

令和元年6月13日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03291

研究課題名(和文) 膜タンパク質の高速な質量分析のための赤外線レーザーイオン化技術の開発

研究課題名(英文) Development of infrared laser ionization techniques for high throughput mass spectrometry of membrane proteins

研究代表者

間 久直 (HAZAMA, Hisanao)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：70437375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：液体クロマトグラフィー(Liquid chromatography; LC)と質量分析(mass spectrometry; MS)を組み合わせたLC/MSによる膜タンパク質の高速な分析の実現を目指し、赤外線レーザーイオン化技術を開発した。赤外線レーザーイオン化を用いて10種のペプチド混合試料のLC/MSに成功した。イオン源を大気圧の約70%に減圧することで信号強度が約1.8倍に向上した。赤外線レーザーで脱離した試料にエレクトロスプレーで電荷を付与すると、信号強度を1桁以上高められ、LC/MSで一般的に用いられるエレクトロスプレーイオン化よりも界面活性剤等の添加物に耐性が高いことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内分子の分析で広く用いられている現状のLC/MSでは、水に対して難溶性である膜タンパク質の分析が極めて困難である。この主要因として膜タンパク質の可溶性に用いられる界面活性剤や尿素などの変性剤によるLC後のイオン化の妨害が挙げられる。本研究課題で開発した赤外線レーザーを用いた新規イオン化技術を用いると、LCの溶出液から膜タンパク質を直接イオン化させることも可能であると考えられ、LCとMSをオンラインで接続したLC/MSによる膜タンパク質の高速な分析の実現によって、プロテオミクスや新規医薬品開発におけるブレークスルーが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Infrared laser ionization techniques have been developed for high throughput liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) of membrane proteins. LC/MS of a mixture of 10 peptides was succeeded with the infrared laser ionization. Ion signal intensity was increased to about 1.8 times by reducing the pressure of the ionization source to about 70% of the atmospheric pressure. Ion signal intensity has been improved more than 10 times by applying charges to the desorbed samples using electrospray, and it was shown that this ionization method has higher tolerance to additives such as surfactants compared with electrospray ionization generally used in LC/MS.

研究分野：レーザー医工学、レーザーイオン化質量分析

キーワード：膜タンパク質 赤外線レーザー レーザーイオン化質量分析 液体クロマトグラフィー 生体分子計測

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上には様々な膜タンパク質が発現しており、これら膜タンパク質が細胞内外の分子輸送やシグナル伝達などの重要な機能を担っている。このため、膜タンパク質はプロテオミクスや新規医薬品開発における重要なターゲットになっている。プロテオーム解析では液体クロマトグラフィー (liquid chromatography; LC) と質量分析 (mass spectrometry; MS) とを組み合わせた LC/MS が広く用いられており、LC からの溶出液のイオン化には主にエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) が用いられている。しかし、膜タンパク質は水に対して難溶性であるため、可溶化剤として用いられる界面活性剤や尿素などの変性剤が ESI によるイオン化を妨害するという問題があり、現状の LC/MS では膜タンパク質の分析が極めて困難である。また、LC で最適な分離を得るためには pH 調整を必要とする場合が多く、リン酸ナトリウムや酢酸ナトリウムなど無機塩の緩衝液が使用されているが、これらは低揮発性の溶媒であり、ESI におけるイオン化効率の低下につながる。更には、流路系の目詰まりや塩の析出による汚染で感度低下を起こすことにもなる。

一方、LC/MS におけるイオン化法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) も用いられている。しかし、MALDI では試料溶液を結晶性化合物 (マトリックス) と混合し、乾燥させ、共結晶化させてから紫外線レーザーを照射して試料をイオン化させるため、LC と MS とをオンラインで接続することができない。このため、LC からの溶出液をロボットで順次プレート上の別の点にスポットし、乾燥させてから MS を行う必要がある。LC からの溶出液を ESI で連続的にイオン化させながら順次質量スペクトルを測定するオンライン LC/MS に対して、スポットティングを行った後で別途 MS を行う手法はオフライン LC/MS と呼ばれており、オンライン LC/MS と比べて分析のスループットやコストの面で不利があると言える。

この課題を解決するため、研究代表者らは赤外線レーザーを用いた MALDI に関する研究を進めてきた。通常 MALDI では紫外線レーザーを使用しており、溶液状態の試料からのイオン化が困難であるため、上述のようにオフラインで LC/MS を行う必要がある。これに対して、赤外線領域は分子内の分子振動と共鳴して特定の波長の光が強く吸収される領域であり、化学結合の種類によって吸収が強くなる波長が異なるため、分子の指紋領域とも呼ばれる。水は広い波長範囲に渡る赤外線を強く吸収し、中でも波長 3  $\mu\text{m}$  帯では紫外線領域と比べて吸収の強さが 10<sup>6</sup> 倍以上にもなる。このため、赤外線レーザーを用いると、大気中で溶液状態の試料からのイオン化が可能である。研究代表者らは、波長 3  $\mu\text{m}$  帯の赤外線レーザーを用いて大気中で水溶液中のペプチドをイオン化させ、MS を行うことが可能であることを示した。ここで重要なのは、通常 MALDI で用いられる有機化合物などのマトリックスを添加することなく、水溶液から直接のイオン化を実現していることである。そして、波長 3  $\mu\text{m}$  帯の赤外線レーザーと、フリットと呼ばれる多孔質の金属製薄板を用いて LC と MS とをオンラインで接続し、2 種のペプチドを分離・検出することに成功した。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、試料溶液から膜タンパク質を直接イオン化させ、LC と MS とをオンラインで接続した LC/MS による膜タンパク質の高速な分析を実現することによって、プロテオミクスや新規医薬品開発にブレークスルーをもたらすために、赤外線レーザーを用いた新規イオン化技術の開発を行った。特に、本研究課題の開始までに行ってきた大気圧赤外線レーザーイオン化による水溶性ペプチドの測定では、一般的に用いられている ESI と比べて検出感度が 1~2 桁程度低いことが課題であった。このため、本研究課題では、イオン源の圧力を大気圧よりも低くしてイオンの透過率を向上させることや、レーザー照射によって脱離させた試料に帯電液滴を噴霧して電荷を付与することによる検出感度の向上を試みた。また、これまでの研究で使用していたイオントラップ型質量分析装置では質量と電荷数の比  $m/z$  が 2,000 までのイオンしか測定できなかった。本研究課題では、 $m/z$  が 32,000 までのイオンを測定可能であり、分子量が数万以上であるタンパク質の分析により適した四重極-飛行時間型質量分析装置を使用することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 大気圧赤外線レーザーイオン化によるオンライン LC/MS

大気圧赤外線レーザーイオン化による測定を行うために、市販の四重極-飛行時間型質量分析装置 (Q-TOF Ultima API, micromass, UK) の ESI イオン源を改造し、赤外線レーザーを導光可能な構造とした。レーザー光源として、光パラメトリック発振 (optical parametric oscillation; OPO) 方式で波長を 2.7~3.1  $\mu\text{m}$  で可変である赤外線レーザー (IR Opolette 2731-HE, OPOTEK, USA) を用いた。中空光ファイバーで導光されたレーザー光を 2 枚の CaF<sub>2</sub> 製平凸レンズを通して集光し、試料溶液に照射した。イオン化部へ一定の流量で流入する試料溶液に対して連続的にレーザー照射を行うために、フリットと呼ばれるステンレス製の多孔質プレートを用いた。内径 75  $\mu\text{m}$  の石英ガラス製キャピラリーを經由して送液され、フリット表面に滲出した試料溶液に、連続的にレーザーを照射してイオン化させた。フリットは手動ステージに固定されており、3 方向に移動可能である。質量分析装置に備えられていたイオン吸入口 (サンプルコーン) の代わりに取り付けられたステンレス製の延長キャピラリーを經由して、発生したイオンを質量分

析装置内の真空部へ取り込んだ。

大気圧赤外線レーザーイオン化によりオンライン LC/MS を行うことが可能であることを確認するため、10 種類のペプチドを混合した試料( 5190-0583、Agilent Technologies、USA ) の測定を行った。フリットを延長キャピラリー先端から 3 mm の位置に固定し、1.5 kV の電圧を印加した。液体クロマトグラフィーにおける移動相として、A: メタノール、および B: 0.05% ギ酸水溶液を用い、流量 0.1 mL/min で逆相カラム ( ZORBAX SB-C18 ( 内径 2.1 mm、長さ 50 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$  )、Agilent Technologies ) に送液した。フリット表面に滲出した移動相に、水の吸収ピークである波長 2.94  $\mu\text{m}$  で、パルス繰り返し周波数 20 Hz、パルス幅 10 ns、ピークパワー密度  $1.0 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$  の赤外線レーザー光を照射してイオン化させた。5  $\mu\text{L}$  のペプチド混合試料を移動相に注入し、質量分析装置による測定を開始した。移動相の A と B の混合比を、0 分から 30 分の間に 10:90 から 80:20 に変化させ、30 分以降は 80:20 を維持させた。

表 1. 大気圧赤外線レーザーイオン化を用いた LC/MS で測定したペプチド混合試料。

#	Name	Molecular weight	Concentration [pmol/ $\mu\text{L}$ ]
1	Bradykinin fragment 1-7	756.85	82.6
2	Bradykinin	1060.21	44.2
3	Angiotensin II (human)	1045.53	50.8
4	Neurotensin	1672.92	31.7
5	Angiotensin I (human)	1296.48	41.0
6	Renin substrate porcine	1759.01	32.0
7	[Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinogen (1-14)	2231.61	49.3
8	Ser/Thr Protein Phosphatase (15-31)	1952.39	48.0
9	[F14] Ser/Thr Protein Phosphatase (15-31)	2099.00	71.5
10	Melittin (honey bee venom)	2846.46	11.0

## (2) 減圧イオン源の開発

上述した大気圧赤外線レーザーイオン化は容易に利用できる反面、現時点では ESI と比べて検出感が低いことが課題である。そこで、フリット周囲を小型の真空容器で覆い、イオン化部を減圧できるイオン源の開発を行った。図 1 に、本研究課題で開発した減圧イオン源の概略を示す。基本的な構成は、上記の大気圧赤外線レーザーイオン化の場合と同じであるが、イオン化部の減圧を行うためにアクリル製の減圧容器を作製した。本減圧容器は延長キャピラリー先端部とフリット

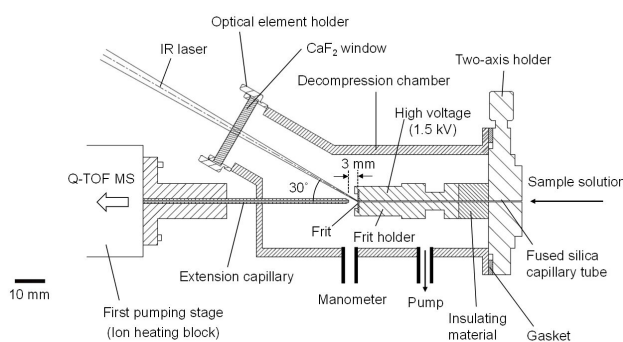


図 1. 赤外線レーザー減圧イオン源の概略図。

を覆う形状になっており、レーザー光の導入用と内部観察用に 2 枚の  $\text{CaF}_2$  製光学窓が取り付けられている。また、内部のフリットに高電圧を印加するためのばねを内蔵しており、外部電源から電圧の調整が可能となっている。容器にはダイヤフラムポンプが接続されており、11 kPa まで減圧することが可能である。また、真空レギュレーター ( IRV10-C06BG、SMC、Japan ) によって排気量を調節することが可能である。容器内の圧力を、容器に接続された圧力計 ( PG-100、COPAL ELECTRONICS、Japan ) を用いて確認した。フリット表面と延長キャピラリー先端の距離は 3 mm とし、フリットと延長キャピラリーには、それぞれ 2.5 kV、および 190 V の電圧を印加した。また、延長キャピラリーの温度は 150°C に設定した。フリット上の溶液を CCD カメラで観察した。比較のため、一般的に用いられている ESI を用いた測定も行った。ESI ではスプレーノズル、およびサンプルコーンにそれぞれ 3.5 kV、および 190 V の電圧を印加した。

## (3) 赤外線レーザー支援脱離エレクトロスプレーイオン化法の開発

赤外線レーザーイオン化の検出感を向上させるため、レーザー照射によってフリット表面から脱離して霧状になった液体試料へ、エレクトロスプレーによって帯電液滴を衝突させて電荷を付与することによるイオン化の促進を試みた。図 2 に、本研究課題にて開発を行った、赤外線レーザー支援脱離エレクトロスプレーイオン化 ( laser-assisted desorption electrospray ionization; LADESI ) イオン源の概略を示す。上記と同じく、四重極-飛行時間型質量分析装置 ( Q-TOF Ultima API ) の ESI イオン源を改造し、赤外線レーザーを導光可能なイオン源を作製した。レーザー光源としても上記の赤外線波長可変レーザー ( IR Opolette 2731-HE ) を用い、波長を水の吸収

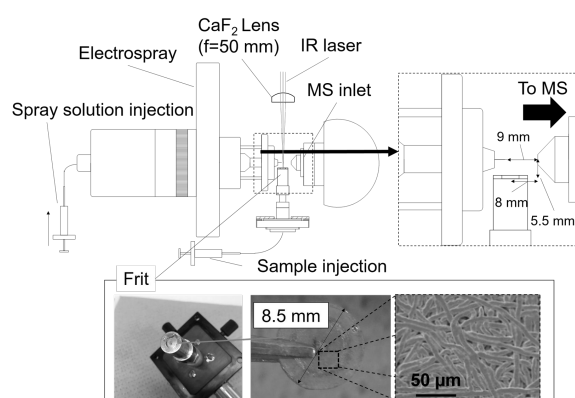


図 2. 赤外線レーザー支援脱離エレクトロスプレーイオン化イオン源の概略図。

ピークである 2.94  $\mu\text{m}$  として、パルス繰り返し周波数 20 Hz で使用した。レーザー光を 3 枚の金ミラーによって導光し、焦点距離 50 mm の  $\text{CaF}_2$  製平凸レンズを通して、スポットサイズが  $1.26 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  となるように集光した。また、レーザーのフルエンスが  $1.5 \sim 1.6 \text{ J/cm}^2$  となるようにエネルギーを調節し、フリットを通して連続的に滲出する溶液にレーザー光を照射した。イオン化した試料をサンプルコーンから質量分析装置内の真空部へ取り込んだ。図 2 に示すように、エレクトロスプレーのノズルとサンプルコーンとの距離を 9 mm、フリットとサンプルコーンとの距離を 8 mm、フリットとサンプルコーン中心軸との距離を 5.5 mm とした。また、エレクトロスプレーのノズルには 3.5 kV の電圧を印加し、フリットは接地した。メタノールと 0.1% ギ酸水溶液を体積比 1:1 で混合した溶液を流速 1  $\mu\text{L/min}$  で流して帯電液滴を噴霧した。サンプルコーンには 50 V の電圧を印加し、温度を 150°C とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大気圧赤外線レーザーイオン化によるオンライン LC/MS

図 3 に、10 種類のペプチドを含んだ試料溶液に対して大気圧赤外線レーザーイオン化によるオンライン LC/MS を行った際の total ion chromatogram (TIC) を示す。一般的に用いられている ESI を用いて同試料の測定を行った場合、移動相中のメタノールの比率が増加するに従って diisooctyl phthalate ( $m/z$  454) などの夾雑物由来の信号が増加してベースラインが上昇し、8、9、10 のピークを確認することができなかった。一方で、大気圧赤外線レーザーイオン化を用いた場合は、ベースラインの上昇が少なく、LC によって分離された全種類のペプチド由来のピークを確認することができた。

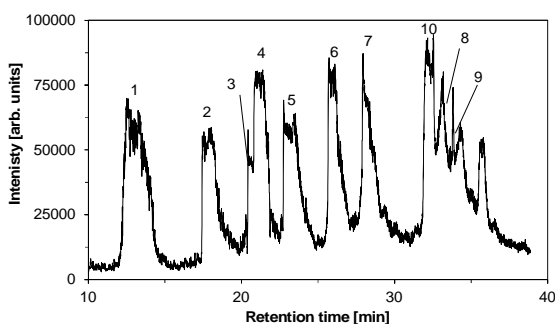


図 3. 大気圧赤外線レーザーイオン化を用いたオンライン LC/MS で得られた 10 種のペプチドを混合した試料の TIC。

##### (2) 減圧イオン源の開発

図 4 に、イオン源の圧力とペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン  $[\text{M}+\text{H}]^+$  の信号強度との関係を示す。イオン源の圧力を大気圧 (101 kPa) から、大気圧の約 70% である 71 kPa に低下させることで信号強度が約 1.8 倍に向上していることがわかる。これは、大気中の中性粒子とイオンとの衝突によるイオンの損失が減少したためと考えられる。しかし、圧力を 71 kPa よりも低くすると、再び信号強度が低下することがわかった。これは、イオン源と質量分析装置内の真空との圧力差が少なくなること、イオンを真空中へ吸引する力が低下したためと推測される。イオン源と質量分析装置内の真空との圧力差が無くても、電場を加えることなどでイオンを質量分析装置内へ導入することができれば、さらに信号強度を高められる可能性があると考えられる。

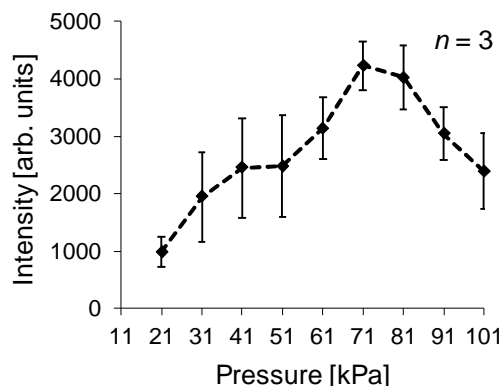
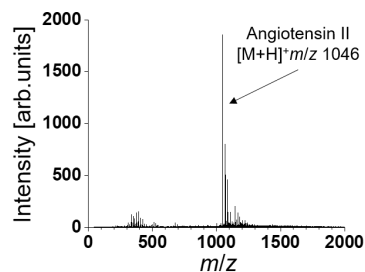


図 4. イオン源の圧力とペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン  $[\text{M}+\text{H}]^+$  の信号強度との関係。

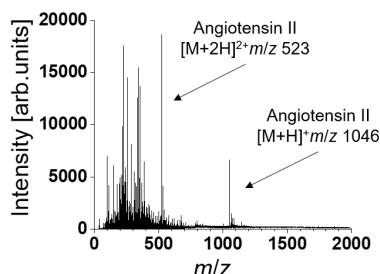
##### (3) レーザー支援脱離エレクトロスプレーイオン化法の開発

図 5 に、LADESI イオン源でエレクトロスプレーによる帯電液滴の噴霧を行わなかった場合、および行った場合に得られた質量スペクトルを示す。図 5(a) のとおり、帯電液滴を噴霧せず、赤外線レーザーのみを照射して得られた質量スペクトルでは angiotensin II にプロトンが 1 個付加したイオン  $[\text{M}+\text{H}]^+$  が主として検出され、その信号強度は 1,861 であった。一方、図 5(b) のとおり、赤外線レーザーによって脱離した試料に帯電液滴を噴霧して得られた質量スペクトルでは angiotensin II にプロトンが 2 個付加したイオン  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  が主として検出され、その信号強度は 18,630 であった。赤外線レーザーによって脱離された試料に帯電液滴を噴霧することで 1 分子あたりに付加されるプロトンの数が増加したと考えられる。また、図 5(a) における angiotensin II の  $[\text{M}+\text{H}]^+$  の信号強度と、図 5(b) における angiotensin II の  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  イオンの信号強度を比較したところ、約 10 倍に向上していたため、LADESI は赤外線レーザーイオン化の検出感度を向上させるのに有効な手法であると考えられる。

次に、膜タンパク質試料の調製で一般的に用いられている条件を模擬するため、界面活性剤などの添加物を混合した場合と、添加物を使用しなかった場合との比較を行った。ギ酸を 0.1% 含んだ水とメタノールとを体積比 1:1 で混合した溶媒で調製した濃度 10  $\text{pmol}/\mu\text{L}$  のタンパク質

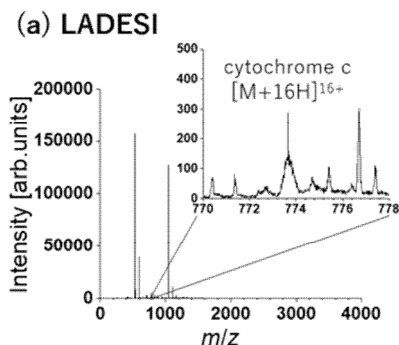


(a) Spray OFF



(b) Spray ON

図 5. LADESI イオン源で (a) 帯電液滴を噴霧せず、赤外線レーザーのみで得られた質量スペクトル、および (b) 赤外線レーザーによって脱離させた試料に帯電液滴を噴霧して得られた質量スペクトル。



(b) ESI

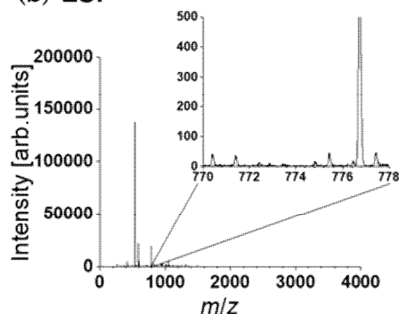


図 6. DDM を 2 mM、tris-HCl を 50 mM、および NaCl を 300 mM 含んだ溶媒中のタンパク質 (cytochrome c) を (a) LADESI、および (b) ESI で測定した際の質量スペクトル。

cytochrome c の溶液に、界面活性剤 n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM) を 2 mM、tris-HCl 緩衝液を 50 mM、NaCl を 300 mM 添加した試料溶液を調製し、フリットに 5  $\mu$ L/min で送液して 3 分間の信号強度を積算した。通常の ESI の場合にも、同試料を 5  $\mu$ L/min で送液し、3 分間の信号強度を積算した。図 6(a) に LADESI、図 6(b) に ESI で得られた質量スペクトルを示す。図 6(a) のとおり、LADESI では cytochrome c に 16 個のプロトンが付加した  $[M+16H]^{16+}$  が検出されていることがわかる。他にも、13~15 個の cytochrome c イオン  $[M+13H]^{13+} \sim [M+15H]^{15+}$  が検出された。一方、図 6(b) のとおり、ESI では cytochrome c のイオンが検出されなかった。したがって、LADESI では ESI と比較してタンパク質試料の調製時に用いられる添加物によるイオン化の抑制が起こりにくく、添加物を加えてもタンパク質のイオン信号強度が低下しにくいことが示された。この特徴は膜タンパク質のオンライン LC/MS を行う上で極めて有用である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

木村公一, 間久直, 粟津邦男: “迅速なタンパク質の質量分析に向けた赤外レーザーエレクトロスプレーイオン化法の開発,” 電気学会 光・量子デバイス研究会資料, OQD-18-005, pp. 21–26 (2018), 査読無.

Yasunari Iguchi, Hisanao Hazama, and Kunio Awazu: “Continuous flow reduced-pressure infrared laser desorption/ionization mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **31**(21), 1845–1850 (2017), 査読有.

DOI: 10.1002/rcm.7970

間久直, 岩出彩花, 粟津邦男: “波長 3 および 6  $\mu$ m 帯赤外レーザーによる大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化の比較,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **64**(6), 237–243 (2016), 査読有.

DOI: 10.5702/massspec.16-79

間久直, 粟津邦男: “赤外レーザーを用いた MALDI のマトリックス,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **64**(5), 183–186 (2016), 査読無.

DOI: 10.5702/massspec.S16-38

[学会発表] (計 9 件)

Koichi Kimura, Hisanao Hazama, and Kunio Awazu: “Comparison of continuous flow infrared desorption electrospray ionization and ESI in measurement of peptide solution containing detergent or buffer,” 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, TP016, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA (5 Jun. 2018).

木村公一, 間久直, 粟津邦男: “大気圧連続流赤外レーザーエレクトロスプレーイオン化法を用いた緩衝液または塩を含んだペプチド試料の測定および ESI 法との比較,” 日本質量分析

学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府吹田市 (2018 年 5 月 15 日).

木村公一, 間久直, 栗津邦男: “迅速なタンパク質の質量分析に向けた赤外レーザーエレクトロスプレーイオン化法の開発,” 電気学会 光・量子デバイス研究会 (バイオメディカルフォトリクス応用), 東北大学東京分室, 東京都千代田区 (2018 年 3 月 5 日).

Koichi Kimura, Hisanao Hazama, and Kunio Awazu: “Development of a continuous flow infrared MALDESI source for online LC/MS analysis of peptides and proteins,” 65th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, MP008, Indiana Convention Center, Indianapolis, IN, USA (5 Jun. 2017).

木村公一, 間久直, 栗津邦男: “ペプチドおよびタンパク質のオンライン LC/MS に向けた連続流赤外レーザーエレクトロスプレーイオン化技術の開発,” 第 65 回質量分析総合討論会, つくば国際会議場エポカルつくば, 茨城県つくば市 (2017 年 5 月 17 日).

Yasunari Iguchi, Hisanao Hazama, and Kunio Awazu: “Development of a reduced pressure infrared laser ionization source as a novel interface for online LC/MS,” 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, MP225, Henry B. González Convention Center, San Antonio, TX, USA (6 Jun. 2016).

Homare Hashiya, Yasunari Iguchi, Hisanao Hazama, and Kunio Awazu: “Sensitivity improvement of infrared laser atmospheric pressure ionization mass spectrometry by synchronizing a Q-TOF mass spectrometer and the laser pulse,” 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, MP225, Henry B. González Convention Center, San Antonio, TX, USA (6 Jun. 2016).

橋谷帆稀, 井口泰成, 間久直, 栗津邦男: “大気圧赤外レーザーイオン化法の検出感度向上に向けた, 四重極飛行時間型質量分析計とレーザーパルスの同期,” 第 64 回質量分析総合討論会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府吹田市 (2016 年 5 月 20 日).

井口泰成, 間久直, 栗津邦男: “膜タンパク質の LC/MS 感度向上に向けた赤外レーザーイオン源の圧力の検討,” 第 64 回質量分析総合討論会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府吹田市 (2016 年 5 月 20 日).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.see.eng.osaka-u.ac.jp/seemb/seemb/>

受賞

日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会 ベストプレゼンテーション賞優秀賞, 木村公一, 間久直, 栗津邦男: “大気圧連続流赤外レーザーエレクトロスプレーイオン化法を用いた緩衝液または塩を含んだペプチド試料の測定および ESI 法との比較,” (2018 年 5 月 18 日).

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名: 岩出 彩花

ローマ字氏名: (IWADE, Ayaka)

研究協力者氏名: 井口 泰成

ローマ字氏名: (IGUCHI, Yasunari)

研究協力者氏名: 橋谷 帆稀

ローマ字氏名: (HASHIYA, Homare)

研究協力者氏名: 木村 公一

ローマ字氏名: (KIMURA, Koichi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。