科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目:基盤研究(B)研究期間:2007~2009課題番号:19390123

研究課題名(和文) 臨床分離腸球菌の細菌叢定着因子(バクテリオシン)の研究

研究課題名 (英文) Genetic and molecular analysis of bacteriocins of enterococcus

clinical isolates - a bacterial colonization factor -

研究代表者

池 康嘉 (IKE YASUYOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:60125820

研究成果の概要(和文):

1. Bacteriocin 41の研究

フェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミドpYI14(61 kbp)は臨床分離株E. faecalis YI714 から分離されたバクテリオシンプラスミドでバクテリオシンBac41をコードする。Bac41遺伝子は $bacL_I$ (ORF7)、 $bacL_2$ (ORF8)、bacA(ORF11)、bacI(ORF12)から成る。 $bacL_I$ / $bacL_2$ は菌体外へのBac41 前駆体発現とその分泌に必要な遺伝子、bacA遺伝子産物は分泌された前駆体バクテリオシンを菌体外で活性化する活性化因子である。またbacIは自身の生産するBac41 に対する免疫因子遺伝子であった。

2. Bacteriocin 51の研究

バンコマイシン耐性、バクテリオシン生産 E. faecium NRCH38 株から単離されたプラスミドを pHY (6.0kbp) と名付けた。pHY には ORF が 9 つ存在した。大腸菌のベクタープラスミド pMW119 を用い pHY 全体をクローン化し、これを E. faecalis OG1S に形質転換したものは、E. faecium, E. hirae, E. durans に対し抗菌活性をもつバクテリオシンを生産した。このクローンを用いた Tn5 挿入変異株、及び転写産物の解析から、ORF1 (bacA) がバクテリオシン遺伝子、ORF2 (bacB) が免疫能をコードすることが解った。bacA, bacB はオペロンを形成していた。

研究成果の概要 (英文):

- 1. The conjugative plasmid pYI14 (61 kbp) was isolated from Enterococcus faecalis YI714, a clinical isolate. pYI14 conferred a pheromone response on its host and encoded bacteriocin 41 (bac41). Bacteriocin 41 (Bac41) only showed activity against E. faecalis. Genetic analysis showed that the determinant was located in a 6.6-kbp region Six open reading frames (ORFs) were identified in this region and designated ORF7 (bacL1) ORF8 (bacL2), ORF9, ORF10, ORF11 (bacA), and ORF12 (bac1). They were aligned in this order and oriented in the same direction. ORFs bacL1, bacL2, bacA, and bac1 were essential for expression of the bacteriocin in E. faecalis. Extracellular complementation of bacteriocin expression was possible for bacL1 and -L2 and bacA mutants. bacL1 and -L2 and bacA encoded bacteriocin component L and activator component A, respectively. The products of these genes are secreted into the culture medium and extracellularly complement bacteriocin expression. bac1 encoded immunity, providing the host with resistance to its own bacteriocin activity.
- 2. The bacteriocin 51 (Bac51) was encoded on the mobilizable plasmid pHY (6,037bp) isolated from vancomycin resistant *E. faecium* V38. Bacteriocin 51 was active against *E. faecium*, *E. hirae*, and *E. duraus*. The sequence analysis of pHY showed that plasmid pHY encoded nine ORFs from ORF1 to ORF9 in this order. ORF3, ORF4 and ORF5 showed homology to *mobC*, *mobA*, and *mobB*, respectively. ORF7 and ORF8 showed homology to *repA* and *repB*, respectively. ORF1, ORF2, ORF6 and ORF9 had no homology to the reported genes. The Tn5

insertion mutants in ORF1 did not show both bacteriocin and immunity activities, implying that ORF1 and ORF2 were the bacteriocin determinant, and were designated as bacA and bacB, respectively. Detailed DNA sequence analysis of bacA and bacB was performed. encoded a 144-amino-acid protein. The ATG start codon was preceded by a potential ribosome binding site 8 bp upstream. The deduced bacA protein had a span of hydrophobic residues typical of the signal sequence at its amino terminus and a potential signal peptidase processing site corresponding to the VEA sequence was located at position 37 to 39 amino acid. The predicted BacA mature protein consisted of 105 amino acids. There was a potential promoter sequence upstream of the start codon. bacB encoded a 55 amino acid protein. The ATG start codon was preceded by a potential ribosome binding site 12 bp upstream. There was no obvious promoter sequence upstream of the ribosome binding site. A putative transcription terminator signal was identified downstream of back. There was no obvious promoter or terminator sequence between bacA and bacB. transcript of bacA and bacB were analyzed by Northern hybridization. The results of Northern analysis of bacA and bacB with bacA-RNA probe showed about 700 nucleotides which corresponded to the nucleotide size of both bacA and bacB, indicating that a transcription initiated from the promoter upstream bacA, continued through bacB, and terminated at the terminator downstream of bacB. The transcription start site was determined at the nucleotide T located at six nucleotides downstream from -10 promoter sequence by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) method. These results indicated that the bacA and bacB composed of operon structure, and bacA was bacteriocin structure gene and bacB was the immunity gene.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	6, 200, 000	1,860,000	8, 060, 000
2008年度	6, 100, 000	1,830,000	7, 930, 000
2009年度	2, 100, 000	630, 000	2, 730, 000
年度			
年度			
総計	14, 400, 000	4, 320, 000	18, 720, 000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード:病原性、腸球菌、バクテリオシン、バクテリオシン遺伝子、分子遺伝

1. 研究開始当初の背景

腸球菌は人、動物の腸管常在菌で典型的な日和見感染菌で、10数種類存在する。腸球菌の中で臨床分離腸球菌の多く(約80%)は E.faecalis 菌で残りは主として E.faecium 菌である。

バクテリオシンは細菌の生産する外分泌 蛋白で、同種、近縁の細菌を殺菌する。バクテリオシン生産菌は細菌叢において非 生産菌に対して生存の優位性を持つために、細菌叢における定着因子(colonization factor)と考えられており、病原性因子の一つである。細菌のバクテリオシン遺伝子は複数の遺伝子により構成される複合遺伝子(オペロン)で、バクテリオシン生産のための構造遺伝子と自らのバクテリオ シンに対する防御のための免疫遺伝子が必須である。

E.faecium のバクテリオシンは、各種の多くの報告がある。それらのほとんどは乳製品加工における乳酸菌としてのE.faecium菌から分離されたもので、それらのバクテリオシンは乳製品加工過程で抗菌剤として利用されている。臨床分離腸球菌、及び E.faecalis のバクテリオシンの研究は少なく、本研究によってこれらの菌のバクテリオシンオペロンの新たな遺伝子発現、調節機構、バクテリオシン蛋白の構造と機能が解明できる。

2. 研究の目的

臨床分離 E.faecalis 菌の約80%はバク

テリオシンを生産する。それらの中で主 なものは① cytolysin(β-Hly/Bac)、② *E.faecalis* にのみ活性をもつbacteriocin 41(Bac 41) (型)、③ enterococcusに広く 活性をもつbacteriocin 51(Bac 51) (型)等 である。その中で最も分離頻度の高い(約 30%) cytolysin(β-Hly/Bac)は人細胞と細 菌細胞膜の両方に活性を示す。これまで 詳しく研究されてきた。② E.faecalis に 活性を示すバクテリオシン(Bacteriocin 41型(Bac41型)) は、フェロモン反応性プ ラスミド上に存在する。フェロモン反応 性プラスミド上に存在する。③ enterococcusに広く活性をもつバクテリ オシン(bacteriocin 51 (Bac 51))の遺伝子 は、主に伝達性プラスミド上に存在する。

本研究では E.faecalis に活性を示す Bacteriocin 41 型 (Bac41) 及 び enterococcus に 広 く 活 性 を 示 す Bacteriocin 51型 (Bac51)の総合的な生 物学的研究を行う。バクテリオシン遺伝 子の分子遺伝学的解析を行い、バクテリ オシン遺伝子を構成するそれぞれのORF の機能、生産発現機構、発現調節機構を 研究する。

3. 研究の方法

- 抗菌剤の MIC 測定
- ・ プラスミドの接合伝達、液体培地中、 固形培地上での接合伝達。
- 軟寒重層法によるバクテリオシン活性 の測定
- ・ プラスミド DNA の分離と解析、及び遺 伝子のクローニング
- ・ プラスミドの制限酵素地図の作成
- ・ DNA 塩基配列の決定
- トランスポゾンによる挿入変異株の分離
- ・ 変異部位及び変異株の解析
- · PCR による遺伝子解析

等の方法を用いた。詳しくは発表論文に記載した。

4. 研究成果

- 1. Bacteriocin 41の研究成果
- (1) バクテリオシン生産菌とバクテリオ シンプラスミドの分離

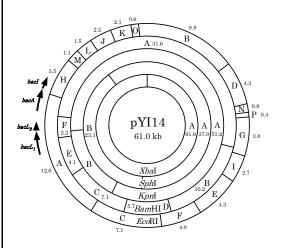
臨床分離 E. faecalis YI714 は E. faecalis にのみバクテリオシン活性を示すバクテリオシン生産菌であった。E. faecalis YI714 は 61 kbp のプラスミドを含んでいた。E. faecalis YI714 を供与菌、E. faecalis FA2-2 Rif, Fus を受容菌として液体培地中で接合伝達を行い、接合伝達株を Rif, Fus を含む培地で選択し、バクテリオシン活性を寒天平板法で調べた。接合伝達株約 500 株に 1 個の割合で、バクテリオシン生産株が得られた。こ

のバクテリオシン生産株(接合伝達株)は、61 kbp のプラスミド(pYI714)を含んでいた。pYI714 (61 kbp) は E. faecalis のフェロモン反応性プラスミドで、E. faecalis にのみ活性のあるバクテリオシンをコードしていた。このバクテリオシンを bacteriocin 41 (600 kg)と名付けた。

(2) pYI714 (61.0 kbp)の制限酵素地図の 作成

pYI714 (61.0 kbp) の制限酵素地図を EcoRI その他の制限酵素を用いて作成した(図 1)。 pYI714 (61.0 kbp) の制限酵素地図は、EcoRI, AHMLJKOBDNPGIEFC の順で、その他の制限酵素の地図も示した。研究の結果、解った Bac41 の遺伝子地図も示した。

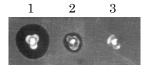
図1. 臨床分離腸球菌株 YI714(*E. faecalis*) から分離した高頻度接合伝達性バクテリオシンプラスミド pYI14



(3) Bac41 遺伝子の EcoRI 断片のクローン化

それぞれの EcoRI 断片をベクタープラスミド pAM401 にクローニングし、E. faecalis FA2-2 を形質転換した結果、EcoRI AH 断片を持つクローンがバクテリオシン活性を示した。Bac41 遺伝子は EcoRI AH (16.1 kbp)内に存在することが示唆された。

図2. Bacteriocin 41 の軟寒重層法による検 出と変異クローンのバクテリオシン活性



1; pAM401::AH

2; pAM401::AHTn5-14

3; pAM401::AHdBa1

指示菌; E. faecalis OG1S

ORF	Gene	location on the map	Gene/protein size(bp/s.a.)	Honology	Mentity/similarity (%)	Position
136 602 766		136 588 602 734	455/150 153/50	pol8 (E. favonis pCF10) EFB0044 (E. favonis V583 pTEF2)	95/200 100/200	anh
766 1330 1827		766 1344 1350 1670 1827 2009	379/192 321/106 183/00	pcT (E faecalir pCF16) pcT (E faecalir pCF16) Efae(0001107 (E faecium)	8990 9997 2097	thermonuclease
2204		2394 2900	711/216	lipoprotein (E. devonie V583)	31/45	
3058	bacL ₁	3018 4845	1788/505	Lyonyme (R subtilir bacteriophage B103) Lyon (S agulartier prophage lembda Sa1) Maramidase (L. plantarum WCFS1)	3752 (1351 mm) 4643 (360 309 mm) 2641 (319 377 mm)	lysin (bacteriocin 41
5032	harL,	5031-5666	636:211			byin espession
5689 6123		5689 6120 6123 6650	430:143	ORFSO (S. preumoniae bacteriophage MMI) EP0037 (S. frecolie VSSD	31/53 27/45	bolin
6693	beck	0085 8875	2181/726	ybiG (R subtilis) ybuG (R subtilis)	40/50	lysis activator
9991	had	9981 9923 9990 10165	576191			instantity
10006 11060		10306 10640 11060 11781	335 110 702 233	EFB0007 (E. Swenlie V583 pTEP2)	99/100	

(4) バクテリオシン遺伝子の遺伝学的解析 pAM401::AH (16.1 kbp)を用いてトランスポゾン (Tn5, Tn7) の挿入変異株の分離、制限酵素によるバクテリオシン遺伝子変異株の導入、PCR方法によるバクテリオシン遺伝子のsubcloneを行った。また、EcoRI AH断片の全塩基配列を決定した。これらの解析の結果、BAc41 遺伝子はAH断片内の 6.6 kbpの領域に存在し、同一方向に転写される6個のORF (ORF7~ORF12)を含んでいた。6個のORFのうち、Bac41発現に必須のORFは4つで、それぞれ $bacL_I$ (ORF7)、 $bacL_I$ (ORF8)、bacA (ORF11)、bacI (ORF12)と命名した。

図3. pYI14 にコードされる Bacteriocin 41 遺伝子の解析

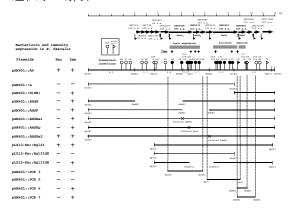


表 2 . Transposon inetion mutants of pAM401::AH and baacteriocin expression

Insertion number in Fig. 2	Plasmiks)*	Transpoon	Map position (M) ³	Location of insert	Bac	lms
	eYD4				**	
	BAM401:AH				**	
44	pAM400 AB/Th 5-44	Ted	11.2	apatreem of ORF136	**	
9	nAM401 AB/Tn 5-9	Tad	-0.8	upstream of OEF136	**	
49	pAM400 - AB/Tn 5-49	Tad	-0.4	spotresm of OEF136	**	
19	pAM401 AB/Tn 5-19	Ted	0.7	ORPHOT	**	- 1
46	#AM 401 - AN/Th 6-45	Tad	1.0	0807766	**	- 1
8, 196	*AM401 AH/Tu.5-9-186	Ted	1.7	between ORF1310 and ORF1827	**	
161	pAM401 - AH/Tn 5-161	Ted	1.9	OEF1827		- 1
24	BAM403 AB/Th 5 24	Ted	2.6	ORF2204	**	
67	pAM401 AB/Th 5-42	TaS	3.2	ORF3008(Aucl. s)		- :
30	pAM401 AB/Th 5 30	Tad	4.0	ORF3058(Aucf.)		- 1
14, 105, 193			43	ORF2018(And, 1)		- 1
105	pAM401 AR/Th 5 64 106 193 pAM401 AR/Th 5 105	Te.5	44	ORF2058(Aur.C.)		- 1
200		Tad	47	OEFS058(Ascf.,)	- 12	- 1
15	pAM 401 AB/Th 5-32		4.5	ORF3058(Aucl.)		- 1
107	pAM401 AB/Te.5-25	Ta5		ORFS033(Ancf.)	- 2	:
	pAM401 AH/Te.5-107	Ta.5	5.2			
188	pAM401 ABTHS 188	Ta-5	5.5	ORFS031(hecf. g)		
104, 121	pAM401 AH/Tm5-104-133	Tad	6.9	ORF0003(Aucst)		
45	pAM401 AB/Tn.5-45	Tad	7.8	ORF0003(Ant/4)		
153	pAM401 AM/Tn 5-123	TmS	7.3	ORF9003(Aug4)		
00	pAM401 AH/Th.5 00	Ta-5	7.3	ORF6603(Amo.4.)		
11	pAM401 AB/Tn.5-51	Tm.5	7.7	ORFHODO(AscA)		
B	pAM401 ARTh 5 6	Tad	8.1	ORFS003(Annt)		
11	pAM401 ABTh 5-11	TaS	0.4	ORF0093(AucA)		
22	pAM401 AB/Tn 7-22	mini Tn 7	8.7	ORI/9693(Auc.4)		
14, 101, 117	pAM401 ABTh 5 14, 101, 117	TeJ	9.5	ORF9981(Ant/)	. *	
50	pAM401 AB/Tn 7-80	mani-Tn.7	9.5	between OEF6061 and OEF9500	**	
25	pAM 401 : AB/Th 7:25	mini Tn 7	9.6	ORF9600	**	
115, 153	pAM401 AB/Tn.5-115,-153	Tm5	10.4	ORF10308	**	
38, 39, 163	pAM401 - AH/Tn.5-38, 39, 163	Tad	10.7	hetween OEF10308 and OEF11080	**	
87.	pAM403 AB/Tn.7:87	mint Tn F	11	between OEF10308 and ORF11080	**	
74	pAM401:AH/Tn7:74	mini Tn 7	11	between ORF10305 and ORF11080	**	
76	pAM401 AB/Tn 7-76	mini/Tn7	11.1	between OEF10308 and OEF11080	. **	
19	pAM400 :AB/Tn 7:69	mini Tn 7	11.1	ORF11000	**	
19	pAM401:AN/Th7:00	mini/Tn 7	11.2	ORF11080	**	
70	pAM401 AB/Tn.7-70	mini Tn 7	11.3	ORF11080	**	
10	pAM 400 : AB/Th 7-40	mini Tn 7	11.4	ORF11080	**	
90	pAM401 AB/Tn 7 80	mini Tn 7	11.4	ORF11090	**	
63	pAM401-AH/Tn 7-83	mini Tn 7	11.9	ORF11000	**	
The host stra The map posi pposite direct		u OG15 lOG tion between	t-10). Eco RI few	pnent A and H. The minus values to	dicate	de

(5) Bac41 の細菌細胞外相補活性

 $bacL_1/bacL_2$ 生産株とbacA生産株それぞれを、指示菌を含む寒天平板上に近接して培養した時、それぞれの菌の間の細菌増殖が阻害され、バクテリオシン活性が見られた。また、それぞれの変異株を交叉させて培養した時、交叉部分の細菌(指示菌)の増殖が阻害され、バクテリオシン活性が見られた。これらの結果は、 $bacL_1/bacL_2$ 、およびbacAの生産物がそれぞれ細菌外に分泌され、細菌外で $bacL_1/bacL_2$ のバクテリオシン前駆体がbacAにより活性化されて、バクテリオシン活性が出現することを示している。

表3.各Bacteriocin 41 変異体間の菌体外相 補試験結果

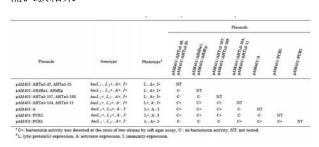


図4. 代表的な Bacteriocin 41 変異体の菌 体外相補試験

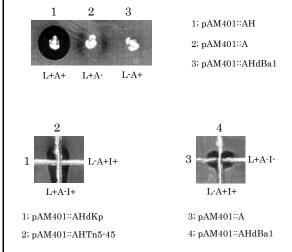


図5. バクテリオシン構造蛋白 BacL1 の相同性解析とC端領域の3回繰り返し構造(基質 図禁)

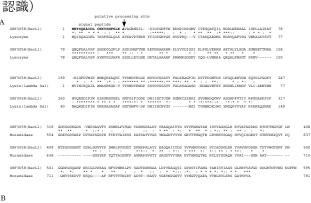
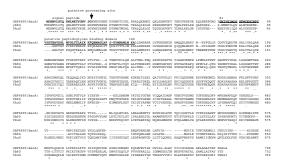


図 6. 活性化因子蛋白 BacA の構造



2. Bacteriocin 51 の研究成果

(1) VRE のバクテリオシン

表1.6 株の VRE のバクテリオシン生産能と その活性域

		•							
指示菌 菌株名	E. faecalis FA2-2	E. faecalis OGIS	E. faecium BM4105R	E. hirae ATCC9790	E. durans ATCC49135	Eraffinosus JCM8733	E. gallinarium BM4174	Listeria monocytogenea	S. aureus FDA209P
VRE34	+	+	+	+	+	+	+	+	_
VRE35	_	_	+	+	+	_	ı	_	-
VRE36	+	+	+	+	+	+	+	+	_
VRE37	+	+	+	+	+	+	+	+	_
VRE38	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VRE39	+	+	+	+	+	+	+	+	_

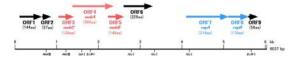
(2) 接合伝達による *E. faecium* VRE38 からのバクテリオシンプラスミド pHY(6.1kbp)の単離

5株のGm耐性VRE(34,35,37,38,39)を供与菌、受容菌をE. faeciumBM4105RF(Rif耐性、Fus耐性)とし、固形培地上で接合伝達実験を行った。得られた接合伝達株の中にはいずれもE. faecium、E. hirae、E. duransに対して抗菌活性を示すもの(bac+とする)が存在した。E. faecium VRE38から分離されたバクテリオシンプラスミドをpHYと名付け、詳細な解析を行った。

(3) pHY の遺伝子地図

pHY の全塩基配列を決定した。総塩基数は6037bpであった。pHY の ORF は9つであった。5 個の ORF は既報の腸球菌のプラスミドにコードされる ORF (プラスミド複製、可動化遺伝子)と高い相同性を示した。ORF1, ORF2 は既報の遺伝子配列・アミノ酸配列ともに相同性がみられず、pHY は新規のバクテリオシンをコードするプラスミドと考えた。

図1. pHY の遺伝子地図



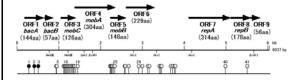
(4) pHY バクテリオシン遺伝子の腸球菌へ のクローニング

スペクチノマイシン耐性遺伝子を入れた 大腸菌のベクタープラスミドpMW119 を用い、 pHY全体をクローン化した形質転換株DH5 α /pMW119+Spc^r+pHYを得た。このプラスミドを用い*E. faecalis* FA2-2 を形質転換した株は、*E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*に対して抗菌活性を示した。

(5) pHY のトランスポゾン Tn5 挿入変異株の分離

クローン化した pHY を用い大腸菌内で Tn5 挿入変異株を得た。変異株の解析結果から ORF1 と ORF2 は、バクテリオシン遺伝子、及び免疫因子遺伝子であると考えられ、それぞれ bacA (144a. a.), bacB (57a. a.) と名付けた。

図2.



●:バクテリオシン活性なし ○:バクテリオシン活性なし

(6) Bac51 のシグナルペプチド同定

SignalP-HMM prediction (gram⁺ models): sequenceにより解析した。BacAのN末端側 39 アミノ酸は典型的なシグナル配列であり、39 番目と 40 番目のアミノ酸間でSec依存的に切断され、C末端側が菌体外へ分泌される。切断部位直前のアミノ酸配列VEAである。BacBには明らかなシグナル配列は存在しなかった。bacAがbac 51 の構造蛋白遺伝子であり、bacBが免疫因子遺伝子である。分泌型bac 51 蛋白は、105 アミノ酸(約 12.0 kDa)である。

(7) pHY のバクテリオシン領域の Northern hybridization

Northern hybridization により転写産物の解析を行った。 bacA のプローブを用いた時、約700nt と約500nt の2本のmRNA が検出された。約700nt のmRNA は、オペロン全体、500ntのmRNA は bacA のみの転写産物と考えられた。

(8) 転写開始点の解析

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を行い、mRNA の開始点を決定し、次図のように bacA 上流の予想プロモータ配列 (-10) より 6 塩基下流の T であることが解った。

図3. bac 51の転写解析 (Northern hybridization)

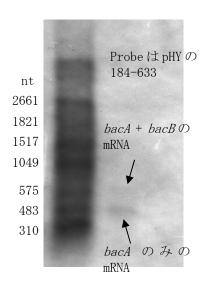
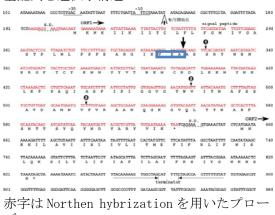


図4. pHYのORF1 (bacA)とORF (bacB)の塩 基配列と遺伝子構造



ブ

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10件)

- 1. Zheng B., <u>Tomita H.</u>, <u>Inoue T.</u> and <u>Ike</u> Isolation of VanB-Type Enterococcus faecalis Strains from Nosocomial Infections: First Report of the Isolation and Identification of the Pheromone-Responsive Plasmids pMG2200, Encoding VanB-Type Vancomycin Resistance and a Bac41-Type Bacteriocin, and pMG2201, Encoding Erythromycin Resistance and Cytolysin (Hly/Bac). Antimicrob Agents chemother. 53(2):735-747, 2009. 查読有
- 2. Tomita H. and Ike Y. Genetic Analysis the Enterococcus Vancomycin-Resistance Conjugative Plasmid pHT β : Identification of the Region involved in Cell Aggregation

and traB, a Key Regulator Gene for Plasmid Transfer and Bacteriol. Aggregation. J 190(23):7739-7753, 2008. 査読有

<u>Tomita H.</u>, kamei E. and <u>Ike Y.</u> Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded the Enterococcus faecalis pheromone-responsive conjugative plasmid pYI14: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (lysin and activator). J Bacteriol. 190(6):2075-85, 2008. 査 読有

[学会発表] (計 21 件)

- 池康嘉、多剤β-ラクタム薬耐性と抗 緑膿菌薬、第83回日本細菌学会総会、 2010.3.27、パシフィコ横浜(神奈川)
- 池 康 嘉 、 Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in Japan、第 21 回日本臨床微生物学会総会(日韓合同 シンポジウム)、2010.1.31、東京ドー ムホテル (東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

池 康嘉 (IKE YASUYOSHI) 群馬大学・大学院医学系研究科・教授 研究者番号:60125820

(2)研究分担者

富田 治芳(TOMITA HARUYOSHI) 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号:70282390

井上 貴子 (INOUE TAKAKO) 研究者番号:00431700 群馬大学・大学院医学系研究科・助教

(3) 連携研究者

谷本 弘一 (TANIMOTO KOICHI) 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号:40188389

藤本 修平 (FUJIMOTO SHUHEI) 群馬大学・大学院医学系研究科・講師 研究者番号:90241869 (H19, 20 年度)

野村 隆浩 (NOMURA TAKAHIRO) 群馬大学・大学院医学系研究科・技術専門

研究者番号:30396634