

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03828

研究課題名(和文) 神経活動をイメージングできる蛍光分子プローブの開発

研究課題名(英文) Development of fluorometric imaging probe of nerve action

研究代表者

竹中 繁織 (Takenaka, Shigeori)

九州工業大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：60188208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：カリウムイオン(K⁺)とナトリウムイオン(Na⁺)は細胞の膜電位の調節に必須であるだけでなく、神経細胞やニューロンの活動電位の発生に重要な役割を担う。本研究では申請者が世界に先駆けて開発したK⁺選択的蛍光イメージング用核酸試薬(カリウムセンシングオリゴヌクレオチド、以下PSO)を細胞表面でのK⁺イメージング試薬と発展させるため固定化システムを検討した。また、PSOのオリゴヌクレオチド配列を網羅的に改変しNa⁺選択的な核酸プローブ(ナトリウムセンシングオリゴヌクレオチド、以下SSO)を創製することについて、オリゴヌクレオチド配列の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Cell network signals were produced by ionic gradient between inner and outer living cell. Temporal-spatial imaging of ionic gradient of potassium (K⁺) and sodium (Na⁺) ions in living cell helps study of cell network signal. We successfully realized by K⁺ imaging by the oligonucleotide-peptide conjugate carrying fluorescence resonance energy transfer dye pair, named as potassium ion sensing oligonucleotide, PSO, for cell interior or cell network. We developed the method to locate PSO on a cell surface and to good performance for fluorescence intensity and preference of K⁺ over Na⁺. We synthesize series of PSO derivatives carrying different length of oligonucleotide and/or peptide. We constructed the method to localize PSO on a cell surface and found out PSO derivative carrying improved performance under cell surface. Furthermore, we change DNA sequence or length systematically to create sodium sensing oligonucleotide, SSO, and we synthesized it as a first case in the world.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：トロンピンバインディングアプタマー カリウムイオン ナトリウムイオン 細胞外イメージング

1. 研究開始当初の背景

生命には電位差を生み出す仕組みがあり、細胞では細胞膜内外のイオン種と濃度の違いが起電力となる。この膜電位は、ニューロンや神経細胞の活動電位発生の閾値を調整しており、細胞内の高濃度 K^+ によって保たれている。すなわち、ATP 依存性の K^+/Na^+ チャンネルで細胞外から細胞内に K^+ を能動的に移動させることによって実現されている。 Na^+ や Ca^{2+} チャンネルにより活動電位が発生するが、 K^+ チャンネルはこれらと拮抗して信号発生の大きさや停止のタイミングを調節する重要な役割を果たしている。また、脳における海馬のてんかん現象で神経の同時発火の初期段階に細胞外千個ほどの K^+ が高まり、脳全体に K^+ 波が広がると考えられており、細胞内外の K^+ 、 Na^+ を識別して画像イメージとして捕えることができれば、神経や脳のイオン輸送の動的なメカニズム解明につながる。

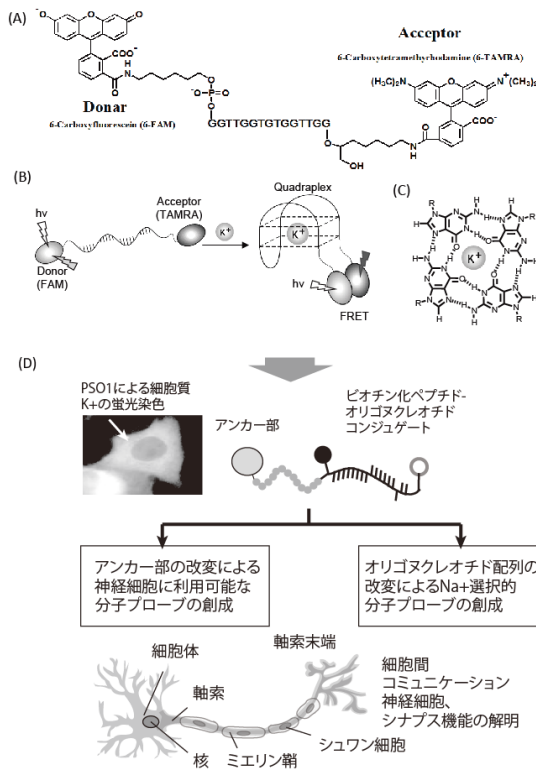


図1. 研究概念図.

竹中は、これまでに高濃度の Na^+ 中で K^+ を特異的に識別して結合する PSO (図 1(A), 図 2) の合成に成功した。これは、トロンピンアプタマー配列 (5' -GGTTGGTGGTTGG-3') が K^+ を選択的に取り込んで安定なグアニン(G)カルテット (図 1(C)) 構造を形成し、核酸部位が 4 本鎖 DNA としてコンパクトに折りたたまれ、両末端に結合した二つの蛍光色素間が近接することによって、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化として検出される [図

1(B)]。このイオンの選択性は、折り畳まれた 4 本鎖 DNA の構造的制約に起因すると考えられる。よって、イオンを取り込んだ際、塩基配列中の特定の G 同士が安定的な水素結合を形成すれば、塩基配列や長さを改変することによって、 K^+ よりイオンサイズの大きい Na^+ 選択的なプローブ (以下 SSO) の創成へつなげることも可能である。

K^+ は細胞内に多く存在するため、本試薬は細胞内へ取り込まれる必要がある。そこで、PSO にペプチド鎖を介してビオチンを導入した PSO1 (図 1D) にビオチン化核排出ペプチド、アビジンによる複合体をビーズロード法で細胞内に導入することによって成功した。また、その際の K^+ に対する PSO1 の解離定数 (K_d) は、 $K_d = 2.2 \text{ mM}$ で、 Na^+ との選択性は 241 倍と極めて高いものであった。このシステムによって K^+/Na^+ の高い選択性を実証するとともに、世界で初めて生きた細胞内の K^+ 濃度変化の蛍光イメージングに成功した。

2. 研究の目的

細胞表面で PSO を局在化することができれば、従来不可能であった過剰の Na^+ 中で K^+ の動的な濃度変化をモニタリングできる可能性がある。そこで細胞はアポトーシスに伴って細胞内の K^+ が細胞外へ流出するので、以下の予備的検討を行った。細胞表面の糖鎖を介して細胞膜上に PSO を局在化させるため、コンカナバリン A、アビジン結合させた PSO を用いた (図 2A)。

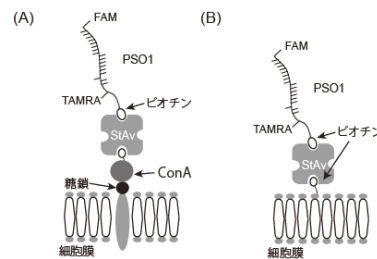


図2. 細胞外 K^+ の検出概念. (A) 糖鎖または(B)ビオチンを介した PSO の固定化.

これに対してアポトーシス誘導剤の添加を行ったところ、細胞表面に位置する PSO1 によって細胞内から流出する K^+ を、共焦点レーザー顕微鏡を用いることによって細胞表面の K^+ 濃度の時空間的变化を蛍光イメージングとして捉えることに成功した。しかしながら、コンカナバリン A の添加に伴う細胞死も観察された。そこで、細胞への固定化部位として、コレステロールやリン脂質を導入した PSO2, 3 (図 3) について検討したがエンドサイトーシスによってプローブが取り込まれ、モニタリング可能なのは数 10 分であった。そこで、本研究では、細胞死を引き起こさず、長時間モニタリング可能なシステムとして、図 3B

に示すように水溶性の Sulfo-NHS-ピオチンによって、細胞表面をピオチン化し、ストレプトアビジン-PSO による細胞外 K⁺センシングを試みる。また、これまでに、GGTAGG(T)_nAGGTTAGG 配列の n を 2~8 まで変化したオリゴヌクレオチドを合成し、Na⁺, K⁺添加に伴う CD スペクトル変化とそれらのイオン存在下での熱安定性 (T_m) について調べた。その結果、n が特定の数の場合、Na⁺存在下の解離定数 K_d = 5.29 ± 1.05 M⁻¹ となり、K⁺の場合が K_d = 11.2 ± 1.3 M⁻¹ に比べ、Na⁺に対する親和性が高くなった。また T_m は Na⁺存在下で 51.2 °C であり、K⁺存在下の 43.0 °C に比べて、8.2 °C の安定化能を得た。これらの CD スペクトルからバスケット型 4 本鎖を形成していると予想される。ループ部分の n 数に関して、K⁺存在下では n 数が増すと T_m は低下し、Na⁺の場合は逆に増加した。そこで、SSO の基本配列を GG(X)_aGG(Y)_bGG(Z)_cGG とし、X、Y、Z となる塩基 (T もしくは A) とその繰り返し数である a, b, c を系統的に変化したオリゴヌクレオチドについて、SSO としての可能性を検討することを目的とする。

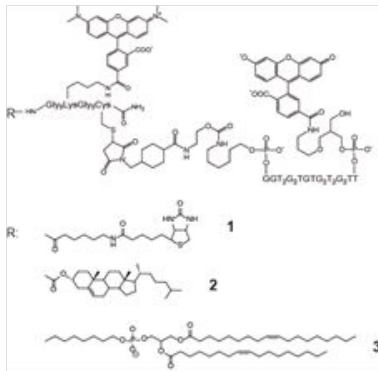


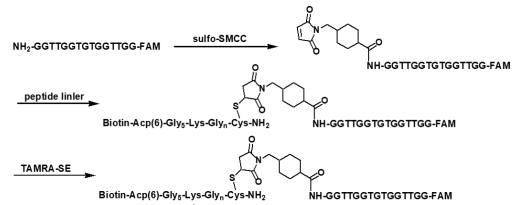
図3. カリウムイオンセンシングオリゴヌクレオチド(PSO1)の構造と設計

3. 研究の方法

PSO の合成

以下に示す PSO を合成した。生成物は、HPLC, MALDI-TOF-MS で高純度に生成物が得られたことを確認した。

probe	peptide	DNA
PSO-5	GGGGG K GGGGG C-NH ₂	5'-GGTTGGTGTGGTTGG TT-3'
PSO-T0G5	GGGGG K GGGGG C-NH ₂	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'
PSO-T0G3	GGGGG K GGG C-NH ₂	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'
PSO-T0G1	GGGGG K G C-NH ₂	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'
PSO-T0G0	GGGGG K C-NH ₂	5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3'



蛍光測定による解離定数の算出

0.20 μM PSO, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) 水溶液に KCl と NaCl を添加していき、蛍光スペクトル測定 (ex = 495 nm) を行った。得られた結果から、式(1)を用いて Ratio の変化率 Ratio から解離定数 (K_d) を算出し、イオンとの結合能を評価した。

$$\text{Ratio} = (\text{Ratio} - \text{Ratio}_0) / \text{Ratio}_0 = Z \cdot [\text{K}^+] / ([\text{K}^+] + K_d) \dots (1)$$

Ratio : F.I._{585 nm} / F.I._{518 nm}, Ratio₀ : [KCl] = 0 mM 時の Ratio, Z : constant.

PSO の新規膜外固定化方法 (膜タンパク質 Biotin 化法)

HeLa 細胞に 0.5 mg/mL sulfo-NHS-Biotin を 15 分で 10 min、5.0 μM Streptavidin を 37 分で 10 min、5.0 μM PSO を 37 分で 10 min インキュベートした。培地には DMEM 2 mL を用い、共焦点レーザー顕微鏡で KCl 添加に伴う蛍光挙動を観察した。また、K⁺流出試薬添加に伴う Ratio 応答確認では Amphotericin B を添加した時の蛍光挙動を観察した。

SSO の配列

SSO として、以下の 9 つの配列について検討した。

略号	配列 5' → 3'
1	GGTTAGG(A) ₆ GGTTAGG
2	GGTTAGG(T) ₄ (A)(T) ₄ GGTTAGG
3	GGTTAGG(T) ₅ (A)(T) ₃ GGTTAGG
4	GGTTAGG(T) ₆ (A)(T) ₂ GGTTAGG
5	GGTTAGG(T) ₇ ATGGTTAGG
6	GGTTAGG(T) ₈ AGGTTAGG
7	GGTTAGG(T) ₉ GGTTAGG
8	GGTTAGG(A) ₆ GGTTAGG
9	GGTTAGG(A)(T) ₇ AGGTTAGG

SSO の評価

2.0 μM オリゴヌクレオチド 1-9, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に対して、100 mM NaCl または KCl 添加に伴う T_m 測定を行った (20-95 °C)。4 本鎖構造において特徴的である 295 nm の楕円率 () が温度上昇に伴い、1/2 となる温度を T_m として算出した。

2.0 μM オリゴヌクレオチド 1-9, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に対して、25 °C で NaCl または KCl 添加に伴う CD スペクトル測定を行った。分子楕円率 () の変化量に対するイオン濃度のグラフから以下の式を用いて、解離定数 K_d を算出した。

$$= Z \times (1 / (1 + (K_d / [Na^+])^2))$$

0.2 μ M SS0, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に対して、25 °C で NaCl または KCl を添加し蛍光スペクトル測定 (励起波長 495 nm) を行った。

4. 研究成果

新規 PSO の解離定数の算出

Table 1. PSO に対する KCl, NaCl 添加に伴う蛍光特性

probe	KCl		NaCl		KCl(145 mM NaCl)		K ⁺ /Na ⁺ 選択性
	K _d /mM	ratio 0-150 mM	K _d /mM	ratio 0-150 mM	K _d /mM	ratio 0-150 mM	
PSO-5	21.2 ± 0.7	1.43	639 ± 24	-	-	-	30.1
PSO-TOG5	13.4 ± 0.6	2.77	677 ± 32	0.37	10.8 ± 0.4	2.34	50.2
PSO-TOG3	9.4 ± 0.5	2.28	692 ± 39	0.63	8.9 ± 0.3	2.02	73.6
PSO-TOG1	12.3 ± 0.6	2.76	538 ± 26	0.32	8.8 ± 0.2	2.49	43.8
PSO-TOG0	10.1 ± 0.5	3.05	564 ± 26	0.36	10.7 ± 0.4	2.75	55.8

新規に合成した 4 種の PSO において、KCl、NaCl 添加に伴う変化から算出した解離定数を Table 1 に示した。KCl を添加するに伴い Ratio 値が増大し、K_d は PSO-5 と比較すると約 2 倍も性能が向上した。これは核酸配列のチミン 2 つを除いたことでマイナスチャージの反発が弱まり、4 本鎖構造の安定性が増したことによると考えられる。また、No. 2 から No. 5 だけで比較すると、いずれも K_d 値はほぼ同等となったが、ペプチドリンカーの最も短い PSO-TOG0 は Ratio 値の増加量 (ratio 0-150 mM) は最大となった。この理由は、構造変化時に蛍光間距離が小さくなることで FRET 効率が向上したためだと思われる。

PSO の新規膜外固定化方法 (膜タンパク質 Biotin 化法)

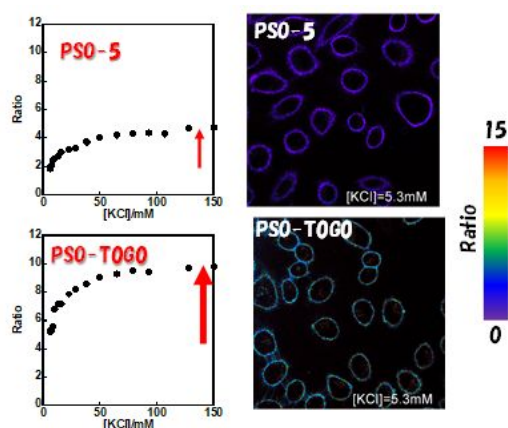


図 4. KCl 添加に伴う PSO-5, PSO-TOG0 の Ratio 変化

膜タンパク質 Biotin 化法で PSO-5 の細胞膜の染色に成功し、インキュベート終了時に細胞死がほとんど見られないことを確認した。また、図 4 に示すように PSO-5 を細胞膜に固定化した状態で、培地 (DMEM, 初期 [KCl] = 5.3 mM) に KCl を添加するに伴い Ratio が増加したことから、本手法で培地中の K⁺濃度

の変化を検出できることが確認された。このときの K_d = 20.4 mM であった。加えて、あらたなプローブとして、PSO-TOG0 でも同様に細胞染色後に KCl 添加を行うと PSO-5 よりも K_d は、16.6 mM と小さくなり、初期培地濃度から [KCl] = 150 mM までの Ratio の増加量が上昇していた。PSO-TOG0 は PSO-5 と比べ、輝度も高く、このことから、PSO-TOG0 は細胞膜上で PSO-5 よりも高感度に K⁺を検出できることが示唆された。

K⁺流出試薬添加に伴う Ratio 応答

PSO-5 ラベル化細胞を 10 分間観察後、26.3 μ M の Amphotericin B を添加し、その後の蛍光挙動を観察した。その結果、図 5 に示すように、観察したすべての細胞において、Amphotericin B 添加直後 (観察開始から 11 min, Amphotericin B 添加 1 min 後) に Ratio の増大が見られた。これにより、膜タンパク質 Biotin 化法によって細胞外に固定化した PSO によってカリウムイオンの挙動がイメージングできる可能性が示された。

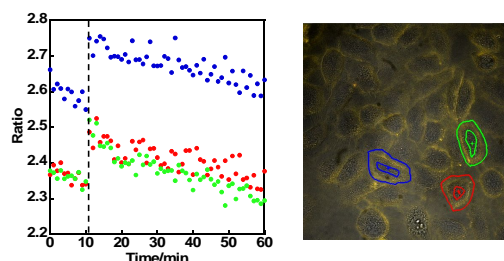


図 5. Amphotericin B 添加に伴う PSO-5, PSO-TOG0 の Ratio 変化

ナトリウムイオンプローブ SS0 の開発

今回検討したオリゴヌクレオチドの配列 1-9 と T_m測定、解離定数 K_dの結果を Table 2 に示す。特定の金属塩存在下で T_mが上昇すれば、その金属塩との親和性が強いと言える。配列 1-9 について検討したところ、4 本鎖形成時の中央ループ部にアデニンを導入することで、NaCl 存在下において 4 本鎖構造が安定化された。しかし、KCl 存在下においては不安定化された。さらに、配列 1, 6 と 2 を比較すると、アデニンとカルテットを形成するグアニンとの距離が近ければ近いほど、NaCl 存在下において 4 本鎖構造は安定化された。これは、チミンよりも立体的に大きいアデニンがカルテット間のイオンを内包するスポットを狭めることによって、イオン半径が小さい Na⁺に対する選択性が向上したと考えられる。また、解離定数 K_dにおいてもグアニンの隣がアデニンである配列 1, 6, 9 が他の配列と比較して高い Na⁺選択性を示した。特に、グアニンの両隣がアデニンである配列 9 では最も Na⁺選択性が高く、SS0 の配列には適していると考えられる。

Table 2. 各オリゴヌクレオチドの NaCl, KCl における T_m, K_d の比較.

略号	T _m / °C		K _d (25 °C) / mM		Na ⁺ 選択性 K _d (KCl) / K _d (NaCl)
	NaCl	KCl	NaCl	KCl	
1	46.0	39.0	7.82±0.16	12.2±0.8	1.6
2	43.5	39.5	12.8±0.4	15.2±0.6	1.2
3	43.0	39.0	11.2±0.2	15.6±0.7	1.4
4	43.5	39.5	10.7±0.4	15.0±0.7	1.4
5	45.5	40.0	8.51±0.18	12.5±0.7	1.5
6	50.5	43.5	4.01±0.07	7.91±0.35	2.0
7	43.5	38.5	11.5±0.2	14.4±0.5	1.3
8	<31.0	<28.5	102±3	170±7	1.7
9	45.0	36.5	7.75±0.15	24.0±1.2	3.1

配列 9 を基本骨格とし、その両端に FAM, TAMRA を有する SSO (図 6) の蛍光測定の結果を 図 7 に示す。

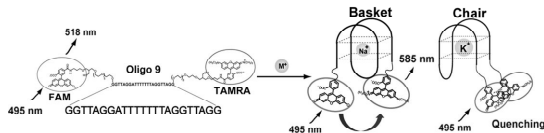


図 6 SSO の NaCl, KCl 存在下における構造変化と検出原理.

SSO に NaCl を添加したところ、ドナー分子 FAM 由来の 518 nm の蛍光強度の減少、アクセプター分子 TAMRA 由来の 585 nm の蛍光強度の上昇が確認された (図 7a)。これより、FRET が起こったと考えられる。一方で、KCl 添加では、518 nm の蛍光強度の減少は起こったものの、585 nm の蛍光強度も減少した (図 7b)。これより、KCl 存在下では、FRET ではなく蛍光分子同士のスタッキング相互作用によりクエンチングが起こったと考えられる。つまり、SSO は NaCl 存在下においてのみ選択的に FRET を起こすことが明らかとなった。細胞外条件である 110 mM KCl 存在下において、NaCl を添加すると、FRET を観察することができた (図 7c)。さらに、Ratio の変化 ($F.I._{585 \text{ nm}} / F.I._{518 \text{ nm}}$) を NaCl, KCl, NaCl (in 110 mM KCl) 添加時それぞれで比較すると、生体内条件において、十分な変化が起きていることが分かった (図 7d)。これより、SSO による生体内 Na⁺ 検出の可能性が示された。

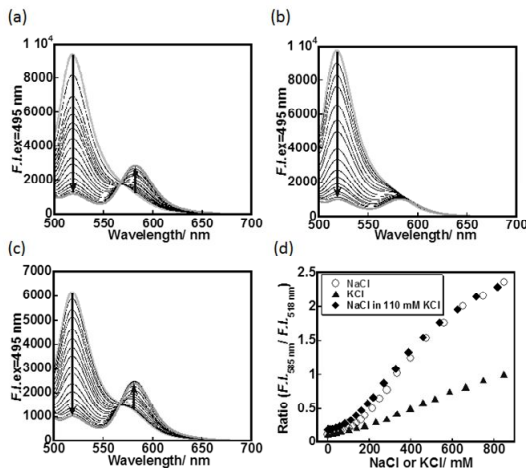


図 7. (a) NaCl 添加, (b) KCl 添加, (c) NaCl 添加 (in 110 mM KCl) に伴う 0.2 μM SSO の F.I._{ex=495 nm} での蛍光スペクトル変化. (d) Ratio ($F.I._{585 \text{ nm}} / F.I._{518 \text{ nm}}$) の NaCl, KCl 濃度依存性.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Shigeori Takenaka, Synthesis of fluorescent potassium ion-sensing probes based on a thrombin-binding DNA aptamer-peptide, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 査読有, Vol.62, 8.9.1-8.9.9 (2015).

doi: 10.1002/0471142700.nc0809s62 conjugate

[学会発表](計 16 件)

「G-rich Oligonucleotide derivatives to monitor potassium ion in living cell」, Shigeori Takenaka, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids (A3RONA2017), 中国 西安, 2017 年 9 月 15-17 日.

「カリウムイオンセンシング蛍光プローブ (Potassium sensing oligonucleotide, PSO) の高性能化の試み」, 黒田 正雄, 佐藤しのぶ, 竹中 繁織, 日本分析化学会 第 66 年会, 東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区), 2017 年 9 月 9-12 日.

「DNA を用いた生体内カリウムイオン蛍光イメージング試薬の開発」, 黒田正雄, 佐藤しのぶ, 竹中 繁織, 第 54 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2017 年 7 月 1 日.

「G-rich Oligonucleotide derivatives to monitor potassium ion in living cell」, Shigeori Takenaka, European Materials Research Society, E-MRS Symposium 2016 Fall "Bioinspired and Biointegrated Materials as Frontiers Nanomaterials V, Warsaw University of Technology (Poland), 2016 年 9 月 19-22 日.

「カリウムイオンの蛍光イメージング試薬を目指した G-リッチオリゴヌクレオチドの配列検討」, 黒田 正雄, 佐藤しのぶ, 竹中 繁織, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2017 年 7 月 2 日.

「配列改変によるカリウムイオン選択的オリゴヌクレオチドの創製」, 黒田正雄, 佐藤しのぶ, 竹中 繁織, ナノ学会第 14 大会, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2016 年 6 月 14-16 日.

「生体内カリウムイオンセンシングを志向したペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート(PSO)のペプチド長の検討」, 坂元 直人, 松田 知己, 永井 健治, 佐藤しのぶ, 竹中 繁織, 日本分析化学会 第 76 回分析化学討論会, 岐阜薬科大学・岐阜大学(岐阜県岐阜市), 2016 年 5 月

28-29 日.

「 Extracellular Potassium Ion Monitoring Based on G-rich Oligonucleotides」, Shigeori Takenaka, The 4th Japan-China Symposium on Nanomedicine, 北九州国際会議場(福岡県北九州市), 2016年5月12-13日.

「生体内での蛍光検出を志向したカリウムイオンセンシングオリゴヌクレオチド(PSO)構造の最適化」坂元 直人, 佐藤しのぶ, 竹中 繁織, 日本化学会 第96春季年会 (2016), 同志社大学 京田辺キャンパス(京都府京田辺市) 2016年3月24-27日.

「 Monitoring of extracellular potassium ion based on G-rich oligonucleotides 」, Naoto Sakamoto, Shinobu Sato, Shigeori Takenaka, 2015 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015), Honolulu, Hawaii, USA, 2015年12月15-20日.

「四本鎖オリゴヌクレオチドを利用した細胞表面でのカリウムイオンセンシングの試み」, 坂元直人, 佐藤しのぶ, 末田慎二, 松田知己, 永井健治, 竹中繁織, 第25回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区), 2015年7月23-24日.

「Potassium sensing oligonucleotide as a fluorometric imaging reagent for an intracellular and extracellular potassium ion」, Shigeori Takenaka, European Materials Research Society, E-MRS Symposium Spring 15V “ Bioinspired and Biointegrated Materials as Frontiers Nanomaterials V Spring Meeting 2015, Lille Grand Palais France, 2015年5月11-15日.

「四本鎖オリゴヌクレオチドを利用した細胞表面でのカリウムイオンセンシングの試み」, 坂元直人, 佐藤しのぶ, 末田慎二, 松田知己, 永井健治, 竹中繁織, 第25回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区), 2015年7月23-24日.

「ナトリウムイオンで4本鎖構造が誘起されるオリゴヌクレオチド配列の探索」, 竹中繁織, 今市悠貴, 佐藤しのぶ, 第25回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区), 2015年7月23-24日.

「ナトリウムイオンを識別するオリゴヌクレオチド配列」, 佐藤しのぶ, 今市 悠貴, 竹中繁織, 日本分析化学会 第75回分析化学討論会, 山梨大学甲府キャンパス(山梨県甲府市) 2015年5月23-24日.

〔図書〕(計 2件)

「第2章 遺伝子ひしめく核内の化学」, 竹中繁織, ナノバイオ・メディシン: 細胞核内

反応とゲノム編集, 宇理須 恒雄 編著, 近代科学社, 13-31 (2017).

「はじめに, Part I Chap 2 医療応用のための分析化学, Part II Chap 1 バイオセンサーの歯科への応用」竹中繁織, CSJ Current Review 24 医療・診断・創薬に化学-医療分野に挑む革新的な化学技術-, 企画・編集 WG, 竹中繁織, 長崎幸夫・杉本直己, 日本化学会編, 化学同人, (2017).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://takenaka.che.kyutech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
竹中 繁織 (TAKENAKA, Shigeori)
九州工業大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 60188208

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

(4) 研究協力者
黒田 正雄 (KURODA, Masao)
尾崎 俊祐 (OZAKI, Shynsuke)
坂元 直人 (SAKAMOTO, Naoto)
今市 悠貴 (IMAICHI, Yuki)