

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21750183

研究課題名 (和文) セリンプロテアーゼのタンパク質基質認識メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Molecular dissection of *Streptomyces* trypsin on the recognition mechanism of structural protein substrates

研究代表者 上杉 佳子 (UESUGI YOSHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：30416416

研究成果の概要 (和文)：セリンプロテアーゼはコラーゲンなどの難分解性タンパク質を分解することから、産業廃棄物利用や血栓症および神経疾患への応用に期待されている。本研究では、*Streptomyces omiyaensis* 由来セリンプロテアーゼ (SOT) をモデル酵素として、高次構造を有するタンパク質基質に対する本酵素群の認識メカニズムを明らかにすることを目的とした。RIBS シャフリング法を用いた詳細な解析により、SOT の Tyr71 がタンパク質基質の高次構造の認識に、Arg72 がコラーゲンとの結合に、Lys217 と Ala221 がフィブリン分解に寄与する残基であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Serine proteases have recently received much attention in relation to degradation of recalcitrant animal proteins, such as collagen, keratin, blood clots, and amyloid prion proteins for beneficial use of industrial waste and medical applications. In this study, a serine protease from *Streptomyces omiyaensis* (SOT), which is a trypsin-like enzyme, was chosen as a model enzyme for clarifying the recognition mechanism of structural protein substrates in serine proteases. We constructed chimeras between SOT and SGT using an *in vivo* DNA shuffling system and several mutants to identify the key residues involved in topological specificities. By comparing substrate specificities of chimeras and mutants, we found that residues 71 and 72 of SOT contribute to topological specificity and collagen binding, respectively. Furthermore, we found that Lys217 and Ala221 of SOT, which is located in the C-terminal α -helix domain, as a crucial residues for fibrinolysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成 22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酵素、基質認識、高分子基質、セリンプロテアーゼ、放線菌、RIBS シャフリング

1. 研究開始当初の背景

セリンプロテアーゼは哺乳類、植物、菌類など様々な生物に存在しており、代謝や発生、炎症などの多様な生理作用に関わる酵素である¹⁾。本酵素群は、酵素の代表的

な存在として古くから研究されており、触媒残基として Ser, His, Asp を持つという特徴がある。近年、セリンプロテアーゼはコラーゲン、カゼイン、フィブリン、プリオンなどの難分解性タンパク質を分解するこ

とから、産業廃棄物利用や血栓症および神経疾患への応用に期待されている²⁾。トリプシン様セリンプロテアーゼの構造は、6つのβ-シートから成るβ-バレルドメインを2つ形成しており、それらのドメイン間に触媒残基を持つ³⁾。従来のセリンプロテアーゼの基質認識における研究は、低分子基質を用いたS1-Sn部位の特異性がよく調べられてきた。しかし、実際の反応はタンパク質等の高分子の基質に対してであり、それにも拘らず、基質の高次構造を含めた認識メカニズムは未だに明らかになっていない。

そこで、2000種類の放線菌株からのスクリーニングにより、コラーゲンに対して高活性な*Streptomyces omiyaensis*由来のセリンプロテアーゼ(SOT)を取得した⁴⁾。本酵素は市販の歯周病菌由来のコラゲナーゼと比較して、ゼラチンおよびコラーゲンの分解活性が顕著に高く、産業への応用が期待される酵素である。興味深いことに、SOTは高い相同性を持つ*Streptomyces griseus*由来のトリプシン(SGT)⁵⁾と基本的な性質や原繊維状コラーゲンの分解活性は同等であるが、網目構造状コラーゲン、ゼラチン、カゼインの分解活性が著しく異なることを示した。また、SOTがSGTと比較して、血栓の原因物質であるフィブリン様基質を顕著に分解することを見出した。これらの結果から、放線菌由来のセリンプロテアーゼが、基質となるタンパク質の様々な高次構造の違いを認識しようという非常に興味深い事実が明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、未だ明らかになっていない、セリンプロテアーゼの高次構造を含めた基質認識メカニズムを解明するために、タンパク質の認識が大きく異なる2種類の放線菌由来セリンプロテアーゼを題材として、その認識の違いやタンパク質との結合性に寄与する残基を特定し、認識メカニズムを提唱することを目的とする。また、その知見をもとに高機能な酵素を創製し、コラーゲン等の産業廃棄物から有用な機能性材料を産生することや、血栓症およびアルツハイマー病等の難分解性タンパク質を原因とする疾患の予防や治療に応用することを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) RIBS シャプリング法によるSOTとSGTのキメラライブラリーの作製

以前の論文⁶⁾に従って、ゲンタマイシン(Gm)耐性およびストプトマイシン(Sm)のターゲットタンパク質をコードする rpsL

遺伝子を挟んで、SOTおよびSGTをコードする遺伝子(*sot*および*sprT*)をタンデムに並べたシャプリング用ベクター(pACT12b(*sot*/Gm^r*rpsL*⁺/*sprT*, 図1A)を作製した。得られたベクターはシャプリング用の大腸菌MK1019(*ssb-3*変異株)に形質転換し、Sm選択圧のもと選抜した。生き残ったクローンについて、PCRによりキメラ全長遺伝子を増幅し、DNAシーケンサーによってキメラ形成部位の同定およびエラーの有無を確認した。得られたキメラ遺伝子を含むプラスミドは我々が開発した放線菌高発現系⁷⁾で発現させ、親酵素で最適化した条件⁴⁾で精製を行い、キメラ酵素を得た。精製酵素はSDS-PAGEで精製度を確認した。

(2) 活性測定

アミノ酸の人工基質Bz-L-Arg-pNAを用いて、酵素の活性を評価した。高分子基質特異性の評価は、FITC標識された原繊維状コラーゲン(タイプI)および網目構造状コラーゲン(タイプIV)を用いて行った。天然のコラーゲンに対する活性測定は、牛のアキレス腱由来のタイプIコラーゲンおよびヒトの胎盤由来のタイプIVコラーゲンを用いて、ニンヒドリン法で行った。カイネティック解析は、人工基質Z-Gly-Pro-Arg-MCAを用いて行った。また、MCA標識されたフィブリン様配列についても分解活性を測定した。フィブリン分解能については、人工血栓溶解法(フィブリンプレート法)を用いて評価した。

(3) 変異型酵素の作製

キメラ間の変異型酵素、SGTとSOTの1残基、2残基変異体、不活性型酵素の作製は、PCRによってプライマーを用いて適切な制限酵素サイトと変異を導入した。変異遺伝子はDNAシーケンサーによって配列の確認を行った後、発現用ベクターに導入した。各遺伝子の発現は、上記と同様に放線菌発現系を用いて行い、精製を行った。精製酵素はSDS-PAGEで精製度を確認した。

(4) CDスペクトルの測定

タンパク質は10 mM CaCl₂を含む10 mM Tris-HCl (pH 8.0)で0.1 mg/mlに調整し、室温にて測定した。

(5) PheおよびTrpの蛍光スペクトルの測定
タンパク質を10 mM CaCl₂を含む10 mM Tris-HCl (pH 8.0)で0.61 μMに調整し、室温にて測定した。励起波長280 nmで蛍光は波長290–400 nmでスキャンした。

(6) 表面プラズモン共鳴法による解析

天然の原繊維状コラーゲン(タイプI)および網目構造状コラーゲン(タイプIV)、フィブリンをリガンドとして解析チップ上にそ

それぞれ固相化し、不活型酵素をチップ上に添加することで、タンパク質基質と不活性型酵素との結合および解離を解析した。

4. 研究成果

(1) SOT と SGT のキメラライブラリーの構築
RIBS シャフリング法を用いて、SOT と SGT のキメラライブラリーを作成した (図 1)。キメラ酵素の切り替えポイントを図 1B に示す。

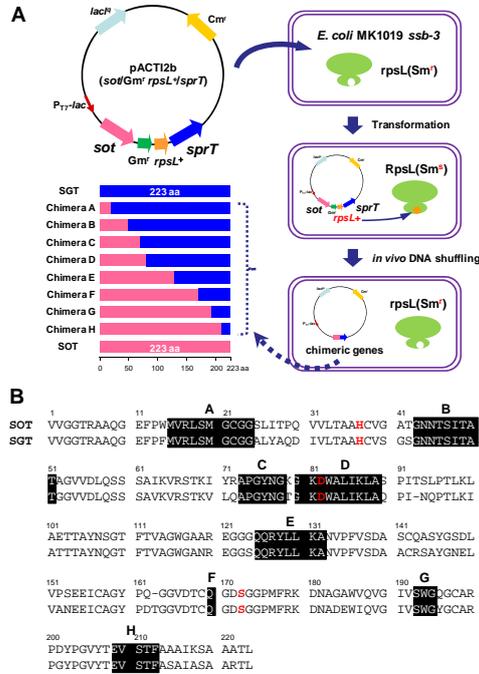


図1 RIBS shuffling法によるキメラ遺伝子の作製

A: RIBS shuffling用プラスミドと大腸菌MK1019 (*ssb-3*変異株)を用いたRIBS shuffling法のストラテジー。B: SOTとSGTの1次構造およびキメラ酵素の切り替えポイント。

これらのキメラ酵素の、高次構造の異なるタイプIコラーゲンとタイプIVコラーゲンに対する比活性を測定し、比較した (図 2A, B)。その結果、キメラ B と C の間で、タイプIコラーゲンとタイプIVコラーゲンに対する活性が大きく異なっていた (図 2C)。これらのキメラの異なる領域は、SOT のアミノ酸領域 52-72 であり、この領域が高次構造の認識に関わることが示唆された。

(2) タンパク質の高次構造の認識に関わるアミノ酸残基の特定

アミノ酸領域 52-72 について、さらに B-1 から B-4 のキメラ酵素を作製し (図 3A)、反応性に関わる残基を探索した。図 3B-D に示すように、キメラ B-3 と B-4 の間でタイプIVコラーゲンに対する活性が大きく異なっており、これらのキメラの違いが 71 番目のアミノ酸残基のみであることから、SOT の Tyr71 がタンパク質基質の高次構造の認識に寄与するアミノ酸残基であることがわかった。このアミノ酸残基は触媒部位および P1

部位の基質特異性に関与する残基のいずれからも離れていることがわかった (図 3E)。

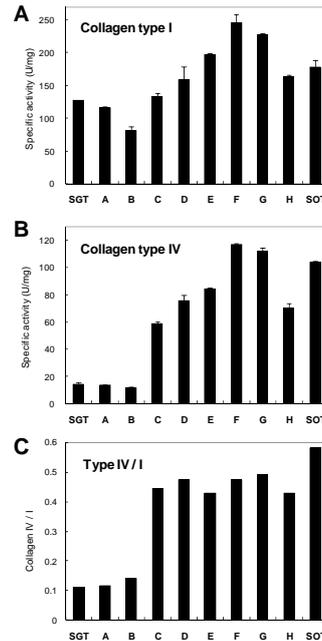


図2 キメラA-HのFITCコラーゲンに対する比活性の比較

タイプIコラーゲン (A) とタイプIVコラーゲン (B) は 10 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に加えておき、酵素溶液を添加して 37 °C で反応を行った。蛍光強度は λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nm で測定した。C: タイプIコラーゲンとタイプIVコラーゲンに対する活性比を表示した。

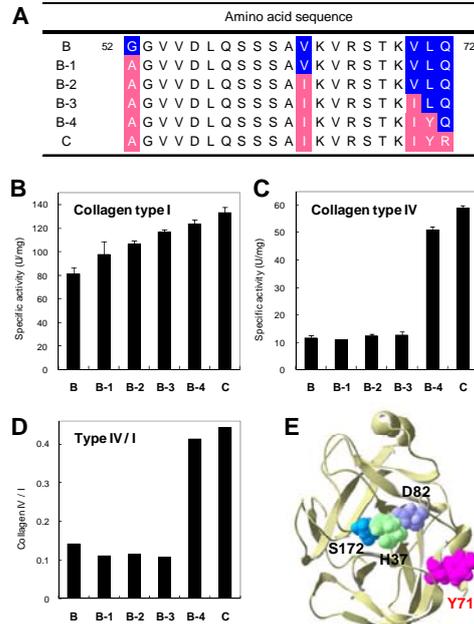


図3 タンパク質基質の認識に寄与するアミノ酸残基の特定
キメラBとCの変異体の一次配列と、タイプIコラーゲン (B) とタイプIVコラーゲン (C) に対する比活性。D: タイプIコラーゲンとタイプIVコラーゲンに対する活性比を表示した。E: SGTの立体構造を基に構築したSOTの構造と、タンパク質基質の認識に関わる残基Tyr71。

(3) アミノ酸残基 71 の変異体の解析

SOT および SGT のアミノ酸残基 71 を様々なアミノ酸残基で置換した変異体について、培養上清の SDS-PAGE を解析した。他の SGT

の1残基変異体と異なり、SGT-L71Pのバンドはほとんど認められず、他のタンパク質を示すバンドが多数認められた。また、SGT-L71Pの培養上清は活性を示さなかった。これらの結果は、SGT-L71Pが正しくフォールディングされなかったためと推測される。アミノ酸残基71はSGTのフォールディングにも影響を与えることが示唆された。

SGTの1残基変異体のタイプIコラーゲンおよびタイプIVコラーゲンに対する活性を比較した結果(図4)、Leu71をTyr(SGT-L71Y)、Trp、Hisに置換した変異体はタイプIVコラーゲンに対する活性が上昇した。一方、SOTの1残基変異体(SOT-Y71L)はタイプIVコラーゲンに対する活性が減少した。

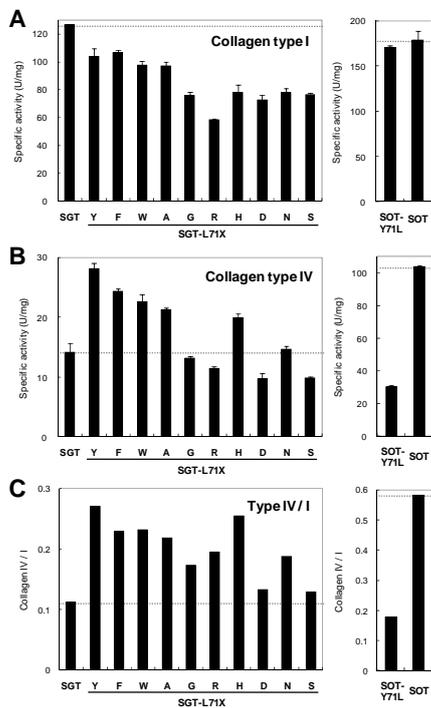


図4 タンパク質基質の特異性に対する71番目のアミノ酸残基の変異の影響

タイプIコラーゲン(A)とタイプIVコラーゲン(B)は、10 mM CaCl₂を含む50 mM Tris-HCl (pH 8.0)に加えておき、酵素溶液を添加して37°Cで反応を行った。蛍光強度はλ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nmで測定した。C:タイプIコラーゲンとタイプIVコラーゲンに対する活性比を表示した。

(4) 表面プラズモン共鳴法によるタンパク質基質との結合領域の解析

解析チップ表面にコラーゲンを共有結合で固定化し、そこに触媒残基であるSer172をAlaに置換して不活性化したキメラ酵素を添加して測定を行った。その結果、コラーゲンとの結合性にもアミノ酸領域52-72が関与することが示唆された。更に詳細な解析から、Arg72がコラーゲンとの結合において重要な残基であることが明らかになった。

(5) 特定したアミノ酸残基のタンパク質基質の認識における影響

次に、特定した2つの機能性残基(アミノ酸残基71、72)を置換した親酵素の変異体を作成し、それぞれの基質に対する分解活性を親酵素と比較した。(図5)。その結果、71番目の残基を置換することでtype IVに対する活性が大きく変化したが、2残基とも置換したSGTの変異体はコラーゲンtype IVに対する活性が顕著に増大し、コラーゲンタイプに対する活性比(Collagen IV/I)が親酵素であるSOTと匹敵するレベルに至った(図5C)。一方、SOT-Y71LはタイプIVコラーゲンに対する活性がSOTと比較して大きく減少し、Collagen IV/IがSOTの2分の1であった。

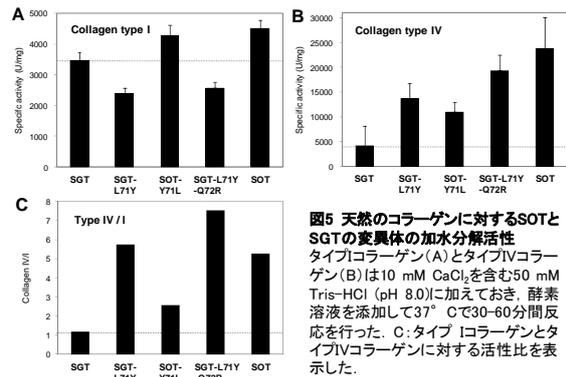


図5 天然のコラーゲンに対するSOTとSGTの変異体の加水分解活性
タイプIコラーゲン(A)とタイプIVコラーゲン(B)は10 mM CaCl₂を含む50 mM Tris-HCl (pH 8.0)に加えておき、酵素溶液を添加して37°Cで30-60分間反応を行った。C:タイプIコラーゲンとタイプIVコラーゲンに対する活性比を表示した。

表1 SOT, SGT, 変異体の基質に対するカインेटックス解析

	K_m (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)
SGT	17.7 ± 0.6	33.0 ± 4.1	1.9
SGT-L71Y	17.2 ± 5.7	51.3 ± 7.8	3.2
SOT-Y71L	17.5 ± 2.9	93.0 ± 17.1	5.4
SGT-L71Y-Q72R	12.0 ± 1.7	57.3 ± 1.8	4.8
SOT	6.1 ± 1.9	279.5 ± 12.1	49.7

また表1に、人工基質Z-Gly-Pro-Arg-MCAに対するカインेटックス解析の結果を示した。SOTとSGTのいずれにおいても、アミノ酸残基71および72の変異によって触媒効率 k_{cat}/K_m が大きく変化した。

(6) 特定したアミノ酸残基の構造への影響

SOTとSGTおよび、71番目の残基の変異体のCDスペクトルとTrpの蛍光スペクトルの測定を行った。図6Aに示すように、SOTおよびSGTの変異体のCDスペクトルは、親酵素であるSOTとSGTと比較して大きく変化しており、二次構造が変化していることが示唆された。また、Trpの蛍光スペクトルにおいてもアミノ酸残基71の変異によって、スペクトルが大きく変化しており、Trpの配向が大きく変化していることが示唆された(図6B,C)。これらの結果から、アミノ酸残基71は酵素の構造にも大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

(7) フィブリン分解に寄与する残基の特定

更に、上述のキメラライブラリーを用いて、フィブリン分解に関わる残基の特定を行っ

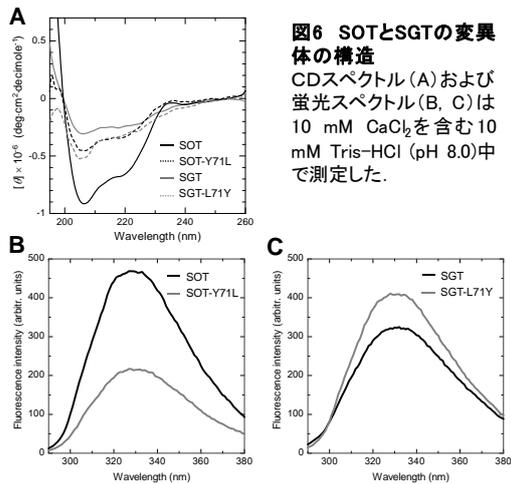


図6 SOTとSGTの変異体の構造
CDスペクトル(A)および蛍光スペクトル(B, C)は10 mM CaCl₂を含む10 mM Tris-HCl (pH 8.0)中で測定した。

た。2種類のフィブリン様基質に対する分解活性を比較した結果、キメラHとSOTの間である分解活性が大きく変わっており、C末端領域がフィブリン分解に関与することが示唆された。変異体を用いた詳細な解析の結果、SOTのLys217とAla221がフィブリン分解に寄与することを見出した。これらの2残基を置換した親酵素の変異体を作製し、フィブリン様基質を用いてカイネティックス解析を行ったところ、SGTの2残基変異体はSGTと比較して、フィブリン様基質に対する K_{cat} 値が4倍高く、触媒効率が増大した。逆に、この2残基をSGT側の残基に置換したSOTの変異体は K_{cat} 値が3分の1に下がっており、触媒効率が減少が認められた。フィブリンプレート法によるフィブリン分解試験を行ったところ、SGTの2残基変異体はフィブリン分解能が5倍以上増大すること、SOTの変異体は分解能が2分の1になることが示された(図7)。これらの結果から、SOTのC末端側の2残基Lys217とAla221がフィブリン分解に寄与することを明らかにした。

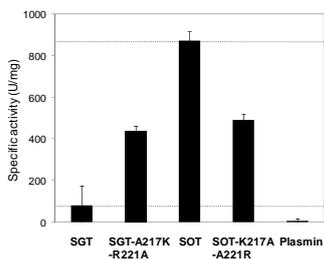


図7 SOTとSGTの変異体のフィブリン分解活性
人工血栓溶解試験(フィブリンプレート法)により、各酵素のフィブリン分解能を評価した。フィブリンプレート作製後、酵素を添加し、37°Cで6時間反応を行った。

以上、当初予定していた研究内容は、全て実施した。

(8) 考察

従来のセリンプロテアーゼの基質認識における研究は、低分子基質を用いたS1-Sn部位の特異性^{1,8-11}に特化しており、実際の基質であるタンパク質等の高分子に対する高次構造を含めた認識メカニズムは明らかに

なっていない。cathepsin Kの中でコラーゲン分解活性を有するcathepsin Kの研究では、このユニークな性質がP1サイトのArg, Lys特異性と、特にP2サイトのPro、P3サイトのGly特異性によるものと考えられてきた¹²。一方、我々のこれまでの研究では、SOTとSGTのP1、P2、P3サイトに対する特異性は同様であるにも拘らず、高次構造を有するタンパク質基質に対する基質特異性は顕著に異なっていた。それ故、我々はS1、S2、S3部位以外の領域が高次構造の認識に関与していると考えた。また、我々はこれまでにRIBSシャフリング法⁶)を用いて、ホスホリパーゼDの反応性や基質認識、耐熱性に関わるアミノ酸残基^{6, 13, 14})や、放線菌由来ロイシニアミノペプチダーゼのカルシウム活性化に関わる残基の機能¹⁵)を明らかにしてきた。今回、SOTとSGTにおいてRIBSシャフリング法による網羅的な機能領域の探索を行うことにより、セリンプロテアーゼの高分子基質の認識に寄与するアミノ酸残基を初めて明らかにした。この発見は立体構造上の情報からは推測されてこなかったものであった。

過去の研究から、SGTの構造は、15個のβシートと2つのαヘリックス構造から形成されていることが知られている³)。SGTはβバレルドメインを2つ形成しており、それらのドメイン間に触媒残基を持つ。図8は、このSGTの立体構造を基にホモロジーモデリングによってSOTの構造を構築したものであるが、高分子基質の認識に寄与するアミノ酸残基Tyr71はN末端側のβバレルドメインのβシート状に位置しており、Trp83と近接している(約3 Å)。それ故、我々はTyr71がTrp83を介して触媒残基Asp82周辺の環境を変化させているのではないかと考える。一方、Arg72は触媒部位から比較的近い所に位置していた。フィブリン分解に関わる2残基Lys217およびAla221は、C末端のαヘリックス上に位置することがわかった。このヘリックスは触媒残基のAsp82の環境に影響することが報告されている。

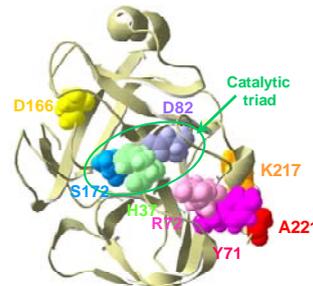


図8 タンパク質基質の認識に寄与する残基の立体構造上の位置
本研究で明らかにしたタンパク質基質の認識に関わるSOTのTyr71、Arg72、Lys217、Ala221周辺の立体構造。

実際、今回の実験でアミノ酸残基71と72、または217と221を置換すると、SOTとSGT

のいずれにおいても触媒効率が大きく変化していた (表 1、図 7)。

他のセリンプロテアーゼと比較すると、SOT の Tyr71 と触媒残基 Ser、His、Asp との位置的關係は、牛由来トリプシン (PDB ID: 1kln) や α -キモトリプシン (PDB ID: 5cha) の、Ile89 または Phe89 (SOT の Tyr71 に相当するアミノ酸残基) と触媒残基との位置的關係と似ている。これらのセリンプロテアーゼの 89 番目のアミノ酸残基は、Ile103 (SOT の Trp83 に相当するアミノ酸残基) と少し離れた位置にあり (約 5 Å)、そのために相互作用ができないのではないかと考えている。これらのセリンプロテアーゼについても、89 番目のアミノ酸残基を他の残基に置換することで Ile103 と相互作用することができれば、基質の高次構造に対する認識が変化するのではないかと推測する。

また、本研究によって SOT の Tyr71 が高次構造を有するタンパク質基質に対する認識のみならず、酵素のフォールディングや構造、触媒効率にも寄与することを明らかにした。今回の知見を基に、高機能性酵素を創成することにより、環境への影響が懸念される化学調整法に代わる安全なコラーゲンペプチド調整技術を新たに提供することができると考える。さらに、SOT は従来の血栓溶解剤と比較して高いフィブリン分解活性を示し、血栓溶解剤に利用できる可能性を示している。血栓症は国内の三大死因の一つであるが、臨床で使用されているストレプトキナーゼや組織プラズミン活性化因子などの血栓溶解剤は高価で脳出血やアレルギー反応などの副作用を伴うため、未だに有用な血栓溶解剤が探索されている。SOT は血栓症の予防食品や治療薬への応用が期待できる。今後、本研究がコラーゲンやフィブリン、更にはアルツハイマー病やパーキンソン病などのアミロイド繊維のような難分解性タンパク質の認識メカニズムに貢献し、酵素の本質的な機能のメカニズムの解明という基礎研究のみならず、産業への応用や疾患の予防および治療へと発展することを願っている。

本研究成果の詳細は、発表論文に掲載されているので、ご参照頂けると幸いです。

- 1) Hedrtrom L. *Chem. Rev.* 102, 4501-4523 (2002)
- 2) Hui Z. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 45-50 (2004)
- 3) Read R. J. *et al. J. Mol. Biol.* 200, 523-551 (1988)
- 4) Uesugi Y. *et al. Biochim Biophys Acta* 1784, 716-726 (2008)
- 5) Olafson R.W. *et al. Biochemistry* 14, 1168-1177 (1975)
- 6) Mori K. *et al. Appl Environ Microbiol*, 71, 754-760 (2005)
- 7) Hatanaka T. *et al. Protein Expr Purif* 62, 244-248 (2008)

- 8) Perona J.J., Craik C.S. *Protein Sci* 4, 337-360 (1995)
- 9) Czapinska H., Otlewski J. *Eur J Biochem* 260, 571-595 (1999)
- 10) Huber R. *et al. J Mol Biol* 89, 73-101 (1974)
- 11) Krieger M. *et al. J Mol Biol* 83, 209-230 (1974)
- 12) Choe Y. *et al. J Biol Chem* 281, 12824-12832 (2006)
- 13) Uesugi Y. *et al. J Biol Chem* 280 26143-26151 (2005)
- 14) Uesugi Y. *et al. Protein Sci* 16 197-207 (2007)
- 15) Arima J. *et al. J Biol Chem* 281 5885-5894 (2006)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- (1) Yoshiko Uesugi, Hirokazu Usuki, Jiro Arima, Masaki Iwabuchi, and Tadashi Hatanaka, Molecular dissection of *Streptomyces* trypsin on substrate recognition. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, *In press*.
- (2) Yoshiko Uesugi, Hirokazu Usuki, Masaki Iwabuchi, and Tadashi Hatanaka, Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces*. *Enzyme and Microbial Technology*, 査読有, 48 (2011) 7-12.
- (3) Yoshiko Uesugi, Hirokazu Usuki, Masaki Iwabuchi, and Tadashi Hatanaka, The role of Tyr71 in *Streptomyces* trypsin on the recognition mechanism of structural protein substrates. *The FEBS Journal*, 査読有, 276 (2009) 5634-5646. その他、原著論文 1 報を投稿中

〔学会発表〕 (計 2 件)

- (1) 上杉 佳子, 放線菌由来セリンプロテアーゼの血栓溶解に関わるアミノ残基, 第 83 回日本生化学会大会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸ポートアイランド (神戸)
- (2) 上杉 佳子, 放線菌由来セリンプロテアーゼの血栓溶解への応用, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21-24 日, 神戸ポートアイランド (神戸)

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: トリプシン様酵素

発明者: 畑中唯史、上杉佳子、西本幸史

権利者: 同上

種類: 公開特許公報 (A)

番号: 特許公開 2009-171870

取得年月日: 2009 年 8 月 6 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上杉 佳子 (UESUGI YOSHIKO)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号: 30416416

(2)(3) 研究分担者、連携研究者 該当なし