

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23247029

研究課題名(和文) 2つのRecAホモログRad51、Dmc1の集合反応の分子レベルでの統括的理解

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanism of the assembly of two RecA homologs, Rad51 and Dmc1

研究代表者

篠原 彰 (Shinohara, Akira)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：00252578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA相同鎖検索反応は、組換えの根幹をなす反応であり、真核生物ではRecAのホモログRad51が体細胞分裂期の相同鎖検索に機能する一方、減数分裂期の相同鎖検索にはRad51に加え、減数分裂期特異的RecAホモログDmc1が働くと考えられている。Rad51と働くPsy3-Csm2-Shu1-Shu2複合体のコア要素、Psy3-Csm2複合体のX線構造解析から、この複合体はRad51と構造的に相同であり、Psy3-Csm2-Shu1-Shu2複合体に代表されるRad51メデエーターがRad51フィラメントの末端に結合することで、Rad51フィラメント形成の促進や安定化に関わるモデルを提出した。

研究成果の概要(英文)：During recombination, homology search between two DNA molecules is a key reaction which is mediated by the RecA homolog Rad51 during mitosis. On the other hand, homology search in meiotic recombination is catalyzed by a collaborative action of two RecA homolog, Rad51 and Dmc1. Both Rad51 and Dmc1 form a filament on the single-stranded DNAs which is regulated in a positive and negative way. We identified a new protein complex containing Psy3, Csm2, Shu1 and Shu2 for Rad51 assembly. We determined a crystal structure of a core component of this complex, Psy3-Csm2. Surprisingly, Psy3-Csm2 shows a structural similarity to Rad51 dimer, although there is little sequence similarity between the proteins. Based on the structure, we propose how the Psy3-Csm2 promotes Rad51 filament on the DNA. This is very novel finding to understand molecular mechanism on how Rad51 mediators facilitate Rad51 filament formation.

研究分野：基礎生物学

キーワード：組換え 減数分裂 ゲノム安定化 Rad51

1. 研究開始当初の背景

DNA 鎖の交換反応である組換えは体細胞分裂期では DNA 損傷、特に、染色体切断を引き起こす DNA 2 重鎖切断の修復に、減数分裂期では相同染色体の分配やゲノムの多様性の創出に重要な役割を果たしている。相同組換えの破綻は染色体の恒常性の維持の異常-ゲノム不安定化-を誘発し、細胞の癌化や配偶子(精子、卵子)の欠損(不妊、流産)を産み出すことが知られている。特に、2つの同じ DNA 配列間で起きる相同組換えは染色体の恒常性を維持するための必須過程であり、染色体機能/構造や染色体ネットワークの中でも重要な構成要素の1つとして、染色体構造による制御を受ける。本研究は相同組換えに関わるタンパク質複合体の構造基盤に基づく分子レベルでの理解を目指している。

相同組換えは核内で空間的に離れて存在する2つの相同な DNA 間で起こる反応である。様々な過程からなる多段階反応であり、中でも、DNA 相同鎖検索反応は、組換えの根幹をなす反応と言え、一本鎖 DNA の塩基配列の情報を利用して、核内に存在する無数に存在する情報の異なる配列、さらには、類似した配列を区別することで、一本鎖 DNA の持つ塩基配列と同じ DNA 配列を持つ2本鎖 DNA を探し出すことが出来る。DNA 間の相同検索を原核生物では RecA タンパク質が、真核生物ではそのホモログ Rad51 が体細胞分裂期の組換え、特に、姉妹染色体間の組換え、に関わるが、相同検索反応の分子機構については不明な点が多い。一方、減数分裂期の組換えには Rad51 に加え、減数分裂期特異的 RecA ホモログ Dmc1 が働くことで、姉妹染色体間ではなく、物理的、空間的に離れた相同染色体間での DNA 交換を促進すると考えられている(組換えパートナー選択機構)。特に真核生物の組換え反応には多数のタンパク質が関わり、DNA 上にタンパク質超分子構造体が染色体というコンテキストで動的変化を繰り返すことで、このタンパク質構造体の機能的特異性が生まれると考えられている。その過程に様々な因子が組換え反応を行なう複合体と一過的に相互作用し、その機能を交換、制御すると考えられる。

2. 研究の目的

組換えの根幹をなす DNA 鎖相同検索反応は体細胞分裂期では RecA ホモログ Rad51 により、姉妹染色体の鎖交換を、減数分裂期では Rad51 に加え、減数分裂期型 Dmc1 の働きにより、相同染色体の DNA 鎖交換を行なう。Rad51, Dmc1 とともに活性化フォームである DNA 上のフィラメント構造は類似していて、特異性は Rad51, Dmc1 と一緒に働く正、負の因子により決まると考えられる。本研究は、Rad51, Dmc1 による DNA 鎖相同検索反応、特に組換えパートナー選択機構、の分子基盤を理解する

ために、我々の同定した Rad51 集合を助ける Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 複合体の構造学解析に基づく分子論的機能解析、Dmc1 の集合を担う Mei5-Sae3 複合体の構造解析に加え、相互作用する因子を DNA 末端の機能的非対称性と言う点から、統括的に分子レベルで理解することを目指す。

3. 研究の方法

(1) Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 複合体の機能、構造解析

Psy3, Csm2, Shu1, Shu2 の4つの因子は組換えに関わることが示されているが、その分子実体は不明であった。これまでの申請者の先行研究によって、これらの因子の中で、Psy3, Csm2 がコアとして4量体を形成し、これらが細胞内で、Rad51 の集合を促進することを見出している。さらに、本申請研究では Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 (PCSS) 4量体、Psy3-Csm2 (PC) 2量体を精製し、その生化学的活性を詳細に検討する。特に DNA 結合活性は比較的単純に測定できる活性である。また、Psy3-Csm2 2量体や Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 (PCSS) 4量体の X 線構造解析のための結晶化を試みる。結晶化が可能で、かつ、十分な回折像が得られた場合は、そのセレノメチオン誘導体の結晶を得ることで、位相を決定し、その構造を解明する。(阪大蛋白研中川博士との共同研究)。同時に、試験管内で、精製した Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 と Rad51 を用いた組換え反応系の構築を目指す。さまざまな種類のモデル基質 DNA や、タンパク質濃度などの検討を加えることで、Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 が Rad51 の組換え活性や集合を促進することを証明する。次に、Rad51 の集合促進の分子メカニズムを知るために、Psy3-Csm2 2量体の結晶解析をさらに進める。Rad51 フィラメントの末端に結合して、その重合を促進するならば、共結晶化が可能かもしれない。

(2) 減数分裂期特異的 Dmc1 の特性

Dmc1 の減数分裂期特異的機能を理解するためには、その集合を助ける Mei5-Sae3 の性質を理解することが大切である。これまで Mei5-Sae3 複合体を精製し、DNA 結合活性を有すること、その結晶構造解析、微小結晶ながら、に成功している(構造解析は阪大蛋白研中川博士との共同研究)。この結晶を回折像が得られるまで大きくし、位相を決定する結晶の取得に取り組む。最終的には X 線構造を決定する。その構造から Mei5-Sae3 複合体がどのような分子メカニズムで Dmc1 の集合を促進するのか、モデルすら掴めていない。精製した Mei5-Sae3 複合体と Dmc1 による試験管内の反応や Mei5-Sae3 複合体と Dmc1 の

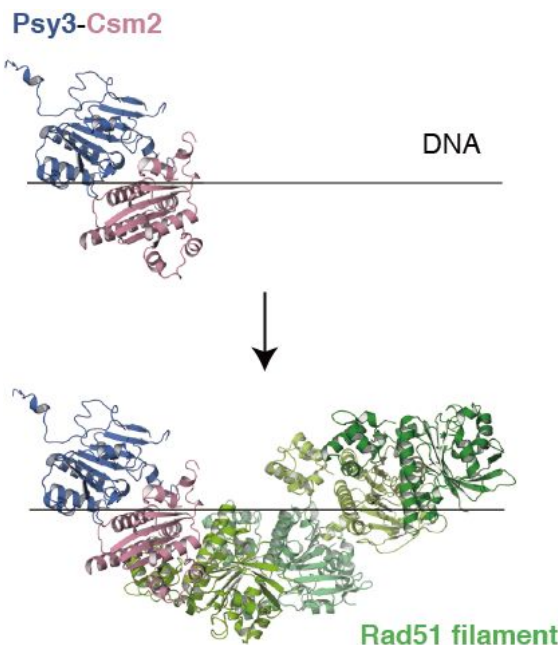
共結晶化により詳細な構造解析を目指すと共に、Mei5-Sae3 複合体や Dmc1 と共に働く、他の因子を同定することが大切である。Dmc1, Sae3 の Flag タグは機能性でない一方、Mei5-Flag は機能性であることを利用し、大量の減数分裂期の細胞から、Mei5-Flag に対しての Affinity purification を行ない、共精製されるタンパク質を精製し、質量分析で解析する（北海道大学小布施博士との共同研究）。予備的な実験では、すでに結合することが知られている Sae3, Dmc1 に加え、一本鎖 DNA 結合タンパク質の RPA を同定できた。これはシカゴ大の Bishop らによる発見と一致する（JBC, 2009）。さらに、Mei5-Flag に相互作用する未知のタンパク質を同定し、その遺伝子の欠失株の遺伝的解析を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究では Psy3, Csm2, Shu1, Shu2 の4つのタンパク質からなる新しいタンパク質複合体を見だし、PCSS と命名した。遺伝的解析からこれらの因子はすべて、減数分裂期の染色体上で Rad51 の集合を促進する上で重要であることがわかった。精製したタンパク質の生化学的解析から Psy3-Csm2, Shu1-Shu2 の安定なヘテロ 2 量体からなり、さらに Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 ヘテロ 4 量体を再構築できた。特に、Psy3-Csm2-Shu1-Shu2 ヘテロ 4 量体と Psy3-Csm2 ヘテロ 2 量体に DNA 結合活性を有することを見出した。

コアとなる Psy3-Csm2 の 2 量体の X 線構造解析を行った所、Psy3-Csm2 の 2 量体の構造がアミノ酸配列の類似性が無いにも関わらず、Rad51 と構造的に類似していることを明らかにできた。その構造をもとに、Psy3-Csm2 の 2 量体が Rad51 フィラメント形成を促進、安定化するモデルと提唱し(下図)そのモデルの妥当性を実験的に証明できた。Psy3-Csm2 の 2 量体は Rad51 フィラメントの一方の末端に結合し、その形成を促進しますが、この結合様式は家族性乳がん責任タンパク質である Brca2 の反対になる。この結果は、Rad51 フィラメント形成の末端の安定化が組換え、つまり、ゲノムの安定化に大切な役割を果たすことを示している(下図)。

(2) 減数分裂期特異的機能 Dmc1 の集合を助ける Mei5-Sae3 複合体の機能を知るためにこの複合体の X 線結晶構造解析を進めている。すでに Mei5 の N 末端を削った Mei5-Sae3 複合体から良質の結晶が得ることが出来、解像度の高い X 線回折像が得られている。位相をきめるために、セレンメチオニンで置換した誘導体を精製し、結晶化にも成功して、その回折像も得ることができた。現在、立体構造を計算しているところである。



図説明-DNA 上に Psy3-Csm2[青-赤]が結合し[上]、Rad51[緑、4つの分子]のフィラメント形成を促進する[下]

Mei5-Sae3 複合体の機能を知るためにこの複合体に相互作用する因子を網羅的に解析している。Mei5 の C 末端に FLAG タグを導入した株を作成し、その減数分裂期の細胞から、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降法で、複合体を精製したところ、特異的なバンドが複数得られた。そのバンドに対応するタンパク質を質量分析を用いて同定したところ、PAF 複合体の 5 つのタンパク質すべてが同定できた。このことは PAF 複合体が Mei5-Sae3, Dmc1 と一緒に機能していることを示している。現在、変異株の表現型を詳細に解析している。

本申請研究は組換えの特異性-組換えのパートナー選択、Rad51, Dmc1 の特異性を、染色体構造や機能的非対称性を分子的に理解する点で非常にユニークであり、当該分野の発展のみならず、ライフサイエンスの発展に大きく寄与することが期待できる。遺伝子治療や育種において、相同組換えを用いた遺伝子の改変技術は高等真核生物では、非常に効率が悪いことが大きな問題となっている。組換えパートナー、特に、遠くに離れた DNA 分子の相同性の認識機構の分子基盤の理解は、このような技術の律速段階を明らかにすることで、効率を上昇させる手段の開発に対して大きく貢献する可能性を秘めているため、ライフサイエンスの中だけでなく広く汎用性の高い基礎研究と言える。また、高等真核生物では組換えはゲノムの安定化や減数分裂期の染色体の分配に関わるため、組換えの理解は、細胞のガン化や配偶子の異数体形成に対して基礎的、かつ重要な知見を生み出すことが

期待できる。つまり、特に今回得られた組換えに關与するタンパク質複合体の構造は、組換えや減数分裂期特異的染色体要素の構造的理解は、抗がん剤や、不妊の治療薬の開発の基礎的情報を提供すると考えられる。

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 5 件)

1. Rao, H.B.D.P., Shinohara M. and A. Shinohara The Mps3 SUN domain is important for chromosome motion and juxtaposition of homologous chromosomes during meiosis. *Genes-to-Cells*. 16. 1081-1096, 2011, CI=5.
2. Shinohara M. and A. Shinohara. Multiple Pathways Suppress Non-Allelic Homologous Recombination during Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 4, e63144, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063144. CI=1
3. Sasanuma, H. Tawramoto, M.S., Lao, J., Hosaka, H., Sanda, E., Suzuki, M., Yamashita, E., Hunter, N., Shinohara M. Nakagawa, A. and A. Shinohara. A new protein complex promoting the assembly of Rad51 filaments. *Nature Comms*.4, 1676, 2013, doi: 10.1038/ncomms2678.CI=8
4. Sasanuma, H. Furihata Y., Shinohara M. and A. Shinohara. *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase disassembles Rad51 from meiotic chromosomes. *Genetics*, 194, 859-872, 2013, doi: 10.1534/genetics.113.150615. CI=1.
5. Shinohara M. and A. Shinohara. Multiple Pathways Suppress Non-Allelic Homologous Recombination during Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**. 4, e63144, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063144.

[学会発表](計 62 件)

招待講演(海外)

1. A. Shinohara, Seminar at Academia Sinica, Taipei, Taiwan April, 13-14, 2013.
2. Control of meiotic recombination by chromosome dynamics”, Akira Shinohara, 2013 FASEB Science Research Conferences Genetic Recombination & Genome Rearrangements, Steamboat Springs, Colorado, 2013 年 7 月 21 日-26 日
3. A. Shinohara, Roles of cohesin in dynamics of chromosomes and nuclear envelopes during meiosis (Seminar), □篠原彰, FMI セミナー、パーゼル(スイス)2012 年 10 月 15 日
4. A. Shinohara, Roles of cohesin and CDK,DDK-dependent phosphorylation of SUN protein Mps3 in meiosis-specific nuclear envelope remodeling, Akira Shinohara, Gordon Research Conferences,

Colby-Sawyer College New London, NH, 2012 年 6 月 3 日-8 日

5. A. Shinohara, Mediators of two RecA homologs, Rad51 and Dmc, FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES, Steamboat Springs, Colorado, 2011 年 7 月 24 日-29 日

発表(海外)

1. 1. DSB-dependent re-localization of the ZMM/SIC complex is promoted by the 9-1-1 checkpoint clamp.、 Miki Shinohara, Akira Shinohara、EMBO meeting meiosis、ナポリ(イタリア)、2011 年 9 月 15 日-22 日
2. CDK (cyclin-dependent kinase)- and DDK (Dbf4-dependent kinase)-dependent Regulation of Chromosome Movements in Meiosis、 H.B.D.Prasada Rao, Miki Shinohara, Akira Shinohara、EMBO meeting meiosis、ナポリ(イタリア)、2011 年 9 月 15 日-25 日

口頭発表(国内)

1. 出芽酵母 DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Rad53 が減数分裂期特異的な DNA 二重鎖切断に应答しない仕組み、 臼井雄彦, 篠原美紀, 篠原彰、日本遺伝学会第 83 回大会、京都大学農学研究科総合館講義室、2011 年 9 月 20 日-22 日
2. 減数分裂期交叉型組換えの数と配置制御の分子メカニズム、 篠原美紀, 篠原彰、酵母遺伝学フォーラム、九州大学医学部百年講堂、2011 年 9 月 5 日-7 日
3. シナプトネマ複合体形成における 9-1-1DNA 損傷チェックポイントクランプの機能、 篠原美紀, 林原加代子, 篠原彰、第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ、サンピア福岡、2011 年 10 月 25 日-27 日
4. Meiosis-specific DNA double-strand breaks escape detection by DNA damage checkpoint mediator, Rad9, to disconnect checkpoint signaling to Rad53 kinase in budding yeast.、 Takehiko Usui, Miki Shinohara, Akira Shinohara、第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ、サンピア福岡、2011 年 10 月 25 日-27 日
5. Meiosis-specific DNA double-strand breaks escape detection by DNA damage checkpoint mediator, Rad9, to disconnect checkpoint signaling to Rad53 kinase in budding yeast、 Takehiko Usui, Miki Shinohara, Akira

- Shinohara, 第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日-16 日
6. シナプトネマ複合体形成における 9-1-1 DNA 損傷チェックポイントクランプの機能、篠原美紀, 林原加代子, 辻岳志, 篠原彰, 第 29 回染色体ワークショップ、仙台秋保温泉ホテルニュー水戸屋、2012 年 1 月 25 日-27 日
 7. 減数分裂期の計画的 DNA 二重鎖切断に対して DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Rad53 の活性化をサイレンシングする仕組み、臼井雄彦, 篠原美紀, 篠原彰, 第 29 回染色体ワークショップ、仙台秋保温泉ホテルニュー水戸屋、2012 年 1 月 25 日-27 日
 8. 減数分裂期特異的染色体運動の制御、篠原彰, H.B.D.Prasada Rao, 篠原美紀, 第 29 回染色体ワークショップ、仙台秋保温泉ホテルニュー水戸屋、2012 年 1 月 25 日-27 日
 9. 出芽酵母 9-1-1 複合体は ZMM/SIC のリクルートを介して組換えを制御する、林原加代子, 辻岳志, 篠原彰, 篠原美紀, 酵母遺伝学フォーラム第 45 回研究報告会、京大宇治キャンパスおうばくプラザ、2012 年 9 月 4 日- 8 日
 10. 転写を介した DNA 鎖切断により誘導される DNA 損傷応答、逆井良, 坂井亜紀子, 前原喜彦, 篠原美紀, 篠原彰, 日本放射線影響学会第 55 回大会、東北大学、2012 年 9 月 6 日-8 日
 11. Srs2 ヘリカーゼの減数分裂期組換えにおける機能、降旗 裕子, 笹沼 博之, 篠原美紀, 篠原彰, 日本遺伝学会第 84 回大会、九州大学医学部 (福岡)、2012 年 9 月 26 日
 12. 出芽酵母の減数分裂期特異的な DNA 損傷チェックポイント蛋白の活性化をサイレンシングする仕組み、臼井雄彦, 篠原美紀, 篠原彰, 日本遺伝学会第 84 回大会、九州大学医学部 (福岡)、2012 年 9 月 26 日
 13. 出芽酵母の減数分裂期特異的な DNA 二重鎖切断に対して DNA 損傷チェックポイント蛋白の活性化をサイレンシングする仕組み、第 35 回日本分子生物学会、臼井 雄彦, 金原 良樹, 篠原 美紀, 篠原 彰, 福岡国際会議場マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11 日-14 日
 14. 出芽酵母 9-1-1 複合体は ZMM/SIC タンパク質のリクルートを介して組換えを制御する、林原加代子, 辻岳志, 篠原彰, 篠原美紀, 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場マリンメッセ福岡、2012 年 12 月 11 日-14 日
 15. 非相同末端結合因子 XRCC4 の M 期における染色体分配に対する機能、寺澤匡博, 篠原彰, 篠原美紀, 第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回核ダイナミクス研究会合同開催、淡路夢舞台国際会議場、2012 年 12 月 19 日- 21 日
 16. 出芽酵母減数分裂期の計画的 DNA 二重鎖切断に対して DNA 損傷チェックポイントが反応しない仕組み Molecular mechanisms to silence activation of DNA damage checkpoint proteins in response to meiosis-specific DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, 臼井雄彦, 篠原美紀, 篠原彰, 日本遺伝学会第 85 回大会、慶応大学 日吉キャンパス、2013 年 9 月 19 日-21 日
 17. Roles of Paf1 complex in Meiosis of Budding Yeast、Santosh Gothwal, Takehiko Usui, Miki Shinohara, Akira Shinohara, 日本遺伝学会第 85 回大会、慶応大学 日吉キャンパス、2013 年 9 月 19 日- 21 日
 18. Regulatory mechanism of nuclear envelope remodeling and chromosome motion during meiosis、Challa Kiran, H.B.D.Prasada Rao, Miki Shinohara, Akira Shinohara, 日本遺伝学会第 85 回大会、慶応大学日吉キャンパス、2013 年 9 月 19 日- 21 日
 19. Role of the Histone H3 methyltransferase enzyme Dot1 in Tel1/ATM activation、Mohammad Bani Ismail, Takehiko Usui, Miki Shinohara, Akira Shinohara, 日本遺伝学会第 85 回大会、慶応大学日吉キャンパス、2013 年 9 月 19 日- 21 日
 20. 構造特異的エンドヌクレアーゼ活性調節サブユニット Slx4 の減数第一前期における新規機能解析、東出望花, 篠原彰, 篠原美紀, 日本遺伝学会第 85 回大会、慶応大学日吉キャンパス、2013 年 9 月 19 日- 21 日
 21. M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、寺澤匡博, 篠原彰, 篠原美紀, 放射線影響学会大第 56 回大会、クラウンパレス青森、2013 年 10 月 18 日-20 日
 22. M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、寺澤匡博, 篠原彰, 篠原美紀, 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、ホテルニュー水戸屋 (仙台)、2013 年 11 月 20 日-22 日
 23. Roles of Paf1 complex in Meiosis of

Budding Yeast、 Santosh Kumar Gothwal、
Miki Shinohara、 Akira Shinohara、 第
22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショ
ップ、 ホテルニュー水戸屋(仙台)、 2013
年 11 月 20 日-22 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/genome/Shinohara-HP-index.html>

(2) 高校の出前講義(アウトリーチ活動)

1. 出前講義-大阪府立住吉高校(2011年11月14日)
2. 出前講義-茨城県立水戸第一高校(2011年11月4日、阪大の派遣事業を兼ねる)
3. 講演-西日本水中一高会(2011年11月12日)
3. 講演-繊維技術士センターの会友会(2012年2月6日予定)
4. 出前講義-私立和歌山信愛女子学院(2012年5月2日、6月20日、7月20日)
5. 体験実習-私立和歌山信愛女子学院(2012年8月31日)
6. 出前講義-茨城県立水戸第一高校(2012年10月18日、阪大の派遣事業を兼ねる)
7. 出前講義-大阪府立住吉高校(2013年1月9日)
8. 講演-茨城県高等学校教頭、副校長会(2013年5月2日)
9. 講演-大阪府立高等学校生物教育研究総会(2013年6月5日)
10. 出前講義-神戸海星女子高校(2013年6月13日)

11. 出前講義-大阪府立枚方高校(2013年6月14、28日)
12. 出前講義-大阪府立住吉高校(2013年9月30日)
13. 講演-サイエンスカフェ-大阪市立科学館(2013年10月5日)(大阪大学学術機構)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 彰 (SHINOHARA AKIRA)
大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：00252578

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：