

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25年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20115008

研究課題名（和文）モデル小動物イメージングのための新しい遺伝子コード型プローブの開発

研究課題名（英文）Genetically encoded probes for imaging molecular processes in vivo

研究代表者

佐藤 守俊（SATO MORITOSHI）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00323501

研究成果の概要（和文）：蛍光イメージングは、もし細胞内や生体で生起する分子過程を可視化する蛍光プローブが開発されれば、その時空間動態を観察するための最も強力な技術となり得る。本研究では、活性酸素種や環状核酸等の細胞内分子過程を可視化する蛍光プローブを開発すると共に、細胞内シグナル伝達を光で自由自在に操作するための分子ツールを開発した。

研究成果の概要（英文）：Fluorescence imaging could be the most powerful technique available for observing spatial and temporal dynamics of molecular processes in living cells and living individuals, if fluorescent probes for the relevant cellular signaling processes become available. In the present research project, we have developed genetically encoded fluorescent indicators for cellular signaling processes, such as reactive oxygen species and cyclic nucleotides, and also developed molecular tool to manipulate cellular signaling processes with light.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2009年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2011年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2012年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
総計	69,200,000	20,760,000	89,960,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞の中の生体分子の挙動を可視化する分子イメージング研究においては、興味ある生体分子もしくは生体イオンを捕まえて光を発生する、いわゆるプローブ（probe）と呼ばれる機能性分子の開発が必須である。我々は現在までに、生体脂質や生体小分子、タンパク質リン酸化など生命機能と疾患の理解に重要な細胞内の分子過程を可視化する蛍光プローブを数多く開発し、それらが生きた細

胞内の分子イメージングにおいて強力なツールとなることを実証してきた。さらに、開発した蛍光プローブを駆使して、既存の研究手法では知り得なかった生きた細胞内の分子過程の時空間動態を次々と明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本領域研究で対象とするモデル小動物においても、様々な分子過程のイメージングが

強く求められている。我々は特に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく二波長測光型の蛍光プローブを数多く設計・開発し、上述のように細胞内の分子過程のイメージングを実現してきた。本研究では、新しい FRET 型蛍光プローブを開発すると共に、これとは異なったタイプの蛍光プローブの開発にも挑戦した。特定の一種類のイオンもしくは生体分子のイメージングに加えて、複数種のイオン・分子過程の同時イメージングに関するニーズが、特にモデル小動物の行動遺伝学研究において急増しているが、これを実現するためには、遺伝子コード型でありかつ単色の蛍光プローブが必要である。しかし、実際に現在モデル小動物での *in vivo* イメージングに用いられている遺伝子コード型単色蛍光プローブは Ca^{2+} 蛍光プローブのみに留まっている。動物行動システムの理解において鍵となる様々な分子過程の単色蛍光プローブの開発が、モデル小動物に基づく分子行動学研究に強く求められる技術課題の一つであると考え、環状核酸の単色蛍光プローブを開発することを目標に研究を行った。

本研究で挑戦する二つ目の課題は、マウスなどの透明でないモデル動物の生体深部におけるイメージングを実現する遺伝子コード型プローブの開発である。生物発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) は、自家蛍光など、蛍光タンパク質が抱える問題に無縁であるため、生体での理想的なレポーターとして注目されるようになって久しい。ルシフェラーゼを活用してカルシウムイオンやタンパク質間相互作用等のイメージングを目指す生物発光プローブも報告されようになってきた。しかし、蛍光タンパク質や蛍光プローブに比べると、ルシフェラーゼや生物発光プローブの利用は依然として限定的である。その原因はいくつか考えられるが、やはり既存のルシフェラーゼの輝度が非常に低いことが第一に挙げられるであろう。この輝度に関する問題が生物発光イメージングの発展のボトルネックになっていることは否めない。日進月歩の勢いの蛍光タンパク質の改良研究に比べると、ルシフェラーゼのそれは散発的であり、蛍光タンパク質に大きく遅れを取っていると言わざるを得ないからである。我々は輝度など、ルシフェラーゼが抱えるいくつかの問題については改良の余地が大きいと考えている。本研究ではルシフェラーゼにアミノ酸変異を導入し、極めて輝度の高い変異体を開発することに目標に研究を行った。

システム分子行動学研究に資する三つ目の技術課題は、モデル小動物の特定細胞において、特定のタンパク質の機能を自由自在に光操作する技術の開発であると我々は考えている。種々のケージド化合物の成功や、神

経伝達を光制御するチャンネルロドプシンのインパクトなどを考えると、様々な酵素等のタンパク質の光操作技術の開発は、モデル小動物のシステム分子行動学研究はもとより、細胞・組織レベルでの基礎研究やマウスなどモデル哺乳類動物での研究においても極めて強力なツールを提供すると確信する。本研究では特に、様々なタンパク質の機能の光操作を実現する極めて一般性の高い技術 (光スイッチタンパク質) を開発し、これを用いて、脂質リン酸化酵素、タンパク質リン酸化酵素、低分子量 GTP 結合タンパク質、三量体 G タンパク質等の生体分子を光照射で自由自在に操作する遺伝子コード型分子プローブを創製した。

3. 研究の方法

1) 細胞内の分子過程を可視化する新しい蛍光プローブの開発。

本研究では、特に細胞のストレス応答の理解に重要なタンパク質リン酸化酵素 (JNK) の活性化を可視化する FRET 型蛍光プローブ、細胞遊走等の様々な細胞機能の理解に重要な活性酸素種の一つである過酸化水素を可視化する FRET 型蛍光プローブ、及び脳神経機能の理解に重要な環状核酸の一つである環状グアノシンーリン酸 (cGMP) を可視化する単色蛍光プローブを開発する。特に、cGMP の単色蛍光プローブについては、ホスホジエステラーゼ (PDE5) の cGMP の分子認識に関わるドメインを、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の 144 番目のアミノ酸と 145 番目のアミノ酸の間に挿入して、当該環状核酸の単色蛍光プローブを開発する。

2) 高輝度生物発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) の開発。

ルシフェラーゼと言えばホタルやウミシイタケ由来のルシフェラーゼが有名である。ホタルやウミシイタケ以外にも様々な生物がルシフェラーゼを有することが知られている。中でもガウシアと呼ばれる体長 10 ミリ程度の小さな海洋性甲殻類が有するルシフェラーゼは、ホタルルシフェラーゼの数百倍という、市販のルシフェラーゼの中では最も高い輝度を有している。ガウシアルシフェラーゼはセレンテラジン (基質) を酸化する酵素である。この酵素反応で生成した励起分子が緩和する過程で生物発光が発生する。我々は、上述の酵素反応が起こる活性中心近傍に集中的にアミノ酸変異を導入し、発光強度を指標として変異体をスクリーニングすることにより、高輝度変異体を開発する。

3) 生体分子の光操作を実現する技術の分子

プローブの開発.

細胞内で生起する分子過程の光操作を実現する分子プローブの設計のためには、光刺激で結合・解離をコントロールできる光スイッチタンパク質の開発が必須である。我々はこの目的のために、光受容に関わる様々な生物が有する光受容体タンパク質の特性を探索することから研究を開始する。必要に応じて、この光受容体にアミノ酸変異を加えてその機能を大幅に向上させ、高性能かつ一般性の高い光スイッチタンパク質を開発する。この光スイッチタンパク質を部品として用いて、様々な生体分子をそれぞれ光操作するための遺伝子コード型分子プローブを設計し、そのキャラクターゼーションを行う。

4. 研究成果

あ) タンパク質リン酸化を可視化する FRET 型蛍光プローブ

細胞のストレス応答を制御するセリン・スレオニンキナーゼ (JNK) の活性を可視化する蛍光プローブ “JuCKY (ジャッキー)” を遺伝子工学的手法を用いて開発した。JuCKY は蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を原理とする蛍光プローブである。JuCKY が ERK や p38 など、基質選択性が非常に酷似している関連のセリン・スレオニンキナーゼには全く蛍光応答をしめさず、JNK の活性化に対してのみシャープな蛍光応答を与えることを示した。このように高いキナーゼ選択性を有する JuCKY に核局在化配列 (nuclear localization sequence) を連結するとプローブが核内局在化し、核内における JNK の動態を可視化できることを示した。一方、核外輸送シグナル配列 (nuclear export signal sequence) を連結した JuCKY は細胞質に局在し、これを用いて細胞質における JNK の活性を可視化できることを示した。

い) 過酸化水素を可視化する FRET 型蛍光プローブの開発

過酸化水素 (H_2O_2) は様々な細胞機能の調節に関与していることが近年次々と明らかにされ、新しい細胞内シグナル伝達物質としても注目されつつある。 H_2O_2 が細胞中でどのように機能しているのか、その細胞内動態を明らかにすることは、 H_2O_2 による生命機能の制御と活性酸素種に起因する数々の疾患を理解する上で鍵となる重要な課題である。本研究では、生理的低濃度の H_2O_2 を高感度かつ特異的、可逆的に可視化する新しい遺伝子コード型蛍光プローブを設計・開発した。プローブの選択性を *in vitro* で検討したところ、 NO 、 $ONOO^-$ 、 OCI^- 、 O_2^- 等の活性酸素種には応答せず、 H_2O_2 特異的に蛍光シグナルを与え

ることを示した。また、 $0.5 \mu M$ から $100 \mu M$ までの H_2O_2 を定量的に検出する極めて感度の良い蛍光プローブであることを示した。この蛍光プローブが応答可逆性を有する蛍光プローブであることも示した。我々は細胞が運動を始める際の初期過程において H_2O_2 が極めて重要な役割を果たしていることを薬理学的手法で明らかにしていたが、細胞のどこで H_2O_2 が生成しているのかは全く不明であった。この問題を明らかにするために、上述の蛍光プローブを遺伝子工学的手法で細胞膜に局在化させた。この局在型の蛍光プローブを用いて血管内皮細胞を観察したところ、 H_2O_2 は細胞膜上で一様に生成するのではなく、膜状仮足 (ラメリポディア) と呼ばれる特定の膜構造内に限局して生成し、細胞運動を制御していることが明らかになった。

う) 環状核酸を可視化する単色蛍光メモリープローブの開発

環状グアノシンーリン酸 (cGMP) は、線虫のような神経細胞を 302 個しか持たない下等生物から、ヒトのような 140 億個以上の神経細胞を有する高等生物において、記憶形成や学習行動をはじめとする様々な神経機能を制御する因子として知られている。cGMP の動態を可視化するために FRET 型の蛍光プローブが開発されているが、これは、細胞内 cGMP の濃度変化に忠実に応答して蛍光シグナルが増減するため、興味ある生物個体を顕微鏡下に束縛・固定した上で、蛍光シグナルをモニターし続けなくてはならない。本研究で開発した蛍光プローブは、細胞内の cGMP 濃度の上昇に応答して蛍光強度が増加する点は既存の蛍光プローブと共通しているが、その後細胞内の cGMP 濃度が低下してもその蛍光強度は減少しないという性質を持つ点が大きく異なる。我々はまず、GFP とホスホジエステラーゼ (PDE5) の cGMP 認識に関わるドメインを用いてプローブを開発し、これが過去におこった環状核酸の濃度上昇を記憶するメモリーとしての機能を有することを明らかにした (図 1)。さらに、当該プローブにアミノ酸変異を導入し、その輝

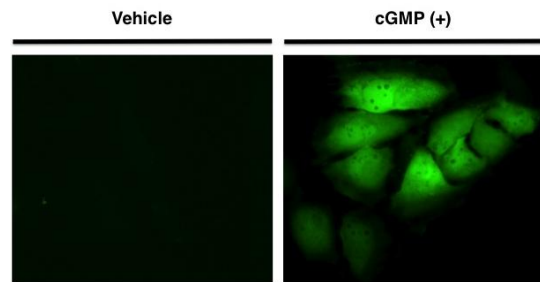


図 1 環状核酸 (cGMP) の単色メモリープローブ。細胞内 cGMP が生成していない時には無蛍光であるが (左図)、細胞内に cGMP が生成すると強い蛍光を発するようになる (右図)。一旦蛍光を発するようになると、cGMP 濃度が減少に転じてても、蛍光強度はそのまま維持される。このように本プローブは記憶型 (メモリー型の) の性質を有している。

度を大幅に向上させた。当該蛍光プローブを導入したトランスジェニック線虫を作製し、当該プローブが線虫の神経細胞における環状核酸の生成をイメージングできることを示した。さらに、メモリーとしての機能を有する当該プローブは、固定・保存処理を施した線虫の標本において、少なくとも数週間以上にわたって、線虫の神経細胞で生じた環状核酸の生成に関する情報を保持することを示した。

本プローブは、興味ある生物個体を、束縛なく自由に行動できる環境下で記憶・学習させた後に、どの神経細胞で cGMP 濃度上昇が起きていたのかを精査することができる。さらに、本プローブは、これまでは観測できなかったほどの微弱なシグナルでも、蓄積させることによって検出できるため、cGMP の高感度 *in vivo* イメージングを可能にする。

え) 高輝度生物発光プローブの開発

我々は、ガウシアルシフェラーゼの活性中心近傍に集中的にアミノ酸変異を導入し、発光強度を指標として変異体をスクリーニングすることにより、高輝度変異体を単離した。ちなみに、ガウシアルシフェラーゼは極めて結晶化が困難なタンパク質であり、その構造は明らかになっていない。我々も当該ルシフェラーゼの生物発光特性を合理的に改変するために結晶化を試みているが成功には至っていない。従って、様々な手法でガウシアルシフェラーゼの活性中心を推定し、その近傍のアミノ酸を狙って変異を導入した。このように取得した変異体のうち最も明るいものは、オリジナルのルシフェラーゼに比べて約 10 倍程度高輝度化していた(図 2, 上図)。ちなみに高輝度化の主要な原因は酵素反応のターンオーバー速度の大幅な向上であることも明らかになった。生体深部でのイメー

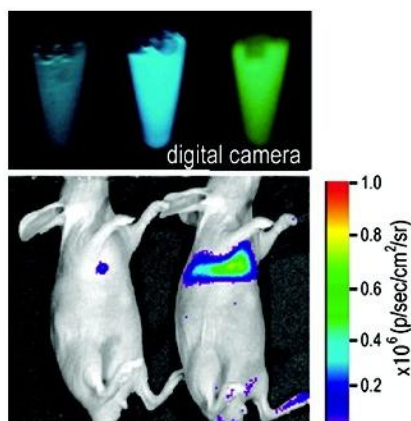


図 2 生物発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) の高輝度化・長波長化。(上図) オリジナルのルシフェラーゼ (左), 高輝度変異体 (中央), 長波長化変異体 (右)。(下図) ルシフェラーゼを用いてガン細胞の肺への転移をイメージング。オリジナルのルシフェラーゼ (左) と高輝度変異体 (右),

ジグにおいて高輝度変異体の有効性を評価するために、悪性黒色腫由来の細胞に高輝度変異体を発現させ、この細胞をマウスの尾静脈に注射して肺への転移を観察した (図 2, 下図)。高輝度変異体では肺全体に悪性黒色腫細胞が転移している様子が観察できた。一方、オリジナルのガウシアルシフェラーゼを用いて同様のイメージングを行ったところ、転移細胞の密度が高い部位のみから生物発光シグナルが観察され、高輝度変異体のように少数の細胞の挙動を可視化することは困難であった (図 2, 上図)。

我々が開発したルシフェラーゼの高輝度変異体は、線虫やショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ等の透明性の高いモデル小動物はもちろんのこと、特にマウス等の透明でない生体サンプルでのイメージングにおいて極めて強力なツールを提供する。その応用範囲としては、生体での少数の癌細胞や幹細胞等の挙動を高感度に追跡する細胞トラッキング、遺伝子発現を高感度に可視化するレポーター、カルシウムイオンやタンパク質間相互作用等の高感度イメージングを実現する生物発光プローブ等が考えられる。また、生物発光タンパク質や生物発光プローブが励起光を必要としないことを考えると、チャンネルロドプシンやハロロドプシンを用いるオプトジェネティクス技術との相性が非常に良いと考えられる。

お) 生体分子の光操作技術の開発

我々はライフサイエンス分野における光技術の将来は必ずしも可視化計測のみに限定されるものでなく、タンパク質の機能や細胞機能を自由自在に“コントロール”するための技術として、光を利用したいと考えている。例えば、細胞膜上の各種受容体や細胞内シグナル伝達を担う様々なタンパク質 (酵素) の活性をそれぞれ光で自由自在にコントロールできるようになれば、当該タンパク質が果たす役割を、薬理学的手法や RNA 干渉等の既存の研究手法では得ることができない高い時間・空間分解能で、明らかにできるのではなかろうか。遺伝子発現に関連した転写、エピジェネティクス等の染色体上で生起する分子過程を光でコントロールできるようになれば、それぞれの遺伝子の機能を解明する技術として極めて有用なのではなかろうか。さらには、生体の中で細胞遊走、細胞死、細胞分化、細胞増殖、分泌等の細胞機能を自由自在に光でコントロールできるようになれば、当該細胞機能の理解とその応用において極めて有効なのではなかろうか。このような光操作技術の開発は、細胞機能の構成的な理解と制御を目指す新しい生命科学の開拓に繋がるであろう。

我々は上述のような光操作技術を実現す

る目的で、植物等が有する様々な光受容体 (photoreceptor) をスクリーニングし、当該タンパク質が光照射に応答して示す機能の探索研究を遂行した。特に、光照射依存的に相互作用を生起する光受容体を解析する実験系を構築し、これを用いて、様々な光受容体をスクリーニングすることにより、非常に興味深い光受容体を見つけ出すことに成功した。その一つは、光照射依存的に可逆的に多量体 (up to 10^6 molecules) を形成する光受容体である。この光受容体をタグとして用いれば、任意のタンパク質やドメインの離合集散を光で自由自在に時空間制御できると考えられる。もう一つ、光照射依存的に二量体を形成する光受容体も見出すことが出来た。我々は、特に光刺激依存的に二量体を形成する光受容体に着目し、これにアミノ酸変異を加えてその機能を大幅に向上させた。具体的には、二量体の相互作用面にアミノ酸変異を導入することにより、親和性を向上させたり、補因子結合部位にアミノ酸変異を加えることにより二量体化のキネティクスを大幅に

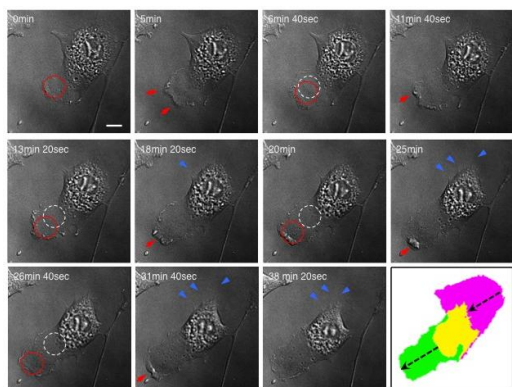


図3 生体脂質 (ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸) の産生を光操作する分子プローブ。光を照射したところ (赤丸印) に当該脂質が産生し、それと共に細胞膜にラメリポディアが形成される。引かし照射の場所を右下に移動させることにより、細胞をその方向に移動させる、つまり細胞の光ナビゲーションが実現できた。

向上させることができた。

このように天然の光受容体にアミノ酸変異を加えることにより開発した光スイッチタンパク質を用いて、細胞遊走やアポトーシス、糖代謝等の細胞機能を制御する生体脂質 (ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸) の産生酵素 (ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ; PI3K) を光で活性化させ当該脂質を細胞膜の狙った場所に瞬時に出現させる分子プローブを開発した。この分子プローブは、極めて静的な状態にある細胞膜に局部的に大量の当該脂質を産生させ、そこにラメリポディアやメンブレンラフリングを自由自在に生起させることが出来ると共に、細胞を光で自由自在に移動させる、つまり細

胞ナビゲーションも可能にすることも示した (図3)。この脂質産生酵素のみならず、低分子量 GTP 結合タンパク質やタンパク質リン酸化酵素の光操作にも当該光スイッチタンパク質を利用できることを示した。

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) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2008). Circularly permuted bioluminescent probes for illuminating ligand-activated protein dynamics. *Bioconjugate Chem.*, *19*, 2480–2486. 査読有
- 2) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2009). A split Gaussia luciferase-based bioluminescence template for tracing protein dynamics in living cells. *Anal. Chem.*, *81*, 67–74. 査読有
- 3) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2009). Genetically encoded bioluminescent indicators for stress hormones” *Anal. Chem.*, *81*, 3760–3768. 査読有
- 4) Kim, S.B., Sato, M., and Tao, H. (2009). Molecular tension-indexed bioluminescent probes for determining protein—protein interactions. *Bioconjugate Chem.*, *20*, 2324–2330. 査読有
- 5) Suzuki, H., and Sato, M. (2010). Genetically encoded fluorescent indicators to visualize protein phosphorylation by c-Jun NH₂-Terminal Kinase (JNK) in living cells. *Supramol. Chem.*, *22*, 434–439. 査読有
- 6) Jang, K., Sato, K., Tanaka, Y., Yan, X., Sato, M., Nakajima, T., Mawatari, K., Konno, T., Ishihara K., and Kitamori, T. (2010). An efficient surface modification using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine to control cell attachment via photochemical reaction in a microchannel. *Lab Chip*, *10*, 1937–1945. 査読有
- 7) Kano, F., Arai, T., Matsuto, M., Hayashi, H., Sato, M. and Murata, M. (2011). Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinositol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, *1813*, 784–801. 査読有
- 8) Oya, M., Suzuki, H., Watanabe, Y., Sato, M., and Tsuboi, T. (2011). Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells. *Genes Cells*, *16*, 608–616. 査読有

- 9) Kim, S.B., Suzuki, H., Sato, M., and Tao, H. (2011). Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays. *Anal. Chem.*, *83*, 8732–8740. 査読有
- 10) Lin, Y.C., Nihongaki, Y., Lin, T. Y., Razavi, S., Sato, M., and Inoue, T. Rapidly reversible manipulation of molecular activities using dual chemical dimerizers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 発表予定, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 佐藤守俊, 細胞内で生起する分子過程の可視化計測法, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008「バイオイメージングのためのバイオマテリアル」, 2008年11月18日, 東京
- 2) 佐藤守俊, 細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ, 日本分析化学会第58年会化学センサー懇談会, 2009年9月24日, 北海道
- 3) 佐藤守俊, 分子イメージング細胞の中の分子を見るナノテクノロジー, 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻談話会「応用化学の新しい潮流」, 2009年10月3日, 東京
- 4) 佐藤守俊, 細胞内のシグナル伝達を可視化する分子プローブ, 日本薬学会第130年会シンポジウム「薬学における生命志向型化学(分子設計を基盤とした生命現象解明)」, 2010年3月29日, 岡山
- 5) 佐藤守俊, “分子イメージング” 細胞内の分子を見るナノテクノロジー, 第24回学際融合ビジュアルライゼーションシンポジウム, 2011年1月11日, 東京
- 6) 佐藤守俊, 細胞内シグナル伝達を可視化する分子プローブ, 日本化学会第24回関東支部大会, 2011年8月31日, 東京
- 7) 佐藤守俊, 細胞内シグナル伝達を可視化する分子プローブ, 第24回植物脂質シンポジウム, 2011年9月19日, 東京
- 8) 佐藤守俊, 細胞内の分子を見るナノテクノロジー, 第60回高分子討論会, 2011年9月29日, 岡山
- 9) 佐藤守俊, 生体分子を可視化する技術・操作する技術, 光操作研究会, 2011年9月30日, 愛知
- 10) 佐藤守俊, 細胞内シグナル伝達を可視化する技術・操作する技術, 日本膜学会第34年会, 2012年5月9日, 東京
- 11) 佐藤守俊, 生体分子を可視化する技術・操作する技術, 京都大学化学研究所生体分子情報研究領域セミナー, 2012年6月21日, 京都
- 12) Moritoshi Sato, Methods to visualize molecular processes in living cells, JASIS, 2012年9月7日, 千葉
- 13) 佐藤守俊, 細胞内の分子過程を探索す

る遺伝子コード型の分子プローブ, 日本化学会第61年会, 2012年9月19日, 金沢

- 14) 佐藤守俊, 生命現象を見る技術・操作する技術, フロンティアシンポジウム, 2012年11月16日, 東京

[その他]

ホームページ等

<http://satolab.c.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 守俊 (SATO MORITOSHI)
東京大学大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：00323501

(2)研究分担者

特記事項なし

(3)連携研究者

特記事項なし