

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04353

研究課題名(和文) 架橋酵素による自然免疫の応答制御と腸内細菌の維持機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism to maintain homeostasis in gut microbiota through protein-protein cross-linking by transglutaminase

研究代表者

川畑 俊一郎 (Kawabata, Shun-ichiro)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：90183037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハエのトランスグルタミナーゼ(TG)に関する本研究により、以下の点が解明された。1) TGは形態形成、体液凝固、感染微生物の包囲化に重要な役割を果たす。2) 転写因子Relishを阻害することで腸内細菌に対する過剰な反応を制御している。3) 腸管においては、キチン結合タンパク質を架橋することで強固な囲食膜の形成に関与している。4) 腸管の常在菌に対する恒常性維持に深く関与している。また、TG遺伝子から選択的スプライシングにより、TG-AとTG-Bの2種類のアイソフォームが産生されることを明らかにするとともに、TG-AのみがN末端の脂質修飾により、細胞外へ分泌されるという新しい分泌機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We obtained following findings through the project on Drosophila TG supported by this grant. TG (i) plays an important role in cuticular morphogenesis, hemolymph coagulation, and entrapment against invading pathogens, (ii) suppresses the immune deficiency pathway to enable immune tolerance against commensal bacteria through the incorporation of polyamines into the NF- κ B-like transcription factor Relish as well as through the protein-protein cross-linking of Relish, (iii) forms a physical matrix in the gut through cross-linking of chitin-binding proteins, and (iv) is involved in the maintenance of homeostasis in microbiota in the gut. In addition, we found the evidence that TG-A, one of alternative splicing-derived isoforms of Drosophila TG, is secreted through an endoplasmic reticulum/Golgi-independent pathway involving exosomes and fatty acylations.

研究分野：生化学、節足動物の自然免疫

キーワード：腸内細菌叢 囲食膜 トランスグルタミナーゼ タンパク質間の架橋 キチン結合タンパク質 ポリアミン ノトバイオートハエ 遺伝子ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

TG は、グルタミン残基とリジン残基の側鎖をイソペプチド結合で架橋する酵素である。ヒトでは 8 種類の TG が同定されており、細胞外基質や皮膚の形成、フィブリン架橋などに関与する。一方、黄色キイロショウジョウバエ(ハエ)には 1 個の遺伝子しか存在せず、TG の機能解析には最適の動物モデルである。申請者らは、ハエ TG をノックダウン(TG-RNAi)すると、生存率が低下すること、翅の水疱形成や腹部の模様の消失を引き起こすことなどを報告した。ハエの自然免疫系には Toll と Imd の経路が存在し、腸管では Imd 経路が発現している。Imd 経路のペプチドグリカン受容体は、細菌細胞壁のペプチドグリカンを認識する受容体であり、下流で働く NF- κ B 様転写因子の Relish が抗菌ペプチドの産生を促す。そのペプチドグリカン受容体は、常在細菌にも応答するため、常在細菌に対する過剰な免疫応答を抑制する機構が存在するはずである。ヒト肝障害の細胞においては、TG2 が転写因子 Sp1 を架橋することで、受容体遺伝子 *c-Met* の転写を抑制すること、また、ガン細胞では、転写因子 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) 依存的に発現した TG2 が、カスパーゼ 3 を架橋して失活させ、NF- κ B 経路を活性化してアポトーシスを抑制することが報告されていた。

私たちは、通常飼育条件下において、ハエ TG が Relish を架橋により不活性化し、腸内細菌に対する過剰な抗菌ペプチド産生を抑制していることを明らかにした。事実、TG-RNAi を行うと TG による転写抑制が解除され、抗菌ペプチド産生が著しく亢進した。興味深いことに、TG-RNAi は、ハエの生存率低下を引き起こした。

また、私たちは、ハエ TG が腸管の囲食膜形成に関与することも見出した。囲食膜は、昆虫の腸管内腔を覆うキチンとキチン結合性タンパク質から成る構造体である。囲食膜は、哺乳類腸管のムチン層に相当し、微生物や異物が腸管上皮に接触することを防御している。申請者らは、囲食膜の構成タンパク質であるドロスクリスタリンとペリトロフィン 15b (Pin15b) を TG の基質として同定したがその機能は不明であった。

以上のように TG は細胞の内外で機能しているが、分泌に必要とされる通常の分泌シグ

ナル配列は存在しない。ハエ TG には、mRNA の選択的スプライシングの結果、TG-A と TG-B の 2 種類が存在するが、それらの機能の差異や局在性は不明である。TG-A と TG-B は、共通の C-末領域(730 残基)にそれぞれ 46 残基と 38 残基の異なる配列が N-末側に付加されたものである。申請者らは、TG-A の N-末端配列に N-ミリスチル化に対するコンセンサス配列が含まれていることを見出した。この脂質修飾が TG の局在性に関与することを示唆していた。

2. 研究の目的

私たちは、ハエ TG が、通常飼育下において、抗菌ペプチド産生を担う転写因子を架橋により不活性化し、腸内細菌に対する過剰な免疫応答を抑制することで、腸内細菌の数と多様性の維持に働いていると推定した。つまり、TG 遺伝子のノックダウンにより、抗菌ペプチドの過剰産生が腸内細菌叢を変化させ、活性酸素分子種(ROS)の産生を亢進し、腸管上皮のアポトーシスを誘導する可能性が高い。本研究では、ノックダウン前後の腸内細菌を同定するとともに、単離した腸内細菌を単一で定着させたノトパイオートハエを作成して、TG による自然免疫の応答制御と腸内細菌に対する共生成立の分子機構を明らかにしたい。また、TG は細胞内だけでなく細胞外でも機能しており、TG の腸管上皮からの分泌機構、および腸管の防御壁としての囲食膜の形成に及ぼす TG の役割を解明したい。

3. 研究の方法

(1) 腸内細菌の 16S rRNA やゲノム解析を行って、野生型と TG-RNAi の腸内細菌を同定し、腸内細菌を単離培養する。腸内細菌を定着させたノトパイオートハエを用いて、TG-RNAi で誘導される生存率低下の原因となる腸内細菌を同定するとともに、原因物質の同定を行う。

(2) TG-RNAi による腸管の抗菌ペプチドの産生の経時変化を追跡するとともに、同時に TG-RNAi で惹起される ROS 産生系との相関について解析する。TG は Ca^{2+} 依存性の酵素であり、腸管上皮の細胞内 Ca^{2+} 濃度を Ca^{2+} 反応性蛍光試薬で測定する。TG-RNAi の腸管での ROS 活性を定量し、ROS 反応性の蛍光色素を用いて組織染色を行う。

(3) 囲食膜の TG 基質をノックダウンして感

染菌に対する生存率の変化を解析する。囲食膜破壊を引き起こす感染菌の毒素成分を同定し、基質や毒素成分の組換え体を機能解析する。

(4) *N*-ミリスチル化の修飾と TG-A の分泌との関係をノックダウンハエにより解析する。TG-A 遺伝子を導入した S2 細胞の *N*-ミリスチル化転移酵素のノックダウンを行って、TG-A の局在性の変化を調べる。無細胞タンパク質合成系を用いて、TG-A のミリスチル化を調べる。ハエの感染時における TG-A、TG-B の組織発現や内局在性の変化を調べる。

4. 研究成果

(1) ハエ TG は囲食膜のドロソクリスタリンを架橋し、繊維状構造を形成した。未架橋のドロソクリスタリンは、病原細菌の分泌プロテアーゼにより、容易に分解された。さらに、TG-ノックダウンハエに病原性細菌を経口感染させた結果、腸管上皮細胞が高頻度で死滅し、ハエは短命となった。以上の知見により、TG によるドロソクリスタリン繊維の安定化は、感染微生物の分泌するプロテアーゼによる囲食膜の破壊を防ぎ、細菌や毒素の腸管上皮細胞への侵入を遮断していることが明らかとなった (発表論文 1, 5)。

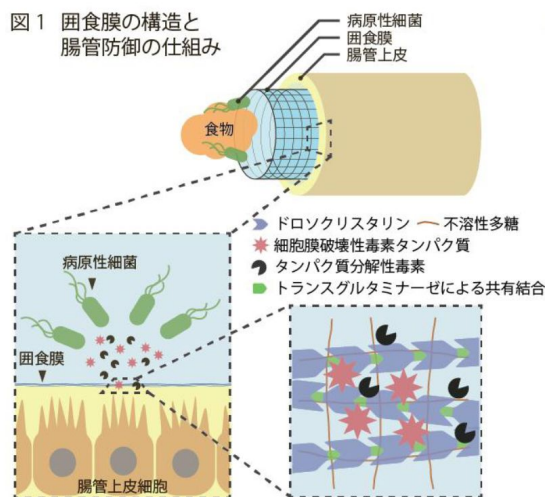


図 1. 囲食膜の構造と腸管防御の仕組み

(2) ハエ腸管には、10~50 種、約 500 万個の腸内細菌が常在しており、宿主の自然免疫系により管理されている。ハエ TG が、抗菌ペプチド産生を担う NF- κ B 様転写因子を化学架橋することにより阻害し、腸内細菌に対する過剰な免疫応答を抑制することで Symbiosis 関係を生み出していることを見出した。次世

代シーケンサーを用いて、腸内細菌叢の 16S rRNA (V4 領域) の解析を行った。羽化後 0.5 日目の野生型ハエではアセトバクター属が 92% を占め、残り 8.0% をプロビデンシア属が占めた。一方、TG ノックダウンハエでは、全体の 77% がプロビデンシア属、22% がアセトバクター属であった。また、それらの菌株を無菌バエに移植したノトバイオートハエの作成に成功した。実際に、野生型のショウジョウバエの腸内細菌叢が酢酸菌属でほとんど占められている事実は、推定外の驚くべきことであった。

腸管から単離した 4 種の細菌株 (SK1 ~ SK4) の抗菌ペプチドと活性酸素に対する耐性を比較するとともに、SK1 ~ SK4 を腸管に取り込ませたノトバイオートハエ (gnotobiotic flies) の性質を解析した。さらに、無菌バエに SK1 と SK4 を 1:1 の比率で感染させると菌を単独で感染させたハエよりも短命となることが判明した (発表論文 2, 5)。

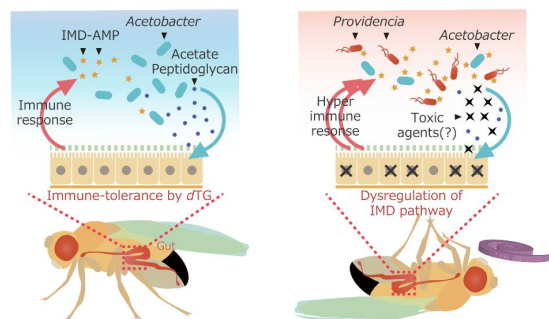


図 2. TG による IMD 経路の負の制御による恒常性維持機構

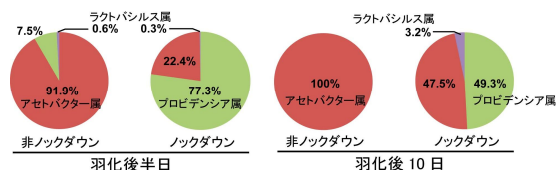


図 3. TG ノックダウン後の腸内細菌叢の変化

(3) TG 合成基質ダンシルカダベリン (DCA) と質量分析を用いて、Relish の TG 架橋部位の 6 個 Gln 残基を同定した。それら全ての Gln 残基は、Relish の DNA 結合に重要なドメインに含まれていた。さらに、Relish の DNA 結合実験より、TG によって DCA を取り込ませた Relish は DNA の結合能力が低下することが明らかとなった。生体内の解析においては、ポリアミンの 1 つであるスペルミンを摂食させたハエにおいて、抗菌ペプチドの 1 つである

Diptericin の発現量が減少した。一方で、TG ノックダウンハエにおいては、スベルミンによる免疫応答抑制が起らなかった。生体内において、TG の基質となるポリアミンが Relish に架橋されることで Relish の DNA 結合性を低下させ、転写因子の活性を抑制していると考えられた (発表論文 3, 5)。

(4) ハエ TG の 2 種類のスプライズバリエーション (TG-A および TG-B) のうち、TG-A の N-末端領域は N-ミリスチル化および S-パルミトイル化の修飾を受けること、さらに両脂質修飾により細胞内局在が変化し、細菌感染依存的な分泌が引き起こされることを見出した。さらに TG-A は細胞内の多胞体 (MVB) を介してエクソソーム小胞として分泌されることも判明した (発表論文 4, 5)。

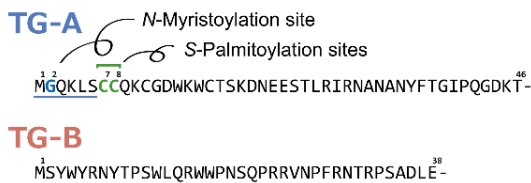


図 4. TG-A の N-末端領域の脂質修飾

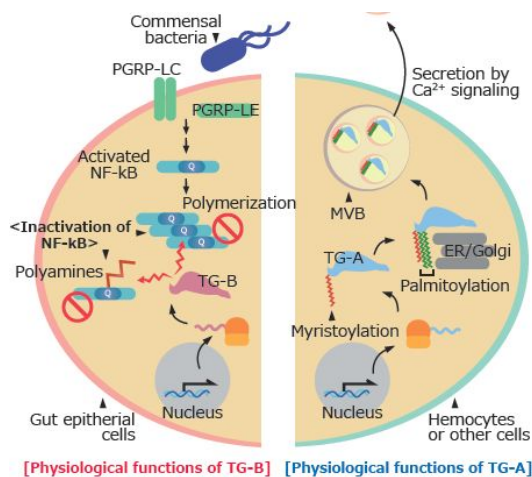


図 5. TG-A のエクソソームを介した分泌の分子機構モデル

(5) Pin15b は、キチン結合性ドメインを有していること、また腸管での mRNA の発現量が高いことから、本タンパク質は囲食膜を構成していることが推定された。そこで Pin15b 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、囲食膜に繊維状に Pin15b が存在していることが示された。続いて Pin15b の生体防御への役割を調べる目的で、*Pin15b* のノックダウンを行った。*Pin15b*-RNAi ハエはコントロール系統と比較

して囲食膜の透過性上昇が観察され、病原性細菌の経口感染により有意に生存率が低下した。また、ウェスタンブロットによる解析の結果、Pin15b は囲食膜上で TG により架橋されること、さらには高度な O 型糖鎖修飾が起こっていることが明らかとなった (未発表)。

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 5 件)

- 1) Shibata, T. and Kawabata, S.: Pluripotency and a secretion mechanism of *Drosophila* Transglutaminase. *J. Biochem.* **163**, 165-176 (2018). (doi: 10.1093/jb/mvx059) (総説)(査読有).
- 2) Shibata, T., Hadano, J., Kawasaki, D., Dong, X., and Kawabata, S.: *Drosophila* TG-A transglutaminase is secreted via an unconventional Golgi-independent mechanism involving exosomes and two types of fatty acylations. *J. Biol. Chem.*, **292**, 10723-10734 (2017). (DOI: 10.1074/jbc.M117.779710) (査読有).
- 3) Maki, K., Shibata, T., and Kawabata, S. Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines masks the DNA-binding region of the transcription factor relish. *J. Biol. Chem.*, **292**, 6369-6380 (2017). (doi:10.1074/jbc.M117.779579) (査読有).
- 4) Sekihara, S., Shibata, T., Hyakkendani, M., and Kawabata, S.: RNA interference directed against the transglutaminase gene triggers dysbiosis of gut microbiota in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **291**, 25077-25087 (2016). (doi:10.1074/jbc.M116.761791) (査読有).
- 5) Shibata, T., Maki, K., Hadano, J., Fujikawa, T., Kitazaki, K., Koshihara, T., and Kawabata, S.: Crosslinking of a peritrophic matrix protein protects gut epithelia from bacterial exotoxins. *PLoS Pathog.* **11**, e1005244 (2015). (doi: 10.1371/journal.ppat.1005244) (査読有).

[学会発表](計 34 件)

- 1) 深江由望, 榎 光輝, 柴田 俊生, 川畑 俊一郎: ショウジョウバエ囲食膜タンパク質 Peritrophin-15 の機能解析. 第 90 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6~9 日.
- 2) 榎 光輝, 柴田 俊生, 川畑 俊一郎: トランスグルタミナーゼとポリアミンを介した NF-κB 転写因子の調節機構. 第 90 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6~9 日.
- 3) 柴田 俊生, 榎 光輝, 川畑 俊一郎: キイロショウジョウバエを用いたトランスグルタミナーゼ (TG) の生理機能と分泌機構の解

明. 第 90 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、2017 年 12 月 6~9 日.

4) Shibata, T., Maki, K., Fujikawa, T., and Kawabata, S.: Transglutaminase-catalyzed crosslinking of peritrophic matrix proteins maintains the gut epithelial immunity in *Drosophila*. Entomology 2017 in the Annual meeting of Entomological Society of America. Denver, Co., U. S. A. November 5-8, 2017. (招待講演)

5) Shibata, T., Maki, K., Fujikawa, T., and Kawabata, S.: Transglutaminase-catalyzed crosslinking of peritrophic matrix proteins maintains the gut epithelial immunity in *Drosophila*. European *Drosophila* Research Conference. London, England, September 22-25, 2017. (招待講演)

6) 榎 光輝, 柴田 俊生, 川畑 俊一郎: 架橋酵素とポリアミンを介した NF- κ B 様転写因子 Relish の調節機構. 日本比較免疫学会第 29 回学術集会、北海道大学、2017 年 8 月 24~26 日.

7) 柴田 俊生, 羽田野 仁喜, 川崎 大地, Dong Xiaqing, 川畑 俊一郎: 脂質修飾とエクソソームを介したショウジョウバエトランスグルタミナーゼの分泌機構. 日本比較免疫学会第 29 回学術集会、北海道大学、2017 年 8 月 24~26 日.

8) 柴田俊生、羽田野仁喜、川崎大地、董曉晴、川畑俊一郎: エクソソームを介したショウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞外分泌機構. 第 28 回日本生体防御学会、相模原市文化会館、2017 年 6 月 29 日~7 月 1 日.

9) 榎 光輝、柴田俊生、川畑俊一郎: トランスグルタミナーゼとポリアミンを介した NF- κ B 様転写因子 Relish の調節機構. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、宮日会館、および宮崎大学医学部、2017 年 5 月 13~14 日.

10) 柴田俊生、羽田野仁喜、川崎大地、董曉晴、川畑俊一郎: エクソソームを介したショウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞外分泌機構. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、宮日会館、および宮崎大学医学部、2017 年 5 月 13~14 日.

11) 川畑俊一郎: ショウジョウバエ腸内細菌の共生と破綻の分子機構. 第 90 回日本細菌学会総会. シンポジウム招待講演、仙台国際センター、2017 年 3 月 19~21 日. (招待講演)

12) Shibata, T., Hadano, J., Shibata, T., Dong, X., and Kawabata, S.: S-Palmitoylation is essential for secretion of transglutaminase upon bacterial infection. (Poster) The Second Asian Invertebrate Immunology Symposium. Yuanzheng Qizhen Hotel, Hangzhou, China, October 14-17, 2016, China.

13) Dong, X., Shibata, T., Hadano, J., and

Kawabata, S.: Fatty-acid modifications control secretion of an alternative splicing form of *Drosophila* transglutaminase is secreted on exosome-like vesicles. (Poster) The Second Asian Invertebrate Immunology Symposium. Yuanzheng Qizhen Hotel, Hangzhou, China, October 14-17, 2016, China.

14) Shibata, T., Hadano, J., and Kawabata, S.: Fatty-acid modifications control intracellular localization and secretion of *Drosophila* transglutaminase. The Second Asian Invertebrate Immunology Symposium. Yuanzheng Qizhen Hotel, Hangzhou, China, October 14-17, 2016, China.

15) Sekihara, S., Shibata, T., and Kawabata, S.: RNA interference directed against the Transglutaminase gene triggers dysbiosis of gut microbiota in *Drosophila*. The Second Asian Invertebrate Immunology Symposium. Yuanzheng Qizhen Hotel, Hangzhou, China, October 14-17, 2016, China.

16) Maki, K., Fukae, Y., Shibata, T., and Kawabata, S.: Functional analysis of a peritrophic matrix protein in *Drosophila*. Second Asian Invertebrate Immunology Symposium. Yuanzheng Qizhen Hotel, Hangzhou, China, October 14-17, 2016, China.

17) 榎 光輝、柴田俊生、川畑俊一郎: トランスグルタミナーゼによる NF- κ B 様転写因子 Relish の修飾. 第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター、2016 年 9 月 25~27 日.

18) 柴田俊生、羽田野仁喜、董曉晴、川畑俊一郎: 感染防御に関わるショウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞外分泌経路解析. 第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター、2016 年 9 月 25~27 日.

19) 関原早苗、柴田俊生、川畑俊一郎: 宿主と腸内細菌の共生破綻を誘導する感染菌の単離と性質. 第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター、2016 年 9 月 25~27 日.

20) 羽田野仁喜、柴田俊生、董曉晴、川畑俊一郎: ショウジョウバエトランスグルタミナーゼの細菌感染依存的な細胞外分泌機構. 第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター、2016 年 9 月 25~27 日.

21) 深江由望、榎 光輝、柴田俊生、川畑俊一郎: ショウジョウバエ腸管の囲食膜構成タンパク質の機能解析. 日本比較免疫学会第 28 回学術集会、東京医科歯科大学、2016 年 8 月 18~20 日.

22) 柴田俊生、羽田野仁喜、川畑俊一郎: タンパク質架橋酵素の脂質修飾と細菌依存的な分泌機構. 日本比較免疫学会第 28 回学術集会、東京医科歯科大学、2016 年 8 月 18~20 日.

23) 柴田俊生、董 曉晴、羽田野仁喜、川畑俊一郎: ショウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞外分泌機構解明. 口頭発表.

平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2016 年 5 月 14~15 日。

24) 董 暁晴、柴田俊生、羽田野仁喜、田川圭介、川畑俊一郎：脂質修飾によるシヨウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞内局在性調節機構。口頭発表。平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2016 年 5 月 14~15 日。

25) 深江由望、榎 光輝、柴田俊生、川畑俊一郎：シヨウジョウバエ腸管の囲食膜構成タンパク質の機能解析。口頭発表。平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2016 年 5 月 14~15 日。

26) 榎 光輝、深江由望、柴田俊生、川畑俊一郎：シヨウジョウバエの架橋酵素と囲食膜タンパク質による囲食膜形成の分子機構。口頭発表。平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、鹿児島大学郡元キャンパス、2016 年 5 月 14~15 日。

27) 羽田野仁喜、柴田俊生、川畑俊一郎：シヨウジョウバエにおけるトランスグルタミナーゼの細胞外分泌機構。ポスター発表。第 88 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド国際会議場、2015 年 12 月 1~4 日。

28) 榎 光輝、柴田俊生、深江由望、吉田邦嵩、川畑俊一郎：トランスグルタミナーゼと囲食膜構成タンパク質の生体防御における役割。ポスター発表。第 88 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド国際会議場、2015 年 12 月 1~4 日。

29) 柴田俊生、羽田野仁喜、田川圭介、関原早苗、川畑俊一郎：脂質修飾が引き起こすシヨウジョウバエトランスグルタミナーゼの細胞内局在性の変化。一般演題。口頭発表（ポスター発表兼）。第 88 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド国際会議場、2015 年 12 月 1~4 日。

30) 榎 光輝、柴田俊生、吉田邦嵩、川畑俊一郎：架橋酵素と囲食膜構成タンパク質の生体防御における役割。一般演題。口頭発表。第 27 回日本比較免疫学会学術集会、福井県小浜市働く婦人の家、2015 年 8 月 21~23 日。

31) 羽田野仁喜、柴田俊生、川畑俊一郎：シヨウジョウバエにおける架橋酵素の細胞外分泌機構。一般演題。口頭発表。第 27 回日本比較免疫学会学術集会、福井県小浜市働く婦人の家、2015 年 8 月 21~23 日。

32) 柴田俊生、関原早苗、藤川 匠、榎 光輝、宮地隆太、石原 健、小柴琢己、川畑俊一郎：シヨウジョウバエの腸内細菌に対する免疫応答と寛容の分子機構。シンポジウム（招待講演）。第 36 回日本炎症・再生医学会、東京（虎ノ門ヒルズ森タワー）、2015 年 7 月 21~22 日。（招待講演）

33) 柴田俊生、羽田野仁喜、関原早苗、小柴

琢己、川畑俊一郎：脂質修飾によるトランスグルタミナーゼの局在化の制御機構。一般演題。口頭発表。平成 27 年度 第 26 回日本生体防御学会学術総会、東京（台東区生涯学習センターミレニアムホール）、2015 年 7 月 10~12 日。

34) 関原早苗、柴田俊生、川畑俊一郎：シヨウジョウバエの腸内共生細菌叢から単離した *Acetobacter* 属の性質。一般演題。口頭発表。平成 27 年度日本生化学会九州支部例会、福岡（九州大学）、2015 年 5 月 16~17 日。

〔図書〕(計 1 件)

1) Shibata, T. and Kawabata, S.: Transglutaminase in Invertebrates. In *Transglutaminases: multiple functional modifier and targets for new drug discovery* (Hitomi, K., Kojima, S., and Fesus, L. Eds.) (2015), pp 117-127, Springer, Tokyo, Heidelberg, New York, and London.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)
なし

○取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~biopoly/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川畑 俊一郎 (KAWABATA Shun-ichiro)
九州大学・大学院理学研究院・教授
研究者番号：90183037

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

柴田 俊生 (SHIBATA Toshio)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：00614257

(4)研究協力者

なし