

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20580223

研究課題名（和文）

プロテアーゼによる二枚貝類コラーゲンの特異な分解挙動の解析と機構解明

研究課題名（英文）

Mechanism of an unique degrading behavior of bivalve molluscan collagen by protease digestion

研究代表者

水田 尚志（MIZUTA SHOSHI）

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：30254246

研究成果の概要（和文）：プロテアーゼ消化による二枚貝類コラーゲンの分解挙動の機構を解明すべく、プロテアーゼ消化前のホタテガイ外套膜コラーゲンを構成する主要 α 鎖2種（a鎖およびb鎖と命名）を単離し、それらの性状解析を行った。さらに、ペプシン消化後得られた可溶化コラーゲンが弱塩基性 pH にて溶解しやすいという特異な pH 溶解特性を見出し、それに基づいて主要コラーゲン分子種を未変性条件下で精製することに成功した。今後、プロテアーゼ消化時の各主要 α 鎖の挙動を追跡して、特異分解挙動の主体となる α 鎖を同定する。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of an unique degrading behavior of bivalve molluscan collagen by protease digestion, the major two α chains, named a and b chains, were isolated from the intact collagen preparation, prior to protease digestion, from scallop mantle, and their biochemical properties were investigated. Moreover, pepsin-solubilized collagen was found to have unusual solubility for collagens, showing high solubility around weak-basic pH. Based on this solubility, the major molecular species of collagen was successfully purified from pepsin-solubilized collagen preparation. It is necessary to identify the critical α component for the unique degrading behavior by chasing the behavior of each major α component on protease digestion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：コラーゲン、二枚貝、ホタテガイ、サブユニット、塩酸グアニジン、ペプシン

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは、主に骨や皮膚など「結合組織」といわれる部位に分布する構造タンパク質の一種である。従来、ウシやブタなど哺乳

類に由来するコラーゲンが食品、化粧品や医薬品などの原料として利用されてきたが、国内における狂牛病の発生以来、コラーゲンの起源として水産動物が注目され、既に多くの

水産動物由来のコラーゲンが製品化されている。魚類のコラーゲンは一般に溶けやすいため容易に抽出されるが、無脊椎動物のコラーゲンは魚類のそれに比べ溶けにくい。従ってコラーゲンを抽出するためにはペプシンなどのプロテアーゼを用いて限定的な分解を行う必要があるが、二枚貝類のコラーゲンをペプシン消化した際に、動物種により程度の差が見られるものの他のグループとは著しく異なる分解挙動を示すことから本研究を着想した。コラーゲン分子は、3つのドメイン(N-テロペプチド、三重らせん領域、およびC-テロペプチド)から成る。プロテアーゼ消化では基本的には上記2つのテロペプチドが分解を受けるが、三重らせん領域は一般にプロテアーゼに対する抵抗性を持つため分解されない。N-テロペプチド中にはコラーゲンの不溶性の原因となる分子間架橋結合が存在し、N-テロペプチドの分解と同時にそれらの分子間架橋結合も遊離されるためコラーゲンの溶解が起こる。ところが、二枚貝類のコラーゲンをペプシン消化すると、電気泳動上で特定の α 鎖バンドの相対量が特異的に減少すること(以下、「特異的減少」とする)が観察される。この「特異的減少」は、当該 α 鎖の三重らせん領域が分解されているために起きるものと予想される。「特異的減少」によりコラーゲン本来の性質が変化している可能性があるため、現在二枚貝類のコラーゲン抽出の障害の一つとなっていると同時に極めて興味深い現象でもある。

この「特異的減少」に関連するこれまでの研究において、マガキ外套膜のコラーゲンで「特異的減少」の程度が比較的小さいことを突き止め、マガキ外套膜より調製したペプシン可溶化コラーゲン(以下、PSCとする)より三重らせん構造を保持した2種のサブユニット($\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖と命名)を単離し、主要コラーゲンのサブユニット組成を決定することに成功した。塩酸グアニジンを含む中性緩衝液で抽出することにより、塩酸グアニジン可溶性コラーゲン(以下、GSCとする)つまり、ペプシン消化を受けていない生来の一次構造を保持したコラーゲンが得られるが、ホタテガイ外套膜について「解繊」(2-メルカプトエタノール、EDTA および NaCl を含む中性緩衝液による処理)によってGSCの収率を上昇させることに成功した。また、二枚貝類コラーゲン α 鎖のN末端が他種動物のコラーゲンに多く見られるpGlu-(ピログルタミン酸)ではなく、Asp-Glu-という特異な配列をとっている場合が多いことなど、極めて興味深い諸事実を発見した。さらに、

ホタテガイ外套膜については、そのGSCが電気泳動上で少なくとも4種類の α 鎖バンドを示すが、観察される各バンド上に移動度の等しい2つ以上の成分が重なっている可能性があるため、「特異的減少」がどの成分の減少によるのか明確でない。このように、二枚貝類コラーゲンの特性に関してはやや状況が複雑化しつつも、極めて興味深い展開を見せている。

2. 研究の目的

本研究では、上述した「特異的減少」の程度が比較的小さいホタテガイやその程度が大きいアコヤガイなどを実験材料とし、【1】GSCを構成する α 鎖をクロマトグラフィーを主体とする生化学的手法により単離し、【2】ペプチドマッピングやアミノ酸分析などの生化学的分析手法を用いてこれらの性状の違いを明らかにする。さらに、【3】二枚貝類のペプシン可溶化コラーゲン(以下、PSCとする)より未変性の各コラーゲン分子種を単離し、各 α 鎖がいかなる組み合わせでコラーゲン分子を構成しているのかを解明する。上記の【1】～【3】の結果を総合し、具体的にどの α 鎖の三重らせん領域がペプシンによる分解を受けるのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

ホタテガイを生きた状態で購入し、直ちに外套膜を採取した。採取した試料はミンサーを用いて破碎し、 -30°C で凍結保存した。必要に応じて氷上で解凍し、実験に用いた。

(2) 各種コラーゲンの調製

①アルカリ抽出

外套膜約200gに約2倍量の0.1M水酸化ナトリウム水溶液を加えてホモジナイズした。懸濁液を $10,000\times g$ 、20分間遠心分離にかけ、沈殿を回収した。この操作を2回繰り返した。得られた沈殿に蒸留水を加え、攪拌し、懸濁液を $10,000\times g$ 、20分間遠心分離を行い、沈殿を回収した。この操作を3回繰り返した。最終的に得られた沈殿画分をアルカリ抽出残渣(RS-AL)とした。

②塩酸グアニジン可溶性コラーゲン

得られたRS-ALを4M塩酸グアニジンを含む0.05M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)で一昼夜攪拌抽出した後、 $10,000\times g$ 、20分間遠心分離した。得られた上清を回収し、蒸留水で透析した後、2M塩化ナトリウムを含む0.5M酢酸により塩析した。その後、 $10,000\times g$ 、20分間の遠心分離により沈殿を回収した。こ

れを蒸留水で透析後、GSC とした。

③ペプシン可溶化コラーゲン

上記①で得られた RS-AL を 0.5 M 酢酸溶液に懸濁し、その懸濁物をコラーゲン重量に対して 1/20 量のペプシンとともに 48 時間攪拌した。10,000×g、20 分間の遠心分離により得られた上清を 0.02 M リン酸水素二ナトリウムに対して一昼夜透析した。これを蒸留水で透析後、凍結乾燥して PSC とした。

(3) 変性条件下における GSC のクロマトグラフィー

調製した GSC 約 50 mg を 4 M 尿素を含む 0.02 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8)、または 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) にそれぞれ懸濁した。その後、60℃で 10 分間加熱し、変性させ、10,000×g、20 分間遠心分離を行った。得られた上清を回収し、試料とした。

前処理・洗浄を行ったホスホセルロースをカラムに充填した。カラムサイズは直径 1.6 cm×高さ 10 cm とし、温度は 42℃に保持した。樹脂は開始緩衝液 (0.02 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) または 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) を流速 1.0 ml/min で 1 時間流すことにより平衡化した。試料の添加後、開始緩衝液で非吸着物質を洗浄し、NaCl の直線グラジエント (0-0.6M) により吸着物質を溶出し、紫外可視検出器 (UV-9000、東京理化) を用い、波長 230 nm で吸光値を測定した。溶出液は 1 画分あたり 3 ml ずつ回収した。直線グラジエント終了後は NaCl の濃度を 1.0 M に上げた。非吸着ピーク画分、吸着ピーク画分およびピーク周辺画分を SDS-PAGE に供した。

(4) 未変性 PSC の溶解条件の検討

①尿素非存在下における溶解性

様々な pH における PSC の溶解性の差異を検討するためにホタテガイ外套膜 PSC 溶液ならびに比較対象としてソデイカ皮 PSC の溶液 (どちらも濃度 1mg/ml) を用いて実験を行った。試料を 5 mM 酢酸に透析した後、それぞれの pH の緩衝液 [塩化カリウム塩酸緩衝液 (pH2.0)、塩化カリウムナトリウム緩衝液 (pH13.0)、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.0)、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5、5.0)、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8、7.4、12.0)、トリス塩酸緩衝液 (pH8.8)、ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH10.0)] と 1:1 で混合し、2 時間静置した。これを 10,000 g で 20 分間遠心分離した。上清について pH 測定し、その値を到達 pH (緩衝液と試料を混合した結果到達した pH) とした。さらに上清の一部

をコラーゲン濃度の測定に供した。また上清と沈殿について SDS-PAGE を行った。

②尿素存在下における溶解性

尿素存在下における溶解性を検討するために、ホタテガイ PSC を 2 M 尿素を含む、0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8)、0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) または 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.8) にそれぞれ一昼夜透析した。その後、透析物を 10,000×g、20 分間遠心分離した。得られた上清および沈殿をそれぞれ回収し、SDS-PAGE に供した。

(5) 未変性条件下における PSC のクロマトグラフィー

PSC を 2 M 尿素を含む 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)、0.05 M ビストリス塩酸緩衝液 (pH6.8) または 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.8) にそれぞれ数日間透析した。その後、透析物を 10,000×g で 20 分間遠心分離した。得られた上清を回収し、試料とした。

洗浄を行ったジエチルアミノエチル (DEAE) セルロース (Whatman DE52) をカラムに充填した。カラムサイズは直径 2.5 cm、高さ 5 cm とし、温度は 4℃に保持した。開始緩衝液 [0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) または 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.8)] を流速 1.0 ml/min で 1 時間流すことで樹脂を平衡化した。試料は流速 1.0 ml/min にてカラムに供した。開始緩衝液にて非吸着物質を洗浄後、塩化ナトリウムの直線グラジエント (0-0.6M) により吸着物質を溶出し、US-VIS detector UV-900 (東京理化) を用い、波長 230 nm で吸光値を測定した。溶出液は 1 画分あたり 3 ml ずつ回収した。直線グラジエント終了後は塩化ナトリウムの濃度を 1.0 M に上げた。非吸着ピーク画分、吸着ピーク周辺画分を SDS-PAGE に供した。またピーク周辺の画分を回収し、蒸留水に対して透析した後、2 M 塩化ナトリウムを含む 0.5 M 酢酸により塩析した。その後、10,000×g で 20 分間遠心分離を行い、沈殿を回収し、蒸留水で透析し、凍結乾燥した。

4. 研究成果

(1) GSC を構成する α 鎖の特性

①各構成 α 鎖の単離

GSC を pH4.8、6.8 および 8.8 の条件下でホスホセルロースクロマトグラフィーに供した結果を図 1～3 に示す。変性条件下でのクロマトグラフィーによって GSC を構成する α 鎖 (SDS-PAGE での移動度が小さいほうから a、b、c および d 鎖) の分離を試みた

ころ、pH4.8 においては、吸着画分の第 1 ピークにて a 鎖が溶出し、第 2 ピークの前半部分に c および d 鎖が、後半部分に b 鎖および β 成分が溶出した (図 1)。本クロマトグラフィーにより a 鎖をほぼ単離できたと判断した。pH6.8 においては非吸着画分に a、c および d 鎖ならびに β 成分が回収され、b 鎖のみが吸着画分として単離された (図 2)。ただし、c および d 鎖については、クロマトグラフィーにおける溶出挙動が類似していたため、相互分離には至らなかった。

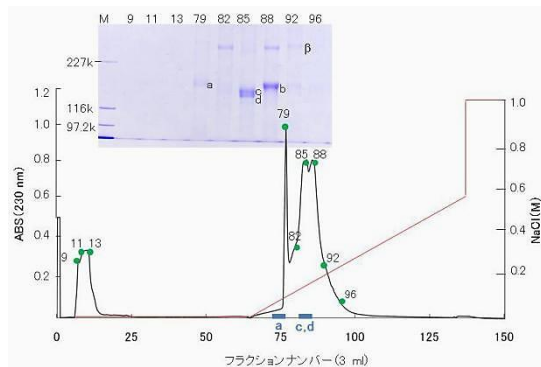


図 1 変性条件下における GSC のホスホセルロースカラムクロマトグラフィー (pH4.8)

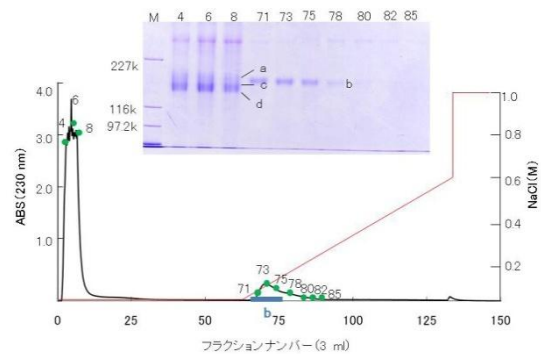


図 2 変性条件下における GSC のホスホセルロースカラムクロマトグラフィー (pH6.8)

②各構成 α 鎖のアミノ酸組成

GSC および単離された α 鎖のアミノ酸組成を表 1 に示す (ただし、主要な 10 種のアミノ酸に限定した)。いずれもグリシンが全体の約 3 割を占め、ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシリジンが含まれるなどコラーゲンの特徴を示していた。また、脊椎動物 I 型コラーゲンに比べ、アラニンに乏しく (50 残基程度) ヒドロキシリジンに富む (12 残基程度) など脊椎動物 V 型コラーゲンの組成と類似していた。GSC を構成する α 鎖の一つである b 鎖においてはその傾向がより強く表

れていた (アラニン: 46.67 残基、ヒドロキシリジン: 28.06)。また、a 鎖、c および d 鎖 (混合物) についても類似した傾向が見られたことから、いずれもコラーゲン性であることが確認された。

表 1 GSC およびその構成 α 鎖のアミノ酸組成 (残基/1,000 残基)

アミノ酸	GSC	a鎖	b鎖	cおよびd鎖 (混合物)
Hyp	75.2 \pm 0.6	76.7 \pm 1.3	60.3 \pm 1.0	74.6 \pm 1.2
Gly	309.9 \pm 4.9	321.5 \pm 3.7	322.2 \pm 3.1	326.9 \pm 1.9
His	7.3 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1	8.8 \pm 0.3	5.8 \pm 0.2
Ala	53.2 \pm 0.4	60.9 \pm 0.5	46.7 \pm 1.3	55.0 \pm 0.3
Pro	91.4 \pm 0.9	90.9 \pm 0.8	91.8 \pm 0.9	96.4 \pm 1.2
Val	22.8 \pm 0.7	17.1 \pm 0.5	25.0 \pm 0.7	18.4 \pm 0.5
Ile	21.1 \pm 0.1	16.3 \pm 0.2	22.0 \pm 0.6	17.4 \pm 0.2
Leu	38.4 \pm 0.3	32.5 \pm 0.4	40.9 \pm 0.4	29.8 \pm 0.1
Hyl	16.4 \pm 1.0	13.7 \pm 0.5	28.1 \pm 0.2	19.0 \pm 0.5
Lys	11.9 \pm 0.0	7.5 \pm 0.6	12.3 \pm 0.2	8.3 \pm 0.1

(2) PSC の pH 溶解特性

①尿素非存在下における溶解特性

未変性条件下においてコラーゲンをクロマトグラフィー的に精製する場合には、通常溶解性を向上させる目的で移動相に 2~4M 程度の濃度となるように尿素を添加するが、ここではまず尿素非存在下における本来のコラーゲンの溶解性について調べた。表 2 はホタテガイおよびソデイカそれぞれの場合について各実験区 (1~10) の到達 pH を示し、図 3 は各実験区における到達 pH と溶解度の関係を示す。ソデイカ皮膚 PSC、ホタテガイ外套膜 PSC 共に pH2 付近において最も高い溶解性 (それぞれ 97%、47%) を示した。また、ホタテガイ外套膜 PSC においては、pH8 付近で再び 30% 以上の高い溶解性を示した。また、図 4 に示す電気泳動の結果はこれらの特性をよく反映するものであった。実

表 2 各実験区における到達 pH

実験区	緩衝液の pH		到達 pH	
			ホタテガイ外套膜 PSC	ソデイカ皮膚 PSC
1	pH	2.0	2.2	2.1
2	pH	3.0	3.0	3.0
3	pH	4.5	4.3	4.4
4	pH	5.0	4.7	4.8
5	pH	6.8	5.9	6.2
6	pH	7.4	6.9	6.8
7	pH	8.8	7.8	7.8
8	pH	10.0	8.9	9.2
9	pH	12.0	10.4	10.4
10	pH	13.0	11.8	11.8

験区 7 (緩衝液の pH が 8.8) から塩基性の pH における電気泳動像を見ると、ホタテガイ PSC においては不溶性画分だけでなく可溶性画分にもバンドが観察される。実験区 10 (緩衝液の pH が 13) においては、ホタテガイ可溶性画分はバンド示さなかった。これは強アルカリ条件によるコラーゲンの加水分解が起こったためと推定される。以上の結果から、ホタテガイ PSC は酸性領域だけでなく弱塩基性～塩基性領域においても高い溶解性を示すことが判明した。

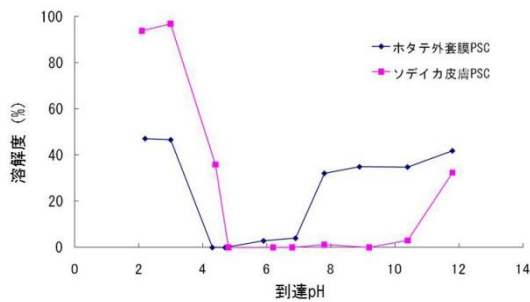


図3 コラーゲンの溶解性に及ぼす pH の影響

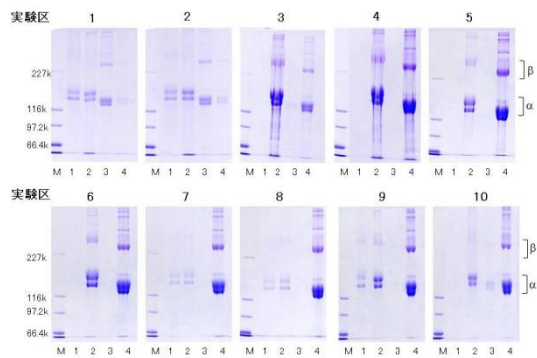


図4 各 pH における可溶性および不溶性画分の SDS-PAGE 像. M: 分子量マーカー、1, 2: ホタテガイ、3, 4: ソデイカ、1, 3: 可溶性画分、2, 4: 不溶性画分。

②尿素存在下における溶解特性

PSC を pH4.8、6.8 および 8.8 に調整した 3 種類の緩衝液に透析し、得られた可溶性画分、不溶性画分および元の PSC を SDS-PAGE に供した結果を図 5 に示す。pH4.8 の条件では可溶性画分にはほとんどコラーゲン性のバンドは示されなかった。しかし pH6.8 および 8.8 の条件では $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 鎖の位置に顕著なバンドが見られた。また pH4.8 の条件では多くの沈殿が回収され

たが、pH の上昇に伴って沈殿の量的割合の減少が観察された。これら結果より尿素存在下においてホタテガイ PSC は中性から弱塩基性の pH 領域で高い溶解性を示すことが分かった。

2M 尿素存在下におけるホタテガイ PSC の pH 溶解特性をさらに精査した結果、尿素は酸性や塩基性領域ではほとんど溶解促進効果を示さなかったが、弱塩基性領域 (pH8~10) においては尿素非存在下に比べ高い溶解度を示した。このように尿素による溶解促進効果は対象となるコラーゲンによっては限定された pH 領域で顕著に現れることが示唆された (データ示さず)。

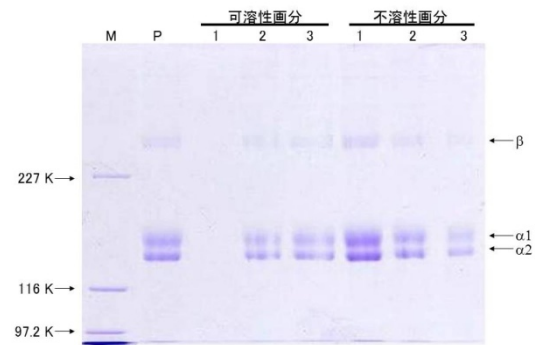


図5 尿素存在下における可溶性画分と不溶性画分の SDS-PAGE 像. M: 分子量マーカー、P: PSC、1: pH4.8、2: pH6.8、3: pH8.8。

(3) PSC に含まれる主要コラーゲンの精製と性状

PSC をトリス塩酸緩衝液 (pH8.8) に透析し、未変性条件下における DEAE セルロースクロマトグラフィーにより主要コラーゲンの精製を試みた (図 6)。非吸着画分におけ

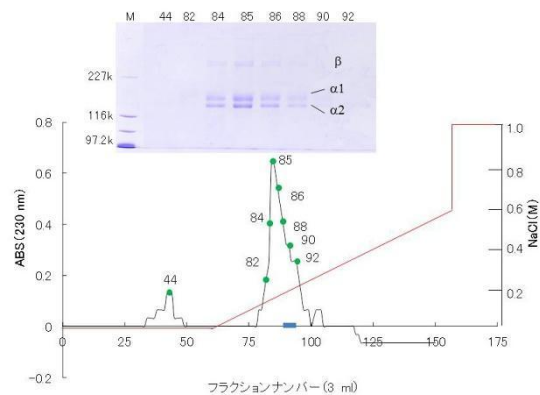


図6 未変性条件下における PSC の DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー (pH8.8)

る1本のピークと吸着画分における1本のピークとして溶出した。吸着画分におけるいくつかの画分を SDS-PAGE にかけてところ、それらのパターンは互いに類似し、 β 鎖、 α 1および α 2鎖のバンドが確認された。また、これらはほぼ PSC のパターンにも一致した。本条件 (Tris-HCl, pH8.8) の他、pH6.8 (リン酸ナトリウム) においても DEAE セルロースクロマトグラフィーを行ったが、類似した結果を得ている (データ示さず)。さらに、上記2条件における吸着ピーク画分をアミノ酸分析に供したところ、それらはいずれも1,000残基あたりグリシンを約330残基、ハイドロキシプロリンを約80残基含むなどコラーゲンに特徴的な組成を示し、さらにそれらの組成は互いにほぼ一致していた。

(4) 考察および今後の展望

本研究では、ホタテガイ外套膜より人為的なプロテアーゼ処理を受けていないインタクトなコラーゲン (塩酸グアニジン可溶性コラーゲン、GSC) を調製し、それを構成する α 鎖2種 (a鎖およびb鎖と命名) の単離に成功した。さらに、ペプシン可溶化コラーゲン (PSC) に関しては、弱塩基性 pH 領域において高い溶解性をもつという、コラーゲンとしては極めて特異な溶解特性を見出し、これを利用してペプシン可溶化コラーゲンに含まれる主要コラーゲン分子種の精製に成功した。通常コラーゲンは中性~弱塩基性 pH 領域に等電点を有するものが多いため本領域ではほとんど溶解性を持たない。また、この溶解特性がプロテアーゼ消化によって新たに生み出されたものであるという可能性も否定できない。従って今回ホタテガイ PSC において見いだされた溶解特性は比較生化学的に興味深い性質といえるだろう。本研究ではプロテアーゼ消化による「特異的減少」が、どの α 鎖の分解によって引き起こされるのかを明らかにするには至っていないが、電気泳動上の易動度から判断すると、泳動位置が非常に接近している a 鎖または b 鎖のどちらかの分解によるものと推察される。従って、今回 a 鎖および b 鎖の精製条件が確立されたことにより、これらの分解挙動を明らかにするための基盤が整ったこととなる。今後は主に免疫化学的手法を用いて、これらの α 鎖の分解挙動を追跡することによって「特異的減少」の機構解明を行うとともに、ホタテガイ PSC で見られた特異な溶解特性が二枚貝類全般において普遍的であるか否か、さらにはどのような機構でこの性質が発現するのかについてもプロテアーゼ消化との関連をも考慮に入れながら検討していきたい。

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3件)

1. 水田尚志. コラーゲン資源としての水産物の利用. 皮革科学. 査読有、58、2012、1-5.
2. 水田尚志. 水産動物からのコラーゲンの回収と有効利用. 兵庫県バイオポリマー研究会報. 査読有、25、2012. (CD-ROM 刊行)
3. Shoshi Mizuta. Biochemical characteristics of collagen in bivalve molluscs. Comparative Physiology and Biochemistry 査読無、28 (増補版)、2011、161.

[学会発表] (計4件)

1. 水田尚志. 水産動物からのコラーゲンの回収と有効利用. 兵庫県バイオポリマー研究会. 2011年7月29日、兵庫県姫路市 (イグレ姫路).
2. Shoshi Mizuta. Biochemical characteristics of collagen in bivalve molluscs. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. 2011年6月4日、名古屋市 (名古屋国際会議場).
3. 水田尚志・谷口瞳・鈴木郁浩・細井公富・横山芳博. 二枚貝類のコラーゲンの特性-ホタテガイ外套膜のコラーゲンの溶解特性と未変性条件下での単離-. 平成23年度日本水産学会春季大会. 2011年3月28日、東京都 (東京海洋大学品川キャンパス).
4. 水田尚志・谷口瞳・鈴木郁浩・細井公富・横山芳博. 二枚貝類のコラーゲンの特性-ホタテガイ外套膜の塩酸グアニジン可溶性コラーゲンを構成するインタクトな α 鎖の単離-. 平成22年度日本水産学会秋季大会. 2010年9月22日、京都市 (京都大学吉田キャンパス).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水田 尚志 (MIZUTA SHOSHI)

公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授

研究者番号：30254246

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：