

機関番号：34504

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580090

研究課題名（和文）超好熱菌の恒常性維持に関する研究

研究課題名（英文）Study on homeostasis of hyperthermophiles

研究代表者

藤原 伸介 (FUJIWARA SHINSUKE)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：90263219

研究成果の概要（和文）：85℃以上で生育する超好熱菌は、分子系統学的に原始生命に最も近い現存生物である。本研究では *Thermococcus kodakaraensis* をモデル生物として、超好熱菌が活発に増殖する状態から生育を抑えられた状態に移ったときに細胞がどのような適応応答を行うか解析した。特に、温度ストレス下での応答に加え、対数増殖期から定常期へ移った際の応答に注目し、形態と膜脂質の変動、遺伝子の発現動態、ポリアミンのような低分子物質のもつ役割について集中的に研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Living microorganisms face various kinds of stress and protect themselves by inducing several stress-responsive proteins. Among all microorganism, hyperthermophiles that grow above 85 °C are considered as one of most primitive microorganisms. It is unclear how hyperthermophile adapts to environmental changes such as temperature stress and nutrient starvation. In the present study, adaptation mechanisms of hyperthermophiles to environmental changes were focused and analyzed using hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* as a model microorganism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アーキア、超好熱菌、環境適応、ポリアミン、分子シャペロニン

1. 研究開始当初の背景

海底火山や温泉などの熱水坑に生育する超好熱菌は原始生命の特徴を残す現存生物と考えられている（図1）。現存する自然界の微生物は様々な生育ストレスにさらされ耐えてきた。ストレスへの応答、順化は微生物の進化・多様性獲得と密接に関係していると考えられる。特に超好熱菌の環境適応機構を研究することで、生物の進化を考察する興

味深い知見が得られると考えられる。特に超好熱菌の低温環境への適応は多様性獲得と密接な関係があったのではないと思われる。現在の地球上には多数の微生物が存在するが、活発に増殖できる環境におかれているものは少ない。つまり対数増殖している細胞はわずかで、ほとんどの細胞は貧栄養な環境下で生きている。定常期の細胞は微生物の自然な姿を反映しているといえよう。最近の研

菌から、大腸菌の対数増殖期と定常期ではリボソーム超分子構造が変化することが見出された。特に定常期に出現する 100S 複合体は 70S 複合体が 2 量体化したユニークな構造であり、この構造は特殊な因子 HPF と RMF という 2 つのタンパク質因子によって調節されていることが解明されている。100S リボソームが形成されると細胞は休眠状態になる。枯草菌では孢子を形成して飢餓状態に耐えるが、孢子内のリボソームは 100S である。

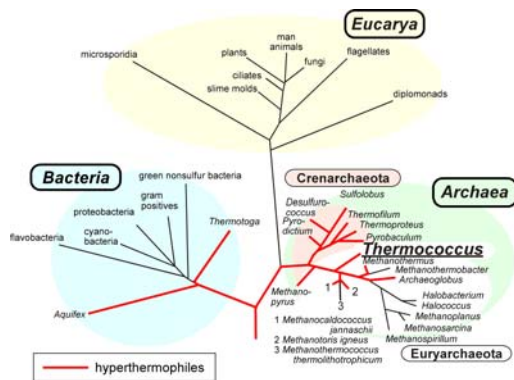


図1 生物の進化系統樹
超好熱菌は全生物の共通の祖先生物と考えられている（赤字は超好熱菌を示す。）

超好熱菌の環境適応機構は不明な点が多く、栄養状態の悪化にともなうリボソーム休止機構も明らかではない。ゲノム中には HPF や RMF のオルソログは存在せず、定常期に細胞内の恒常性がどのように保たれているのか不明である。また超好熱菌の一部には低温で特異的に誘導されてくる分子シャペロニンが存在する。このシャペロニンは低温ストレスで誘導されるが、生育段階での発現時期は対数増殖期に限られ、定常期にはその発現は抑えられてしまう。超好熱菌は生命誕生以来、環境変化の少ない場所で数十億年という長い年月をできるだけ変化しないで生きながらえてきた生物である。その時間の多くは決して富栄養な環境ではなかったはずである。超好熱菌の生育時期特異的な遺伝子の発現動態を観察することや、代謝活動の変化を調べることは、細胞の進化を考えるうえでも意義深い。我々は生育下限温度での適応因子を研究し、その過程の中で細胞が増殖時期の違い（対数増殖期と定常期）により、脂質合成系酵素が活性変動したり、タンパク質の品質を管理するシャペロン分子の中に、遺伝子の発現が著しく変化するものがあることを見出した。本研究では細胞の恒常性維持という視点から、遺伝子の網羅的な発現動態・機能動態の解明を行った。*Thermococcus kodakarensis* は生育至適温度が 85°C の超好熱性アーキアである。本菌は遺伝子の破壊系

が確立されており、遺伝子の機能を検証できる優れたモデル微生物である。本課題では超好熱菌の恒常性を維持に焦点をあて、以下の目的を掲げて研究を遂行した。

2. 研究の目的

(1) リボソームの生育時期に依存した超分子構造の解明

リボソームは遺伝子の翻訳を通じて細胞の増殖を支配する。構造的視点から超好熱菌のリボソームの特徴を解き明かすことを目的とし、各生育時期での超分子構造と生育段階に依存した活性の変化を検討する。

(2) 環境変化に応答する因子のカタログ化
従来プロテオーム解析は 2 次元電気泳動で検出した特異的なタンパク質の特定により行われてきたが、本研究では質量分析 (LC-MS) を利用したプロテオーム解析と DNA マイクロアレイを用いて解析を行う。超好熱菌ではゲノムサイズが大腸菌の半分にも満たないことから、候補タンパク質も限られ質量分析による手法が可能と思われる。今回は恒常性維持という観点から、生育段階に加え、温度変化（高温ストレスと低温ストレス）、培地の硫黄成分の影響も注目している。硫黄は生命維持に必要な元素のひとつだが、*Thermococcus kodakarensis* においては電子の授受に関係しており、エネルギー生産で重要な役割を果たしている。*T. kodakarensis* はヒドロゲナーゼを有しているが、硫黄を含まない培地では水素を発生して生育する。一方、硫黄が含まれる場合、ヒドロゲナーゼは硫黄を最終電子受容体として硫化水素を放出する。また、解糖系をはじめ、代謝酵素の多くが補酵素に鉄硫黄クラスターを有するフェレドキシンを利用してエネルギーの獲得を行う。興味深いことに硫黄を含まない培地では *T. kodakarensis* は増殖後に溶菌してしまう。硫黄が制限された環境で細胞の恒常性維持がどのように行われるのか、この点についても検討する。

(3) 同定した因子の生理学的意義の解明

本菌では特定の遺伝子の生理学的機能が遺伝学的手法により考察できる。破壊株と野生株の生理学的性質（生育特性）の違いから遺伝子の機能・役割を解明する。タンパク質性の因子については組換え体を取得し、試験管内実験により検証する。

3. 研究の方法

(1) リボソームの生育時期に依存した超分子構造の解明

密度勾配遠心法により細胞中からリボソームを分取し、超分子の大きさと構成成分タンパク質を分析した。分離は RFHR (radical-free and highly reducing) 2 次元電気泳動法により行った。また、質量分析装

置 (LC-MS) を利用しての構成成分を同定した。翻訳活性はキチナーゼ遺伝子の転写産物を用いて S30 画分を用いて、*in vitro* 翻訳を行い、4-MU (メチルウンベルフェロン) を基質に評価した。翻訳活性は S100 画分とリボソームを混合した試料についても調べた。興味深いタンパク質については遺伝子の破壊を行い、破壊株の生理学的性質がどのように変化するかを調べた。超好熱菌には多価ポリアミンが存在することが報告されている。これら塩基性分子が翻訳に関与していることも考えられた。この点についてもあわせて検討した。

(2) 環境変化に応答する因子のカタログ化

T. kodakarensis の細胞を栄養培地で増殖させ、経時的にサンプリングして、各段階での細胞を取得した (生育時期の違いによる細胞の分取)。タンパク質のプロテオーム解析、転写産物のトランスクリプトーム解析をそれぞれ質量分析法 (LC-MS) とマイクロアレイ法で行った。また生育時期の違いに加え、培養温度の違い (60°C、85°C、93°C) で同様の解析を行い、データを収集した。

(3) 同定した因子の生理学的意義の解明

上記 (1) (2) の解析により特異的に発現が確認された遺伝子については、推定される機能に応じて遺伝子破壊株を構築し生理学的性質を調べ、あるいは組換えタンパク質を取得して生化学的性質の解析を試みた。*T. kodakarensis* は遺伝子の特異的破壊法が確立されている唯一の超好熱菌である。その原理は本菌が 5-フルオロオロト酸 (FOA) を含む選択培地では *pyrF* 遺伝子の機能欠損株のみが生育するという性質に基づくものであり、この性質を利用しながら非選択圧下で *pyrF* の機能相補と同時に特定の遺伝子を破壊する。興味深い因子の生化学的性質については大腸菌を利用した高発現系 (pET 系プラスミド、pQE 系プラスミド) を用い、高発現させて調べた。タンパク質によっては *in vitro* の実験を行い、機能の検証を行った。シャペロン様因子については、凝集抑制活性を指標にどのような働きがあるのか調べた。特に細胞内タンパク質の管理に直接関与すると考えられることから、その因子がどのような基質分子に作用するのかについても興味を持たれる。この点については特異的抗体を調製し、免疫沈降実験から、基質分子の特定を行った。

4. 研究成果

(1) リボソームの生育時期に依存した超分子構造の解明

Thermococcus kodakarensis を 85°C で培養し、対数増殖期と定常期の細胞を得た。細胞の持つ翻訳活性を検討するために、それぞれ

の時期から無細胞抽出液 (S30 画分) を分取し、翻訳活性を検討した。翻訳活性は対数増殖期のもののみ認められた。次にリボソームの大きさを調べたところ、対数増殖期、定常期のいずれの細胞でも 70S リボソームのみが認められ、100S リボソームはみられなかった。さらに細胞質画分 (S100 画分) とリボソーム (それぞれの増殖期の 70S) を、組み合わせて活性を検証したところ、対数増殖期のリボソームを用いた場合にのみ高い活性が認められた。次に定常期のリボソーム画分に含まれる特異的タンパク質を特定するために、RFHR 二次元電気泳動と質量分析 (LC-MS) 分析を行った。定常期のリボソーム画分には対数増殖期にはない特異的なタンパク質が存在し、これらは転写レベルで誘導されていることがわかった。また (2) の解析により、培養温度の上昇に伴いアミノプロピルスベルミンの合成が高まることが示された。そこで *in vitro* の翻訳実験にアミノプロピルスベルミンを添加したところ、特に高温で胞内翻訳活性を促進する効果がみられた。

(2) 環境変化に応答する因子のカタログ化

定常期に入った細胞で、その形態と膜脂質の変動、遺伝子の発現動態、細胞のもつ翻訳活性について集中的に研究を行った。形態変化を観察したところ、定常期に入ると鞭毛が減少し、細胞も小型化していることが確認された。膜脂質成分を調べたところ、定常期になるにつれて炭化水素鎖の長いカルドアーケオール型脂質の割合が高まった。遺伝子の発現動態を調べたところ、この合成制御は転写段階でなされていることがわかった。時期特異的に発現しているものの中に、分子シャペロン (*cpkA*) も見出された。*cpkA* の生育時期特異性は 60°C でのみみられた。いくつかの超好熱菌において多価ポリアミンが高温での生育に重要であることが報告されているが、生育時期特異性はみられなかった。しかし生育温度に依存した多価ポリアミンの合成が確認され、この調節は TK1592 遺伝子 (アデノシルメチルプロピルアミンの合成酵素をコードする) によって支配されていることが示唆された。TK0147 (スペルミジン合成酵素をコードする) はポリアミンの生合成に関与する遺伝子であるが、その発現は生育温度、生育時期のいずれにも影響を受けなかった。またポリアミン合成の起点となるアルギニン脱炭酸酵素は生育に必須であることが遺伝子の破壊実験により示された。本酵素も生育時期特異的な発現量変動はみられなかった。また、培地中の硫黄の有無による遺伝子の発現動態変化を調べたところ、硫黄の添加により硫化水素発生系遺伝子の発現が誘導され、硫黄を除くと水素発生系遺伝子の

発現が誘導された。この調節の中心的役割を果たす転写因子が TK1086 と予測された。

(3) 同定した因子の生理学的意義の解明

上記のカタログ化解析で得られた知見により、いくつかを選びその機能を解析した。ポリアミン生合成系については初期酵素であるアルギニン脱炭酸酵素 TK0149 の生育必須性が明らかになった。TK1592 は、高温(93°C)で高発現し、アミノプロピル基供与に中心的な役割を果たしている。その誘導は転写レベルでなされ、プロモーター上流領域が制御のシスエレメントとして機能していることが明らかになった。この領域には既知の熱ショック応答性遺伝子の保存配列は存在せず、あたらしい制御機構の存在が示唆される。なお、ポリアミンはリボソームの超分子構造に影響を与えなかった。

生育時期特異的に膜脂質成分の変動を調べたところ、増殖条件の悪化に応じて炭水素鎖の長いカルドアーケオール型脂質の割合が高まることが示された。今回、シス型プレニルトランスフェラーゼについて生化学的解析を行ったところ、産物鎖長の制御には 109 番目の Lys が関与していることが示された。

また、温度依存性の発現を示した遺伝子の中で、低温特異的な誘導を示した RNA ヘリカーゼ (TK0306) とシャペロニン CpkA に注目し、その性質を調べた。TK0306 は *T. kodakaraensis* 由来でありながら、50°C を ATPase 活性の反応最適温度にもつ。熱に対する感受性が高く、組換えタンパク質は 20°C から変性がはじまり、70°C で完全に変性した。unwind 活性を調べたところ、二本鎖の RNA、DNA には作用しないが、ステムループ様の構造をとった RNA に作用し、ATP 依存的に構造をほぐした (unwind 活性を示した)。TK0306 は、低温ストレス時に形成される好ましくない RNA の構造をほぐすために働いているものと考えられる。また、本遺伝子の上流には非翻訳領域が存在するが、この領域は低温での特異的発現に寄与している可能性が考えられた。

また、低温特異的に誘導されてくる分子シャペロニン CpkA の特異的基質の探索を試みたところ、indole-3-glycerol-phosphate synthase (TrpC) が同定された。TrpC を尿素で変性させ、リフォールディング時にシャペロニンの添加効果を検討したところ、CpkA では効果がみられたが、高温誘導型シャペロニン CpkB では効果は認められなかった。シャペロニンに関しては低温及び高温で特異的に誘導される分子シャペロニン CpkA と CpkB の標的タンパク質をカタログ化した。両標的の分子量分布に違いは認められないが、疎水度と塩基性度に違いがみられた。CpkA が特異

的に捕捉している標的の中で TrpC タンパク質に注目し、CpkA との作用機序を *in vitro* で検証した。CpkA は TrpC の部分変性した状態を認識し、再生していることが明らかになった (図 2)。

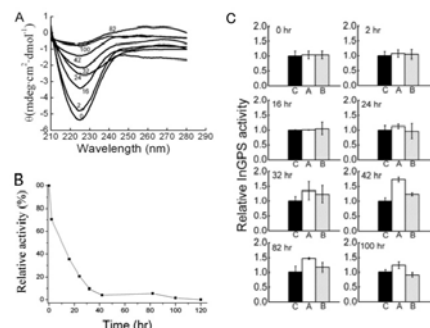


図 2 シャペロニンの変性 Tk-TrpC への効果 (A) Tk-TrpC の 8M 尿素存在下での水中での変性曲線. 経時的構造変化を遠紫外部波長 (222nm) の分子楕円率の変化を示した。グラフ中の数字は水中での処理時間を示す。

(B) Tk-TrpC の残存活性. Tk-TrpC の 8M 尿素存在下での水中で処理したときの時間推移に伴う酵素の残存活性を表示している。

(C) Tk-TrpC のリフォールディングにおけるシャペロニンの添加効果. 各処理時間での変性 Tk-TrpC を自発的にリフォールディングしたときに比較活性を表示している。C, シャペロニン未添加によるリフォールディング; A, CpkA を添加したときのリフォールディング; B, CpkB を添加したときのリフォールディング

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 13 件)

- ① Morimoto, M., Fukuda, W., Nakajima, N., Masuda, T., Terui, Y., Kanai, T., Oshima, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Dual biosynthesis pathway for longer chain polyamines in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Bacteriol.* (査読有り), 192/19, 4991-5001 (2010)
- ② Kanai, T., Takedomi, S., Fujiwara, S., Atomi, H., and Imanaka, T. Identification of the Phr-dependent heat shock regulon in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Biochem.*

- (査読有り), 147/3, 361-370 (2010)
- ③ Shimada, Y., Fukuda, W., Akada, Y., Ishida, M., Nakayama, J., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Property of cold inducible DEAD-box RNA helicase in hyperthermophilic archaea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り), 389, 622-627 (2009)
- ④ Yamada, Y., Fukuda, W., Hirooka, K., Hiromoto, T., Nakayama, J., Imanaka, T., Fukusaki, E., and Fujiwara, S. Efficient in vitro synthesis of cis-polyisoprenes using a thermostable cis-prenyltransferase from a hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Biotechnol.* (査読有り) 143, 151-156 (2009)
- ⑤ Mandai, T., Fujiwara, S., and Imaoka, S. Construction and engineering of a thermostable self-sufficient cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り), 384/1, 61-65 (2009)
- ⑥ Mandai, T., Fujiwara, S., and Imaoka, S. A novel electron transport system for thermostable CYP175A1 from *Thermophilus HB27*. *FEBS J.* (査読有り) 276/8, 2416-2429 (2009).
- ⑦ Matsuno, Y., Sugai, A., Higashibata, H., Fukuda, W., Ueda, K., Uda, I., Sato, I., Itoh, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Effect of growth temperature and growth phase on lipid composition of archaeal membrane from *Thermococcus kodakaraensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73/1, 104-108 (2009)
- ⑧ Fujiwara, S., Aki, R., Yoshida, M., Higashibata, H., Imanaka, T., and Fukuda, W. Expression profiles and physiological roles of two types of molecular chaperonins from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* (査読有り), 74/23, 7306-7312 (2008)
- ⑨ Danno, A., Fukuda, W., Yoshida, M., Aki, R., Tanaka, T., Kanai, T., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Expression profiles and physiological roles of two types of prefoldins from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J. Mol. Biol.*, 382, 298-311 (2008)
- ⑩ Fukuda, W., Morimoto, N., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Agmatine is essential for the cell growth of *Thermococcus kodakaraensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* (査読有り), 287, 113-120 (2008)
- ⑪ Iizuka, R., Sugano, Y., Ide, N., Ohtaki, A., Yoshida, T., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Yohda, M. Functional characterization of recombinant prefoldin complexes from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. strain KS-1. *J. Mol. Biol.* (査読有り), 377/3, 972-983 (2008)
- ⑫ Fujiwara, S., Yamanaka, A., Yamada, Y., Higashibata, H., Fukuda, W., Nakayama, J., Imanaka, T., and Fukusaki, E. Efficient synthesis of trans-polyisoprene compounds using two thermostable enzymes in an organic-aqueous dual-liquid phase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り), 365, 118-123 (2008)
- [学会発表] (計 27 件)
- ① Gao, L., Danno, A., Fukuda, W., Imanaka, T., and Fujiwara, S. Specific substrates of cold-inducible chaperonin in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* 8th International congress on extremophiles 2010 年 9 月 14 日 Ponta Delgada, Azores, Portugal
- ② Fujiwara, S. Dual biosynthesis pathway for longer chain polyamines in hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. 2010 INTERNATIONAL POLYAMINE CONFERENCE, 2010 年 6 月 15 日 御殿場高原リゾート 時之栖 (とくのすみか) 御殿場高原ホテル BU 静岡
- ③ 青木俊, 橋本雄介, 細川桂一, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介 アーキアリボソームの超分子構造と遺伝子の発現動態 2010 年度日本農芸化学会, 2010 年 3 月 29 日 東京大学駒場キャンパス

- ④ 山下敬太, 福田青郎, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* の水素・硫化水素発生を調節する転写因子の機能解析 2010年度日本農芸化学会, 2010年3月29日 東京大学駒場キャンパス
- ⑤ 益田剛明, 森本奈菜子, 中島七海, 福田青郎, 大島泰郎, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌における長鎖・分岐型ポリアミン合成に関する研究 第82回日本生化学会 2009年10月23日 神戸国際会議場
- ⑥ 橋本雄介, 青木俊, 田口文子, 福田青郎, 池上大二郎, 金井保, 今中忠行, 細川桂一, 藤原伸介. アーキアとバクテリアのリボソーム超分子構造の比較 第82回日本生化学会, 2009年10月23日 神戸国際会議場
- ⑦ 高楽, 団野篤史, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介. Cold inducible chaperonin in *Thermococcus kodakaraensis* traps indole-3-glycerol-phosphate synthase as a specific substrate. 第82回日本生化学会 2009年10月23日 神戸国際会議場
- ⑧ 福田青郎, 瀬尾博之, 中下裕太, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌における栄養環境変化が遺伝子発現に及ぼす影響 2009年度日本農芸化学会 2009年3月29日 福岡国際会議場
- ⑨ 瀬尾博之, 福田青郎, 中下裕太, 金井保, 跡見晴幸, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌遺伝子の生育段階に依存した発現動態解析 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9日 神戸国際会議場
- ⑩ 吉岡幸, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌の高温誘導型遺伝子 Tip49 ホモログの機能解析 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9日 神戸国際会議場
- ⑪ 島田陽子, 福田青郎, 赤田庸平, 東端啓貴, 田中丈士, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来低温誘導型 DEAD-box タンパク質に関する研究. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月12日 神戸国際会議場

- ⑫ 団野篤史, 安藝良平, 福田青郎, 今中忠行, 藤原伸介. 超好熱菌の低温誘導型 シャペロニン・誘導機構及び生理的意義. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月9日) 神戸国際会議場

〔図書〕(計1件)

岸本通雅, 堀内淳一, 藤原伸介. 三共出版 新生物化学工学(2008) 総ページ数 149 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 変異型逆転写 DNA ポリメラーゼ
 発明者: 藤原 伸介、佐野 創太郎
 権利者: 学校法人 関西学院
 種類: 特許
 番号: 特願 2008-276613
 出願年月日: 2008年10月28日
 国内外の別: 国内

名称: 変異型逆転写 DNA ポリメラーゼ
 発明者: 藤原 伸介、佐野 創太郎
 権利者: 学校法人 関西学院
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2009/68289
 出願年月日: 2009年10月23日
 国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ:
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~fujiwara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 伸介 (FUJIWARA SHINSUKE)
 関西学院大学・理工学部・教授
 研究者番号: 90263219

(3) 連携研究者

今中 忠行 (IMANAKA TADAYUKI)
 立命館大学・生命科学部・教授
 研究者番号: 30029219

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)
 京都大学・工学研究科・教授
 研究者番号: 90243047