

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23116008

研究課題名(和文)ゲノム配列情報とエピゲノム情報の維持・変異のクロスレギュレーション

研究課題名(英文)Cross-regulation of the maintenance and mutagenesis of genomic sequence and epigenetic information

研究代表者

菅澤 薫(Sugasawa, Kaoru)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授

研究者番号：70202124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 85,820,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレオチド除去修復におけるDNA損傷認識因子の細胞内局在制御に、ヘテロクロマチン様構造の形成が関わっている可能性を見出した。細胞のDNA損傷応答を制御するDNA修復と転写のクロストーク因子として重要なDDB2タンパク質の機能制御に関わるさまざまな翻訳後修飾(ユビキチン化、SUMO化、アセチル化等)の役割を明らかにした。また、自然突然変異の抑制と能動的DNA脱メチル化に関する塩基除去修復酵素チミンDNAグリコシラーゼ(TDG)のタンパク質安定性を制御する分子機構を解明するとともに、TDGが色素性乾皮症C群タンパク質を介してヌクレオチド除去修復機構と機能的に相互作用することを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it is suggested that formation of heterochromatin-like structures is involved in regulation of intracellular localization of DNA damage recognition factors for nucleotide excision repair. We also elucidate novel roles of various post-translational modifications (ubiquitination, SUMOylation, acetylation, etc.) in functional regulation of the DDB2 protein, which is involved in crosstalks between DNA repair and transcription, thereby regulating cellular DNA damage responses. Furthermore, the molecular mechanism is uncovered for regulating stability of thymine DNA glycosylase (TDG), which is a key factor involved in both base excision repair suppressing spontaneous mutagenesis as well as active DNA demethylation. TDG is also shown to interact functionally with the nucleotide excision repair pathway by affecting functions of the xeroderma pigmentosum group C (XPC) protein.

研究分野：細胞生物学

キーワード：遺伝子 エピゲノム 発現制御 DNA損傷修復 変異

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は種々の環境因子に加え、活性酸素や S-アデノシルメチオニン (SAM) などのエネルギー代謝物によって絶えず損傷を受けている。DNA 損傷は突然変異や染色体異常、さらには細胞死を誘導することにより、がんや神経変性、早期老化など、種々の疾患・病態の原因となり得る。このような弊害を未然に防ぐさまざまな DNA 修復機構のなかでも、特に日常的に発生する膨大な数の塩基損傷を処理する塩基除去修復 (BER) やヌクレオチド除去修復 (NER) に関しては、生化学的な分子機構の理解が進んでいた。しかしながら、細胞内において修復反応の開始のために必要とされるクロマチン構造変換の分子機構については未だに不明な点が多く残されていた。

一方、BER や NER のような除去修復反応に伴い、その領域にあらかじめ存在する 5-メチルシトシンを含む短い DNA 鎖の切除、あるいは修飾ヒストンの解離により局所的なエピゲノム情報の攪乱が引き起こされる可能性があり、細胞の遺伝子発現と正常な機能を維持するためには、修復完了後に元のエピゲノム情報を正確に再構築する必要がある。すなわち DNA 損傷とその修復はエピゲノム情報を書き換える ("Rewriting") 機会を与えるものと捉えることができ、ゲノム塩基配列情報とエピゲノム情報、それぞれの維持・再編に関わる分子機構とその相互制御関係 (クロスレギュレーション) を理解することの重要性が急速に高まっていた。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム配列情報の維持にあたる DNA 修復機構と、遺伝子発現を制御するエピゲノム情報の修飾・維持機構との機能的連携を分子レベルで明らかにすることで、その破綻によって引き起こされるゲノム不安定性やエピゲノム異常と種々の疾患・病態発現機構との関連の理解に資することを目的とした。具体的には、NER を制御するヒストン修飾やクロマチン構造変換因子の同定、NER における損傷認識因子の翻訳後修飾を介した転写環境制御、能動的 DNA 脱メチル化機構における DNA 修復因子の役割、SAM による塩基損傷の修復機構と細胞内代謝との関連等を明らかにすることを旨として研究を行った。

3. 研究の方法

(1)クロマチン免疫沈降

FLAG タグを融合した XPC または DDB2 を安定発現するヒト線維芽細胞株を樹立し、パラホルムアルデヒドによる固定、クロマチン画分の調製および超音波処理による断片化処理の後、抗 FLAG 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。

(2)局所紫外線照射

波長 250 nm の深紫外線を発する水銀-キセノン光源と反射対物レンズを備えた正倒立型

蛍光顕微鏡を用いて、細胞核内の局所に紫外線を照射した。EGFP を融合した XPC を安定発現する細胞株を用いて局所紫外線照射を行い、EGFP-XPC の損傷部位への集積をタイムラプス観察した。

(3)DNA 損傷修復速度の測定

DNA 複製による損傷の希釈を防ぐため、細胞を過剰チミジン処理した後、紫外線に暴露した。チミジン存在下で様々な時間培養した後、ゲノム DNA を調製し、紫外線誘発損傷である (6-4) 光産物を特異的に認識する抗体を用いた ELISA 法により損傷の定量を行った。

(4)無細胞ユビキチン化反応

バキュロウイルス発現系を用い、DDB1-DDB2 および CUL4A-RBX1 複合体をそれぞれ発現・精製した。これらを試験管内で混合して CRL4^{DDB2} ユビキチンリガーゼ複合体を再構成し、ゲル濾過カラムによりヘテロ四量体を精製した。このユビキチンリガーゼ複合体と E1、E2 (UbcH5a)、ユビキチンおよび基質として XPC 複合体を用い、ユビキチン化反応を行った。

4. 研究成果

(1)DNA 損傷修復制御におけるエピゲノム環境の役割

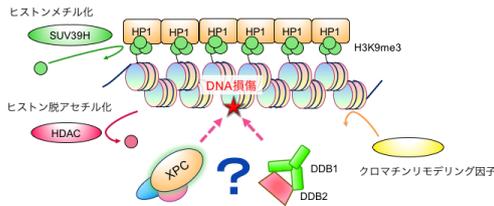
①NER の DNA 損傷認識に伴うエピゲノム情報の変換

ヒトのゲノム全体を対象とする NER においては、色素性乾皮症 C 群 (XP-C 群) の責任遺伝子産物である XPC タンパク質を含むヘテロ三量体 (XPC 複合体)、および DDB1 と XP-E 群の責任遺伝子産物である DDB2 から成るヘテロ二量体 (UV-DDB) が DNA 損傷部位を認識して結合することにより、修復反応が開始される。細胞内においてこれらの損傷認識因子が実際に損傷部位に結合するためには、ヒストン修飾やクロマチンリモデリング因子の関与によりクロマチン構造の変換が必要になると考えられるが、その分子機構の詳細は不明であった。

NER の損傷認識の場におけるクロマチン構造の状態を調べるため、XPC および DDB2 を標的とするクロマチン免疫沈降 (ChIP) 系を構築した。紫外線照射後、様々な時間培養した細胞について ChIP および抗修飾ヒストン抗体によるウエスタンブロットを行った結果、XPC や DDB2 が結合したクロマチン領域からアセチル化ヒストンが排除されている可能性を見出した。細胞をヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるトリコスタチン A や酪酸で処理すると、XPC の局所紫外線照射部位への集積やゲノム全体における紫外線誘発 DNA 損傷の修復に遅延が見られたことから、NER の初期過程においてヒストンの脱アセチル化が関わっている可能性が示唆された。

一般にヒストンの脱アセチル化はクロマチンの凝縮を促し、遺伝子発現に対して抑制的に働くと考えられていることから、上記の結

果は予想外であった。そこで損傷認識因子の細胞内局在を詳しく調べたところ、XPC がヘテロクロマチンに局在する傾向があることを見出した。通常の培養条件において、蛍光タンパク質を融合した XPC とヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) の共局在が観察されるのみならず、HDAC 阻害剤処理によって両者ともヘテロクロマチンから消失した。さらに細胞核内の局所に紫外線を照射することで HP1 自身が損傷部位に集積すること、この集積が XPC や UV-DDB に依存しないことが示された。



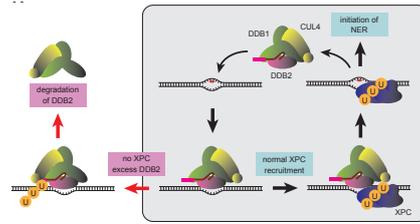
以上の結果は、DNA 損傷部位においてヒストンの脱アセチル化等を介してヘテロクロマチン様構造が形成され、これによって損傷認識因子のリクルートが促進されている可能性を示唆する。従来、遺伝子発現の制御に関して確立されてきたクロマチン高次構造の役割とは異なる概念を提起するものとして興味深い。

②細胞の DNA 損傷応答を制御する DDB2 の翻訳後修飾

DDB2 は NER において損傷認識因子として機能すると同時に、がん抑制遺伝子産物 p53 と機能的に相互作用し、細胞の DNA 損傷応答における転写環境の制御に関わることが知られている。このように DNA 修復と転写のクロストーク因子として重要であるにもかかわらず、細胞内における DDB2 の機能制御には不明な点が多く残されていた。

我々は DDB2 の N 末端に存在する特定の立体構造を取らないと予想されるテール領域がアセチル化、ユビキチン化、ポリ ADP リボシル化など、様々な翻訳後修飾の標的となることを明らかにした。特に UV-DDB は CUL4-RBX1 とともにユビキチンリガーゼ複合体 (CRL4^{DDB2}) を形成しており、DDB2 が DNA 損傷を認識すると CRL4^{DDB2} が活性化されて、DDB2、XPC、ヒストン等の様々なタンパク質がユビキチン化を受けること、DDB2 が紫外線照射に応答してプロテアソーム依存的に分解されるのに対して、XPC のユビキチン化は概ね可逆的であることが以前から知られていた。しかしながら、これらの現象の生理的な意義については不明であった。

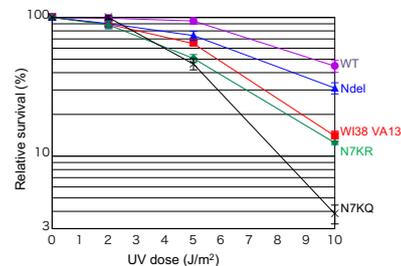
今回、人為的に XPC の細胞内発現レベルを変化させることにより、DDB2 の紫外線誘導性ユビキチン化および分解を XPC が負に制御していることが明らかになった。無細胞ユビキチン化反応系を用いた生化学的な解析も含め、XPC は CUL4-RBX1 ユビキチンリガーゼの基質として DDB2 と競合関係にあり、UV-DDB によ



って XPC が正常に損傷部位にリクルートされれば、DDB2 は分解を免れるというモデルを提唱した。これは、「DNA 損傷時に損傷認識因子である DDB2 がなぜ分解される必要があるのか？」という長年の謎に一定の解答を与えるものである。

さらに、XPC がユビキチン様タンパク質 SUMO による修飾を受けることを見出した。SUMO 化部位を欠損した変異 XPC を安定発現する細胞株では、主要な紫外線誘発 DNA 損傷である (6-4) 光産物の修復に有意な遅延が認められた。紫外線誘発損傷が UV-DDB から XPC に受け渡される過程で XPC の SUMO 化が重要な役割を担っており、CRISPR/Cas9 による DDB2 遺伝子破壊実験から、SUMO 化の非存在下では損傷部位に結合した UV-DDB 自身が DNA 修復の開始を妨害してしまうことが示唆された。

一方、N 末端テール領域を欠失、もしくはリジン残基のアミノ酸置換を導入した種々の変異型 DDB2 を安定発現する細胞株を作製したところ、DNA 損傷の修復速度に有意な差がないにもかかわらず、細胞の紫外線感受性にさまざまな変化が生じることを見出した。特にアセチル化を模倣したグルタミン変異体で紫外線感受性の増強が顕著に見られた。この紫外線感受性は DNA 二重鎖切断の誘導を介しており、p53 および DNA 依存性プロテインキナーゼの活性化に依存することが示された。このような細胞応答に関わる DDB2 の新たな機能を探るため、質量分析による相互作用因子の解析を試みたところ、解糖系に関わる細胞内代謝酵素やクロマチンリモデリング因子複合体のサブユニット等、興味深い因子が得られている。現在、これらの因子の機能解析を進めている。



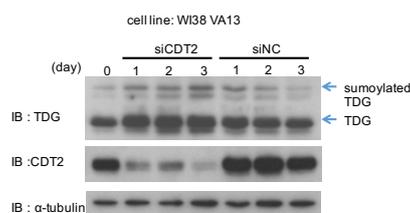
(2) エピゲノム制御における DNA 修復機構の役割

①能動的 DNA 脱メチル化における DNA 修復機構の役割

チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) は、シトシンおよび 5-メチルシトシンの自発的な脱メ

チル化によって生じる G:U、G:T ミスマッチを解消する BER 反応を開始する酵素で、自然突然変異の抑制に寄与すると考えられてきた。一方、最近になって TDG は DNA の能動的脱メチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが示され、注目を集めている。しかしながら、TDG の DNA 修復酵素としての活性と、エピゲノム制御における機能との関係は必ずしも明らかになっていない。

我々は、TDG が種々の DNA 損傷に応答してユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けることを新たに見出した。別に細胞周期 S 期での TDG の分解が報告されていることを踏まえ、これらの分解に関わるユビキチンリガーゼとして CRL4^{CDT2} を同定することに成功した。実際、CRL4^{CDT2} による基質認識に重要とされる PCNA 相互作用部位に変異を導入することにより、TDG タンパク質の定常的な発現レベル上昇と DNA 損傷誘導性分解の抑制が観察された。仮に TDG が半メチル化状態の DNA に作用して脱メチル化を引き起こすとすれば、DNA 複製、修復時におけるエピゲノム情報の消去を防ぐ上で TDG が積極的に分解されている可能性が考えられる。



上記の分解耐性の TDG 変異体に加え、SUMO 化部位や BER 酵素としての活性中心にアミノ酸置換を導入した各種 TDG 変異体を安定発現する細胞株を作製して解析を行った。その結果、TDG の発現に依存してゲノム中の 5-メチルシトシンや脱メチル化の中間体である 5-ヒドロキシメチルシトシンのレベルに有意な変化が見られた。しかしながら、この効果は TDG の BER 酵素としての活性とは独立したものであることが示唆され、従来の脱メチル化機構のモデルを再検討する必要があるのではないかと考えている。

一方、我々は XPC が TDG と物理的に相互作用するとともに、無細胞系において TDG の活性を促進することを以前に報告している。XPC が複数の DNA 修復機構に関与して突然変異の抑制に寄与している可能性が示唆されていたが、今回 TDG の発現レベルに応じて細胞の紫外線感受性の増強および紫外線誘発 DNA 損傷の修復速度の低下が引き起こされることを新たに見出した。NER と BER が XPC を競合することで、お互いの機能に影響を及ぼしていることを示す結果として興味深いものである。

②SAM によるメチル化塩基損傷の修復酵素と細胞内代謝の変化

転写・エピゲノム制御においてメチル基供与体として重要な役割を果たす S-アデノシルメチオニン (SAM) は、DNA や RNA と反応してメチル化損傷塩基を生じることが知られてい

る。これらの損傷の修復に関わるとされる大腸菌 AlkB のヒトホモログ ALKBH ファミリーは、ある種のがん細胞において発現が亢進していることが報告されている。HeLa 細胞を親株として ALKBH2 または ALKBH3 の安定過剰発現および発現抑制を行ったところ、ALKBH2/3 の発現レベルと細胞増殖速度の間に正の相関が認められた。

ALKBH は TET 等とともにジオキシングナーゼ・ファミリーに属し、 α -ケトグルタル酸を補因子としてメチル基の酸化を触媒することから、ALKBH の発現が細胞内代謝に及ぼす影響に着目した。メタボローム解析の結果、ALKBH3 過剰発現細胞において、特にポリアミン合成経路の亢進が見られ、この細胞がポリアミン合成阻害剤に対して高感受性を示すことを新たに見出した。一方、ALKBH3 過剰発現細胞において ALKBH3 の発現を siRNA によって抑制すると、細胞死が誘導されることがわかった。ALKBH3 の高発現に適応した細胞内代謝環境が、ALKBH3 の基質となる DNA/RNA のメチル化損傷を引き起こしやすい状態になっている可能性を考えて引き続き解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

- ①Cavadini, S., Fischer, E. S., Bunker, R. D., Potenza, A., Lingaraju, G. M., Goldie, K. N., Mohamed, W. I., Faty, M., Petzold, G., Beckwith, R. E., Tichkule, R. B., Hassiepen, U., Abdulrahman, W., Pantelic, R. S., Matsumoto, S., Sugasawa, K., Stahlberg, H., Thomä, N. H.: Cullin-RING ubiquitin E3 ligase regulation by the COP9 signalosome. *Nature* 531: 598-603 (2016) 査読有
DOI: 10.1038/nature17416
- ②Osakabe, A., Tachiwana, H., Kagawa, W., Horikoshi, N., Matsumoto, S., Hasegawa, M., Matsumoto, N., Toga, T., Yamamoto, J., Hanaoka, F., Thomä, N. H., Sugasawa, K., Iwai, S., Kurumizaka, H.: Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. *Sci. Rep.* 5: 16330 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/srep16330
- ③Okuda, M., Kinoshita, M., Kakumu, E., Sugasawa, K., Nishimura, Y.: Structural insight into the mechanism of TFIIH recognition by the acidic string of the nucleotide excision repair factor XPC. *Structure* 23: 1827-1837 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.str.2015.07.009
- ④Li, C. L., Golebiowski, F. M., Onishi, Y., Samara, N. L., Sugasawa, K., Yang, W.: Tripartite DNA lesion recognition and verification by XPC, TFIIH, and XPA in nucleotide excision repair. *Mol. Cell*

- 59: 1025-1034 (2015) 査読有
doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.012
- ⑤ Akita, M., Tak, Y.S., Shimura, T., Matsumoto, S., Okuda-Shimizu, Y., Shimizu, Y., Nishi, R., Saitoh, H., Iwai, S., Mori, T., Ikura, T., Sakai, W., Hanaoka, F., Sugasawa, K.: SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Sci. Rep.* 5: 10984 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/srep10984
- ⑥ Matsumoto, S., Fischer, E.S., Yasuda, T., Dohmae, N., Iwai, S., Mori, T., Nishi, R., Yoshino, K., Sakai, W., Hanaoka, F., Thomä, N.H., Sugasawa, K.: Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res.* 43: 1700-1713 (2015) 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkv038
- ⑦ Kikuchi, Y., Umemura, H., Nishitani, S., Iida, S., Fukasawa, R., Hayashi, H., Hirose, Y., Tanaka, A., Sugasawa, K., Ohkuma, Y.: Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. *Genes Cells* 20: 191-202 (2014) 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12210
- ⑧ Okashita, N., Kumaki, Y., Ebi, K., Nishi, M., Okamoto, Y., Nakayama, M., Hashimoto, S., Nakamura, T., Sugasawa, K., Kojima, N., Takada, T., Okano, M., Seki, Y.: PRDM14 promotes active DNA demethylation through the Ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development* 141: 269-280 (2014) 査読有
DOI: 10.1242/dev.099622
- ⑨ Nishi, R., Sakai, W., Tone, D., Hanaoka, F., Sugasawa, K.: Structure-function analysis of the EF-hand protein centrin-2 for its intracellular localization and nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 41: 6917-6929 (2013) 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkt434
- ⑩ Pines, A., Vrouwe, M.G., Marteiijn, J.A., Typas, D., Luijsterburg, M.S., Cansoy, M., Hensbergen, P., Deelder, A., de Groot, A., Matsumoto, S., Sugasawa, K., Thoma, N., Vermeulen, W., Vrieling, H., Mullenders, L.: PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* 199: 235-249 (2012) 査読有
DOI: 10.1083/jcb.201112132
- ⑪ Fischer, E.S., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G. M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., Iwai, S., Gut, H., Sugasawa, K., Thomä, N.H.: The molecular basis of CRL4^{DDB2/CSA} ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* 147: 1024-1039 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.035
- ⑫ Naegeli, H., Sugasawa, K.: The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair* 10: 673-683 (2011) 査読有
DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.04.019
- [学会発表] (計 41 件)
- ① 萱澤 薫: ヌクレオチド除去修復の細胞内制御機構とその多様性、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015. 12. 1~4、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ② 稲瀬 安希、太田 奈緒、本橋 ほづみ、萱澤 薫: 酸化的 DNA/RNA 脱メチル化酵素 ALKBH3 の機能解析、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015. 12. 1~4、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ③ Onishi, Y., Tone, D., Kinoshita, M., Iwai, S., Sakai, W., Sugasawa, K.: Molecular mechanism of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. The 15th International Congress of Radiation Research、2015. 5. 25~29、国立京都国際会館 (京都府)
- ④ 中西 正哉、各務 恵理菜、酒井 恒、萱澤 薫: ヌクレオチド除去修復の制御に関わるクロマチン構造動態、日本薬学会第 135 年会、2015. 3. 25~28、神戸学院大学 (兵庫県)
- ⑤ Sugasawa, K.: In vivo regulation of mammalian nucleotide excision repair. Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair、2015. 2. 8~14、ベンチュラ (アメリカ)
- ⑥ Sugasawa, K.: Post-translational modifications coordinating recognition and repair of UV-induced DNA damage. The 9th 3R Symposium、2014. 11. 17~21、御殿場高原ホテル (静岡県)
- ⑦ 萱澤 薫: 紫外線誘発 DNA 損傷修復の細胞内制御機構、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014. 10. 1~3、かごしま県民交流センター (鹿児島県)
- ⑧ 萱澤 薫: 哺乳類ヌクレオチド除去修復における DNA 損傷認識過程の制御、第 36 回日本分子生物学会年会、2013. 12. 3~6、神戸ポ

ートアイランド（兵庫県）

- ⑨ 稲瀬 安希、入野 康宏、加香 孝一郎、小島 真梨子、深水 昭吉、菅澤 薫：酸化的脱メチル化酵素 ALKBH2/3 の発現変化が細胞増殖・代謝に及ぼす影響、第36回日本分子生物学会年会、2013. 12. 3～6、神戸ポートアイランド（兵庫県）
- ⑩ 菅澤 薫：ゲノム DNA 損傷の修復と細胞応答を制御するタンパク質翻訳後修飾の役割、第86回日本生化学会大会、2013. 9. 11～13、パシフィコ横浜（神奈川県）
- ⑪ Matsumoto, S., Fischer, E. S., Yoshino, K., Thomä, N. H., Sugasawa, K.: Functional studies on ubiquitylation of the DNA damage recognition protein DDB2. The 8th 3R Symposium, 2012. 11. 25～28、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県）
- ⑫ Sugasawa, K.: Post-translational protein modification regulating mammalian nucleotide excision repair. The 4th US-Japan DNA Repair Meeting, 2012. 4. 11～14、リーズバーク（アメリカ）

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugasawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅澤 薫 (SUGASAWA, Kaoru)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授
研究者番号：70202124

(2) 連携研究者

酒井 恒 (SAKAI, Wataru)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・助教
研究者番号：70526251

岩井 成憲 (IWAI, Shigenori)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号：10168544

(3) 研究協力者

稲瀬 安希 (INASE, Aki)
松本 翔太 (MATSUMOTO, Syota)
戸根 大輔 (TONE, Daisuke)
中村 知史 (NAKAMURA, Tomohumi)
中西 正哉 (NAKANISHI, Seiya)
各務 恵理菜 (KAKUMU, Erina)
小山 紗季 (KOYAMA, Saki)
岸本 藍子 (KISHIMOTO, Aiko)
上村 美花 (UEMURA, Mika)
金子 雄貴 (KANEKO, Yuki)
後藤 元成 (GOTO, Motonari)