

令和元年6月20日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04346

研究課題名(和文) P型ポンプ；エネルギー共役の分子基盤と異常による発癌

研究課題名(英文) P-type pump；Molecular basis of energy coupling and carcinogenesis caused by defects

研究代表者

鈴木 裕 (Suzuki, Hiroshi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：50183421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：P型Caポンプの代表メンバー筋小胞体Caポンプの輸送路開口・閉口の構造機序とそれによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度設定の仕組み、膜脂質のポンプ機能への関与を解析し、エネルギー共役機構の理解を深めた。またCaポンプを用いて膜蛋白1分子動態解析法を開発し、各構造中間体間の遷移を解析し共役機構の理解を進めた。またP型ポンプであるフリッパーゼの巨大基質(リン脂質)輸送機序を理解するための基本的知見を得た。他方、発癌原因となる小胞体Caポンプの4種の遺伝子異常を動物モデルで見出し、詳細な病態解析と共に、其々がどのようなCaポンプ蛋白と機能の異常を引き起こすかを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Caポンプの作動機序、即ち如何に構造が大きく変化し、如何なる構造領域が如何なる役割を果たし、ポンプ機能を成立させるかを「分子解剖学」により次々に露わにできた。またポンプ異常と病態脂質二重層形成機序の理解を深めると共に、さらに膜蛋白全般について作動機序解明の研究基盤を実例を持って形成した。

2017年度には、当該分野のほとんどすべての著名な、また若手の研究者を集め、滋賀県大津にて国際会議(P-type international meeting)を主催し、深い議論と交流の場を設け、国際交流と共に当該分野の今後の発展のため、また日本がその中心となって今後も深く貢献するための基盤さらに強くした。

研究成果の概要(英文)：Gating mechanism of sarco(endo)plasmic reticulum Ca-pump SERCA1a and involvement of lipid on membrane in the pump function were studied, thereby understanding of energy coupling mechanism in the active Ca<sup>2+</sup> transport were further deepened. By the use of the Ca<sup>2+</sup>-pump, the methods for a single molecule dynamics were developed, and the structural changes of the pump were analyzed for understanding the structural mechanism. For the flippase, another P-type ATPase, studies were performed to identify its specific substrates, and reveal the mechanism. Fur types of mutations of endoplasmic Ca<sup>2+</sup>-pump SERCA2b that develop squamous cell carcinoma in mouse model were identified, and the pathological consequences and defects in the pump protein were revealed.

研究分野：生化学

キーワード：Ca-pump active transport flippase energy coupling P-type ATPase

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) P型カチオンポンプはATP分解に共役して特異的カチオンを輸送する膜蛋白ファミリーであり、ATP分解とカチオン輸送を可能にする共通のドメイン構造を有して共通の反応機構によって特異的カチオンを輸送する。現在までにCaポンプを中心とした生化学的研究とそれに基づく各中間体結晶構造の解明により、細胞質ドメインの大きな動きとそれに伴う膜貫通ヘリックスの配向性変化による輸送エネルギー共役の仕組みの理解が進んできた。しかし未だ、Ca放出前のリン酸化中間体E1PCa<sub>2</sub>およびE2PCa<sub>2</sub>の構造解明、ゲーティングの主役である“Aドメインの動き”を輸送路に伝達する第二膜貫通ヘリックス“M2”の機能の具体、膜脂質とポンプ蛋白の分子間相互作用の機能的意義を解明することが本質的課題として残されている。また、膜蛋白1分子動態解析法の開発とそれによる解析も必須な挑戦的課題である。膜リン脂質非対称性形成を担うP型ポンプの一員“フリッパーゼ”の膜脂質輸送機構の解明も必須である。

(2) 各ポンプ機能の破綻は多様の重篤な病態を引き起こすが、現在、非筋細胞型Caポンプ(SERCA2b)点変異による扁平上皮癌の発症と表現型(病態)差異の機序理解のため、ポンプ蛋白分子の異常を解明して分子基盤を確立することが急務となっている。

### 2. 研究の目的

(1) ① P型カチオンポンプの代表メンバーである筋小胞体Caポンプの輸送路開口・閉口(ゲーティング)機構とそれによる細胞質および小胞体内腔Ca<sup>2+</sup>濃度設定の仕組みを解明し、エネルギー共役機構の理解をさらに深める。  
② Caポンプを用いて1分子動態解析法を開発し、各構造中間体間の構造遷移を解析し共役機構の理解を格段に進めるとともに、膜蛋白1分子解析法として確立する。  
③ 得られた成果を他のP型ポンプ、特にフリッパーゼに適用して巨大基質(リン脂質)輸送機序を理解するための基本的知見を得る。

(2) P型ポンプ遺伝子異常による病態発症について本研究では“発癌”に焦点を絞り、非筋細胞小胞体Caポンプ(SERCA2b)の遺伝子異常による発癌、変異の違いによる癌病態差異の機序を理解するための分子基盤を与える。

### 3. 研究の方法

(1) ① **Caポンプエネルギー共役機構解明:** M2の各領域特異的構造変化(二次構造と長さの変化、相互作用組換え、折れ曲り)がどのステップでどのように生起して輸送路開口・閉口を誘起するかを解明するため、ヘリックス構造を破壊・障害する変異、伸長させる変異など多様な変異を導入し、各反応素過程への影響を速度論的に解析する。またM2先端部とA,Pドメインの集合状態に対する部位特異的変異、pH、Mg<sup>2+</sup>、K、界面活性化剤等の影響を解析し、リン酸化中間体(E<sub>P</sub>)の異性化および分解とゲーティングにおける集合状態変化の構造機能を解明する。  
② **膜脂質分子のポンプ機能への関与:** 膜脂質頭部とポンプ蛋白分子との静電的および疎水性相互作用それぞれの機能的意義を、Nanodiscに組み込む脂質の種類を変えて、ポンプ機能の速度論的解析を行い解明する。  
③ **E1PCa<sub>2</sub>構造アナログの安定化と新規開発:** 本中間体の構造アナログE1Ca<sub>2</sub>・BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>の可溶化・結晶化のための安定化因子を種々の条件を検討して探索する。またN-エチルマレイミド特異的修飾で著明に安定化させたE1PCa<sub>2</sub>のアナログ(E1Ca<sub>2</sub>・BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>)を開発し、構造特性を解明して結晶構造解析に資する。  
④ **1分子動態解析:** Nanodiscと3次元XYZ軸解析用蛍光顕微鏡技術を利用し、Caポンプを用いて膜蛋白1分子動態解析法を確立し実施する。そしてポンプの各構造中間体間の遷移や未結晶化中間体構造を生理的条件下で解析して、これまでの学説を検証するとともに輸送機構の理解を格段に進める。  
⑤ フリッパーゼ(ATP8A1、ATP9A、ATP9B)を培養細胞にて大量発現し、機能および速度論的解析を行い、其々の基質を同定すると共に、脂質輸送の反応機構と構造機序の理解を深める。

(2) **SERCA2b点変異による発癌の分子基盤:** 発癌原因となるSERCA2b遺伝子点変異が蛋白発現と機能特性に与える影響を解明するため、各変異ポンプ蛋白を培養細胞にて発現し、蛋白発現と機能の異常を解析する。これにより発癌と癌病態差異の機序理解の分子基盤とする。

### 4. 研究成果

(1) ① **M2ヘリックス各領域の構造機能:** Aドメイン連結部位、先端部、細胞質領域、膜内細胞質側・内腔側の各領域に残基置換・削除、グリシン挿入を行ない、リン酸化中間体形成・異性化・分解とCa<sup>2+</sup>結合・閉塞・放出(図1)をラピッドクエンチングとラピッドフィルトレーションにより解析した。また内腔側からのCa<sup>2+</sup>結合や輸送部位プロトン化の影響を解析した。なお、各ゲーティングに必須な領域特異的ヘリックスの巻戻し・再形成とそれに伴う長さ変化

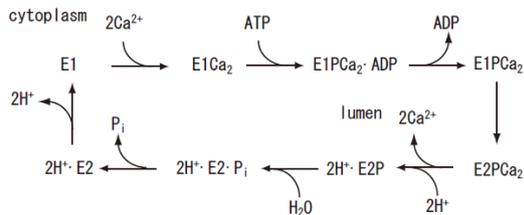


図1. 小胞体 Ca ポンプ(Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>ポンプ)の反応サイクル

E1: Ca<sup>2+</sup>結合型活性化状態  
 E1P: ADP 感受型リン酸化中間体  
 (ADP と反応して ATP を再生できる EP)  
 E2P: ADP 非感受型リン酸化中間体  
 E2: 非活性化状態  
 (Na, K ポンプの場合、輸送カチオンは Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup>)

はグリシンの挿入箇所と個数を変えることにより、また M4 や P ドメインとの M2 領域特異的相互作用の組み換えとその機能（各構造中間体の安定化等）については関与すると推定した残基の置換を導入することにより影響を解析した。その結果、各反応素過程で M2 が如何にヘリックス構造と長さを変化させて A ドメインの動きを輸送部位に伝え、適時・適切な Ca<sup>2+</sup> 進入路と放出路の開口・閉口（ゲーティング）を成立させて細胞質と小胞体内腔それぞれの Ca<sup>2+</sup> 濃度を適切に設定するか、その構造機序を露わにした（「主な発表論文等」⑤）。

② **M2 上の Gly105 の構造機能**：長い M2 ヘリックス (a. a. 87~126) 上の Gly105 は他の P 型ポンプにも保存されており、A ドメインの動き（回転と傾き）に伴い M2 ヘリックスの折れ曲りを可能にしてリン酸化中間体の異性化と分解、それに伴うゲーティングを成立させると我々は予想した。そこで、Gly105 をアラニンで置換して (G105A) ヘリックスを固くした変異体を作成し、さらにこの G105A 変異体の M2 上の各位置にグリシン導入（即ちグリシンの位置をずらして柔軟性を与える変異体作成）を行ない、ATP 分解とそれに共役する Ca<sup>2+</sup> 輸送の活性測定、および各反応素過程の速度論的解析、Ca<sup>2+</sup> 結合・閉塞・放出解析を行った。その結果、G105A では、リン酸化中間体の構造異性化が著明に遅くなると共に、E1PCa<sub>2</sub> および E2PCa<sub>2</sub> における Ca 閉塞構造が障害を受けること、その結果、ATP 分解活性が著明に遅くなるとともに、Ca<sup>2+</sup> 輸送活性の消失（脱共役）が生じる事を露わにした。さらに、これらの構造と機能の障害は、7 残基離れてヘリックスの同じ面に存在する Ala112 の位置にグリシンを戻し込むと (A112G)、完全に野生型の構造・機能が回復する事を解明した。これらにより、Gly105 は M2 上の最適な位置に局在する柔軟な関節として各反応素過程で機能し、ATP 分解に共役した Ca<sup>2+</sup> 輸送を成立させていることが解明された（図 2）（「主な発表論文等」③）。

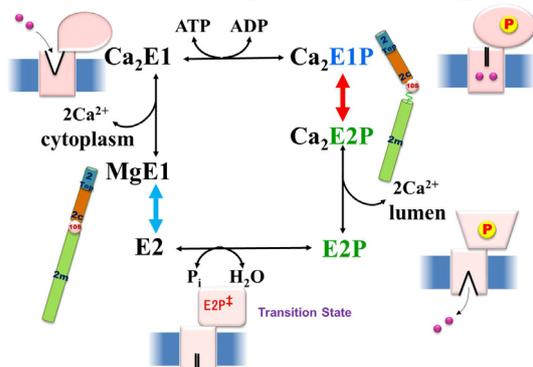


図2. Gly105 は M2ヘリックスの最適位置に局在する柔軟な関節として機能する。

③ **M2 先端部と A, P ドメインとの集合状態変化**

**化の機能的意義**：E2P 基底状態では、M2 先端部 Tyr122/Leu119 が A, P ドメインの疎水性 5 残基と強く結合して Ca<sup>2+</sup> 放出路を開口し、同時に E2P 分解の触媒部位を形成させることを当研究グループは変異体の生理的条件下での構造・機能解析により予想している（引用文献①）。一方、界面活性剤 C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 存在下、低 pH (5.7) で輸送部位がプロトン化した E2·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup> 結晶構造（引用文献②）や高濃度 (50mM) Mg<sup>2+</sup> で輸送部位に Mg<sup>2+</sup> が結合した場合（引用文献③）、Tyr122/Leu119 は他の 5 残基とは疎水結合しておらず、生理的条件下での酵素学的・生化学的知見に矛盾する。そこで本研究では、特に E2P 基底状態アナログ E2·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup> について、Tyr122/L119 と A, P ドメインの集合状態変化に対する C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>, pH, 輸送部位への Mg<sup>2+</sup> や K<sup>+</sup> の低親和性結合の影響を、既に我々が確立した生化学的手法（プロテアーゼに対する抵抗性の変化）により調べ、E2P 異性化・分解とゲーティングへの影響を解析した。その結果、E2P における当構造領域の集合状態は C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> や溶液条件により大きく変化する事を見出し、さらにゲート開口と閉口、E2P 加水分解の触媒形成の構造プロセスにおける当該領域の逐次的構造変化の実態を予測し、細胞内環境の変化や膜揺らぎに対応した輸送機能成立の構造機序の理解を深めた。そして、柔軟な E2P 構造 (E2·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>) 構造について、生理的条件下で機能する真の姿を結晶構造解析や単粒子解析、1 分子動態解析により解明する事が必須の課題である事を示した（「主な発表論文等」②、④）。

④ **膜脂質分子のポンプ機能への関与**：膜脂質頭部とポンプ蛋白分子との静電的および疎水性（立体的）相互作用の機能的意義を解明するため、Nanodisc（図 3）に組み込む脂質の種類を変えて、ポンプの速度論的機能解析を行った。その結果、ホスファチジルコリン (PC) が他の脂質頭部（ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール）に比べ、静電的にも立体的にも圧倒的にポンプ機能に有利であること、そして PC を主成分とする筋小胞体膜が如何にポンプ機能に有利に作用しているかを解明した（「主な発表論文等」①）。

⑤ **筋小胞体 Ca ポンプ E1PCa<sub>2</sub> 構造アナログ (E1Ca<sub>2</sub>·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup>) の安定化と新規開発**：E1Ca<sub>2</sub>·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup> の結晶化条件、特に膜脂質と蛋白構造の揺らぎを生じさせる界面活性剤 C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 存在下での安定化には Ca<sup>2+</sup> 放出型の E2·BeF<sub>3</sub><sup>-</sup> への構造異性化（引用文献④、E1PCa<sub>2</sub> → E2P + 2Ca<sup>2+</sup> の反応アナログ）を防ぐことにある。そこで C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 存在下で [Ca<sup>2+</sup>], [Mg<sup>2+</sup>], pH, [K<sup>+</sup>] について吟味し、安定化条件を探索した。また Mg<sup>2+</sup> よりも強く触媒部位に結合する Mn<sup>2+</sup> も利用した。他方、E1PCa<sub>2</sub> を著明に安定化して E2P への異性化を阻害する化学修飾、即ちリン酸化部位 Asp351 近傍の二つの

システイン残基 (Cys344/Cys364) の *N*-エチルマレイミド修飾によって安定な  $E1Ca_2 \cdot BeF_3^-$  を形成し、その構造状態を解析し安定化条件を探索した。

⑥ **膜蛋白 1 分子動態解析法の開発と実施：**

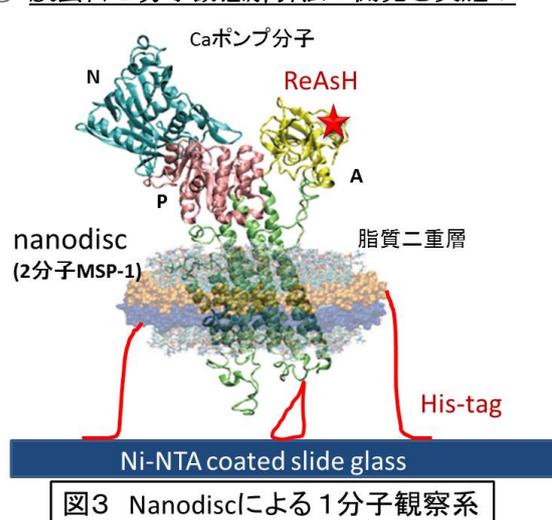


図3 Nanodiscによる 1分子観察系

A ドメインへ TC-Tag を導入した Ca ポンプ変異体の正常な発現・機能を確認し、TC-Tag を ReAsH で特異的蛍光ラベル、さらに、MSP-1 蛋白と当該 ReAsH ラベル Ca ポンプから Nanodisc (図 3) を形成・精製するシステムを確立した。そして、当該 Nanodisc をスライドガラス観察面に吸着させ、3 次元動態解析顕微鏡による Ca ポンプ 1 分子動態解析を実施した。この際、 $E1Ca_2$  状態を標準状態 (コントロール) として、ReAsH ラベルの動きと相対位置を解析した。また、メタルフッ素 ( $BeF_3^-$ ,  $AlF_4^-$ ,  $MgF_4^-$ ) により固定した各中間体アナログの其々の構造状態、および ATP によるポンプ作動時の動きを解析した。そして、各構造状態間の構造遷移の特性、即ち A ドメインの生理的条件下での動きを露わにする解析データを取得することに成功した。

⑦ **フリッパーゼ解析：** ヒトフリッパーゼ (ATP8A1, ATP9A, ATP9B) と ATP8A1 サブユニット CDC50 の大量発現を、京都大学・申准教授の協力を得て培養細胞系により確立し、各蛋白を含む膜面分 (ミクロソーム) を単離し機能解析した。その結果、ATP8A1 の基質はホスファチジルセリン (PS) である事を同定し、さらに、速度論的解析により、リン酸化中間体の形成・構造異性化・加水分解の各反応素過程における基質脂質や他の脂質の影響を明らかにして、反応機序の解明のための基本情報を得た。

(2) **SERCA2b 遺伝子点変異による発癌：** ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) による網羅的変異導入を利用したヒト発癌モデル突然変異体マウスの大規模検索プロジェクトで 15 系統以上の発癌マウス変異体を樹立し、さらにその内の 4 系統は SERCA2b 遺伝子に点突然変異を有して食道にヒトの場合と類似した遅発性の扁平上皮癌を発症する事を見出した。そして発癌マウスモデルについて、表現型差異、各組織における癌分布と SERCA2b 発現等の詳細な病理学的解析を進めた (引用文献⑤)。さらに、培養動物細胞でこれら変異 SERCA2b 蛋白を発現し、発現異常と機能異常の特性 (即ち、輸送速度・脱共役・細胞質および内腔  $Ca^{2+}$  其々の親和性・速度論的特性)、など変異の影響を詳細に解析している。

<引用文献>

- ① Kazuo Yamasaki, Wang Gouli, Takashi Daiho, Stefania Danko, Satoshi Yasuda, and Hiroshi Suzuki. Roles of Tyr122-Hydrophobic Cluster and  $K^+$  Binding in  $Ca^{2+}$ -releasing Process of ADP-insensitive Phosphoenzyme of Sarcoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. J. Biol. Chem. Vol. 283, 2008, 29144-29155.
- ② Chikashi Toyoshima, Yoshiyuki Norimatsu, Shiho Iwasawa, Takeo Tsuda, and Haruo Ogawa. How processing of aspartylphosphate is coupled to lumenal gating of the ion pathway in the calcium pump. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 104, 2007, 19831-19836.
- ③ Claus Olesen, Martin Picard, Anne-Marie Lund Winther, Claus Gyurup, J. Preben Morth, Claus Oxvig, Jesper Vuust Møller and Poul Nissen. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. Nature Vol. 450, 2007, 1036-1042.
- ④ Stefania Danko, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Xiaoyu Liu, and Hiroshi Suzuki. Formation of Stable Structural Analog of ADP-sensitive Phosphoenzyme of  $Ca^{2+}$ -ATPase with Occluded  $Ca^{2+}$  by Beryllium Fluoride : Structural Changes during phosphorylation and isomerization. J. Biol. Chem. Vol. 284, 2009, 22722-22735.
- ⑤ Hideaki Toki, Osamu Minowa, Maki Inoue, Hiromi Motegi, Yuko Karashima, Ami Ikeda, Hideki Kaneda, Yoshiyuki Sakuraba, Yuriko Saiki, Shigeharu Wakana, Hiroshi Suzuki, Yoichi Gondo, Toshihiko Shiroishi, and Tetsuo Noda. Novel allelic mutations in murine Serca2 induce differential development of squamous cell tumors. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 476, 2016, 175-182.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, Satoshi Yasuda, and Hiroshi Suzuki. Nanodisc-based kinetic assays reveal distinct effects of phospholipid head groups

on the phosphoenzyme transition of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. J. Biol. Chem. 査読有、Vol.292, 2017, 20218-20227

DOI: 10.1074/jbc.M117.816702

- ② Stefania Danko, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Hiroshi Suzuki. Structure/function of Ca-ATPase revealed by mutations, kinetics, and structural analyses of reaction intermediates. Scientific Reports. 査読有、Vol.7, 2017, 41172

DOI: 10.1038/srep41172

- ③ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki. Glycine 105 as Pivot for a Critical Knee-like Joint between Cytoplasmic and Transmembrane Segments of Second Transmembrane Helix in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. J. Biol. Chem. 査読有、2016, Vol.291, 24688-24701

DOI: 10.1074/jbc.M116.759704

- ④ Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, and Hiroshi Suzuki. Assembly of a Tyr122-hydrophobic Cluster in Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Synchronizes  $\text{Ca}^{2+}$  Affinity-reduction and Release with Phosphoenzyme Isomerization. J. Biol. Chem. 査読有、Vol.290, 2015, 27868-27879

DOI: 10.1074/jbc.M115.693770

- ⑤ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki. J. Biol. Chem. 査読有、Vol.290, 2015, 27868-27879. Second Transmembrane Helix (M2) and Long Range Coupling in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. J. Biol. Chem. 査読有、Vol.289, 2014, 31241-31252

DOI: 10.1074/jbc.M114.584086

[学会発表] (計3件)

- ① Hiroshi Suzuki, Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, and Stefania Danko. Structure/function of Ca-ATPase revealed by mutations, kinetics, and structural analyses of reaction intermediates. The 15th International Conference of "Na, K-ATPases and Related Transport ATPases. 2017年9月26日、Otsu (Japan)

- ② Kazuo Yamasaki, Takashi Daiho, Stefania Danko, Satoshi Yasuda, and Hiroshi Suzuki. Effects of phospholipid's head groups on the properties of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase embedded in nanodisc. The 15th International Conference of "Na, K-ATPases and Related Transport ATPases. 2017年9月24-30日、Otsu (Japan)

- ③ Takashi Daiho, Kazuo Yamasaki, Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki. Glycine 105 as Pivot for a Critical Knee-like Joint between Cytoplasmic and Transmembrane Segments of the Second Transmembrane Helix in  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. The 15th International Conference of "Na, K-ATPases and Related Transport ATPases. 2017年9月24-30日、Otsu (Japan)

[図書] (計2件)

- ① Stefania Danko, and Hiroshi Suzuki. Human Press, Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 1377. The Use of Metal Fluoride Compounds as Phosphate Analogs for Understanding the Structural Mechanism in P-type ATPases. 2016, 195-209 ページ

- ② Hiroshi Suzuki, and Stefania Danko. Human Press, Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 1377. Phosphorylation/Dephosphorylation Assays. 2016, 211-226 ページ

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：大保 貴嗣

ローマ字氏名：DAIHO Takashi

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：90207267

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：山崎 和生

ローマ字氏名：YAMASAKI Kazuo

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8桁)：60241428

### (3) 研究分担者

研究分担者氏名：安田 哲  
ローマ字氏名：YASUDA Satoshi  
所属研究機関名：旭川医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：80749896

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：政池 知子  
ローマ字氏名：MASAIKE Tomoko

(5) 研究協力者

研究協力者氏名：美野輪 治  
ローマ字氏名：MINOWA Osamu

(6) 研究協力者

研究協力者氏名：ダンコー ステファニア  
ローマ字氏名：DANKO Stefania

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。