

福井工業高等専門学校

研 究 紀 要

自然科学・工学

第 52 号

RESEARCH REPORTS OF NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY,
FUKUI COLLEGE
NATURAL SCIENCE AND ENGINEERING NO.52

DECEMBER 2018

目 次

メダカ <i>Per1</i> mRNA のスプライシングバリエントの 単離と発現解析.....	按 察 日 向 木 下 明日香 大 西 夏 奈 浅 田 浩 利 谷 口 龍 平 加 藤 敏 <u>川 村 敏 之</u>	1
酵母細胞表層に Protein A の Z ドメインを提示する 構成発現プラスミドの構築およびその発現提示の蛍光観察.....	桂 田 康 平 <u>松 野 敏 英</u> 高 山 勝 己	5
福井平野西縁断層の確実性 ー 福井地震から 70 年ー	<u>岡 本 拓 夫</u>	11
幼児における投速度調節テストの信頼性及び性差.....	青 木 宏 樹 出 村 慎 一 当 麻 成 人	17
学生の技術者教育と技術職員研修への民間講習会の活用 ー 測定器具の使い方を例としてー	<u>山 田 健太郎</u> 五 味 伸 之 藤 田 祐 介 北 川 浩 和	21

* 下線は投稿者

CONTENTS

Isolation and Gene Expression of Medaka(<i>Oryzias latipes</i>)	
<i>Per1</i> mRNA Splicing Variant	Hyuga AJICHI Asuka KINOSHITA Kana ONISHI Hirotoshi ASADA Ryuhei TANIGUCHI Satoshi KATO <u>Toshiyuki KAWAMURA</u> 1
Construction of the Constitutive Expression Plasmid for Display of Z-domain from Protein A on the Yeast Cell Surface and Fluorescence Microscopy Analysis of the Yeast Cells	Kohei KATSURADA <u>Toshihide MATSUNO</u> Katsumi TAKAYAMA 5
Reliability of the Active Fault at the Western Margin of the Fukui Plain — 70 years after the Fukui Earthquake —	<u>Takuo OKAMOTO</u> 11
Reliability and gender difference of a ball velocity regulation test for preschool children	<u>Hiroki AOKI</u> Shin-ichi DEMURA Narihito TAIMA 17
Utilization of company training program for engineer education and technical support staff training — As an example of how to use measuring instruments —	<u>Kentaro YAMADA</u> Nobuyuki GOMI Yusuke FUJITA Hirokazu KITAGAWA 21

* The name of an underline means a contributor.

メダカ *Per1* mRNA のスプライシングバリエーションの単離と発現解析

按察 日向* 木下明日香* 大西 夏奈* 浅田 浩利*
谷口 龍平* 加藤 敏** 川村 敏之**

Isolation and Gene Expression of Medaka(*Oryzias latipes*) *Per1* mRNA Splicing Variant

Hyuga AJICHI, Asuka KINOSHITA, Kana ONISHI, Hirotoshi ASADA,
Ryuhei TANIGUCHI, Satoshi KATO and Toshiyuki KAWAMURA

In this study, we revealed a novel type of *per1* splicing variant RNA in medaka brain. The *per1* splicing variant is expressed in night and reduced the expression level by light. Thus, this expression is repeated in a 24-hour cycle. In addition, we synthesized this splicing variant RNA *in vitro*.

Key Words : Circadian rhythm, *Period1* gene, Slicing variant, *Oryzias latipes*

1. 緒言

メダカは小型で、止水による飼育も可能なため小スペースで実験が可能である。また全ゲノム配列も決定されており、脊椎動物の実験モデルとしての利用価値が高いメダカを用いてサーカディアンリズムを調べる実験をするため、光で発現が誘導され、24時間周期を刻むことで知られている *period1* 遺伝子は体内時計を司る遺伝子の一つで、発現に関わる外的因子は光で、光を感知すると発現量が増加し、光が感知できないと発現量は減少する^{1), 2)}。しかし、メダカにおける *Per1* の脳での発現は RT-PCR で検出できないほど少ない。しかし、サイズが倍程度ある遺伝子が顕著な発現を有し、暗化で発現誘導するのではないかということ突き止めた。この遺伝子の塩基配列を決定したところイントロンが残ったままの *Per1* 遺伝子であることがわかった。この *Per1* スプライシングバリエーションはイントロン上にストップコドンを含み、タンパク質として合成されないと考えられる。暗化で誘導され24時間周期を刻む *Per1* スプライシングバリエーション RNA の機能について調べることを実験の目的とする。

2. 実験

〈メダカの飼育環境〉

メダカの飼育はバケツまたは水槽にチオ硫酸ナトリウムでカルキ抜きした水を溜めた。棚に設置した電灯によって日照時間をコントロールした（日照時間 12 時間、暗期 12 時間）。卒研生の学生らで日々のえさをあたえたり、水を替えたりして飼育した。飼育のため卒研生の室温は常時 25℃に設定した。ライトがつく時間は日の出、ライトが消える時間は日没を模倣している。

〈RNA 抽出および RT-PCR〉

日の出直後日没後 12 時間 (L0) 日の出後 3 時間 (L3) 6 時間 (L6), 9 時間 (L9), 12 時間 (日没直後 D0), 日没後 3 時間 (D3), 6 時間 (D6), 9 時間 (D9) の 3 時間ごとに 8 回メダカを採取・解剖し、脳を採取し -80℃で保存した。採取した脳から RNA 抽出を抽出した (RNeasy Mini Kit, QIAGEN 社)。この RNA を用い、*Per1* mRNA 由来の cDNA を PCR により増幅し、それぞれの遺伝子の発現量を推定した。L0, L3, L6, L9, D0, D3, D6, D9 の 8 サンプルを用いて *Per1* プライマーを用

* 福井工業高等専門学校専攻科環境システム工学専攻 ** 物質工学科

いて RT-PCR を行った (PrimeScript One Step RT-PCR Kit, TaKaRa 社). 使用した *Per1* のプライマーを以下に示す.

Per1-14-F 5' GCTGCACATCAACGCCCAGC

Per1-421-440R 5' TCGTGCTCAGAGCTGCTGGA

反応条件は 50℃で 30 分逆転写反応を行った後, 94℃で 2 分で逆転写酵素の失活および DNA ポリメラーゼの活性化を行い, 94℃ 30 秒, 65℃ 30 秒, 72℃ 1 分の PCR 反応を 35 サイクル行った.

〈RT-PCR で検出した遺伝子のクローニングおよびシーケンス〉

Per1 cDNA を T-vector pMD20 に導入し(図 1)シーケンスをして, 塩基配列を確定した. 日の出から日の入り, (L0, L3, L6, L9, D0, D3, D6, D9) のメダカの脳を解析した.

塩基配列同定後, *Per1* cDNA を導入した pMD20 を, *EcoRI* で制限酵素処理を行った後, *in vitro* において SP6 RNA Polymerase を用いて *Per1* cDNA から RNA を合成した.

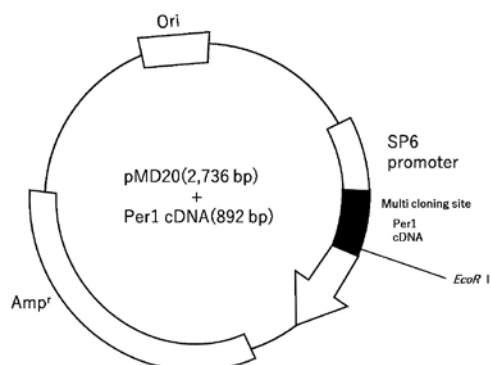


図1 メダカ *Per1* スプライシングバリエント cDNA をクローニングしたプラスミドベクター

3. 結果

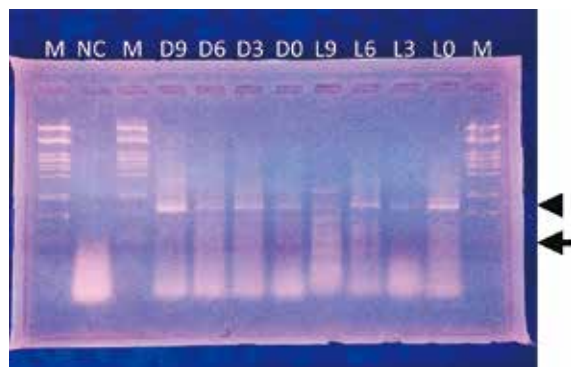


図2 RT-PCR による *Per1* 遺伝子の発現解析
➡はスプライシングされた*per1*, ▼はスプライシングバリエント*per1*. NCは逆転写反応を行わず, PCR反応のみ

日の出から日の入り, 次の日の入りまで3時間おき(L0, L3, L6, L9, D0, D3, D6, D9)のメダカの脳における *Per1* スプライシングバリエントの発現量を解析した(図2). メダカでは本来脊椎動物で広く知られている *per1* 遺伝子の発現量は RT-PCR では検出できないぐらい低いということがわかった(図2 ➡). また, イントロンを含むスプライシングバリエント *per1* は夜誘導され, 光により減衰するという発現パターンを示した(図2 ▼). *Per* 遺伝子は光により誘導され, 夜発現量が減少する 24 時間周期を刻む時計遺伝子であることが知られている^{1), 2)}. また, 現在までに判明している *per1* のスプライシングバリエントは非翻訳領域のイントロンの選択的スプライシングにより起こることが分かっているが³⁾, 本研究では翻訳領域中に見られるという違いがあることがわかった(図3). また, イントロン中にはストップコドンが存在し, タンパク質には翻訳されないことが予想できる. したがって, RNA として機能してい

```
TGTGAGCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCAT
GATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGGGGAAAGCTTG
CATGCCCTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCTACTAGTCATATGGA
TTGCTGCACATCAACGCCCAGCAGCAGCACTCAGGGGAGAGTG
TCGGGTGCCACCTCAAAGACCAGGACGGAGACCCCGAGGGCC
TGAGCCGGCAGAAAGGCCGACCGAGCCGGGCCCCCATGGCTCCCC
ACAGGAGCGGGGACACGACAGACGACGGGTGTGCTCCATGGAA
GGAGGGTCCAGGTCCGGAGACCAGCGGGGACCGAGCTCGGACG
AGATGGAGGGGATGTCCAGCGGGAACGACTCCGGCGAGAGGGA
GAGCCACCCGCGCTCCTGCGGACACCACTCCTCAACGAGCTCC
CACAGCTCCTCAAACGGGAAGGACTCCGGCTTGATGCTGGAGA
GCAACAAGAGGTAGGAGCTTGACCTATGACCTCCCGTTTCCT
GTCAACTCACACAAAAATATCTTTTGAACCTTAAAGAGTTCC
CGCCTGCTTTAGGTACCACTGTTCCGCTTCATTTTCTGAATA
CATTTTTTCCATTGTGAAAAAAGCCCTGTTAAAAACACCGT
TTTCATTGACGCACCAACAGATTACCGGTTTGTGCTCAAC
CACTTCCAGAAGCAACGTGAATGGCAGAAACCTCAGGGTTCTT
TTGTGGAGTCCGGAAGTTGAGTCAAAGCGAATCGTATAATCTGC
TGGCGTAGCATCAATGCGATGTTTCGGATCAAAACACTTTATC
TCCTGCAACTGAACTGCCTTCTGCAGCACATAGTCAGATGTT
TCCAGGAAGCGCCAGTCTGATCTGATTTACCTTTGGTATTTGT
CTGCAACAACCTCCTGAAAGAATGTTTGGTCCCTCCCTCTTC
AGCTCCAACTCTCAGAGCCTGTCCCCCCCCGGGGCTCCCTGG
CCTACAGCCTGCTGTCCACAGCTCTGAGCACGAAATCGGATC
CCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTACAACG
TCGTGACTGGGAAACCCCTGGCGTTAC
```

ベクター: 水色, インサート: 黄色, TAG: ストップコドン

図3 同定した *Per1* pre-mRNA の塩基配列

るか, もしくは何も機能していない RNA であるかが推測できる. しかし, 夜発現誘導され光により減衰する 24 時

間周期を刻むという現象が何の生理現象にもかかわりがないということがあるであろうか。

そこで、本研究ではこの *Per1* スプライシングバリエント RNA を *in vitro* で合成することを試みた (図4, 図5). *Per1* cDNA を導入した pMD20 を *EcoRI* で切断して直鎖とした (図4 ▼) 後, SP6 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成した (図5 ▼). 合成した RNA は生体内で24時間周期を刻む RNA と同じ構造をしているので (今回は一部分のみ), RNA 自体の立体構造や生物にどのように影響するかなどを解析する材料として使用できる。



図4 *Per1* cDNA 導入済み pMD20 の電気泳動
 ➡制限酵素処理していないスーパーコイル構造のプラスミド
 ▶*EcoRI* 制限酵素処理により直鎖となったプラスミド



図5 *in vitro* 合成した *Per1* スプライシングバリエント RNA の電気泳動解析

4. 結論

メダカの脳においてサーカディアンリズムに関与する遺伝子の単離を行った。 *Per1* 遺伝子は脊椎動物に広く保存されているサーカディアンリズム遺伝子であるが、本研究では従来とは異なるスプライシングにより生じた RNA を発見した (図3)。また、このスプライシングバリエントは夜、転写量が増加していき、昼に転写量が減少していく (図2) ことを明らかにした。この RNA にはイントロンがスプライシングされず残っており、イントロン中にス

トップコドンが存在するので、タンパク質には翻訳されないと予想される。

これまでも、 *per* 遺伝子のスプライシングバリエントは知られているが³⁾、それらとは全く別の構造である。RNA として脳でどのような働きがあるか調べるために、この cDNA をプラスミドベクターにクローニングをし、脳で実際に合成されている *Per1* スプライシングバリエント RNA を試験管内で再合成することに成功した (図4, 5)。この RNA にはジゴキシゲニン標識を付加したので、生体内における挙動や相互作用する物質の特定などに応用が可能である。

5. 参考文献

- 1) Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. "Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels". *Nature* 343 (6258) : p536-40 1990.
- 2) Dunlap, JC. "Molecular Bases for Circadian Clocks". *Cell* 96 (2) : p271-290 : 1999.
- 3) Cheng Y, Gvakharia B, Hardin PE. Two Alternatively Spliced Transcripts from the *Drosophila period* Gene Rescue Rhythms Having Different Molecular and Behavioral Characteristics". *Molecular and Cellular Biology* 18 (11) : 6505-6514.
- 4) 按察, 加藤, 川村 メダカ *Per1* mRNA のスプライシングバリエントの単離と発現解析 平成 29 年度日本化学会北陸地区研究発表会要旨集 p170 (H 16) 2017 年 12 月 1 日

酵母細胞表層に Protein A の Z ドメインを提示する 構成発現プラスミドの構築およびその発現提示の蛍光観察

桂田 康平* 松野 敏英** 高山 勝己**

Construction of the Constitutive Expression Plasmid for Display of Z-domain from Protein A on the Yeast Cell Surface and Fluorescence Microscopy Analysis of the Yeast Cells

Kohei KATSURADA, Toshihide MATSUNO and Katsumi TAKAYAMA

An EZZ fragment encoding the partial E-domain and two tandemly aligned Z-domain, ZZ-domain, derived from *Staphylococcus aureus* protein A was PCR-amplified from pGEM-EZZ vector. The EZZ fragment was digested with SalI and AvrII and then inserted into pFGKII426 vector digested with same restriction enzymes. The resultant plasmid was designated as pFGKII426-EZZ. The pFGKII426-EZZ vector was designed to display EZZ-domain on the yeast cell surface using a secretion signal of prepro- α -factor and a Flo428 anchor protein (C-terminal 428 a.a. of Flo1p). Restriction enzyme digestion and DNA sequencing confirmed the successful construction of the recombinant plasmid, pFGKII426-EZZ. The pFGKII426-EZZ was transformed into the *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain. Expectedly, the display of EZZ-domain on the yeast cell surface was confirmed by immunofluorescence staining with FITC-labeled anti-protein A.

Keywords : *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast cell surface display, Z-domain, Constitutive expression, Promoter

1. はじめに

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、培養操作が容易であり、遺伝子組換えに必要な分子生物学的手法が確立されている。酵母は、真核細胞であるために、ヒト由来のタンパク質の発現が可能である。酵母の細胞膜には、細胞膜に局在する糖タンパク質が存在する。船が錨（いかり、アンカー）によって停止するように、細胞膜局在性の糖タンパク質の C 末端には GPI(グリコシルフォスファチジルイノシトール) アンカーと呼ばれる錨の役割をする疎水性アミノ酸配列（糖脂質領域）がある。この GPI アンカーが細胞膜のグルカン層に共有結合することで、糖タンパク質は細胞膜上の正しい位置に繋ぎ留

められている。糖タンパク質の分子構造を見ると、N 末端に分泌シグナルがあり、C 末端に GPI アンカー付着シグナルがある。これまでに、これらの分泌シグナルおよび GPI アンカー付着シグナルの利用によって、さまざまな目的タンパク質が酵母細胞表層に提示できることが報告されている¹⁻⁶⁾。たとえば、ある有用タンパク質 A が他のタンパク質 B と特異的な結合または相互作用を示すような場合には、タンパク質 B を細胞表層に提示した酵母を用いれば、有用タンパク質 A が簡単に回収できる。*Staphylococcus aureus* の Protein A 由来の Z ドメインは、ヒトやウサギの IgG 抗体の Fc 部位に幅広い親和性を持つため、抗体受容体として用いられている。酵母表層提示技術を利用して、この Z ドメインが細胞表層に提示され

*福井工業高等専門学校専攻科環境システム工学専攻 **物質工学科

た酵母を新規な免疫吸着剤として利用するための研究が行われている。このような免疫吸着剤の利点は、現行の吸着剤と比較すると、供給（酵母の培養）が容易であり、遠心分離および酸処理の簡単な操作によって目的タンパク質が容易に回収できることである。これまでに、Zドメインをタンデムに繋いだ二量体であるZZドメインを用いて、ZZドメインが酵母表層に提示された改変酵母株の開発が報告されている¹⁾。既報の研究では、誘導発現型プロモーター(*GALI, UPR-ICL*)を用いてZZドメインの高い発現レベルが報告されている。誘導発現型プロモーターの問題点は、目的タンパク質であるZZドメインの発現を誘導するタイミングの厳密な制御が困難であり、ZZドメインの発現量が大幅に変動することである。このため、品質が均一な免疫吸着剤(ZZドメインが細胞表層に提示した酵母)の供給が困難である。そこで、本研究では、構成発現型プロモーター(*PGKI*)を有する新たな構成発現型ベクターを構築し、ZZドメインを酵母細胞表層に構成的に発現提示する酵母を開発する。

2. 材料と方法

2.1 菌株および培養

大腸菌株は *Escherichia coli* DH5 α 株をプラスミドベクター構築のための宿主として用いた。アンピシリン耐性を有するプラスミドベクターで形質転換した *E. coli* DH5 α 株は、LB培地(1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% Sodium chloride; w/v)に終濃度 100 μ g/ml のアンピシリン(Ampicillin)を加えた LB-Amp 培地で培養した。出芽酵母株は *Saccharomyces cerevisiae* BY4741株(MATa his3 Δ 1leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0)を用いた。pFGKII426-EZZおよびpFGKII426で形質転換した *S. cerevisiae* BY4741 株の培養は、培地に 1/100 量の 100 $\times$ Leu, His, Met アミノ酸ストック溶液(0.6 g のロイシン, 0.2 g のメチオニン, 0.2 g のヒスチジンを 100 ml のリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline; PBS)に溶解した)を添加した。SD-U 培地は、SD 培地(0.67% Yeast nitrogen base without amino acids(YNB w/o a.a.) (Difco), 2% D-Glucose; w/v)に 1/100 量の 100 $\times$ Leu, His, Met アミノ酸ストック溶液を添加した。SDC-U 培地は、SDC 培地(0.67% YNB w/o a.a., 2% D-Glucose, 2% Casamino acids (BD Biosciences); w/v)に 1/100 量の 100 $\times$ Leu, His, Met アミノ酸ストック溶液を添加した。

2.2 pFGKII426-EZZ の構築

pFGKII426-EZZ ベクターを構築するために、インサート配列として EZZ 遺伝子配列および骨格ベクターとして pFGKII426 ベクター⁷⁻⁹⁾を用いた。pFGKII426⁷⁾は、PGK1 プロモーター、分泌シグナルである prepro- α -factor およびアンカータンパク質である FLO428 を持つ。PGK1 プロモーターは、高い発現能力を持つ構成発現型プロモーターであり、遺伝子発現のための誘導が不要である。FLO428 は、凝集タンパク質であるフロクキュリン Flo1 由来の C 末端側の 428 アミノ酸の配列であり、GPI アンカー付着シグナル配列を含む。pFGKII426-EZZ のプラスミドマップを図 1 に示す。

EZZ 遺伝子配列(366 bp)は PCR 法で増幅した。この PCR 法は、テンプレート DNA として pGEM-EZZ ベクターを用い、ポリメラーゼとして KOD-Plus-Neo (TOYOBO)を用い、プライマーとして FlagC fw (5'-TATAGTTCGACGCGCAACACG ATGAAGCCGT-3', 下線は SalI を示す) および FlagC rv (5'-TATACCTAGGTTTCGGCGCCTGAGCATCAT-3', 下線は AvrII を示す)を用いた。PCR 反応条件は、熱変性(94 $^{\circ}$ C, 2 min)した後、熱変性(98 $^{\circ}$ C, 10 sec), アニリング(55 $^{\circ}$ C, 30 sec) および伸長(68 $^{\circ}$ C, 30 sec)を 45 サイクル行った。PCR 法で得られた PCR 産物(EZZ 遺伝子配列)は、SalI および AvrII によって制限酵素消化した後、2%アガロースゲル電気泳動(100 V, 30 min)に供した。アガロースゲル上の DNA バンドを確認するために、電気泳動したアガロースゲルはエチジウムブロマ이드溶液で染色(30 min, 室温)した後、ゲル撮影装置(AE-6932GXCF, ATTO)に供した。EZZ 遺伝子配列(366 bp)の両端に制限酵素配列(制限酵素消化済み)が付加された目的バンド(372 bp)は、このアガロースゲルから切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を用いて精製した。この精製した EZZ 遺伝子配列(372 bp)はインサート DNA として用いた。

pFGKII426 ベクター(9,123 bp)は、EZZ 遺伝子配列の制限酵素消化と同様に、SalI および AvrII によって制限酵素消化した後、1%アガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマ이드で DNA を染色した。目的バンドである制限酵素消化した pFGKII426 のバンド(9,117 bp)は、このアガロースゲルから切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製した。この制限酵素消化した pFGKII426(9,117 bp)は骨格ベクターとして用いた。

インサート DNA である EZZ 遺伝子配列 (372 bp) および骨格ベクターである pFGKII426 (9,117 bp) をライゲーション反応によって連結し, pFGKII426-EZZ を構築した. ライゲーション反応は, 8 μ l の EZZ 遺伝子配列 (372 bp) および 2 μ l の pFGKII426 (9,117 bp) を混合し, 5 μ l の Ligation high (Toyobo) を加えて, 保温 (16°C, O/N) した. このライゲーション反応産物を用いてコンピテントセルである *E.coli* DH5 α 株を形質転換した. 形質転換は, ライゲーション反応産物 (反応溶液) の全量 (15 μ l) を *E.coli* DH5 α 株 (10 μ l) に加え, 氷冷 (30 min) した後, ヒートショック (42°C, 40 sec) し, 氷冷 (2 min) した. この形質転換コンピテントセル溶液を LB-Amp 寒天プレート培地に塗布した後, 静置培養 (37°C, O/N) した. LB-Amp 寒天プレート培地上に生育したコロニーを形質転換体として保管した.

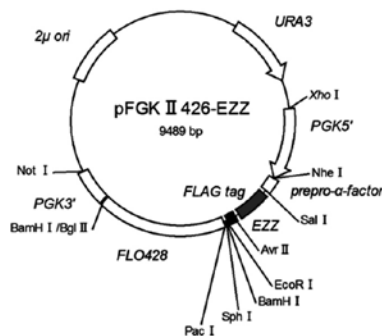


図 1 pFGKII426-EZZ のプラスミドマップ

2.3 pFGKII426-EZZ の確認

形質転換体のうち 8 コロニーを 5 ml の LB-Amp 液体培地で振とう培養 (30°C, 150 rpm, O/N) した. この培養液から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて 8 個の pFGKII426-EZZ を抽出した. pFGKII426-EZZ の構築を確認するために, はじめに, pFGKII426-EZZ は, 制限酵素 (SalI および AvrII) で消化し, その消化した DNA 断片の大きさを確認した. 正しく構築された pFGKII426-EZZ は 9,489 bp であり, 制限酵素で消化した pFGKII426-EZZ 由来の DNA 断片は 372 bp および 9,117 bp である. この制限酵素消化反応の溶液組成は, 5 μ l の pFGKII426-EZZ, 1 μ l の CutSmart Buffer, 0.5 μ l の SalI (New England Biolabs), 0.5 μ l の AvrII (New England Biolabs) および 3 μ l の滅菌水を用いた. アガロースゲル電気泳動は, 制限酵素消化した pFGKII426-EZZ, 制限酵素消化していない pFGKII426-EZZ, DNA サイズマーカーとして 1 kb DNA Ladder (Takara) および 200 bp DNA Ladder (Takara) を 1%

アガロースゲルに供した. つぎに, pFGKII426-EZZ の構築を確認するために, pFGKII426-EZZ の塩基配列は, DNA シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を用いて解読した. シーケンス用の PCR 反応の溶液組成は, 添付の説明書に記載の方法に従った. PCR 反応溶液から PCR 産物の精製は, BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) を用い, 添付の説明書に記載の方法に従った.

2.4 免疫蛍光染色による ZZ ドメイン発現の解析

Scerevisiae BY4741 株は, Yeast Transformation Kit (G-Biosciences) を用いて, pFGKII426-EZZ および pFGKII426 で形質転換し, 形質転換体である BY4741/pFGKII426-EZZ および BY4741/pFGKII426 (ネガティブコントロールとして使用) を得た. これらの種培養は, SD-U 寒天プレート培地上に生育した BY4741/pFGKII426-EZZ および BY4741/pFGKII426 のシングルコロニーを 5 ml の SD-U 液体培地にそれぞれ植菌し, 振とう培養 (30°C, 150 rpm, 24 h) した. 本培養は, 初期 O.D.₆₀₀ = 0.03 になるように種培養液を 50 ml の SDC-U 液体培地に植菌し, 振とう培養 (30°C, 150 rpm, 48 h) した. 48 h 培養後に, 菌体は 500 μ l の本培養液から遠心分離 (5,000 rpm, 3 min) によって集菌し, この菌体に対して 1 ml の PBS を用いて洗浄および集菌 (5,000 rpm, 3 min) の操作を 3 回繰り返した. 得られた菌体は, 100 μ l の PBS で懸濁し, 新しい 1.5 ml チューブに移した. この菌体懸濁液は, 終濃度 10 μ g/ml となるように 1 mg/ml の Anti-protein A antibodies chicken-poly labeled with FITC (Immunosystem AB) (励起波長: 490 nm) を 1 μ l 加えた後, アルミホイルで遮光して反応 (室温, 1 h) した. この菌体溶液に対して 1 ml の PBS を用いて洗浄および集菌 (3,000 rpm, 5 min) の操作を 3 回繰り返した. 集菌した菌体は, 100 μ l の PBS で懸濁し, 新しい 1.5 ml チューブに移した. スライドガラス上にこの 50 μ l の菌体懸濁液を滴下し, その液滴上にさらに 50 μ l の PBS を滴下した. 酵母細胞の微分干渉画像および蛍光画像は, 蛍光顕微鏡 (OLYMPUS IX81, 蛍光波長: 525 nm) (400 倍) を用いて撮影した.

3. 結果と考察

pGEM-EZZ が有する EZZ 遺伝子配列を鋳型として PCR 法を用いて, SalI 部位および AvrII 部位を付加した PCR 産物

(386 bp) を得た。この PCR 産物は SalI および AvrII によって制限酵素消化し、インサート DNA (372 bp) として用いた。このインサート DNA (372 bp) を同じ制限酵素で消化した pFGKII426 (9,117 bp) にライゲーションした。ライゲーション産物でコンピテントセル E.coli DH5 α 株を形質転換し、形質転換体を得た。8 コロニーの形質転換体から抽出した 8 個の pFGKII426-EZZ を制限酵素消化し、アガロースゲル電気泳動に供した結果、すべての pFGKII426-EZZ において目的の大きさの DNA 断片 (372 bp および 9,117 bp) を確認した (図 2)。この pFGKII426-EZZ の塩基配列は DNA シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) を用いて解読した結果、目的の pFGKII426-EZZ の構築を確認した (図 3)。

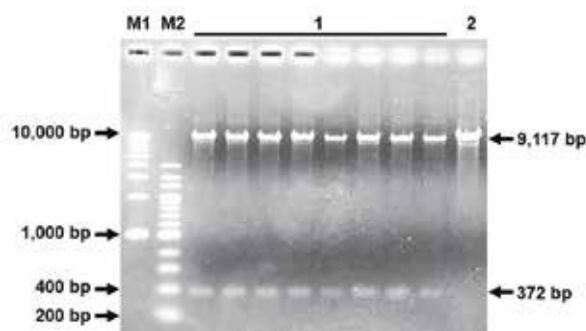


図 2 pFGKII426-EZZ の制限酵素消化。制限酵素消化した pFGKII426-EZZ (1), 制限酵素消化していない pFGKII426-EZZ (2), 1 kb DNA Ladder (M1), 200 bp DNA Ladder (M2)。

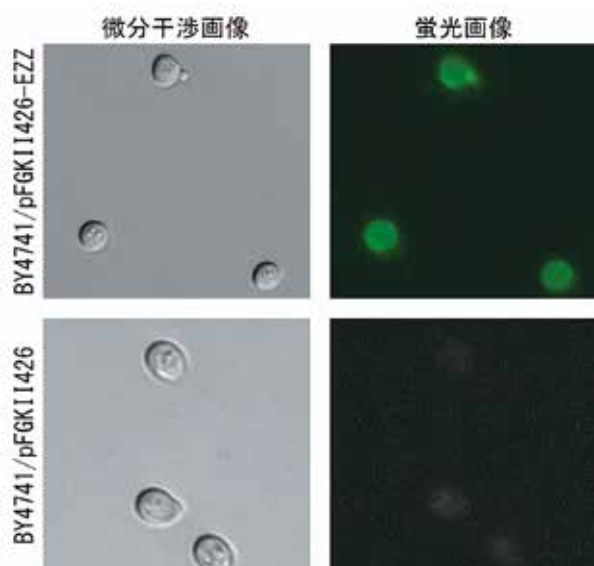


図 4 酵母細胞の微分干渉画像および蛍光画像

さらに、免疫蛍光染色によって酵母細胞表層に発現提示した ZZ ドメインを解析した。FITC 蛍光標識した BY4741/

pFGKII426-EZZ および BY4741/pFGKII426 (ネガティブコントロール) の微分干渉画像および蛍光画像を顕微鏡下で観察した。この結果、ネガティブコントロールである BY4741/pFGKII426 は、ZZ ドメインの発現がないために、蛍光を示さなかった。一方、BY4741/pFGKII426-EZZ は強い蛍光を示した (図 4)。この結果は、BY4741 株に導入した pFGKII426-EZZ ベクターの *PGKI* プロモーターによって、期待したように、ZZ ドメインが酵母細胞表層に発現提示できたことを示している。本菌株の培養過程において、ZZ ドメインの発現を誘導するための操作は行っていない。このため、ZZ ドメインは構成発現型 *PGKI* プロモーターによって構成的に酵母細胞表層に発現提示することが確認できた。

4. 謝辞

本研究を進めるにあたり、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 近藤 昭彦 教授および石井 純 准教授、神戸大学大学院工学研究科 荻野 千秋 教授には懇切な御指導と御助言を賜りました。ここに深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) A. Kondo and M. Ueda, Appl. Microbiol. Biotechnol., 64 (2004) 28-40.
- 2) J. Ishii, F. Okazaki, A. C. Djohan, K. Hara, N. Asai-Nakashima, H. Teramura, A. Andriani, M. Tominaga, S. Wakai, P. Kahar, Yopi, B. Prasetya, C. Ogino and A. Kondo, Biotechnol Biofuels, 9 (2016) 188.
- 3) M. Kaishima, J. Ishii, T. Matsuno, N. Fukuda and A. Kondo, Scientific Reports, 6 (2016) 35932.
- 4) S. T. Henriques, L. Thorstholm, Y. Huang, J. A. Getz, P. S. Daugherty and D. J. Craik, PLoS ONE, 8 (2013) e80474.
- 5) K. Kuroda and M. Ueda, Biotechnol. Lett., 33 (2011) 1-9.
- 6) K. Matsui, K. Kuroda and M. Ueda, Appl. Microbiol. Biotechnol., 82 (2009) 105-113.
- 7) H. Suzuki, J. Ishii, A. Kondo and K. Yoshida, Biotechnol. Lett., 37 (2015) 429-435.
- 8) T. Tanaka, S. Masunari, J. Ishii, K. Wakamura, M. Segawa, H. Fukuda and A. Kondo, J. Biotechnol., 145 (2010) 79-83.
- 9) J. Ishii, K. Izawa, S. Matsumura, K. Wakamura, T. Tanino, T. Tanaka, C. Ogino, H. Fukuda and A. Kondo, J. Biochem., 145 (2009) 701-708.

CCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGCGGAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGAAAGATGCCGATTTGGGCGCG
 AATCCTTTATTTGGCTTCACCTCATACTATTATCAGGGCCAGAAAAGGAAGTGTTCCTCCTTCTTGAATTGATGTTACCTCATAAAGCACGTGGCCTTTATCGAGAAAGAAAT
 TACCGTCGCTCGTGATTTGTTGCAAAAAGAACAAACTGAAAAACCCAGACACGCTCGACTTCCTGTCTTCTATTGATTGCAGCTTCCAATTCGTACACAACAAGGTCCTAGCGA
 CGGCTCACAGGTTTTGTAACAAGCAATCGAAGGTTCTGGAATGGCGGGAAGGGTTTAGTACCACATGCTATGATGCCCACTGTGATCTCCAGAGCAAAGTTCGTTGATCGTACTGTTA
 CTCTCTCTCTTTCAACAGAATTGTCCGAATCGTGTGACAACAACAGCCTGTTCTCACACACTCTTTCTTCTAACCAAGGGGGTGGTTTAGTTAGTAGAACCTCGTGAACTTACATT
 TACATATATATAAACTTGCATAAATTGGTCAATGCAAGAAATACATATTTGGTCTTTCTAATTCGTAGTTTTTCAAGTTCTTAGATGCTTTCTTTTCTCTTTTACAGATCATCAAG
 GAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACGCTAGCATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTGCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACA
 GAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGTTACTTAGATTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATA
 AATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTTTGGATAAAAGAGACGTGACGCGCAACACGATGAAGCCGTAGACAACAAATTCACAAAGAACAACAAACGCG
 TTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAGATGACCCAAGCCAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAAT
 GATGCTCAGGCGCGGAAAGTAGACAACAAATTCACAAAGAACAACAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTA
 AAAGATGACCCAAGCCAAGCGCTAACCTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCGGAAACCTAGGGACTACAAGGATGACGATGACAAGGAATTCGGATCCGCATGC
 TTAATTAATATCTAGCAATGGAACCTCTGTGATTTCTTCTCAGTAATTTCTTCTCAGTCACTTCTTCTATTCACTTCTTCTCCAGTCATTTCTTCTCAGTCATTTCTTCTTCT
 ACAACAACCTCCACTTCTATATTTCTGAATCATCTAATCATCCGTCATTCCAACAGTAGTCCACCTCTGGTCTTCTGAGAGCGAAACGAGTTCAGCTGGTCTGTCTCTTCTTCC
 TCTTTATCTCTTCTGAATCATCAAAATCTCTACATATTTCTTCTCATCATTACCACTTGTTACCAGTGCACAACAAGCCAGGAAACTGCTTCTTATTACCACTGCTACCACTACA
 AAAACGAGCGAACAACCACTTTGGTTACCGTGACATCCTGCGAGTCTCATGTGTGCACTGAATCCATCTCCCTGCGATTGTTTCCACAGCTACTGTTACTGTTAGCGGCGTCACAACA
 GAGTATACCACATGGTGCCCTATTTCTACTACAGAGACAACAAGCAAACCAAGGGACAACAGAGCAAACACAGAAACAACAAACCAACCGGTAGTTACAATTTCTTCTTGTGAA
 TCTGACGTATGCTAAGACTGCTTCTCCAGCCATTGTATCTACAAGCACTGCTACTATTAACGGCGTTACTACAGAATACACAACATGGTGTCTATTTCCACCACAGAAATCGAGGCAA
 CAAACAACGCTAGTTACTGTTACTTCTGCGAATCTGGTGTGTGTTCCGAAACTGCTTCACCTGCCATTGTTTCGACGGCCACGGCTACTGTGAATGATGTTGTACGGTCTATCTCTACA
 TGGAGGCCACAGACTGCGAATGAAGAGTCTGTCAGCTCTAAATGAACAGTGTACCGGTGAGACAACAACCAATACTTTAGCTGCTGAAACGACTACCAATACTGTAGCTGCTGAGACG
 ATTACCAATACTGGAGCTGCTGAGACGAAAACAGTAGTCACCTCTTCGCTTCAAGATCTAATCACGCTGAAACACAGACGGCTTCGCGACCGGATGTGATTGGTCACAGCAGTAGTGT
 GTTCTGTATCCGAAACTGGCAACCAAGAGTCTAACAAGTCCGGGTTGAGTACTATGTCGCAACAGCCTCGTAGCACACCAGCAAGCAGCATGGTAGGATATAGTACAGCTTCTTTA
 GAAATTTCAACGTATGCTGGCAGTGCCAACAGCTTACTGGCCGGTAGTGGTTAAGTGTCTTCATTGCGTCTTATTGCTGGCAATTATTTAAGGATCTGAAATAAATTGAATTGAATTG
 AAATCGATAGATCAATTTTTTCTTTCTTTTCCCATCTTTACGCTAAAATAATAGTTATTTTATTTTGAATTTTTTATTTATATACGTATATAGACTATTATTATCTT
 TTAATGATTATTAAGATTTTTATTAATAAAAAAATTCGCTCCTCTTTAATGCCTTTATGCAGTTTTTTTTCCATTGATTTCTATGTTGCGGTTGAGCGTATTTAAGTTTAATAA
 CTCGAAAATTCTGCGTTCGTTAAAGCTGCGGCGGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGGTAAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGT

図 3 pFGKII426-EZZ ベクターの部分塩基配列

福井平野西縁断層の確実性 — 福井地震から 70 年 —

岡本 拓夫*

Reliability of the Active Fault at the Western Margin of the Fukui Plain — 70 years after the Fukui Earthquake —

Takuo OKAMOTO

A large earthquake, called the Fukui Earthquake with M7.1, occurred on June 28, 1948. The earthquake fault was buried under the thick accumulation of the Fukui Plain. The position of the earthquake fault was not clear because of the thick accumulation. On the western side, there was a clear dislocation between the mountain and plain exits. We will study the structure around the western margin of the Fukui Plain by using the waveform data recorded at the temporal station at the high school and a new station at the elementary school. We concluded that this dislocation is an active fault.

Key Words : Seismicity, Active fault, Edge effect, Earthquake fault, Fukui Earthquake

1. はじめに

福井平野における地震観測の必要性和観測点の紹介を、報告書¹⁾(岡本, 2017)で詳細に行った。その後、藤島高校のSSHのプログラムで解析が継続的になされ、結果が日本地球惑星科学連合の連合大会高校部門で継続的に発表されている。特に注視される結果としては、福井平野内において福井平野東縁断層(以下東縁断層と表記)帯内の観測波形が、アジムサルに変化するS波コードの特有なフェーズを描くことである²⁾。彼らは、東縁断層帯が大きな断層破碎帯構造でトラップされた波だ、と考え説明している(詳細に議論していく必要はあるが)。さらに、西縁部にも強震帯の存在が指摘されている³⁾(岡本, 2016)。これらは、西縁部にも断層構造が存在し、南部に存在する鯖江断層と関連する可能性も考えられることを示している。岡本(2017)¹⁾は、河合小学校で、高感度地震観測を開始することが可能であると結論し、観測を開始した。結果、西縁部が断層構造でなければ発現されることのない後続波が観測されたことを示した。その後の藤島高校の生徒達によるSSHの継続研究(岡本の指導)によって、

断層のエッジ効果による波形の可能性が高いことが指摘された。さらに、重力の研究(野口他, 2011)⁴⁾において、同地域に基盤構造の深い落ち込みが指摘されており、また、断層構造の存在を支持する結果となっている。断層構造が存在することは、当該断層の活動だけではなく地震動の増幅にも関与する事となり、当地域の地震防災を考察する上で重要なファクターになる。福井平野の高校や小学校に地震計を置く

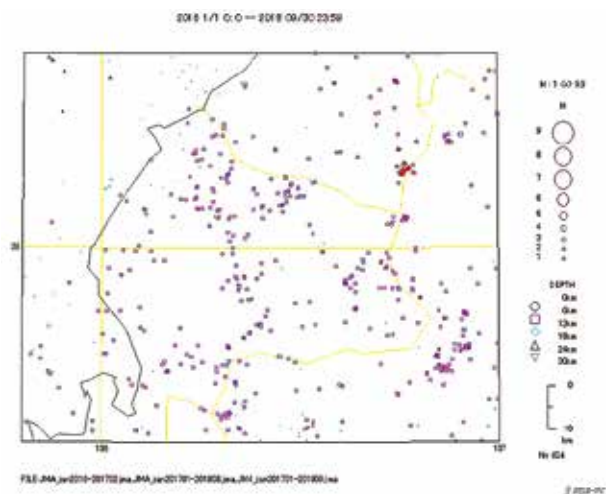


Fig.1 Hypocenter map at Reihoku area by SEIS PC.

*一般科目教室(自然科学系)

ことは、小学校に幼稚園も併設されているので、高校生以下における理科教育や防災教育においても、貢献できると考えている。学校は地域の広域避難所にも指定されているので、地域の防災力向上にも役立つはずである。以下、詳細について報告する。

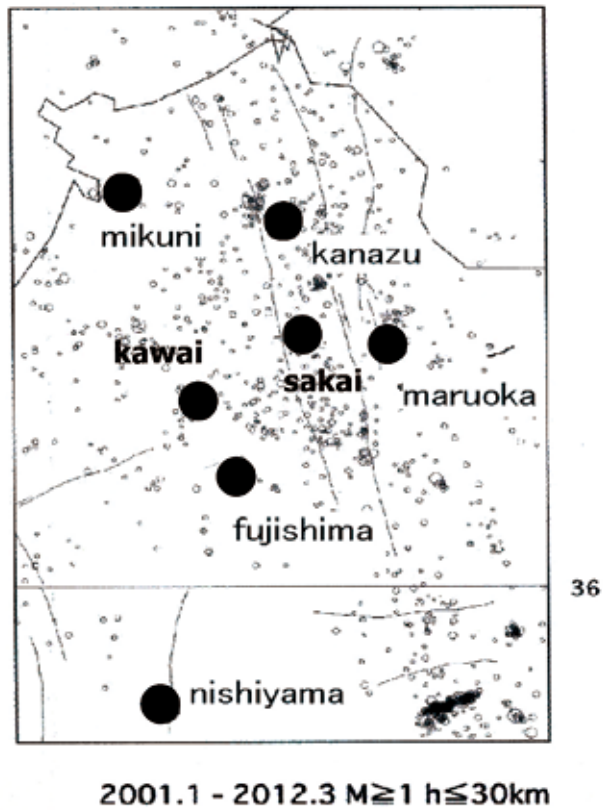


Fig.2

Fig.2 Distribution of temporal station in Fukui Plain.

2. 最新の震源と観測点の位置関係



Fig.3 Observation system view at Kawai elementary school.

最新の気象庁による震源を、Fig.1に示す。越前岬東部に認められる低地震活動域（空白域）が、鯖江市付近になる。京大北陸観の震央図（少し以前）の上に各観測点の位置を示したものが、Fig.2である。福井平野東縁断層帯（福井地震の原因となった福井地断層も含む）、西縁部、鯖江断層を意識した配置になっている。特に、金津高校・坂井高校・丸岡高校は福井平野東縁断層帯を、河合小学校（Fig.3）は西縁を、西山動物園は鯖江断層を意識して配置された。

3. 観測システムと解析

福井平野は厚い堆積層に覆われ、人口も多く、工場等も隣接している。本来なら、地震観測に適さない地域である。観測が可能な理由や、観測点の配置の詳細については、岡本（2017）¹⁾で、全観測点について、まとめてふれられている。また、解析方法についても、岡本（2016）³⁾や岡本（2017）¹⁾で、詳細に報告がなされている。

4. 重力解析

他の観点として、西縁部の地形の特性を議論している研究の結果を、紹介する。野口他（2011）⁴⁾は、微動の解析結果を利用した重力のデータの解析により、福井平野の基盤構造を推定している。Fig.4に、野口他による坂井平野区下の推定構造を示す。特に顕著な事は、西縁部に認められる基盤構造の落ち込みである。似たような構造としては、鳥取県西部域の弓ヶ浜半島で認められた構造である⁵⁾（Okamoto et al., 2004）。このことから、西縁部は典型的な断層構造である、と理解することができる。

5. 考察

これまでに得られた結果について考察する。西山動物園の波形については、福井高専の地球物理学研究会や電子情報工学科の卒業研究として解析され、結果として、鯖江断層の活動度の高さが報告されている。藤島高校、金津高校、丸岡高校、三国高校、坂井高校、河合小学校については、Hi-netの永平寺観測点の波形と比較し、地震と判断できる

波形を Win system に upload し、震源決定が行われている。また、波形解析による結果の一例として、2016 年度の地球惑星科学関連合大会の高校生のセッションで、「福井地震断層の探究Ⅳ」（福井県立藤島高校）⁶⁾によって、特徴的に、福井平野東縁断層帯内にあると考えられる金津高校・坂井高校に関して、水平動 2 成分の S 波の到着時間差が一定近く（同じ振動方向）になる現象を捉えることができたことが、報告されている。振動方向によって波（横波）の伝播速度が異なる現象は偏向異方性と言われ、極性を持つ媒質を伝わる時に認められる現象である。金津高校・坂井高校において特に顕著に認められた結果は、金津高校・坂井高校の直下に S 波速度の極性の大きい構造・物性が存在している事を意味し、福井地震断層の断層構造に起因する現象である可能性を示している事になる。この事は、福井平野東縁断層帯、特に福井地震断層（西側断層）の繰り返しの活動を示す結果でもあると考えられ、東縁断層帯全体が断層破碎帯の可能性もあることが分かった。また、河合小学校の観測波形については、S 波のコーダ部に大きな揺れを示す波形が得られたことが、2017 年度の地球惑星科学関連合大会の高校生のセッションで、「福井地震断層の探究Ⅴ」（福井県立藤島高校）²⁾として発表（波形中の黒矢印）された（Fig.5）。兵庫県南部地震（1995, M7.3）で認められた震災の帯や鳥取県西部地震（2000, M7.3）で認められた境港市の震度異常の成因と同じく、既存断層によるエッジ効果である可能性が、強く指示された。まだ数個の地震の解析結果であるので、将来、波形例を増やし理論波形と比較するなどの方法を用いて、詳細に議論していく予定である。

6. 結論

一つは、鯖江断層が活動的な断層であることが明らかにされた。次に、福井平野東縁断層帯が、金津高校・坂井高校の観測波形より、繰り返して活動している可能性を指摘する事ができた。このことは、東縁断層帯全体が断層破碎帯である可能性を示していると考えられる。更に、余震活動の詳細な把握により、福井平野東縁断層帯内の主部と西側断層の関係を明らかにできる可能性を示せた。西縁部については、河合小学校の波形が、西縁断層の存在の可能性を

示すエッジ効果に伴う S 波や典型的な S コーダ波形を含むことが分かった。重力の結果等を含めて最終的に、福井平野の坂井平野区西縁は、活断層であると結論づけられた。さらに、西縁部の断層はその走向により、鯖江断層との関わりが危惧されるので、さらなる詳細な解析が、将来の重要な課題になると認識している。

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、福井地方気象台（磯部英彦台長）、石川有三博士（防災科研）及び京大防災研北陸観測所（西上欽也所長）より、震源情報を頂きました。地震観測では、飯尾能久教授（京大防災研）、鯖江市西山動物園（金田飼育員）、藤島高校（前田先生）、金津高校（坂東先生）、丸岡高校（鈴木先生）、三国高校（斉川校長先生）、坂井高校（高橋教頭先生）、河合小学校（前川校長先生）にご対応を頂きました。解析では、藤島高校 SSH プログラムの生徒諸君、谷口先生（武生高校）、岩堀博士（京大防災研）、電子情報の野村先生と卒研究生（田邊君、河野君、三澤君、宮本君、巢守君）、福井高専地球物理学研究会の諸氏に協力を頂いています。以上の方々に記して感謝致します。なお、費用の一部は JST の SSH プログラムを使用しています。

参考文献

- 1) 岡本拓夫、福井平野区における地震観測Ⅱ－河合小学校観測点の増設－、福井工業高等専門学校研究紀要、自然科学・工学、第 51 号、pp.23-27、(2017)。
- 2) 藤島高校 SSH 研究発表、福井地震断層の探求Ⅴ、(2017)。
- 3) 岡本拓夫、福井平野西縁部と鯖江断層、福井工業高等専門学校研究紀要、自然科学・工学、第 50、pp.59-62、(2016)。
- 4) 野口竜也・中谷英史・香川敬生・安井譲・小嶋啓介、重力データに基づく福井平野及び鯖江盆地の 3 次元基盤構造の推定、第 31 回土木学会地震工学研究発表会講演論文集、(2011)。
- 5) Takuo OKAMOTO・Tatsuya NOGUCHI・Ryohei NISHIDA, On The Study For Abnormal Intensities At The Sakaiminato City Recognized On The Tottori-ken Seibu Earthquake (2000, M7.3 JMA), 13th WCEE in Vancouver, paper ID 2762, (2004)。
- 6) 藤島高校 SSH 研究発表、福井地震断層の探究Ⅳ、(2016)。

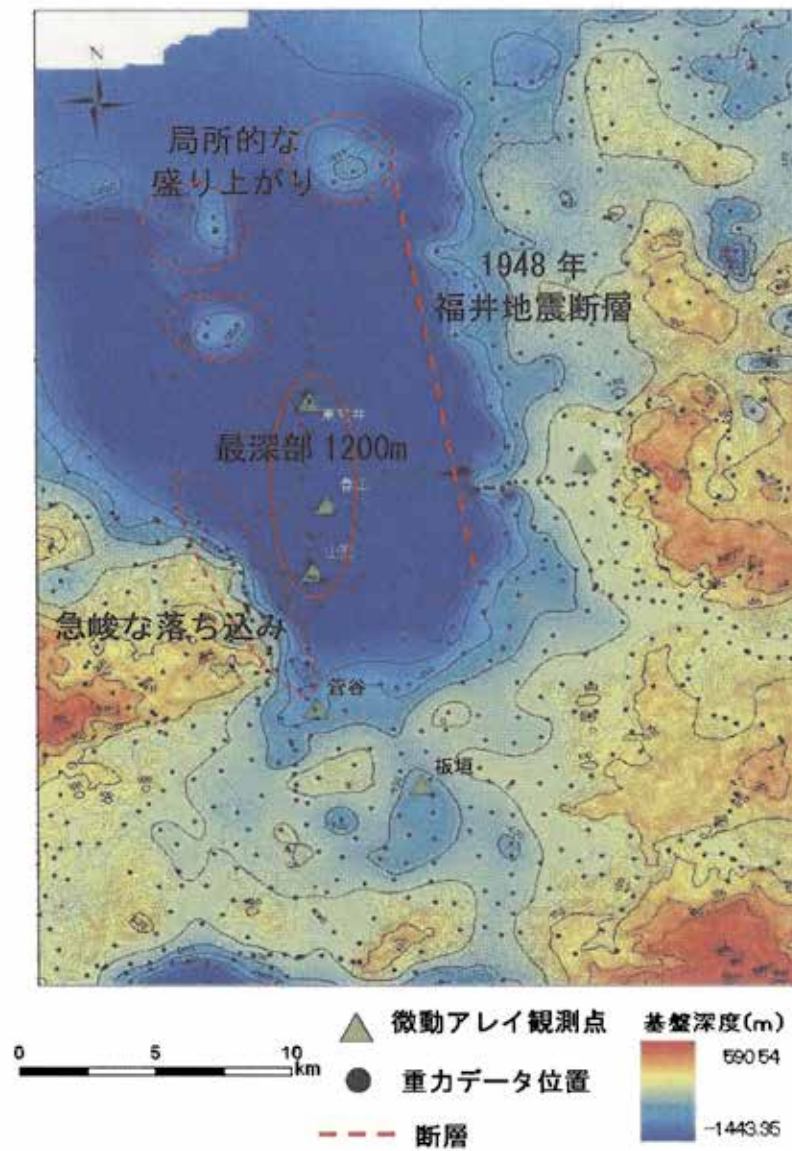


Fig.4 Under Ground Structure at Sakai Plain estimated by Nopguchi et al.. (2011).

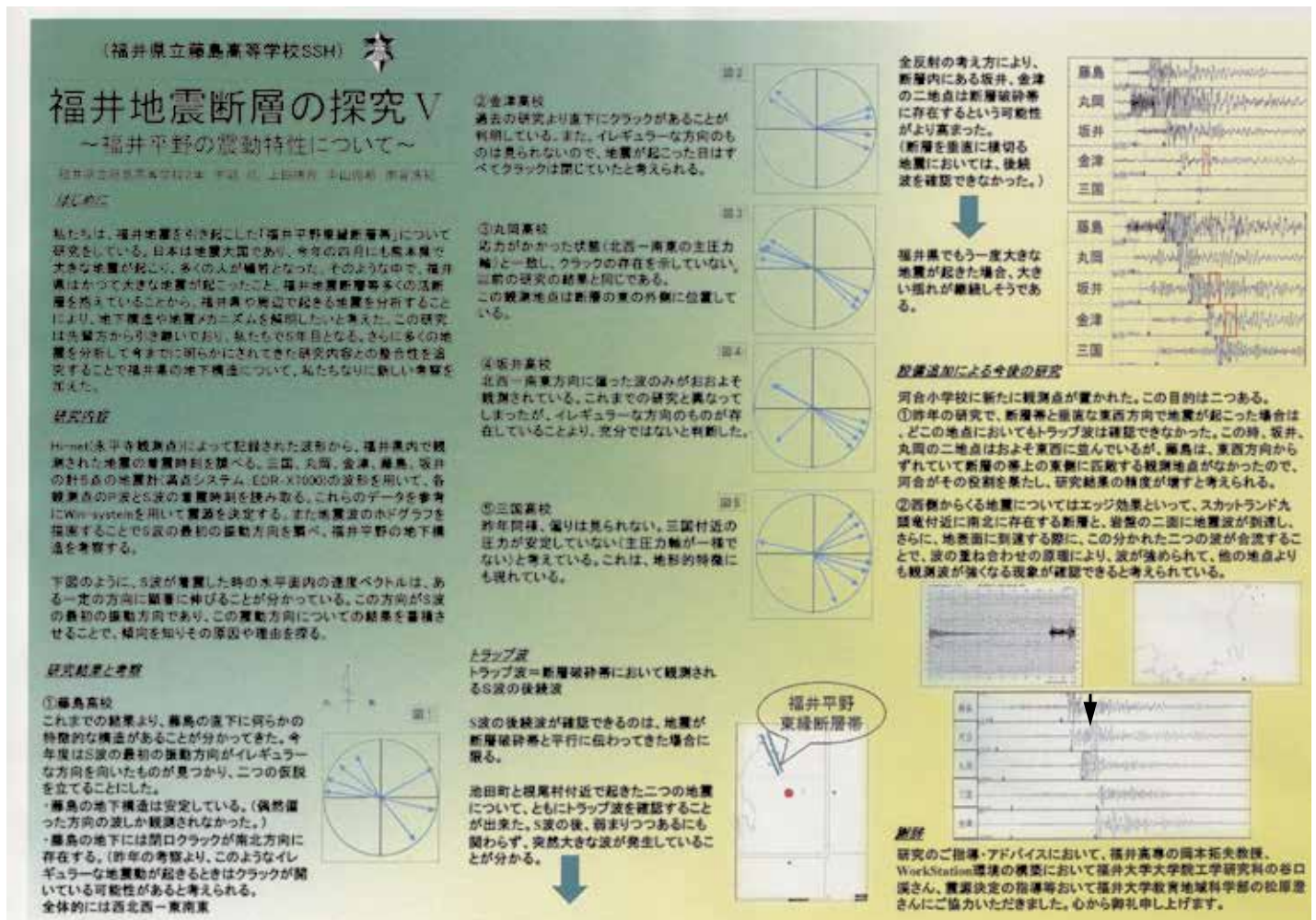


Fig.5 Presentation of Fujishima High School at Geoscience Union in 2017 Makuhari.

幼児における投速度調節テストの信頼性及び性差

青木 宏樹* 出村 慎一** 当麻 成人***

Reliability and gender difference of a ball velocity regulation test for preschool children

Hiroki AOKI, Shin-ichi DEMURA and Narihito TAIMA

A remarkable decrease in children's throwing ability has been reported; however, until now, the ability has mainly been assessed by distance. Nevertheless, easily measuring throwing velocity has become possible recently, and a ball velocity regulation test for preschool children has been developed but not fully tested. Therefore, this study examined the reliability and gender difference of a newly developed ball velocity regulation test for preschool children. Participants were 6-year-old boys (68) and girls (41). After they threw once with maximum effort at maximal velocity, they were requested to throw twice at 50% (demand velocity) of maximal velocity; their throw velocity (exertion velocity) was measured. Mean error ($[(\text{demand velocity} - \text{exertion velocity}) \times 100 / \text{maximal velocity}]$) between the two trials' demand velocity and exertion velocity was used as an evaluation variable. Reliability (intra-class correlation coefficient) of demand velocity was over 0.66 for both boys and girls. No gender difference was found in the evaluation variable. Results demonstrated that this ball velocity regulation test has high reliability, and there is no gender difference in 6-year-olds.

Key Words : throwing ability, ball velocity, preschool children

1. 緒言

近年の子ども達の体力の低下は深刻であり、特に「投げる」能力の低下が著しいことが問題視されている¹⁾。文部科学省の調査報告²⁾によると、2013年度の小学生の遠投距離は1964年度の小学生の遠投距離に比べて劣り、特に男子でその傾向が顕著である。投運動はヒトの基本的な運動の一つであり、投能力の低下はボールを扱う野球やドッジボールのみならず他の球技スポーツにも影響を及ぼすことが考えられる³⁾。

子どもの投能力を評価するために、これまで遠投距離の測定が利用されてきた^{4) 5) 6)}。ボールの正確投(的当て)の測定も、主に幼児を対象に実施されてきた⁷⁾。一方、投能力には、遠投能力や正確投能力だけでなく、速く投げる

(以下、速投)、力を調整して投げる(以下、調整投)等の能力も含まれる。速投能力や調整投能力は、特別な測定器具が必要であるため、これまで教育現場では測定が困難であった。しかし、近年、安価な器具の開発に伴い投速度も測定が可能になった。幼児期は調整能力が著しく発達する時期であり、前述の投能力の構成要因の中では速さを調整(コントロール)して投げる能力の評価も重要であるが、これまで、幼児の投速度の制御(調節)能力についてはほとんど検討されていない。新規テストの作成の場合、テストの信頼性が高いことが不可欠の条件であり、特に幼児の場合、テストの信頼性は重要である。遠投に関しては、これまでテストの信頼性が検討され⁶⁾、性差が認められることが数多く報告されている^{4) 6) 8)}。投速度調節テストにも性差がみられる可能性がある。

*一般科目教室(自然科学系) **金沢大学 ***大阪薬科大学

本研究の目的は、6歳児を対象に50%投速度調節テストの信頼性及びテストの性差を検討することであった。

2. 方法

2・1 被験者

被験者は健康な6歳の男児68名(身長 110.3 ± 4.8 cm, 体重 18.7 ± 2.3 kg)及び女児41名(身長 109.2 ± 4.4 cm, 体重 17.9 ± 2.1 kg)であった。幼児及び幼稚園の園長には、事前に実験の趣旨、方法、実験の危険性を十分に説明し参加の同意を得た。金沢大学人間科学系ヒトを対象とする研究倫理委員会(2012-05)による承認を得ている。

2・2 測定方法

被験者には前方5mに設置された野球用のティーネットの中心に向かって、オーバーハンドスローにより最大速度で1回投球させ、その時の投速度をティーネット後方からスピードガンにより測定した。その後、「今の投げた速さの半分の速さ(50%:要求速度)で投げてください」と指示し、2回投球(発揮速度)させた。次式により算出された誤差を、投速度調整誤差と定義し、2試行の平均値を評価変数とした。

投速度調整誤差 = ((要求速度 - 発揮速度) / 最高速度) × 100

2・3 解析方法

測定値の試行間信頼性を検討するために、級内相関係数(ICC: Intraclass Correlation Coefficient)を算出した。最高速度、要求速度、発揮速度、及び誤差の平均値の性差は、最高速度、要求速度及び発揮速度に分散の同質性認められなかったため、Welch法より検討した。本研究における有意水準は5%とした。

3. 結果

男女児の最高速度は、それぞれ 35.0 ± 6.8 km/hと 29.1 ± 4.5 km/hで、男児の方が有意に速かった(t-value=5.39, $p<0.05$)。

表1は、発揮速度、誤差の基礎統計値及びICCを示している。ICCは、0.66～0.86であった。

表1. 発揮速度及び誤差の基礎統計値及びICC

	発揮速度(km/h)					誤差(%)				
	1試行目		2試行目		ICC	1試行目		2試行目		ICC
	Mean	SD	Mean	SD		Mean	SD	Mean	SD	
男児	22.6	6.4	22.4	5.8	0.86	-14.6	12.3	-14.2	11.2	0.85
女児	18.8	2.7	19.0	3.7	0.66	-15.8	13.5	-16.5	15.5	0.83

表2は、要求速度、発揮速度及び誤差の性差の検定結果を示している。要求速度及び発揮速度は男児が女児よりも有意に速かったが、誤差は両者の間に有意な差は認められなかった。

表2. 要求速度、発揮速度及び誤差の性差

	男児		女児		t-value
	Mean	SD	Mean	SD	
要求速度(km/h)	17.5	3.4	14.6	2.3	5.39*
発揮速度(km/h)	22.5	5.9	18.9	2.8	4.39*
誤差(%)	-14.4	11.0	-16.1	13.4	0.71

* $p<0.05$

4. 考察

要求速度(最高速度の50%)及び発揮速度ともに男児が女児よりも速かった。これまでに、数多くの報告で幼児の遠投距離は男児が女児よりも優れることが明らかにされている^{4) 6) 8)}。出村⁶⁾は、幼児の遠投距離の性差や発達差の要因として、まず投げる動作、次に筋パワーを主とした体力要因の差異をあげている。宮丸⁹⁾の報告によると、男児の殆どが野球のピッチングのワインドアップモーションを7歳で獲得している。男児は女児に比べて筋パワーを効率よくボールに伝える投技術を習得しており、要求速度及び発揮速度ともに男児は女児よりも速かったと考えられる。

桑原ら¹⁰⁾の信頼性の基準に従うと、本研究における投速度調節誤差の信頼性は高いと判断される。出村⁶⁾の報告によると、幼児の遠投距離は、ゴルフボール、ソフトボール及びテニスボール(硬式、軟式)とともに、信頼性係数は0.8以上であった。青木ら¹¹⁾は、小学校低学年児童のテニスボールの遠投距離のICCは0.8以上であったと報告して

いる。幼児期には、投能力は男女児とも加齢に伴い発達するが、男児は女児に比べて投能力に優れると考えられる。本研究の被験者は6歳の幼児であり、男女児ともに安定した投球をすることができたため評価変数（誤差）の試行間信頼性は非常に高かった（ICC>0.83）と考えられる。

一方、投速度調節誤差は男女間で有意差が認められなかった。関¹²⁾の報告によると、要求レベルの異なる最大跳躍距離の25%、50%、及び75%を目標距離とするねらい跳びにおいて、目標距離との誤差の平均値（3段階の誤差の平均）は男児では約3%、女児では約4%で、目標距離に対する正確性は男児の方が有意に高かった。また、関は、動作様式に性差が見られないことから、身体活動量の多い男児の方が、日常の遊びの中で、発揮筋力の出力量を調節する学習機会を多く得ていると推測している。力加減や投げる方向をコントロールする能力の指標として利用されているボールの的当てテスト¹³⁾は、幼児を対象とした場合性差がない⁷⁾。村瀬と浅見¹⁴⁾の報告によると、5～6歳において把握時の発揮力量感覚に関する感覚尺度が確立されている。本研究の投速度調節は最大速度の50%の速度としている。5歳児の段階ではほとんどの者は半分という概念を理解している¹²⁾。最大速度の50%の速度はより速い速度やより遅い速度に比べて投球速度を調節しやすいと考えられる。また、6歳児の場合、ボールのコントロール能力や把握感覚に性差はなく、50%の速度調節投にも性差がみられなかったと推察される。

5. まとめ

6歳児における50%投速度調節テストは試行間信頼性が高く、性差が認められない。

参 考 文 献

- 1) 内村美帆・金高宏文（2004）低学年児童における投能力向上に関するトレーニング研究—子どもたちが生き生きとドッチボールに参加する姿を目指して—。スポーツトレーニング科学, 6, 79-86.
- 2) 文部科学省（2014）報道発表平成25年度体力・運動能力調査の結果について,
http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/26/10/

icsFiles/afiedfile/2014/10/14/1352498_01.pdf.

- 3) 青木宏樹, 出村慎一, 内田雄（2017）小学校低学年児童におけるキャッチボール頻度と遠投距離の関係及びその性差. 北陸体育学会紀要, 53, 333-38.
- 4) 金善鷹, 松浦義行（1988）幼児及び児童における基礎運動技能の量的変化と質的变化に関する研究：走, 跳, 投運動を中心に. 体育学研究, 33, 27-38.
- 5) 奥野暢通, 後藤幸弘, 辻野昭（1989）投運動学習の適時期に関する研究—小・中学生のオーバーハンドスローの練習効果から—。スポーツ教育学研究, 9, 23-35.
- 6) 出村慎一（1993）幼児期におけるボール遠投に対する体力及び投動作の貢献度とその性差. 体育学研究, 37, 339-350.
- 7) 加納裕久, 久我アレキサンデル, 玉腰和典, 丸山真司（2016）幼児期における定位能力・分化能力の発達の特性：投・跳動作に着目して. 発育発達研究, 70, 36-47.
- 8) 宮口和義, 出村慎一（2016）石川県における幼児の体格・基礎運動能力についての考察：1985年と2013年との比較. 発育発達研究, 73, 20-28.
- 9) 宮丸凱史（1980）投げの動作の発達. 体育の科学, 30, 464-471.
- 10) 桑原洋一, 斎藤俊弘, 稲垣義明：検者内および検者間のReliability（再現性, 信頼性）の検討. 呼と循, 1993, 41, 945-952.
- 11) 青木宏樹, 出村慎一, 妙願紗紀, 藤谷かおる, 岩田英樹（2013）小学校低学年の遠投距離に及ぼすボール投げ（ZERO 真下投げ）トレーニング効果の検討. 教育医学, 59, 163-167.
- 12) 関智美（2010）立ち幅跳びにおける跳躍距離調節に関する一考察. 奈良佐保短期大悪研究紀要 18, 19-23.
- 13) 梅崎さゆり, 中谷敏昭, 山本大輔, 中須賀巧, 橋元真央（2013）コーディネーション運動が幼児の運動能力に与える効果—投球・捕球能力の量的変化と質的变化—。発育発達研究, 59, 27-40.
- 14) 村瀬智彦, 浅見高明（1993）幼児の把握時の力量弁別特性と力量弁別に基づく測定方法の検討. 体力科学, 201-208.

学生の技術者教育と技術職員研修への民間講習会の活用 －測定器具の使い方を例として－

山田健太郎* 五味 伸之** 藤田 祐介* 北川 浩和*

Utilization of company training program for engineer education and technical support staff training -As an example of how to use measuring instruments-

Kentaro YAMADA, Nobuyuki GOMI, Yusuke FUJITA and Hirokazu KITAGAWA

In this report, we created the engineering education material based on company training program. This teaching material describes the use of calipers and micrometers, is documented the measurement principle to complement the lack of understanding of students. This material included a commentary on how to use and a dedicated test piece, aiming to standardize the teaching method. We used this text for students and technical support staff. And we conducted a questionnaire survey to confirm the effectiveness of the material. It was confirmed that this material had a certain effect on understanding the way of using the instrument efficiently.

Key Words : Mechanical Engineering Education, Company training program, Engineering education material, Caliper, Micrometer

1. はじめに

本校機械工学科における初動的な技術者教育の一つに、寸法測定器具であるノギス、マイクロメータの使用法を含めた知識習得がある。ノギスは、製品の外側・内側・深さ・段差等を一般的に 5/100mm 単位で測定できる器具である。また、マイクロメータはノギスよりも精度が高く、1/100mm 単位で測定できるものである。

これらの測定器具は学生が将来機械エンジニアとして活躍する際のみならず、機械工作実習^{1), 2)}、機械工学実験、卒業研究等の授業においても頻繁に使用するため、それらの正しい使用法を教育指導することは重要である。

しかしながら、学生に対するこれら測定器具に関する具体的な教育方法は、指導者の個人的な知識・経験等に依存するところが多いことに加えて、これら測定器具の特性上、学生は測定値を正しく認識できない。したがって、同

測定器具に対する教育方法を統一するためには、改めて指導者自身が正しい測定技術の確認と新たな知識の習得が重要であると考え、そこで、著者らは民間の測定器具メーカーが主催する“測定器の正しい使用と管理方法”に関する講習会に参加した。一般的な民間の講習会に参加することにより、製品の開発・設計・製造担当者から市販の教科書等に記載されていない貴重な情報を得ることができる。このような情報を含め、改めて確認できた技術・技能を统一的に学生の技術者教育に導入できるかを協議した。さらに、技術教育の融合複合化が求められている現在において、機械系以外の技術職員においてもノギスやマイクロメータを使用する機会が増えることも容易に推察され、前述の講習会で得た知識・技術を他の技術職員にも還元することにより、本校の全体的な教育資質の向上に繋がると考える。

他の高専³⁾も含めた機械工学系の高等教育機関でもノギス、マイクロメータに関する教育は必修化されているが、

*教育研究支援センター

**機械工学科

著者らが知る限り、測定器具メーカーの講習会を同教育に活用している例はない。本報では、測定器具メーカーの講習会で得られた知見・技術情報等を本校機械工学科学生と教育研究支援センター技術職員への技術者教育に活用した事例、およびその効果をアンケートによって評価した報告を行う。

2. 学生の技術者教育への適用

機械工学科1年生で開講している「専門基礎Ⅱ」の後期第1回目の授業においてノギス使用方法を、機械工学科2年生で開講している「機械工作実習Ⅰ」の前期第1回目の授業においてマイクロメータ使用方法の指導を実施した。1,2年生とも学生は40名程度で、4人で1グループとし10グループ程作った。ノギスは1人につき1本、マイクロメータは2人に1台用意した。ノギス、マイクロメータとも90分間1コマの授業で行い、おおまかな講義のスケジュールは講義を30分、その後、実技演習を60分で実施することとした。

2回にわたって実施された民間講習会(1回目は“マイクロメータ・ノギス・テストインジケータ・ダイヤルゲージ等の正しい使用と管理方法”と題した講義が1時間、2回目は“測定工具の基礎知識講座”と題した講義が1時間、実技演習が1時間30分)での内容を踏まえて、機械工学科学生の初動教育のための講義資料およびテストピースを作成した。これによりノギスおよびマイクロメータの教育方法の統一ができたと考える。

マイクロメータの使用法の講義はパワーポイントのスライドを用いて行った。使用した講義資料の一部を図1に示す。同講義資料は民間の測定器具メーカー主催の講習会にて配布された資料⁴⁾、および同講習会で新たに認識した測定技術・知識を参考にして新たに作成したものであり、学生への初動教育ならびに詳細な説明をするのに有効であった。例えば、同講習会でマイクロメータを使用してものを測定する際、目分量ではなくスリーブ基線とシンブル目盛線の重なる量により、 $1/1000\text{mm}$ 単位を読み取れる説明を受けて図1の資料を作成した。

実技演習は“マイクロメータを扱う”、“測定の演習”、“演習の答え合わせ”の順番で行った。演習で間違えた学生には理解できるまで指導した。演習で使用したテストピース

および測定箇所を図2と図3に示す。図2の丸パイプの外径 a と内径 b をノギスの使用方法の授業において測定させ、図3の丸棒の外径 c と長さ d をマイクロメータの使用法の授業において測定させた。

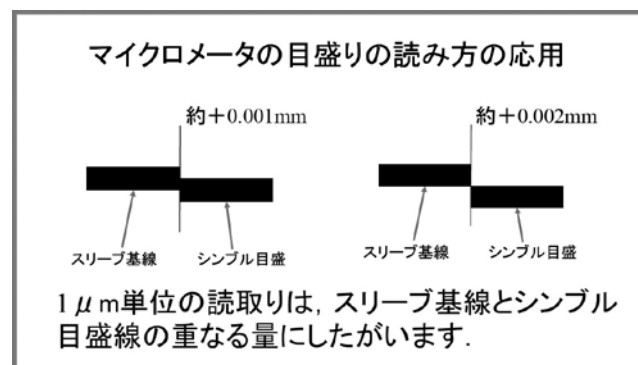


図1 新たに作成した講義資料の一部例

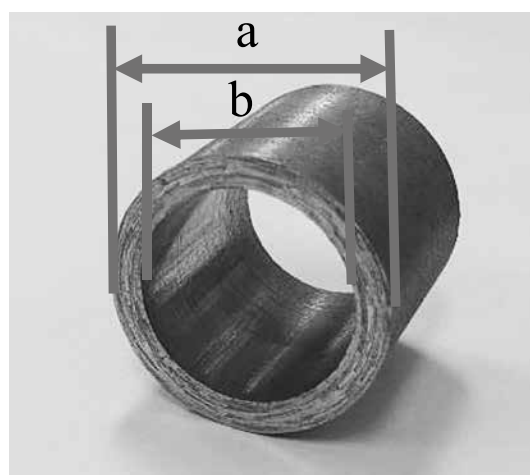


図2 テストピース(丸パイプ)

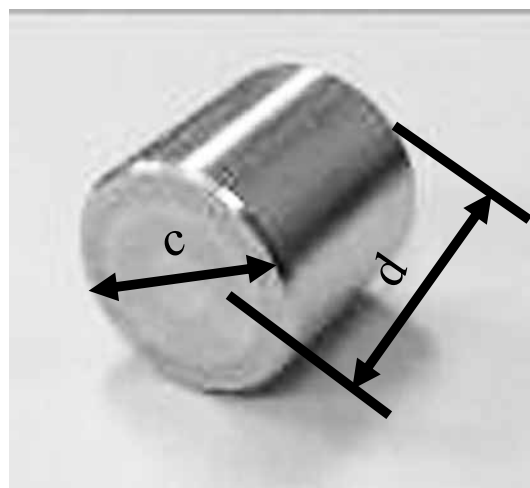


図3 テストピース(丸棒)

3. 技術職員の研修

機械系以外の技術職員にもノギスやマイクロメータの正しい測定技術・知識が必要になると思われたので、教育研究支援センター内で研修会を開催した。機械系以外の技術職員においてはこれらの測定器具は業務上身近なものではなく初心者であることを踏まえ、同研修会で使用した資料とテストピースは第2章で述べたものと同じものとした。ノギスとマイクロメータに関する講義時間はそれぞれ15分と20分とし、さらに実技演習はそれぞれ20分と25分であった。実技演習に際し、ノギスは1人につき1本、マイクロメータは2人につき1台用意し、2人1組で実施した。

さらに参加者が後日、いつでも測定器具の使用方法等の確認ができるようにするため、講義の内容の動画撮影も研修時にあわせて行い、共有サーバーに保存した。図4、5に技術職員研修の様子を示す。



図4 技術職員研修（講義の様子）



図5 技術職員研修（実技演習の様子）

4. アンケート結果

4.1 機械工学科2年生を対象とした第1回アンケート結果

平成30年4月に機械工学科2年生を対象としたノギスとマイクロメータの指導に関するアンケートを行った。アンケートはマイクロメータの使用方法に関する授業後に実施し、機械工学科2年の学生数は42名で、アンケートの回答率は100%であった。

はじめに同学年に対して平成29年10月にノギスの使用方法の授業を実施していたため、6か月の時間の経過を受けてどの程度指示値を正しく読むことができるか確認した。図6に示す指示値に対して、その目盛りを正しく読むことができたかを確認した結果を図7に示す。図7より正しく指示値を読むことができた学生は81%であり、残りの19%は読むことができなかったことが分かった。これより、ノギスの使用方法に関する授業中は、目盛りを正しく読むことができる学生が100%近くいたと思われるが、6か月の時間が経過すると19%の学生がノギスの目盛りの読み方を忘れてしまうことが分かる。

次にマイクロメータの使用方法を指導したことを受けて、“マイクロメータを使えるようになりましたか？”についてのアンケートを実施した。結果を図8に示す。図8より全学生が「できるようになった」、「だいたいできるようになった」と回答していると分かる。そこで、図9に示す指示値に対して、その目盛りを正しく読むことができたかを確認した結果を図10に示す。図10によると2%の学生は正しくマイクロメータの指示値を読むことができないことが分かる。つまり、理解しているつもりが、実際は浅い理解に留まっている学生がいることが分かった。

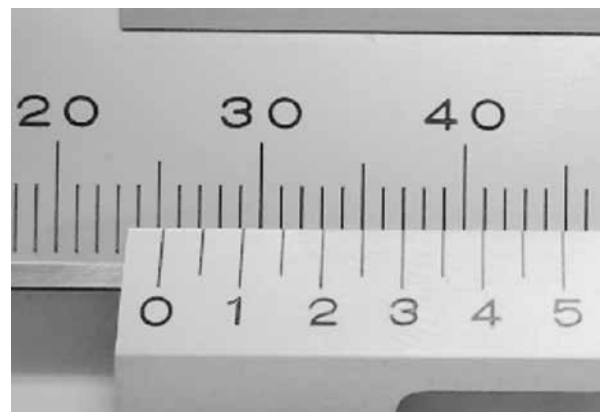


図6 ノギスにおける指示値の問題例

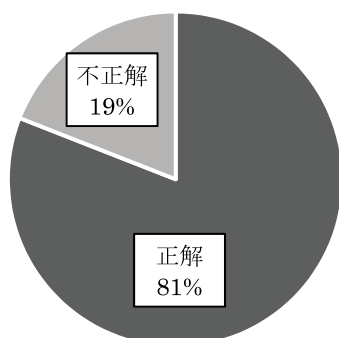


図7 ノギスの読み方の演習結果（6か月経過後）

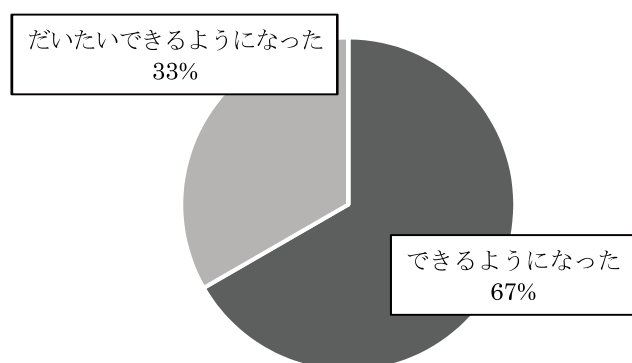


図8 “マイクロメータは使えるようになりましたか？”のアンケート結果



図9 マイクロメータにおける指示値の問題例

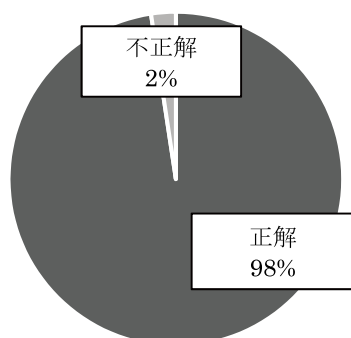


図10 マイクロメータの読み方の演習結果（講義直後）

4.2 機械工学科2年生を対象とした第2回アンケート結果

マイクロメータに関する理解の定着を確認するために、平成30年7月に機械工学科2年生を対象として前節と同一のアンケートを実施した。アンケートの回答率は41/42（=97.6%）であった。“マイクロメータの読み方の演習”についての結果を図11に示す。図11によると、指示値を正しく読むことのできた学生はアンケート回答者の71%に留まり、図10の結果に比べると27%減少し、3か月間で知識が薄らぎ、理解が定着していない学生がいることが分かった。

マイクロメータの読みの不正解者12名に、4月のマイクロメータ使用方法の授業以降に、実習でマイクロメータを使用したかを質問した結果を図12に示す。図12によると不正解者の中で最も多いのが、4月の授業以降一度も使用していない学生で58%である。そして6月に使用した学生

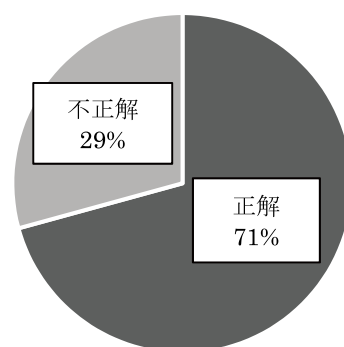


図11 マイクロメータの読み方の演習結果（3か月経過後）

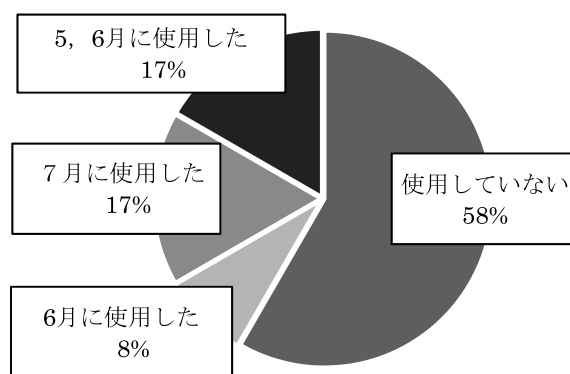


図12 実習でマイクロメータを使用しましたか？マイクロメータ読み方の不正解者（12名）のアンケート結果

が8%, 7月に使用した学生が17%である。5月と6月の両方とも使用したにもかかわらず、不正解となった学生は17%(2名)にも及び、これは注目すべきことであると考え、対策を検討した。測定技術・知識の定着がみられない学生への対策としては、学生が常に確認・閲覧できる場所に同講義資料を配置しておく環境整備が有効であると考えられる。また、この対策を行うことによって理解している学生に対しても、再確認できる環境整備の構築にもなると思われる。

4.3 機械工学科2年生と技術職員のアンケート結果

最後にマイクロメータの指導の分かりやすさを確認するためにアンケートを実施した。平成30年4月に機械工学科2年生を対象としたマイクロメータの指導に関するアンケート結果を図13、平成29年10月に技術職員を対象としたマイクロメータの指導に関するアンケート結果を図14に示す。回答者は機械工学科2年生が42名、技術職員が11名であった。

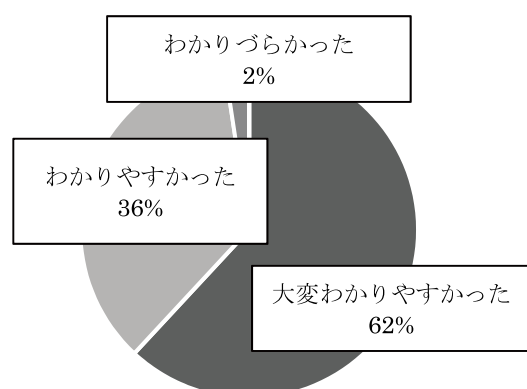


図13 “説明は分かりやすかったですか?”のアンケート結果(機械工学科2年生)

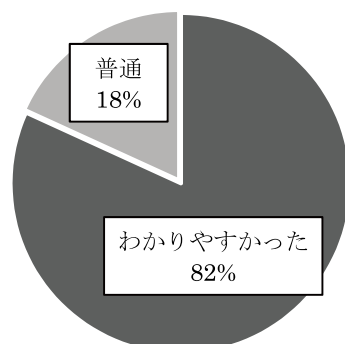


図14 “説明は分かりやすかったですか?”のアンケート結果(技術職員)

図13より「大変わかりやすい」と回答した学生は62%、「わかりやすい」と回答した学生は36%であり、図14より「わかりやすかった」と回答した技術職員は82%であった。この結果より同講義資料およびテストピースは、学生および技術職員への初動教育に対して、“わかりづらい”との意見が学生から多少あったが、一定の効果はあると思われる。

5. おわりに

基本的な測定器具であるノギスとマイクロメータの正しい測定技術・知識に関する定着と普及を図ることを目的に、測定器具メーカーの講習会に参加し、そこで習得したことを活用して独自に講義資料と専用テストピースを作成した。本校機械工学科学生ならびに機械系以外の技術職員を対象にそれらの器具について原理や使用方法を指導した。本報では、それらの事例を紹介するとともにアンケート結果について検討した。

その結果、機械工学科学生および機械系以外の技術職員への指導後のアンケート結果は“わかりやすい”との回答が非常に多かった。このことより著者が作成した講義資料およびテストピースは、初心者立場からも理解を深めるのに有効であると考えられる。しかしながら、同アンケート結果より測定技術・知識の定着がみられない学生も数名いることが明らかになり、その対策として学生が常に閲覧・確認できる場所に同講義資料を配置しておくことが考えられる。

参考文献

- 1) 福井工業高等専門学校 web シラバス 機械工学科 専門基礎Ⅱ, “https://syllabus.kosen-k.go.jp/Pages/PublicSyllabus?school_id=19&department_id=12&subject_id=0002&year=2018”.
- 2) 福井工業高等専門学校 web シラバス 機械工学科 機械工作実習Ⅰ, “https://syllabus.kosen-k.go.jp/Pages/PublicSyllabus?school_id=19&department_id=12&subject_id=0107&year=2017”.
- 3) モデルコアカリキュラム-ガイドライン-, (独) 国立高等専門学校機構, “<http://www.kosen-k.go.jp/procurement/291013->

MCC-guideline.pdf”.

- 4) 株式会社 ミットヨ, “測定工具 ワンポイントチェック”,
Catalog No.12024 (9), “[https://www.mitutoyo.co.jp/
support/service/catalog/07_kogu/12024.pdf](https://www.mitutoyo.co.jp/support/service/catalog/07_kogu/12024.pdf)”.

研究推進委員会

委員長 常 光 幸 美 (物 質 工 学 科)
委 員 安 丸 尚 樹 (機 械 工 学 科)
山 本 幸 男 (電 気 電 子 工 学 科)
荒 川 正 和 (電 気 電 子 工 学 科)
下 條 雅 史 (電 子 情 報 工 学 科)
坂 元 知 里 (物 質 工 学 科)
辻 野 和 彦 (環 境 都 市 工 学 科)
青 木 宏 樹 (一般科目教室(自然科学系))
藤 田 卓 郎 (一般科目教室(人文社会科学系))

福井工業高等専門学校 研究紀要 自然科学・工学 第 52 号

平成 30 年 12 月 25 日 印 刷

平成 30 年 12 月 25 日 発 行

編 集 兼
発 行 者

福 井 工 業 高 等 専 門 学 校

福 井 県 鯖 江 市 下 司 町
T E L (0778) 62-1111 (代)
F A X (0778) 62-2597

印 刷 所

(有)ワープロセンターHOPE

福井県越前市東千福町 21-4
T E L (0778) 24-1146
F A X (0778) 24-2339
