

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07356

研究課題名(和文) 神経変性促進分子「バイセクト糖鎖」の選択的発現機構と作動原理の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of expression and action of neurodegeneration-promoting glycan bisecting GlcNAc

研究代表者

木塚 康彦 (Kizuka, Yasuhiko)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・准教授

研究者番号：20564743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経系の糖鎖の発現と機能を明らかにするものである。特にアルツハイマー病を促進するバイセクト糖鎖や関連する糖鎖構造に着目している。本研究による主な成果として、バイセクト糖鎖の発現とも関連の深い糖鎖分岐構造GnT-Vの立体構造を世界で初めて明らかにした(Nagae et al., Nat. Commun., 2018)。また、バイセクト糖鎖の欠損マウスの脳では、N型糖鎖の末端構造がおしなべて増加していることを発見し(Nakano et al., Mol. Cell. Proteomics, 2019)、バイセクト糖鎖がN型糖鎖の成熟を抑制する働きがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、バイセクト糖鎖のN型糖鎖抑制因子としての生理機能が明らかになったとともに、バイセクト糖鎖の発現にも関わるGnT-Vの立体構造を世界に先駆けて解明した。バイセクト糖鎖はアルツハイマー病の発症や進行と深く関わり、アルツハイマー病患者でその発現量が増加していることから、患者脳で本糖鎖が発現することの意義の解明に近づいたと言える。またGnT-Vはがんの悪性化を引き起こす糖鎖分岐構造を形成することから、その立体構造の解明によってがんの悪性化を抑える化合物のデザインが可能になった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanisms of expression and functions of neural glycans. In particular, we focus on bisected glycans which have been found to promote Alzheimer's disease. Major achievements of this project are as follows. 1) We for the first time solved the 3D structure of N-glycan branching enzyme, GnT-V, that is highly related to the expression of bisected glycans (Nagae et al., Nat. Commun., 2018). 2) We revealed that several terminal structures of in N-glycans are commonly increased in the brain of the mutant mice lacking bisected glycans, demonstrating a novel function of bisected glycans as a suppressor of N-glycan maturation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖生物学 糖鎖 bisecting GlcNAc バイセクト糖鎖 脳 HNK-1 GnT-V PRMT1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の半数以上のタンパク質は糖鎖を持っている。この最も豊富な翻訳後修飾である糖鎖付加が、発生・免疫・神経機能など、生体の基礎をなす生命現象に深く関わることは想像に難くない。糖鎖には様々な構造のものが存在しているが、それぞれの糖鎖の発現は細胞ごと、タンパク質ごとに厳密に制御されている。そして各糖鎖の付加異常は生体の恒常性を乱し、末端の一つの糖が欠損・付加するだけで癌・アルツハイマー病(AD)・糖尿病・COPD など、現代人を脅かす疾患を引き起こすことが知られている(Ohtsubo et al., *Cell* 2006, 126, 855. Taniguchi and Kizuka, *Adv. Cancer Res.* 2015, 126, 11)。このことから、糖鎖の発現機構と機能をさらに理解し、それを医療応用することは、現代生物学が解決すべき基本的かつ重要な課題の一つである。

代表者はこれまで一貫して、神経系における糖鎖の発現と機能に関する研究を続けてきた。神経系は他の組織には見られない特徴的な機能糖鎖を発現しており、HNK-1 やポリシアル酸といった神経特異的糖鎖は記憶・学習や神経ネットワーク形成などの神経高次機能に必須である(Kizuka and Oka, *Cell. Mol. Life Sci.* 2012, 69, 4135)。また神経特異的糖鎖の発現不全は認知症・統合失調症・脱髄疾患など、様々な神経疾患を引き起こすことも明らかになっている(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.* 2015, 7, 175)。代表者は、こうした神経系糖鎖の発現が様々なレベルで厳密に制御されていることを見出してきた。例えば生合成酵素遺伝子のエピジェネティックな転写調節(Kizuka et al., *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 31337-46; *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 11253)、生合成酵素のゴルジ体局在制御(Kizuka et al., *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 9247)、生合成酵素のヘテロ複合体による活性調節(Kizuka et al., *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 13644; Kouno and Kizuka et al., *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 31337) などである。また機能的なアウトプットとして最近、「バイセクト糖鎖」(図 2 左上)と呼ばれる神経に豊富に存在する糖鎖を欠損させると、アルツハイマー病(AD)の原因となる A $\beta$  ペプチドの産生が劇的に抑制され、AD 病態が大幅に改善されることを見出した(Kizuka et al., *EMBO Mol. Med.* 2015; *Biochem J.* 2016; *FEBS Lett.* 2015)(図 2 右)。そしてこの原因が、A $\beta$  ペプチドを産生する BACE1 プロテアーゼの機能抑制であり、BACE1 が選択的にバイセクト糖鎖を持つ糖タンパク質であること(図 2 左下)、AD 患者で BACE1 上のバイセクト糖鎖の発現量が上昇していることも明らかにした。これらの事実は、バイセクト糖鎖が神経変性に促進的に働く糖鎖であり、バイセクト糖鎖生合成酵素 GnT-III が AD の新規治療ターゲットとなりうることを示している。本研究ではこの神経変性関連糖鎖に着目し、その選択的発現と作動原理の解明に迫る。

### 2. 研究の目的

糖鎖生物学においては未解明の大きな疑問が 2 つある。1 つは「糖鎖発現の恒常性メカニズム」であり、2 つ目は「糖鎖機能の作用原理」である。1 つ目の糖鎖発現について、糖鎖の配列情報は直接ゲノムにはコードされておらず、糖鎖は糖転移酵素によって作られる遺伝子の二次産物であるため、糖鎖の発現はゲノム・エピゲノム・酵素・細胞内糖代謝など、様々なレベルで制御を受ける。それらのうちいずれかが破綻すると糖鎖の発現異常を通じて疾患を引き起こすと考えられるが、糖鎖の発現恒常性、発現異常のメカニズムについてはあまりにも不明な点が多い。2 つ目の糖鎖の作動原理についても、膨大な数の糖鎖構造が存在することがわかっているにもかかわらず、ほとんどの糖鎖については、明確な結合相手や機能発揮プロセスがわからない現状がある。本研究では、こうしたこれまでの糖鎖科学が抱えてきた疑問の解決を目指す。対象としては、自身がこれまで解析を行ってきた“神経変性促進因子”である「バイセクト糖鎖」に焦点を絞り、その生理的・病的な発現メカニズムと機能の分子基盤を明らかにすることを目的とする。これにより、アルツハイマー病の病態形成メカニズムの解明や新規治療薬の開発への寄与を目指し、基礎科学・医学の発展に資する基礎研究を推進したい。

### 3. 研究の方法

本研究では、バイセクト糖鎖および関連する神経糖鎖の発現機構と作動原理を明らかにするため、以下のアプローチで研究を進めた。1) バイセクト糖鎖および関連する糖鎖の生合成酵素の阻害剤や活性制御化合物の探索のため、ケミカルバイオロジーのアプローチで酵素の立体構造を明らかにすること、2) バイセクト糖鎖などの特異的な糖鎖により機能が調節されている糖タンパク質(SOD3 など)に焦点を絞り、それらの糖鎖構造の詳細とタンパク質機能との関係性を生化学的に明らかにすること。3) バイセクト糖鎖生合成酵素(GnT-III)欠損マウスで起きる変化を明らかにし、バイセクト糖鎖の生理的意義を明らかにすること。4) バイセクト糖鎖などの機能性糖鎖の発現を制御する新しい因子を同定すること。これらの解析により、バイセクト糖鎖および関連する糖鎖がどのように発現制御され、どのように機能するのか、という問いの答えを明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究では、ケミカルバイオロジーのアプローチを用い、糖鎖の発現や機能の解析に資する新しい化合物として、6-アルキニルフコースと呼ばれる糖のアナログが、フコシル化糖鎖の合成阻害剤として働き、細胞の機能を調節できることを明らかにした(Kizuka et al., *Cell Chem. Biol.*, 2017)。本化合物はがん細胞の浸潤能を抑制することから、本アプローチにより糖鎖構造を制御することにより、がんの悪性化をコントロールする可能性が示された。また、EC-SOD(SOD3)と呼ばれる抗酸化に関わる糖タンパク質の機能が、糖鎖構造によって厳密に制御されていることを見出し(Ota et al., *Glycobiology*, 2017)、疾患と糖鎖に関する新たな知見が得られた。さらに、バ

バイセクト糖鎖の発現とも関わりがんと関連の深い N 型糖鎖分岐酵素 GnT-V の立体構造を東京大学の長江博士との共同で世界で初めて明らかにし、*Nat. Commun.* 誌に発表した。GnT-V はがんを悪性化する酵素としてよく知られており、本成果により糖鎖を標的としたがんの悪性を抑制する候補化合物のデザインが可能となった。また鹿児島大学の原田博士らとの共同で、エクソソームなどの細胞外小胞の糖鎖発現プロファイルを明らかにした (Harada et al., *BBA, FEBS Lett.*, 2018)。また、バイセクト糖鎖の合成酵素である GnT-III (Mgat3) 欠損マウスの脳における糖鎖構造解析を広島大学の中の三弥子博士と進め、GnT-III の欠損によって、シアル酸、ルイス型フコース、HNK-1 などの N 型糖鎖の末端構造がおしなべて増加することを明らかにした。またその原因として、これら糖鎖末端構造を生合成する酵素が、共通して、バイセクト型の糖鎖構造を基質として好まないことを見出した。このことは、バイセクト糖鎖が、N 型糖鎖の末端修飾を一般に抑制するブレーキ役としての生理機能を有することを示している。以上の成果は *Mol. Cell. Proteomics* 誌に発表した。また神経系の糖鎖の発現を負に制御する因子として、新たにアルギニンメチル化酵素 1 (PRMT1) を同定し、PRMT1 欠損マウスの脳で HNK-1 糖鎖の発現が上昇していること、そのメカニズムとして、HNK-1 合成酵素や HNK-1 キャリアタンパク質の mRNA 発現が KO マウスで増加していることなどを明らかにした。本成果は、アルギニンのメチル化による糖鎖発現制御という、新規のクロストークメカニズムの存在を世界で初めて示した。

また、これらの成果の一部は、*Cell. Immunol.* 誌、*TIGG* 誌、*Int. J. Mol. Sci.* 誌に総説論文として発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Misuzu, Hirata Tetsuya, Yonekawa Chizuko, Takeichi Kaho, Fukamizu Akiyoshi, Nakagawa Tsutomu, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1864
2. 論文標題 Region-specific upregulation of HNK-1 glycan in the PRMT1-deficient brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129509 ~ 129509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.129509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Miyako, Mishra Sushil K., Tokoro Yuko, Sato Keiko, Nakajima Kazuki, Yamaguchi Yoshiki, Taniguchi Naoyuki, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Bisecting GlcNAc Is a General Suppressor of Terminal Modification of N-glycan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Proteomics	6. 最初と最後の頁 2044 ~ 2057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/mcp.RA119.001534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagae Masamichi, Yamaguchi Yoshiki, Taniguchi Naoyuki, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 437 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kizuka Yasuhiko	4. 巻 31
2. 論文標題 Regulated Expression and Disease Relevance of Neural Glycans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 SE89 ~ SE90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1942.2SE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Yoichiro, Kizuka Yasuhiko, Tokoro Yuko, Kondo Kiyotaka, Yagi Hirokazu, Kato Koichi, Inoue Hiromasa, Taniguchi Naoyuki, Maruyama Ikuro	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 N glycome inheritance from cells to extracellular vesicles in B16 melanomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Yoichiro, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Kizuka Yasuhiko, Yagi Hirokazu, Yamamoto Mika, Kondo Kiyotaka, Inoue Hiromasa, Kato Koichi, Taniguchi Naoyuki, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Maruyama Ikuro	4. 巻 1863
2. 論文標題 Generation of the heterogeneity of extracellular vesicles by membrane organization and sorting machineries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 681 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.01.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagae Masamichi, Kizuka Yasuhiko, Mihara Emiko, Kitago Yu, Hanashima Shinya, Ito Yukishige, Takagi Junichi, Taniguchi Naoyuki, Yamaguchi Yoshiki	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-05931-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kizuka Yasuhiko	4. 巻 31
2. 論文標題 Detection and Modulation of Fucosylated Glycans using Fucose Analogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E1 ~ E6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1757.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kizuka Yasuhiko, Mishra Sushil, Yamaguchi Yoshiki, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 333
2. 論文標題 Implication of C-type lectin receptor langerin and keratan sulfate disaccharide in emphysema	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 80 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2018.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Fumi, Hirayama Tetsuya, Kizuka Yasuhiko, Yamaguchi Yoshiki, Fujinawa Reiko, Nagata Masahiro, Ismanto Hendra S., Lepenies Bernd, Aretz Jonas, Rademacher Christoph, Seeberger Peter H., Angata Takashi, Kitazume Shinobu, Yoshida Keiichi, Betsuyaku Tomoko, Kida Kozui, Yamasaki Sho, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 High affinity sugar ligands of C-type lectin receptor langerin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2018.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ota Fumi, Kizuka Yasuhiko, Nakano Miyako, Yamaguchi Yoshiki, Kitazume Shinobu, Ookawara Tomomi, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Sialylation of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) enhances furin-mediated cleavage and secretion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwx087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kizuka Yasuhiko, Nakano Miyako, Yamaguchi Yoshiki, Nakajima Kazuki, Oka Ritsuko, Sato Keiko, Ren Chien-Tai, Hsu Tsui-Ling, Wong Chi-Huey, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 An Alkynyl-Fucose Halts Hepatoma Cell Migration and Invasion by Inhibiting GDP-Fucose-Synthesizing Enzyme FX, TSTA3	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1478.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2017.08.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kizuka Yasuhiko、Kitazume Shinobu、Taniguchi Naoyuki	4. 巻 1861
2. 論文標題 N-glycan and Alzheimer's disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 2447 ~ 2454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2017.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 がん・アルツハイマー病に關与する糖転移酵素の構造と機能
3. 学会等名 第8回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 N型糖鎖の枝分かれ構造の生合成と疾患との關連性
3. 学会等名 第3回名大医薬系3部局交流シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 糖鎖の枝分かれ構造の生化学
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部 第184回例会 若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 糖鎖生物学を研究する上でのデータベースへの期待
3. 学会等名 トーゴの日シンポジウム2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 糖アナログを用いた糖鎖機能の追跡と改変
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 糖アナログを利用した糖鎖機能の追跡と改変
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kizuka Y., Nakano M., Taniguchi N
2. 発表標題 Inhibitory roles of bisecting GlcNAc in terminal modifications of N-glycan
3. 学会等名 The 11th International Symposium on Glycosyltransferases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kizuka Y., Nakano M., Taniguchi N
2. 発表標題 Regulation of terminal N-glycan modifications by bisecting GlcNAc
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society for Glycobiology. 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 神経系糖鎖の発現・機能解析とケミカルツールの開発
3. 学会等名 ConBIO2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木塚康彦、谷口直之
2. 発表標題 フコース誘導体を用いたグライコケミカルバイオロジー
3. 学会等名 ConBIO2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuhiko Kizuka
2. 発表標題 Detection and disease involvement of bisecting GlcNAc and fucosylated glycans
3. 学会等名 Internaltional Symposium, Systems Glycobiology and Beyond (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木塚康彦
2. 発表標題 N型糖鎖のbisecting GlcNAc修飾に関する研究
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第14回若手のカフォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kizuka Y., Funayama S., Nakano M., Nakajima K., Yamaguchi Y., Kitazume S., Ren ST., Hsu TL., Wong CH., Taniguchi N
2. 発表標題 Glyco-chemical biology using fucose analogs
3. 学会等名 XXIV International Symposium on Glycoconjugates
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木塚康彦、中の三弥子、北爪しのぶ、谷口直之
2. 発表標題 Bisecting GlcNAcが持つN型糖鎖末端の修飾抑制機能
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kizuka Y., Nakano M., Taniguchi N
2. 発表標題 Suppressive effects of bisecting GlcNAc on terminal modifications of N-glycans
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society for Glycobiology
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

がん悪性化に関する糖鎖合成酵素GnT-Vの構造を解明  
<https://www.gifu-u.ac.jp/about/publication/press/20180821.pdf>  
研究室HP  
[https://www1.gifu-u.ac.jp/~kizuka\\_2/](https://www1.gifu-u.ac.jp/~kizuka_2/)  
[https://www1.gifu-u.ac.jp/~kizuka\\_2/publication.html](https://www1.gifu-u.ac.jp/~kizuka_2/publication.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中の 三弥子  (Nakano Miyako)		
研究協力者	長江 雅倫  (Nagae Masamichi)		
研究協力者	中嶋 和紀  (Nakajima Kazuki)		
研究協力者	橋本 美涼  (Hashimoto Misuzu)		
研究協力者	原田 陽一郎  (Harada Yoichiro)		