

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山県立大学	助成金額 :	470 千円
研究代表者 : 森重健一	所属 : 工学部知能ロボット工学科	職位 : 講師
研究題目 : BMI 技術を用いたヒトの運動機能拡張に関する研究		

研究概要

脳波は脳の神経活動に伴って頭皮表面で生じる電位変化であり、運動や判断に関する様々な情報が含まれている。しかし、脳波データに含まれる神経活動を反映した信号は極めて小さく、眼球運動や心拍といった様々なノイズに歪められているため、脳情報の解読は困難を伴う。研究代表者は、脳波・脳磁図データを脳電流と複数ノイズ源の電流に一度に変換する方法を見だし、ノイズに乱されたデータであっても、それらを分離し脳電流のみを抽出する方法を開発した。さらに、抽出した様々な脳領域での脳電流の中から、実験タスクに真に重要な脳電流だけに絞り込み、未知の計測データに対しても高い推定精度で時系列信号を解読することができた。本研究では、研究代表者が見出してきたブレイン・マシン・インタフェース技術にロボットアームを組み合わせることで、人間の機能を拡張し、「第3の手」として利用可能なシステムの基盤技術を開発することを目的とする。さらに、ロボットアームという道具が人間の拡張機能としてどのように身体化され、それに伴って脳内表現がどう変化していくのか、明らかにするための一助とする。

成果要約

健常者を対象に、実験参加者が肘の単関節到達運動を遂行しているときの脳波と筋電位、手先の運動軌道の計測を行い、自分自身が発するノイズが脳波へ及ぼす影響を調べた。その結果、上肢を動かしているときの筋電位やそれに伴って生じる眼球運動が、頭皮上に配置したセンサ全体に、大きく影響を及ぼしていることを明らかにした。

そのようなノイズに歪んだ脳波からその影響を分離して脳活動のみを抽出するために、階層ベイズ推定を用いた。その際に、実験参加者のMRI構造画像から作成した頭部3次元モデルと到達運動のメタ解析fMRIデータを階層ベイズ推定の事前分布として用い、到達運動遂行中の脳波から大脳皮質表面とノイズ源に配置したダイポール位置での電流を推定した。実験参加者は右手で到達運動実験を行っていたため、主に対側の一次運動野と補足運動野付近で大きな電流が推定され、その値の大きさや特徴は妥当だった。今後は、推定した脳電流から手先位置・速度・加速度、屈筋と伸筋の筋電位の時系列信号を再構成する予定である。

また、右手・左手を動かす運動イメージ課題を行なっているときの脳波から同様の手順で脳電流を推定し、その周波数特徴を脳活動のパターンとして見分けることで実験参加者の運動意図を推定することも行ない、良好な結果が得られた。さらに、脳波データからロボットアームをリアルタイムで制御するためのシステムを構築した。人間の機能を拡張し、「第3の手」が必要な協働課題として、木の板を片方の手とロボットアームを使って壁に押し付け、もう片方の手で壁に固定する作業を想定した。この協働課題では、実験参加者が部材の端を壁に押し付けたとき、イメージすることでロボットアームを動かし、部材のもう一方の端を壁に押しさえ付ける必要がある。今後は、識別精度を向上させるとともに、ロボットアームを「第3の手」として身体化することが脳活動に及ぼす影響について、学習前後の変化を明らかにしていく予定である。

本研究成果を得るために用いた解析手法である、ノイズ除去手法とメタ解析 fMRI データを組み合わせた脳活動推定方法について、学会発表を行なった。今後もデータ計測及び解析を続け、学会発表や論文投稿を行う予定である。

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
	<p>(1) Shinnosuke Yoshiiwa, Hironobu Takano, Keisuke Ido, <u>Ken-ichi Morishige</u>, “Estimation of cortical currents from EEG signals during N-back working memory tasks,” ICMLC&ICWAPR 2022, Sep 9 – 11, 2022, Toyama</p> <p>(2) Shinnosuke Yoshiiwa, Hironobu Takano, Keisuke Ido, <u>Ken-ichi Morishige</u>, “Pattern classification of working memory contents using EEG cortical currents during N-back task,” Neuro2022, Jun 30 – Jul 3, 2022, Okinawa</p>		
経費の執行状況	区 分	執行額(円)	備 考
	物品費	369,721	ロボットアーム
	旅費	29,060	学会発表旅費
	その他	24,219	学会参加費
	間接経費	47,000	光熱水費

公益財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山県立大学	助成金額 : 470 千円	
研究代表者 : 中村正樹	所属 : 工学部情報システム工学科	職位 : 教授(旧 准教授)
研究題目 : 形式概念分析と機械学習の融合による交通事故の解明・予測		

研究概要

交通事故に対して、事故が発生する前に先制的な対策が取れるように、事故発生分析・予測システムを開発する。超高齢化を背景とした社会変容に警察業務のあり方が検討されており、そのために、交通事故の精緻なデータが近年蓄積されつつある一方、従来のデータ駆動による分析方法では因子が多様なために一般的な傾向を見いだせないケースが頻発している。交通事故発生メカニズムの解明を題材に、機械学習をはじめとするデータ駆動手法の課題の解決を目標とする。

富山県警察本部と連携し、人身事故、物損事故のデータ、交通事故防止のための対策事例などの提供を受ける。さらに、気象データや人流データ等の各種オープンデータや商用データを入手し、これらの異種のビックデータを統合的に利活用するため、機械学習法を導入する。機械学習法を効果的に用いるため、形式概念分析を用いてデータを形式的な枠組みで取り扱う。これによって機械学習の入出力となる複雑な交通事故メカニズムを可視化する。

成果要約

本研究では、形式概念分析による交通事故の事故要因を分析、機械学習による予測モデルを作成する手法を提案した。機械学習による予測モデル作成における、特徴量エンジニアリングや予測結果の分析において形式概念分析を活用する手法を検討した。本手法を用いて将来の人対車両事故が重傷・死亡事故になるかを予測するモデルを作成することで、本手法に関する有用性を得た。

形式概念分析により、例えば「曇りで昼の時間帯に横断歩道以外を横断していた高年期であり歩行者中の第二当事者と損傷がない第一当事者の間で発生した 19 件の交通事故のうち、16 件は第二当事者が重傷を負った」とルールが得られる。このルールに基づき天候と時間帯別に高年期の人身事故を分析した結果、昼かつ曇りという時間帯と天候の組み合わせ時に高年期の事故割合が多いことが発見された。

このように形式概念分析を適用することで、人手では探しきれない膨大な事故関連データから事故分析に効果的なヒントを得ることができる。さらに、本研究では、形式概念分析の結果を用いることで、機械学習に基づく事故分類予測の精度が向上するという知見を得ることができた。

以上の研究成果は、下記研究成果発表状況の 1,6 で発表し、特に 6 については、講演会の最優秀論文賞および優秀発表賞と表彰された。

上記以外にも、衛星画像を用いた事故予測モデルの検討 (同 2, 4) や道路形状に基づく事故分析 (3, 5)、自転車事故の分析や形式概念分析の効率化 (7) などの研究成果について、それぞれ学外発表した。

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Shogo Kotani, Masaki Nakamura, Kazutoshi Sakakibara, Tatsuo Motoyoshi, Keisuke Hoshikawa , Toward prediction of traffic accidents using formal concept analysis of actual accidents and related data, The Proceedings of the International Conference on Machine Learning and Cybernetics (ICMLC) , 6014, Toyama, 9-11 Sep. 2022 2. 浅井 智也, 中村 正樹, 榑原 一紀, 本吉 達郎, 星川 圭介, 富山県の交通事故データと衛星画像を用いた交通事故予測モデルの開発 2022 年電気・情報関係学会北陸支部連合大会, F2-46, 2022.9.3 (金沢大学, Online). 3. 甲斐 雅也, 中村 正樹, 榑原 一紀, 本吉 達郎, 星川 圭介, 富山県における交通事故現場周辺の道路形状による事故属性の分析, 2022 年電気・情報関係学会北陸支部連合大会, F2-27, 2022.9.3 (金沢大学, Online). 4. 浅井智也, 中村正樹, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 交通事故データと衛星画像を用いた富山県特有の交通事故予測モデルの開発, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2022, SS04-01, pp.362-363, 2022 年 11 月 25-27 日, 近畿大学東大阪キャンパス 5. 甲斐雅也, 中村正樹, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 機械学習を用いた富山県における交通事故現場周辺の道路形状による事故属性の分析, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2022, SS04-07, pp.383-384, 2022 年 11 月 25-27 日, 近畿大学東大阪キャンパス 6. 小谷祥悟, 中村正樹, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 形式概念分析と機械学習による交通事故予測システムの検討, 計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2022, SS04-02, pp.364-369, 2022 年 11 月 25-27 日, 近畿大学東大阪キャンパス (最優秀論文賞, 優秀発表賞 W 受賞) 7. 中村正樹, 輿水樹, 柴田大翔, 小谷祥悟, 榑原一紀, 本吉達郎, 星川圭介, 形式概念分析による交通事故データ分析について ―自転車事故の分析と形式概念分析のための属性抽出手法―, 計測自動制御学会 システム・情報部門 社会システム部会 第 31 回社会システム部会研究会予稿集, pp.1-6, 2023.3.5-7 石垣島 		
経費の執行状況	区 分	執行額(円)	備 考
	学会参加費, 発表費	423,000 千円	国際会議 ICMLC,電気・情報関係学会北陸支部連合大会, 計測自動制御学会システム・情報部門学術講演会, 社会システム部会研究会
	間接経費	47,000 千円	

公益財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山県立大学	助成金額 : 470 千円
研究代表者 : 久加朋子	所属 : 環境・社会基盤工学科
職位 : 准教授	
研究題目 : 富山における河川水中浮遊ゴミの現況把握と水理モデルを用いた輸送特性の検討	

研究概要

近年、世界各地の海域で海ゴミ、とくにプラスチックゴミの問題が深刻化している。2009 年 7 月 15 日、海岸漂着物処理推進法（平成 21 年法律第 82 号）が公布・施行され、富山県では平成 22 年度より海岸漂着物実態調査が実施されている。令和元年度の調査結果（富山県提供）によると、富山県内の 20 箇所の海岸における 100 m³あたりの漂着物量（m³）は、射水市庄西町に位置する六渡寺海岸にて最も多いことが確認されている。六渡寺海岸では、海岸清掃活動を六渡寺地区住民にて年 2 回、ボランティア活動（六友会）にて月 1 回（3 月～11 月、8 月を除く）、富山県による清掃委託が年 3 回実施される他、海ゴミに関する普及活動も展開されている。こうした活動の結果、六渡寺海岸における海ゴミ量は年々減っている。しかし依然としてごみ量は多い。そこで本研究では、小矢部川から河口に至るまでの浮遊ゴミの挙動を明らかとすることを目的とし、① 聞き取り調査（富山県環境政策課、富山市、六渡寺自治会）、② 目視調査、③ ドローン（UAV）調査、④ 定点カメラ・画像解析（8 か所設置：富山県河川国道事務所、高岡市、海上保安庁へ依頼）、⑤ 水文データ整理、⑥ 非定常 2 次元流れ解析にゴミモデルを追加し、現地データとの比較からモデル精度の検証までを実施した。

成果要約

調査箇所を図-1 に示す。UAV（Autel Evo II）によるゴミ調査は、小矢部川河口から 40km 上流の南砺市（左岸側に南砺市福光斎場）までを 23 区間に分け、5 日間かけて撮影を行った。撮影時の飛行条件は、グラウンドにて事前検討を行い、ペットボトルや袋等のゴミが十分に確認できる条件として飛行高度 70 m、フロントオーバーラップ 85%、サイドオーバーラップ 75%、ジンバルピッチ 90°、飛行速度 25m/s とし、地上解像度 2cm を確保するようにした。撮影後、得られた多量の画像は MetaShape Professional（Metashape 社）を用い、区間ごとにオルソ画像合成までを行った（図-2）。図-3 に、撮影した 40km 範囲の小矢部川本川における停止ゴミの位置・個数を示す。図-3 より、画像欠損箇所を除くと、いずれの地点にも停止する河川ゴミが確認された。上流から下流にかけて停止ゴミ数は増加傾向にあり、支川が合流するたびにゴミが増加していることが分かる。右岸と左岸の傾向を確認すると、上流部（38k~30k）の主なゴミ停止場所は、蛇行部の外岸部（図-3 の青枠内）や砂州上（図-3 の青枠以外）であった。上流域の砂州では、低水路河岸から約 30m 離れたような場所でもごみの停止が見られる点が特徴的であった。これは、上流部は水深も浅く低水路も狭いため、水位が上がりやすいためである。一方、上流部より下流側の中流域（27k~14k）では上流部や下流部と異なり、蛇行部分が少なく単調な流れが多い。このため、20k~14k では右岸左岸まんべんなくごみが停止したと考えられる。さらに下流部（14k~5k）では、大きく蛇行している地形のため、右岸と左岸でごみの停止に大きく偏りが現れた（図-3）。また、下流区間は非常にゴミの数が多く、その大半が蛇行外岸側のブロックや植生付近であり、その他として蛇行内岸側砂州の上に停

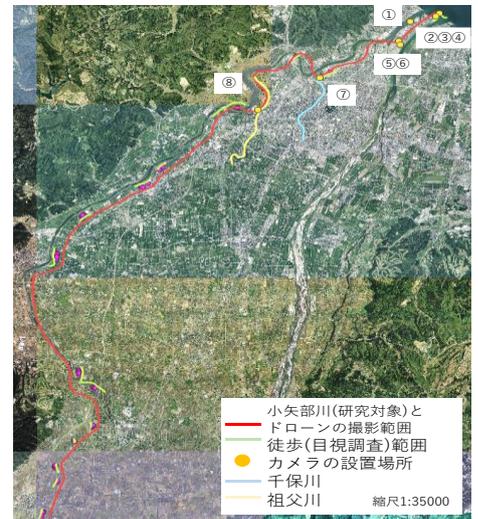


図-1 小矢部川の調査範囲（目視調査域、ドローン撮影範囲・計算区間、定点カメラ位置）



図-2 ゴミ停止位置（結果一部抜粋）

止するものであった。なお、上流側では農業ゴミの袋等が多く、下流側ほどペットボトルや袋、バケツなど様々な生活由来のゴミが増える傾向が確認された。

タイムラプスカメラ 8 台のうち、ある程度傾向がつかめたのは 3 か所 (図-1 の②,⑥, ⑧) であった。②の千保川合流部では、小矢部川本川と千保川から流入する浮遊ゴミが明瞭に確認できた。8/24~10/31 の期間の浮遊ゴミ数 (5 分間隔撮影画像を用いた) を図-4 に示す。調査期間中、ゴミ輸送が確認されない日はなく、平水時も常に若干のゴミが河口に向かって流出する状況が確認された。さらに、確認された浮遊ゴミ数は小矢部川で 191 個、千保川で 445 個となり、5 分間隔の画像の集計において、約 2.3 倍もの差が認められた。千保川は市街地を經由し、比較的小矢部川の下流付近で合流する支川であり、ゴミの多さが際立って多いことが分かる。このほか、出水時のみに着目すると、出水前半に浮遊ゴミが集中するファーストフラッシュ現象も確認された。

数値解析では、非定常平面 2 次元流れモデル (iRIC Nays2D) に流れに追従する粒子モデルを追加し、浮遊ゴミの輸送および停止箇所の再現性・精度について検証を行った。検証のための計算は 2 ケースとし、平水時および実績出水時の 2 つの流量ハイドログラフを与えた。計算区間は 5k~16k の範囲とし、計算格子サイズは約 4 m×4 m、河床高には 2021 年グリーンレーザデータ (富山河川国道事務所提供) を用いた。粒子停止水深には、今後の検証が必要であるが、今回は 0.01 m を設定した。結果の一部を図-5 に示す。計算では繰り返し出水を与えていないため、粒子 (浮遊ゴミ) 停止数は限られるが、出水条件にて図-5 の黄色で示す箇所へ停止が確認された。平水時と出水時を合わせると、現況で、図-5 の白線の箇所への粒子停止が再現できなかった。これは、ブロック上へと浮遊ゴミが停止する箇所であり、現況のモデルのままでは再現が難しい場所である。今後、複数回の出水を繰り返すことで、どの程度浮遊ゴミが堆積するホットスポットが計算できるかを精度検証すると共に、流れるゴミのうち、何割程度が河道内に一時貯留されるかなどの検討に発展させていくことが課題である。

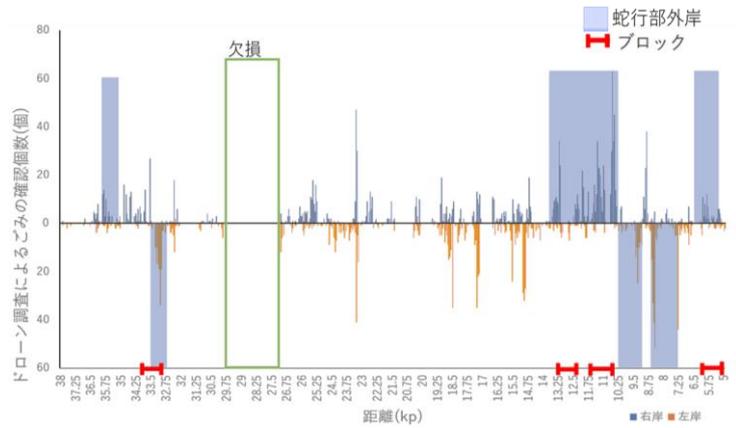


図-3 UAV 画像から確認した停止ゴミ(右岸・左岸)

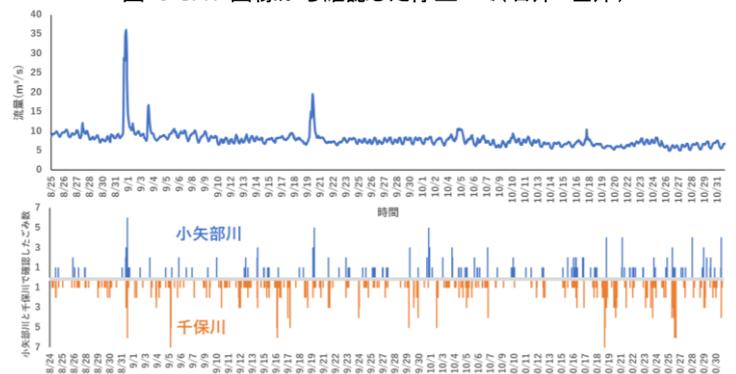


図-4 上)千保川の時間流量, 下)浮遊ゴミ確認数(小矢部川・千保川)



図-5 粒子停止箇所の比較, 左)実績, 右)出水時の計算結果

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
学会発表	富満亮太・久加朋子：小矢部川における河川浮遊ごみの現況と輸送特性の検討，令和4年度土木学会中部支部研究発表会（2023/3/3） 土木学会中部支部 優秀発表表彰 受賞		
経費の執行状況	区分	執行額(円)	備考
	物品費・作業補助謝金・分析機利用費	423,000	UAV バッテリ，充電用蓄電池，ハイクカムカメラ，Metashape 購入費，他調査物品，作業補助謝金
	間接経費	47,000	

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山県立大学	助成金額 :	470 千円
研究代表者 : 黒田啓介	所属 : 工学部環境・社会基盤工学科	職位 : 准教授
研究題目 : オゾンと過酸化水素を用いた CN-キトサン複合体による光触媒吸着反応の促進と水中有機汚染物質除去への適用		

研究概要

世界中で都市化が進む中、安価で環境負荷が小さく、かつ高効率な水質浄化技術が求められている。光触媒を用いた水質浄化は、強い酸化力で幅広い物質が分解できることが特徴であるが、紫外線照射が高コストな点や触媒金属の溶出・腐食が問題であった。これまで研究代表者は、可視光で駆動するメタルフリーな光触媒であるグラフィティックカーボンナイトライド（以下 CN）と、吸着剤であるキトサンを用いて、太陽光が利用でき、汚染物質を酸化分解と吸着の両方で除去し、かつ処理後の固液分離が容易な低コストの光触媒担持型吸着ビーズを開発したが、酸化力が弱く反応時間が長い点が課題であった。そこで本研究では CN の分解速度の向上について検討するため、CN による光触媒分解に寄与する活性酸素種を同定するとともに、他の光触媒で反応速度向上に用いられるオゾンや過酸化水素の添加を検討した。除去対象物質は、発がん性のあるマラカイトグリーン、アシッドブラック 1（AB1）、メチレンブルーの3種類の有機色素と、水環境中に広く分布するため薬剤耐性菌の発生が懸念される抗生物質のスルファメトキサゾール（SMX）とした。

成果要約

1. CN による有機色素の分解に寄与する活性酸素種の同定

研究代表者らによる既報（羽間・黒田、2022、日本水環境学会年会講演集）に従い作成した CN 担持キトサンビーズを用い、3種類の有機色素の吸着・分解実験を行った（図1）。CN 単体による AB1 の分解は、スーパーオキシドアニオン（ $\cdot\text{O}_2^-$ ）を捕捉するベンゾキノン（BQ）を添加すると抑制された（図1左）。光触媒反応ではヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）、電子（ e^- ）、 $\cdot\text{O}_2^-$ などが活性酸素種として生成するが、AB1 の分解には $\cdot\text{O}_2^-$ が主に寄与していたと考えられた。

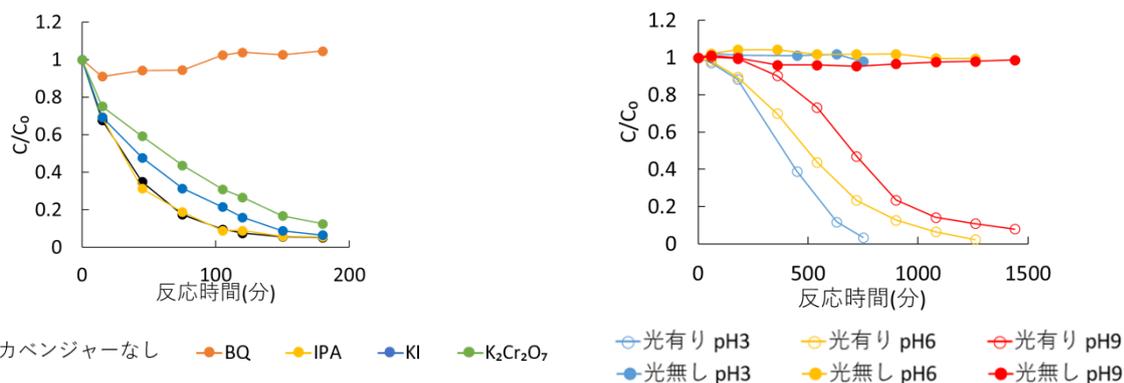


図1 左) CN による AB1 の光触媒分解におけるスカベンジャーの効果、右) CN 担持キトサンビーズによる AB1 の除去特性と溶液 pH の関係（縦軸は初期濃度に対する濃度比）

・O₂-生成は酸性条件で促進するとされているため、CN 担持キトサンビーズによる AB1 の分解を pH3, 6, 9 で行ったところ、pH3 の酸性条件において分解が最も促進された (図 1 右)。これより、AB1 の分解には・O₂-が最も寄与していることが裏付けられた。これらの結果を誌上発表 (論文 1) および学会発表した。

・CN による SMX の光触媒分解とオゾン・過酸化水素添加の効果

次に、CN による光触媒分解にオゾンや過酸化水素を添加する効果について、SMX を対象物質に調べた (図 2)。光源は 300W キセノンランプからの可視光 (波長 400~600 nm) とし、過酸化水素 (H₂O₂) は 14.7 mg/L となるよう実験開始時に試料水に添加し、オゾン注入量は 0.2 g/hr とし試料水中に連続注入した。その結果、CN による光触媒分解により SMX が分解したが、H₂O₂はそれ自体では SMX は分解されず、CN と H₂O₂を添加しても SMX の分解は促進されなかった (図 2 左)。一方、オゾンを添加した場合 SMX は急速に濃度が減少した。可視光照射下の CN とオゾンを組み合わせた場合、SMX の分解速度はオゾン単独に比べて増加したが、増加した割合は数%と小さかった。

今後はスカベンジャー添加実験による SMX の分解に寄与する活性酸素種の同定や、総有機炭素 (TOC) を分析することによる SMX の無機化割合の測定などによって、オゾン+CN の SMX 分解機構を推定する予定である。また、キトサン等の吸着剤に CN を担持した場合の SMX の分解速度とオゾン添加の効果を検討する予定である。このほか、本研究に関連して光触媒担持吸着剤を用いた水中のヒ素の酸化・吸着除去に関する総説論文を執筆した (論文 2、査読中)

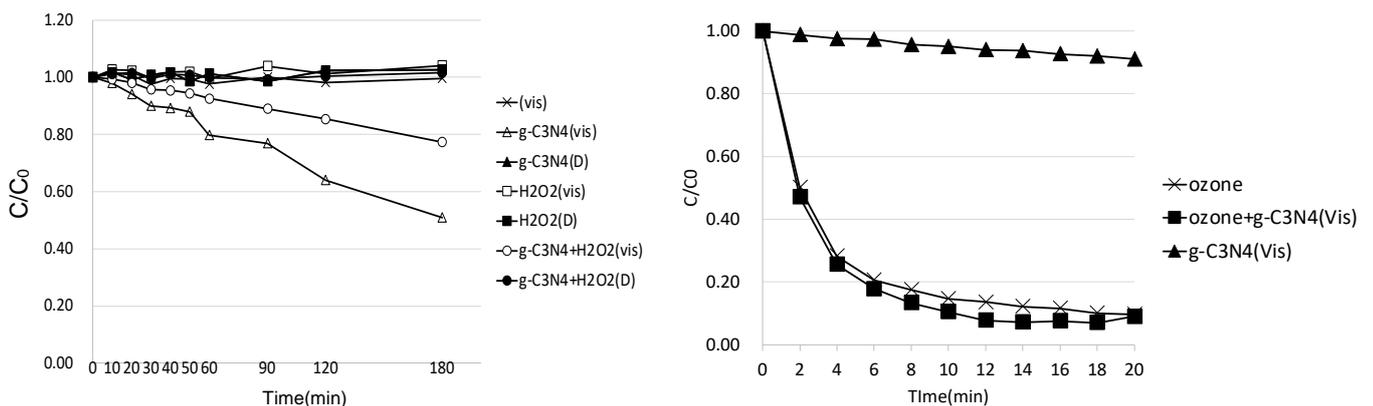


図 2 可視光照射下の CN(g-C₃N₄)による SMX の分解特性と (左) 過酸化水素添加の効果、(右) オゾン添加の効果 (縦軸は初期濃度に対する濃度比。Vis は可視光照射条件、D は光照射なしの条件を表す)

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
論文 1 (査読あり)	羽間悠菜、黒田啓介 (2022) グラフィティックカーボンナイトライドを用いた光触媒担持吸着剤の開発と水中有機色素除去への適用、土木学会論文集 G (環境), 78 (7) III_441-III_448.		
学会発表 1 (口頭、査読あり)	羽間悠菜、黒田啓介(2022)グラフィティックカーボンナイトライドを用いた光触媒担持吸着剤の開発と水中有機色素除去への適用、第 59 回環境工学研究フォーラム要旨集		
論文 2 (査読あり、投稿中)	Kuroda K, Lu, B, and Hama, Y, Recent progress in photocatalysts for oxidation of As(III) and photocatalyst-impregnated adsorbents for removing aqueous arsenic, <i>Current Opinion in Environmental Science & Health</i> , in review.		
経費の執行状況	区分	執行額(円)	備考
オゾン発生機一式	物品費	387,000	オゾン発生量 5g/h
英文校閲	作業委託費	36,000	3000 words
間接経費一式	その他	47,000	光熱水費、総額の 10%

公益財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山県立大学	助成金額 : 470 千円	
研究代表者 : 戸田 弘	所属 : 工学部 生物工学科	職位 : 講師
研究題目 : 有機溶媒耐性微生物を利用した環境調和型物質生産システムの構築		

研究概要

近年の合成生物学の発展に伴い、バイオプロセスによる有用物質生産の研究が加速している。しかし、これらの多くのバイオプロセスは水系反応で行われるため、医薬品中間体などの難水溶性化合物を対象とした微生物変換などでは、高濃度の基質を反応させることが困難である。この課題解決の一つアプローチとして、有機溶媒-水二相系反応が用いられるが、従来宿主として利用されてきた大腸菌宿主は有機溶媒耐性が低く、酵素菌体の失活による反応持続性の低下が問題となる。こうした課題解決のために、近年 *Rhodococcus* 属細菌や *Pseudomonas* 属細菌などの有機溶媒耐性菌を利用した物質生産プロセスが研究されている。我々はこれまでに、有機溶媒耐性菌 *Kocuria rhizophila* を利用したスチレン酸化酵素の発現及びキラル化合物の生産等について研究しており、また当該細菌で利用可能な新規シャトルベクターなどの開発も行っている。そこで本研究では、*K. rhizophila* DC2201 が有する有機溶媒耐性機構の解明や、代謝系遺伝子改変による有用物質生産について研究を行った。

成果要約

1) *K. rhizophila* DC2201 が示す有機溶媒耐性機構の解明

K. rhizophila DC2201 を有機溶媒存在下で培養し、回収した菌体から RNA の抽出を行った。同様に有機溶媒非添加条件で培養した菌体からも RNA の抽出を行い、それぞれ抽出した RNA を用いて次世代シーケンスによる網羅的解析を行った。両培養条件における RNA 転写量の比較結果から、約 300 遺伝子において転写量の顕著な増加が確認された。これらの遺伝子には、転写調節因子、トランスポーター、分子シャペロン、細胞壁合成関連遺伝子など、他の微生物においても有機溶媒耐性への関与が示唆されているものが多く含まれていた。一方で、糖転移酵素や糖異性化酵素、多糖類合成酵素など、細胞外多糖類の合成に関与すると示唆される一連の遺伝子群の転写量が顕著に増加していた。同じグラム陽性細菌である *Rhodococcus* 属細菌において、細胞外多糖がその有機溶媒耐性に関与しているという知見があることから、*K. rhizophila* DC2201 においても類似のメカニズムにより菌体の親水性を高め、疎水性化合物である有機溶媒に対するバリア機能を高めることで耐性を発揮していることが推測される。現在、これらの解析結果をもとに遺伝子破壊株の作成を行っており、*K. rhizophila* DC2201 の有機溶媒耐性機構の解明を行う予定である。

2) 代謝系遺伝子改変による物質生産

K. rhizophila DC2201 が持つ有機溶媒耐性により、様々な疎水性化合物の生産への応用が期待される。そこで本菌を利用した物質生産のモデル化合物として、芳香族化合物であるスチレンおよびカロテノイド類の一種であるアスタキサンチンの生産を試みた。スチレンは芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンを出発材料とし、2 段階の酵素反応によりスチレンへと変換が可能である。そこでデータベースより取得したフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)および桂皮酸脱炭酸酵素(FDC, PAD) 遺伝子をそれぞれ合成し、*Kocuria* 用発現ベ

クターにクローニングした後、*K. rhizophila* DC2201 へ導入した。両酵素遺伝子を導入した組換え株において、培養液上清中にスチレンを約 0.1 mM 生産することが確認された。また、有機溶媒を重層させた二相系における培養を試みた結果、オクタンを重層した際に約 10 mM のスチレンが溶媒層に蓄積されることが明らかとなった。

カロテノイド類であるアスタキサンチンは、その高い抗酸化作用から近年化粧品やサプリメントとしての需要が高まっている。*Kocuria* 属細菌はカロテノイド化合物生産系を有するものが多く、*K. rhizophila* においてもサルシナキサンチンやデカプレノキサンチンといった C50 カロテノイドを生産することが明らかとなっている。この内在性のカロテノイド合成代謝経路を改変することで、様々な有用カロテノイド類を生産することが可能であると考え、遺伝子破壊によるリコペン生産株の作成及び外来遺伝子導入によるアスタキサンチン生産を試みた。リコペンから C50 カロテノイド合成へ関与する遺伝子 *CrtEb* を破壊した結果、破壊株における C50 カロテノイドの消失およびリコペンの蓄積が確認された。また、この破壊株に対してアスタキサンチン生産に関与する遺伝子 *CrtY*, *CrtW*, *CrtZ* を導入した結果、中間体である β -カロテン、ゼアキサンチン、カンタキサンチンの生産が確認された。しかし、アスタキサンチンについてはその生産量が微量であり、検出限界以下であることが推測された。今後はアスタキサンチン生産量の増加に向け、リコペン高生産株の作成などを目指していく予定である。

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
	1)H. Toda, N. Itoh, and T. Kanai, Bioprocess development for producing useful chemical compounds with the organic solvent-tolerant microorganism <i>Kocuria rhizophila</i> , <i>Active Enzyme Molecule</i> 2022, 2022, 9.31-10.1 (Toyama) 2)戸田 弘、金井 保、有機溶媒耐性菌 <i>Kocuria rhizophila</i> DC2201 代謝改変株を利用した芳香族化合物生産、第 74 回日本生物工学会 2022 年度大会、2022. 10.17-20 (オンライン) 3)戸田 弘、小野木 奈々、有機溶媒耐性 <i>Kocuria</i> 属細菌の代謝改変およびカロテノイド生産、日本農芸化学会 2022 年大会、2022.3.15-18 (オンライン) 4)戸田 弘、有機溶媒耐性菌をプラットフォームとした有用化合物生産プロセスの構築、生物工学若手研究者の集い 有機的連携研究会、2022.8.13 (オンライン)		
経費の執行状況	区 分	執行額(円)	備 考
	物品費	423,000	遺伝子組換え実験関連試薬 分析用 HPLC カラム プラスチック類消耗品
	間接経費	47,000	

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名	富山県立大学	助成金額	470 千円		
研究代表者	安田佳織	所属	工学部 医薬品工学科	職位	准教授 (旧 講師)
共同研究者	真野寛生	所属	工学部 医薬品工学科	職位	特定助教
研究題目	ビタミン D 充足に向けた診断・予防法の開発				

研究概要

超高齢社会に突入した現代の日本において、丈夫な骨や筋力を維持し健康を保つことは重要課題である。骨や筋肉の形成には、ビタミン D が重要な役割を果たす。食品から摂取、もしくは皮膚で生合成されたビタミン D3 は、体内で、25-ヒドロキシビタミン D3 (25D3) を経て、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミン D3 ($1,25D3$) へと代謝され、ビタミン D レセプター (VDR) と結合することで種々の生理作用を示す。活性型は $1,25D3$ であるが、体内では大部分が 25D3 として存在し、血中 25D3 濃度が低くなるほど、骨粗鬆症や癌、また筋力低下のリスクが高まることが知られている。日本では、近年の生活習慣により血中 25D3 の不足・欠乏者の割合が増加しており、ビタミン D3 の積極的摂取が望まれている。

我々は、近年、複数のビタミン D 遺伝子改変ラットを利用し、25D3 が骨粗鬆症・くる病に対する予防・治療の両方に有望であること、一方で、ビタミン D 不活性化酵素 CYP24A1 遺伝子欠損 (KO) ラットでは、同量の 25D3 投与が腎石灰化等の重篤な副作用につながることを明らかにした。これらの結果は、ビタミン D3 や 25D3 の積極的摂取が疾患予防と健康維持に重要であるが、一方で、CYP24A1 が機能不全に陥った人の場合、ビタミン D3 や 25D3 の摂取が副作用を引き起こす可能性を示唆している。すなわち、安全にビタミン D3 や 25D3 の積極的摂取を推奨するために、事前に、血中ビタミン D 代謝物を簡便かつ安価に測定する技術がきわめて重要になる。LC/MS/MS や ELISA 法による定量が一般的であるが、本研究では、分割型ルシフェラーゼを利用し、簡便かつ迅速なビタミン D 代謝物定量系の開発を目指した。

ビタミン D が関与する疾患の予防・治療に対して 25D3 摂取が有効である可能性を前述したが、25D3 は体内で CYP24A1 による代謝を受け不活性化を受けやすい。そこで、重篤なビタミン D 欠乏者に対してより効率よくビタミン D の充足を可能にすることを目指し、25D3 よりもさらに効果持続性の高い 25D3 型誘導体の探索を行った。

成果要約

1. 分割型ルシフェラーゼを利用した簡便なビタミン D 代謝物定量系の開発

これまでに、我々は、VDR のリガンド結合領域と分割型ルシフェラーゼのキメラ酵素を大腸菌で発現させ、得た酵素液をバイオセンサーとするビタミン D 代謝物定量系を開発してきた。取得したバイオセンサーとリガンドを混合後、発光基質であるルシフェリン、ATP を添加することでリガンド濃度依存的な発光が検出される。これまでに確立してきた系では、VDR に結合するリガンドすべてを検出するため、複数のビタミン D 代謝物が存在する生体試料中の 25D3 や $1,25D3$ 濃度を正確に定量することが困難であった。25D3、 $1,25D3$ をそれぞれ特異的に定量することを目的とし、上述の系の VDR リガンド結合領域に、後述する変異を入れた酵素を複数作製した。VDR の 274 番目のアルギニン (Arg274) は $1,25D3$ の 1α 位水酸基と、また、VDR の 305 番目および

397 番目に存在するヒスチジン (His305, His397) は 1,25D3 の 25 位水酸基と水素結合をすることで、1,25D3 との結合に重要な役割を果たすことが知られている。Arg274 をロイシンに置換した R274L 変異体を用いた場合には、1,25D3 に対する応答は、25D3 と同程度まで著しく低下した。生体では、1,25D3 の 500~1000 倍程度の濃度で存在することを考量すると、生体試料中の 25D3 濃度測定により適した形のものになったといえる。次に、1,25D3 に対する応答を高める目的で、His305、His397 を他のアミノ酸に置換した検出系を作製した。その結果、H305D, H397N, H397E の 3 種は、25D3 に対する応答が著しく低下し、1,25D3 特異的に検出可能であることがわかった。上述したとおり、CYP24A1 の機能不全時には、ビタミン D3 や 25D3 の過剰摂取が副作用を引き起こしやすいことから、25D3 や 1,25D3 に加え、CYP24A1 代謝物である 24,25-ジヒドロキシビタミン D3 (24,25D3) 濃度の測定も重要であると考えており、今後、24,25D3 特異的な定量系も開発したいと考えている。

2. 効果持続性の高い 25D3 型誘導体の探索

25D3 の積極的摂取はビタミン D が関与する疾患の予防・治療に有望であるが、25D3 も 1,25D3 と同様に VDR を介して CYP24A1 による連続的な不活性化を受ける。すなわち、VDR への結合能を維持しつつ、CYP24A1 による不活性化を受けにくい 25D3 型誘導体は効果持続性が高いといえる。そこで、側鎖にフッ素を導入した数種類の 25D3 型誘導体について、CYP24A1 の代謝活性、VDR 結合能評価を行った。CYP24A1 活性については、CYP24A1 発現大腸菌の膜面分と電子伝達系を添加した再構成系を用い、代謝解析を行うことで算出した。VDR 結合能については、上述と同様、分割型ルシフェラーゼを用いた系を使っており、リガンド結合領域 (LBD) にリガンドが結合すると LBD の構造の変化に伴い、N 末領域と C 末領域が機能的な複合体を形成できなくなり、発光能を失う。25D3 もしくは各誘導体を種々の濃度で系に添加し、VDR 結合能を 25D3 と比較した。両実験の結果から、導入したフッ素基の位置や数により、CYP24A1 代謝抵抗性や VDR 結合能が大きく異なることがわかった。誘導体の中には、25D3 に比べて顕著に高い結合能を有しつつ、CYP24A1 代謝抵抗性を有するものも存在した。*in vitro* 系で CYP24A1 代謝抵抗性のあった誘導体について、ラット体内における血中濃度の経時変化を 25D3 と比較したところ、*in vivo* においても 25D3 に比べて顕著に代謝されにくく、長時間高い血中濃度を維持していることがわかった。高い VDR 結合能と代謝抵抗性を併せ持つ 25D3 型誘導体が、ビタミン D をより効果的に充足できる可能性がある。

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
	岩井悠一郎、大下遥己、真野寛生、川越文裕、高野真史、橘高敦史、榊利之、安田佳織 側鎖にフッ素を有するビタミン D 誘導体の代謝およびがん細胞増殖抑制効果 第 95 回日本生化学会大会 (2022.11.9-11 名古屋) 真野 寛生 NanoBiT 技術を用いた活性型ビタミン D の新規検出系の開発 令和 4 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 (2022.12.3-4 富山) 他		
経費の執行状況	区分	執行額(円)	備考
	物品費	423,000	遺伝子工学用試薬／細胞・大腸菌培養関連消耗品／分析用消耗品
	光熱水費	47,000	