

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2008

課題番号：17066002

研究課題名（和文） ライフサーベイヤをめざしたデジタル精密計測技術の開発

研究課題名（英文） The development of accurate quantitative and digital tools for Lifesurveyor

研究代表者

神原 秀記 (KAMBARA HIDEKI)

東京農工大学・大学院工学府・講師

研究者番号：20397011

研究成果の概要：分子レベルで生命や細胞機能を正確に理解するには、生命の基本単位である個々の細胞に含まれるすべての分子種とその動態を精密に定量解析すると共に、細胞間の相互作用をモニターして生命活動を統合的に把握する必要がある。本研究では、組織や血液を構成する細胞群の中から標的細胞を1つ選出し、そこに含まれている全てあるいは主要な mRNA を抽出し、精密に定量分析する技術の開発を目的とした。その要素技術として、組織や血液の中から標的細胞を1個ずつ選出し取り出す技術、その中に含まれる全ての mRNA を効率よく抽出し cDNA に変換する技術、個々の cDNA を増幅しビーズに捕獲する技術、ビーズ上に捕捉された遺伝子の配列を一括して決定するシークエンスシステム、膨大な配列を繋ぎ合わせ定量的に表示可能な情報解析システム、さらに得られた解析データを検証するための非侵襲的細胞内 mRNA 検出技術を開発し、1細胞内の発現変動のモニタリングを可能とする統合的システムの実現のための基盤を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	61,900,000	0	61,900,000
2006年度	66,200,000	0	66,200,000
2007年度	82,800,000	0	82,800,000
2008年度	90,000,000	0	90,000,000
総計	300,900,000	0	300,900,000

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： ライフサーベイヤ、1細胞解析、デジタル精密計測、パイロシークエンス、磁気ビーズ、RNA 回収、RNA 検出、バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析が完了し、大量の分子化学データを生命活動の解明と医療などへ応用することが大きな課題となりつつあった。しかし、これまでに得られている分子科学的なデータ、特に遺伝子発現プロファイルなどの生命活動に密接に関連した、多くの細胞の時間的空間的な平均値として得られたものであり、実際の生命活動を必ずしも反映しないことが指摘され始めていた。これら課題を克服するには1つの細胞を用いて遺伝子の発現

やタンパク質の組成分析などを行う必要があるが、研究開発当初は世の中に1細胞を対象とした良い定量分析技術が無く、1細胞内の mRNA などの精密定量分析は困難であった。一方、米国ではゲノム解析に続いて細胞レベルでの解析機運が高まりつつあり、細胞アレイを用いた医薬品のスクリーニングや関連技術の開発に NIH (米国国立衛生研究所) が膨大な研究投資を始めるなどの状況であった。これに伴い、1細胞に含まれる物質の分析に興味を持たれ始め、Analytical

Chemistry 誌に " Single-Cell Scene " などの特集が組まれていた。

このような背景下で 1 細胞分析に必要なツールの開発を目指して、本特定領域研究をタイムリーにスタートした。本計画研究では、1 細胞を対象として mRNA を効率よく抽出し、cDNA ライブラリーを作製すると共に、それらを精密に定量分析する技術及び細胞内にプローブを導入してモニターする技術の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、組織や血液の中から標的細胞を選出し取り出す技術、標的とする 1 細胞に含まれる全てあるいは主要な mRNA を効率よく抽出し cDNA に変換する技術、個々の cDNA を 1 コピーから並列して増幅してそれぞれをビーズに捕獲する技術、ビーズ上に捕捉された DNA コピーの配列を一括して決定するシステム、膨大な配列を繋ぎ合わせ定量的に表示可能な情報解析システムの構築を目的とした。さらに、得られた解析データを検証するため、非侵襲的な細胞内 mRNA 検出技術の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 1 細胞集積デバイスの開発 (竹山)

レーザー加工によってプラスチック基板上に 100×100 のアレイ状の微細貫通孔を作製した。このアレイ上にマイクロ流路と配し、1 細胞集積デバイスを構築した。本デバイスは各微細孔下方から陰圧を付加することで、物理的に細胞をトラップするものであり、細胞への侵襲性の少ない細胞捕捉法を採用した。細胞捕捉効率の検討を行い、ヒト末梢血単核球の約 0.1% に当たる造血幹細胞 (CD34⁺細胞) の検出に利用した。

(2) 1 細胞からの mRNA 回収マイクロプローブの開発 (珠玖、神原)

1 細胞操作-特に走査型プローブ顕微鏡を基盤とするマニピュレーション-物質輸送制御-細胞応答の追跡システムを展開し、ガラスキャピラリーや微小電極、マイクロ流体プローブを組合せ、接着細胞、細胞塊を含む様々な系で、1 細胞または極少数の細胞サンプルからの mRNA 定量を検討した。

(3) 1 分子 PCR 法の開発 (竹山、神原)

表面吸着を除去 (ブロッキング) 処理したチャンパーアレイ (3.6×10^5 孔、容量 490 μ l) に、1 copy/well のテンプレート DNA 分子を導入し、それぞれの DNA を個別増幅する技術を開発した。また、ビオチン化した DNA 断片と充分量のストレプトアビジン固定化ビーズを混合し、1 DNA 断片 / 1 ビーズ以下となるように試料を調製し、チャンパーに導入することで、効率よい DNA 1 コピー増幅を実現した。

(4) PCR 増幅産物の配列解析用ビーズ上への高効率搬送技術の開発 (竹山、神原)

個別並列増幅した PCR 産物を配列解析に用いる担体ビーズに効率よく搬送する必要がある。そこで、ハイドロゲルを含有する PCR 反応液を調製し、ビオチン化オリゴヌクレオチドを用いてチャンパーアレイ中でまず PCR を行った。次いでチャンパー内に 1 個のビーズをそれぞれ導入する必要があるが、反応液の冷却・固化によってチャンパー上に形成された凹みにアビジン固定化ジルコニアビーズ (22μ m) を導入することで、1 粒子 / 孔のビーズアレイを構築した。これを加温することでゲルを溶解させ、ビオチン - アビジン反応を介して、ビーズ上に PCR 産物を集積した。

(5) 酵素固定化磁気微粒子を用いたパイロシーケンス法の開発 (竹山、神原、小島)

大腸菌形質転換体より、ビオチン化 pyruvate phosphate dikinase (PPDK) 及び luciferase の生産を行い、各酵素の精製を行った。精製したビオチン化酵素を各タンパク量比 (PPDK:luciferase=5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴) でストレプトアビジン被覆した磁気微粒子に導入し、PPDK と luciferase を固定化した磁性粒子を作製した。同粒子を用いてピロリン酸検出を行った。また、連続使用における酵素耐久性を検討した。また、luciferase の改良を検討した。

(6) パイロシーケンシング法における読み取りエラー発生シミュレータの開発 (秋山、神原)

パイロシーケンスから得られる大量の配列断片データ処理・解析法の構築に向けて、下記 3 つの分野をカバーする 6 項目の研究開発を実施した。

- ・配列読み取りを支援する情報技術
 - (a)パイロシーケンシング法シミュレータ
 - (b)読み取り誤差を訂正するシステム
- ・配列断片のゲノム貼り付けの情報技術
 - (c)動的計画法による高速な精密貼り付け
 - (d)近似法との併用による超高速貼り付け
- ・既存情報との比較を行う情報解析技術
 - (e)既存ソフトの活用による情報解析
 - (f)情報解析プラットフォームの新規構築

(7) 光シグナルタンパク質を利用した非侵襲的細胞内 mRNA 検出法の開発 (小島)

研究項目 1 ~ 7 において開発される mRNA のデジタル精密計測技術に加えて、非破壊かつ非侵襲的な mRNA 検出技術の開発を行った。特に、細胞内で産生される生体材料を用いる手法として、FRET タンパク質プローブを用いた mRNA 検出技術の開発を行った。

4. 研究成果

(1) 単一細胞捕捉デバイスの開発 (竹山) デバイスに細胞懸濁液を導入後、1 分間の吸引操作を行うことで、導入した全細胞の約

90%を捕捉し、微細孔上に規則的に配列することが可能であった。また、非接着性の細胞、例えば血液細胞なども規則的に基板上に捕捉し保持することが可能であり、単一細胞を高密度に集積化することによって、撮像・解析の迅速化・簡易化が実現できた。本細胞捕捉技術の応用として、細胞捕捉後にマイクロ流路内の液交換を連続的に行い、捕捉細胞に対して fluorescence in situ hybridization を行う手法を開発した。本手法により、血清供給条件と血清飢餓条件で培養した細胞における β -actin mRNA 発現量の変動を単一細胞レベルで明らかにした。さらに、本デバイスの高い細胞捕捉効率を利用することで、ヒト末梢血単核球を微細孔アレイ上に網羅的に捕捉し、蛍光イメージングにより個々の細胞の免疫表現型を解析し、ヒト末梢血単核球の約 0.1%に当たる造血幹細胞(CD34⁺細胞)の検出を実現した。以上のように、数万レベルの細胞を捕捉できる細胞マイクロアレイを実現しており、本技術は非侵襲な単一細胞解析の実現を支える基盤技術の一つになる。

(2) 単一細胞からの mRNA 回収マイクロプロブの開発(珠玖, 神原)

1細胞由来の mRNA 定量解析を可能とするプロブとして、ガラスキャピラリープロブ、リング電極プロブ、流体プロブを開発した。微小リング電極プロブにより、顕微鏡観察下狙った1細胞を電場破碎し、ほぼ100%の効率で mRNA を回収、定量解析することに成功した。目的遺伝子(β 1-integrin)の相対発現量の違いから、細胞株の違い(例えば乳癌細胞 MCF-7 と乳腺細胞 HMT-3522 T4-2)が1細胞レベルで判別可能であることが分かった。また、プロブ

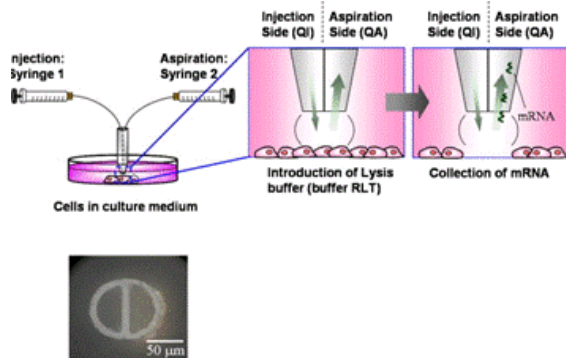


図1 形状のデュアルキャピラリーを用いた細胞からの mRNA 抽出

先端に、局所的層流を誘起して細胞破碎液を作用し、単層培養系から1細胞を回収した(図1)。リング電極探針によりマウス胚の内部細胞塊と栄養外胚葉から細胞を採取し、マーカー遺伝子により未分化状態を評価可能であることを確認した。ハウスキーピング遺伝子に着目し、キャピラリーおよびリング電極探

針により1細胞 mRNA 定量を実施した結果、10コピー/cell 程度の低発現遺伝子を検出できた。ITO 電極上に損傷回復モデルを作製し、傷修復領域の遺伝子発現が多細胞系と異なることを示唆する結果を得た。

(3) 1分子 PCR 法の開発(神原, 竹山)

490 pL の孔内で1 DNA 断片を PCR 増幅する技術における増幅率は 4.1×10^7 であり、一般的なチューブ PCR とほぼ同程度の増幅率を確認した。また、cDNA ライブラリーは磁気ビーズ上に作製することが多い。そこで、ストレプトアビジン固定化ダイナビーズ(2.8 μ m)に1 DNA 断片以下/1粒子になるように調製したビーズを PCR テンプレートに用いた場合には増幅率は若干低下したものの、増幅率 2.8×10^7 を確認した。この量はパイロシーケンシングによる配列決定を行う上で十分な量である。

(4) PCR 増幅産物の配列解析用ビーズ上への高効率搬送技術の開発(神原, 竹山)

PCR あるいは cDNA 作製に用いるビーズは直径が小さく、表面積が小さいことから配列解析に要求される充分量の DNA を保持できない。そこで、更に大きなビーズの表面に PCR 産物を搬送する技術が必要となる。計測用に用いるジルコニアビーズを1粒子/1PCRチャンバーの割合で導入することができれば都合が良い。

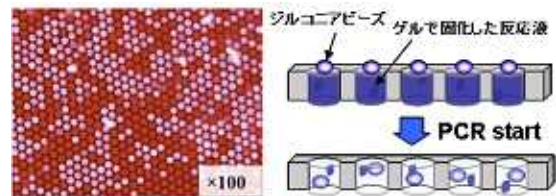


図2 左図: アガロース(赤)上の凹みにトラップされたジルコニアビーズ(白)、右図: 本系を用いた PCR の模式図

そこで、通常では複数のビーズが入ってしまう反応セルをハイドロゲルで満たし、固化後に生じる凹みを利用して1個ずつビーズをチャンバー内に配置する技術を開発した。また、アガロース融解・固化・ビーズの重層を繰り返すことで、異種ビーズを1粒子ずつ孔に落とすことが可能であり、これは種々の応用にも使える技術である(図2)。チャンバー内で再度 PCR を行い、アビジン標識ジルコニアビーズ上に 1×10^7 分子の PCR 産物を保持することができた。これを用いてパイロシーケンシングを行い、配列解析に十分な発光量を確認した。すなわち、1分子 DNA からパイロシーケンシングを行うプロトコルを確立した。

(5) 酵素固定化磁気微粒子を用いたパイロシーケンシング法の開発(竹山, 神原, 小島)

パイロシーケンシングではテンプレート DNA に加えて酵素類もビーズに固定して反応セル内に保持する必要がある。これらに用いる酵素としてビオチン化 PPKD 及び luciferase を新たに作製した。その酵素活性を測定した結果、それぞれ 508.9、2.2 mU/mg で、パイロシーケンシングに十分な活性を持っていた。ストレプトアビジン被覆の磁気微粒子にビオチン - アビジン反応を介して固定 PPKD および luciferase を固定して発光反応の評価を行った。(図3)。

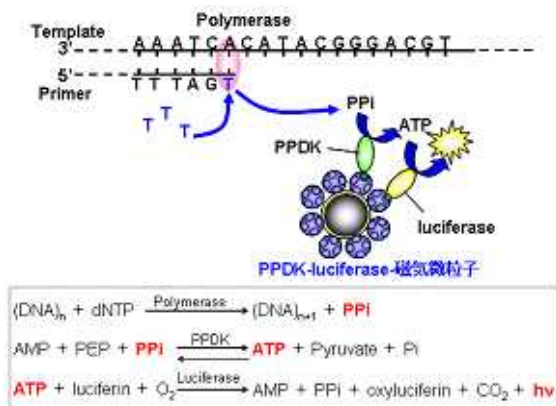


図3 PPKD-luciferase-磁気微粒子の模式図

その結果、PPKD 及び luciferase をタンパク量比 1:5 で導入した際に、最も高い S/N 比が得られた。また、この PPKD-luciferase-磁気微粒子を用いて、ピロリン酸検出を繰り返したところ、発光強度の低下は見られず、粒子上の酵素の安定性が確認された。これはパイロシーケンシングのプラットフォームとして使用可能で、かつ、繰り返し使用可能なためコスト低減にも有効である。さらに、遺伝子操作技術を用いて、比活性が高く、かつ dATP に対する反応性が低い酵素の取得にも成功し、よりパフォーマンスの高い改良 luciferase を作製した。

(6)パイロシーケンシング法における読み取りエラー発生シミュレータの開発(秋山、神原)

- ・配列読み取りを支援する情報技術
- (a)パイロシーケンシング法シミュレータ
パイロシーケンシング法は、一度に大量の配列をシーケンシングできる一方、長い配列のシーケンシングを進めていく過程で、不完全塩基対形成や、余剰塩基除去ミスなどにより、特有の読み取り誤差が入る傾向がある。同シーケンシング法における配列読み取りエラーの発生過程を詳細に研究する目的で、ソフトウェアシミュレータ SimPyro を独自に設計し、完成させた。
- ・配列断片のゲノム貼り付けの情報技術
- (c)動的計画法による高速な精密貼り付け
GPGPU (汎用的なグラフィックプロセッサ

ード)の利用による高速なマッピングシステムを設計、開発した。

- ・既存情報との比較を行う情報解析技術
- (e)既存ソフトの活用による情報解析
計測データを基に遺伝子発現分布などを求めるための情報解析環境を構築した(図4)。

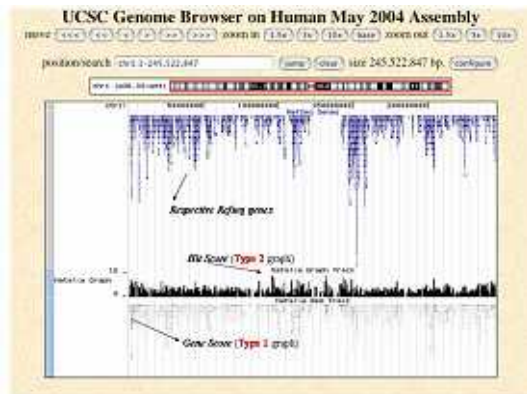


図4 情報解析プラットフォーム画面例

(f)情報解析プラットフォームの新規構築
既存のデータベースへの相同性検索や、モチーフ解析などを、網羅的に行うためのプロトタイプソフトウェアを開発した。複数のデータに関する相同性検索などの処理を一括して予約でき、計算はネットワーク上に接続された強力なコンピュータを呼び出して順次行うことができる。

(7)光シグナルタンパク質を利用した非侵襲的細胞内 mRNA 検出法の開発(小島)
破壊検査に加えて非破壊 mRNA 検査技術を開発して比較することは、データの精度を上げる上で重要である。そこで、化学合成した蛍光修飾プローブを使用せず、細胞内で産生可能なコンポーネントのみを利用した mRNA 検出法の開発を試みた。これは非破壊かつ非侵襲的な mRNA 検出法として長期にわたる時間的な mRNA 解析が可能になると考えた。特定 mRNA 配列に結合し安定化するペプチドを利用して、FRET プローブを開発した。その検出限界は 2.5 nM であり、その他の FRET を利用したタンパク質プローブと比較しても非常に低い検出限界を持つことが示された。さらに、蛍光或いは発光活性を有する 2 つのタンパク質プローブと、ターゲット mRNA と相補的な異なる部分配列を有する 2 つの RNA プローブを組み合わせて使用することにより、任意の RNA を高感度に検出できることが明らかになった。

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 68 件)
- Taniguchi K, Kajiyama T, Kambara H. Quantitative analysis of gene expression

with a cDNA library from a single cell. Nature Method (in press) (査読有)

Hosokawa M, Arakaki A, Takahashi M, Mori T, Takeyama H, Matsunaga T. High-density microcavity array for cell detection: single-cell analysis of hematopoietic stem cells in peripheral blood mononuclear cells. Anal Chem. (in press) (査読有)

Zhang X, Wu H, Chen Z, Zhou G, Kajiyama T, Kambara H. Dye-free gene expression determination by sequence-tagged reverse-transcription polymerase chain reaction coupled with pyrosequencing. Anal Chem, 81: 273-281, 2009. (査読有)

Yoshino T, Nishimura T, Mori T, Suzuki S, Kambara H, Takeyama H, Matsunaga T. Nano-sized bacterial magnetic particles displaying pyruvate phosphate dikinase for pyrosequencing. Biotechnol Bioeng, 103: 130-137, 2009. (査読有)

Lin Z, Takahashi Y, Murata T, Takeda M, Ino K, Shiku H, Matsue T. Electrochemical gene-function analysis for single cells with addressable electrode/microwell arrays, Angew Chem Int Ed, 48: 2044-2046, 2009. (査読有)

Chang CY, Murata T, Takahashi Y, Shiku H, Chang HC, Matsue T. Entrapment and measurement of a biologically functionalized microbead with a microwell electrode. Lab Chip, 9: 1185-1192, 2009. (査読有)

Takahashi Y, Miyamoto T, Shiku H, Asano R, Yasukawa T, Kumagai I, Matsue T. Electrochemical detection of epidermal growth factor receptors on a single living cell surface by scanning electrochemical microscopy. Anal Chem, 81: 2785-2790, 2009. (査読有)

Andou T, Endoh T, Mie M, Kobatake E. RNA detection using peptide-inserted Renilla luciferase. Anal Bioanal Chem, 393: 661-668, 2009. (査読有)

Arakawa H, Karasawa K, Munakata E, Obinata R, Maeda M, Suzuki S, Kamahori M, Kambara H. Development of bioluminescent pyrophosphate assay using pyruvate phosphate dikinase and its application to single-nucleotide polymorphism analysis. Anal Biochem, 379: 86-90, 2008. (査読有)

Matsunaga T, Hosokawa M, Arakaki A, Taguchi T, Mori T, Tanaka T, Takeyama H. High-efficiency single-cell entrapment and fluorescence in situ hybridization analysis using a poly(dimethylsiloxane) microfluidic device integrated with a black poly(ethylene terephthalate)

micromesh. Anal Chem, 80: 5139-5145, 2008. (査読有)

Lin Z, Takahashi Y, Kitagawa Y, Uemura T, Shiku H, Matsue T. An addressable microelectrode array for electrochemical detection. Anal Chem, 80: 6830-6833, 2008. (査読有)

Mie M, Shimizu S, Takahashi F, Kobatake E. Selection of mRNA 5'-untranslated region sequence with high translation efficiency through ribosome display. Biochem Biophys Res Commun, 373: 48-52, 2008. (査読有)

Tsukamoto K, Yoshikawa T, Hourai Y, Fukui K, Akiyama Y. Development of an affinity evaluation and prediction system by using the shape complementarity characteristic between proteins. 6: 1133-1156, 2008. (査読有)

Tominaga D, Iguchi F, Horimoto K, Akiyama Y. High-throughput automated image processing system for cell array observations. Information and Media Technologies, 3:71-78, 2008. (査読有)

Taguchi T, Arakaki A, Takeyama H, Haraguchi S, Yoshino M, Kaneko M, Ishimori Y, Matsunaga T. Detection of *Cryptosporidium parvum* oosysts using a microfluidic device equipped with the SUS micromesh and FITC-labeled antibody. Biotechnol Bioeng, 96: 272-280, 2007. (査読有)

Nashimoto Y, Takahashi Y, Yamakawa T, Torisawa Y, Yasukawa T, Ito-Sasaki T, Yokoo M, Abe H, Shiku H, Kambara H, Matsue T. Measurement of gene expression from single adherent cells and spheroids using fast electrical lysis. Anal Chem, 79: 6823-6830, 2007. (査読有)

Tominaga D, Iguchi F, Akiyama Y, Horimoto K. Development of automated image processing procedure for cell-arrays. Proc. of the 11th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics (WMSCI2007), 4:19-24, 2007. (査読有)

Zhou G, Kajiyama T, Gotou M, Kishimoto A, Suzuki S, Kambara H. Enzyme system for improving the detection limit in pyrosequencing. Anal Chem, 78: 4482-4489, 2006. (査読有)

Torisawa Y, Ohara N, Nagamine K, Kasai S, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T. Electrochemical monitoring of cellular signal transduction with secreted alkaline phosphatase reporter system. Anal Chem, 78: 7625-7631, 2006. (査読有)

Tanaka G, Funabashi H, Mie M, Kobatake

E. Fabrication of an antibody microwell array with self-adhering antibody binding protein. Anal Biochem, 350: 298-303, 2006. (査読有)
ほか 48 件

[学会発表](計 80 件)
国際

Kambara H “Development and prospect of DNA analysis technologies -toward future diagnostics “, The Bio Angstrom Day in Uppsala, 2008/11, Sweden

Kambara H “Development and prospect of DNA Analysis technologies -quantitative analysis of mRNA in a single-cell- “, CNSI-CNBI Joint Symposium on Nanobiotechnology 2008, 2008/9, Tokyo University, Tokyo

Kambara H “Development and prospect of DNA analysis technology”, 2007 International Conference on Genomics, 2007/10, Hong Kong Science & Technology Park, Hong Kong

ほか 46 件

国内

神原秀記「DNA シーケンサ開発の歴史と最近の進歩」、電気化学会第 76 回大会(第 47 回化学センサ研究発表会)、2009 年 3 月、京都

神原秀記「ゲノム解析のためのキャピラリーアレーDNA シーケンサの開発」、日本化学会第 89 回春季年会、2009 年 3 月、千葉

神原秀記「DNA 解析技術の発展と 1 細胞中の mRNA の計測」、生命情報工学研究センター 特別講演会、2008 年 12 月、東京

ほか 28 件

[図書](計 14 件)

Guohua ZHOU, Hideki KAMBARA et al., (2007) “Proceedings of the 5th International Forum on Progress on Post-genome Technologies (IFPT 5)”, Phoenix Publishing Media Group and Jiangsu Electronic & Audiovisual Press, PROGRESS ON POST-GENOME TECHNOLOGIES, 542 pages

神原秀記、松永是、植田充美 監修(2006) 「一細胞定量解析の最前線 - ライフサーベイヤー構築に向けて - 」、シーエムシー出版, 271 pages

神原秀記、竹山春子 (2006) 「生体分子群のデジタル精密計測に基づいた細胞機能解析 - ライフサーベイヤーをめざして - 」、月刊 未来材料、6 巻、11 号、pp.52-57

ほか 11 件

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

名称: 「PCR チャンバーの調製方法および PCR キット」

発明者: 松永 是、竹山春子、岡村好子、神原秀記、梶山智晴、白井正敬

権利者: 東京農工大学・日立製作所

種類: 特願

番号: 2009-15456

出願年月日: 2009 年 1 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: ウェルプレートを用いた核酸増幅法

発明者: 杉山寿紀、國府田安彦、河野研二、松永是、竹山春子、岡村好子

権利者: 日立マクセル株式会社

種類: 特願

番号: 2008-285825

出願年月日: 2008 年 11 月 6 日

国内外の別: 国内

名称: 核酸分析用組成物

発明者: 鈴木繁哉、小玉侑加子、黒澤恵子、小畠英理、三重正和

出願人: キッコーマン株式会社

種類: 特願

番号: 2008-043830

出願年月日: 2008 年 2 月 26 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ: <http://www.tuat.ac.jp/~surveyor/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原 秀記 (KAMBARA HIDEKI)

東京農工大学・大学院工学府・講師

研究者番号: 20397011

(2) 研究分担者

竹山 春子 (TAKEYAMA HARUKO)

東京農工大学・大学院工学府・客員教授

研究者番号: 60262234

珠玖 仁 (SHIKU HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10361164

小畠 英理 (KOBATAKE EIRI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号: 00225484

秋山 泰 (AKIYAMA YUTAKA)

東京工業大学・大学院情報理工学研究科・教授

研究者番号: 30243091

(3) 連携研究者

岡村 好子 (OKAMURA YOSHIKO)

早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機構・講師

研究者番号: 80405513