

平成21年 5月 28日現在

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18684016
 研究課題名(和文) 時間分解 X線構造解析・分光法によるカロテノイドの光保護分子メカニズムの解明
 研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Photoprotective Function of a Carotenoid Bound to the Photoreaction Center Revealed by Time-Resolved X-Ray Crystallography
 研究代表者
 藤井 律子 (FUJII RITSUKO)
 大阪市立大学・大学院理学研究科・博士研究員
 研究者番号：80351740

研究成果の概要：紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 由来の光反応中心複合体の 1.95 Å の高分解能 X線結晶構造解析に日本で初めて成功した。その結果、光合成光保護メカニズムに関与すると考えられるカロテノイドの結合長の変位を検出するためには 2.5 Å 以上の高分解能が必須であることがわかった。また分解能を左右するクライオプロテクションなどの操作を改良することにより、従来よりも小さい光を透過する結晶でも高分解能を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	22,700,000	6,810,000	29,510,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・物性 I

キーワード：光物性・光合成・たんぱく質構造、物性・光誘起協力現象・エネルギー散逸

1. 研究開始当初の背景

自然が生み出した最高の光電変換機構である光合成では、周辺アンテナ、コアアンテナと光反応中心という 3 種類の色素蛋白複合体内で、限られた構造の色素分子が周囲の蛋白質により絶妙な位置に配置し、静電環境に変調を加えられることによって高効率の光エネルギー伝達とそれに伴う量子収率 1 を誇る電子伝達を達成している。特に注目すべき点は、光反応中心複合体(RC)が過剰な光照射から自身を保護する機能をも備えている事である。紅色光合成細菌の RC では、バクテリオクロロフィル二量体(P)が励起されると、電荷は A ブランチのバクテリオフェオフィチン(H_A)へ

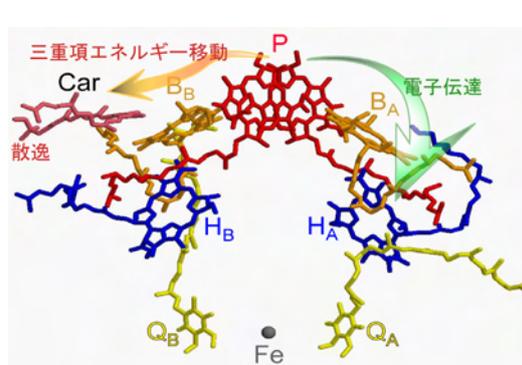


図 1：紅色光合成細菌の光反応中心に結合する色素の配置図(2.2 Å, PDB 1RGN)

と分離し、キノン A(Q_A)から非ヘム鉄(Fe)を介してキノン B(Q_B)へ伝達され、2つ電子を受け取った Q_B は RC から外れてプロトンを輸送する。過剰な光が照射されると H_A から電荷の再結合が起こり、高確率で生体に有害な三重項状態の P(³P)が生成する。この ³P を 15 シスカロテノイド(Car)がクエンチし、Car が受け取った三重項エネルギーを安全に散逸するという 2 段階の反応が光保護作用であるが、この分子メカニズムについてはまだ明らかになっていない。

(1) P から Car への三重項エネルギー伝達は、天然の RC の B_B,B_A の置換や Car 欠損株の RC への Car の再構成という手法で、生化学的に改変された RC に対する分光学的アプローチが盛んに行われ、B_B を介していること、また共役鎖長(*n*)が 9 以下の Car では ³P のクエンチが観測されないことが報告されて来た。しかしながら、改変 RC の色素置換率や結合状況についての詳細な検討がなされないまま分光学的データが解釈されているために、世界の共通認識が間違った方向へ誘導されている危険性があると危惧される。実際に研究代表者らは X 線結晶回折で結合状況を確認した *n* = 9 の合成カロテノイドを再構成した改変 RC のマイクロ秒時間分解吸収スペクトルより ³Car を検出することに成功し、上述の報告に反する結果を得た。そこで原子スケールの高分解能を達成している現在の X 線結晶回折技術を用いて色素及び周辺分子の構造を明らかにした上で、改変 RC の分光学的データを解析することにより、P→Car の三重項エネルギー伝達の分子メカニズムを詳細に解明することを本研究の第一の目的とする。

(2) 光保護作用の第 2 段階、Car の三重項エネルギーの散逸について申請者は、溶液中で三重項状態を経由した全トランス体への異性化が非常に高効率・高速(サブマイクロ秒)で起こることを時間分解吸収分光より明らかにし、RC 中で三重項状態において中央付近の 3 つの二重結合にねじれが生じることをラマンと基準振動解析、および時間分解 ESR 分光より明らかにすることで、「15 シス Car の構造変化を伴う効率よい三重項エネルギーの散逸」という仮説を持つに至った。しかしながら、Car 分子に大きな構造変化が起こるとすると、周囲のアミノ酸残基の構造変化をも誘発して蛋白全体が大きく揺らぐことになるため、この仮説は容易には受け入れられがたい。これを立証する最も有効な方法は、時間分解 X 線結晶解析である。高エネルギー加速器研究機構で平成 17 年秋から時間分解 X 線結晶回折の稼動が始まり、順次蛋白質用の回折像(ラウエ

像)を観測する方向に拡張されるという機会を利用して、天然 RC および色素系を改変した RC の結晶を大量に調製して時間分解 X 線結晶回折を行い、光誘起による Car 及び周辺アミノ酸残基の構造変化を検出することにより、RC 内の Car の三重項エネルギー散逸の分子メカニズムに関する研究代表者らの仮説を立証することを第二の目的とする。

2. 研究の目的

(1) 紅色光合成細菌の光反応中心複合体 (RC) に結合した 15 シスカロテノイド (Car) の光保護作用の詳細な分子メカニズムを解明するために、様々な構造の合成 Car を再構築した改変 RC を創成し、X 線結晶構造解析により詳細な Car の結合状況を決定して時間分解吸収スペクトルを測定し、より詳細な励起状態のエネルギー移動を議論することを第一の目的とする。

(2) 三重項エネルギーの散逸過程に Car の構造変化がどのように関与するのかを明らかにするため、時間分解 X 線結晶構造解析という新規の手法を適応し、生態系における一分子の Car から蛋白質全体への励起移動を観測し、光誘起協力現象という新しい切り口の物理を展開することを究極の目標とする。

3. 研究の方法

紅色光合成細菌 *Rhodobacter(Rba.) sphaeroides* のカロテノイド欠損株(R26.1) 及び野生株(2.4.1)を培養し、これらから単離・精製した光反応中心(RC)を試料として用いた。

(1) 様々な共役鎖長を持つ合成カロテノイドを再構築した RC の μ 秒時間分解吸収分光法によるカロテノイド三重項状態の解析。

① 野生株の RC には共役鎖長 10 のスフェロイデンというカロテノイドが結合している。カロテノイド欠損変異株の RC を調製し、有機合成で作成した共役鎖長 7, 8 のスフェロイデンアナログを再構築し、吸収スペクトル・CD という分光学的手法によりカロテノイドの結合を確認し、マイクロ秒時間分解吸収によりカロテノイドによるスペシャルペア三重項状態のクエンチの詳細を決定した。

② 再構成 RC の結晶化を行い、X 線結晶構造解析及び精密化を行なうことにより、再構成の効率やカロテノイドの結合の状態を評価した。

(2) RC の光誘起時間分解 X 線結晶構造解析。

① まず比較的結晶性の良いカロテノイド欠損株の RC を大量調製し、シッティングドロップ法により結晶化を行い、X 線回折像を取

得して構造精密化を行うところまでの手法を確立し、技術を習得した。次に、結晶化がより困難なカロテノイド含有の野生株の RC の結晶化を同様に行い、卓上 X 線発生装置 (R-AXIS⁺) を用いて回折像の評価を随時行い、結晶化条件の最適化を行なった。

② ビームライン (PF-AR, KEK) にて X 線結晶構造解析を行ない、高分解能が得られた RC の結晶を用いて、光照射中の X 線回折像の測定及び構造解析を行なうことにより光照射前後の構造変化を検出することを試みた。

4. 研究成果

(1) 様々な共役鎖長を持つ合成カロテノイドを再構成した RC の μ 秒時間分解吸収分光法によるカロテノイド三重項状態の解析。

① 共役二重結合数 7, 8, 9, 11 のスフェロイデンアナログを再構成した RC 及び野生株の RC の μ 秒時間分解吸収スペクトルを測定し、特異値解析により時間変化成分を抽出した (図 2)。

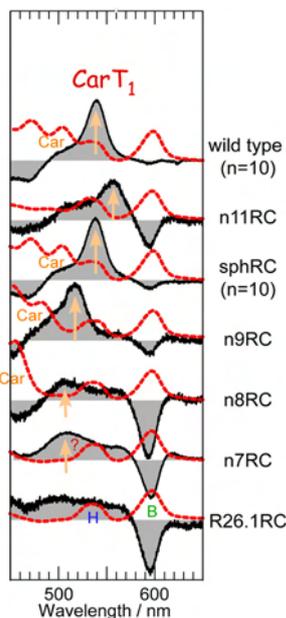


図 2: RC の μ 秒時間分解吸収スペクトルより抽出した時間変化成分 (黒線) 及び定常状態の吸収スペクトル (赤点線)。

崩れたため、このシグナルをカロテノイド由来と断定することは困難であり、カロテノイド欠損株 (R26.1) RC の結果よりこの位置にバクテリオクロフィルの T_1 吸収バンドが重なることがわかった。よって共役鎖長 7 のカロテノイドについてはカロテノイドの T_1 の生成については課題が残った。

② 共役二重結合鎖の短い合成カロテノイド 3,4,7,8,5',6'-ヘキサヒドロ-7',8'-ジデヒドロスフェロイデン (n8) を再構成した n8RC の結晶

カロテノイドとバクテリオクロフィルの基底状態の吸収が減衰していることより、これらの分子が励起状態にあることがわかり、新たに生成したバンド (矢印) が励起状態のシグナルである。この遷移エネルギーはカロテノイドの基底状態の遷移エネルギーと比例した (図 3) ため、カロテノイドの T_1 シグナルであると帰属した。しかしながら共役鎖長 7 のカロテノイドを結合した RC (n7RC) ではその相関関係が

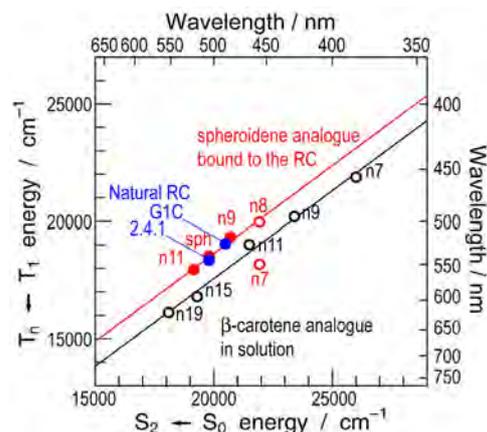


図 3: カロテノイドの基底状態 ($S_2 \leftarrow S_0$) に対する T_1 状態 ($T_n \leftarrow T_1$) の遷移エネルギー (再構成 RC, 赤: 天然 RC, 青 [Cogdell et al., *Biochim. Biophys. Acta* 408 (1975) 189.]: 溶液中の β カロテン, 黒 [Mathis and Kleo, *Photochem. Photobiol.* 18 (1973) 343.]

を調製し、分解能 3.5 \AA の X 線回折像を得ることに成功した。詳細な解析の結果、得られた結晶中には n8 カロテノイドは結合していない可能性が高いことがわかり、カロテノイドの結合を確認する目的でも 3.0 \AA 程度の分解能が必要であることがわかった。結晶化前の溶液では吸収スペクトル及び CD スペクトルにより再構成の効率はほぼ 100% であることが予測されていたが、結晶化した際には、実体顕微鏡による観測でも明らかに、結合したカロテノイドによる発色が見られなかった。この現象は、現在の条件では、再構成の段階で混在しているか、結晶化を行う間にカロテノイドが遊離・分解することにより、より結晶性の高いカロテノイド欠損株の RC だけが結晶化し、結晶成長したと説明することができる。よってこの手法を用いて再構成の効率を議論することは困難であることがわかった。

(2) RC の光誘起時間分解 X 線結晶構造解析。

①-1 良い X 線回折像を与える結晶生成の歩留まりが悪い事を解決するために、大きいゲルろ過カラムの導入により一度に精製する RC の量を増やし、結晶化のバッチ当たりの蛋白質質量を増やした。またシッティングドロップ型の結晶育成井戸から結晶を選択し、X 線回折測定用のループを用いてピックアップし (すくい上げ)、クライオプロテクション処理を行うという一連の作業技術の向上を図った。これらの結果として、卓上型 X 線回折測定装置 (R-AXIS⁺⁺) を用いたプレ測定において 3.0 \AA を切る分解能が得られる結晶を一度に 15~20 個程度調製して凍結保存し、ビームライン (PF-AR) で X 線回折像を取得する技術を確立した。

①-2 構造精密化の専門家を1ヶ月間招聘して、X線回折生データの構造精密化を研究代表者が行なう技術を取得した。野生株 RC の結晶について構造精密化を行なったところ、分解能 1.95~2.1 Å という世界最高レベルの分解能のデータを複数得ることに成功した[近日中に PDB にアップロードする予定]。同じ RC の高分解能データが複数セット得られたことにより、詳細な電子密度の比較を行なうことが可能になり、これまであまり注目されていなかった、蛋白質のふらつきの多い部分、蛋白質表面や内部に存在する水分子の結合性の高さ、界面活性剤分子・脂質分子の挙動について様々な知見が得られた。(図4)

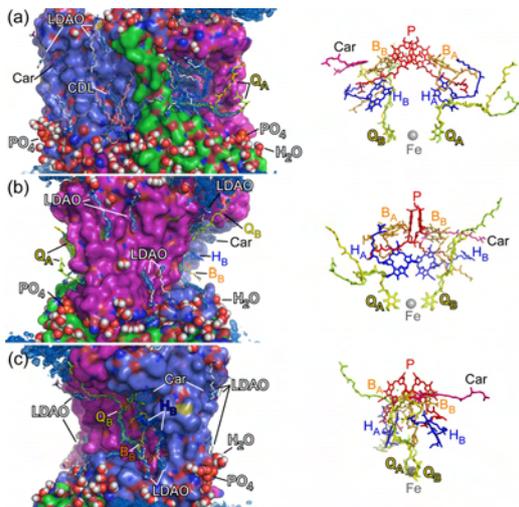


図4 : *Rba. sphaeroides* 2.4.1RC の X 線結晶構造解析(分解能 1.95 Å)による分子構造(M,L サブユニットをそれぞれ青,ピンクで示す)と電子密度マップ(青色,1.5 σ ,左図)及び左図より光合成色素のみを取り出した図(右図). RC の L,M,H サブユニット(それぞれ赤,青,緑)の表面に、水分子(H₂O),界面活性剤分子(LDAO),脂質分子(CDL),緩衝液(PO₄)が観測できた。

これらの分子構造を用いて、特に本研究の目的となるカロテノイド結合部位を詳細に検討した。カロテノイドは中央部分で折れ曲がっており、図4(c)の側からみるとL,Mサブユニットから半分突き出しているのがよく見える(図5)。カロテノイドの電子密度はB_Bに最近接のC15=C15'付近及び π 電子共役系のつながった部分では非常に濃いが、0.05~0.06 Å 程度の結合長の伸縮という構造変化を議論するには至らない事が明らかになった。また、カロテノイドの蛋白質の無い側は、B_B, P, H_B, Q_Bのアルキル側鎖で埋まっているが、これらの電子密度は部分的に非常に薄くてその帰属が困難であり、これらの周辺環境を含めたカロテノイドの光保護作用に関与する構造変化を検出するためには2.5 Å を切る高分解能の結晶を用いることが必須であることがわかった。

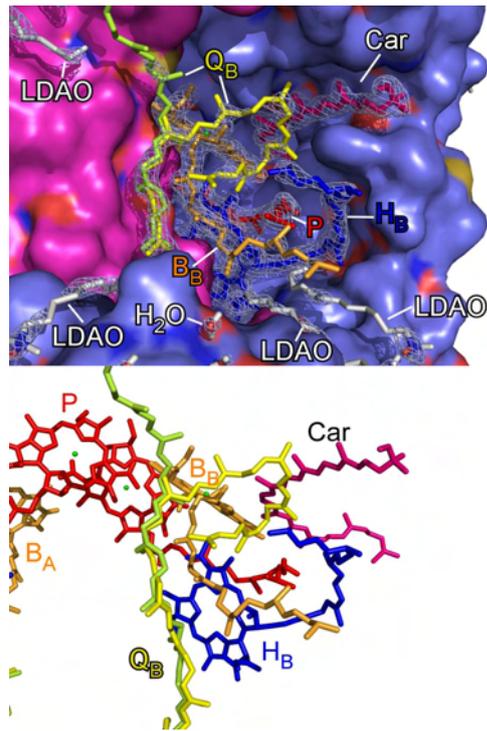


図5 : *Rba. sphaeroides* 2.4.1RC の X 線結晶構造解析(分解能 1.95 Å)による分子構造(M,L サブユニットをそれぞれ青,ピンクで示す)と電子密度(グレー,1.5 σ)の図(上)及び光合成色素のみの配置図(下).キノン(Q_B)のセカンダリーコンフィグレーションを黄緑色で示した。

② 以上の結果を得た段階では、直径 250 μ m~400 μ m,長さ 1mm 程度の大きな六角柱状の結晶でしか高分解能のX線回折像を得る事ができなかった。しかしながら光を用いた均一な励起を行なうためには少なくとも透過する光の波長が存在することが必須となる。この問題を解決するために、様々な形状・大きさ(小ささ)の結晶について大阪市大の卓上型X線発生装置(R-AXIS⁺)を用いたプレ測定により分解能を確認した。このプレ測定を繰り返し行なう間に、結晶の選択(結晶の仕込みから測定までの時間や、実体顕微鏡で観測できる結晶の形状(割れ目,すじ,しわ,ゆがみなどが見られるかどうか,結晶のエッジがまっすぐかどうか等),結晶の前処理(シッティングドロップのウェルからすくい上げるフィッシング操作,クライオプロテクション処理)で疑問を感じた場合にはほとんど高い分解能が得られないということに気づいた。これは結晶の大きさにはあまり関わりが無かったため、実体顕微鏡観察でかろうじて光の透過が目視できる程度の大きさの結晶に焦点を絞り、繰り返し測定を行なうことにより、直径 120 μ m~150 μ m,長さ 400 μ m~1mm の小さい六角柱状結晶について R-AXIS⁺で 2.8~3 Å 程度の回折像を得る

ことに成功し、ビームラインでの測定では 2.5 Å 以上を得ることができた。これらの結晶に光照射を行ないながら X 線結晶回折像の取得を試みたが、現段階では X 線照射によるダメージが大きく有意な変化は観測されなかった。しかしながら、今後時間分解 X 線結晶構造解析を行なうための全ての準備が整ったと考えられ、近日中に成果が出ることを期待できる。

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 17 件)

- ① **R. Fujii**, S. Shimonaka, N. Uchida, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Sugisaki, and H. Hashimoto, "Construction of Hybrid Photosynthetic Units Using Peripheral and Core Antennae from Two Different Species of Photosynthetic Bacteria: Detection of the Energy Transfer from Bacteriochlorophyll *a* in LH2 to Bacteriochlorophyll *b* in LH1", *Photosyn. Res.* **95** (2008) 327-337. 査読有
- ② **R. Fujii**, N. Wakatake, S. Shimonaka, Q.-D. Chen, M. Sugisaki, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, "Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectra of Photosynthetic Membranes from a Purple Bacterium *Blastochloris (Rhodopseudomonas) viridis*", *Carotenoid Science*, **11** (2007) 26-31. 査読有
- ③ Y. Kakitani, **R. Fujii**, Y. Hayakawa, M. Kurahashi, Y. Koyama, J. Harada, K. Shimada, "Selective Binding of Carotenoids with a Shorter Conjugated Chain to the LH2 Antenna Complex and those with a Longer Conjugated Chain to the Reaction Center from *Rubrivivax gelatinosus*", *Biochemistry* **46** (2007) 7302-7313. 査読有
- ④ R. L. Christensen, M. G. I. Galinato, E. F. Chu, **R. Fujii**, H. Hashimoto, H. A. Frank, "Symmetry Control of Radiative Decay in Linear Polyenes: Low Barriers for Isomerization in the S₁ State of Hexadecaheptaene.", *J. Am. Chem. Soc.* **129**(6) (2007) 1769-1775. 査読有
- ⑤ **R. Fujii**, M. Shimizu, T. Nishio, T. Kusumoto, D. Niedzwiedzki, Z. Pendon, H. A. Frank, R. J. Cogdell, H. Hashimoto, "Triplet States of Carotenoids Having Shorter Conjugation Lengths Reconstituted into the Reaction Centre of *Rhodobacter sphaeroides* R26.1 Detected by Time-Resolved Absorption Spectroscopy", *Carotenoid Science*, **10** (2006) 72-77. 査読有

有

- ⑥ H. Hashimoto, **R. Fujii**, K. Yanagi, T. Kusumoto, A. T. Gardiner, A. W. Roszak, N. W. Issacs, Z. Pendon, D. Niedzwiedzki, H. A. Frank, R. J. Cogdell, "Structures and Functions of Carotenoids Bound to Reaction Centres from Purple Photosynthetic Bacteria", *Pure Appl. Chem.* **78**(8) (2006) 1505-1518. 査読有
- ⑦ Y. Kakitani, **R. Fujii**, Y. Koyama, H. Nagae, L. Walker, B. Salter, A. Angerhofer, "Triplet-State Conformational Changes in 15-*Cis*-Spheroidene Bound to the Reaction Center from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 as Revealed by Time-Resolved EPR Spectroscopy: Strengthened Hypothetical Mechanism of Triplet-Energy Dissipation", *Biochemistry* **45**(7) (2006) 2053-2062. 査読有

[学会発表] (計 68 件)

- ① 喜多 麻美子, **藤井 律子**, 伊波 匡彦, 橋本 秀樹: オキナワモズク盤状体由来のフコキサンチン-クロロフィル a/c 蛋白質 (FCP) の単離, 第 50 回日本植物生理学会, 2009 年 3 月 21-24 日, 名古屋大学(名古屋市), ポスター
- ② **A. W. Roszak**, A. T. Gardiner, V. Moulisova, A. D. Putranto, **R. Fujii**, H. Hashimoto, N. W. Isaacs, R. J. Cogdell: Structure of Reaction Centre Carotenoid in *Blastochloris viridis*, 第 22 回カロテノイド研究談話会, 2008.06.28-29, ホテルムーンビーチ(沖縄), 招待講演
- ③ A. W. Roszak, A. T. Gardiner, V. Moulisova, A. D. Putranto, **R. Fujii**, H. Hashimoto, N. W. Isaacs, R. J. Cogdell: Structure of the Carotenoid Bound to the Reaction Centre from *Blastochloris viridis*, The 15th International Symposium on Carotenoids, Hotel Moon Beach, Okinawa, Japan, June 22-27, 2008 (poster)
- ④ **R. Fujii**, N. Wakatake, S. Shimonaka, Q.-D. Chen, M. Sugisaki, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, H. Hashimoto: Femtosecond Time-Resolved Absorption Spectra of Photosynthetic Membranes from a Purple Bacterium *Blastochloris (Rhodopseudomonas) viridis*, 15th International Symposium on Carotenoids, Hotel Moon Beach, Okinawa, Japan, June 22-27, 2008 (poster)
- ⑤ **R. Fujii**, S. Shimonaka, N. Uchida, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Sugisaki and H. Hashimoto, "Construction of Hybrid

Photosynthetic Units using Peripheral and Core Antennae from Two Different Species of Photosynthetic Bacteria: Detection of the Energy Transfer from Bacteriochlorophyll *a* in LH2 to Bacteriochlorophyll *b* in LH1”, 15th International Symposium on Carotenoids, Hotel Moon Beach, Okinawa, Japan, June 22-27, 2008 (invited oral presentation)

- ⑥ **R. Fujii**, S. Shimonaka, N. Uchida, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Sugisaki and H. Hashimoto, “Construction of Hybrid Photosynthetic Units using Peripheral and Core Antennae from Two Different Species of Photosynthetic Bacteria: Detection of the Energy Transfer from Bacteriochlorophyll *a* in LH2 to Bacteriochlorophyll *b* in LH1”, 14th International Congress of Photosynthesis: Satellite Workshop on Photosynthetic Light-Harvesting Systems, Buchanan Arms Hotel, Drymen, UK, July 18-19, 2007 (Poster)
- ⑦ **藤井 律子**, 下中 奨三, 内田 直子, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, 杉崎 満, 橋本 秀樹: 人工膜内に配列した異種の光合成色素蛋白複合体間のエネルギー伝達, 日本物理学会 2007 年春季大会, 2007 年 3 月 18-21 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島市)
- ⑧ **藤井 律子**, 下中 奨三, 内田 直子, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, 杉崎 満, 橋本 秀樹: 人工膜内に配列した異種の光合成色素蛋白複合体間のエネルギー伝達, 第 17 回光物性研究会、2006 年 12 月 8-9 日、大阪市立大学(大阪)
- ⑨ **R. Fujii**, S. Shimonaka, N. Uchida, A. T. Gardiner, R. J. Cogdell, M. Sugisaki And H. Hashimoto: Heterogeneous Two-Dimensional-Crystallization and Energy Transfer of the LH2 and LH1-RC Complexes from Different Species of Photosynthetic Bacteria: An Investigation by Means of Electron Microscopy and Near-Infrared Fluorescence Spectroscopy, 12th International Symposium of Phototrophic Prokaryotes, Pau (south of France), August 27-September 1st, 2006. (oral)

[図書] (計 4 件)

- ① R. J. Cogdell, A. T. Gardiner, M. Gabrielsen, J. Southall, A. W. Roszak, N. W. Isaacs, **R. Fujii** and H. Hashimoto, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, “The Structure of Purple Bacterial Antenna Complexes”, In: Petra Fromme (Ed.), *Photosynthetic Protein Complexes A Structural Approach*, 2008, pp. 325-340.
- ② 橋本秀樹, **藤井律子**, (株)シーエムシー出

版, 「光合成の初期過程の最新の描像」, 光合成微生物の機能と応用 (上原赫 編) 1 章 2 節, 2006, pp. 18-37

- ③ 橋本秀樹, **藤井律子**, 杉崎満, オプトロニクス社, 「有機・バイオー光合成アンテナ色素淡白複合体・カロテノイド・超高速レーザー分光」, *光物性の基礎と応用*(光物性研究会組織委員会編) 第 3 部 5 章, 2006, pp. 239-261
- ④ Y. Koyama, Y. Kakitani, L. Limantara and **R. Fujii**, Springer, “Effects of Axial Coordination, Electronic Excitation and Oxidation on Bond Orders in the Bacteriochlorin Macrocycle, and Generation of Radical Cation on Photo-Excitation of in vitro and in vivo Bacteriochlorophyll *a* Aggregates: Resonance Raman Study”, In: B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger and H. Scheer (eds.), *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 25), 2006, pp. 323-335.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 律子 (FUJII RITSUKO)
大阪市立大学・大学院理学研究科・博士研究員
研究者番号 : 80351740

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :