタンビーズ（φ500～700 μm)を原料とし，SPS を行った．SPS 条件は，加圧力 20 MPa，昇温速度 50 ℃/min，焼結温度 600 ℃，保持時間 3 min，真空雰囲気下とした．サイリスタ及びインバータ制御方式それぞれでパルス比を変化させ，焼結を行った．作製した焼結体試料の断面に対して光学顕微鏡及び SEM-EDS を用いて組織観察及び分析を行った．

３．実験結果及び考察

パルス比の違いによる試料の界面観察結果を図 1 に，パルス比 ON/OFF=40/7 試料の界面における SEM 観察結果を図 2 に示す．焼結の進行が十分でなく，ほぼ全てのビーズ界面で接合されていないものが支配的であった．また，粒毎に接合の進行度合いは異なることが観察された．これは，SPS 時の試料に対する投入エネルギーが小さいことによるものと考えられる．このため，パルス比の違いによる組織の明確な差は見られなかった．

ビーズ界面の接合状態による酸素含有割合を表 1 に示す．酸素含有割合は，EDS ピークデータにおける酸素ピークをチタンピークで除することにより規格化した．酸素は，接合面より非接合面の方が多く存在していることがわかった．

インバータ，サイリスタの制御方式及びパルス比による焼結体への影響を表すデータは当日に示す．

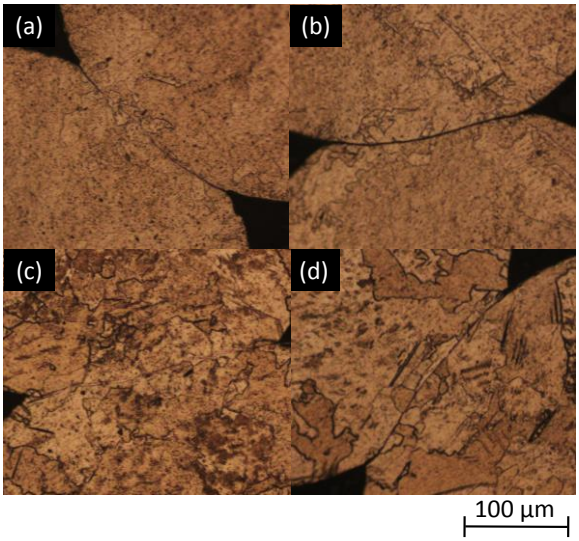


図 1．パルス比による試料の界面観察結果
ON/OFF=(a,b) 40/7 (c,d) 330/3

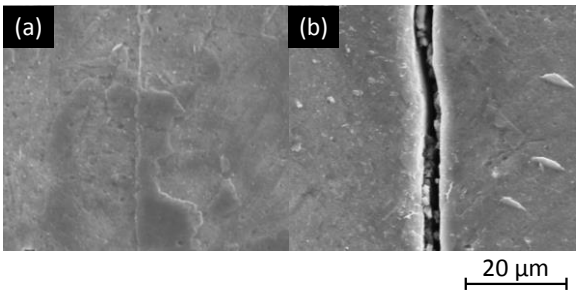


図 2．パルス比 ON/OFF=40/7 試料の界面における SEM 観察結果

表 1．試料中の酸素含有割合
(EDS ピークデータによる規格値)

	接合面	非接合面	粒内
酸素含有割合	8.9	11.7	8.5

謝辞
本研究の一部は「高専-長岡技科大共同研究助成」の支援を受けたものです．

お問い合わせ先
氏名：川上雄士
E-mail：kawakami@kurume-nct.ac.jp

J-10

光触媒 $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ 複合粒子の合成と微細化の検討

（仙台高専マテリアル環境工学科）
○松房恵美・佐藤友章

キーワード：光触媒、複合粒子、微細化、$WO_3/g\text{-}C_3N_4$、複合化処理

１．緒言

近年、光触媒によって太陽光を利用し、CO_2 と H_2O を原料として有用な有機物を光合成する研究が盛んである。多くの研究所や大学等で人工光合成を目的とした光触媒材料の研究・開発が行われており、開発された光触媒材料の一つに $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ 系ハイブリッド光触媒がある。この $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ は可視光波長領域において光触媒作用するという利点を有する。一方で、多くの光触媒と同様に生成を目的とする物質の収率が低いという欠点がある。

本研究では、複合粒子のハイブリッド化と微細化を目的として、$g\text{-}C_3N_4$ 粉末の微細化および液相中における酸化タングステン系と $g\text{-}C_3N_4$ との複合化処理を行い、合成粒子の結晶構造や粒径分布などについて検討する。

２．実験方法

メラミンを大気中、550 ℃の条件で熱分解することにより $g\text{-}C_3N_4$ 粉末を得た。さらに微細化を目的として、この粉末を水酸化ナトリウム水溶液に加えて懸濁させ、80 ℃で 20 時間撹拌を行った。その後、減圧濾過により固液分離し、固体を乾燥機で一晩乾燥させてから粉砕することでアルカリ水熱処理による微細化処理 $g\text{-}C_3N_4$ を得た。

$g\text{-}C_3N_4$ と複合化処理後に生成される H_2WO_4 との質量比が 1:1 となるよう、微細化処理 $g\text{-}C_3N_4$ とタングステン酸アンモニウムパラ五水和物を秤量し超純水を加えて超音波処理を 30 分行うことにより懸濁させた。80 ℃の分散懸濁液に反応開始剤の硝酸水溶液を加えて撹拌しながら 2 時間複合化処理を行った。その後、減圧濾過により固液分離を行い、乾燥機で一晩乾燥させることにより $H_2WO_4/g\text{-}C_3N_4$ 複合粒子を得た。さらに、大気中、250 ℃の条件で 3 時間熱処理を行い $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ 複合粒子を得た。

得られた各粉末に対して、X 線回折装置(XRD)による結晶構造および粒度分布の分析を行った。

３．結果と考察

合成した $g\text{-}C_3N_4$, $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ の XRD 測定結果を図 1 に示す。$g\text{-}C_3N_4$ では 28°付近にピークが、$WO_3/g\text{-}C_3N_4$ では $g\text{-}C_3N_4$ のピークは小さく WO_3 の回折ピークが大きく現れた。これらのピークの

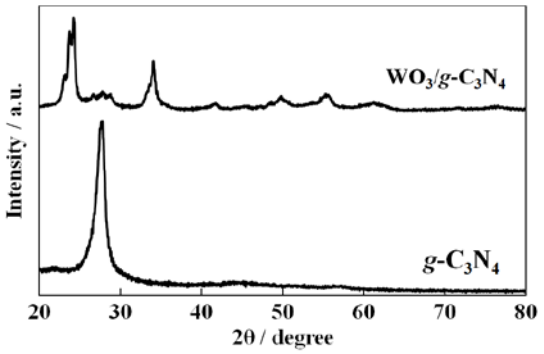


図 1 合成した $g\text{-}C_3N_4$ および $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ の XRD 測定結果

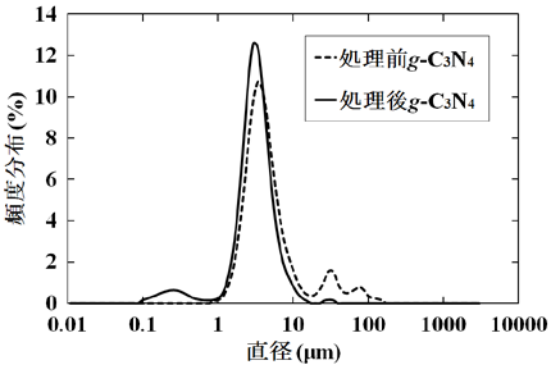


図 2 アルカリ水熱処理前後の $g\text{-}C_3N_4$ の粒度分布測定結果

様相は Ohno らの報告と同様であり、$g\text{-}C_3N_4$, $WO_3/g\text{-}C_3N_4$ が合成されているとみられる。

アルカリ水熱処理前後の $g\text{-}C_3N_4$ の粒度分布測定結果を図 2 に示す。処理前後ともに 5 μm 付近の分布が主であるが、処理前に存在した 10 μm 以上の分布が処理後にはほぼ見られなくなり、さらに 0.5 μm 付近に新たなピークが現れた。$g\text{-}C_3N_4$ は層状構造であることからアルカリ水熱処理により層が剥離し、見掛け上、サブミクロンサイズの小さな粒子が現れたものと思われる。

参考文献：Photocatalytic reduction of CO_2 over a hybrid photocatalyst composed of WO_3 and graphitic carbon nitride ($g\text{-}C_3N_4$) under visible light , Teruhisa Ohno *et.al.* , *Journal of CO_2 Utilization* , **6,** 17-25(2014)

お問い合わせ先
氏名：佐藤友章
E-mail：tomo@sendai-nct.ac.jp

J-11

Fe-Cr-Co 合金の組織と硬さにおよぼす時効熱処理の影響

（仙台高専マテリアル環境工学科[1]、
仙台高専専攻科生産システムデザイン工学専攻[2]）
○高玉秀之[1]・大宮啓太[2]・伊東航[1]

キーワード：高硬度合金、スピノーダル分解、Fe-Cr-Co 合金

１．緒言

現在使用されている高硬度材料として超硬合金がある。高い硬さを有し、耐摩耗性があるという特徴があるが、割れやすく、加工しにくいという欠点がある[1]。それを改善するために、高硬度かつ靭性を持つ材料が期待されている。近年、Fe-Mo-Mn-Al 合金に時効熱処理を施すことで、1000 を超えるビッカース硬さとある程度の靭性をもつことが発見された。これは Fe-Mo 合金のスピノーダル分解による変調組織の発現が原因とされる[2]。

一方、宮崎らにより、Fe-Cr 合金でもスピノーダル分解が発現すると報告されている[3]。しかし、時効処理に伴う組織、諸特性に不明な点が多く、詳細は明らかにされていない。

本研究では Fe-Cr 合金に注目し、スピノーダル分解温度を上昇すると期待される Co を添加した Fe-Cr-Co 三元系合金を用いる。熱処理条件の温度、時間を変化させて、組織、硬さ、結晶構造等を解析し、スピノーダル分解の有無、高硬度を示す原因を解明することとする。

２．実験方法

種々の組成の Fe-Cr-Co は Ar 雰囲気下でアーク溶解炉を用いて作製した。各元素の純度は、電解 Fe: 99.9% 、電解 Cr: 99% 、電解 Co: 99.9%、である。試料は石英管に真空封入し、溶体化熱処理を 1300 ℃で 6 時間、時効熱処理を 500～600 ℃、1～24 時間でそれぞれ行い、その後水中焼き入れした。

試料の組織観察には光学顕微鏡を用いた。硬さ測定にはマイクロビッカース硬さ試験機を用いた。XRD 測定では 2θ の範囲が 20～100° まで、Cu-Kα 線を用いて行った。

３．実験結果

図 1 に Fe-30Cr-25Co (wt.%)合金を 1300 ℃で 6 時間溶体化熱処理した後、600 ℃で 24 時間時効熱処理を施した組織写真を示す。図 1 から 50～200 μm 程度の析出物が確認された。また、この組織と他の条件下での組織にほとんど変化は見られなかった。

図 2 に Fe-30Cr-25Co (wt.%)合金の時効熱処理に伴うビッカース硬さの変化についてのグラフを示す。組織全体、析出物、別々に硬さを測定したが、いずれの熱処理条件においても 300 HV 0.3 程度であった。

また、溶体化および時効試料の X 線回折パターンにおいてはバルク材で測定したため、いずれの熱処理条件においても FCC 相由来の一部のピークのみが見られた。今回、析出物由来のピークが発現しなかった理由は不明である。

以上の結果より、Fe-30Cr-25Co 合金に時効熱処理を施したときにスピノーダル分解は起きず、硬さの向上は確認できなかった。当日は Fe-30Cr-25Co 以外の組成の調査結果についても報告する。

【参考文献】
[1] J. Gurland and P. Bardzil: J. Met., 7 (1995) 311.
[2] 宮崎 亨: 日本金属学会会報, 19 (1980) 185.
[3] 宮崎 亨ら: 日本金属学会誌, 38 (1974) 70.

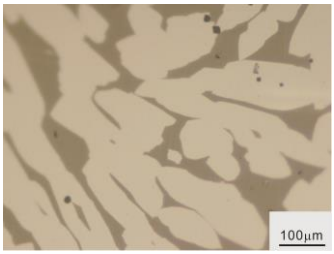


図 1：時効熱処理を施した Fe-30Cr-25Co 合金の光学顕微鏡写真

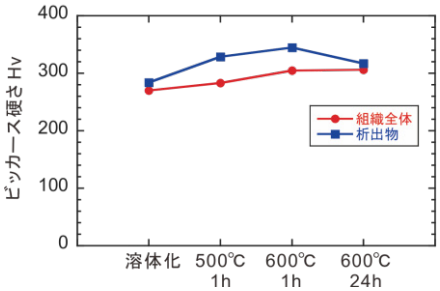


図 2：時効熱処理に伴う Fe-30Cr-25Co 合金のビッカース硬さの変化

お問い合わせ先
氏名：伊東航
E-mail：ito@sendai-nct.ac.jp

実用鋼の浸窒焼入れにおける硬さ向上メカニズムに関する研究

J-12

○齋藤樹[1]・熊谷進[2]
（仙台高専専攻科生産システムデザイン工学専攻[1]、
仙台高専マテリアル環境工学科[2]）

キーワード：材料加工、熱処理、焼入れ焼戻し、ガス窒化、実用鋼

１．緒言

鉄鋼部品の表面処理として工業的に行われている浸炭焼入れでは内部歪みによる工数の増大、ガス窒化では硬化層の薄さが課題とされており、近年では浸窒焼入れが注目されている。浸窒焼入れは焼入れとガス窒化を同時、または連続的に行う処理であり、ガス窒化より比較的厚い窒素の硬化層が試料表面に得られることが期待されている。
そこで本研究では、実用鋼に窒化焼入れを施し、鋼材の影響について調査する。

２．実験方法

供試材は JIS SCr420H 鋼であり、2 mm×8 mm×20 mm の平板状試験片に加工した。NH3 ガス(5N)を流量 20 ml 一定で流し、580℃で 6 h 保持後、920 ℃に昇温、30 min 保持し 80 ℃の油に落とすことで焼入れた。焼戻しは 300 ℃～500 ℃で行い、硬さ分布に及ぼす焼戻し温度の影響を調べた。また比較のために窒化を施していない焼入れ焼戻し試料も作製した。

熱処理を施した試料に対して断面の光学顕微鏡観察、電子線後方散乱回折(SEM-EBSD)、マイクロビッカース硬さ試験、表面のX線回析(XRD)を行った。

３．結果及び考察

図 1 に試料断面の硬さ分布を示す。また、6 h ガス窒化（焼入れなし）の結果も示す。窒化焼入れでは表面側で硬さが低下しているものの窒化していない焼入れ焼戻し鋼より硬さの向上は顕著である。また、ガス窒化と比較して内部まで硬さが向上しており、これは焼入れ･焼戻し過程で窒素が内部に拡散していることを示していると思われる。表面側の硬さの低下に関してはポーラス層の存在と窒素が表面から抜けたものであると思われる。

窒化表面の XRD パターンを図 2 に示す。各温度において母相のマルテンサイト相に加えて Fe_3N、Cr_2N、C_3N_4 などの窒化物のピークが検出されているが、焼戻し温度によって主要な窒化物が異なっている。

５．結言

実用鋼を対象に浸窒焼入れ焼戻しを行い、浸窒による硬さの向上を明らかにした。また表面の XRD 回折から合金元素の窒化物を確認できた。

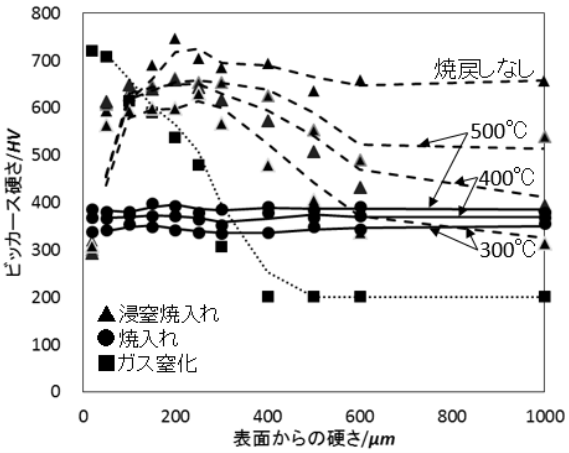


図 1 表面からの硬さ分布

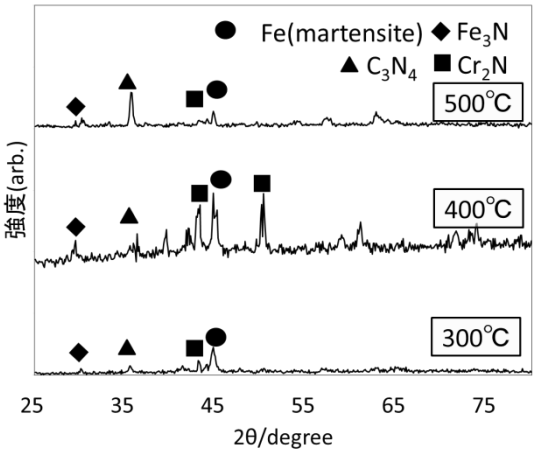


図 2 試料表面の XRD パターン

謝辞

本研究は、パーカー熱処理工業（株）技術研究所渡邊陽一氏から供試材の提供並びに有益な助言を多数いただきながら遂行したもので、ここに深謝の意を表します。

お問い合わせ先
氏名：熊谷進
E-mail：skumagai@sendai-nct.ac.jp

J-13

思川桜から分離した酵母の特性解析と地域ブランドのお酒・パンの開発

（小山高専専攻科複合工学専攻物質工学コース[1]、小山高専物質工学科[2]）
○荻野目あづさ[1]・川久保利麗叶[2]・上田誠[2]

キーワード：酵母、醸造、26SrDNA

１．緒言

各種アルコール飲料は発酵原料や製造法が異なるため、その製造に用いられる醸造用酵母は、その製造するアルコール飲料に適したものが選択され使用されている。清酒については、殆どのものが醸造協会系酵母を使用して製造されているが、個性的なお酒のニーズから、独自の酵母を、地域性を活かして花や果実から新たに探索する試みもなされている。本研究では、栃木県小山市の市花である思川桜（*Prunus subhirtella forma omoigawa*）から、発酵用酵母を取得し、清酒や製パンなどの発酵食品の開発を行うことを目的とした。

２．実験方法

YPS 液体培地（スクロース 20%、酵母エキス 0.3%、ポリペプトン 0.3%、プロピオン酸カリウム 0.64%、クロラムフェニコール 0.01%）に採取した桜の花弁を漬け、数日間のうちに菌の生育が確認できた培養液を YM 培地（グルコース 1%、酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.3%、ポリペプトン 0.5%）に塗布し、生えてきたコロニーを単離した。

分離株の中から *Saccharomyces* 属酵母を選別するために、単離した菌株をクロムアガーカンジダ寒天培地に播植し、出現するコロニーが白から紫色を呈する菌株を選択した。そしてこれら分離株について、エタノール耐性試験、TTC 染色試験等によって酵母の酒造能力を調べ、優良株を 26SrDNA D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列解析から種の同定を行った。

S. cerevisiae と同定された菌株を用いて研究室規模での小仕込試験を行ったのちに、生成した清酒の醸造特性の調査を行った。また、製パンへの展開も考慮し、実際に製パン業者で使用されているベーカーズイーストと本研究で取得した酵母との製パン能の比較を行った。

３．結果

YPS 培地に漬け込んだ 265 サンプル中、92 サンプルに発泡が確認されたため、これらの培養サンプルからクロムアガーカンジダ培地により、*Saccharomyces* 属酵母または *Saccharomyces* 属類縁の酵母と予想される菌を、顕微鏡観察の結果も含めて分離し、酵母の酒造能力の評価を行った。結果、どの項目でも概ね優れており TTC 染色でも赤色を呈した OPJ-1 株、OPJ-1 株には劣るが比較的優れた結果を示した OPJ-74-1 株を選択した。この二株はリボゾーム DNA の遺伝子解析の結果から *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。

小仕込試験の結果、生成した清酒は二株とも協会系酵母とは異なる特徴を持っていることがわかった。また、OPJ-1 は比較的高濃度のエタノールを生成することができたが OPJ-74-1 はエタノールへの耐性がやや低かった。

OPJ-1 株の製パン能は、市販の酵母よりも発酵力はやや劣るが増殖力には問題なく、酵素活性や耐熱性の解析による製パン条件の至適化を検討したい。

４．総括

研究で得られたデータを基に OPJ-1 を用いて地元酒蔵で仕込みを行い、2014 年 4 月に水、お米、酵母全て地元産の日本酒を販売し好評を得た。実生産において、工程中および味覚で改良すべき点が確認できたため、現在は酵母改良のための育種研究を進めており、年内の改良株作成を進めている。

本酵母群の製パンへの展開については、小山市の障害者自立支援の製パン業者（社会福祉法人）と共同して行っている。研究においては、分離酵母と工業的なパン酵母の発酵能力や得られたパンのテクスチャー等を工学的な解析で比較し、また、安定で再現性のある製パン能を持つ酵母供給のための培養条件再度検討中である。今年度、OPJ-1 を用いて製作したパンを自校の学園祭において限定販売し、概ね好評を博したため、現在は、来年度に向けた定期的な製品化を目標としている。

本研究は、三機関連携プロジェクトの助成金で行われた。

お問い合わせ先
氏名：荻野目あづさ
E-mail：akox.0c0@gmail.com

J-14

Aspergillus niger を用いた複合酵素反応による ショ糖からのDFAⅢの合成

（小山高専専攻科複合工学専攻物質工学コース[1]、小山高専物質工学科[2]）
○増田亮[1]・秋元将吾[2]・上田誠[2]

キーワード：*Aspergillus niger* 、DFAⅢ、フラクトオリゴ糖、カスケード反応

１．緒言

DFAⅢ(di-D-fructo-furanose 1,2’ : 2,3’ -dianyhydride)は 2 分子のフルクトースが分子内で脱水環化したオリゴ糖であり、カルシウムやマグネシウムなど、ミネラルを吸収促進する効能があるとされ健康補助食品として商品化されている。現在はキク科の植物の貯蔵多糖類であるイヌリンを原料とした Inulin Fructotransferase(DFAⅢ合成酵素,IFTase)を用いた酵素反応によって合成される。しかしイヌリンは高価なため、より安価なスクロースから酵素反応によりフラクトオリゴ糖(fructooligosaccharides)を合成し、さらに同一反応系内で IFTase を作用させフラクトオリゴ糖を連続的に変換し DFAⅢを合成するカスケード反応の構築を検討した。

２．実験方法

Aspergillus niger ATCC20611 を 5%スクロースを唯一の炭素源とする液体培地に植菌し、24h 前培養の後、48h 本培養を行い、培養液から遠心分離によりフラクトオリゴ糖合成に用いる菌体を調整した。

フラクトオリゴ糖合成でのスクロース濃度を検討するために、スクロース濃度を 300、400、500g/L になるように pH7.0 の 20mM リン酸カリウム緩衝液で調整した。これに得られた *A.niger* 菌体を加え反応させ、生成したフラクトオリゴ糖の重合度、生成量を HPLC で分析した。

次にワンポット反応でフラクトオリゴ糖を DFAⅢに変換させる IFTase の調整を行った。イヌリンを唯一の炭素源とする液体培地に *Arthrobacter* sp.OTTC-1 を植菌し 48h 培養後、遠心分離し上清を回収した。これを 80%飽和の硫酸アンモニウム溶液で塩析後、沈殿物を再溶解・透析し、得られた菌体外酵素を IFTase 粗酵素液とした。

DFAⅢ合成検討は、*A.niger* 菌体を用いてスクロースから合成したフラクトオリゴ糖溶液に IFTase を作用させる方法及び、*A.niger* の菌体反応と IFTase の反応をワンポットで行い、スクロースを出発原料とするカスケード反応により行う方法の二通りを検討した。生成した DFAⅢは HPLC で分析した。

３．結果及び考察

・*A.niger* によるフラクトオリゴ糖の合成

調製した *A.niger* 菌体と濃度 300、400、500g/L スクロースの反応系で 5 日間反応させた。いずれの反応も糖転移反応によるフラクトオリゴ糖の生成が確認できた。HPLC で分析した結果、500g/L スクロースの反応系が GF_5、GF_6、GF_7 と思われる重合度の高いフラクトオリゴ糖の生成量が最も多いことが分かった。IFTase はイヌリンのような重合度の高いフラクトオリゴ糖に対して反応性が良い(Km 値が低い)ため、IFTase の反応にはフラクトオリゴ糖の重合度、生成量が最も高い 500g/L スクロースを用いる事にした。

・フラクトオリゴ糖と IFTase の反応

500g/L スクロースと *A.niger* の反応から得られたフラクトオリゴ糖溶液に、IFTase 量を変えて反応させ、HPLC で分析した結果、至適条件で 2h 反応させた系で生成した DFAⅢの量が 5g/L 以上であった。また、ワンポット反応の検討についても報告する。

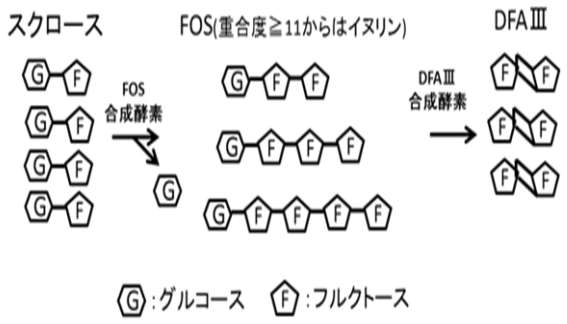


Fig. DFAⅢ合成のスキーム

お問い合わせ先
氏名：増田亮
E-mail：masuda.apatite@gmail.com

J-15

ゴム分解微生物の遺伝子解析およびゴム分解遺伝子の変異体作成条件の検討

（久留米高専専攻科物質工学専攻[1]、久留米高専生物応用化学科[2]）
○田中　涼[1]・笈木宏和[2]

キーワード：ゴム、微生物処理、エレクトロポレーション、変異体作成

１．緒言

現在我々はゴム製品を様々な場所で利用している。しかし合成ゴムは多量に生産・利用されているため、それに伴い廃棄物処理の問題が年々深刻化してきている。最も多量に生産されている合成ゴムはスチレン-ブタジエンゴム(SBR)であり、その処理方法は、燃焼や埋め立てといった環境に負荷を与える方法が主である。

現在、低環境負荷の面からゴムを分解する微生物の研究が盛んに行われている。本研究室でも合成ゴムを分解するバクテリア *Entero-bacter* MOE-1（MOE-1）の作成およびゴム分解反応に寄与する酵素の抽出や解析に取り組んできた。

本実験は、MOE-1 の分解酵素をコードする遺伝子の同定条件の検討を目的とし、次世代シーケンサーによる MOE-1 の total DNA 解析およびゴム分解酵素をコードする遺伝子部位を特定するための変異体の作成条件の検討を試みた。変異体作成には UV を照射し、菌体にランダムな変異を与える UV 法および、ある特定の配列に入り込み、部分的な変異を与えるトランスポゾン法を用いた。なお、トランスポゾン法は、その導入条件を詳細に検討する必要があるため、今回は前実験としてプラスミドを用いたエレクトロポレーションによる導入試験を試みている。

２．結果および考察

total DNA の解析の結果、MOE-1 の GC 含量 55.7%、Total 塩基数 4,804,247 個を確認することができた。ゴム分解菌の推定される反応メカニズムより、BLAST 検索の結果により得られた Oxygenase、Hydrolase、Peroxidase のいずれかがアルデヒド生成に関与していると考えられる。

変異体の作成にあたり、ゴムの分解生成物であるアルデヒドの生成が行われなくなることが考えられる。そこで、変異体選定のためのアルデヒドの検出方法の検討を行ったところ、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた場合、よい検出結果を得ることができた。天然ゴム分解菌などでよく用いられているプレート染色法 1)も試みたが、MOE-1 ではうまく検出できなかった。この理由として、MOE-1 が膜タンパクのため、うまく染色できないことが考えられる。

Table 1　MOE-1のアルデヒド生成比の平均値

菌名	アルデヒド生成比	菌名	アルデヒド生成比
131224-01	0.972	131224-06	1.000
131224-02	1.025	131224-07	0.970
131224-03	1.017	131224-08	0.937
131224-04	0.981	131224-09	0.995
131224-05	0.882		

Table 2a 大腸菌のエレクトロポレーション後のコロニー数

電圧	1.2	2.0	2.5	3.0
コロニー数	-	9	0	0

Table 2b MOE-1のエレクトロポレーション後のコロニー数

電圧	1.2	2.0	2.5	3.0
コロニー数	100〉	0	0	0

Table 1 に、UV 法を用いて変異をかけたものの MOE-1 のアルデヒド生成比を、野生株と比較したものを示す。その結果、アルデヒド生産量が有意に低い菌体を一株取得することができた。同株は SBR を分解する遺伝子に変異がかかっている可能性が高いと考えられる。

Table 2a、b に、プラスミドを用いたエレクトロポレーションによるプラスミドの導入予備試験の結果を示す。これより、電圧を低めに設定したものの方が高いプラスミド導入率を得ていることが確認できる。このことから、プラスミドの導入に関しては 1.2V 程度の弱電圧が適していると考えられる。

３．その他

本実験で MOE-1 の total DNA の抽出、配列解析を行うことができた。エレクトロポレーション法にて、十分量のプラスミドを導入できる条件が決定したことから、今後はトランスポゾンを用いて導入実験を行い、アルデヒド検出法を用いて目的の変異体のスクリーニングの実施を行う。

お問い合わせ先
氏名：笈木宏和
E-mail：oiki@kurume-nct.ac.jp

J-16

ミヤコグサ Al イオン耐性機構に関する研究

（神戸高専専攻科応用化学専攻[1]、神戸高専応用化学科[2]）
○渡邊宏幸[1]・下村憲司朗[2]

キーワード：マメ科植物、ミヤコグサ、Al イオン耐性遺伝子、*STOP1*、*STOP2*

１．緒言

熱帯、亜熱帯、温帯には酸性土壌が多く存在し、農耕地の 30~40%を占めている。酸性土壌では土壌中の Al が Al イオンとして溶出し、植物の根の伸長を阻害するため、有効な作物生産が期待できない。

しかし、シロイヌナズナやコムギなどからは有機酸を分泌することで Al イオンをキレート化し、植物根への吸収を防ぐ有機酸分泌型 Al イオン耐性機構と、細胞内に侵入した Al イオンを排出する Al排出型 Alイオン耐性機構が確認されている。これらの機構に関与する遺伝子について、有機酸分泌型 Al イオン耐性機構には *ALMT1*(*aluminum activated malate transporter*)遺伝子と *MATE*(*multidrug and toxic compound extrusion*)遺伝子が、Al 排出型 Al イオン耐性機構には *ALS3*(*aluminum sensitive*)遺伝子が関与することが確認されている。また、転写因子の *STOP1(Sensitive to proton)*遺伝子と *STOP2* 遺伝子がこれらの Al イオン耐性遺伝子の発現量を調節する研究報告もある。

シロイヌナズナやコムギでは Al イオン耐性機構の研究が進んでいるが、重要な食糧源となるマメ科植物では Al イオン耐性機構の解明がほとんど進んでいない。そこで本研究室では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いてマメ科植物の Al イオン耐性機構の解明を進めてきた。

これまでの研究結果より、マメ科のモデル植物であるミヤコグサからアミノ酸配列が類似した LjALMT1 と LjAACT、LjALS3、LjSTOP1 が確認されている。しかし、これらの類似遺伝子の機能はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、ミヤコグサの Al イオン耐性遺伝子の発現量を調節することが予想される *LjSTOP1* の機能解析を行った。

２．結果

ミヤコグサゲノムデータベースを用いて、シロイヌナズナの *STOP1* 遺伝子の塩基配列をもとに BLAST 解析を行った。その結果、*AtSTOP1* と塩基配列が類似した遺伝子が確認された。確認された遺伝子を *LjSTOP1* とし、ミヤコグサゲノムから予想された LjSTOP1 のアミノ酸配列と既に報告されているシロイヌナズナ及びダイズ、イネ、トウモロコシ、ブドウの STOP1 のアミノ酸配列に対し、系統樹解析を行った。その結果、単子葉類と双子葉類で別々のグループを形成し、さらに双子葉類の中でも同じマメ科植物であるダイズとミヤコグサでクラスターを形成していることが確認された。

続いて、各植物の STOP1 アミノ酸配列の比較を行うために、マルチプルアライメント解析を行った。その結果、LjSTOP1 と AtSTOP1 では 53.2%、LjSTOP1 と GmSTOP1 では 83.9%の相同性を示した。

３．展望

CLUSTALW 解析により、STOP1 は単子葉類と双子葉類でアミノ酸配列が類似していることが確認された。また、双子葉類の中で LjSTOP1 と GmSTOP1 はマメ科独自のグループを形成していたので、両者のアミノ酸配列が非常に類似していることが確認された。

加えて、マルチプルアライメント解析により、LjSTOP1 が既知のシロイヌナズナの STOP1 と高い相同性を示し、さらにダイズでより高い相同性を示した。以上のアミノ酸配列解析から LjSTOP1 が Al イオン耐性機構に関与していることが示唆された。

今後は、強発現法およびアンチセンス法を用いて *LjSTOP1* の機能解析を行う。*LjSTOP1* の機能解析は、ミヤコグサに導入する遺伝子構造体:コンストラクトの作製まで完了している。そこで今後の展望としては、作製したコンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、アグロバクテリウム法を用いてミヤコグサ胚軸に形質転換を行う。形質転換後、ミヤコグサ胚軸の個体再生を経て、*LjSTOP1* 遺伝子の発現量を促進または抑制させたミヤコグサ遺伝子組換個体の作製を行う。その後 Al イオン存在下で生育し、根の伸長を比較することで *LjSTOP1* 遺伝子がミヤコグサの Al イオン耐性機構に関与していることを確認する。また、STOP1 と共に Alイオン耐性機構に関わる STOP2 の塩基配列をミヤコグサゲノムデータベース上で検索し、予想されたアミノ酸配列の比較解析を行う。

お問い合わせ先
氏名：下村憲司朗
E-mail：shimo@kobe-kosen.ac.jp

J-17

ミヤコグサ Al イオン耐性候補遺伝子の解析

（神戸高専専攻科応用化学専攻[1]、神戸高専応用化学科[2]）
○三木貴光[1]・下村憲司朗[2]

キーワード：マメ科植物、ミヤコグサ、Al イオン耐性遺伝子、*ALMT1*、*ALS3*

1. 緒言

作物生産に利用される土壌の約 70%は問題土壌である。その一つに酸性土壌があり、酸性土壌中の植物の生育阻害となる最も大きな因子は酸性化に伴って溶出する Al イオンである。Al イオンにより根の伸長が阻害されるため植物の水分、養分の吸収が抑制され収量の低下につながる。シロイヌナズナからは Al イオン耐性機構に関与する遺伝子として、*ALMT1* (aluminum activated malate transporter) 遺伝子と *ALS3* (aluminum sensitive) 遺伝子が確認されている。また、ミヤコグサゲノムデータベースから既知のシロイヌナズナの *AtALMT1* 遺伝子に類似した塩基配列を持つ *LjALMT1* 遺伝子が確認されている。さらにミヤコグサから既知のシロイヌナズナの AtALS3 とアミノ酸配列が類似した LjALS3-1 および LjALS3-2 が確認されている。

Al イオン耐性機構の研究は多く行われているが、重要な食糧源となるマメ科植物の Al イオン耐性機構の報告は少なく、多くの知見は得られていない。そのため本研究では LjALMT1、LjALS3-1、LjALS3-2 アミノ酸配列の比較解析を行った。また、*LjALMT1* および *LjALS3-1* 遺伝子が Al イオン耐性機構に関与する遺伝子かどうかの確認を行うために *LjALMT1* および *LjALS3-1* 遺伝子の機能解析を行った。

2. 結果

2.1 アミノ酸配列の比較解析

アミノ酸配列の比較解析では CLUSTALW 解析、マルチプルアライメント解析、TMHMM 解析を行った。その結果、CLUSTALW 解析では LjALMT1、LjALS3-1、LjALS3-2 はマメ科で独自のグループを形成することが確認された。また、マルチプルアライメント解析では LjALMT1、LjALS3-2 ではアミノ酸配列の全体、LjALS3-1 ではアミノ酸配列の後半部分で高い相同性が確認された。さらに TMHMM 解析では、LjALMT1 は AtALMT1 と膜貫通ドメイン保有数が異なった。また LjALS3-1 では AtALS3 と膜貫通ドメイン保有数が異なり、LjALS3-2 では一致することが確認された。

2.2 *LjALMT1*、*LjALS3-1* 遺伝子の機能解析

機能解析では、強発現法およびアンチセンス法による解析に用いるセンスおよびアンチセンスコンストラクトの作製、さらに完成したコンストラクトのアグロバクテリウムへの導入を行った。またアグロバクテリウム法を用いてミヤコグサ形質転換個体の作製に着手した。その結果、ミヤコグサ形質転換個体の作製の地上部伸長まで行うことができた。

3. 考察および展望

3.1 アミノ酸配列の比較解析

比較解析の結果から、LjALMT1 は既知のものとアミノ酸配列は類似しているが膜貫通ドメイン保有数が異なるためタンパク質構造が異なるのではないかと考えられた。また LjALS3-1、LjALS3-2 はアミノ酸配列の相同性と膜貫通ドメイン保有数の観点から LjALS3-2 がミヤコグサの ALS3 である可能性が示唆されたが LjALS3-1 も他の ALS3 と共通の高度に保存されたドメインを有していることから今後は *LjALS3-1*、*LjALS3-2* 遺伝子の機能解析を行っていく。

3.2 *LjALMT1*、*LjALS3-1* 遺伝子の機能解析

ミヤコグサ形質転換個体の作製では地上部伸長まで行うことができたため、今後は地下部誘導、地下部伸長を行いミヤコグサ形質転換個体の作製をしていく。これにより得られた個体は *LjALMT1* および *LjALS3-1* 遺伝子の発現量を促進または抑制させているため Al イオン存在下で生育させ、根の伸長に変化が見られれば *LjALMT1*、*LjALS3-1* 遺伝子が Al イオン耐性機構に関与する遺伝子であることが示唆される。

お問い合わせ先
氏名：下村憲司朗
E-mail：shimo@kobe-kosen.ac.jp

J-18

培地中の酸素濃度が与える *Aurantiochytrium* sp. NBRC 102614 株培養への影響

（旭川高専専攻科応用化学専攻[1]. 旭川高専物質化学工学科[2]）
○松下文也[1]・三浦悠葵[2]・松浦裕志[2]

キーワード：*Aurantiochytrium*, 酸素濃度, 濁度, バイオマス量, 脂質量

緒言

我が国はエネルギー資源の 9 割以上を海外からの輸入に頼っているのが現状である.また,CO_2 の排出による地球温暖化などの問題を抱えている.そのため,一時ブームが去ったと思われていた微細藻類のバイオマス利用に関する研究が再び着目されている.

演者らは微細藻類の中でも葉緑体を持たず,光合成を行わない *Aurantiochytrium* という従属栄養性の藻類に着目した.この藻類は DHA,DPA,EPA 等の不飽和脂肪酸を大量に蓄積し,バイオ燃料となる飽和脂肪酸についても同様に蓄積する.また,光合成を必要としない従属栄養性であり,二酸化炭素の削減には至らないが溶存有機物質が豊富な有機廃水などを活用することでバイオ燃料の生産に利用できるなど応用の可能性は高い.

本研究ではこの *Aurantiochytrium* sp. NBRC 102614 株(以後 NBRC 102614 株)の培養時の撹拌速度すなわち培地中の酸素濃度が NBRC 102614 株のバイオマス量や全脂質量に何らかの影響を及ぼしていると仮説を立て,さまざまな撹拌速度条件下において NBRC 102614 株を培養する.さらに,そのバイオマス量と全脂質量を測定し,培地の撹拌速度が及ぼす代謝産物への影響について条件ごとに比較した.

実験操作

・供試藻類株

独立行政法人製品評価技術基盤機構から供与された NBRC 102614 株を使用した.

・前培養

500 ml の三角フラスコに 300 ml の GTY 液体培地を加え,高圧蒸気殺菌後に NBRC 102614 株を接種した.培養は温度 30℃,撹拌速度 120 rpm において 3 日間行った.

・本培養

前培養と同様の容量の三角フラスコに同量の GTY 液体培地を加え,高圧蒸気殺菌後に液体種株を培地の濁度が OD_{660}=0.01 となるように加えた.培養条件は温度 30℃,撹拌速度 60,90,120,150 rpm であり,条件ごとに 1,2,3 日間培養したものをそれぞれ回収した.繰り返し数は 4 回であった.

・濁度測定

本培養中の培地の濁度を吸光光度計により,OD_{660} を測定した.また,測定は各撹拌速度で 1 日ごとに行った.

・乾燥重量測定

培養後のサンプル 5 を 15 分間,3000 rpm において遠心分離し,細胞のみを－30℃で凍結させた.その後,凍結乾燥処理し,細胞の乾燥重量を測定した.

・脂質含有量測定

凍結乾燥処理した細胞から Folch 法により脂質を抽出し,重量を測定した.

実験結果

以下に 90,120 rpm および培養期間ごとの濁度の測定結果を示す.

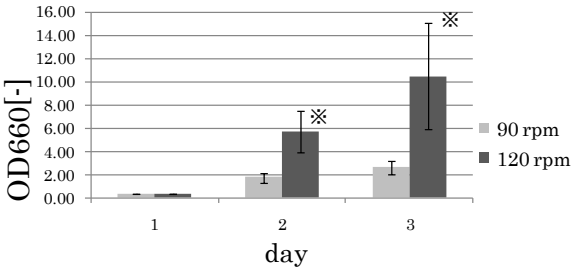


図1. 90 rpmと120 rpmでの培養期間ごとの濁度
※：同時間の90 rpmと比較して有意差が認められた(P<0.05)

撹拌速度が速い条件下においては培養 1 日目を除き,撹拌速度が低い場合と比較すると濁度が高くなる傾向となった.

撹拌速度間で t 検定を行ったところ,培養 1 日目の平均濁度を除くと,90 rpm と 120 rpm での同培養期間の濁度について有意差が示された($P<0.05$).したがって,培地の撹拌速度すなわち培地中の酸素濃度が濁度に何らか影響を及ぼすことが示唆された.また,現在 60,150 rpm における培養期間ごとの濁度を測定し,特定の培養期間における撹拌速度と濁度の回帰分析を行い,撹拌速度と培地濁度にどのような相関があるか検討中であり,各培養条件下における細胞の乾燥重量および脂質含有量の測定についても当日発表する予定である.

問い合わせ先
氏名：松浦裕志
E-mail：matsuura@asahikawa-nct.ac.jp

J-19

卵殻膜の水抽出成分におけるチロシナーゼ活性阻害

（米子高専物質工学科）
○大江ひかる・田中美樹・谷藤尚貴

キーワード：食品廃棄物、チロシナーゼ活性阻害

1. 緒言

現在一般的に利用されている食品添加物の多くは食品保護のために開発されたものであり、人体への毒性・危険性については完全に安全であるとはいい難いものも存在している。しかしながら、加工を施す前の食品はすぐに腐敗や褐色色素の沈着(=褐変)などが起きてしまい、店頭では見栄えの問題などで廃棄せざるを得ずに食品ロスとなってしまうため、可食部分の廃棄量を減少させることは大きな課題となっている。そこで、我々が数年前から継続している卵の内皮部分である卵殻膜の中身の成分を維持するという機能を、食品の褐変現象を抑制する効果へと応用できるのではないかと考えたところ、卵殻膜を浸漬させた溶液で酵素活性阻害を示す成果が得られた。また、卵殻膜の水抽出成分と考えられる最も内側(白身側)に存在する薄膜構造を SEM により観察してみると、文献にはない新しい構造を確認することができた。

2. 実験

卵殻膜の水抽出成分を得るために、卵殻膜 100 mg を純水 10 mL に 1 日間浸漬させた後、卵殻膜を引き上げ、その溶液を卵殻膜の水抽出液とした。酵素活性阻害試験は、0.1 mol/L りん酸緩衝液 5.0 mL、L-DOPA 溶液 2.0 mL、DMSO 0.25 mL、卵殻膜の水抽出液 1.0 mL を加えて振とうし、25 ℃で 15 分間保温後、チロシナーゼ酵素溶液 0.25 mL 加えて 25 ℃で 5 分間反応させた。その後、直ちに分光光度計で吸光度（測定波長 475 nm）を測定し、これをチロシナーゼ阻害活性測定(C)とした。チロシナーゼ活性測定(A)はりん酸緩衝液 6.0 mL、L-DOPA 溶液 2.0 mL、DMSO 0.25 mL、チロシナーゼ酵素溶液 0.25 mL、ブランク測定(B)はりん酸緩衝液 6.25 mL、L-DOPA 溶液 2.0 mL、DMSO 0.25 mL、試料液測定(D)はりん酸緩衝液 5.25 mL、L-DOPA 溶液 2.0 mL、DMSO 0.25 mL、試料液 1.0 mL をそれぞれ入れ、振とうしたものの吸光度を測定して結果を下式に代入することでチロシナーゼ酵素活性阻害率を計算した。

$$\text{阻害率} = 100 - \left\{ \frac{(C-D)}{(A-B)} \times 100 \right\} \%$$

3. 結果と考察

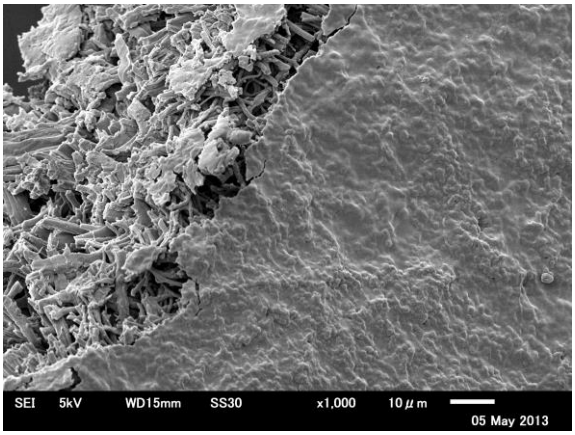


図 1.　卵殻膜表面の SEM 像

卵殻膜の水抽出成分の酵素活性阻害率は 22%となり、一般的なメラニン生成阻害物質として利用されているコウジ酸 [2]と比較すると、約 1/3 程度もの性能となった。この結果から、卵殻膜の水抽出成分は酵素活性阻害を示す機能を持っており、食品の褐変抑制に寄与する成分を持つと考えられるため、今後は食品添加物への応用が期待できる。また、SEM で観測された新しい薄膜構造(図 1)は水に浸漬していると次第に消失していく成分であったため、この薄膜構造が今回酵素活性阻害を示した水抽出成分であると考えられる。そして、今回発見した薄膜構造が食品の褐変抑制に寄与していることはまったく新しい知見であり、今後更なる追及を行っていくとともに、新しい材料としての応用も検討していく。

4. 参考文献

1) 増田勝己, 多田千明, 食用植物及び香辛料の褐変阻害について, 仁愛女子短期大学研究紀要, 42 巻, pp.57-64(2010)
2) 山本真二（三省製薬株式会社）, メラニン生成抑制外用剤, 特開平 5-92916.

お問い合わせ先
氏名：谷藤尚貴
E-mail：tanifuji@yonago-k.ac.jp

J-20

ヒメツリガネゴケにおけるBAP応答遺伝子の発現解析

（群馬高専専攻科環境工学専攻[1]、群馬高専物質工学科[2]）
○佐藤克俊[1]・大岡久子[2]

キーワード：NACファミリー、BAP、ヒメツリガネゴケ、発現解析

1. 緒言

植物ホルモンは、植物の生長を少量で調節する生理活性物質であり、植物の発生や分化、環境応答において重要な役割を果たしている。植物ホルモンの1種であるサイトカイニンは、葉や茎の生長に関与することが知られている。現在、サイトカイニンによって誘導される遺伝子のいくつかは単離・同定されているが、転写因子においてはほとんど報告されていない。

NACファミリーは、様々な生長段階や組織で発現する植物特異的転写因子であり、植物の形態形成やストレス応答に関与することが知られている。高等植物において、いくつかのNACファミリー遺伝子の機能解析は行われているが、コケ植物におけるNACファミリー遺伝子の機能はほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、コケのモデル植物であるヒメツリガネゴケ（蘚類）を用いて、サイトカイニンに応答するNACファミリー遺伝子の機能解明を目的とした。そのため、サイトカイニンの1種であるBAP（6-ベンジルアミノプリン）を用いてNACファミリー遺伝子の発現解析を行った。

2. 系統解析

2.1 方法

種子植物であるシロイヌナズナ（双子葉類）とイネ（単子葉類）、シダ植物であるイヌカタヒバ、コケ植物であるヒメツリガネゴケのアミノ酸配列をPlantGDBから収集した。収集したアミノ酸配列をInterProScan-5-RC-6で解析し、Pfamデータベースで「PF02365」にヒットしたアミノ酸配列をNACファミリーと定義した。解析した4種の植物種のNACファミリーをClustalX (ver. 2.1)を用いてアライメントし、NJPlot (ver. 2.3)を用いて無根系統樹を作図した。

2.2 結果及び考察

ヒメツリガネゴケのNACファミリーを33個推定し、PpNAC001からPpNAC033と名付けた。系統解析の結果、8個のNACファミリーがヒメツリガネゴケの形態形成に関与していると考えられた。これらの配列からプライマーを設計し、以下の発現解析に用いた。

3. 発現解析

3.1 方法

BCDATG培地で培養したヒメツリガネゴケの原糸体をKnop液体培地に継代し、1週間振とう培養した。これをKnop固体培地に継代して1週間前培養した後に、BAPを1 ppm含むKnop固体培地に移した。継代直後から3日目まで1日ごとにtotalRNAを抽出した。抽出は4回行い、それぞれサンプル1からサンプル4とした。設計したNACファミリー遺伝子のプライマーを用いてRT-PCRを行い、2%アガロースゲルを用いて電気泳動した。画像解析ソフトであるImageJ（ver. 1.48）を用いて発現強度を定量化した。常発現遺伝子であるアクチン遺伝子を用いて発現強度を補正した。

3.2 結果及び考察

発現解析の結果、PpNAC025は、全てのサンプルにおいて、BAP添加培地に継代してから発現強度が経時的に増加した（図1）。顕微鏡観察の結果、BAP処理後、2日目以降から芽分化が確認できた。よって、PpNAC025はBAP応答遺伝子であり、芽分化に関与することが示唆された。

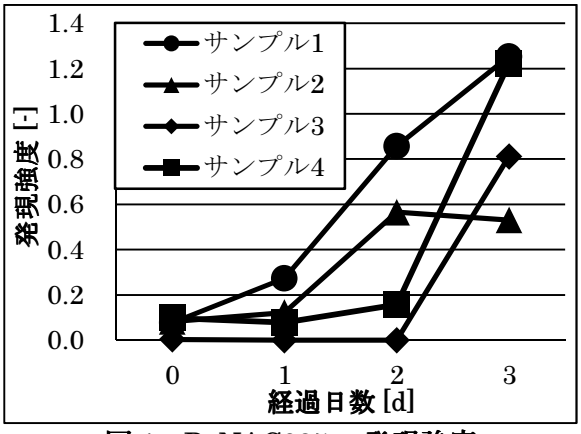


図1　PpNAC025の発現強度

お問い合わせ先
氏名：大岡久子
E-mail：ooka@chem.gunma-ac.jp

J-21

葉緑体 DNA の定量を目的とした植物体からの DNA 抽出方法の検討

（群馬高専物質工学科）
桑原俊・大岡久子

キーワード：葉緑体 DNA、DNA 抽出法

1. 緒言

葉緑体は、植物細胞内に存在する直径 3~10μm の細胞小器官であり、光合成を行う色素体である。独自の DNA を持ち分裂によって増殖する。植物種によって 1 細胞あたりの葉緑体数は異なり、1 個のものから数万個含むものまで存在するといわれている[1]。現段階では植物細胞内の葉緑体数を正確に定量する方法は確立されていない。現在、葉緑素の定量には吸光度が用いられているが、色素の分解を考慮すると安定した定量法であるとはいえない。そこで、本研究では、葉緑体が独自の環状 DNA を持つことに注目した新規葉緑体定量法の確立を目的とし、totalDNA 抽出方法の検討と、核 DNA 及び葉緑体 DNA の検出を行った。

2. DNA 抽出方法の検討

2.1 実験材料

実験材料として、群馬高専構内のシロツメクサ、イチョウ、ハナミズキ 2 種(ここでは、苞が赤い個体の葉をハナミズキ R、苞が白い個体の葉をハナミズキ W とする)を用いた。

2.2 実験方法

植物体からの DNA 抽出に用いられる簡便な迅速単離法[2]を用いて抽出を行った。また、多糖類やポリフェノール類は、PCR を阻害することが知られている。そこで、それらを多く含む植物体からの DNA 抽出に用いられる CTAB 法[3]を用いて抽出を行った。

2.3 結果と考察

一般に、A_{260}/A_{280} 値が 1.8~2.0 を示すと高純度であるとされている。迅速単離法では A_{260}/A_{280} が著しく低く測定された。CTAB 法では、全てのサンプルについて 1.8~2.0 の範囲に収まっており、今回用いた植物においては CTAB 法で高純度の DNA を抽出することができた。

3. 核 DNA をターゲットとする PCR

3.1 実験方法

CTAB 法によって抽出したサンプル(シロツメクサ、イチョウ、ハナミズキ 2 種)について RNase 処理を行い、PCR を行った。また、RNase 処理の必要性を確かめるために、RNase 処理を行っていないサンプルについても同様に PCR を行った。プライマーには、シロツメクサアクチンプライマーとランダムプライマーを用いた。

3.2 結果と考察

RNase 処理を行ったサンプルについては、すべてバンドを確認することができた。RNase 処理を行わなかったサンプルについては、シロツメクサ以外バンドを得ることができなかった。以上のことから、PCR を行うためには、CTAB 法で抽出したサンプルに RNase 処理を行う必要があることが証明された。

4. 葉緑体 DNA をターゲットとする PCR

4.1 葉緑体特異的プライマーの設計

葉緑体に特異的な領域として、rbcL 領域に注目した。5 つの植物の rbcL 領域の配列を ClustalX (ver. 2.1)でアライメントにかけ、プライマーを設計した。

4.2 実験方法

設計したプライマーを用いて、CTAB 法によって抽出したサンプル(シロツメクサ、イチョウ、ハナミズキ 2 種)について、PCR を行った。

4.3 結果と考察

すべてのサンプルにおいて、約 500bp のバンドを確認することができた。このプライマーによる PCR 産物は 512bp になるため、目的領域を増幅できていると考えられる。葉緑体特異的なバンドが得られたことから、CTAB 法抽出サンプルにおいて、葉緑体 DNA を検出できた。

5. まとめと今後の方針

PCR で葉緑体 DNA を検出するために、CTAB 法で抽出したサンプルに RNase 処理を行ったものが適していることが確認された。また、設計したプライマーを用いて rbcL 領域を増幅し、葉緑体 DNA の検出を行うことができた。

今後は、葉緑体数の定量化を目的としてリアルタイム PCR に用いるプライマーの設計を行う。さらに、葉緑体数と色素量の関係性の確認を行う。

6. 参考文献

[1] 宮城島進也、『葉緑体分裂増殖の制御機構とその進化』、*Plant Morphology*、23、pp.61-70、2011.
[2] 島本功 他、『新版植物の PCR 実験プロトコール』、秀潤社、pp.41-43、2000.
[3] 島本功 他、『新版植物の PCR 実験プロトコール』、秀潤社、pp.49-50、2000.

お問い合わせ先
氏名：大岡久子
E-mail：ooka@chem.gunma-ct.ac.jp

J-22

ハナミズキの葉からのカルス誘導

（群馬高専物質工学科[1]、長岡技術科学大学生物系[2]）
○エリーン シン ツーシェン[1]・高原美規[2]・大岡久子[1]

キーワード：ハナミズキ、カルス

１．緒言

ハナミズキは街路樹として植えられていたり、公園や庭先などに植えられていたりと、非常に人気の高い花木である。さらに、贈り物や記念樹として利用されることも多く、園芸品種としての価値が高い。しかし、大木化しやすく手入れが困難になるなどの問題もある。また、苞(通常花弁と思われている部分)の色は白色または淡赤色しかなく、さらなる品種改良が期待されている。遺伝子組換えなどの様々な品種改良においては、カルスが用いられる。さらにハナミズキの病原性試験においてもカルスが用いられた例がある。

現在、ハナミズキに関するカルス化培養は種子を用いて行われている。しかし、ハナミズキの種子を採取できる時期は限られている。そこで、ハナミズキの葉に注目した。そして、ハナミズキの葉から簡便なカルスの培養系を確立することを目的とし、植物ホルモンを用いて葉からのカルス誘導の条件を検討した。

２．実験材料と方法

群馬高専内の 2 種類のハナミズキの葉を用いた。赤い苞を咲かせる木を R とし、白い苞を咲かせる木を W とした。

Murashige & Skoog (MS) 培地を用いて、ハナミズキの葉を培養した。加えた植物ホルモン(2,4-D:2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、カイネチン:6-フルフリルアミノプリン、NAA:1-ナフチル酢酸)の違いによって、5 種類の培地(A、B、C、D、O)とした。A は 2ppm 2,4-D、0.4ppm カイネチン、B は 6ppm 2,4-D、0.4ppm カイネチン、C は 2ppm NAA、0.4ppm カイネチン、D は 6ppm NAA、0.4ppm カイネチンをそれぞれ加えた。O はホルモンフリーである。

R と W の葉を 1%の弱アルカリ性洗剤で洗浄した後、70%エタノールに 1 分間浸漬して、次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度 1%)に 10 分浸漬した。殺菌した後、葉を滅菌水で 4 回洗浄し、切り分けて培養した。R と W の葉をそれぞれ培地 A、B、C、D、O に置床した。シャーレ 1 枚に 5 個の約 0.5cm の大きさに切った葉(外植片)を置床した。1 種類の培地に対して 3 シャーレ(15 個の外植片)を培養した。葉の培養実験は 3 反復行い(葉の採取日は、2014 年 4 月 15 日、4 月 30 日、5 月 16 日)、LH-220N 型人工気象器内で培養した(25°C、12 時間日長)。

1 ヶ月ごとに継代を行った。大きく生長した外植片やカルスは半分に切り分けて、新たな培地に移動した。コンタミがあった場合、コンタミしていない外植片を新たな培地に移動した。

３．結果と考察

3 回の培養を行った結果、培地 O 以外に、培地 A、B、C、D にある外植片からカルスの誘導ができた。添加した植物ホルモンの違いにより、生じたカルスが異なってくることが観察できた。2,4-D を添加した培地 A、B に生じたカルスの特徴が似ていて、柔らかくて、白色や褐色のカルスであった。NAA を添加した培地 C、D でのカルスは硬くて、白色のもあるが、黄色、緑色、赤色のカルスも生じた。

また、培養経過時間に対するカルス化率をグラフにした(Fig. 1)。3 回の培養とも同様の傾向を示したため、ここでは第 1 回目培養の結果のみを示した。Fig. 1 により、培地 A で培養した外植片のカルス化が一番早かったことが分かった。

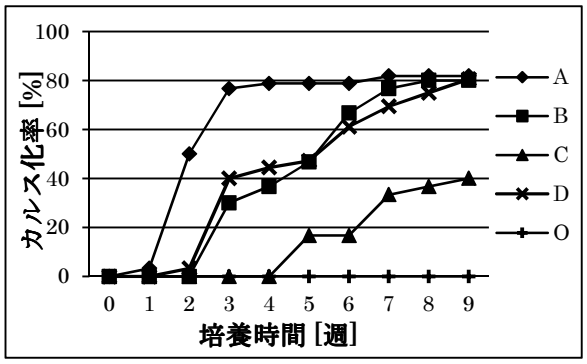


Fig. 1　第 1 回目培養の外植片に対するカルス化率

４．今後の課題

葉から誘導したカルスを用いて、再分化条件を検討する。

お問い合わせ先
氏名：大岡久子
E-mail：ooka@chem.gunma-ct.ac.jp

J-23

卵殻膜を用いた食品劣化防止剤の開発

（米子高専物質工学科）
○田中美樹・谷藤尚貴

キーワード：卵殻膜、酵素的褐変、アボカド、リサイクル、メラニン

１．緒言

卵は割らなければ常温で数日間腐ることは無い。この事実から、我々はこれまでに「卵殻が卵の中身を腐敗から守る機能を持つならば、他の食品を守る事にも応用ができる」と仮定して、卵殻の中でも内側にある皮の部分である卵殻膜を有効利用する様々な応用法を考案してきた。本発表では、食品の劣化防止剤へ応用できる新しいリサイクル手法を開発した成果について報告する。

私たちが生命を維持するためには「食」は必要不可欠であり、一般生活において高品質で安全な食品供給は常に求められる。しかしながら、食品流通・消費段階で特に生鮮食品の品質低下による可食部の廃棄がされており、大きな課題となっている。そのなかで、食品添加物は食品の劣化を防ぐためには欠かせない存在となっている。我々は、劣化の著しい青果の中でも加工した果肉において変色による劣化の速く、加工品を市場に出しにくいアボカドを実験試料として注目し、これを抑える試みに取り組んだ。

２．実験

2-1. 卵殻膜及び添加剤によるアボカドの褐変抑制機能の検証

①水道水及び色素水溶液（青色 1 号、青色 2 号、緑色 3 号、黄色 4 号、黄色 5 号、赤色 3 号、赤色 106 号、クルクミン、ケルセチン）に浸漬した卵殻膜にセラミック包丁でカットしたアボカド片をのせて、アボカドで最も色素の沈着する維管束付近を完全に覆ってシャーレ内へ入れた。

②これを、蛍光灯照明下の室内で果肉部に生じた色彩変化を目視で観察した。

2-2. 卵殻膜の酵素活性試験による評価

①2.5 mmol/L L-DOPA 溶液とチロシナーゼ酵素溶液（酵素 15.65 unit/0.25 ml）を調製した。また、青色 1 号、緑色 3 号、クルクミン、ケルセチンをそれぞれ 1×10^{-6}、1×10^{-5}、1×10^{-4} mol/L 水溶液を調製して試料液とした。セルに 0.1 mol/L りん酸緩衝液 1.0 mL、L-DOPA 溶液 0.4 mL、試料溶液 0.2 mL を加えて振とうし、25 °C で 15 分間保温後、チロシナーゼ酵素溶液 0.05 mL 加えて 5 分間反応させた。

② ①の操作後、直ちに分光光度計で吸光度（測定波長 475 nm）を測定し、これをチロシナーゼ活性阻害活性測定とした。その他にもブランク、試料溶液、チロシナーゼ活性を測定してチロシナーゼ活性阻害率を算出した。

３．結果および考察

図-1. アボカド果肉切片の 1 h 後の変化

卵殻膜をアボカド果肉に被覆することで褐変の抑制に成功し、その機能は卵殻膜へ導入する添加物によってさらに強化させることにも成功した。これは、無処理の果肉上に生成したメラニン等の有色成分が卵殻膜に移動して吸着されていることが主な理由であることと、色素のもつフェノール基が主要な基質であるチロシンの類縁体としてチロシナーゼに認識されてチロシン→DOPA→ドーパキノンへの化学変換を阻害したためだと考えられる。

添加物として用いた食品色素が示す作用をチロシナーゼ阻害活性評価試験によって検証したところ、酵素阻害活性が見出された。特に化学構造においてほぼ同一構造である青色 1 号と緑色 3 号の比較では、濃度の薄い順に緑色 3 号が 3.6%→5.0%→12%、青色 1 号が 0%→0%→0.5%であり、唯一の構造の違う箇所であるフェノール系水酸基が有する緑色 3 号のみが強い阻害を示すことから、今回添加剤として用いた食品色素は分子中のフェノール基が褐変に関わる酵素群を阻害していることが分かった。

これらの卵殻膜の機能がアボカド以外の酵素的褐変が起こりやすい他食品に劣化防止剤として利用できたことから、食品添加物としての多様性を見出せた。チロシナーゼ活性阻害は食品以外のメラニン生成を抑制して着色を防ぐ作用があることから、今後は食品保存だけではなく美白の肌を目指した化粧品開発への応用も考えられ、卵殻膜の高付加価値な実現的リサイクルが期待できると考えている。

お問い合わせ先
氏名： 谷藤尚貴
E-mail：tanifuji@yonago-k.ac.jp