

平成21年5月8日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19780160
研究課題名（和文） 紅藻スサビノリの環境（栄養・温度）応答の分子機構の解明
研究課題名（英文） Molecular analysis of physiological responses to environmental changes in marine macroalga, <i>Porphyra yezoensis</i> (Rhodophyta)
研究代表者 柿沼 誠 (KAKINUMA MAKOTO)
三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
研究者番号：60303757

研究成果の概要：紅藻スサビノリ葉状体の栄養塩類の取込みに重要な役割を果たすと考えられる4種類のトランスポーター遺伝子を同定し、栄養環境変化に対する各遺伝子の発現応答性を明らかにした。また、スサビノリ葉状体の環境応答や葉状体栄養細胞の生殖細胞への分化に関与していると考えられる5種類の候補遺伝子を同定し、環境（水温および光周期）変化にて生殖細胞分化を誘導した葉状体における各遺伝子の発現変動を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：海洋生物化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：紅藻・スサビノリ・環境応答・トランスポーター・窒素同化・栄養塩・生殖細胞・細胞分化

1. 研究開始当初の背景

日本人にとって馴染み深い海藻類は、古くから食糧あるいは工業原料として利用されてきた。食用海藻の中で、産業上最も重要な藻種が紅藻スサビノリ (*Porphyra yezoensis*) である。養殖スサビノリの生産量は、近年の養殖技術の発達・改良、多収穫性品種の選抜育種、加工工程の全自動化などにより飛躍的に増大した。しかしながら、スサビノリの養殖は気象・海況に大きく左右されるため、依然として養殖には多くの病障害が伴い、生産量や品質は不安定である。

近年、日本各地のスサビノリ養殖場において、スサビノリの生産量や品質を著しく低下させる色落ち現象が毎年発生し、養殖業に甚大な被害をもたらしている。色落ちは、海水中の栄養塩類（特に無機窒素）の減少によりスサビノリ葉状体が退色・黄褐色化する現象で、その原因として、養殖期の降雨量減少による陸地からの栄養塩類の供給量減少、植物プランクトンの大量発生による海水中の栄養塩類の減少、などが考えられている。これまでに、養殖場の水質（栄養塩濃度、植物プランクトン量など）と色落ち発症との関連性

が調べられている。また、色落ちスサビノリでは、紅藻特有のタンパク質色素フィコピリンの含量が著しく減少していることが明らかにされている。しかしながら、スサビノリの色落ち発症の生理・分子機構や、栄養塩類の代謝特性は未だ明らかにされておらず、養殖場における色落ち現象発生の予測・予防を困難なものとしている。したがって、養殖場におけるスサビノリの色落ち発生の予測や、低栄養塩耐性品種の効率的な選抜育種などを行うためには、スサビノリの栄養塩類の代謝特性と色落ち発症機構を分子レベルで解明することが必要不可欠である。

また、近年の海水温の上昇傾向により、養殖スサビノリの生産量や品質の低下が懸念されている。特に養殖スサビノリの採苗・育苗が海水温の上昇傾向により大きな影響を受け、養殖初期の生産量低下や種網の品質低下などが起こっている。スサビノリ葉状体は、低水温、短日条件では成熟することなく成葉まで生長するが、高水温、長日条件では葉状体栄養細胞の単孢子や生殖細胞への分化（成熟）が誘導・促進され、葉状体から単孢子、精子、果孢子が放出されるに伴い葉状体は崩壊する。このようなスサビノリ葉状体の生長特性は、スサビノリの養殖期間・海域を限定する要因であると共に、海水温上昇による養殖初期の生産量や種網の品質に与える影響にも深く関係している。したがって、近年の海水温の上昇傾向がスサビノリ葉状体の生長特性に与える影響を把握し、養殖法の改善・改良や高温耐性品種の効率的な選抜育種などを行うためには、葉状体が海水温変化を認識して成熟応答する一連の分子機構の解明が必要不可欠である。

2. 研究の目的

スサビノリ色落ちの発症は、海水中の栄養塩類のうち、特に無機窒素の減少によるところが大きい。藻類や陸上植物が一般に利用できる無機窒素源は主に硝酸イオンとアンモニウムイオンであり、これらの取込みはそれぞれ、硝酸イオントランスポーター（NRT）とアンモニウムイオントランスポーター（AMT）により行われる。我々は既に、海水中の無機窒素量の変化により発現変動する遺伝子の単離・同定を進め、これまでに海水中の無機窒素の有無で発現変動する遺伝子由来の cDNA 断片を 24 個単離しており、そのうちの 19 個は窒素源の取込みに関与する NRT と尿素トランスポーター（UT）をコードしていた。そこで本研究では、スサビノリの NRT（PyNRT）、UT（PyUT）、AMT（PyAMT）に着目し、各トランスポーターの cDNA を単離して各分子の一次構造を明らかにする。さらに、スサビノリ葉状体の色落ち過程や、色落ちスサビノリに対して種々の窒素源を添加して

色落ちを回復させる過程における PyNRT、PyAMT、PyUT 遺伝子の発現変化を調べ、無機窒素の取込みに関わる分子の特性を把握し、葉状体の無機窒素の代謝特性と生長特性を明らかにする。

また、我々は既に、スサビノリ葉状体が水温や光周期の変化を認識して成熟応答する一連の分子機構に関与する遺伝子の単離・同定も進めている。これまでに、環境認識や成熟応答に関与すると考えられる遺伝子由来の cDNA 断片を多数単離し、これらの中には環境応答、代謝制御、形態形成、細胞分化への関与が示唆されている heat shock protein 82（HSP82）、HSP90、mitogen-activated protein kinase（MAPK）、SNF1-related protein kinase（SNF1PK）、低分子量 G タンパク質（SGTP）をコードしているものが含まれていた。そこで本研究では、スサビノリの HSP82（PyHSP82）、HSP90（PyHSP90）、MAPK（PyMAPK）、SNF1PK（PySNF1PK）、SGTP（PySGTP）cDNA を単離して各分子の一次構造を明らかにする。さらに、スサビノリ葉状体栄養細胞が生殖細胞へ分化する過程における各遺伝子の発現変化を調べ、葉状体の環境認識や成熟応答と各遺伝子機能との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) スサビノリ葉状体における窒素源取込みの分子機構解析

① 窒素源の取込みに関与するトランスポーター遺伝子の cDNA クローニング：スサビノリ葉状体の窒素源取込みに重要な役割を果たす PyNRT、PyAMT、PyUT をコードする cDNA の単離を行った。まず、濾過天然海水培地で低水温（10℃）、短日条件（明期 10 h、暗期 14 h）で 72 h 培養した葉状体から全 RNA を抽出・精製し、RACE PCR 用 cDNA を合成した。既に得られている部分 cDNA の塩基配列情報を基に PyNRT および PyUT cDNA に対する RACE PCR 用プライマーを、スサビノリ EST データベースの塩基配列情報を基に PyAMT cDNA に対する RACE PCR 用プライマーを作製した。各プライマーを用いて RACE PCR 用 cDNA を鋳型とした RACE PCR を行い、増幅 cDNA をクローニングして塩基配列を決定した。

② 葉状体の色落ち誘導試験：室内培養におけるスサビノリ葉状体の色落ち誘導条件を明らかにするため、室内培養試験を行った。栄養補強海水培地を用いて低水温、短日条件にて生長させた葉状体を濾過天然海水培地に移し、培地交換せずに低水温、短日条件で培養を続けて色落ちを誘導した。24 h 毎に葉状体色ならびに海水培地中の溶存無機態窒素（DIN）を測定し、葉状体の色落ちが始まるまでと、完全な色落ち状態になるまでの培養時間を調べた。

③葉状体の色落ち過程におけるトランスポーター遺伝子の発現解析:PyNRT, PyAMT, PyUT cDNA の塩基配列情報を基に, 各 cDNA を特異的に検出するリアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットを作製した. 葉状体の色落ち誘導には濾過天然海水培地を用い, 培地交換せずに低水温, 短日条件で葉状体を 168 h 培養した. 培養期間中, 24 h 毎に葉状体を回収し, 各葉状体から全 RNA を抽出・精製した. 得られた全 RNA から合成したリアルタイム PCR 用 cDNA を鋳型として, PyNRT, PyAMT, PyUT cDNA に特異的なプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム PCR を行い, 各遺伝子の発現変化を調べた.

④葉状体の色落ち回復過程におけるトランスポーター遺伝子の発現解析:濾過天然海水培地を用い, 培地交換せずに低水温, 短日条件で葉状体を 72 h 培養して色落ちを誘導した. 次いで, 窒素源として硝酸ナトリウム, 亜硝酸ナトリウム, 塩化アンモニウム, 硫酸アンモニウム, 尿素, アミノ酸(アルギニン, グルタミン酸, グリシン)を低濃度 (0.15 mM) あるいは高濃度 (1.5 mM) で添加し, 各窒素源添加後 2 h と 26 h の葉状体を回収した. 各葉状体から抽出・精製した全 RNA からリアルタイム PCR 用 cDNA を合成し, リアルタイム PCR により各遺伝子の発現変化を調べた.

(2)スサビノリ葉状体における環境認識および成熟応答の分子機構解析

①環境認識および成熟応答に関与する遺伝子の cDNA クローニング:スサビノリ葉状体が環境(水温, 光周期)変化を認識して成熟応答する一連の分子機構に関与していると考えられる PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP の cDNA 単離を行った. 栄養補強海水培地を用いて低水温, 短日条件で培養したスサビノリ葉状体を高水温 (15°C), 長日条件(明期 14 h, 暗期 10 h)に移して培養し, 葉状体栄養細胞の生殖細胞への分化を誘導した. 生殖細胞の形成が認められた時点で葉状体を回収し, 全 RNA を抽出・精製して RACE PCR 用 cDNA を合成した. 既に得られている部分 cDNA の塩基配列情報を基に PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP cDNA に対する RACE PCR 用プライマーを作製した. 各プライマーを用いて RACE PCR 用 cDNA を鋳型とした RACE PCR を行い, 増幅 cDNA をクローン化して塩基配列を決定した.

②葉状体の成熟誘導試験:室内培養におけるスサビノリ葉状体の成熟誘導条件を明らかにするため, 室内培養試験を行った. 栄養補強海水培地を用いて低水温, 短日条件にて生長させた未成熟葉状体を, 高水温, 長日条件での培養に移し, 成熟を誘導した. 24 h 毎に葉状体栄養細胞を観察し, 栄養細胞が生殖細胞に分化するまでの培養時間を調べた.

③葉状体の成熟過程における候補遺伝子の発現解析:PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP cDNA の塩基配列情報を基に, 各 cDNA を特異的に検出するリアルタイム PCR 用プライマー・プローブセットを作製した. 栄養補強海水培地を用いて低水温, 短日条件にて生長させた未成熟葉状体を高水温, 長日条件に移して培養し, 葉状体の成熟を誘導した. 葉状体の成熟が十分に進むまで 24 h 毎に葉状体を回収し, 各葉状体から全 RNA を抽出・精製した. 得られた全 RNA から合成したリアルタイム PCR 用 cDNA を鋳型として, PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP cDNA に特異的なプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム PCR を行い, 各遺伝子の発現変化を調べた.

④候補遺伝子産物に対する抗体の選定:大腸菌用発現ベクターに PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP cDNA を組み込み, 各分子の大腸菌発現ベクターを構築した. 各ベクターを用いて発現用宿主大腸菌を形質転換させ, 組換えタンパク質を調製した. また, PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP の演繹アミノ酸配列情報を基に, 各分子に対する市販の一次抗体を選定した. PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP の大腸菌組換えタンパク質と選定した一次抗体との反応性をウエスタン・ブロット解析により調べた.

⑤葉状体の成熟過程における候補遺伝子産物の同定:低水温, 短日条件にて生長させた未成熟葉状体と, 高水温, 長日条件で培養して成熟誘導した葉状体を回収し, 4%パラホルムアルデヒド, 0.4 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) (PBS-PFA 固定液) に浸漬した. 次いで, 葉状体をエタノール浸漬により脱水・脱色し, アクリル樹脂に包埋後, 回転式マイクロームにて葉状体を 10 μ m に薄切した. 樹脂包埋切片をスライドガラスに固定後, 選定した市販一次抗体およびアルカリフォスファターゼ (AP) 結合二次抗体を用いた免疫染色を行った. なお, 抗体反応の検出には NBT/BCIP による発色法を利用した.

4. 研究成果

(1)スサビノリ葉状体における窒素源取込みの分子機構解析

①窒素源の取込みに関与するトランスポーター遺伝子の cDNA クローニング:RACE PCR により, PyNRT および PyAMT についてはそれぞれ, 479 および 483 アミノ酸残基をコードする約 1.9~2.0 kbp の cDNA が得られた. 一方, PyUT については異なるアミノ酸残基をコードする約 2.4~2.5 kbp の 2 種類の cDNA (740 アミノ酸残基をコードする PyUT1 cDNA と 680 アミノ酸残基をコードする PyUT2 cDNA) が得られた.

②窒素トランスポーターの一次構造解析：PyNRT, PyAMT, PyUT1, PyUT2の演繹アミノ酸配列の疎水性分布を調べたところ、PyNRTは12回、PyAMTは11回、PyUT1は15回、PyUT2は16回の膜貫通ドメインをもつ膜タンパク質であることが明らかとなった。NRTには、一次能動輸送体(ABC型NRT)と、プロトンとの共輸送によって硝酸イオンを輸送する2種類の二次能動輸送体(NRT1とNRT2)が存在する。PyNRTの演繹アミノ酸配列には、NRT2に特徴的なmajor facilitator superfamily(MFS)モチーフとnitrate-nitrite porterファミリーモチーフが保存されており、PyNRTはNRT2に分類されると推察された。また、PyNRTのC末端にはリン酸化配列が認められ、他生物種NRT2と同様にPyNRTもリン酸化による活性調節を受けることが考えられた。AMTも構造や機能によって3つのファミリーに分類されるが、陸上植物や藻類のAMTはAMT1ファミリーに属している。PyAMTの演繹アミノ酸配列はAMT1のそれと高い相同性を示し、他生物種AMT1で高度に保存されているMFSモチーフ様配列も認められたため、PyAMTはAMT1ファミリーに分類されると推察された。陸上植物や酵母では、sodium-solute symporterスーパーファミリーに属する高親和性プロトン-尿素共輸送体DUR3が尿素の取り込みを行っている。PyUT1およびPyUT2の演繹アミノ酸配列は、陸上植物DUR3のものと比較的高い相同性を示した。しかしながら、PyUT1とPyUT2の演繹アミノ酸配列の同一率が約56%であること、両分子の膜貫通ドメイン構造が異なること、陸上植物のDUR3に保存されているwalker Aモチーフ様配列がPyUT2にのみ認められることから、PyUT1とPyUT2の細胞内機能は大きく異なることが推察された。

③葉状体の色落ち誘導条件：葉状体(平均5cm)5枚を500mLの濾過天然海水培地で培養して色落ちを誘導し、24h毎に葉状体色と海水培地のDINを測定した。その結果、色落ち誘導後24hで海水培地のDINは最小値となり、誘導後72~96hで葉状体は色落ち状態となった。

④葉状体の色落ち過程におけるトランスポーター遺伝子の発現変化：色落ち誘導前後の葉状体におけるPyNRT, PyAMT, PyUT1, PyUT2遺伝子の発現量を調べたところ、各遺伝子発現は色落ち誘導後48hで急増し、その後も高い発現レベルを維持し続けていた。なお、色落ちによりPyUT2遺伝子発現が特に著しく誘導され、色落ち誘導後48hでの発現量は色落ち誘導前の約75倍であった。したがって、スサビノリ葉状体はPyNRT, PyAMT, PyUT1, PyUT2遺伝子を高発現して貧栄養環境に対応していること、PyUT2遺伝子が貧栄養環境に対する応答・適応に特に重要な役割を果たし

ていることが考えられた。

⑤葉状体の色落ち回復過程におけるトランスポーター遺伝子の発現変化：色落ち誘導後72hでPyNRT, PyAMT, PyUT1, PyUT2遺伝子発現は色落ち誘導前の約5~50倍に増加した。窒素源添加後2hおよび26hで最も顕著に発現抑制されたのはPyNRT遺伝子で、硝酸ナトリウム以外の窒素源添加によりPyNRT遺伝子の発現レベルは、色落ち誘導前の発現レベルにまで抑制された。PyAMT, PyUT1, PyUT2遺伝子発現は、無機態窒素源の添加により大きく抑制されたが、有機態窒素源の添加に対して顕著な変動を示さなかった。したがって、PyNRT遺伝子は硝酸イオンを除く窒素源に対して、PyAMT, PyUT1, PyUT2遺伝子は有機態窒素源よりも無機態窒素源に対して顕著な発現応答性を示すこと、貧栄養状態の葉状体はアンモニウムイオンを優先的に取込むことが明らかとなった。なお、PyUT1とPyUT2遺伝子はDUR3遺伝子とは異なる発現特性を示し、両PyUTの細胞内機能はDUR3のそれと異なると考えられた。貧栄養条件下で高発現するPyUTの細胞内での機能特性や局在性を明らかにするためには、酵母変異株を用いた遺伝子相補試験や、Anti-PyUT抗体を用いた免疫染色を行う必要がある。

(2)スサビノリ葉状体における環境認識および成熟応答の分子機構解析

①環境認識および成熟応答に関与する遺伝子のcDNAクローニング：RACE PCRにより、PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTPについてそれぞれ、757, 887, 387, 417, 203アミノ酸残基をコードする約0.8~3.0 kbpのcDNAが得られた。

②環境認識および成熟応答に関与する分子の一次構造解析：PyHSP82およびPyHSP90の演繹アミノ酸配列中にはHSP90ファミリーモチーフが存在し、各分子のC末端部にはそれぞれ、細胞質局在モチーフおよび小胞体局在モチーフが認められた。したがって、PyHSP82は細胞質型HSP90に、PyHSP90は小胞体型HSP90に分類されると推察された。PyMAPKの演繹アミノ酸配列には、MAPKに特徴的なATP結合領域、Ser/Thrキナーゼ活性部位、活性化領域(T-loop)、CDドメインが保存されていた。なお、T-loop内に存在するリン酸化モチーフ“TxY”は多くの場合“TEY”であるが、PyMAPKのそれは“TAY”であった。PyMAPKと同様、PySNF1PKの演繹アミノ酸配列にはATP結合領域、Ser/Thrキナーゼ活性部位、T-loopが保存されていた。また、PySNF1PKのT-loop内のリン酸化部位は、他生物種SNF1PKと同様にThr残基であった。SGTPは構造と機能により大きくRas, Rab, Arf, Rho, Ranに分類される。PySGTPはRabファミリーに分類され、GTP結合領域やGTP結合に伴って構造変化す

る Switch I/II 領域は他生物種 SGTP 同様、高度に保存されていた。

③葉状体の成熟誘導条件：低水温、短日条件にて生長させた未成熟葉状体（平均 5 cm）5 枚を 500 mL の栄養補強海水培地に移し、高水温、長日条件で培養して葉状体の成熟を誘導した。24 h 毎に葉状体を顕微鏡で観察したところ、成熟誘導後 72 h の葉状体先端部で生殖細胞の分化が認められ、誘導後 168 h で生殖細胞は葉状体の半分以上を占めた。

④葉状体の成熟過程における候補遺伝子の発現変化：低水温、短日条件で培養し、生殖細胞が認められない葉状体を未成熟葉状体、成熟誘導後 48 h で生殖細胞が認められない葉状体を成熟誘導葉状体、成熟誘導後 72 h で葉状体先端部に生殖細胞が認められた葉状体を成熟初期葉状体、成熟誘導後 168 h で生殖細胞が葉状体の半分以上を占めるものを成熟葉状体とし、各葉状体における PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP 遺伝子の発現量を調べた。その結果、PyMAPK および PySNF1PK 遺伝子は成熟初期葉状体で、PyHSP82, PyHSP90, PySGTP 遺伝子は成熟誘導および成熟葉状体で高発現していることが明らかとなった。各遺伝子産物は環境変化を認識して成熟応答する一連の分子機構において、重要な役割を担っていることが考えられた。

⑤候補遺伝子産物に対する抗体の選定：大腸菌内で PyHSP82, PyHSP90, PyMAPK, PySNF1PK, PySGTP を発現させたところ、予想される分子量の組換えタンパク質の発現が確認された。各組換えタンパク質につき、選定した市販一次抗体および AP 結合二次抗体を用いたウェスタン・ブロット解析を行ったところ、Anti-ERK1/2 抗体が PyMAPK を認識することが明らかとなった。しかしながら、他の組換えタンパク質は選定した市販一次抗体と反応せず、これらタンパク質の免疫染色には特異抗体を独自に作製する必要がある。

⑥葉状体の成熟過程における PyMAPK の同定：未成熟葉状体、成熟誘導葉状体、成熟初期葉状体、成熟葉状体のアクリル樹脂包埋切片に対して Anti-ERK1/2 抗体および AP 結合二次抗体を反応させ、発色法による免疫染色を行った。その結果、PyMAPK は成熟初期葉状体の細胞内で多く蓄積されている傾向が認められた。しかしながら、栄養細胞（未分化細胞）、雌雄生殖細胞の間で PyMAPK の蓄積量に顕著な差は認められず、生殖細胞形成初期における PyMAPK の機能特性を明らかにすることはできなかった。細胞内シグナル伝達に関与する MAPK は、リン酸化（活性化）後に細胞質から核内に移行し、他の遺伝子発現を制御することが知られている。生殖細胞形成期における PyMAPK の細胞内機能を明らかにするためには、PyMAPK をより特異的に認識す

る一次抗体や、リン酸化（活性型）PyMAPK を特異的に認識する一次抗体を独自に作製する必要がある。

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 1 件）

- ① Kakinuma M, Coury DA, Nakamoto C, Sakaguchi K, Amano H. Molecular analysis of physiological responses to changes in nitrogen in a marine macroalga, *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *Cell Biol. Toxicol.* 2008; **24**: 629-639, 査読有。

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Kakinuma M, Tominaga H, Nakamoto C, Miura Y, Inoue M, Morita T, Maegawa M, Amano H. Molecular analysis of physiological and developmental responses to environmental changes in marine macroalgae and angiosperms. Third Bilateral Seminar Italy and Japan: Physiological and Chemical Impacts on Marine Organisms (Seeking Sustainability and Postgenomics). 2008 年 11 月 26 日, 愛知県名古屋市。
- ② Miura Y, Suzuki T, Coury DA, Kaneko I, Amano H, Kakinuma M. Isolation and characterization of five gametogenesis-related genes in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). 5th World Fisheries Congress. 2008 年 10 月 23-24 日, 神奈川県横浜市。
- ③ 中本知香, Coury DA, 坂口研一, 天野秀臣, 柿沼 誠. 紅藻スサビノリ窒素トランスポーターの構造及び発現解析. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会. 2007 年 9 月 27 日, 北海道函館市。

〔その他〕

DDBJ/EMBL/GenBank アクセス番号

PyNRT cDNA : AB298556

PyUT1 (PyDUR3.1) cDNA : AB359179

PyUT2 (PyDUR3.2) cDNA : AB359180

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿沼 誠 (KAKINUMA MAKOTO)

三重大学・大学院生物資源学研究所・
准教授

研究者番号：60303757

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者