

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19329

研究課題名(和文)低アレルゲン化ワクチンを用いたアレルゲン免疫療法によるイヌアレルギー治療への挑戦

研究課題名(英文)Challenge for treatment of dog allergy by allergen immunotherapy using hypoallergenic vaccine

研究代表者

乾 隆 (Inui, Takashi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：80352912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：X線結晶構造解析により、アレルゲンタンパク質のCanis familiaris allergen 1 (Can f 1) およびCan f 6の立体構造を、それぞれ2.5 および2.35 の分解能で得ることに成功した。得られた構造を基にしてIgEエピトープ予測を行い、予測した部位のアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した6種類の変異体Can f 1および3種類の変異体Can f 6を作製した。これら変異体のIgE反応性を調べたところ顕著に減少したが、IgE反応性低下の程度は変異を導入した部位や使用した患者血清に大きく依存することが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イヌアレルギーなどのI型アレルギーの発症メカニズムに関する研究報告は数多く存在するが、人為的に免疫寛容を誘導し根治を目指す応用研究は極めて少ない。特に、エピトープ部位に変異を導入した低アレルゲン化ワクチンの開発という試みは世界的にも類を見ず、学術的価値は非常に高い。全人口の約3人に1人が何らかのアレルギー疾患に罹患している我が国において、得られた変異型アレルゲンがワクチンとして有用であることが示されれば、イヌアレルギーのみならず、他の様々なアレルギーの治療にも応用できることから、社会に大いに貢献できるプロジェクトであると言える。

研究成果の概要(英文)：By X-ray crystal structure analysis, we succeeded in obtaining the three-dimensional structures of the allergen proteins Canis familiaris allergen 1 (Can f 1) and Can f 6 at 2.5 and 2.35 resolution, respectively. Based on the obtained structure, IgE epitopes of Can f 1 and Can f 6 were predicted, and by substituting the amino acid residues at the predicted sites with alanine, 6 types of mutant Can f 1 and 3 types of mutant Can f 6 were constructed. The IgE reactivity of these mutants was remarkably decreased when examined, but the extent of the decrease in IgE reactivity was found to depend largely on the site where the mutation was introduced and the patient serum used.

研究分野：タンパク質科学、構造生物学、免疫学

キーワード：イヌアレルギー リポカリンアレルゲン X線結晶構造解析 アレルゲンとエピトープ IgE

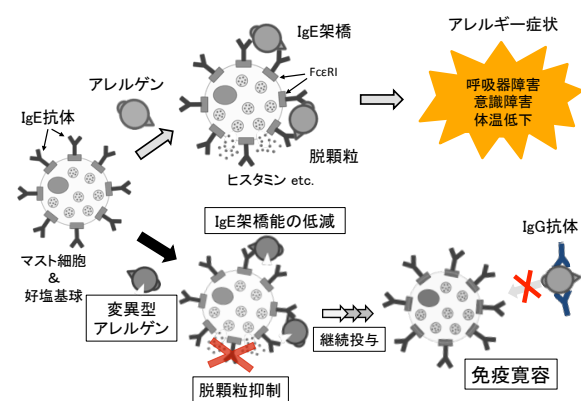
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イヌの飼育頭数の増加や身体障害者補助犬法の整備に伴い、イヌとヒトが直接的に接触する機会が増加している。その結果、イヌが産生・分泌するタンパク質がアレルゲンとなり惹起されるイヌアレルギーが、大きな社会問題となっている。イヌアレルギーは、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、およびアレルギー性鼻炎等を引き起こすI型アレルギーである。I型アレルギーの根治療法として、アレルゲンの継続投与により免疫寛容を導くアレルゲン免疫療法が実施されているが、アレルゲン自体の投与は副作用として重篤なアナフィラキシー反応を引き起こす危険性があるため、アナフィラキシー誘発活性を低下させた低アレルゲン化ワクチンの開発が望まれている。これまでに、イヌアレルギーとして7種類のタンパク質が同定されているが、イヌアレルギー患者血清中のIgEとの反応性から、唾液腺で産生・分泌される *Canis familiaris* allergen 1 (Can f 1) が主要イヌアレルギーであることが判明している (*J. Allergy Clin. Immunol.*, **87**, 1056-1065, 1991)。また、顎下腺で産生し、分泌される Can f 6 は、Can f 1 に次いでアレルゲン活性が高いが、両者はアミノ酸配列の相同性から共に生体内輸送タンパク質群であるリポカリンファミリーに属することが判明している (*Immunology*, **92**, 577-586, 1997)。

一般に、アナフィラキシー反応は、アレルゲンが肥満細胞や好塩基球上のIgE抗体と結合し、IgE受容体FcεRIが架橋することにより放出されるヒスタミン等が原因となり惹起される(図1上)。そこで、IgE結合親和性を低下させた変異型アレルゲンを継続投与すれば、脱顆粒を起こすことなくIgG抗体の産生が惹起され、IgGがアレルゲンと結合することによってIgEとアレルゲンとの結合が阻害され、結果として免疫寛容に導かれるのではないかという発想に至った(図1下)。

図1. アレルギー反応と免疫寛容機構



### 2. 研究の目的

本申請研究では、アナフィラキシー誘発活性を低減させた低アレルゲン化ワクチンの開発を目的とし、まずはX線結晶構造解析により、イヌアレルギータンパク質であるCan f 1およびCan f 6の立体構造を決定する。次に、得られたCan f 1およびCan f 6の構造に対してエピトープ予測アルゴリズムを用いて、アレルギーの原因であるIgE抗体が結合するエピトープ部位を予測する。予測されたエピトープ部位のアミノ酸に変異を導入することにより、ヒトIgEとの結合能を低下させた変異型Can f 1およびCan f 6を作製し、野生型および変異型Can f 1およびCan f 6の*in vitro*アレルギー活性の評価を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) イヌアレルギー患者血清中Can f 1およびCan f 6特異的IgE抗体価の測定

Can f 1およびCan f 6のアレルゲン活性をELISAにより確認した。ELISAには、一次抗体として22名のイヌアレルギー患者血清、および6名の健常者血清を用いた。その結果、Can f 1およびCan f 6に対する患者血清の反応性は45%および47.4%となり、精製したCan f 1およびCan f 6がイヌアレルギー患者血清に対して反応性を有していることが明らかとなった。

#### (2) Can f 1およびCan f 6の結晶化条件の検討および結晶構造解析

IgEエピトープの予測に必要な立体構造を明らかにするために、Can f 1およびCan f 6の結晶化、およびX線結晶構造解析を行った。Can f 1の結晶化は、20 mg/mlに調整したCan f 1 C118A溶液(20 mM Tris-HCl, pH 7.4)を用いた。結晶化母液として0.1 M imidazole (pH 6.5), 30% PEG3350, 6% isopropanol, 0.1 M CaCl<sub>2</sub>を用い、20°Cでのsitting drop蒸気拡散法により単結晶を得た。一方、Can f 6の結晶化は、17 mg/mlに調整したCan f 6溶液(20 mM リン酸緩衝溶液, pH 7.0)と結晶化母液(1.0 M リン酸二水素アンモニウム, 20% (w/v) PEG3350)を用い、sitting drop蒸気拡散法により単結晶を得た。それぞれの単結晶を用いてSPRING-8のビームラインBL26B1においてX線回折データを測定し、分解能2.5 Åおよび2.35 Åまでのデータを用いて分子モデルを構築した。Can f 1は56%の相同性をもつhuman tear lipocalinをサーチモデルとして、一方Can f 6は61%の相同性をもつイノシシ由来salivary lipocalin (PDB ID: 1GM6)をサーチモデルとしてMolrepによる分子置換法により初期位相を決定した。R factor=23.5%および20.3%, およびR free=27.5%および26.8%まで精密化を行い、両結晶構造を決定した。

#### (3) Can f 1およびCan f 6のIgEエピトープ予測と変異型Can f 1およびCan f 6の作製

Can f 1では、交差反応性を有するhuman tear lipocalinおよび交差反応性を示さないウマアレルゲンEqu c 1、マウスアレルギーMus m 1、ウシアレルギーBos d 2間でシークエンスアライメントを行い、さらにCan f 1の立体構造を利用してIgEエピトープ予測を行った。その

結果、6 残基のアミノ酸が IgE エピトープと予測され、それらをアラニンに置換した変異型 Can f 1 を作製した。一方、Can f 6 では、ネコアレルゲン Fel d 4、ウマアレルゲン Equ c 1 との交差反応性、および Can f 6 の立体構造を利用して IgE エピトープの予測を行った。3 種間でアラインメントを行った結果、高度に保存されている領域を同定した。次に、予測した領域を Can f 6 の立体構造上にマッピングし、溶媒面に露出しているアミノ酸残基を選択し、Can f 6 の IgE エピトープと予測した。エピトープ予測部位のアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を作製し、その IgE 結合親和性を、イヌアレルギー患者血清を用いた ELISA および Western blotting により確認した。

#### (4) 野生型および変異型 Can f 1 および Can f 6 の *in vitro* アレルゲン活性の評価

RS-ATL8 細胞(図 2)は、ラット培養マスト細胞株 RBL-2H3 細胞にヒト高親和性 IgE 受容体(Fc ε RI)を安定発現させ、NF-AT 応答性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株である (*Allergy*, 65, 1266-1273, 2010)。本細胞をイヌアレルギー患者血清にて感作し、段階希釈した野生型および変異型 Can f 1, あるいは Can f 6 を添加し、抗原刺激を行う。その後、細胞を溶解させ、ルシフェリンにより酵素反応を行い、その際に生じる化学発光量をアレルゲン活性の指標とし、野生型および変異型 Can f 1, あるいは Can f 6 のアレルゲン活性を評価する。

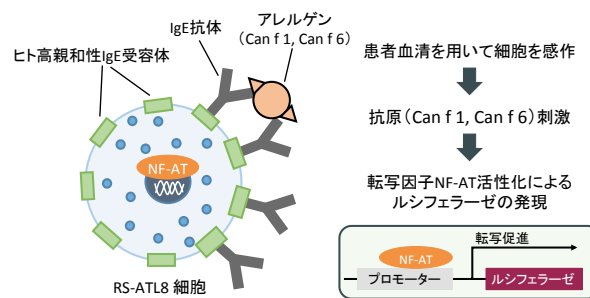


図2. RS-ATL8 cell assay

### 4. 研究成果

#### (1) Can f 1 および Can f 6 の X 線結晶構造解析

X 線結晶構造解析により決定した結晶構造の非対称単位中には 7 分子の Can f 1 C118A が存在していたが、 $\alpha$  炭素に関する RMSD は 0.41Å であることから同一の立体構造を有していると判断した。Can f 1 C118A は、リポカリンファミリーに保存された立体構造すなわち 8 本の逆平行  $\beta$  ストランドからなる  $\beta$  バレル構造を骨格とし、各  $\beta$  ストランドをつなぐフレキシブルなループと 1 本の  $\alpha$  ヘリックスを有していることが明らかとなった (図 3a)。

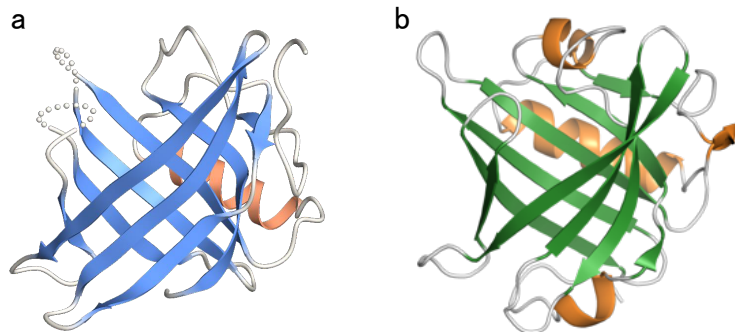


図3. (a) Can f 1 と(b)Can f 6 の結晶構造

一方、Can f 6 では非対称単位中に 4 分子の Can f 6 が存在していたが、それら 4 分子の主鎖原子の RMSD は 0.63Å であり同一の立体構造を有していると判断した。また、Can f 6 の立体構造も Can f 1 同様に、リポカリンファミリーにおいて高度に保持されている 8 本の逆平行  $\beta$  ストランドからなる  $\beta$  バレル構造とそれに付随する  $\alpha$  ヘリックス構造を有していた (図 3b)。

#### (2) Can f 1 および Can f 6 の IgE エピトープ予測と変異型 Can f 1 および Can f 6 の作製

Can f 6 の立体構造 (図 3b) をもとに、ネコアレルゲン Fel d 4 およびウマアレルゲン Equ c 1 との三次構造および配列類似性を考慮して、交差反応性に関与する可能性がある IgE 認識部位を 3 箇所予測した。次に、予測した部位の連続したアミノ酸 3 残基をそれぞれアラニンに置換した 3 種類の変異体 Can f 6 (mu-1, mu-2 および mu-3) を作製した。これら変異体の IgE 反応性を調べたところ顕著に減少したが、IgE 反応性低下の程度は変異を導入した部位や使用した患者血清に大きく依存することが判った。また、Western blot 解析を行った結果、変性状態 (SDS-PAGE) では野生型 Can f

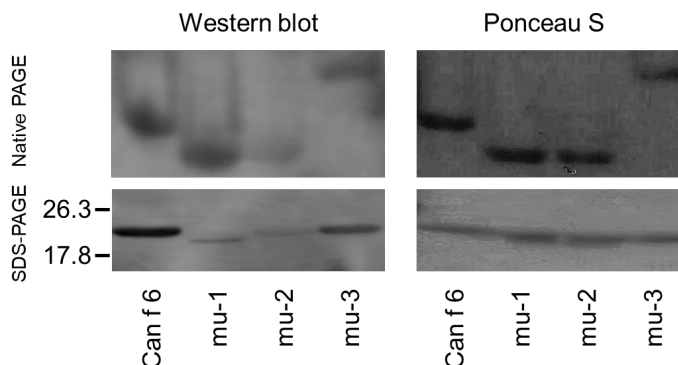


図4. IgE-western blotting of Can f 6

6と比較して、mu-1、およびmu-2に対するIgE結合親和性が明らかに低下していたが、mu-3に対しては大きな変化はなく、わずかに反応性が低下していた(図4)。また、非変性状態(Native PAGE)では、mu-2に対する反応性が顕著に低下していたが、mu-3に対する反応性はわずかに低下し、mu-1に対する反応性には変化はなかった。以上の結果から、Can f 6は複数のエピトープを含むイヌアレルゲンであり、Can f 6反応性血清にはCan f 6エピトープを認識するIgEが様々な量で含まれると考えられた。また、変異体によるIgE反応性の低下は、Can f 6がNative構造を維持しているか否かに大きく依存しており、Can f 6が正しい三次構造を形成していることがIgEエピトープとして働くために重要であるということが判明した。

一方、Can f 1では、アレルゲン交差反応性とIgEエピトープ予測サーバーを用いて得られたアミノ酸残基をアラニンに置換した6種類の変異型Can f 1を作製した。ELISAにより患者血清中のIgEとの結合親和性を評価したところ、R152Aが野生型Can f 1と比較してIgE結合親和性が約10%低減した。また、多重変異型Can f 1(R152A/K49A, R152A/H86A, R152A/R111A)を作製し同様の実験を行った結果、R152A/R111Aが18%の低減を示した。

### (3) 野生型および変異型Can f 1の*in vitro*アレルゲン活性の評価

ラット培養マスト細胞株RS-ATL8細胞を用いて、野生型Can f 1および変異型Can f 1(R152A, R152A/K49A, R152A/H86A, R152A/R111A)の脱顆粒能を測定した結果、4種の多重変異型Can f 1は、野生型Can f 1と比較して有意に脱顆粒能が低減されることが判明し、特にR152A/R111Aが最も脱顆粒能の低減を示した(図5)。

今後、野生型Can f 1およびCan f 6をアジュバンドである水酸化アルミニウムと共にマウス

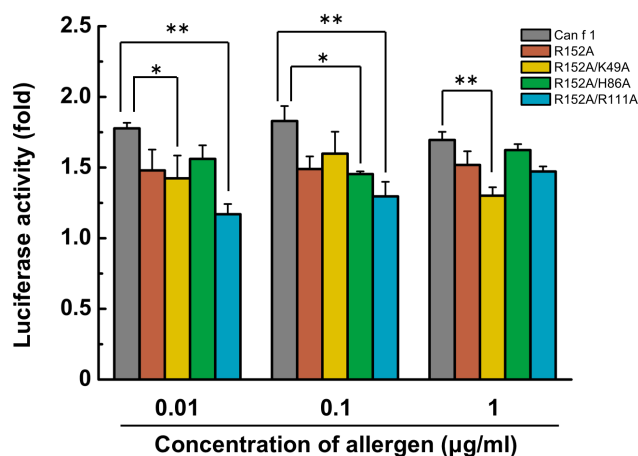


図5. Degranulation activity of Can f 1 and mutants

腹腔内に週1回×3回投与することにより免疫感作し、イヌアレルギーモデルマウスを作製する。免疫感作終了後、精製した変異型Can f 1およびCan f 6をマウス腹腔内に週1回×9回投与し、末梢血を採取し、末梢血中の抗体およびサイトカインを定量するとともに、フローサイトメトリーを用いてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞(制御性T細胞, Treg)の割合を測定することにより、免疫寛容の誘導(アレルゲン免疫療法の効果)の有無を確認する。さらに、アレルゲン免疫療法終了後、Can f 1およびCan f 6を尾静脈より投与し、アナフィラキシー誘発試験を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamamoto Kenji, Ishibashi Osamu, Sugiura Keisuke, Ubatani Miki, Sakaguchi Masaya, Nakatsuji Masatoshi, Shimamoto Shigeru, Noda Masanori, Uchiyama Susumu, Fukutomi Yuma, Nishimura Shigenori, Inui Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of the dog allergen Can f 6 and structure-based implications of its cross-reactivity with the cat allergen Fel d 4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38134-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Islam Zohirul, Inui Takashi, Ishibashi Osamu	4. 巻 509
2. 論文標題 Gpr137b is an orphan G-protein-coupled receptor associated with M2 macrophage polarization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 657 ~ 663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jikuzono Tomoo, Horikawa Aya, Ishikawa Tomoko, Hirokawa Mitsuyoshi, Sugitani Iwao, Inui Takashi, Ishibashi Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 Proteinase K treatment improves RNA recovery from thyroid cells fixed with liquid-based cytology solution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-018-3914-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horikawa Aya, Yoneda Tomomi, Yaoita Eishin, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Kuramochi Mizuki, Yamate Jyoji, Inui Takashi, Ishibashi Osamu	4. 巻 165
2. 論文標題 A novel splicing variant of small nucleolar RNA host gene 4 is a podocyte-selective non-coding RNA upregulated in response to puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 447 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Osamu, Akagi Ichiro, Ogawa Yota, Inui Takashi	4. 巻 501
2. 論文標題 MiR-141-3p is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and targets pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2, a negative regulator of the PI3K/AKT pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 507 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Misaki, Lin Yuxi, Nakatsuji Masatoshi, Inui Takashi, Lee Young-Ho	4. 巻 102
2. 論文標題 Kinetics and polymorphs of yeast prion Sup35NM amyloidogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Natsuki, Wakabayashi Masayuki, Nakatsuji Masatoshi, Kashiwagura Haruka, Shimoji Naohiro, Sakamoto Shiho, Ishida Atsuko, Lee Jangsoon, Lim Bora, Ueno Naoto T., Ishihara Hideki, Inui Takashi	4. 巻 489
2. 論文標題 MEK and PI3K catalytic activity as predictor of the response to molecularly targeted agents in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 484 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Teraoka Yoshiaki, Kume Satoshi, Lin Yuxi, Atsui Shogo, Inui Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Comprehensive Evaluation of the Binding of Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase to Poorly Water-Soluble Drugs	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Pharm.	6. 最初と最後の頁 3558 ~ 3567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Doi Hisashi, Kida Tatsuya, Nishino Kosuke, Nakatsuji Masatoshi, Sakamoto Shiho, Shimizu Shota, Teraoka Yoshiaki, Tamura Yasuhisa, Kataoka Yosky, Inui Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Solubility-Improved 10-O-Substituted SN-38 Derivatives with Antitumor Activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 1715 ~ 1722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/cmdc.201700454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計47件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 乾 隆
2. 発表標題 生体内輸送タンパク質のDDSへの応用
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 姥谷 美樹, 杉浦 慶亮, 山本 賢史, 中辻 匡俊, 福富 友馬, 石橋 宰, 乾 隆
2. 発表標題 ネコアレルゲンFel d 4の精製およびアレルゲン活性の評価
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 山本 賢史, 石橋 宰, 杉浦 慶亮, 姥谷 美樹, 中辻 匡俊, 島本 茂, 野田 勝紀, 内山 進, 福富 友馬, 西村 重徳, 乾 隆
2. 発表標題 イヌアレルゲンCan f 6のX線結晶構造解析と交差反応性を利用したB細胞エピトープの同定
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 姥谷 美樹, 杉浦 慶亮, 山本 賢史, 福富 友馬, 石橋 宰, 乾 隆
2. 発表標題 ネコアレルゲンFel d 4の精製とIgE結合親和性の評価
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 坂口 真哉, 櫻木 和磨, 増田 旭, 福富 友馬, 川上 裕司, 乾 隆, 石橋 宰
2. 発表標題 ワモンゴキブリアレルゲンとの相同性を有するチャタテムシ由来アレルゲンの同定
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 石橋 宰, 坂口 真哉, 櫻木 和磨, 福富 友馬, 川上 裕司, 乾 隆
2. 発表標題 ハウスダスト中の不快害虫チャタテムシが誘発するアレルギーの診断と治療戦略
3. 学会等名 第7回大阪府立大バイオ・メディカル・フォーラム
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 坂口 真哉, 櫻木 和磨, 福富 友馬, 川上 裕司, 乾 隆, 石橋 宰
2. 発表標題 Maltose-binding proteinを融合したチャタテムシ由来アレルゲンLip b 1のアレルゲン性の評価
3. 学会等名 第7回大阪府立大バイオ・メディカル・フォーラム
4. 発表年 2018年～2019年



1. 発表者名 乾 隆
2. 発表標題 生体内輸送タンパク質を利用した癌指向性ドラッグデリバリーシステム
3. 学会等名 第15回SPring-8先端利用技術ワークショップ-生体システムを利用した新しい機能性材料とその起源-(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本賢史, 大谷拓也, 中辻匡俊, 福富友馬, 西村重徳, 乾 隆
2. 発表標題 イヌアレルゲンCan f 6のX線結晶構造解析と交差反応性を利用したB細胞エピトープ決定
3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉浦慶亮, 櫻井 光智子, 中辻匡俊, 福富友馬, 乾 隆
2. 発表標題 イヌアレルギー患者に対する低アレルゲン化ワクチンの開発
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会 第90回日本生化学会大会 合同大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生体高分子機能学研究室 (Inui lab.)  <a href="http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/biol-macromol/">http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/biol-macromol/</a></p>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石橋 宰  (Ishibashi Osamu)  (70293214)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授    (24403)	
研究分担者	西村 重徳  (Nishimura Shigenori)  (90244665)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教    (24403)	