

WAKO

Infomatic

World

実験化学者のための
IT活用誌

2008

January No.8

目 次

計算化学のすすめ

第6回 反応機構の探索 2

京都府立大学 人間環境学部 講師 リントウルオト正美

分子モデリングソフトウェア “Spartan” (スパルタン) のご紹介

(6) 分子構造データベース: SMD、SRD など 4

米国法人 Wavefunction, Inc. 日本支店長 内田 典孝

β -(1 \rightarrow 3)-グルカンと核酸とが形づくる3重螺旋構造 6

北九州市立大学 国際環境工学部 教授 上江洲 一也

“eMD²” (エムディースクエア) で始める分子動力学シミュレーション

(6) 分子操作及び MDGRAPE-3 との連携 8

株式会社インフォグラム システム開発部 田上 享

計算化学のすすめ

第6回 反応機構の探索

京都府立大学 人間環境学部 講師 リントウルオト正美

計算化学による化学反応機構の解明において複雑な機構と複数の生成物が予想される場合、あらかじめ数種類の生成物を仮定し、それぞれの生成熱を比較することによって熱力学的な選択性を知ることができる。また、複雑な多段階反応においては寿命の短く実験では捕らえにくい中間体についても数種仮定し、その安定性の比較が可能である。実験では直接的な情報を得ることの難しい遷移状態についても計算を行うことによってその構造や物性を知ることができ、かつ活性化エネルギーを見積もることにより反応機構を速度論的に取り扱うことが可能となる。

1. Diels-Alder 反応 -endo 則-

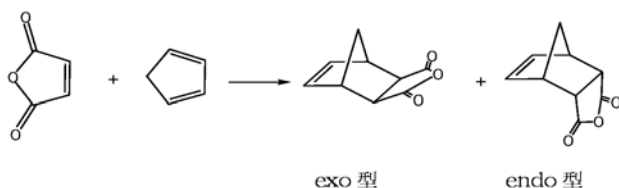


図1. シクロペンタジエンと無水マレイン酸のDiels-Alder反応

無水マレイン酸とシクロペンタジエンのDiels-Alder反応では2つの生成物 exo 型と endo 型が予想される。実験では endo 型が約90%生成し、また、反応は熱力学支配ではなく速度論支配であることがわかっている。

計算手順としては無水マレイン酸とシクロペンタジエンそれぞれの全エネルギー E (反応物)を求め(E (反応物) $=E$ (無水マレイン酸) $+E$ (シクロペンタジエン))、2つの生成物の全エネルギー E (exo 型)、 E (endo 型)を求める。これらのエネルギーの差から生成熱を得ることができる。

$$\Delta E(\text{exo 型}) = E(\text{exo 型}) - E(\text{反応物})$$

$$\Delta E(\text{endo 型}) = E(\text{endo 型}) - E(\text{反応物})$$

6-31G/HFの結果によれば、 $\Delta E(\text{exo 型}) = -21.76 \text{ kcal/mol}$ 、 $\Delta E(\text{endo 型}) = -21.09 \text{ kcal/mol}$ で生成熱にほとんど差は見られない。これは反応が熱力学支配ではなく、速度論支配であることを示している。

2. フロントティア軌道理論

フロントティア軌道理論より遷移状態ではシクロペンタジエンのHOMOと無水マレイン酸のLUMOは図2のような相互作用をしていると考えられる。赤い線で示される相互作用によ

って新たな結合が形成される。この赤い線は exo 型、endo 型両方で見られる。endo 型には新たな結合生成はないが遷移状態の安定化には役立っている青い線で表される相互作用が存在している。この相互作用は diene の新たに2重結合が形成される部分とカルボニル炭素との間の相互作用である。2重結合が新たに形成される部分は電子リッチな部分でカルボニル炭素は電子不足な部分であり、この相互作用は系を安定化する。endo 型ではこの相互作用による安定化がみられるが、exo 型ではこの相互作用は見られない。これによ

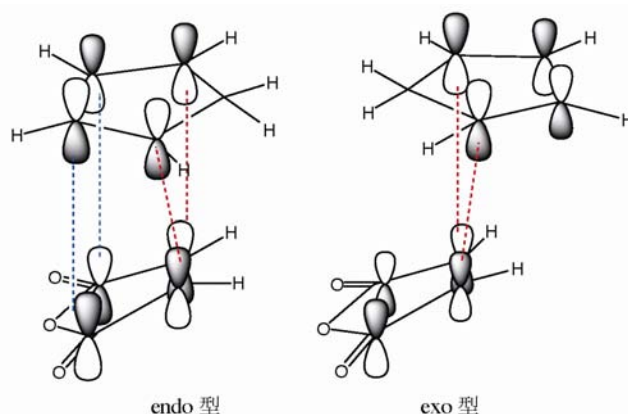


図2. 遷移状態におけるHOMO-LUMO相互作用

り生成物の選択性が決まっているものと考えられる。

3. 基底関数や電子相関の影響

種々の基底関数や計算方法を用いて、生成熱や endo 型を生成するのに必要な活性化エネルギーの計算を行った。その結果を表1に示す。HFレベルの計算を改善するには電子相関を考慮に入れた計算が必要となる。電子相関を考慮した計算方法の一つで有機反応や触媒反応などを対象とする研究でよく使われる方法として、MP2法がある。MP2法とは電子相関を摂動法によって考慮する方法で2次の摂動までを考慮している。MP2法は比較的弱い分子間相互作用や水素結合などで重要な電子相関を比較的低いコストで考慮できる計算方法である。対象としている系が小さい場合にはMP2法を用いた構造最適化が可能であるが、大きい系の場合にはHFなどで構造最適化を行い、その構造を用いてMP2計算するなどの工夫が必要である。

一方、DFT計算では電子相関の一部取り込んだ形となっており、対象とする系によってはMP2とほぼ同等の結果を得ることができ、なおかつMP2よりも低いコストで計算すること

ができる。しかし、弱い相互作用が重要な系では DFT 計算では記述できない場合もある。しかし、MP2 法よりも計算コストはかなり小さくて済むため、今回は DFT 計算を用いた。今回用いた B3LYP とは DFT 計算で用いられる交換-相関汎関数を示す。

表 1. 2 つの生成物 exo 型、endo 型の生成熱 (kcal/mol) と endo 型を生成するために必要な活性化エネルギー (kcal/mol) の比較

生成熱	生成熱		活性化
	exo 型	endo 型	エネルギー
6-31G/HF	-21.76	-21.09	27.79
6-31G(d,p)/HF	-23.06	-22.47	30.69
6-31G(d,p)/B3LYP	-21.75	-20.87	12.40

exo 型と endo 型の生成熱の差はどの方法を用いても約 1kcal/mol 内であることがわかる。また、活性化エネルギーは電子相関を考慮に入れることによって大幅に低下していることがわかる。

4. 反応機構の探索

反応機構、経路を計算によって解明したい場合、反応物や生成物の計算結果とフロンティア理論を用い、その反応性や選択性について知ることができる。もう一つの方法としては実際に遷移状態の計算を行い、反応機構について速度論的に扱うこともできる。

ギ酸は金属や金属酸化物上に吸着してギ酸アニオンを生成する。表面上のギ酸アニオンとしては図 3 に示すようにユニデンテイト型、バイデンテイト型、ブリッジング型の 3 種があり、金属や金属酸化物によってそれぞれの安定性が異なることがわかっている。ZnO(10 $\bar{1}$ 0) 表面上におけるギ酸アニオンの生成過程について HF 法と MP2 法で計算を行った⁴⁾。種々の反応経路を仮定し、計算を行った結果、図 4 に示すような 2 つの経路の活性化エネルギーが MP2 法でパス a では 7.5kcal/mol、path b では 18.4kcal/mol となった。両方のパスでギ酸は分子状吸着して安定化し、パス a ではさらにバ

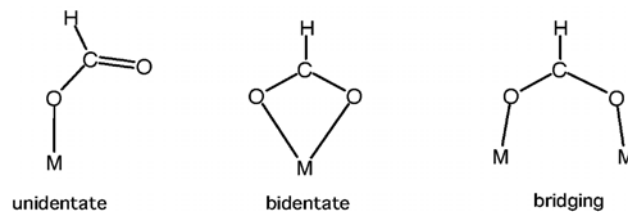


図 3. 金属表面上におけるギ酸アニオン。M は金属を示す。

イデンテイト型の間体を経由し、パス b ではユニデンテイト型の遷移状態を経て、ブリッジング型のギ酸アニオンとして安定化することがわかった。以上の結果から、ZnO(10 $\bar{1}$ 0) 表面ではギ酸は一旦、分子状吸着、バイデンテイト型を経由し、ブリッジング型のギ酸アニオンとプロトンを生成することがわかった。

このような複雑な反応経路を探索する手順としてはまず予想される生成物の探索を行い、反応物と生成物を結ぶ経路に存在するであろう、中間体や遷移状態の仮定を行う必要がある。

遷移状態の探索は反応物や生成物、中間体とは異なり、構造最適化に時間がかかる。また、遷移状態では虚数の振動数を示す自由度が一つだけある、ということに注意をしなければならない。

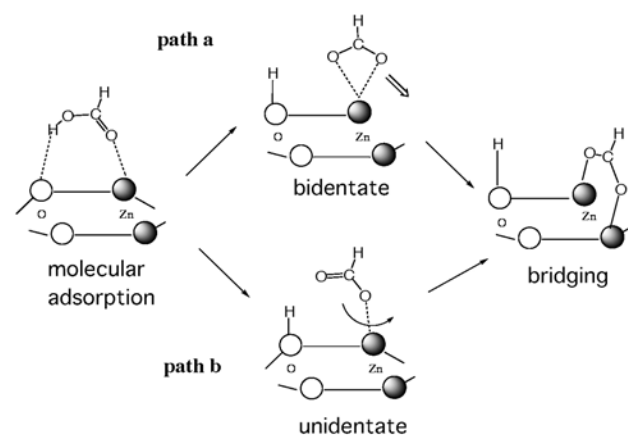


図 4. ZnO(10 $\bar{1}$ 0) 表面上におけるギ酸アニオンの生成過程。

参考文献

1. ザボ、N. S. オストランド「新しい量子化学(上)」、東京化学出版、1990 年
2. 加納航治「有機反応論」三共出版、2006 年
3. W. J. Hehre, A. J. Ahlstrom, J. E. Nelson「The Molecular

Modeling Workbook for Organic Chemistry」WaveFunction, Inc., 1998 年

4. H. Nakatsuji, M. Yoshimoto, Y. Umemura, S. Takagi, M. Hada, J. Phys. Chem. 1996, 100, 694.

分子モデリングソフトウェア“Spartan”（スパルタン）のご紹介

(6) 分子構造データベース：SMD、SRD など

米国法人 Wavefunction, Inc. 日本支店長 内田 典孝

今回は Spartan に関連するデータベースについて紹介します。

Spartan には、Spartan Molecular Database (以下 SMD)、および、Spartan Reaction Database (以下 SRD) の 2 つの分子構造データベースが標準装備されています。

(1) SMD

Spartan で分子を構築する際、画面下の中央部に文字列が表示されることがあります。

たとえば、 sp^3 炭素を入力すると、“methane”と表示されます。この表示は、メタン分子にさらに sp^3 炭素を接続していくとともに、“ethane”、“propane”、“n-butane”... というように、構造に応じた名称に変化していきます。これは表示された、構築途中の分子構造が SMD に存在することを意味しており、名称の左側にある▲ボタンをクリックすると SMD にどのような該当エントリーがあるかのリストが表示されます。

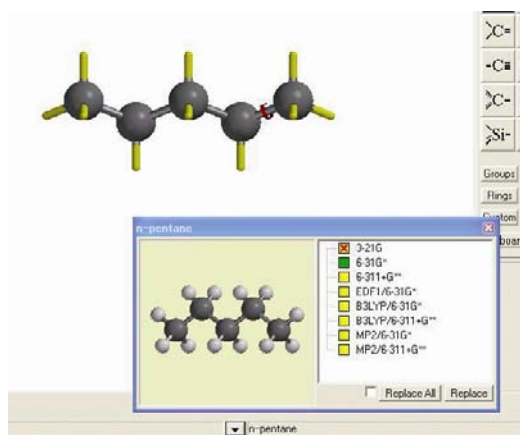


図 1：SMD のポップアップ画面

上図は、n-ペンタン作成中に SMD のポップアップ画面を開けたところで、HF/3-21G から MP2/6-311+G*までの 8 通りの計算結果にアクセスできることを示しています。

このダイアログの中の Replace ボタンを押すことで、SMD の情報を作成中のファイルに呼び出すことができ、Properties 画面 (図 2 参照) を開くと、その計算レベルでの全エネルギーなどの情報が確認できます。



図 2：Molecule Properties 画面 (“イ”はÅ²、“ナ”はÅ³の文字化け)

また、Display/Spectra 画面を開くと、下図のようになっています。

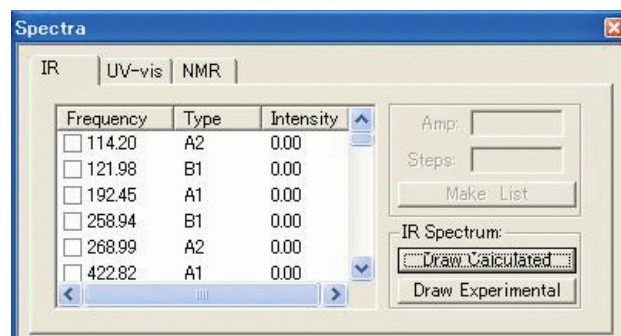


図 3：Spectra ダイアログ

ここでは、IR の計算結果が SMD に存在していたことを示し、画面内の“Draw Calculated”ボタンを押すと分子表示画面内に IR チャートを表示することができます。

“Draw Experimental”ボタンについては、ネットワークを介して NIST の公開データベースを参照し計算結果のチャートに重ねて表示できます。

SMD はこのように、低分子約 15 万分子種の最安定構造を、さまざまな手法で計算した結果を内包しており、エネルギーや、電荷分布、双極子モーメントなどの数値データのほか、4 万件の IR スペクトル、15,000 件の NMR スペクトル、1,500 件の UV/Vis スペクトルの計算情報を内蔵しています。また、ネットワークを介することで NIST における、1.2 万件の IR スペクトルや 1500 件ほどの UV/Vis スペクトル、およびケルン大学における 15,000 件の NMR スペクトルにアクセスすることができます。

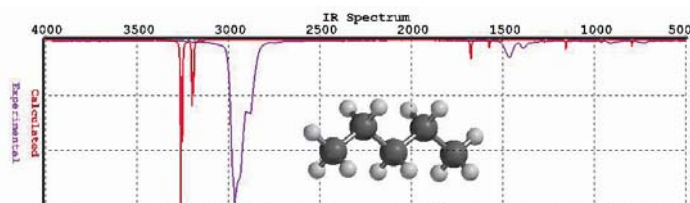


図 4：n-ペンタンの HF/3-21G と NIST による IR スペクトルチャートの比較

(2) SRD

遷移構造を探索する場合に、より近い初期配座を作ることには、非常に重要です。平衡構造と違って遷移構造の最適化は、その構造の近傍でないと、計算が収束しにくく、結果が求められないことがあるからです。

Spartan では、既知の遷移構造を類似した反応の初期構造として提供する機能がありそのために装備しているのがSRDです。

たとえば、1-ペンテンのエン反応の場合は反応は図5左のように描画できますが、SRDには、右のような遷移構造があることが、ボタンをクリックすることでわかります。この構造を計算の初期構造として与えることで、効率的に遷移構造の最適化が可能になります。

SRDには、有機反応を中心に約1500件の反応の遷移構造とそのIR情報を内包しています。

完全一致する内容でない場合には、類似構造を当てはめて、また、類似構造もヒットしなかった場合には、矢印で与えた反応の前後の構造の幾何平均を提示しますので、なにかしらの初期構造に関する示唆を与えることができます。

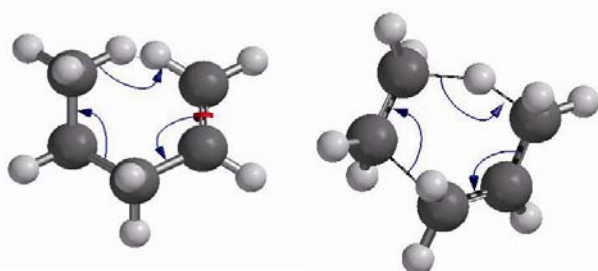


図5：1-ペンテンのエン反応

(3) その他のデータベース

SMDの説明で触れましたが、Spartanではネットワークを介していくつかの有用なデータベースにアクセスが可能です。

NIST、ケルン大学のスペクトル情報以外には、Protein DatabankにIDを打ち込んで、タンパク質や一緒にバンドルされているリガンド分子の構造を閲覧可能です。これは、特にリガンドとの相互作用を検証する際に有用です。

またCCDCの提供するX線解析による構造データベースCSDにもインターフェイスが取れており、SpartanではCSDのシステムソフトウェア、データベースのパスを設定するだけでSMDと同様の検索が可能です。

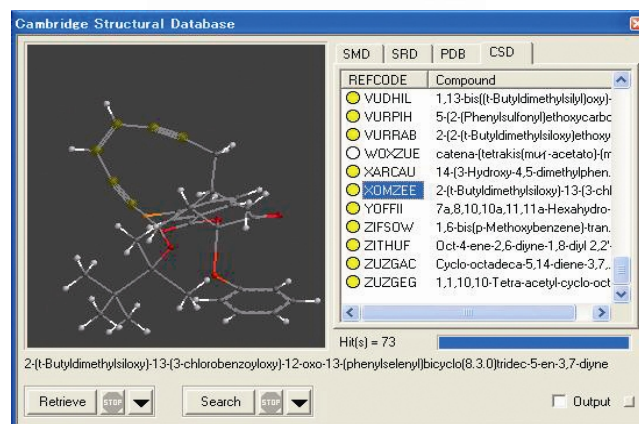
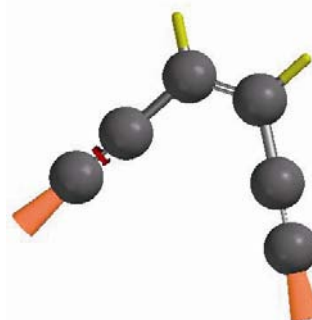


図6：トポロジー検索画面

Spartanにはデータベースのボタンにより分子構造のトポロジーで検索する機能もあります。

たとえば、図6上図のようにオレンジ色でマーキングがされた場所は、以降どのような構造でもヒットすることになります。

右がヒットリストです、リファレンスコードをクリックすると、分子全体の構造がレビューされ、その分子を選択して取り出せ (Retrieve)、文献情報にもアクセスできます。次回は、No. 6にてご紹介したグラフィックス(1)の続きと、スペクトルチャートについてご紹介いたします。



β -(1 \rightarrow 3)-グルカンと核酸とが形づくる3重螺旋構造

北九州市立大学 国際環境工学部 教授 上江洲 一也

β -(1 \rightarrow 3)-グルカン類に属するシゾフィランは右巻きの3重螺旋として菌より産出される。これをジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) などの極性有機溶媒に溶解すると3重螺旋構造が崩壊してランダムコイル状の単鎖となる。この状態から水に戻すと、完全に元に戻るわけではないが3重螺旋構造が再生される。この現象を“Renature”と呼んでいるが、この過程で、ある種ホモ核酸 (Poly(A), Poly(dA), Poly(C), Poly(dT) など) が存在すると、3重螺旋の一本鎖が核酸に置き換わった、多糖2本と核酸1本で構成される高分子複合体ができる¹⁾⁻³⁾。この複合体形成現象はシゾフィラン特有のものではなく、他の β -(1 \rightarrow 3)-グルカンであるカードランやレンチナンでも観測されている⁴⁾。この複合体構造に関して、実験的には多糖と核酸との量論比や核酸螺旋構造の対称性が確保されていることなどが確認されているものの、その詳細な構造を実験的に明らかにすることは困難であった。そこで、計算化学的手法により、その複合体構造について本質的な理解を目指した。

まず初めに β -(1 \rightarrow 3)-グルカンの中で最もシンプルな構造を持つカードラン (CUR) と、複合体形成が確認されている Poly(C) を用いて多糖/核酸複合体の分子モデルをコンピュータ上で作成することにした。作業の流れとして、カードラン3重螺旋の結晶構造モデル⁵⁾から1本の多糖鎖を抜き取り、それによって形成される溝に Poly(C) 鎖をはめ込むというものであるが、互いの結晶構造をただ単純に当てはめるだけでは、螺旋1巻きの長さ (ピッチ) や螺旋幅のズレなどの理由から、CUR/Poly(C) 複合体モデルを作成することはできない。そこで、1本の多糖鎖を抜き取ってできた溝に沿って、シトシン残基 (Poly(C) 塩基) をグルコース2分子に対して

1分子の割合で配置した。その後、配置したシトシン残基間をリン酸バックボーンで連結し、分子力学法 (MM 法) によってリン酸部分だけを構造最適化して初期構造を作成した。CUR/Poly(C) 複合体モデルのサイズは、当研究室のマシ性能を考慮して、19 unit (グルコース2分子と核酸1分子を1 unit とし、総原子数は約1600) とした。続いて、その CUR/Poly(C) 複合体モデル全体を半経験的分子軌道法 (MOPAC AM1 COSMO 法) によって構造最適化した。本誌2007年8月号で β -(1 \rightarrow 3)-グルカンの新たな水素結合様式を発見したことを示したが、この際にも AM1 法を用いている。これは、PM3 や PM5 法に比べ、生体分子においては AM1 法の方が水素結合を適切に再現できるということが過去の計算結果より分かっており、 β -(1 \rightarrow 3)-グルカンや核酸の高次構造においては水素結合が極めて重要な因子であることから、今回の計算には AM1 法を採用することにした。一般的に PM3 や PM5 法は、生体分子における水素結合の評価に関して AM1 法に劣るものの、生成熱計算の精度が高いことや、多価分子にも適用可能であるなどの長所があり、AM1 法はアルキル基やニトロ基を含む分子の計算に誤差が生じることが多いなどの欠点がある。以上の理由から今回は AM1 法を採用したが、分子を構成する原子の種類によって計算方法を変えることが、より精度の高い計算結果を得るために重要である。COSMO (COnductor-like Screening MOdel) というのは、溶媒効果を考慮する方法の一つであり、溶媒を一定の誘電率 ϵ (水の場合 $\epsilon=78.5$) をもつ均一な導体と見なす連続体モデルを用いている。

また、核酸分子中のリン酸部位には負電荷が存在するため、電荷を中和する目的から対カチオンを配置しなければなら

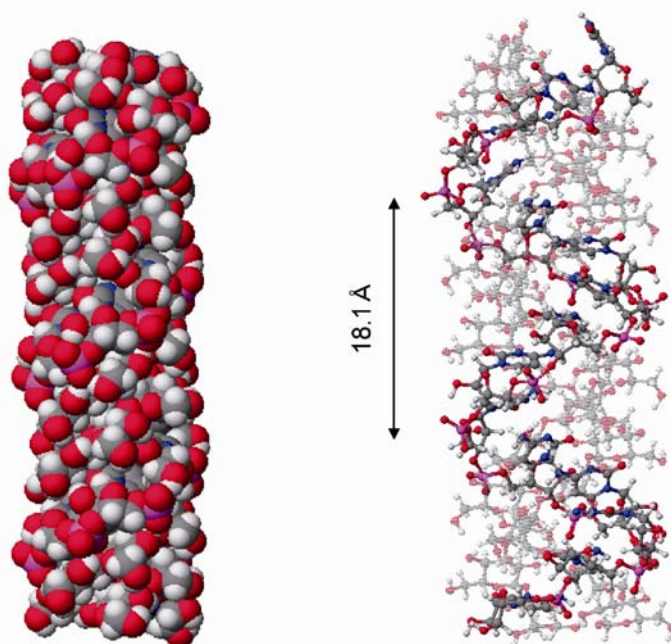


Fig.1 Calculated molecular model for the CUR/Poly(C) complex.

ない。したがって、リン酸部位の近傍に H_3O^+ を配置した。多糖/核酸複合体を生成する場合、実験的には Na 塩を使用することから、対カチオンとしては Na^+ を用いることが理想的であったが、今回計算に使用した AM1 法には Na^+ のパラメータが無かったため、代用として H_3O^+ を用いることとした。

以上のような手順で、CUR/Poly(C) 複合体モデルを作成し、MOPAC AM1 法を用いて約半年の歳月をかけて CUR/Poly(C) 複合体の静的安定構造を計算した結果、Fig. 1 に示す分子モデルが得られた^{6), 7)}。複合体モデルの螺旋ピッチは約 18 Å であり、実験的に求めたピッチと非常に近い値であった (Fig. 1)。また興味深いことに、Poly(C) のシトシン残基の 2 位のアミノプロトンと 3 位の窒素原子がカードランの 2 位の OH 基と分子間水素結合を介して連結していることが示された (Fig. 2)。本誌 2007 年 8 月号では、多糖の分子が、連結した

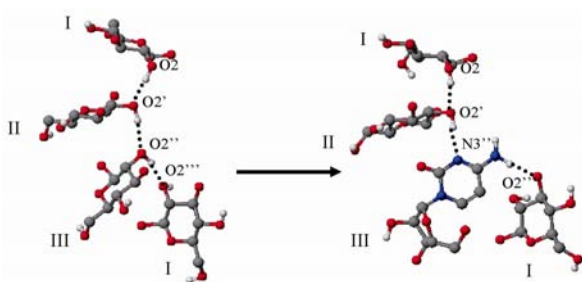


Fig. 2 Hydrogen bonds between CUR and Poly(C) in the complex.

長い水素結合の中で電子が非局在化して水素結合全体が安定化することを示した。複合体の静的構造では、その連結した水素結合を切ることなく、その一部に塩基が入り込んでいることがわかる。Fig. 3 に、Poly(C) 鎖の結晶構造⁸⁾、および多糖/核酸複合体中の Poly(C) 鎖の上面図を示す。結晶構

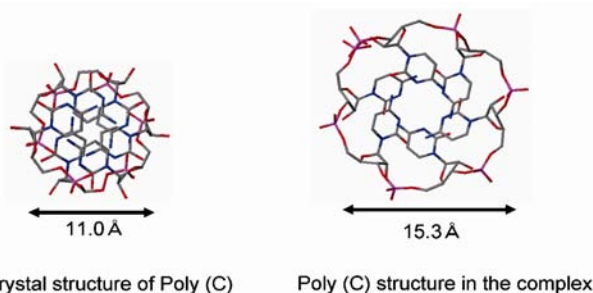


Fig. 3 Top view comparison between the Poly(C) conformation in crystal and in the complex.

参考文献

1. K. Sakurai and S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**(18), 4520–4521 (2000).
2. K. Sakurai, M. Mizu and S. Shinkai, *Biomacromolecules*, **2**(3), 641–650 (2001).
3. K. Sakurai, K. Uezu, M. Numata, T. Hasegawa, C. Li, K. Kaneko and S. Shinkai, *Chem. Commun.*, **35**, 4383–4398 (2005).
4. K. Koumoto, T. Kimura, H. Kobayashi, K. Sakurai and S. Shinkai, *Chem. Lett.*, 908–909 (2001).

造での螺旋幅が 11 Å であるのに対し、MO 計算後の多糖/核酸複合体中では 15.3 Å と大きく螺旋幅を拡げている。一方、カードラン 2 重螺旋の螺旋幅はほとんど変化していなかった。

CUR/Poly(C) 複合体は、ある程度の鎖長がないと安定に存在しないことが実験的に明らかとなっている⁹⁾。この実験事実を計算化学的手法により検証するため、鎖長を変化させた CUR/Poly(C) のモデルを作成し、それぞれの生成熱 (Heat of Formation, HOF) を求めて、式 (1) により ΔH を算出した。

$$\Delta H = 3H_{\text{complex}} - (3H_{\text{poly(C)}} + 2H_{\text{CUR3}}) \quad (1)$$

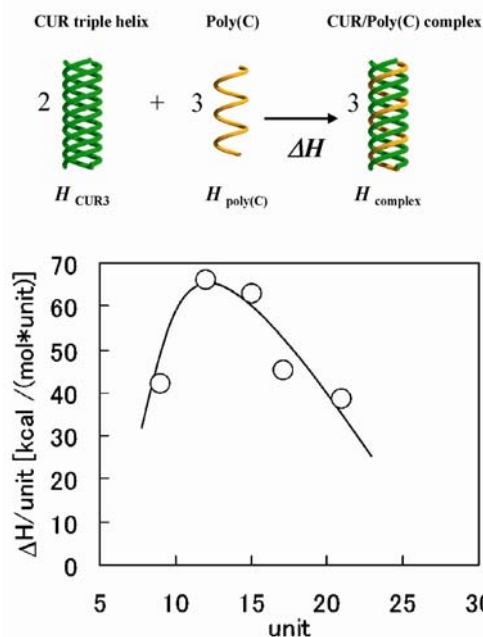


Fig. 4 Chain length dependence of the standard enthalpy change (DH) per the structural unit (two glucoses and one cytosine).

その結果、鎖長が 15 unit 以上になると ΔH が低下する傾向がみられた (Fig. 4)。この結果は、先に示した実験的解析とも一致する。一方で、10 unit 以下の鎖長においても ΔH が低下している。これは、あまりに鎖長が短いと 3 重螺旋構造をとることができないのであるが、無理やり 3 重螺旋構造にして計算すると螺旋末端をほどこいた状態で安定化するため、一見エネルギー的に安定であるかのような結果となっている。

5. K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai and S. Shinkai, *Chemistry & Biodiversity*, **1**, 916–924 (2004).
6. K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai and S. Shinkai, *Biomacromolecules*, **6**, 1540–1546 (2005).
7. 三好賢太郎, 上江洲一也, 櫻井和朗, 新海征治, *高分子論文集*, 63 巻 7 号, 451–457 (2006).
8. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer-Verlag: Tokyo (1987).
9. K. Koumoto, K. Sakurai, S. Shinkai and T. Kunitake, *Am. Chem. Soc. Polym. Prep.*, **43**(2), 721–722 (2002).

eMD²で始める分子動力学シミュレーション

(6) 分子操作及び MDGRAPE-3 との連携

株式会社インフォグラム システム開発部 田上 享

今回は、eMD²の機能である、リアルタイム分子操作と超高計算チップ「MDGRAPE-3」との連携についてご説明いたします。

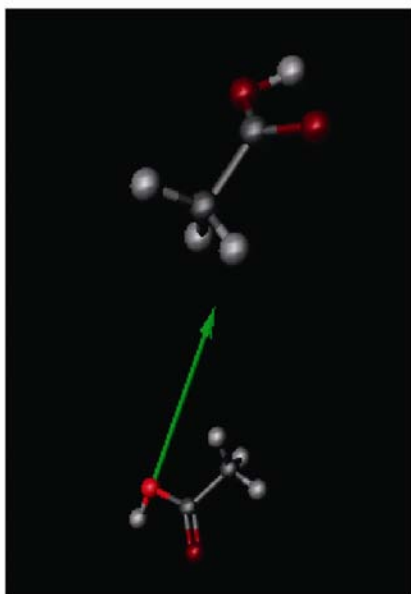
■リアルタイム分子操作

通常、MD シミュレーションでは分子の初期配置を作成して計算を開始すると、計算が完了するまで触れることは出来ません。

それに加え、計算途中の状況を画面で確認できない場合があります。

eMD²では、計算中の動きをリアルタイムに表示しながら、分子に力を加えて分子操作を行うことが可能となっており、操作と計算結果が常にリンクしたダイナミック分子マニピュレーションが可能です。

これにより、フェムト秒スケールの「分子のダイナミクス」を直感的に把握でき、本格的な MD シミュレーション前の試行錯誤や、作成の難しい複雑な初期構造の生成などにも威力を発揮します。



■MDGRAPE-3 との連携

MD は非常に計算量が多く、計算に非常に時間がかかります。

その大半は原子間に働くクーロン力などの非結合力の計算に費やされ、原子数の増加に伴って計算時間は数週間、数ヶ月に及ぶ場合もあります。

したがって、通常のデスクトップ PC では原子数が数万となるような系では実質的な計算が難しいケースも少なくありません。

理化学研究所が開発した MD シミュレーション専用の計算チップである「MDGRAPE-3」は、最も計算量の多い原子間の非結合力を非常に高速に計算することができます。

eMD²は、この MDGRAPE-3 との連携が可能となっており、コンピュータの PCI-X スロットに MDGRAPE-3 を装着することで非装着時と比較して計算速度は数十倍向上し、シミュレーション時間を大幅に短縮することが可能となります。

つまり、MDGRAPE-3 非装着時に1ヶ月以上かかった計算が数日で完了することになり、これまでは計算時間の問題で難しかった規模の大きな系も計算可能となります。

クラスタを構築する場合などと比較すると導入も容易で、コストパフォーマンスに優れた計算チップであると言えます。

今回は、MD シミュレーションを行う上で便利なツールなどをご紹介します。

eMD²の体験版及び今回の連載記事の Web 版を以下の URL よりご覧いただけます。

<http://www.emd2.jp/> こちらも、是非ご覧下さい。

本文に記載しております試薬は試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「家庭用品」などとして使用できません。価格はすべて希望納入価格であり、消費税等が含まれておりません。

和光純薬工業株式会社

本社 ☎540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 ☎(06) 6203-1788 (試薬学術部)
支店 ☎103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号 ☎(03) 3270-8243 (試薬学術部)

●九州営業所 ☎(092) 622-1005 (代) ●横浜営業所 ☎(045) 476-2061 (代)
●東海営業所 ☎(052) 772-0788 (代) ●筑波営業所 ☎(029) 858-2278 (代)
●東北営業所 ☎(022) 222-3072 (代) ●北海道営業所 ☎(011) 271-0285 (代)
●中国営業所 ☎(082) 285-6381 (代)

フリーダイヤル 0120-052-099 フリーファックス 0120-052-806

■ご意見・お問い合わせ、本誌のDM新規登録・変更等については、

E-mail : org@wako-chem.co.jp まで

Wako Chemicals USA, Inc.

<http://www.wakousa.com>

●Head Office (Richmond, VA)

Tel: 1-804-714-1920

●Los Angeles Sales Office

Tel: 1-949-679-1700

●Boston Sales Office

Tel: 1-617-354-6773

Wako Chemicals GmbH

European Office

<http://www.wako-chemicals.de>

Tel: 49-2131-311-0

URL : <http://www.wako-chem.co.jp>