

## 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5月20日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390055

研究課題名（和文）ポストゴルジ交通網における積み荷タンパク質の品質管理機構とその異常

研究課題名（英文）Quality control mechanisms of cargo proteins in the post-Golgi trafficking

研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30244908

研究成果の概要（和文）：ゴルジ体／エンドソーム局在型のクラスリンアダプター分子である GGAs/AP1 の機能をヒト由来培養細胞株やショウジョウバエを用いて解析した。その結果、これら分子は細胞の増殖や分化に関わる上皮成長因子受容体および Notch のポストゴルジ輸送を調節することでこれら受容体の細胞内分解を回避させていることを見出した。本研究により細胞増殖や個体発生における GGAs/AP1 の新機能が提唱され、癌治療戦略の糸口が見出された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate physiological functions of Golgi/endosome-localized clathrin adaptors, GGAs and AP1, we performed extensive functional analysis using mammalian and drosophila model systems. We found that GGAs and AP1 are involved in the intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and Notch, respectively, by evading their degradations. Therefore, we propose new function of GGAs/AP1 in cell proliferation and differentiation, which would potentially be useful for developing new cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞微細形態学、クラスリン、凝集体、リソソーム分解

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内において新規合成された膜貫通型蛋白質や分泌蛋白質がそれぞれの機能の場へ到達し、最終的にその機能を発揮するためには個々のタンパク質の品質管理と厳密な輸送の調節が必須である。ポストゴルジ交通網はトランスゴルジ網（TGN）-エンドソーム／リソソーム-細胞膜間輸送の総称であり、タンパク質や脂質の生合成経路とエンドサ

イトーシスを介した分解経路が複雑に交差している。ここを流れる積み荷タンパク質はオルガネラ間を往来しながら最終的にはリソソームへ輸送されて分解を受けたり、場合によっては輸送キャリアーの凝集体を形成したりする。この分解処理に向かう過程を「ポストゴルジ交通網における品質管理」と捉えることができるが、その詳細な機構は不明である。

TGN における膜タンパク質の選別と輸送を

制御する細胞質因子として GGA1, 2, 3, 及び AP1 等のクラスリンアダプター分子群が知られており、これらにより制御される積み荷タンパク質として M6PR, BACE, sorLA/LR11, sortilin, LRP3 等が報告されている。これまで、我々を含めて多くの研究者が細胞生物学レベルにおける GGAs/AP1 の分子機能解析を進めてきた。しかし、以下のような問題点が指摘されていた。(1) 哺乳類細胞の GGA は複数あり、一方 AP-1 はヘテロ 4 量体で各サブユニットにアイソフォームが存在することから、RNAi 実験や遺伝子改変動物作製が困難である。(2) GGAs/AP1 の標的となる未知の積み荷タンパク質が存在する可能性がある。(3) クラスリンアダプターアクセサリ分子の解析が進んでいない。したがって個々の分子の作用機序や作用部位 (経路)、さらに高次生理機能については未だ解決されていない状態である。

## 2. 研究の目的

本研究では、GGAs/AP1 の生理機能について、積み荷蛋白質の品質管理という観点から解析する。より具体的には方法論的に異なる 3 つの研究に分け、多角的なアプローチを行う。

(1) 単一の GGA あるいは AP1 を持つショウジョウバエを研究対象とし、ショウジョウバエ由来培養細胞および個体における GGA, AP1 の生理機能解析を行う。

(2) ヒト由来培養細胞系を用いて GGA1, 2, 3 あるいは AP1 のノックダウン実験を行い、M6PR 以外に TFR や 上皮成長因子 (EGFR) など、細胞の維持、増殖に重要な積み荷タンパク質の細胞内輸送に対する影響を解析する。

(3) クラスリンアダプター分子のアクセサリ分子である p56 に焦点を絞り、性状解析とノックアウトマウスの作製を通してその生理機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ GGA, AP1 の性状解析

① ショウジョウバエ GGA, AP1 サブユニット、Arf1 等に関して遺伝子クローニング及び特異的抗体の作製を行い、免疫蛍光法を用いて Schneider S2 細胞における細胞内局在解析を行った。また、これらの分子の細胞内存在様式をショ糖密度勾配遠心法、ゲルろ過等の生化学的手法を用いて解析した。さらに GGA 及びクラスリン (CHC) が Arf1 GTPase 依存的に膜へリクルートされるかどうかを解析するために S2 細胞ライセートから超遠心法によりミクロソーム画分を単離し、試験管内再構成系を構築した。

② ショウジョウバエにおける積み荷タンパク質候補である Lerp の発現誘導系を構築し、

クラスリンアダプター、Arf 等の因子の発現抑制による Lerp の細胞内輸送への関与を解析した。

(2) ハエ個体を用いたクラスリンアダプター関連因子の生理機能解析

① GGA, AP1 等の遺伝子を GAL4 システムを用いて組織特異的にノックダウンし、表現型解析を行った。GAL4 により発現が誘導されるノックダウンコンストラクトの遺伝子導入ライン (IR[inverted repeat]ライン) は国立遺伝学研究所およびオーストリア DGRC より分与された。

② ey-GAL4 による複眼でのノックダウンにより rough eye 表現型が観察された ey-GAL4/IR{AP1 $\mu$ 1}, ey-GAL4/IR{AP1 $\gamma$ 1}, ey-GAL4/IR{CG8538} 等のラインについて発生初期の eye-disc を 3 齢幼虫より単離し、Scabrous, Prospero, Notch, Delta 等の分子に対する特異的抗体を用いた形態学的解析、生化学的解析を行った。

③ 単離 eye-disc を 2 $\mu$ g/ml 20-OH ecdyson, 5% FBS を含む M3 medium 中で 200 $\mu$ g/ml Chroloquine の存在、非存在下で器官培養を行った。固定後、抗 Notch, 抗 Rab7, 抗 DE-cadherin 抗体を用いた免疫染色を行った。

(3) ヒト培養細胞を用いたクラスリンアダプターの機能解析

① HeLa, ARPE (ヒト網膜色素上皮) 等の細胞株を用いて GGA1, 2, 3 および AP1 サブユニットの一つである  $\gamma$ -adaptin のノックダウン実験系の確立を行った。M6PR や EGFR をはじめとする様々な積み荷タンパク質分子の発現様式に対する影響を形態学的、生化学的に調べた。

② GGA2 が EGFR と直接相互作用するかどうかを GST-プルダウンアッセイにより検討した。

③ EGFR の細胞内輸送に GGA2 がどのように関わっているかを調べるために、GGA2 ノックダウン細胞をリソソーム酵素阻害剤で処理した後、抗 EGFR 抗体及び抗 cathepsinD 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

(4) クラスリンアダプターアクセサリ蛋白質、p56 の組織局在解析及びノックアウトマウスの作製

① p56 に対する抗体を作製し、培養細胞及び成獣マウス組織における局在解析を行った。

② 理研 CDB 動物資源開発室との共同研究で p56 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。

## 4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ細胞における GGA 及び AP1 の性状解析

S2細胞におけるGGAの局在を解析するために、特異抗体を作製して免疫蛍光染色を行った。その結果、内在性GGAはゴルジ膜およびエンドソーム膜上に局在した。

ショウジョウバエ AP1 に関しては、 $\mu 1$  サブユニットをコードする AP47 のクローニングを行い、特異抗体を作製した。AP47 を恒常的に発現する S2 細胞のクローンを作製し、解析を行った。AP1 は S2 細胞において GGA と良い共局在を示す事から、トランスゴルジに存在すると考えられる。また、細胞分画実験、ショ糖密度勾配遠心、ゲルろ過実験等により、AP1 は GGA に比べて安定して膜フラクションに結合する事、約 300kDa の分子複合体を形成していることが示唆された。

哺乳動物ではクラスリンが膜ヘリクルートされるためには、アダプター分子が GTP 結合型 Arf1 依存的にゴルジ体膜に結合する事が必要であることが示されている。ショウジョウバエにおいても同様のメカニズムが存在するかどうかを明らかにする目的で S2 細胞より単離した膜画分と細胞質を用いた試験管内再構成系を構築した。その結果、細胞質画分に非水解型 GTP アナログである GTP $\gamma$ S を加える事により、GGA およびクラスリン重鎖 (CHC) の膜へのリクルートが増加する事、さらにこの CHC および GGA の膜画分への結合量の増加は Arf 結合領域を含む GGA の VHS-GAT 領域により濃度依存的に阻害される事が示された (図 1)。また、同様な実験を Arf1 ノックダウン S2 細胞由来の細胞質を用いて行ったところ、GGA, CHC の膜へのリクルートが顕著に減少する事が分かった。これらの結果から、哺乳動物や酵母と同様に、ショウジョウバエにおいても Arf1-GTP が膜に結合する事により GGA が VHS-GAT 領域を介して Arf1 に結合し、さらに CHC をリクルートすると考えられる。

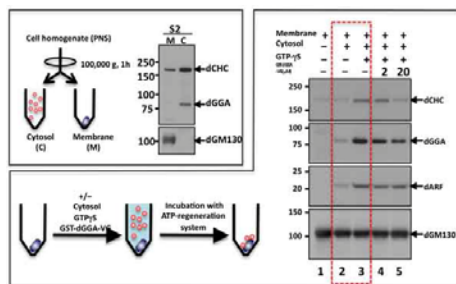


図1 GGA及びクラスリンの膜へのリクルートの試験管内再構成実験 S2細胞由来の膜画分に、S2細胞の細胞質及びGTP $\gamma$ Sを加える事によりArf1と共にGGA,クラスリン(CHC)が膜に結合する。この現象はGGAのVHS-GAT領域リコンビナント蛋白質により濃度依存的に阻害される事から、GGAとGTP型Arf1との結合を介していることが示唆された。

次に GGA/AP1 が M6PR のショウジョウバエオルソログである Lerp の細胞内輸送を制御

するかどうかを解析した。酵母ツーハイブリッド法により GGA が Lerp の細胞質領域に存在する DxxLL モチーフを認識し直接結合する事、S2 細胞内で両者が共局在する事を示した。

さらに GGA と AP1 が積み荷分子である Lerp の細胞内輸送に協調的に機能することを、発現誘導された Lerp のリソソーム系での C 末

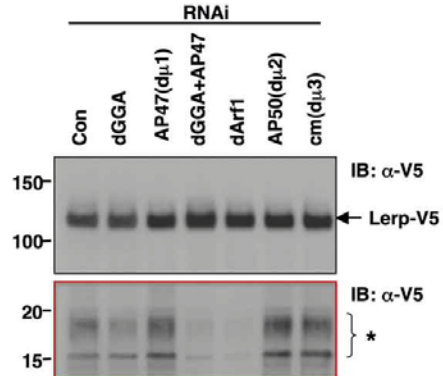


図2 GGAとAP1のダブルノックダウン (lane 4) によりLerpのエンドソーム/ライソソーム系でのプロセッシング (\*) が阻害される。

端タンパク質分解を検出する系を用いて示した (図 2)。

以上の結果より、GGA/AP1 の細胞生物学的生理機能がショウジョウバエから哺乳動物まで極めて良く保存されており、ショウジョウバエが GGA/AP1 の機能解析を進める上で有用な実験モデル系になる事が示唆された。ここまでの成果は Journal of Cell Science (2010) に報告した。

(3) ショウジョウバエ個体を用いたクラスリンアダプター関連因子のノックダウンによる表現型の解析

ショウジョウバエは哺乳動物に比べ遺伝子の重複が少なく、RNAi 法による遺伝子発現抑制を用いた表現型解析に適している。GAL4 システムを用いた組織特異的 RNAi により GGA や AP1 サブユニットの発現を様々な器官、発生時期で抑制した。ey-GAL4 により発生初期の眼において AP1 の発現を抑制したところ、成虫の複眼に rough eye と呼ばれる形成不全が起こる事が分かった。組織学的な解析により、成虫の複眼において、光受容を行う単位である個眼のパターン形成に異常が見出された。

この異常が複眼発生のどの時点で起こるかを調べるために、eye-disc と呼ばれる眼の成虫原基が形成される幼虫の時期において、光受容神経細胞を免疫染色により解析した。その結果、細胞が R8 ニューロンと呼ばれる最初の光受容神経細胞に分化するステージにそのパターン形成に異常が見られることが明らかになった (図 3)。

さらに細胞配列のパターン形成に関わる

シグナル分子の発現を解析した所、Notch タンパク質の発現が AP1 の発現抑制により低下していることがわかった。

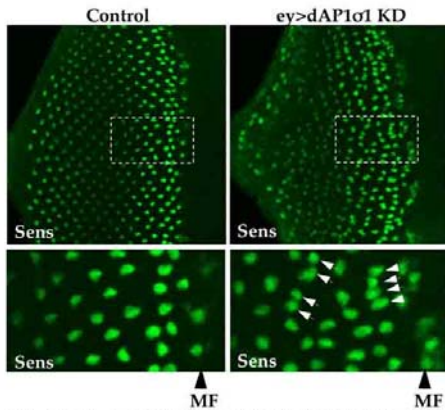


図3 AP1のノックダウンによる光受容神経細胞のパターン異常はこれらの細胞が神経細胞に運命づけられる発生初期の時点で既に観察される。3齢幼虫のeye-discにおけるR8 neuronのマーカーであるSensの染色を行った。AP1ノックダウンによりR8の異常なクラスター(矢印)が見られる。

Notch は膜貫通型のシグナル分子であり、細胞膜表面で隣接する細胞膜表面に存在するリガンドと結合する事により自分のみならず周囲の細胞の分化の方向付けに関わる事が知られている。AP1 のノックダウンにより Notch の mRNA レベルでの発現は影響を受けない事から、タンパク質レベルでの安定性に問題があると考えた。そこで、FRT-FLP システムを用いて AP1 null mutant 細胞をモザイク状に発現した eye-disc を作製し、リソソームのプロテアーゼ阻害剤であるクロロキンの存在下で器官培養した所、Notch がリソソームに蓄積することが分かった (図4)。

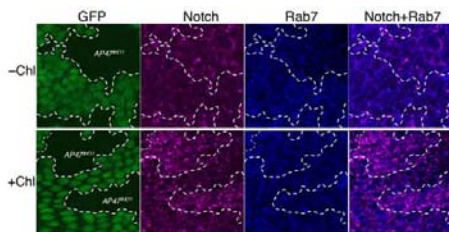


図4 AP1 $\mu$ 1(AP47)のnullアリル(AP47<sup>SH $\epsilon$ 1</sup>)を用いたeye-discのモザイク解析。GFPポジティブ細胞は野生型、GFPネガティブ細胞はAP1欠損細胞を示す。クロロキン(Chl)存在、非存在下で10時間器官培養を行った後、Notch, Rab7の免疫染色を行った。AP1欠損細胞においてクロロキン存在下にNotchの蓄積が観察される。

また、ey-GAL4 によるノックダウンを用いたスクリーニング、および遺伝子の性状解析を行い、ショウジョウバエにおける AP1 のアクセサリ分子として Aftiphilin を初めて同定した。

以上の結果は、AP1 およびアクセサリ分子 Aftiphilin の機能が Notch 分子のポストゴルジ交通網における正常な局在化、ひいては器官発生期における正常なパターン形成に必須である事を示している。ここまでのショウ

ジョウバエ個体を用いた研究成果は Journal of Cell Science (2012)に報告した。

#### (4) ヒト培養細胞株を用いたクラスリンアダプターの機能解析

ヒト細胞におけるクラスリンアダプター分子群の生理機能を明らかにする目的で、HeLa 細胞や ARPE19 細胞 (ヒト網膜色素上皮細胞) などの培養細胞で GGA1, 2, 3 や AP1 の siRNA によるノックダウン実験系を確立した。その結果、GGA2 あるいは AP1 の発現低下により上皮成長因子受容体 (EGFR) の発現量が顕著に減少する事を見出した (図5)。

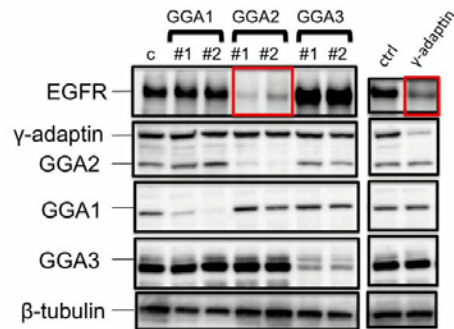


図5 GGA2あるいはAP-1複合体の減少はEGFRタンパクの減少を引き起こす。

この時、EGFR の mRNA 量の有意な減少は見られず、また同 RNAi 実験においてリソソームプロテアーゼ阻害剤 (E64d+Leupeptin) を添加して免疫蛍光染色すると EGFR がカテプシンD陽性のリソソームに検出された(図6)。

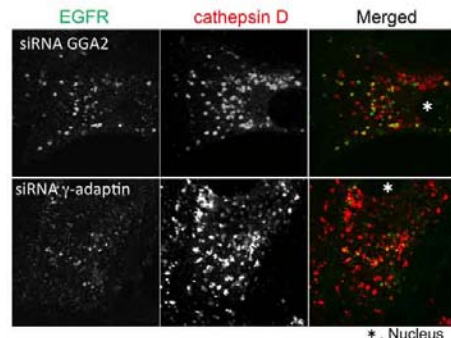


図6 EGFR陽性の顆粒状シグナルはリソソームマーカーであるcathepsinDと共局在する。

このことより、GGA2 の発現低下は EGFR のリソソームへのミスソーティングを来し、このため EGFR 分解が促進されることが示唆された。

これまで、AP1 と EGFR の結合に関する報告はあるが、GGA2-EGFR 間の結合は知られていない。そこで、GST プルダウン法を用いて解析した。GFP を融合した EGFR 細胞質領域を HEK293 細胞に発現させ、その細胞抽出液を、グルタチオンビーズと結合した GST 融合型の GGA2 VHS+GAT 領域 (積み荷認識領域) と反応させた。GGA2 VHS+GAT 内の積み荷認識に必要

な N108 をアラニンに置換した変異体をネガティブコントロールとして用い、結合実験のポジティブコントロールとして M6PR の一種である CIMPR と GGA2 VHS+GAT 間の結合も解析した。その結果、GGA2 VHS+GAT が CIMPR のみならず、EGFR 細胞質領域にも結合することが確認され、さらに N108 に変異を持つ GGA2 VHS+GAT では結合が観察されなかった(図 7)。GGA2 に認識される部位を詳細に解析するため、EGFR 細胞質領域を jxt domain、kinase domain、tail domain に分け、上記と同じように結合解析を行ったところ、GGA2 VHS+GAT が EGFR jxt domain を認識することが明らかとなった(図 7)。

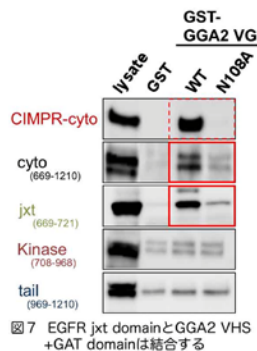


図 7 EGFR jxt domain と GGA2 VHS+GAT domain は結合する

以上の結果から GGA2 および AP1 は EGFR の細胞質領域を認識し、リソソームへのターゲティングをネガティブに調節することで EGFR 蛋白量を調節する事が示唆された。本解析結果は現在投稿準備中である。

#### (5) クラスリンアダプター関連因子、p56 の性状解析及びノックアウトマウスの作製

GGA の機能を修飾するアクセサリー分子 p56 の機能解析のために、p56 抗体を作製した。ヒト p56 の N 末端のペプチドをウサギに免疫し、抗血清を得た。抗体の特異性を確認するために、ウェスタンブロットを行った。HeLa 細胞において p56 を siRNA によりノックダウンし、その細胞抽出液を解析したところ、p56 ノックダウン細胞では p56 タンパク質量の明らかな減少が観察された。また p56 は TGN に局在することが報告されており、作製した抗体を用いて免疫染色を行ったところ、培養細胞において TGN マーカーとの共局在が観察された。以上の結果より、作製した p56 抗体が内在性 p56 を特異的に認識する事が確認された。

p56 が生体内のどの組織で機能するか調べるために、成獣マウスにおいて p56 の発現分布解析を行った。p56 は大脳皮質、海馬、小脳、脊髄の神経細胞で発現が確認され、その分布パターンは顆粒状であった。

次に p56 の細胞内局在を明らかにするために、ゴルジ体マーカーである GM130 (cis-

Golgi) あるいは TGN38 (*trans*-Golgi network)、初期エンドソームマーカーの EEA1、後期エンドソームマーカーの LBPA、後期エンドソーム / リソソームマーカーの Lamp1 との二重染色を行った。p56 陽性の顆粒状構造は常に GM130 の近傍に見出され、TGN38 陽性の構造の一部と共局在していた(図 8)。この結果から、p56 は神経細胞の TGN で機能する可能性が示唆された。

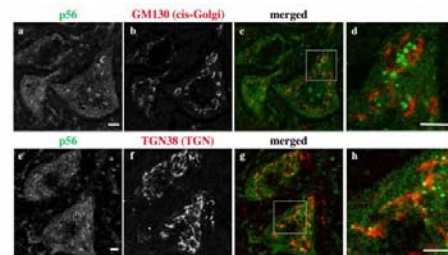


図 8 p56 陽性の顆粒状シグナルは、TGN マーカーである TGN38 陽性の小管状構造上に局在する。

p56 が GGA の機能解析の糸口となる可能性があることから、p56 の個体における機能を明らかにするために、p56 のコンディショナルノックアウトマウス作製に着手した。コンディショナルノックアウトのための targeting vector を作製し、ES 細胞に導入した。相同組換え ES 細胞を取得し、定法に従ってキメラマウスを作製した。キメラマウスと野生型マウスの交配で得られた仔マウスを PCR によって検定したところ、改変遺伝子を持つ個体(遺伝子型は  $p56^{Neo/+}$ ) が得られた。さらにその個体と、全身で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (CMV-Cre マウス) を交配させ、片方の染色体で p56 遺伝子を欠損するヘテロマウス ( $p56^{+/-}$ ) を作製した。

今後、ヘテロマウス同士の交配で全身性のノックアウトマウスを作製する予定である。全身性のノックアウトマウスが胎生期初期に致死となる場合は、 $p56^{Neo/+}$  マウスと、全身で FLPe を発現するマウスを交配させ、Floxed マウスを作製する。組織分布解析から p56 が中枢神経系で発現が高いことが明らかであるため、中枢神経系でコンディショナルノックアウトを行う。その際用いる Cre トランスジェニックマウスとして、Nestin-Cre マウスや Pcp2-Cre マウスが候補として挙げられる。さらに、p56 ノックアウトマウスあるいは Floxed マウスから胎児線維芽細胞を調整し、細胞生物学的な解析を行う。

#### (6) 結論と今後の取り組み

本研究では様々なモデル系を用いてクラスリンアダプター分子の生理機能に関する解析を行った結果、GGA、AP1 等のクラスリンアダプターが、EGFR、Notch 等の生体に重要な膜貫通型シグナル分子のポストゴルジ交通網における品質管理(分解回避機構)に深

く関わっていることが明らかとなった。今後、GGA と AP1 の機能がどのように分担されているのか、また、アクセサリ分子がどのようにクラスリンアダプター分子群の機能を調節しているのかを解析する予定である。

#### 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 10 件)

- ① Kametaka S and Waguri S. Visualization of TGN-endosome trafficking in mammalian and drosophila cells. *Methods Enzymol.* (2012) 504:255-271. 査読無
- ② Kametaka S, Kametaka A, Yonekura S, Haruta M, Takenoshita S, Goto S, Waguri S. AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* (2012) 125:634-648. 査読有
- ③ Takahashi D, Hase K, Kimura S, Nakatsu F, Ohmae M, Mandai Y, Sato T, Date Y, Ebisawa M, Kato T, Obata Y, Fukuda S, Kawamura YI, Dohi T, Katsuno T, Yokosuka O, Waguri S, Ohno H. The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice. *Gastroenterology.* (2011) 141: 621-632. 査読有
- ④ Misaki R, Morimatsu M, Uemura T, Waguri S, Miyoshi E, Taniguchi N, Matsuda M, Taguchi T Palmitoylated Ras proteins traffic through recycling endosomes to the plasma membrane during exocytosis. *J. Cell Biol.* (2010) 191: 23-29. 査読有
- ⑤ Kametaka S, Sawada N, Bonifacino JS, Waguri S. Functional characterization of protein-sorting machineries at the trans- Golgi network in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.* (2010) 123:460-471. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① 亀高諭、植村武文、和栗聡. 細胞膜受容体安定化機構とゴルジ・エンドソーム局在型クラスリンアダプター. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会, 山梨、2012/3/26
- ② 亀高諭、亀高愛、米倉真一、後藤聡、和栗聡. AP-1 を介した Notch 輸送調節機構の解析. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会, 山梨、2012/3/27
- ③ 植村武文、和栗聡. 上皮成長因子受容体の細胞内分解に関与するゴルジ・エンドソーム局在型クラスリンアダプター分子の解析. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会, 山梨、2012/03/27
- ④ 亀高諭、亀高愛、春田峰雪、米倉真一、後

藤聡、和栗聡. AP-1 複合体を介した Notch 輸送調節機構の解析. 第 84 回日本生化学会大会, 京都、2011/9/22

- ⑤ 植村武文、澤田直樹、亀高諭、山本雅哉、和栗聡. Tissue and cellular distribution of p56, an accessory protein for clathrin adaptors. 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、横浜、2011/03/30
- ⑥ 植村武文、澤田直樹、亀高諭、山本雅哉、和栗聡. クラスリンアダプターのアクセサリ蛋白質, p56 の発現分布解析. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、盛岡、2010/03/30
- ⑦ 亀高諭、澤田直樹、和栗聡. Functional characterization of protein-sorting machineries at the trans-Golgi network in *Drosophila melanogaster*. 第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪、2010/5/20

[その他]

ホームページ等

[http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/anatomy2\\_index.html](http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/anatomy2_index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)  
福島県立医科大学・医学部・  
教授  
研究者番号：30244908

##### (2) 研究分担者

亀高 諭 (KAMETAKA SATOSHI)  
福島県立医科大学・医学部・  
講師  
研究者番号：10303950  
山本 雅哉 (YAMAMOTO MASAYA)  
福島県立医科大学・医学部・  
准教授  
研究者番号：20446115  
澤田 直樹 (SAWADA NAOKI)  
福島県立医科大学・医学部・  
博士研究員  
研究者番号：50452644  
(H21 年度のみ)  
植村 武文 (UEMURA TAKEFUMI)  
福島県立医科大学・医学部・  
助教  
研究者番号：80548925  
(H22→23 年度)

##### (3) 連携研究者 なし